

Patrícia Peres

Análise Funcional Integrada com Modelagem Molecular da Hemoglobina Catódica do Peixe

Hoplosternum littorale



*



1910001280





Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Patrícia Peres

**ANÁLISE FUNCIONAL INTEGRADA COM MODELAGEM
MOLECULAR DA HEMOGLOBINA CATÓDICA DO PEIXE
*HOPLOSTERNUM LITTORALE***

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

Orientador:

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior

São José do Rio Preto- SP

2004

PATRICIA PERES

**ANÁLISE FUNCIONAL INTEGRADA COM
MODELAGEM MOLECULAR DA HEMOGLOBINA
CATÓDICA DO PEIXE *HOPLOSTERNUM
LITTORALE***

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior



1.1.280/04

São José do Rio Preto- SP

2004



+547.963.4
P437a

20804008 3

PATRICIA PERES

ANÁLISE FUNCIONAL INTEGRADA COM
MODELAGEM MOLECULAR DA HEMOGLOBINA
CATÓDICA DO PEIXE *HOPLOSTERNUM*
LITTORALE

Peres, Patricia.

Análise funcional integrada com modelagem molecular da hemoglobina catódica do peixe *Hoplosternum littorale* / Patricia Peres. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
96 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Walter Filgueira de Azevedo Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Hemoglobina. 3. Teleósteos. 4. Biofísica molecular. 5. Iso-hemoglobina. 6. Estresse osmótico. 7. Modelagem molecular. I. Azevedo Júnior, Walter Filgueira. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 547.963.4



1. 547.963.4

São José do Rio Preto - SP

2004

PATRICIA PERES

**ANÁLISE FUNCIONAL INTEGRADA COM
MODELAGEM MOLECULAR DA HEMOGLOBINA
CATÓDICA DO PEIXE *HOPLOSTERNUM*
*LITTORALE***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Prof. Dr. Valmir Fadel

São José do Rio Preto, 12 de Março de 2004.



Agradecimentos

Agradeço ao Deus pai por toda a bênção que me deu durante toda a minha

vida.

Ao Prof. Dr. Walter Figueira da Fonseca Junior, pela orientação

e pelo incentivo profissional e científico proporcionado durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonfatti Rodriguez, pela valiosa

orientação e incentivo ao longo da minha vida acadêmica e profissional, e também pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho. É uma honra poder compartilhar os resultados desta qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcos Francisco Coimbra, pelas sugestões e

ajuda durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo André Antunes, pela orientação e pelo

apoio durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Drs. João Rogério e João Roberto Siqueira, pela

orientação e pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto pela orientação durante a minha

realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Dr. Cleusa R. Santa Lucia, pela orientação e pelo

apoio durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física e aos colegas

importantes amigos, amigos e familiares.

Aos meus pais, pelos valores transmitidos durante

minha vida.

toda minha vida e ao querido Marcos por todo estímulo e carinho dedicado durante esses anos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela força espiritual durante toda minha vida.

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, pela orientação e pelo crescimento profissional e científico proporcionado durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela valiosa dedicação e colaboração sem a qual a realização deste trabalho não seria possível e, sobretudo, pela amizade. E ainda, pela colaboração no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo pelas sugestões e amizade dispensada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey pela amizade e pela acolhida desde o primeiro momento.

Aos Profs. Drs. João Ruggiero e José Roberto Ruggiero pela amizade e pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Eloi Feitosa pela orientação dedicada em minha iniciação científica e pela amizade.

A Dra. Claudia R. Bonini Domingos, pela colaboração crítica e atenciosa no exame de qualificação.

Aos demais professores do departamento de física, e não menos importantes, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Aos Profs. membros da banca examinadora, meu muito obrigado.



Aos funcionários pela pronta ajuda e paciência: Ilva Cecílio Bernades, Paulo Salinas, Antônio Barbosa, Eliani Nobuco I. Ohira e Rosemar R. de Carvalho Brena.

Ao amigo, Uderlei D. Covissi por me mostrar o caminho da ciência.

Aos amigos, Hamilton Cabral, Fabio Renato Lombardi e Fernanda Canduri, pela ajuda em incontáveis momentos, pela paciência e pela amizade.

Aos colegas Marcio Vinícius, Luciana Moro, Fátima, Fausto, Shirley, Fernanda, Sabrina, Priscila, Bernadete, Renato Caetano, Renato, Cristiane, André, Diogo, Sidney, Márcia e Ricardo, pela amizade.

Aos colegas do grupo, Henrique, Denis, Valmir, Nelson, Hugo, Guilherme, Luciana, Helen, Ana Helena, Karisa, Alexandre, Nathalia, Mariane, José Renato e Danilo, pela harmoniosa convivência.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, Patrícia, Cecília, Adriana, Rejane, Débora e Ana Lúcia, pela ajuda em vários momentos e pela amizade em todos.

Aos demais colegas dos departamentos de física e química, indistintamente, meu muito obrigado.

Aos departamentos de física e química e ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP) por propiciar minha formação científica e pelo apoio e disposição.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Marcos, pelo incentivo, ajuda, encorajamento, paciência, amor e carinho.



Aos meus pais e minha irmã, com toda gratidão.



"A mente que se abre a uma nova
idéia jamais volta ao seu tamanho
original."

(Albert Einstein)

Índice Geral

Índice Geral	i
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas e Quadros	ix
Lista de Abreviações	x
Resumo	1
Abstract	3
1. Introdução	5
1.1 Aspectos Gerais	5
1.1.1 Estruturas Protéicas	5
1.2 Hemoglobinas	7
1.2.1 A ligação Cooperativa do Oxigênio	9
1.2.2 Mecanismo da Cooperatividade da Ligação do Oxigênio	13
1.2.3 Efetores Alostéricos	15
1.2.3.1 Efeito do 2,3 Bifosfoglicerato (BPG)	16
1.2.3.2 Efeito Bohr	17
1.2.3.3 Efeito de CO ₂	18
1.2.3.4 Efeito da Atividade de Água	19
1.2.3.5 Efeito do Íon Cloreto	22
1.2.4 Mecanismos para Interação Alostérica	23
1.2.4.1 Mecanismo Concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC)	24



1.2.4.2 O Modelo Seqüencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF)	25
1.2.5 A Existência de Estados Intermediários da Hb durante a sua Oxigenação	25
1.3 Mecanismo de Absorção de O ₂ em Peixes	26
2. Objetivos	29
3. Materiais e Métodos	31
3.1 Purificação das Hb ^{ct} e Hb ^{an} do peixe <i>H. littorale</i>	31
3.1.1 Obtenção dos Espécimes	31
3.1.2 Coleta e Processamento do Sangue	31
3.1.3 Focalização Isoelétrica	33
3.2 Cristalização das Hemoglobinas	34
3.3 Coleta de Dados para os Cristais das Hbs	35
3.4 Modelagem Molecular Comparativa da Hb ^{ct}	36
3.5 Avaliação das Mudanças Conformacionais das Hb ^{ct} e Hb ^{an} pelo Método de Estresse Osmótico	38
3.6 Titulação das Hb ^{ct} com ATP	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1 Separação das Iso-hemoglobinas	43
4.2 Cristalização	44
4.2.1 Cristalização das Hb ^{ct} e Hb ^{an} do Peixe <i>Hoplosternum littorale</i>	44
4.3 Coleta de Dados de Difração de Raios X	45
4.4 Modelagem Molecular Comparativa	46



4.4.1 Qualidade dos Modelos	46
4.4.2 Descrição Geral	49
4.4.3 Interface $\alpha_1\beta_2$	55
4.4.4 Interface $\alpha_1\beta_1$	58
4.5 Avaliação das Mudanças Conformacionais das Hb ^{ct} e Hb ^{an} pelo Método de Estresse Osmótico	60
4.5.1 Hemoglobina Catódica	60
4.5.2 Hemoglobina Anódica	67
4.6 Cálculo das Constantes de Associação de ATP às formas Oxigenada e Desoxigenada da Hb ^{ct}	73
5. Conclusão	76
6. Referências Bibliográficas	78
7. Anexos	88
Anexo 1	88
1. Determinação de Oxi e Meta-Hb	88
Anexo 2	90
2. Cristalização de Macromoléculas Biológicas	90
2.1 Introdução	90
2.2 Princípios Gerais para Cristalização de Macromoléculas	91
2.2.1 Pureza da Macromolécula	91
2.2.2. Estabilização e Armazenagem	91
2.2.3 Nucleação, Crescimento e Cessação de Crescimento	91



2.2.4	Conceitos sobre solubilidade	92
2.2.4.1	Salting-in e Salting-out	92
2.2.5	Diagrama de Fase de Macromoléculas Biológicas	92
2.2.6	Fatores que Influenciam o Crescimento de Cristais	94
2.3	Técnicas de Cristalização de Macromoléculas Biológicas	95
2.3.1	Cristalização em <i>Batch</i>	95
2.3.2	Cristalização por Difusão de Vapor	95
2.4	Método da matriz Esparsa	96
2.5	Montagem dos cristais para Coleta de Dados	97
Anexo 3		98
3.	Procedimento para a Correção da Pressão Barométrica	98

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da ligação peptídica	5
Figura 2. Uma porção da cadeia polipeptídica indicando o grau torcional de liberdade de cada unidade peptídica	5
Figura 3. Um diagrama de Ramachandran mostrando os ângulos ϕ e ψ estericamente permitidos	6
Figura 4. Representação da molécula de hemoglobina	8
Figura 5. Representação do grupo heme	9
Figura 6. Curvas de dissociação da mioglobina e hemoglobina. A saturação dos sítios de ligação de oxigênio é mostrada como função da pressão parcial de oxigênio	10
Figura 7. Representação do gráfico de Hill para as moléculas de mioglobina e a hemoglobina	13
Figura 8. Representação esquemática da translação da hélice F com a oxigenação da hemoglobina	14
Figura 9. Diagrama esquemático mostrando as mudanças na estrutura quaternária durante a oxigenação	15
Figura 10. Representação esquemática da molécula de Hb humana ligada á molécula de 2,3 Bifosfoglicerato (BPG)	17
Figura 11. Efeito do pH na afinidade da hemoglobina	18



Figura 12. Representação da passagem da hemoglobina do estado T_x para o R, na presença de um intermediário T_0	26
Figura 13. Foto de um espécime do peixe <i>H. littorale</i>	32
Figura 14. Esquema mostrando a montagem de uma gota de cristalização, utilizando-se o método de difusão de vapor	35
Figura 15. Coluna cromatografia de troca iônica, mostrando o padrão de separação dos componentes do sistema de hemoglobina do peixe <i>H. littorale</i>	43
Figura 16. Foto do gel de isoeletrofocalização em agarose	43
Figura 17. Foto dos cristais da hemoglobina catódica (Hb^{ct}) na forma oxigenada	44
Figura 18. Fotos dos cristais da Hb^{an} na forma carbomonoxi	45
Figura 19. Alinhamento das sequências de <i>P. bernaacchii</i> e <i>H. littorale</i> . (a) cadeia α e (b) cadeia β	47
Figura 20. Gráfico de Ramachandran dos modelos gerados para hemoglobina catódica do peixe <i>H. littorale</i> , na forma oxigenada (a) e desoxigenada (b)	48
Figura 21. Diagrama em fitas da hemoglobina catódica no estado oxigenado (R) e desoxigenado (T) do peixe <i>H. littorale</i>	50
Figura 22. Comparação estereoscópica da região do heme	52
Figura 23. Representação do potencial eletrostático de superfície para os monômeros $\beta_1\beta_2$, para a Hb^{ct} na forma oxigenada e na desoxigenada	53

Figura 24. Representação dos resíduos de aminoácidos envolvidos nos sítios, convencional e adicional de fosfato 55

Figura 25. Comparação das estruturas de H.littorale Hb (preto) e P. bernachii (cinza) na forma oxigenada (a) e desoxigenada (b) na interface $\alpha_1\beta_2$ após a sobreposição dos tetrâmeros 56

Figura 26. Comparação das estruturas de H.littorale Hb (preto) e P. bernachii (cinza) na forma oxigenada (a) e desoxigenada na interface $\alpha_1\beta_1$, após sobreposição dos tetrâmeros 59

Figura 27. Gráficos da dependência de $\ln(P_{50})$ com a atividade de água $\ln(a_w)$. Experimentos realizados nas diversas condições experimentadas, com 60 μM /heme de Hb^{ct} em Hepes 30 mM pH 7,5 a 20°C 63

Figura 28. Gráficos da dependência de n_{50} com a atividade de água $\ln(a_w)$ na condição *stripped* e na presença de 0,1 e 1 mM de ATP (a) 100 mM de NaCl e 100 mM de NaCl + 1mM de ATP(b). Representação gráfica para a molécula de Hb^{ct}. Experimentos realizados em, pH 7,5 a 20 °C 66

Figura 29. Gráficos da dependência de $\ln(P_{50})$ com a atividade de água $\ln(a_w)$. Experimentos realizados nas diversas condições experimentadas, com 60 μM /heme de Hb^{an} em Hepes 30 mM pH 7,5 a 20°C 69

Figura 30. Gráficos da dependência de n_{50} com a atividade de água $\ln(a_w)$ na presença de 0,1 mM de ATP, 100 mM de NaCl e 100 mM de NaCl + 1mM de ATP (a) e 1mM de ATP e na condição *stripped* (b). Representação gráfica para a

molécula de Hb^{ct} . Experimentos realizados em, pH 7,5 a 20 °C	72
--	----

Figura 31. Variação da afinidade de oxigênio da Hb^{ct} em função da concentração de ATP, que varia de 0 a 35 mM. O símbolo $\bigcirc$ representa o valor de $\log P_{50}$ na ausência de ATP	74
---	----

Figura 32. Representação de Macromolécula sem íons dissolvidos (1) e com íons dissolvidos (2), mostrando o efeito dos íons na sua solubilidade	93
--	----

Figura 33. Diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.	94
---	----

Figura 34. Representação dos processos de Difusão de Vapor	96
--	----

Índice de Tabelas e Quadros

Tabela 1. Valores de RMSD dos átomos da cadeia principal obtidos por sobreposição dos segmentos em conformação α -hélice (BGH) dos modelos gerados oxi e desoxi contra estruturas cristalográficas depositadas no PDB (Protein Data Bank) 50

Tabela 2. Valores referentes às distâncias entre His proximal e distal e o átomo de ferro do grupamento heme. Comparação entre as estruturas modeladas e estruturas resolvidas experimentalmente por cristalografia 51

Tabela 3. Dependência da afinidade da Hb^{ct} em função da atividade de água 61

Tabela 4. Dependência da afinidade da Hb^{an} em função da atividade de água 63

Tabela 5. Parâmetros da ligação heterotrópica de moléculas de água para Hb^{ct} 68

Tabela 6. Parâmetros da ligação heterotrópica de moléculas de água Hb^{an} 70

Quadro 1. Variação dos coeficientes de extinção molar de acordo com o pH 89

Quadro 2. Coeficiente de extinção molar da oxi-Hb ($\times 10^4$) 90



Lista de Símbolos e Abreviações

Hb	Hemoglobina
CO ₂	Monóxido de Carbono
BPG	2,3-Bifosfoglicerato
O ₂	Oxigênio
ATP	Adenosinatrifosfato
IPP	Inositolpentafosfato
Y	Saturação fracional
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
P ₅₀	Pressão parcial para saturar 50% dos sítios de ligação
Oxi-Hb	Hemoglobina oxigenada
Desoxi-Hb	Hemoglobina desoxigenada
a _w	Atividade de água
Hb ^{ct}	Hemoglobina catódica
Hb ^{an}	Hemoglobina anódica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ABS	Absorbância
n ₅₀	Coeficiente de Hill
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
PEG	Polietilenoglicol
T ₀	Estado intermediário da desoxigenação da Hemoglobina
T _x	Estado desoxigenado clássico
Δn _w	Variação do número de moléculas de água
Δn _s	Variação do número de moléculas de soluto
Osm	Osmolalidade
K ₀	Constante de associação de ATP ao estado oxigenado da Hb
K _D	Constante de associação de ATP ao estado desoxigenado da Hb
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron



Resumo

Muitos peixes apresentam iso-hemoglobinas (isoformas de Hbs), as quais eventualmente exibem uma grande variedade no comportamento funcional quando comparado com as hemoglobinas de mamíferos, em termos de cooperatividade na ligação do ligante e controle alostérico exercido por uma variedade de fatores químicos, tais como H^+ , Cl^- , CO_2 , 2,3-bifosfoglicerato (BPG) e água.

O sangue do peixe *Hoplosternum littorale* mostra duas hemoglobinas, uma com migração eletroforética catódica e outra anódica. Tais hemoglobinas foram investigadas com relação ao efeito de solvatação, por aplicação do método de estresse osmótico, e com relação à constante de ligação de adenosina trifosfato, a fim de se analisar uma proposta da literatura para um segundo sítio para a ligação deste efector.

Juntamente com estas análises, descreve-se aqui um modelo molecular para a hemoglobina catódica nos estados oxigenado e desoxigenado. Os modelos foram determinados pelo método de modelagem molecular comparativa baseados em estruturas cristalográficas de alta resolução.

Foi observado neste trabalho que a água afeta potencialmente a afinidade pelo oxigênio de ambas hemoglobinas, na presença de sacarose. A afinidade por oxigênio é diminuída à menores valores de atividade de água. Nota-se que a adição de efetores aniônicos aumenta significativamente o número diferencial de moléculas de água ligadas, e assim, é proposto que a forma desoxigenada



destas hemoglobinas, coexiste em duas conformações alostéricas, as quais dependem da presença ou não de ânions, como ocorre para a hemoglobina humana. Porém, foi observado que a variação do número de moléculas de água com o processo de oxigenação é quantitativamente diferente do encontrado para hemoglobina humana.

Não foram encontradas evidências da existência de um sítio adicional de ligação de fosfato para ambas hemoglobinas.



Abstract

Mostly fish are considered to present iso-hemoglobins (isoforms of Hbs) that exhibit a greater variety of functional behavior compared with mammalian hemoglobins, in terms of cooperative ligand binding and allosteric control exerted by a variety of chemical factors, such as H^+ , Cl^- , CO_2 , 2,3-biphosphoglycerate (BPG), and water.

The blood of *Hoplosternum littorale* show two hemoglobins, different electrophoretically, one cathodic and other anodic. The hemoglobins were investigated solvation effects by means of the osmotic stress method and was reported the binding constant to adenosine triphosphate, for confirmed a propose of literature by a additional binding site to phosphate.

Here is also described a molecular model for the cathodic hemoglobin in the unliganded and liganded states. The models were determined by molecular modeling based on the high-resolution crystal structure of hemoglobins.

Were demonstrate that water potential affects oxygen affinity of two hemoglobins in the presence of sucrose. The oxygen affinity is decrease in smaller values of water activity. Addition of cofactors strongly increases the differential number of water molecules bound, and we propose that the deoxy-hemoglobin coexists in two allosteric conformations which depends on whether anion is bound or not, as occurs in the human hemoglobin. However, We show that the number of water molecules upon oxygenation is different quantitatively those find to human hemoglobin.

1 Introdução Were not found evidence to confirmed the propose of a additional binding site to phosphate.

1.1.1 Estrutura Primária

As estruturas secundárias de um polímero são definidas como a continuação local dos esboços. Para entender estas estruturas são necessários do conhecimento de algumas estruturas de ligação repetitivas. Os grupos pontuados têm uma estrutura planar rígida, a qual é uma consequência da interação hidrogeno que forma a ligação covalente em caráter parcial de dupla ligação (Figure 1) (Foster, 1999).



Figure 1. Representação da interação de ligação covalente



Figure 2. Modelo de interação hidrogeno entre os grupos de ligação covalente de ligação covalente

1. Introdução

1.1 Aspectos Gerais

1.1.1 Estruturas Protéicas

As estruturas secundárias de um polímero são definidas como a conformação local do seu esqueleto. Para proteínas estas estruturas são construídas ao redor de unidades planares de ligações peptídicas. Os grupos peptídicos têm uma estrutura planar rígida, a qual é uma consequência da interação ressonante que fornece à ligação peptídica um caráter parcial de dupla ligação (Figura 1) (Fersht, 1999).

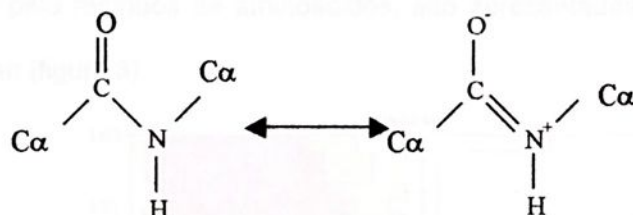


Figura 1. Representação esquemática da ligação peptídica.

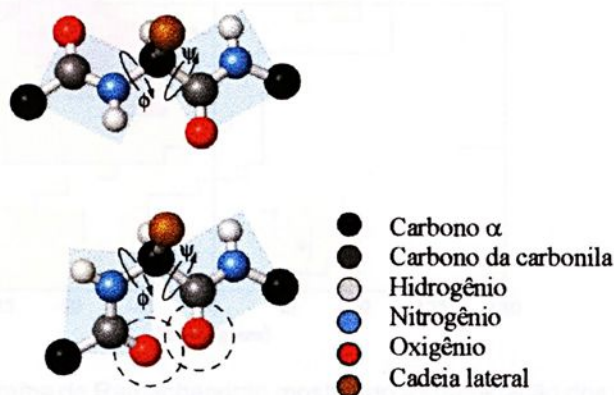


Figura 2. Porção da cadeia polipeptídica indicando o grau torcional de liberdade de cada unidade peptídica. (<http://cwx.prenhall.com/horton>).

Assim pode ser especificada a conformação do polipeptídeo pelos seus ângulos de torção sobre as ligações $C_{\alpha}-N$ (ϕ), $C_{\alpha}-C$ (ψ) de cada um de seus resíduos de aminoácidos (figura 2).

Choques estéricos restringem o número de conformações disponíveis para as cadeias polipeptídicas. Conformações assumidas quando alguma distância interatômica entre átomos não ligados até o terceiro vizinho, é menor que suas distâncias de van der Waals, são proibidas estericamente (Ramachandran *et al.*, 1963). As informações sobre as conformações expressas como combinações dos ângulos ϕ e ψ assumidas pelo resíduos de aminoácidos, são apresentadas em um diagrama de Ramachandran (figura 3).

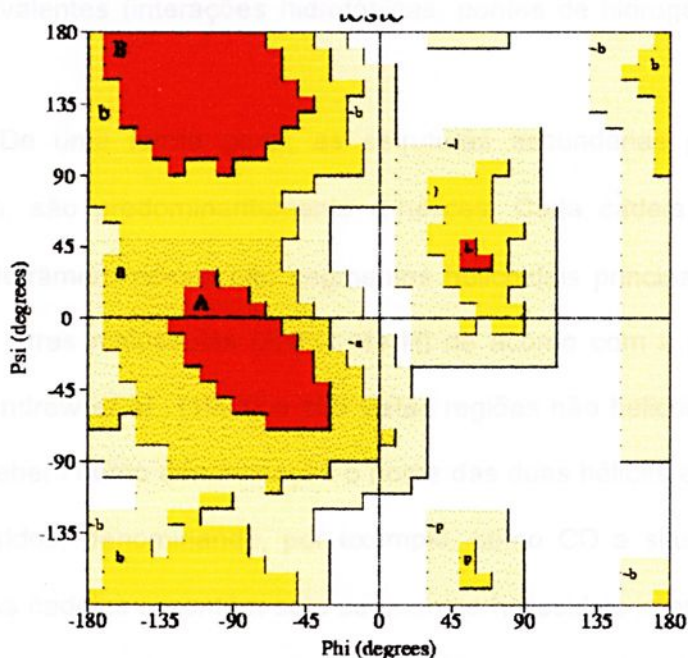


Figura 3. Diagrama de Ramachandran mostrando a combinação dos ângulos ϕ e ψ estericamente permitidos e proibidos. No diagrama de Ramachandran as regiões A, B, e L são favoráveis, as regiões a, b e l são permitidas e ~a, ~b e ~l são generosamente permitidas. A região vazia é proibida.

1.2 Hemoglobinas

A hemoglobina (Hb) humana A₁ (a qual representa 98% do total de Hbs) (Stryer, 1995) é uma proteína tetramérica de constituição $\alpha_2\beta_2$ (figura 4), com um diâmetro de aproximadamente 55Å. Para os mamíferos cada cadeia α possui 141 resíduos de aminoácidos, enquanto que a cadeia β possui 146. Cada cadeia α está em contato com ambas cadeias β , porém há pouca interação entre duas cadeias α ou duas cadeias β . Os dímeros $\alpha\beta$ estão relacionados simetricamente por um eixo de rotação binário, e as subunidades α e β por uma pseudo-simetria de segunda ordem (Voet & Voet, 1995). As quatro cadeias do tetrâmero são unidas por ligações não covalentes (interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes salinas).

De uma forma geral, as estruturas secundárias presentes na molécula de Hb, são predominantemente α -hélices. Cada cadeia polipeptídica constituinte do tetrâmero possui oito segmentos helicoidais principais que foram designados por letras maiúsculas (A,B,C até H) de acordo com a nomenclatura proposta por Kendrew *et al.*, (1961) e são vistas regiões não helicoidais entre as hélices, que recebem como denominação o nome das duas hélices entre as quais eles estão inseridos, denominando, por exemplo, como CD a situada entre as hélices C e D. As cadeias α contêm sete segmentos helicoidais interrompidos por segmentos não helicoidais, e as cadeias β contêm oito segmentos helicoidais (Perutz *et al.*, 1998).

A principal função das hemoglobinas é transportar o oxigênio (O₂) do pulmão, ou brânquias e/ou tecidos de troca gasosa (epitélio faringeal, câmara

branquial, bexiga natatória, pulmão verdadeiro, estômago, intestino e lábios) de um animal para os capilares dos tecidos, para ser usado na respiração.

A capacidade da hemoglobina de se ligar reversivelmente ao oxigênio depende da presença de um grupo prostético, chamado heme, que também fornece cor à hemoglobina. Cada uma das cadeias polipeptídicas contém um grupo heme. Este é constituído de uma parte orgânica, a protoporfirina, e um átomo de ferro (figura 5) (Baldwin, 1975).

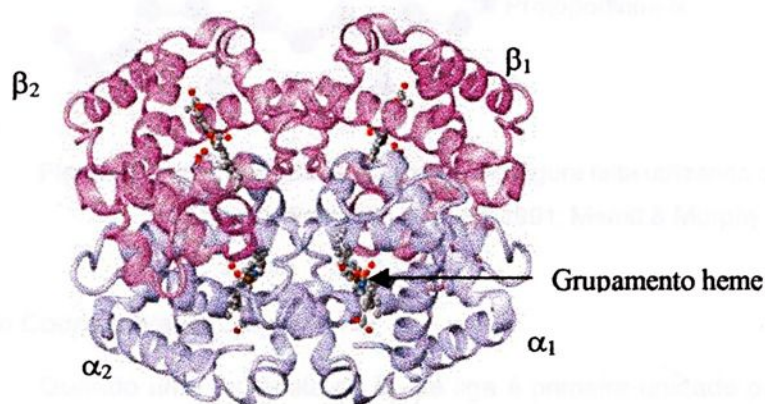


Figura 4. Representação da molécula de hemoglobina A humana. (<http://cwx.prenhall.com/horton>).

As cadeias polipeptídicas são dispostas de tal forma que há extensa interação entre subunidades diferentes. A interface $\alpha_1\beta_1$ (e a interface simetricamente equivalente $\alpha_2\beta_2$) envolve 35 resíduos, onde a interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$) envolve 19 resíduos, havendo uma cavidade no centro da molécula através da qual passa o eixo de simetria binário. Estas associações são predominantemente hidrofóbicas, embora numerosas pontes de hidrogênio e pares iônicos estejam envolvidos. As mudanças quaternárias que ocorrem com a oxigenação dão-se inteiramente através de sua interface $\alpha_1\beta_2$. Os contatos $\alpha_1\beta_1$ não são mudados, presumivelmente como resultado de

sua associação mais extensiva e presumivelmente, por esta interface não desempenhar importante papel na cooperatividade da ligação do oxigênio e nos efeitos alostéricos (Baldwin & Chothia, 1979; Mihailescu & Russu, 2001).

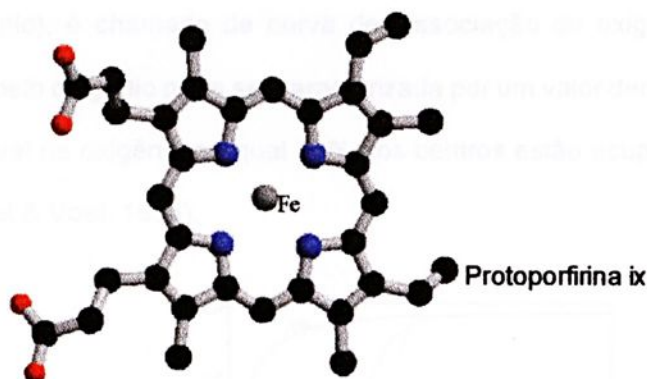


Figura 5. Representação do grupo heme. Figura feita utilizando os programas Molscrip e Raster3D (Kraulis, 1991; Merritt & Murphy, 1994).

1.2.1 A ligação Cooperativa do Oxigênio

Quando uma molécula de O_2 se liga à primeira unidade polipeptídica da Hb, essa informação é transmitida às subunidades restantes através das interações que ocorrem nas suas interfaces, e assim, as demais subunidades aumentam progressivamente a afinidade pelo oxigênio, que se liga portanto, de forma cooperativa (Gelin *et al.*, 1983).

A ligação cooperativa do oxigênio à hemoglobina é um exemplo de interação alostérica (nestas interações a ligação de um ligante a um sítio na proteína, influencia a afinidade de ligação dos demais sítios não ligados). Estas interações ocorrem entre ligantes do mesmo tipo (interações homotrópicas), como neste caso, o O_2 , ou de tipos diferentes (interações heterotrópicas), H^+ , CO_2 , ATP, 2,3-BPG, Cl^- (Imai, 1982) e água (Colombo *et al.*, 1992).

A saturação fracional de oxigênio (Y) é definida como a fração ocupada de todos os centros heme de ligação. O valor de Y pode variar de 0 (todos os centros vazios) a 1 (todos os centros ocupados). O gráfico de Y versus pO_2 (pressão parcial de oxigênio), é chamado de curva de dissociação do oxigênio (figura 6). A afinidade da Hb pelo oxigênio pode ser caracterizada por um valor denominado P_{50} , que é a pressão parcial de oxigênio na qual 50% dos centros estão ocupados (ou seja, na qual $Y = 0,5$) (Voet & Voet, 1995).

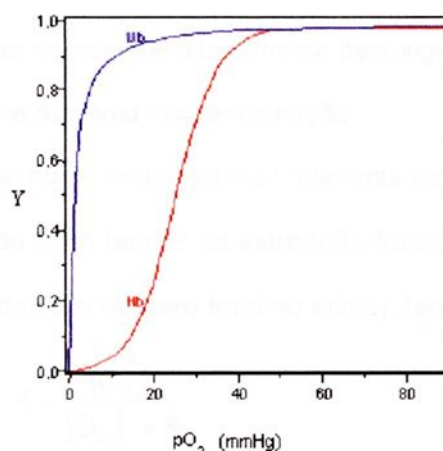


Figura 6. Curvas de dissociação da mioglobina (azul) e hemoglobina humana (vermelha). A saturação dos sítios de ligação de oxigênio é mostrada como função da pressão parcial de oxigênio. A curva de oxigenação apresenta um formato hiperbólico para a mioglobina e sigmóide para a hemoglobina, denotando a cooperatividade da ligação de O_2 a esta última (Stryer, 1995).

A primeira tentativa de analisar a curva de dissociação da Hb foi formulada por Archibald Hill em 1910 (Voet & Voet, 1995) que considerou a ligação de O_2 como sendo representada genericamente pela equação de equilíbrio:



onde n representa o número de moléculas de O_2 que se associam à proteína.

A constante de equilíbrio (K) para a dissociação da oxi-hemoglobina é dada por:

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

onde, $[\text{Hb}]$ é a concentração da hemoglobina totalmente desoxigenada.

$[\text{O}_2]$ é a concentração de oxigênio livre em solução.

$[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]$ é a concentração da hemoglobina totalmente oxigenada.

Expressando a equação 2 em termos de saturação fracional de O_2 (Y) (razão entre o número de sítios ligados e o número total de sítios), temos:

$$Y = \frac{[\text{O}_2]^n}{[\text{O}_2]^n + K} \quad (3)$$

Pela lei de Henry, a concentração de oxigênio na fase líquida é proporcional à pressão parcial do gás na fase gasosa (Atkins, 1999) dessa maneira, a concentração de O_2 é dada por:

$$[\text{O}_2]_{\text{solução}} = p\text{O}_2 \cdot K_H \quad (4)$$

sendo K_H , a constante de solubilidade do O_2 na solução (constante de Henry).

Substituindo a equação 4 na equação 3, obtemos a equação de Hill:

$$\frac{Y}{1-Y} = K(pO_2) \quad (5)$$

A forma logarítmica da equação 5:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log[O_2] - \log K \quad (6)$$

Como para a hemoglobina $K = (P_{50})^n$, substituindo isto na equação 6, temos:

$$\log\left(\frac{Y_{O_2}}{1-Y_{O_2}}\right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \quad (7)$$

Então, o gráfico referente a esta equação tem uma inclinação de n e o intercepto no eixo $\log pO_2$ é P_{50} .

Embora a hemoglobina não se ligue ao oxigênio em um único passo, como assumido na derivação da equação de Hill, seu gráfico de Hill é essencialmente linear para valores de Y entre 0,1 e 0,9 (figura 7). Sua máxima inclinação, que ocorre próximo de $Y = 0,5$, ou onde $pO_2 = P_{50}$, é normalmente tomada como sendo a constante ou coeficiente de Hill (n).

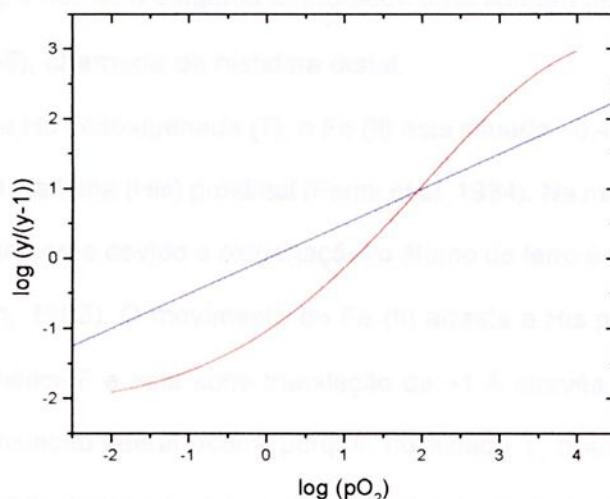


Figura 7. Representação do gráfico de Hill para as moléculas de mioglobina (azul) e de hemoglobina (vermelho). Um gráfico de Hill é também usado para analisar o grau de cooperatividade da molécula em estudo. A inclinação da curva no ponto médio de ligação ($Y = 0,5$) é chamado de *coeficiente de Hill*, que aumenta com o grau de cooperatividade. Sendo igual a 1 para a mioglobina, qual não apresenta cooperatividade para a ligação do O_2 e de $\sim 2,8$ para a Hb humana A (Voet & Voet., 1995).

1.2.2 Mecanismo da Cooperatividade da Ligação do Oxigênio

A afinidade da Hb pelo O_2 aumenta com o acréscimo da saturação da molécula. Assim a afinidade para a ligação de subseqüentes moléculas de O_2 à Hb é maior do que para a ligação da primeira molécula à desoxi-Hb.

O átomo de ferro encontra-se coordenado aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, ligado à cadeia polipeptídica através de um resíduo de histidina do segmento F - a histidina F8 (His 87)- chamada de histidina proximal e pode ainda ser ligado, reversivelmente, a uma molécula de oxigênio. Além de ligar-

se ao ferro do grupo heme, o oxigênio estabelece uma ligação de hidrogênio com a histidina E7 (His 58), chamada de histidina distal.

Na Hb desoxigenada (T), o Fe (II) está situado $\sim 0,4$ Å fora do plano do heme em direção à histidina (His) proximal (Fermi *et al.*, 1984). Na mudança ocorrida no estado eletrônico do heme devido a oxigenação, o átomo de ferro é levado ao plano da porfirina, (Shaanan, 1983). O movimento do Fe (II) arrasta a His proximal com ele, a qual está presa à hélice F e esta sofre translação de ~ 1 Å através do plano do heme (figura 8). Esta translação lateral ocorre porque, no estado T, o anel imidazol da His proximal está orientado de maneira tal que seu movimento direto de $0,4$ Å junto ao plano do heme poderia causar sua colisão com o heme.

As grandes mudanças estruturais ocorrem nas áreas de contato entre os dímeros, que efetivamente se deslocam um em relação ao outro em 15° (figura 9) (Ackers *et al.*, 1992).

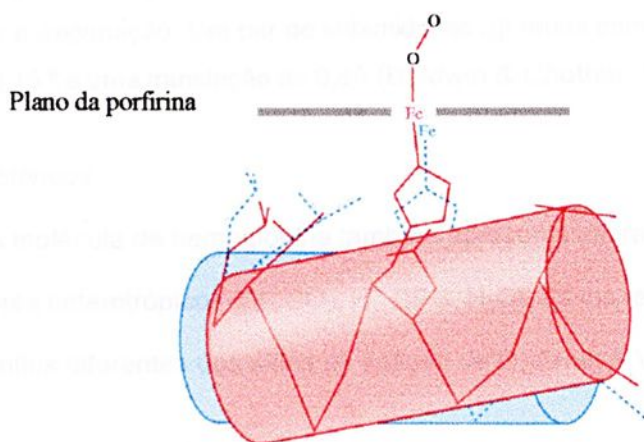


Figura 8. Representação esquemática da translação da hélice F com a oxigenação da hemoglobina. (<http://cwpx.prrenhall.com/horton>).

A diferença entre a conformação da forma oxigenada (R) e desoxigenada (T) da Hb ocorre principalmente na interface $\alpha_1\beta_2$ (e na interface simetricamente relacionada $\alpha_2\beta_1$), a qual consiste da hélice C e segmento FG da α_1 , respectivamente, contatando com o segmento FG e hélice C da β_2 . A interface $\alpha_1\beta_2$, principalmente a hélice C e o segmento FG, deslizam durante a mudança na estrutura quaternária que ocorre na ligação da Hb (Baldwin & Chothia, 1979).

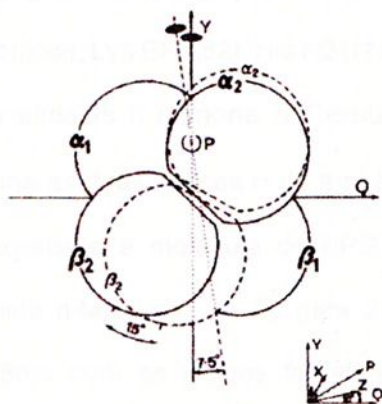


Figura 9. Diagrama esquemático mostrando as mudanças na estrutura quaternária durante a oxigenação. Um par de subunidades $\alpha\beta$ muda com relação ao outro por uma rotação de 15° e uma translação de $0,8\text{\AA}$. (Baldwin & Chothia, 1979).

1.2.3 Efeitores Alostéricos

A molécula de hemoglobina também apresenta alteração na afinidade pela ação de efetores heterotrópicos (Cl^- , CO_2 , H^+ , BPG, H_2O). Esses reguladores ligam-se à proteína em sítios diferentes dos sítios de ligação de O_2 (Voet & Voet, 1995).

1.2.3.1 Efeito do 2,3 Bifosfoglicerato (BPG)

A ação do BPG diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Esta diminuição da afinidade é essencial para que a hemoglobina descarregue o oxigênio nos capilares dos tecidos (Benesh & Benesch, 1969).

A estrutura da desoxi-hemoglobina humana complexada com BPG, determinada por difração de raios X (Richard, *et al.*, 1993), mostra que o BPG se liga na cavidade central da molécula (Figura 10). Os grupos aniônicos da molécula de BPG interagem com os resíduos catiônicos, Lys EF6(82), His H21(143), His NA2(2), e grupos amina do n-terminal de ambas cadeias β (Arnone & Perutz, 1974; Richard *et al.*, 1993). A transição T $\rightarrow$ R aproxima as duas hélices H de ambas cadeias β , estreitando assim a cavidade central e expelindo a molécula de BPG. Além de aumentar as distâncias entre os grupos amina n-terminais de 16 para 20Å, o que previne suas simultâneas pontes de hidrogênio com os grupos fosfatados do BPG (Benesh & Benesch, 1969).

Geralmente, apenas uma molécula de fosfato orgânico é ligada a uma molécula de desoxi-Hb, embora sítios adicionais para ligação de ATP tenham sido propostos (Amiconi *et al.*, 1985; Weber *et al.*, 2000; Tamburrini *et al.*, 2000; Riccio *et al.*, 2001). Para a Hb^{ct} do peixe *H. littorale*, Weber e colaboradores (2000) sugeriram a existência de um sítio adicional para interação de fosfatos (ATP, GTP e IHP).



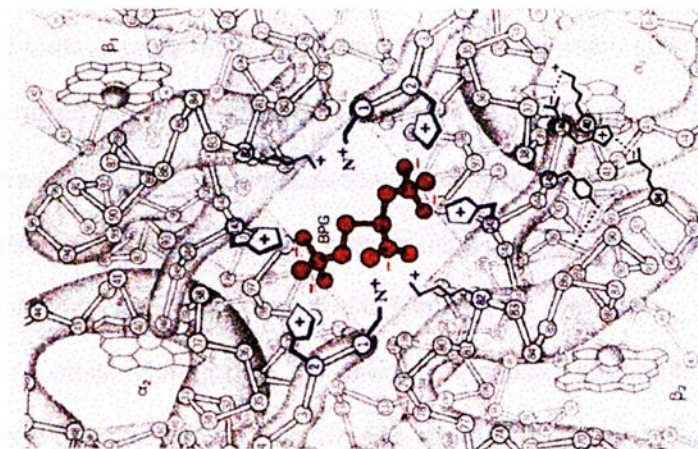


Figura 10. Representação esquemática da molécula de Hb humana ligada à molécula de 2,3 Bifosfoglicerato (BPG) (Voet & Voet, 1995).

1.2.3.2 Efeito Bohr

Quando o oxigênio liga-se à hemoglobina em pH fisiológico, ela sofre uma mudança conformacional deslocando o equilíbrio termodinâmico $T \rightleftharpoons R$ na direção da estrutura da oxi-Hb (R), estimulando assim a liberação de prótons (H^+). Por sua vez, a diminuição do pH favorece a liberação de O_2 devido à captação de H^+ pela proteína. Conseqüentemente, o aumento da concentração de prótons diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio, estabilizando a estrutura da desoxi-Hb (figura 11), fenômeno este conhecido como efeito Bohr.

As mudanças conformacionais que ocorrem na hemoglobina pela ligação do O_2 reduzem os pKs de vários grupos, entre estes, os grupos n-terminais das subunidades α e os grupos c-terminal das subunidades β . Considerando-se a Hb humana temos que, na estrutura de baixa afinidade por O_2 , a principal contribuição para o efeito Bohr é a do resíduo His146 do c-terminal das duas cadeias β . Este resíduo forma uma ponte salina com o Asp 94 da mesma cadeia. A ponte salina formada estabiliza o próton ligado, dificultando sua dissociação. Na forma oxigenada, a ponte em

questão não é formada. Outros resíduos, tal como a Val 1, também estão envolvidos no efeito Bohr. Este grupo amino N-terminal das cadeias α , forma uma ponte salina com o c-terminal da outra cadeia α , dificultando assim a liberação do próton pela Hb. Portanto, os prótons são efetores alostéricos que ligados a sítios reguladores da Hb estabilizam a conformação da desoxi-Hb (Perutz *et al.*, 1980; Perutz *et al.*, 1998).

O efeito Bohr pode ser dividido em dois subtipos: o efeito Bohr alcalino e o efeito Bohr ácido. Acima do pH 6,5 uma diminuição na concentração de prótons leva a um aumento na afinidade da Hb por O_2 , constituindo o que se conhece como efeito Bohr alcalino ou normal. O efeito Bohr ácido ocorre quando, abaixo do pH 6,5, um aumento na concentração de prótons leva a um aumento na afinidade de oxigenação (Brittain, 1987).

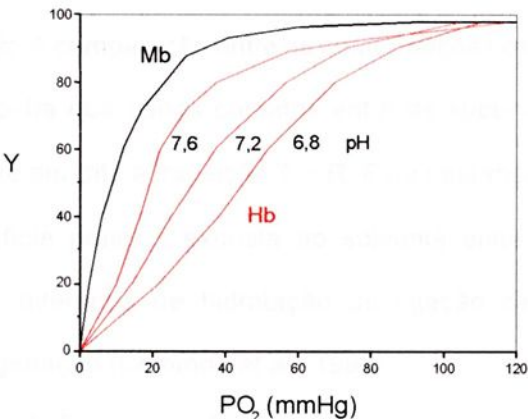


Figura 11. Efeito do pH na afinidade da hemoglobina mostrado em vermelho (Colombo, 1996).

1.2.3.3 Efeito de CO_2

O mecanismo de transporte de CO_2 no sangue é fundamentalmente diferente do utilizado para o oxigênio. A maior parte do CO_2 (~75%) do sangue se apresenta

combinado com água formando bicarbonato. O CO_2 restante (~25%) é transportado pela Hb na forma de carbamato, ligado reversivelmente aos grupos amina terminais, formando assim, pontes salinas que estabilizam a forma T da Hb (Kilmartin 1976). Por tal motivo, o CO_2 diminui a afinidade da Hb por O_2 mesmo em pH constante.

1.2.3.4 Efeito da Atividade de Água

A interação de uma proteína com água é crucial na estabilização de sua estrutura nativa, embora desidratação não necessariamente implique no desenovelamento (Colombo *et al.*, 1990).

A sensibilidade da molécula de Hb com relação às moléculas de água pode ser investigada por meio da dependência da afinidade do oxigênio com a variação da atividade de água, ou equivalentemente, estresse osmótico (Parsegian *et al.*, 1986; Colombo *et al.*, 1992). A comparação entre as conformações oxigenada e desoxigenada da hemoglobina mostra que vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente durante a transição T $\rightarrow$ R. Esta mudança estrutural implica numa diferença de superfície protéica exposta ao solvente entre estas conformações e, conseqüentemente, diferença de hidratação ou ligação de moléculas de água à proteína, com a oxigenação (Colombo *et al.*, 1992).

A adição de solutos inertes (açúcares e polióis) em diferentes concentrações à solução de Hb, constitui uma boa abordagem experimental para se estudar a variação da afinidade pelo oxigênio com a variação da atividade de água, mostrando que a água não só atua como solvente do sistema biológico, mas também como ligante, com importante papel regulador de diversos processos biológicos a nível molecular.



Para analisar o efeito dos solutos neutros sobre as características de ligação do oxigênio à Hb, dois casos devem ser considerados: a ligação direta do soluto com a proteína e o efeito indireto do soluto sobre a atividade de água. Colombo & Bonilla Rodriguez, (1996) e Hundahl e colaboradores (2003) encontraram uma independência comum entre a afinidade por oxigênio e a atividade de água com relação à natureza do soluto, reforçando a suposição da exclusão destes solutos pela camada de solvatação que envolve a proteína, e de qualquer espécie de interação direta com as estruturas T ou R. Portanto, moléculas de água agem como um ligante alostérico.

As hemoglobinas de peixes mostram uma grande diversidade de propriedades de ligação de oxigênio e efeitos alostéricos, e são bem caracterizadas dos pontos de vista funcional e estrutural, sendo excelentes candidatos para estas análises.

O efeito de solvatação pode ser então determinado através da equação de *linkage*, originalmente proposta por Wyman (1964), e como mostrado em trabalhos mais recentes (Colombo *et al.*, 1992; Parsegian *et al.*, 1995). A equação de *linkage* que determina o número diferencial de moléculas de um ligante L que se liga à Hb com ligação de oxigênio, é expressa da seguinte forma:

$$\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{(n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}})}{4} \quad (8)$$

onde, P_{50} é a pressão de O_2 necessária para saturar a 50% dos sítios da Hb,

a_L é a atividade do ligante L,

a_i corresponde a atividade de outros ligantes que não L,

Δn_L é a diferença do número de moléculas de L ligadas entre as estruturas oxi e desoxi da Hb,

n_L^{oxi} é o número de moléculas de L ligadas à forma oxi e



n_L^{desoxi} é o número de moléculas de L ligadas à forma desoxi.

Esta análise é correta apenas quando a atividade de um ligante varia e a atividade de qualquer outro presente na solução é mantida constante.

Quando o ligante alostérico L é a água, esta relação pode ser escrita como:

$$\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}}{4} = \frac{\Delta n_w}{4} \quad (9)$$

onde, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi e desoxi da Hb,

a_w é a atividade de água,

Δn_w é o número diferencial de moléculas de água ligadas entre as estruturas oxigênica e desoxigenada da Hb.

No caso em que a ligação do soluto e de água pode ser concomitantemente analisada (Colombo *et al.*, 1994; Colombo & Bonilla Rodriguez, 1996) temos uma equação de *linkage* baseada na relação de Gibbs-Duhem que descreve como $\ln P_{50}$ varia, devido à ligação diferencial de água e do soluto, cuja concentração varia e promove mudanças em a_w . Para analisar as variações concomitantes entre a água e o soluto ligados:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{pO_2} = 4 \left[\frac{55,5}{\text{ms}} \Delta n_s - \Delta n_w \right] \quad (10)$$



Então, a inclinação do gráfico de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ fornece a diferença aparente do número de moléculas de soluto e água (Δn_s e Δn_w , respectivamente) ligados entre as moléculas de Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada.

Em recentes estudos sobre a cinética de ligação de oxigênio e água à molécula de Hb, Salvay e colaboradores (2003), mostraram que a ligação de moléculas de água a superfície da proteína exposta na transição da conformação de baixa afinidade (T) para a de alta afinidade (R) é um passo crucial no mecanismo alostérico, e sugerem a possibilidade da atividade de água do meio, participar do controle cinético de algumas importantes reações *in vivo*.

1.2.3.5 Efeito do Íon Cloreto

Outro efector alostérico fisiologicamente importante é o íon cloreto (Cl^-) que contribui para a regulação da afinidade da Hb pelo oxigênio de forma a reduzi-la, estabilizando assim, a estrutura desoxi-Hb (T) (Perutz *et al.*, 1994).

Perutz e colaboradores (1993 e 1994) propuseram que a regulação da afinidade pelo ligante O_2 por Cl^- ocorre via interações eletrostáticas não específicas. Segundo esta proposição, o ânion cloreto não possui um sítio de ligação específico na Hb. Sua ação é a de neutralizar o excesso de cargas positivas existentes na região da cavidade central da desoxi-Hb por condensação iônica.

Em uma reavaliação sobre a ação alostérica que os íons cloreto exercem sobre a oxigenação da Hb, constatou-se que sua atuação também se dá de forma indireta, isto é, via efeito de sua concentração na atividade de água da solução (Colombo *et al.*, 1994).



Colombo e Seixas (1999) verificaram o comportamento do Δn_w , que acompanha a transição $T \rightarrow R$, em experimentos realizados em diferentes concentrações de NaCl. Estes autores mostraram que a variação de hidratação associada a oxigenação da Hb é modulada pela ligação preferencial de ânions à estrutura da desoxi-Hb. Os experimentos revelaram que a mudança conformacional da desoxi-Hb para a oxi-Hb em soluções com até 1 mM de NaCl, é acompanhada por um Δn_w de 25 moléculas de água. Por sua vez, 70 moléculas de água foi o valor da variação de hidratação associada com a transição $T \rightarrow R$ determinada em concentrações de NaCl maiores que 50 mM.

1.2.4 Mecanismos para Interação Alostérica

A molécula de O_2 liga-se à Hb, induzindo uma mudança na conformação desta, conferindo dois estados conformacionais diferentes e designados como sendo, tenso (T) a forma desoxigenada da Hb, e relaxado (R) a forma oxigenada. Na ausência do ligante, a proteína predomina na forma T, em equilíbrio com a forma R; a presença do ligante desloca o equilíbrio para um predomínio da formas R (Perutz, 1980). O aumento ou diminuição da afinidade pelo oxigênio na presença de efetores alostéricos, é explicado pela estabilização de uma das conformações (T ou R), aumentando ou diminuindo o valor da constante de equilíbrio entre R e T (Riggs, 1998).

As transformações apresentadas pela hemoglobina desoxigenada são estabilizadas por pontes salinas e ligações de hidrogênio. Na desoxi-Hb os resíduos c-terminal das quatro cadeias participam de interações eletrostáticas. Todas essas ligações são quebradas quando a proteína se encontra na forma oxigenada (Fermi *et al.*, 1984).



1.2.4.1 Mecanismo Concertado de Monod-Wyman-Changeux (MWC) (Monod et al., 1965)

J. Monod, J. Wyman e J.P. Changeux (1965) mostraram que com a ligação de oxigênio, a concentração da estrutura na forma oxigenada é aumentada, uma vez que o oxigênio liga-se preferencialmente a ela. Quando moléculas suficientes de oxigênio são ligadas, esta forma é estabilizada. Assim para as subseqüentes ligações de O_2 a afinidade se torna maior.

A estrutura quaternária da Hb é assumida como sendo simétrica. Uma molécula em particular parcialmente oxigenada ou desoxigenada é tomada como estando no estado R ou T; assim estados mistos não ocorrem.

O modelo é definido pelas seguintes hipóteses:

- a. A proteína alostérica é um oligômero de protômeros que são simetricamente relacionados.
- b. A proteína existe em um dos dois estados conformacionais, T (tenso), a forma predominante quando a proteína está na ausência de oxigênio, e R (relaxado), forma predominante quando a proteína está na presença de oxigênio, os dois estados estão em equilíbrio e diferem no número de ligações entre as subunidades, com o estado T sendo mais compacto comparado com o estado R.
- c. O ligante pode ligar-se ao protômero em cada conformação. Somente a mudança conformacional altera a afinidade do protômero pelo ligante.
- d. A simetria molecular da proteína é conservada durante a mudança conformacional. Não há oligômero que simultaneamente contenha protômeros R e T.



1.2.4.2 O Modelo Seqüencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF)

Este modelo assume que o progresso do estado T para o estado R é um processo seqüencial. A ligação do ligante induz uma mudança conformacional na subunidade e interações cooperativas surgem através da influência que estas mudanças exercem nas subunidades vizinhas. A dimensão destas interações depende do grau de acoplamento mecânico entre as subunidades. Na presença de amplo acoplamento, mudanças conformacionais tornam-se concertadas e o oligômero mantém sua simetria. Contudo, com pouco acoplamento as mudanças conformacionais ocorrem seqüencialmente quando mais ligantes são ligados.

A essência do modelo seqüencial é que a afinidade de ligação do ligante varia de acordo com o número de ligantes ligados, enquanto no modelo de simetria esta afinidade depende somente do estado quaternário da proteína.

As duas hipóteses do modelo de KNF são:

a. Na ausência de ligantes, a proteína existe em uma única conformação (T).

b. Após a ligação, o ligante induz uma mudança conformacional na subunidade na qual é ligado. Esta mudança é transmitida as subunidades vizinhas através das interfaces.

1.2.5 A Existência de Estados Intermediários da Hb Durante sua Oxigenação

Para a interpretação do efeito da concentração de NaCl sobre o Δn_w , Colombo e Seixas (1999) propuseram que a desoxi-Hb coexiste em duas conformações alostéricas distintas: a clássica T (T_x), estabilizada na presença de íons Cl^- e uma estrutura intermediária denominada T_0 na ausência de ânions.



Este novo modelo proposto para a oxigenação da Hb (figura 12) concilia os dois estados clássicos da proteína (R e T_x) com um novo estado intermediário. A transição do estado T_x para R passa pelo estado intermediário T_0 , no qual ânions são liberados da estrutura com a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado (T_0) da Hb é estabilizado e a transição passa a ser de T_0 para R, com uma pequena variação de hidratação (Colombo & Seixas, 1999).

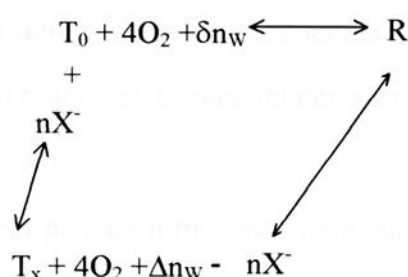


Figura 12. Representação esquemática da passagem da hemoglobina do estado T_x para o R, na presença de um intermediário T_0 (Colombo & Seixas, 1999).

1.3 Mecanismo de Oxigenação de Hbs de Peixes

Os vertebrados desenvolveram dois mecanismos principais para suprir suas células com um fluxo contínuo e adequado de O_2 . O primeiro é o uso de moléculas transportadoras de oxigênio para vencer as limitações impostas pela baixa solubilidade do O_2 na água. O segundo é um sistema circulatório que distribui ativamente O_2 às células.

As Hbs de peixes têm ocupado o papel central no estudo das relações entre estrutura molecular e função, devido às várias soluções adaptativas, desenvolvidas para suprir os baixos níveis de oxigênio dissolvido na água.

As estratégias comportamentais estão ligadas a variações no mecanismo respiratório. Além da respiração convencional, o peixe ainda pode contar com a respiração aérea acessória, que pode ser obrigatória (*Arapaima gigas* e *Lepidosiren paradoxa*) (Val, 1996) ou, em alguns casos, facultativa (*Liporsacus anisitsi*) (Oliveira *et al.*, 2001). Essa habilidade da respiração acessória fornece ao peixe manter um alto nível de atividade aeróbica em meios aquáticos deficientes em oxigênio. Na respiração aérea existem vários locais onde ocorre a troca gasosa: epitélio faringeal, câmara branquial, bexiga natatória, pulmão verdadeiro, estômago, intestino e lábios (Val, 1996).

Os peixes possuem múltiplas hemoglobinas (também conhecidas como isoformas) (Delatorre *et al.*, 2000, Fadel *et al.*, 2000), que são caracterizadas por apresentarem ou não propriedades funcionais diferentes (Riggs, 1970). O aparecimento destas frações de Hb pode ser fruto da seleção de características com “valor adaptativo” (hipótese selecionista), ou ainda fruto de mutações neutras e de deriva genética (hipótese neutralista). O reino animal apresenta muitas hemoglobinas isomórficas agindo sob uma variedade de requerimentos fisiológicos e sujeitas ao estresse do meio, sendo uma fonte natural para estudos das relações estrutura-função (Smarra *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2003).

O bagre tamoatá (*Hoplosternum littorale*) natural da bacia do rio Amazonas, apresenta respiração bimodal (brânquias/intestinos). Este peixe apresenta duas distintas frações de Hbs, sendo uma com migração eletroforética anódica (Hb^{an}) e outra catódica (Hb^{ct}).



As características físico-químicas das duas Hbs pertencentes ao tomoatá são diferentes. A pH próximo do valor intracelular, a afinidade da Hb^{ct} excede a afinidade da Hb^{an}. Em contraste com um pronunciado efeito Bohr normal da Hb^{an}, a Hb^{ct} exibe um marcado efeito Bohr reverso.

A Hb^{an} apresenta efeito de temperatura mais pronunciado quando comparada com a Hb^{ct} e íons cloreto reduzem a afinidade de ambas Hbs, exceto para Hb^{an} em pH maior que 7,0, onde 0,1 M de cloreto aumenta a sua afinidade pelo O₂. Curiosamente, BPG e baixas concentrações de outros efetores aumentam a afinidade por O₂ da Hb^{an} a pH 7,5. Para a Hb^{ct}, Weber e colaboradores (2000) sugeriram a existência de um sitio adicional para interação de fosfato, visto que as curvas de log P₅₀ versus concentração de ATP, IHP e GTP denotaram a presença de mais do que uma molécula de efetor ligada por molécula de Hb, pois a inclinação da curva assumiu um valor > 25 por heme.

Na Hb^{ct} a posição NA2(2β) é ocupada por His, como em mamíferos, em contraste com outros peixes teleósteos que apresentam Glu ou Asp neste sitio de ligação de fosfatos. Ocorre ainda a presença de Ser na posição H21(143β) comparado com His em mamíferos e Lys ou Arg em outros peixes.

2. Objetivos

As estratégias ligadas às variações no mecanismo respiratório, como a habilidade da respiração aérea acessória apresentada por alguns peixes, torna-os capazes de manter um alto nível de atividade aeróbica mesmo em meios aquáticos deficientes em oxigênio. As hemoglobinas de peixes, por sua vez, exibem uma diversidade de aspectos funcionais o que é devido à adaptação entre as necessidades fisiológicas e a disponibilidade de oxigênio. O peixe *H. littorale*, o qual habita em ambientes com condição de hipoxia, apresenta respiração aérea acessória e duas hemoglobinas, que são caracterizadas por apresentarem propriedades funcionais diferentes. Sendo assim, as Hbs pertencentes aos peixes desta espécie são uma excelente fonte natural para estudos das relações estrutura-função.

Com base nestas informações os principais objetivos deste trabalho, envolvendo as hemoglobinas do peixe *Hoplosternum littorale*, foram:

1. Cristalizar ou modelar a hemoglobina catódica do peixe *Hoplosternum littorale*, a fim de definir as características estruturais peculiares e lançar bases para um estudo estrutural comparativo com outras hemoglobinas de peixes e com a hemoglobina humana, e correlacionar aspectos estruturais com mudanças conformacionais.

2. Avaliar para ambas Hbs, a contribuição da hidratação com relação às mudanças conformacionais ocorridas durante o processo de oxigenação, através do método de estresse osmótico, analisando a variação de moléculas de



água ligadas entre os diferentes estados da hemoglobina e o efeito da solvatação sobre as características de ligação do oxigênio.

3. Determinar a afinidade de ligação e o número de moléculas de ATP ligada a ambos estados de oxigenação da Hb^{ct} e definir a ocorrência ou não de um sítio adicional para ligação de fosfato.



3. Materiais e Métodos

3.1 Purificação das Hemoglobinas Hb^{ct} e Hb^{am} do peixe *H. littorale*

3.1.1 Obtenção dos Espécimes

Os exemplares utilizados foram conseguidos junto ao CAUNESP- Centro de Aquicultura da UNESP- Jaboticabal por intermédio do Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez, e mantidos no Biotério desta instituição.

3.1.2 Coleta e Processamento do Sangue

Espécimes adultos de *Hoplosternum littorale* (figura 13) apresentando um tamanho de aproximadamente 16 X 6 cm, foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1g para 15 litros de água) por aproximadamente cinco minutos.

O sangue dos animais foi coletado por punção da veia caudal com seringa e agulha descartáveis, contendo 1mL de solução salina tamponada (tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 0,9% de NaCl, EDTA 1mM e 0,2% de D-Glicose). O sangue coletado foi transferido imediatamente para tubos de polipropileno (Corning 50mL) contendo solução salina tamponada.

Em seguida, passou-se à "lavagem das hemácias", onde os tubos foram centrifugados por quatro vezes a 380 xg durante 10 minutos numa temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi removido no final de cada centrifugação e foi adicionado tampão salino, (previamente descrito, porém sem glicose) a fim de separar as hemácias dos demais componentes do plasma. A hemólise foi realizada por acréscimo de tampão contendo: Tris-HCl 50mM, pH 9,2 seguido por centrifugação (1520 xg por 40 minutos), sendo o sobrenadante concentrado em concentradores centriprep 50, da Amicon.





Figura 13. Foto de um espécime do peixe *H. littorale*.

O primeiro processo cromatográfico ao qual o sangue hemolisado foi submetido foi a filtração em gel, processo no qual as moléculas são separadas de acordo com seus tamanhos e formas (Scopes, 1994).

A coluna de filtração em gel com dimensões de 2,6x18cm foi preenchida com Sephacryl S-100 HR em ambiente refrigerado a 4°C. A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, pH 9,2 e NaCl 0,2 M. Após a eluição das amostras, estas foram novamente concentradas por centrifugação a 380 xg.

A separação das isoformas da hemoglobina foi realizada por cromatografia de troca iônica. Neste procedimento íons que são eletrostaticamente ligados na resina insolúvel são reversivelmente trocados por íons em solução.

A coluna (2,6 x 15 cm) foi preenchida por Q-Sepharose, a 4°C. Foi usado um gradiente linear salino de eluição (0 a 100 mM de NaCl, num volume de 150 mL) em tampão Tris 50mM, pH 9,2. As frações foram concentradas por centrifugação a 380 xg usando concentradores Amicon (centriplus 50), fazendo-se o acréscimo do volume de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,2 (3 vezes o volume da amostra) com intuito de substituir o tampão anterior. A amostra concentrada foi posteriormente armazenada em nitrogênio líquido, até o momento de uso.

3.1.3 Focalização Isoelétrica

Os componentes isolados tiveram sua purificação aferida por focalização isoeletrica em gel de agarose.

Para a confecção do gel pesou-se 0,22g de agarose e adicionou-se a esta 13,2mL de água bidestilada. Em seguida à dissolução da agarose, acrescenta-se anfólitos nas seguintes proporções: 0,8 mL de anfólito (faixa de pH 3-10) e 0,8mL de anfólito (faixa de pH 8-10,5). Posteriormente, a solução é rapidamente distribuída sobre uma placa de vidro (5 X 7cm) que suporta 5mL de gel. Em poucos segundos o gel solidifica-se e, então, é colocado nas extremidades da placa contendo o gel, duas tiras de papel de filtro (5 X 0,5cm, com 1mm de espessura) embebidas uma com solução de NaOH 1M (extremidade catódica) e outra solução de H_3PO_4 1M (extremidade anódica). Sendo assim, coloca-se a placa numa caixa de isopor contendo gelo no seu interior, para dissipação do calor, e sobre a placa uma tampa de acrílico com os eletrodos é colocada sobre as tiras, assim permite-se a passagem de corrente elétrica pelo gel de agarose. Esta etapa é chamada de pré-focalização. Durante a pré-focalização é aplicada uma corrente de 5mA por 10-15 minutos, a fim de que os anfólitos se distribuam pelo gel, formando o gradiente de pH.

Ao final da pré-focalização, retira-se a placa com os eletrodos e aplica-se a amostra de Hb no meio do gel, durante o processo de transferência da amostra, da fita para o gel, mantêm-se a corrente de 5mA constante, o tempo de transferência é variável, sendo analisado visualmente. Após uma razoável transferência da amostra, eleva-se a corrente elétrica para 8mA constante, iniciando a corrida de



aproximadamente 40 minutos. Ao final da corrida fixa-se o gel com TCA 20% (ácido tricloroacético) por 3 minutos e, em seguida, cobre-se o gel com papel de filtro para secagem. Se necessário, após uma boa desidratação do gel procede-se à coloração com Ponceau ou negro de Amido.

3.2 Cristalização das Hb^{ct} e Hb^{an}

Para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína, por técnicas de difração de raios X, é imprescindível a obtenção de monocristais de tamanho apropriado para a coleta de dados. Para a obtenção de cristais adequados é necessário controlar fatores que influenciem a cinética de crescimento do cristal da macromolécula como: pH, temperatura, pureza e concentração da amostra (Drenth, 1999).

Existem várias técnicas de cristalização de proteínas, todas tendo como objetivo levar a solução da macromolécula biológica a um estado de supersaturação (Ducruix & Giége, 1999), favorável a formação dos primeiros núcleos cristalinos.

Dentre os métodos normalmente usados para a obtenção de cristais, a difusão de vapor e a cristalização em *batch* foram empregados nesse trabalho; a difusão de vapor foi realizada através do sistema de gota pendurada (*hanging drop*), segundo o método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

Para a aplicação do método de difusão de vapor 1,0 mL de cada uma das soluções que compõe o método da Matriz esparsa foi colocada nos reservatórios de uma placa de cristalização. As gotas, contendo a Hb e a solução de

cristalização, foram montadas em lamínulas siliconizadas (figura 14). As lamínulas foram colocadas e vedadas com graxa de silicone sobre cada um dos reservatórios.

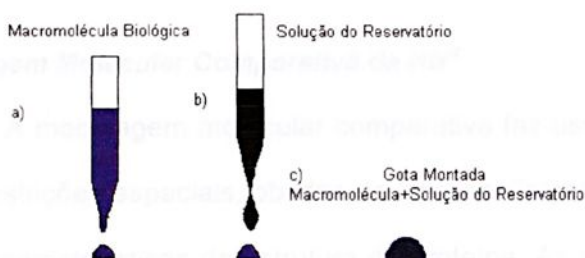


Figura 14. Esquema mostrando a montagem de uma gota de cristalização, utilizando-se o método de difusão de vapor.

No método de cristalização em Batch a solução de Hb foi misturada ao agente de cristalização em um tubo de vidro, sendo a extremidade deste vedada após a adição da amostra.

Uma descrição sobre a técnica e os princípios de cristalização são discutidos no anexo 2.

3.3 Coleta de Dados dos Cristais das Hbs

Para a coleta de dados de difração de raios X dos cristais das Hb^{ct} e Hb^{an} do peixe *H. littorale* utilizamos dois métodos: (1) os cristais foram montados em capilares de vidro, e os dados coletados à temperatura ambiente, (2) os cristais foram colocados em *loops* e submetidos ao processo de congelamento com nitrogênio gasoso (100 K), utilizando como protetor criogênico PEG 400.

Os cristais foram expostos à radiação Síncrotron, na estação PCr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) Campinas, SP. Os dados de difração de

raios X para ambos cristais foram coletados utilizando placa de imagem Marccd com radiação de comprimento de onda de 1,43 Å.

3.4 Modelagem Molecular Comparativa da Hb^{ct}

A modelagem molecular comparativa faz uso do procedimento de satisfação de restrições espaciais, obtidas de uma análise estatística das relações entre as várias características da estrutura da proteína. As restrições e termos de energia enfocando o propósito estereoquímico são combinados em uma função objetiva. Os modelos são calculados então por um procedimento de otimização da função objetiva que minimiza a violação das restrições espaciais.

Foi realizada uma modelagem molecular comparativa com relação à sequência da Hb^{ct} (Weber *et al.*, 2000).

O primeiro passo no processo foi a identificação das proteínas com estruturas tridimensional conhecidas que estão relacionadas com a sequência alvo. Iniciou-se a busca usando como parâmetro de entrada a sequência de ambas cadeias (α e β) da estrutura da Hb^{ct} para que esta fosse comparada com as sequências das estruturas conhecidas (*templates*) depositadas no PDB. As estruturas cristalográficas escolhidas como modelo inicial para a modelagem foi a Hb de *Pagothenia bernacchii* (código do PDB: 1GCV e 1 GCW) (Ito *et al.*, 1995) nas formas carbomonoxigenada e desoxigenada.

O segundo passo foi o alinhamento das sequências primárias de ambos, alvo e *template*. Um alinhamento preciso foi obtido usando o programa MultAlin (Corpet, 1988).



No terceiro passo foram construídos modelos para cada cadeia polipeptídica independentemente, através do programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993). Foram obtidos 1000 modelos tridimensionais para cada cadeia, tanto da estrutura oxigenada, quanto da desoxigenada. Em posse dos melhores modelos de cada cadeia, passou-se para a montagem das estruturas quaternárias; para tal procedimento inicialmente foi realizada a sobreposição das cadeias α e β com o tetrâmero do *template*, utilizando o programa LSQKAB (CCP4, 1994), para obtenção do dímero. Obtido as coordenadas do dímero, foi aplicado a matriz de rotação das coordenadas para a obtenção do tetrâmero, e a partir deste procedimento, obteve-se as coordenadas dos modelos das estruturas quaternárias.

No quarto passo, os modelos foram avaliados com relação à qualidade estéreo-química, que foi feita com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1994), e o melhor modelo, segundo este parâmetro, foi avaliado também pelos valores de RMSD, calculados com o programa LSQKAB (CCP4, 1994). Valores de RMSD medem a dissimilaridade entre os modelos gerados e as estruturas cristalográficas.

Para o cálculo da área de superfície escondida na interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_1\beta_2$) da Hb^{ct} no estado oxigenado e desoxigenado, foi utilizado o programa AREIMOL (CCP4, 1994).



3.5 Avaliação das Mudanças Conformacionais das Hb^{ct} e Hb^{an} pelo Método de Estresse Osmótico

O estudo da ligação do oxigênio às hemoglobinas do peixe *Hoplosternum littorale* (Hb^{ct} e Hb^{an}) purificadas e concentradas a 60 μ M (heme), foi realizado pelo método espectrofotométrico-tonométrico (Giardina & Amiconi, 1981), o qual se baseia nas mudanças espectrais que ocorrem durante a transição entre as formas desoxigenada e oxigenada. Foi utilizado como tampão, Hepes 30 mM pH 7,5 e como soluto neutro sacarose. As análises foram realizadas no referido tampão, na ausência de ânions cloreto e fosfato (forma *stripped*), e na presença destes efetores alostéricos (100 mM de Cloreto de Sódio, 0,1 mM e 1mM de adenosina trifosfato). Para evitar a formação de meta-hemoglobina foi adicionado às soluções de hemoglobina catalase e superóxido dismutase. Todos os experimentos foram realizados a 20 °C.

O método espectrofotométrico-tonométrico foi executado com a hemoglobina através de passagens alternadas de nitrogênio e vácuo no interior do tonômetro, acompanhado de leituras espectrofotométricas da absorbância em determinados comprimentos de onda, durante a passagem da forma desoxigenada para a oxigenada da hemoglobina e vice-versa. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Varian.

O controle da obtenção da forma desoxigenada foi feito pela relação proposta por Benesch e colaboradores (1965):

$$\frac{\text{Abs}_{555}}{\text{Abs}_{540}} \geq 1,24 \quad (11)$$



que indica a relação entre os coeficientes de absorvidade da forma desoxigenada em 555 e 540 nm, respectivamente.

Antes da desoxigenação da solução de hemoglobina foi realizada a leitura da absorbância da oxi-hemoglobina inicial, e os dados foram utilizados para os cálculos de P_{50} , $\log P_{50}$ e n_{50} , e também para constatar o nível de concentração de meta-hemoglobina. Todos os experimentos em que o nível inicial ou final de meta-Hb ultrapassasse 5%, foram descartados.

A reoxigenação foi realizada com auxílio de seringas, fazendo-se a injeção de pequenos volumes de ar no interior dos tonômetros. A cada acréscimo de ar os tonômetros foram equilibrados em banho com água a temperatura controlada (20°C) durante um tempo mínimo de 7 minutos.

Para efeito de cálculo dos parâmetros funcionais e do teor de meta-hemoglobina, foram adotadas as variações das leituras de absorbância em 690 nm (linha de base), 569 nm (ponto isobéstico), 560 nm (pico da desoxi) e 576 e 541 nm (picos da oxi). As adições de ar prosseguiram até atingir níveis elevados de saturação. Nesse ponto, o tonômetro era aberto, a fim de se obter a leitura da oxi final (100% de saturação).

A saturação parcial foi calculada a cada adição através da seguinte expressão:

$$Y = (Abs_{\lambda} - Abs_D) / (Abs_O - Abs_D) \quad (12)$$

Onde, Y é a saturação parcial (0 a 1),

Abs_{λ} é a absorbância em 576, 560 ou 540 nm, após a adição de ar,



Abs_O e Abs_D são as absorbâncias da oxi-Hb inicial e da desoxi-Hb respectivamente, no mesmo comprimento de onda (λ) em que foi efetuada a leitura de absorbância.

As leituras em 569 nm permitiram corrigir as medições espectrais.

Os volumes de ar adicionados foram convertidos em pO₂ de acordo com uma modificação, realizada por Bonaventura, da fórmula apresentada por Giardina & Amiconi (1981):

$$PO_2 = \frac{(\%O_2 \cdot TB / TA \cdot (PBC - (PV \cdot UR))) \cdot VI}{VT - VA} \quad (13)$$

onde, PO₂ (mmHg) é a pressão parcial d oxigênio,

%O₂ é o percentual do gás na atmosfera (21%),

PBC é a pressão atmosférica corrigida (anexo 4),

PV é a pressão de vapor de água (segue anexo 4),

UR a umidade relativa,

VT o volume do tonômetro, em mL,

VA o volume da amostra, em mL,

VI o volume de ar injetado, em mL.

Os parâmetros que descrevem as propriedades funcionais de afinidade e cooperatividade foram calculados através de um programa que executa os cálculos antes mencionados, e realiza uma representação gráfica de Hill. A partir do gráfico de Hill, foram determinados os pontos para a execução de uma regressão linear ($y = a + bx$) na região em torno de 50% de saturação (região da reta onde intercepta o eixo X), obtendo-se assim o coeficiente de Hill (n), que corresponde à inclinação da reta. Por sua vez, a P₅₀ foi calculada utilizando-se a intersecção da reta no eixo y:

$$P_{50} = 10^{-a/b} \quad (14)$$



Após o experimento de ligação de oxigênio, a osmolalidade da solução de Hb foi determinada pela diminuição do ponto de congelamento, medido em Osmômetro: Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.) no laboratório do prof. Dr. Márcio Francisco Colombo (Departamento de Física, IBILCE/UNESP).

A atividade de água (a_w) foi obtida através da expressão (Colombo e Bonilla Rodriguez, 1996):

$$\ln a_w = \frac{\Delta}{K_f M_w} = \frac{-Osm}{M_w} \quad (15)$$

onde, Δ é a diminuição do ponto de congelamento,

$K_f = 1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$ é a constante crioscópica,

Osm é a osmolalidade da solução (mol Kg^{-1}) e

M_w é a molaridade da água pura (55,55 M)

Para analisar o efeito da atividade de água como um simples ligante heterotrópico na oxigenação, foi utilizada a equação número 9 p. 21. Esta análise considera que somente a atividade de um ligante heterotrópico varia, neste caso, a água.

Para analisar se a atividade de mais do que um ligante heterotrópico (soluto e água) está variando em nossos experimentos, foi utilizada a equação 10 p. 21.

A equação 10 foi então modificada, apresentando-se como:

$$\ln P_{50} = P_0 - \Delta n_s \cdot \ln(-55,55 \cdot (\ln a_w - \ln a_{w0})) - \Delta n_w \cdot \ln a_w \quad (16)$$

onde P_0 e $\ln a_{w0}$ são os valores de P_{50} e $\ln a_w$ na ausência de sacarose;

Substituindo-se $\ln a_w$ por: $-Osm \cdot 55,55$, temos:

$$\ln P_{50} = P_0 - \Delta n_s \cdot \ln(Osm - Osm_0) + \Delta n_w \cdot \frac{Osm}{55,55} \quad (17)$$



onde Osm é a osmolalidade da solução em cada ponto.

3.3 Separação das frações hemoglobínicas

Nas primeiras de purificação por coluna de troca iônica, a amostra foi

3.6 Titulação da Hb^{ct} com ATP

O número de moléculas de ATP ligadas à molécula de Hb^{ct} foi determinado conforme equação de interrelação de Wyman (Amiconi *et al.*, 1985):

$$-\Delta x = \Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{ATP}] \quad (18)$$

onde Δx fornece o número de moléculas de ATP ligado por heme;

As constantes de associação com ATP foram determinadas utilizando uma estimativa não linear de parâmetros do programa SigmaPlot (Jandel Scientific, EUA), de acordo com a equação abaixo (Bonilla *et al.*, 1994):

$$\log(P_{50})_p = \log(P_{50})_a + \frac{1}{4} \log \left(\frac{1 + K_D [X]}{1 + K_O [X]} \right) \quad (19)$$

onde, $\log(P_{50})_p$ é o logaritmo de P_{50} medido na presença de ATP.

$\log(P_{50})_a$ é o logaritmo de P_{50} medido na ausência de ATP.

K_D e K_O , são as constantes de associação na forma desoxigenada e oxigenada respectivamente.

X é a concentração molar de ATP livre.

O método utilizado para a determinação do valor de P_{50} em virtude da concentração de ATP foi o método espectrofotométrico-tonométrico descrito acima. Para tal foi utilizado tampão Hepes 30 mM (pH 7,5) e várias concentrações de adenosina trifosfato (ATP).

4. Resultados e Discussão

4.1 Separação das Iso-hemoglobinas

No processo de purificação por troca iônica, a amostra total demonstrou ser composta por duas frações (figura 15), o que foi confirmado pelo método de isoeletrofocalização em gel de agarose.

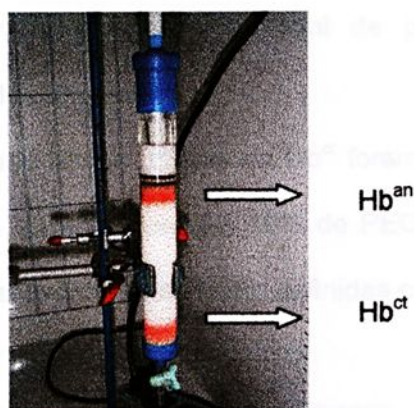


Figura 15. Coluna de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose), mostrando o padrão de separação dos componentes do sistema de hemoglobina do peixe *H. littorale*.

A Hb total apresentou padrão de separação em duas formas distintas. Uma Hb minoritária catódica, (Hb^{ct}), e outra majoritária anódica (Hb^{an}) (figura 16), confirmando os dados encontrados por Weber e colaboradores (2000).

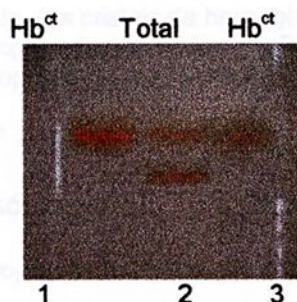


Figura 16. Foto do gel de isoeletrofocalização em agarose. Os poços número 1 e 3 indicam a Hb^{ct} e o poço número 2 a Hb total.

4.2 Cristalização

4.2.1 Cristalização das Hb^{ct} e Hb^{an} do Peixe *H. littorale*

Cristais da Hb^{ct} foram obtidos inicialmente pelo sistema de *hanging drops* na condição de Hepes 0,1M pH 7,5 e 20% de PEG 10000, contudo tais cristais não apresentavam tamanho e volume ideais. Após várias tentativas de otimização, novos cristais foram conseguidos em tampão bicine 0,1M pH 9,0 e 20% de PEG 10000, numa concentração de 5 mg/ml de proteína; tais cristais apresentaram padrão pobre de difração.

Posteriormente, novos cristais da Hb^{ct} foram obtidos na condição de Hepes 0,1M pH 7,5, 20% de isopropanol e 18% de PEG 4000 (figura 17). Os últimos cristais obtidos apresentaram arestas bem definidas com tamanho e volume consideráveis (0,2 x 0,2 x 0,2 mm).



Figura 17. Foto dos cristais da hemoglobina catódica (Hb^{ct}) na forma oxigenada, crescidos em 0,1M de Hepes, pH 7,5, 20% de isopropanol e 18% de PEG 4000.

Para a Hb^{an} a condição em que surgiram os melhores cristais continha 0,1M de citrato de sódio pH 5,6, 10% de isopropanol e 18% de PEG 4000 pelo sistema de *hanging drops*, mas estes cristais não apresentaram padrão de difração satisfatório; assim novos cristais foram obtidos. Tais cristais cresceram em 0,1M de Hepes, pH 7,5 e 20% de PEG 10000 (figura 18).



Figura 18. Fotos dos cristais da Hb^{an} na forma de meta-hemoglobina. Cristais conseguidos na condição contendo 0,1M de Hepes, pH 7,5 e 20% de PEG 10 000.

Mesmo após exaustivos testes os experimentos de cristalização em *batch* não renderam bons resultados, nem para a forma carbomoxigenada nem para a forma desoxigenada de nenhuma das Hbs investigadas. Isso pode ser consequência da solução macromolecular não ter atingido, em nossas tentativas, um estado de supersaturação, instável termodinamicamente, suficiente para iniciar o processo de nucleação dos cristais.

4.3 Coleta de Dados de Difração de Raios X

Na coleta de dados não foi obtido padrão de difração adequado para nenhum dos cristais de hemoglobina testados.

Esta falta de padrão de difração pode ser atribuída a alguns fatores. Um destes fatores é a falta de pureza da amostra, embora a análise de focalização isoelétrica tenha mostrado sua pureza. A macromolécula não somente deve estar pura em termos de falta de contaminantes, mas também ser conformacionalmente pura. Macromoléculas desnaturadas ou amostras que apresentam microheterogeneidade estrutural, afetam o crescimento dos cristais e principalmente

o empacotamento das macromoléculas na rede cristalina. Como hemoglobinas de peixes apresentam isoformas, (Riggs, 1970) muitas vezes extremamente parecidas estruturalmente, a microheterogenidade pode estar envolvida nos problemas de difração apresentado pelos cristais. E como a qualidade dos cristais depende do ordenamento das moléculas na cela unitária, este fator parece ser o mais provável no nosso caso.

4.4 Modelagem Molecular Comparativa

4.4.1 Qualidade dos Modelos

O alinhamento da seqüência de cada cadeia polipeptídica da Hb^{ct} com o respectivo modelo, mostrou-se apropriado para a execução do processo. Esse fato é atribuído como resultado da ocorrência de muitas regiões conservadas. Sabemos que estruturas tridimensionais de proteínas da mesma família são mais conservadas que suas seqüências, assim, se a similaridade entre duas proteínas a nível de estrutura primária é detectada, a similaridade a nível de estrutura terciária pode ser assumida (Lesk & Chothia, 1980).

A porcentagem de identidade das seqüências entre as Hbs de *H. littorale* e *P. bernacchii* é de 64% para as cadeias α e β (figura 19).



1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

HbCt SLTAKD KALVKAFFGKIAGKADAVGHEALVRMLVVPYPTKTYFAHWPDLSPESEVKKHGKTIHAAVKEAVGKIDDLVGGMAQLSOLHAFKMRVDP SNFKILSHN ILVTCAYHFPDDFTPEVHVSFOKF

1HBH XSLSDKDKAAVRRLWSKIGKSADRAIGNDALSRMIVVPYPTKTYFSHWPOVTPGSPHIKAHGKKVMGGIALAVSKIDDLKTGLMELSEQHAYKL RVDPA NFKILNHCILVVISIHFPEFTPEAHVSLDKF

Consensus .SLsaKDKAAvRAlfgKIagkADA!Gn#ALsRMiVVPYPTKTYFaHWPDlsPgSee!KaHGKk!Maa!aeAVgKIDDLkgG\$a#LS#qHA%K\$RVDPa NFKILnHnILVtcat hFPd#FTPEaHVSIDKF

131 140 143

HbCt LAALSSTAADKYR

1HBH LSGVALALAERYR

Consensus LaalalaaA#rYR

(a)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

HbCt VHFSDAERDAIAAIWGKIHIIDEIGPQSLARVLIYYPHTQRYFSKFGDMSSVAAISGNPKVAAHGKVYLGALEKGVKNLDNVKATYSNLSQLHCEKLNVDPNDFRALGDCITIVVASKFGNAFTPELQNAW

1HBH VENTDKERSIISDIFSHMDYDDIGPKALSRLIYYPHTQRFSGFGMLYNAEAIIGNANVAHGIKVLHGLDRGVKNMDNIAATYADLSTLHSEKLVDPDNFKLLSDCITIVLAAKMGHAFETQGA

Consensus VefsDaERdaIaaIfghidiD#IGPqalaRcLIYYPHTQRhFSgFG\$snaaAIIGNanVAHGIkVLgaL#rGVKN\$DN!aTYa#LSqLHcEKLNVDPDNFralgDCITIVLaakMGnAFTaELQnAf

131 140 146

HbCt HKFLSVVAAALSSRYF

1HBH QKFLAVVVSALGKQYH

Consensus qKFLaVVaaALgkrYh

(b)

Figura 19. Alinhamento das sequências de *P. bernacchii* e *H. littorale*. (a) cadeia α e (b) cadeia β . O alinhamento foi feito com o programa multalin (Corpet, 1988). Na linha "Consensus" os resíduos em vermelho, são resíduos idênticos.

A qualidade dos modelos da Hb^{ct} em ambos estados de oxigenação foi assegurada pela análise das propriedades estereoquímicas e pela comparação com outras estruturas cristalográficas de Hbs.

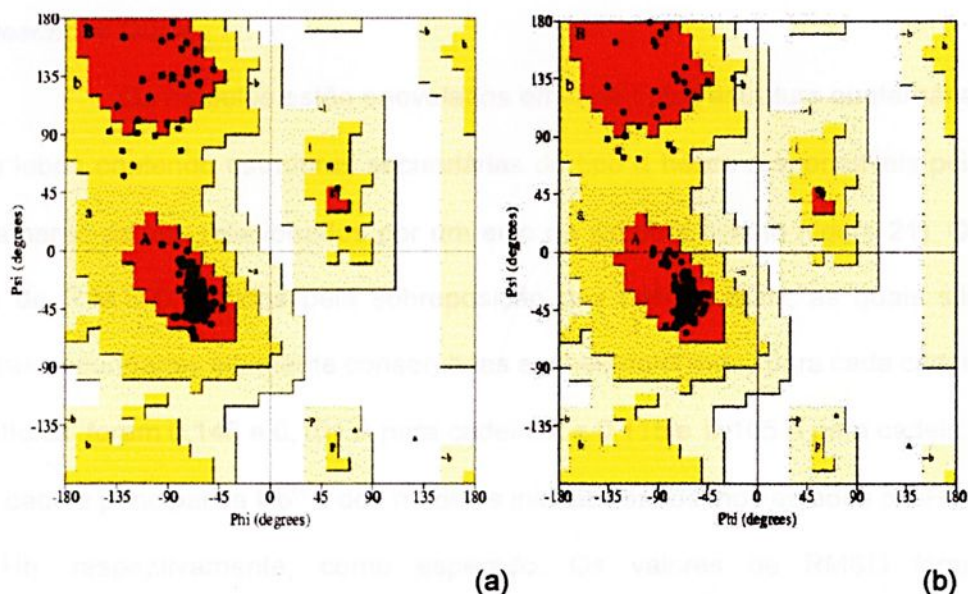


Figura 20. Gráficos de Ramachandran dos modelos gerados para hemoglobina catódica do peixe *H. littorale*, na forma oxigenada (a) e desoxigenada (b). Gráficos calculados pelo programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1994). As regiões A, B, e L são favoráveis, as regiões a, b e l são permitidas e ~a, ~b e ~l são generosamente permitidas. Resíduos de glicina são mostrados como triângulos.

Os diagramas de Ramachandran para os modelos estruturais são mostrados na figura 20. A análise do melhor modelo da Hb^{ct}, na forma oxigenada, mostrou que 94,9% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 5,1% nas regiões adicionalmente permitidas, e 0,0% nas regiões generosamente permitidas e proibidas; A Hb^{ct}, na forma desoxigenada, mostrou 96,5% dos resíduos nas regiões mais favoráveis, 3,5% nas regiões adicionalmente permitidas e 0,0% nas regiões generosamente permitidas e proibidas. O índice geral dos modelos é

bom, assim sendo, os modelos podem ser usados para análises estruturais comparativas com outras Hbs de vertebrados.

4.4.2 Descrição Geral

Os modelos estão enovelados em uma típica estrutura quaternária, com os lobos contendo estruturas secundárias do tipo α hélice responsáveis pelo enovelamento da Hb, relacionados por um eixo de simetria binário (figura 21). Os valores de R.M.S.D. obtidos pela sobreposição das hélices BGH, as quais são estruturas secundárias altamente conservadas em hemoglobinas, para cada cadeia polipeptídica foram 0,146 e 0,101 Å para cadeia α , e 0,115 e 0,105 Å para cadeia β entre a cadeia principal da Hb^{ct} e dos modelos iniciais usados, nos estados oxi-Hb e desoxi-Hb, respectivamente, como esperado. Os valores de RMSD foram comparados com valores de outras Hbs de peixes (tabela 1). O fato que todos os valores de RMSD serem menores que 1Å mostra que as estruturas terciárias e quaternárias são separadamente muito similares umas com as outras, tanto na forma oxigenada quanto na desoxigenada. Sugerindo que modelos são aplicáveis para obtenção de bases estruturais da Hb^{ct}.

As estruturas analisadas aqui, apresentam todos os quatro átomos de ferro permanecendo no plano do heme e fora dele para os estados oxigenado e desoxigenado, respectivamente (figura 22). As distâncias entre a histidina distal, a histidina proximal e o átomo de ferro do heme foram obtidas e comparadas entre a Hb^{ct} e outras Hbs de peixes, como mostrado pela tabela 2.



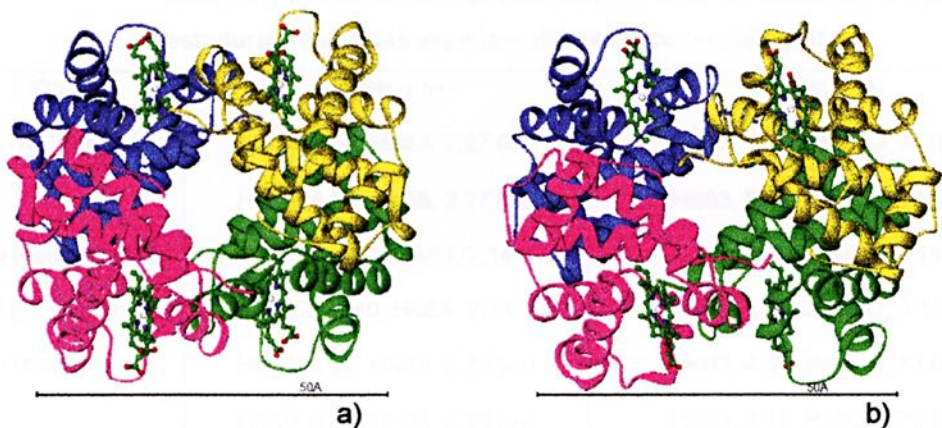


Figura 21. Diagrama em fitas da hemoglobina catódica no estado oxigenado (R) (a) e desoxigenado (T) (b) do peixe *H. littorale*. Figura gerada utilizando o programa RIBBONS (Carson, 1997).

Tabela 1. Valores de RMSD dos átomos da cadeia principal obtidos pela sobreposição dos segmentos em conformação α -hélice (BGH) dos modelos gerados nas formas oxigenada e desoxigenada da Hb, contra estruturas cristalográficas depositadas no PDB (*Protein Data Bank*).

ESTADO DA HEMOGLOBINA	REFERÊNCIA: NO PDB	RMSD DA CADEIA α (Å)	RMSD DA CADEIA β (Å)
Carbomonoxi	1spg	$\alpha_1 = 0,367$	$\beta_1 = 0,485$
Carbomonoxi	1ltln	$\alpha_1 = 0,115$	$\beta_1 = 0,454$
Carbomonoxi	1ouu	$\alpha_1 = 0,412$	$\beta_1 = 0,469$
Carbomonoxi	1gcw	$\alpha_1 = 0,674$	$\beta_1 = 0,664$
Desoxi	1cg5	$\alpha_1 = 0,501$	$\beta_1 = 0,765$
Desoxi	1out	$\alpha_1 = 0,399$	$\beta_1 = 0,429$
Desoxi	1gcv	$\alpha_1 = 0,579$	$\beta_1 = 0,697$



Tabela 2. Valores referentes às distâncias, em Å, entre a His proximal, a distal e o átomo de ferro do grupamento heme. Comparação entre as estruturas modeladas e estruturas resolvidas experimentalmente por cristalografia .

Estrutura	Cadeia α (Å)	Cadeia β (Å)
Hb^{at} (oxi)	His59, 4,54; His88, 2,27 (α_1)	His63, 5,09; His92, 2,32 (β_1)
	His59, 4,54; His88, 2,27 (α_2)	His63, 5,09; His92, 2,32 (β_2)
1pbx (carbomonoxi)	His59, 4,34; His88, 2,14	His63, 5,0; His92, 2,18
1t1n (carbomonoxi)	His59, 4,40; His88, 2,14	His63, 4,40; His92, 2,13
1ouu (carbomonoxi)	His59, 4,35; His88, 2,21 (α_1)	His63, 4,40; His92, 2,13 (β_1)
	His59, 4,45; His88, 2,30 (α_2)	His63, 4,15; His92, 2,22 (β_2)
1spg (carbomonoxi)	His60, 4,68; His89, 2,00	His63, 4,47; His92, 2,05
1gcw (carbomonoxi)	His58, 4,80; His87, 2,22 (α_1)	His53,4,80; His82, 2,25 (β_1)
	His58, 4,70; His87, 2,10 (α_2)	His53, 4,80; His82, 2,28 (β_2)
Hb humana (oxi)	His58, 4,3; His87, 1,9	His63, 4,2; His92, 2,1
Hb^{at} (desoxi)	His59, 4,14; His88, 2,37 (α_1)	His63, 4,59; His92, 2,32 (β_1)
	His59,4,14; His88, 2,37 (α_2)	His63, 4,59; His92, 2,32 (β_2)
1cg5 (desoxi)	His59, 4,45; His88, 2,18	His59, 4,45; His88, 2,25
1out (desoxi)	His59, 4,69; His88, 2,18	His63, 4,67; His92, 2,10
1gcv (desoxi)	His58, 4,20; His87, 2,18 (α_1)	His53, 4,50; His82, 2,24 (β_1)
	His58, 4,24; His87, 2,30 (α_2)	His53, 4,50; His82, 2,20 (β_2)
1hbh (desoxi)	His59, 4,22; His88, 2,26 (α_1)	His59, 3,93; His88, 2,25 (β_1)
	His59, 4,48; His88, 2,19 (α_2)	His63, 4,74; His92, 2,11(β_2)
Hb humana (desoxi)	His59, 4,2; His88, 2,1	His59, 4,1; His88, 2,2

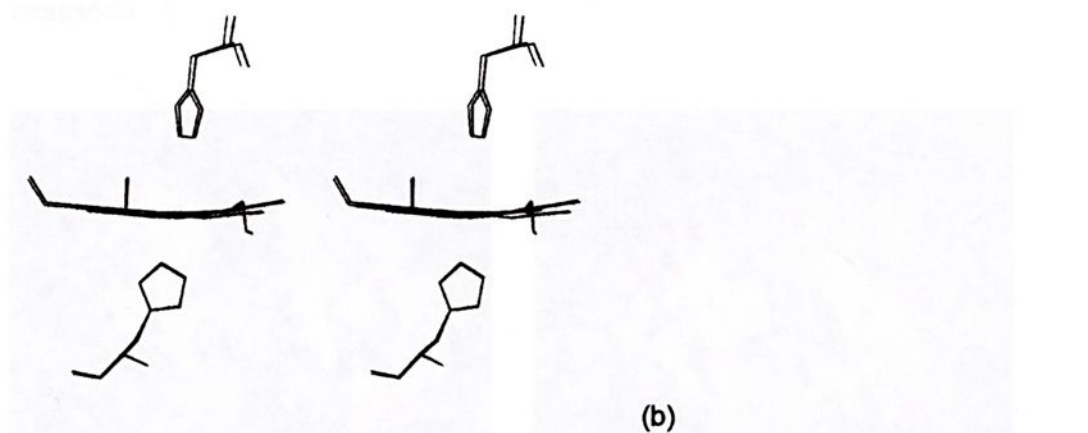
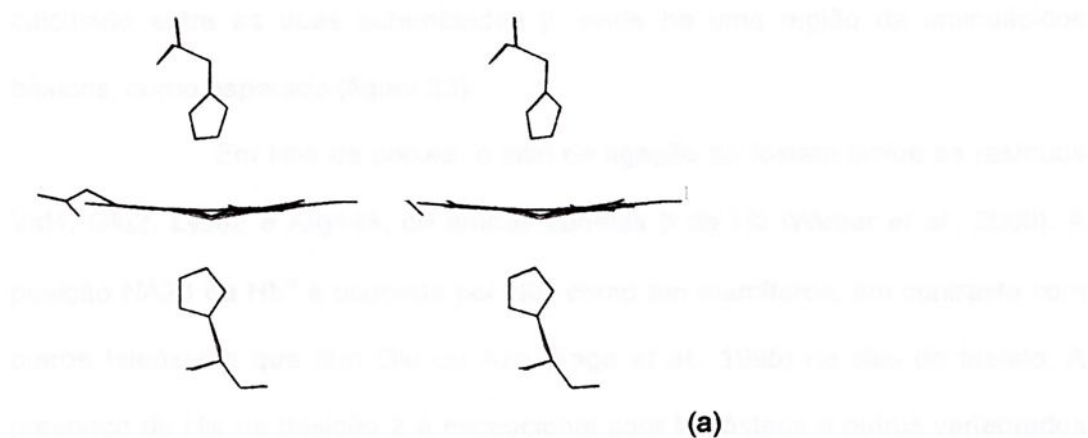


Figura 22. Comparação estereoscópica da região do heme. Em preto Hb desoxi; em cinza Hb de *H. littorale* na forma desoxi Hb (a). Em preto Hb carbomonoxi de *P. bernacchii*, em cinza, Hb de *H. littorale* (b).

Um sítio de ligação específico usualmente exibe uma certa região de aminoácidos ácidos ou básicos para complementar seu potencial de receptor ou de alvo (Lu *et al.*, 2000). A região definida na cavidade central correspondendo ao sítio de ligação de fosfato pode ser vista no potencial eletrostático de superfície

calculado entre as duas subunidades β , onde há uma região de aminoácidos básicos, como esperado (figura 23).

Em Hbs de peixes, o sítio de ligação do fosfato inclui os resíduos Val1, Glu2, Lys82 e Arg143, de ambas cadeias β da Hb (Weber *et al.*, 2000). A posição NA2 β da Hb $^{\alpha}$ é ocupada por His, como em mamíferos, em contraste com outros teleosteos que têm Glu ou Asp (Fago *et al.*, 1995) no sítio de fosfato; A presença de His na posição 2 é excepcional para teleosteos e outros vertebrados ectotérmicos, onde sua distribuição sugere uma correlação com a respiração acessória.

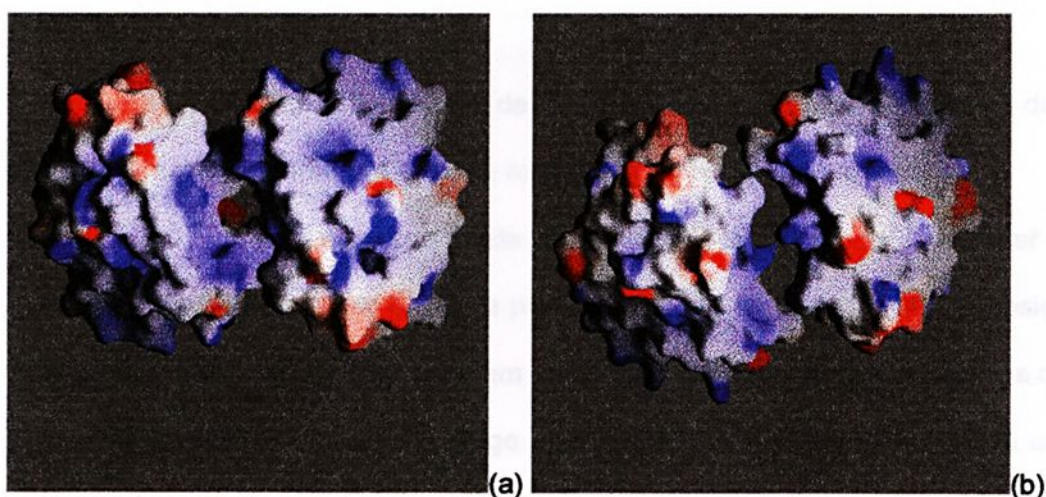


Figura 23. Representação do potencial eletrostático de superfície para os monômeros $\beta_1\beta_2$, para a Hb $^{\alpha}$ nas formas oxigenada e desoxigenada, a e b, respectivamente. As figuras foram geradas pelo programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) onde a cor azul representa resíduos carregados positivamente; vermelho representa resíduos carregados negativamente e branco resíduos neutros.

Um sítio adicional de ligação de fosfatos tem sido proposto para alguns vertebrados (Amiconi *et al.*, 1985; Tamburrini *et al.*, 2000; Verde, *et al.*, 2002). Os resíduos adicionais envolvidos no sítio adicional de fosfatos seriam Lys104 e Lys132 de ambas cadeias β (Verde *et al.*, 2002). Na Hb^{ct} a presença dos resíduos Lys82 e Lys132 e também da Arg na posição 104, substituindo um resíduo de lisina, porém mantendo o caráter positivo desta posição, sugerem a presença de um sítio adicional de fosfatos, como foi proposto por Weber e colaboradores (2000) (figura 24). Esta proposta é suportada pela análise do potencial eletrostático da superfície, obtido da cavidade central da molécula de Hb^{ct}, pois a cavidade é predominantemente positiva, contudo esta análise é insuficiente para confirmar tal proposta.

A figura 23, também denota a diferença na distância entre as duas cadeias β , sendo menor para a forma oxigenada da Hb, como esperado.

A Hb^{ct} é caracterizada por um efeito Bohr reverso (Weber *et al.*, 2000). Esse efeito pode ser devido à presença de um resíduo de Asn na posição FG4(β 94), o qual é encontrado também na Hb catódica de enguia e outras Hbs que apresentam efeito Bohr reverso (Fago *et al.*, 1995). A Hb^{ct} apresenta ainda uma substituição na posição HC3(β 146), onde um resíduo de His é trocado por um resíduo de Phe, como encontrado na Hb catódica de truta e Hb de enguia (Fago *et al.*, 1995). O efeito Bohr reverso na Hb^{ct}, a qual apresenta His na posição NA2(β 2), é quase duas vezes maior do que o efeito Bohr reverso encontrado na Hb catódica de enguia (Weber *et al.*, 2000), a qual apresenta um resíduo de Glu naquela

posição, indicando que grupos carregados positivamente na cavidade central contribuem para este efeito.

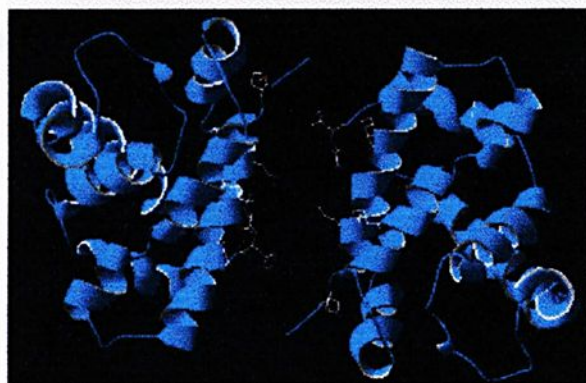


Figura 24. Representação dos resíduos de aminoácidos envolvidos nos sítios, convencional e adicional, de ligação de fosfato.

4.4.3 Interface $\alpha_1\beta_2$

A diferença entre as conformações T e R ocorre principalmente na interface $\alpha_1\beta_2$, a qual consiste da hélice C e segmento FG da cadeia α_1 , respectivamente, contatando com o segmento FG e hélice C da β_2 . Quando a região de interface $\alpha_1\beta_2$ da Hb^{ct} e os modelos iniciais nas formas oxi e desoxi são sobrepostos, alinham intimamente. Pequenos desvios nas cadeias laterais são geralmente pouco importantes, a menos que eles ocorram em regiões que estão envolvidas na função, tal como sítio ativo e sítio de ligação de ligantes (Sali & Sánchez, 2000) (figura 25).

Na Hb^{ct} em comparação com Hb humana (Silva *et al.*, 1992) pode ser visto que o segmento α FG mostrou somente uma substituição no resíduo

90(1FG), onde His é trocada por Phe. Na hélice α C dois resíduos são substituídos, Phe36 (1C) por Tyr e Thr38 (3C) por Gln.

No segmento β FG o resíduo de Asp94 (2FG) é trocado por Glu e His97 (4FG) por Asn; Na hélice β C o resíduo Phe41(7C) é substituído por Tyr.

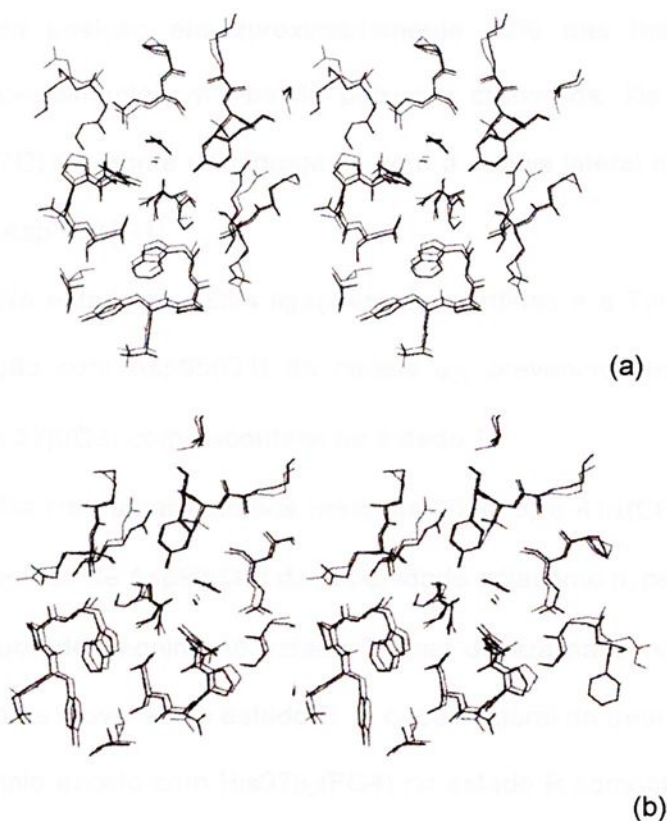


Figura 25. Comparação das estruturas de *H.littorale* Hb (preto) e *P. bernachii* (cinza) na forma oxigenada (a) e desoxigenada (b) na interface $\alpha_1\beta_2$ após a sobreposição dos tetrâmeros. Figuras feitas no programa Xtalview (McRee,1999).

A His97 β (4FG) presente em Hb humana é trocada para Asn em Hb^{ct}, mas o contato com Thr41 α (5C), no estado T é conservado; onde no estado R

His97 β esta em contato com Thr38 α (2C) perdendo contato com Thr41 α , mas em Hb^{ct} Thr38 α é substituído por Gln38 α não fazendo contato com Asn97 β .

A mudança de Phe para Tyr do resíduo 41 β (7C) significativamente altera o contato feito pelo resíduo em ambas estruturas quaternárias, mas Tyr é encontrada nesta posição em aproximadamente 10% das hemoglobinas de vertebrados, especialmente em Hbs de peixes e crocodilos. Na Hb^{ct} na forma desoxi, Tyr 41 β (7C) faz ponte de hidrogênio com a cadeia lateral da Cys 40 β (C6), Asn 102 β (G4) e Asp 99 β (G1).

No estado R, estas ligações são perdidas e a Tyr em vez disso, forma uma ligação com Asp95(G1) da cadeia α_2 , prevenindo este resíduo de interagir com Trp 37 β (C3) como acontece no estado T.

Na Hb humana ambos resíduos 38 α (C3) e 41 α (C6) são resíduos de treonina. O resíduo de Asp99(G1) da subunidade adjacente β_2 permanece entre estes dois resíduos de treonina no estado T, mas desliza passando por 38 α (C3) conforme a proteína move-se no estado R. A cadeia lateral da treonina C3 não faz ponte de hidrogênio exceto com His97 β_2 (FG4) no estado R somente (Tame *et al.*, 1996). Na Hb^{ct} o resíduo 97 β_2 (FG4) é Asn e 38 α (C3) é uma Gln (como na maioria das Hbs de peixes) mas parece desempenhar um papel similar, com o Asp99(G2) permanecendo entre 38 α e 41 α na forma desoxi e deslizando no estado R.

O resíduo His97(4FG) que foi mutado para Asn, não realiza ponte de hidrogênio entre as cadeias na Hb humana e nem na Hb^{ct}.



Dois resíduos têm sido identificados como podendo levar a relativa estabilização do estado T, Tyr85 β (F1) e Tyr41 β (C7) como ocorre na Hb I da truta (Tame *et al.*, 1996) também estão presentes em Hb^{ct}.

A Hb^{ct} modelada na forma oxigenada, apresenta 995 Å² de área de superfície escondida e 1431 Å² para a forma desoxigenada, valores maiores que os apresentados pela Hb humana (950 e 1300 Å² para oxi-Hb e desoxi-Hb, respectivamente (Chothia *et al.*, 1976)).

Esta diferença de área acessível com o processo de oxigenação encontrada para a Hb^{ct} está de acordo com o valor da variação do número de moléculas de água, (uma molécula de água equivale a 10 Å²) encontrado nos experimentos de estresse osmótico (~41 moléculas de água).

4.4.4 Interface $\alpha_1\beta_1$

A interface $\alpha_1\beta_1$ (e $\alpha_2\beta_2$) entre as subunidades α e β do dímero, é bastante estável com a posição relativa das duas subunidades não sendo modificada pelo estado de ligação da proteína.

A interface $\alpha_1\beta_1$ em Hb^{ct} ocupa uma área de superfície escondida de 1492 Å² e 1640 Å² nas formas oxi-Hb e desoxi-Hb respectivamente, menor que aquela da Hb humana (forma meta-hemoglobina, 1750 Å², forma desoxigenada, 1650 Å²).

Quando a interface $\alpha_1\beta_1$ da Hb^{ct} e das Hbs utilizadas como modelos iniciais são sobrepostas a conformação global é mantida (figura 26).

A preservação da estrutura tridimensional da interface $\alpha_1\beta_1$, importante para as propriedades funcionais da Hb, foi observada em nossos modelos para Hb^{ct} (figura 26). Sendo esta interface altamente conservada durante a evolução, é usualmente usada como referência na comparação de estruturas, entre ambas as formas, e entre Hbs de diferentes espécies (Baldwin & Chothia, 1979). Esta preservação é provavelmente um requerimento chave da conformação tetramérica da Hb de vertebrados.

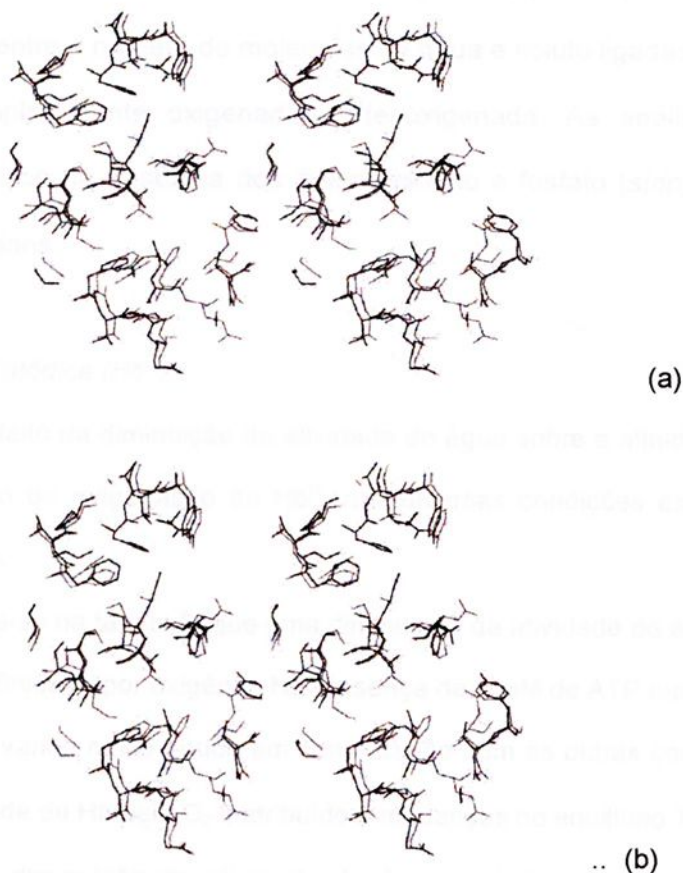


Figura 26. Comparação das estruturas da Hb de *H.littorale* (preto) e da Hb de *P. bernachii* (cinza) na forma oxigenada (a) e desoxigenada (b) na interface $\alpha_1\beta_1$, após sobreposição dos tetrâmeros. Figuras feitas no programa Xtalview (McRee, 1999).

4.5 Avaliação das Mudanças Conformacionais das Hb^{ct} e Hb^{an} pelo Método de Estresse Osmótico

Os experimentos de estresse osmótico foram realizados a fim de se analisar a variação da área exposta ao solvente e, dessa forma, sondar as mudanças conformacionais que ocorrem durante o processo de oxigenação das Hbs catódica e anódica do peixe *H. littorale*. Para investigar as transições alostéricas, foi medida a influência da atividade de água e da presença de ânions na aparente diferença entre o número de moléculas de água e soluto ligadas à Hb, nas conformações completamente oxigenada e desoxigenada. As análises foram realizadas com as Hbs na ausência dos ânions cloreto e fosfato (*stripped*), e na presença destes ânions.

4.5.1 Hemoglobina Catódica (Hb^{ct})

O efeito da diminuição da atividade de água sobre a afinidade da Hb pelo O_2 , no processo de oxigenação da Hb^{ct} , nas diversas condições estudadas é mostrado na tabela 3.

Nota-se na tabela 3, que uma diminuição da atividade de água leva a uma diminuição na afinidade por oxigênio. Na presença de 1 mM de ATP mais 100 mM de NaCl a afinidade variou muito pouco em comparação com as outras condições. A diminuição da afinidade da Hb pelo O_2 é atribuído à mudanças no equilíbrio $T \rightarrow R$ como uma decorrência da diminuição da atividade de água. A baixa atividade de água favorece a estabilização da estrutura menos hidratada, no caso, a forma T de baixa



afinidade pelo O₂. O que também é observado em outras Hbs de mamíferos (Colombo et al., 1992; Tosqui et al., 2000; Hundahl et al., 2003).

Tabela 3. Dependência da afinidade da Hb^{ct} em função da atividade de água.

Condição	Osm (Osm/kgH ₂ O)	ln a _w	P ₅₀ (mmHg)	ln P ₅₀
<i>Stripped</i>	0,044	-7,92 . 10 ⁻⁴	2,08	0,73
	0,156	-2,81 . 10 ⁻³	2,15	0,77
	0,343	-6,19 . 10 ⁻³	2,25	0,81
	0,469	-8,44 . 10 ⁻³	2,29	0,83
	0,715	-1,29 . 10 ⁻²	2,33	0,84
	0,876	-1,58 . 10 ⁻²	2,43	0,89
	1,211	-2,16 . 10 ⁻²	2,74	1,01
ATP 1mM	0,042	-7,56 . 10 ⁻⁴	7,13	1,96
	0,161	-2,91 . 10 ⁻³	7,59	2,03
	0,339	-6,11 . 10 ⁻³	7,96	2,07
	0,455	-8,21 . 10 ⁻³	8,27	2,11
	0,644	-1,16 . 10 ⁻²	8,52	2,14
	0,889	-1,61 . 10 ⁻²	9,06	2,20
	1,183	-2,13 . 10 ⁻²	10,4	2,34
ATP 0,1 mM	0,048	-0,64 . 10 ⁻⁴	3,81	1,33
	0,162	-2,92 . 10 ⁻³	4,32	1,46
	0,351	-6,32 . 10 ⁻³	4,52	1,50
	0,496	-8,93 . 10 ⁻³	4,82	1,57
	0,788	-1,42 . 10 ⁻²	5,55	1,71
	0,799	-1,63 . 10 ⁻²	5,82	1,76
	1,307	-2,33 . 10 ⁻²	6,08	1,80
NaCl 100 mM	0,236	-4,26 . 10 ⁻³	2,51	0,92
	0,295	-5,31 . 10 ⁻³	2,48	0,91
	0,549	-9,88 . 10 ⁻³	2,87	1,05
	0,655	-1,18 . 10 ⁻²	2,87	1,05
	0,850	-1,53 . 10 ⁻²	3,32	1,20
	1,080	-1,94 . 10 ⁻²	3,36	1,21
	1,201	-2,16 . 10 ⁻²	3,50	1,25
NaCl 100 mM + ATP 1mM	0,267	-4,81 . 10 ⁻³	4,54	1,51
	0,356	-6,41 . 10 ⁻³	4,82	1,57
	0,565	-1,01 . 10 ⁻²	4,83	1,57
	0,674	-1,21 . 10 ⁻²	4,72	1,55
	0,967	-1,74 . 10 ⁻²	4,71	1,55
	1,022	-1,84 . 10 ⁻²	4,84	1,57
	1,546	-2,78 . 10 ⁻²	4,97	1,60

O valor de P_{50} é altamente dependente da concentração de ânions, além da atividade de água, como mostrado pela tabela 3. Observa-se também que a condição *stripped* é a condição de maior afinidade por O_2 , e que o efetor ATP diminui de forma mais pronunciada a afinidade pelo O_2 do que o NaCl.

As equações de Wyman (9) e Gibbs-Duhem (10) foram ajustadas aos dados experimentais de $\ln(P_{50})$ versus $\ln(a_w)$ e (Osm), respectivamente. Os parâmetros obtidos pela equação de Wyman são mostrados na tabela 4. A equação de Gibbs-Duhem não apresentou ajuste satisfatório aos pontos experimentais e desta forma nossas análises subsequêntes levam em consideração apenas os dados obtidos com a equação de Wyman. Esta equação foi considerada, como sendo a que melhor representa o comportamento dos dados experimentais de estresse osmótico.

O fato do melhor ajuste ser conseguido com a equação de Wyman reflete a hipótese intrínseca desta equação em experimentos de estresse osmótico, onde a afinidade pelo O_2 responde somente às mudanças na atividade de água, sendo que a sacarose não interage com a superfície da proteína. Esta hipótese foi confirmada pelo número de moléculas de soluto ligadas com a oxigenação (Δn_s), obtidos pelo ajuste da equação de Gibbs-Duhem, ser praticamente zero.

Foi mostrado pelos ajustes que a Hb^{ct} (figura 27) na forma *stripped* liga durante o processo de oxigenação, 41 ± 9 moléculas de água. Na presença de 0,1 mM e 1 mM de ATP estes números aumentam para 73 ± 8 e $65,6 \pm 12$ e na presença de cloreto são 85 ± 12 moléculas de água. Já na presença de 100 mM de NaCl e 1mM de ATP a inclinação $d(\ln P_{50})/(\ln a_w)$, corresponde a 4 ± 16 moléculas de água. Como pode-se observar pelos coeficientes de correlação (tabela 4) a equação se ajusta bem aos dados experimentais.



Tabela 4. Parâmetros da ligação heterotrópica de moléculas de água à Hb^{ct}.

Amostra	Soluto	$\Delta n_w \pm S.D$ Wyman	Coefficiente de Correlação
Hb ^{ct}	sacarose	41 ± 9	0,9717
	sacarose + ATP 1 mM	$65,6 \pm 12$	0,9882
	sacarose + ATP 0,1 mM	73 ± 8	0,9045
	sacarose + NaCl 100 mM	85 ± 12	0,9111
	sacarose + ATP 1 mM + NaCl 100 mM	4 ± 16	0,8925

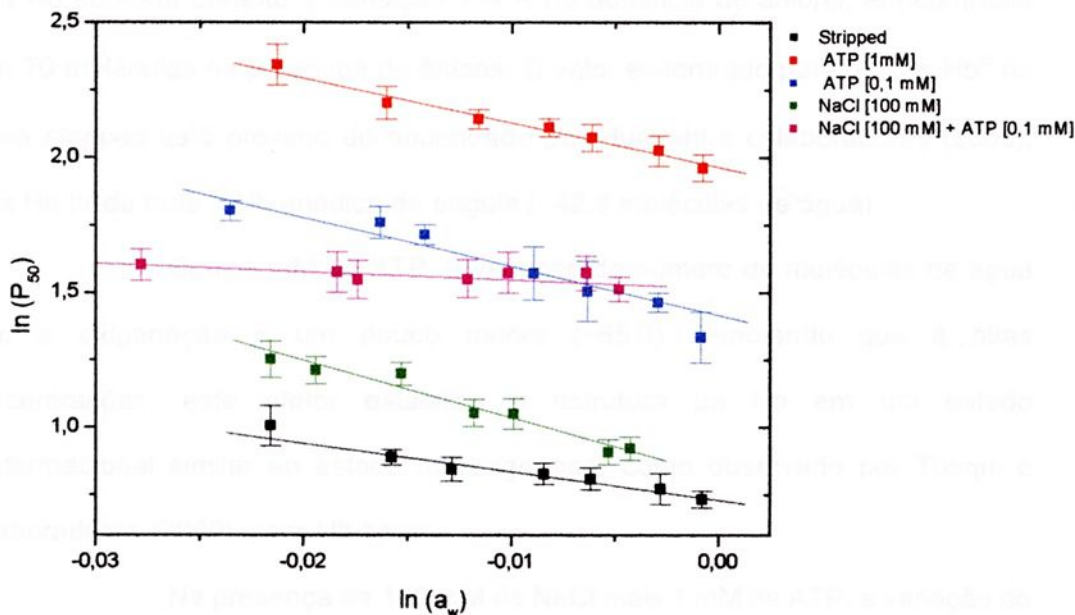


Figura 27. Gráficos da dependência de $\ln(P_{50})$ com a atividade de água $\ln(a_w)$. Experimentos realizados nas diversas condições experimentadas, com 60 μ M/heme de Hb^{ct} em Hepes 30 mM pH 7,5 a 20°C.

Foi encontrado para a Hb^{ct} uma variação de ~41 moléculas de água durante a oxigenação na forma *stripped* e de ~73 e ~85 moléculas na presença de 0,1 mM de ATP ou 100 mM de NaCl, respectivamente. Estas variações nos valores de Δn_w sugere que na ausência de ânions, a Hb^{ct} assume um novo estado conformacional, diferente do estado T clássico (T_x que é induzido pela presença de ânions), adotando o estado intermediário, denominado T_0 , mais hidratado que o T_x e, portanto apresentando uma maior área acessível ao solvente.

Essa observação está de acordo com o encontrado para Hb humana por Colombo e Seixas (1999), onde somente 25 moléculas de água ligam-se à Hb humana durante a transição $T \rightarrow R$ na ausência de ânions, em contraste com 70 moléculas na presença de ânions. O valor encontrado para Δn_w da Hb^{ct} na forma *stripped* está próximo do encontrado por Hundahl e colaboradores (2003), para Hb IV da truta e Hb anódica de enguia (~42,8 moléculas de água).

Com 1 mM de ATP, a variação do número de moléculas de água com a oxigenação é um pouco menor (~65,6), denotando que à altas concentrações, este efector estabiliza a estrutura da Hb em um estado conformacional similar ao estado desoxigenado, como observado por Tosqui e colaboradores (2000), para Hb bovina.

Na presença de 100 mM de NaCl mais 1 mM de ATP, a variação do número de moléculas de água é muito pequena. Assim a molécula é estabilizada em um estado conformacional próximo ao estado oxigenado (R), visto que esta condição não é a condição de menor afinidade pelo oxigênio.



Os resultados sugerem que, desde que ânions estejam presentes, a proteína assume a estrutura T_x , independente do tipo de ânion ligado, ou o modo de ligação (específico ou condensação de cargas). Esta falta de especificidade a ânions implica que a estabilização da estrutura T_x em relação a T_0 é primariamente determinada por mudanças alostéricas induzidas por neutralização de cargas.

Em estudos sobre o efeito de solvatação em proteínas, diferenças no tamanho da área acessível ao solvente entre estados conformacionais são fatores determinantes. Foi encontrado para a estrutura da Hb^{ct} modelada a partir de um *template* na ausência de cloreto e fosfato, uma diferença de área acessível ao solvente no processo de oxigenação de $436 \text{ \AA}^2$. Assim ligariam-se à Hb^{ct} 43,6 moléculas de água após a oxigenação, o que está próximo ao valor encontrado nos experimentos de estresse osmótico (~41 moléculas de água), considerando que uma molécula de água pode ocupar aproximadamente de 9 a $10 \text{ \AA}^2$ de superfície (Colombo et al., 1992).

A figura 28 (a e b) também ilustra o comportamento da cooperatividade versus a atividade de água. Os gráficos mostram que em todas as condições experimentais estudadas o processo de oxigenação foi cooperativo ($n_{50} > 1$).



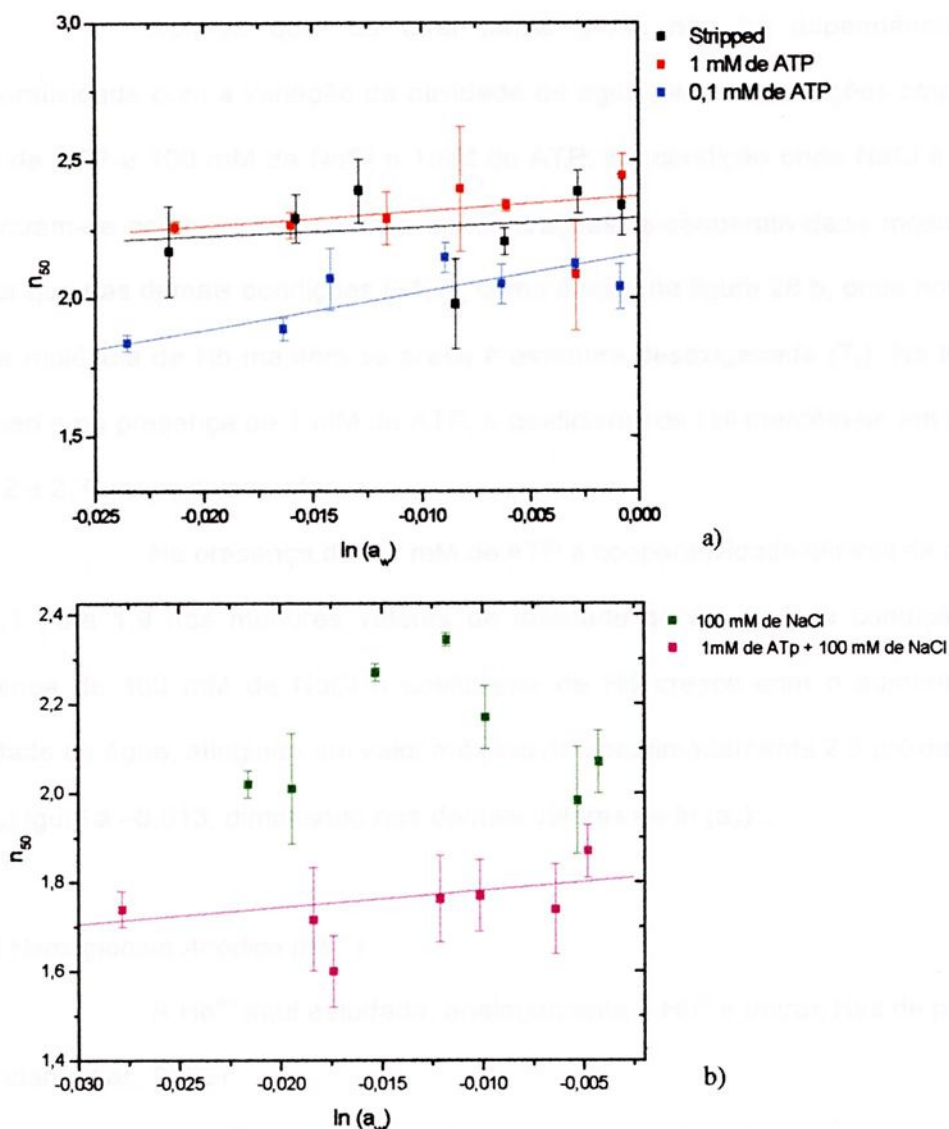


Figura 28. Gráficos da dependência de n_{50} com a atividade de água $\ln(a_w)$ na condição *stripped* e na presença de 0,1 e 1 mM de ATP (a) 100 mM de NaCl e 100 mM de NaCl + 1mM de ATP(b). Representação gráfica para a molécula de Hb^{ct} . Experimentos realizados em, pH 7,5 a 20 °C.

Nota-se que, de uma forma geral, não há dependência da cooperatividade com a variação da atividade de água para as condições *stripped*, 1mM de ATP e 100 mM de NaCl e 1mM de ATP. Na condição onde NaCl e ATP encontram-se combinados em altas concentrações, a cooperatividade mostra-se menor que nas demais condições ($\sim 1,7$), como é visto na figura 28 b, onde nota-se que a molécula de Hb mantém-se presa à estrutura desoxigenada (T_x). Na forma *stripped* e na presença de 1 mM de ATP, o coeficiente de Hill mantém-se em torno de 2,2 e 2,3, respectivamente.

Na presença de 0,1 mM de ATP a cooperatividade diminui de cerca de 2,1 para 1,9 nos menores valores de atividade de água. Já a condição na presença de 100 mM de NaCl o coeficiente de Hill cresce com o aumento da atividade de água, atingindo um valor máximo de aproximadamente 2,3 próximo de $\ln(a_w)$ igual a $-0,013$, diminuindo nos demais valores de $\ln(a_w)$.

4.5.2 Hemoglobina Anódica (Hb^{an})

A Hb^{an} aqui estudada, analogamente à Hb^{ct} e outras Hbs de peixes (Hundahl *et al.*, 2003).

A Hb^{an} responde à diminuição na atividade de água com a diminuição da afinidade pelo O_2 , indicando ligação preferencial de moléculas de água ao estado R. Esse comportamento foi evidenciado pelas inclinações dos gráficos de $\ln(P_{50})$ versus $\ln(a_w)$ (figura 29). Contudo o efeito da mudança de atividade de água não é idêntico ao ocorrido para a Hb^{ct} como mostrado na tabela 5.

Para a Hb^{an} diferentemente da Hb^{ct} a condição *stripped* não mais apresentou a máxima afinidade; a presença de 0,1 mM de ATP e 100 mM de NaCl



induziram a um aumento da afinidade pelo O_2 , de forma mais pronunciada para o íon cloreto.

Tabela 5. Dependência da afinidade da Hb^{an} em função da atividade de água.

Condição	Osm (Osm/kgH ₂ O)	ln a _w	P ₅₀ (mmHg)	ln P ₅₀
Stripped	0,039	-7,02.10 ⁻⁴	4,52	1,51
	0,156	-5,06.10 ⁻³	4,80	1,57
	0,312	-5,63.10 ⁻³	4,93	1,59
	0,459	-8,55.10 ⁻³	5,15	1,64
	0,653	-1,17.10 ⁻²	5,40	1,69
	0,781	-1,46.10 ⁻²	5,61	1,72
	1,142	-2,52.10 ⁻²	5,84	1,76
ATP 1mM	0,042	-7,5.10 ⁻⁴	5,30	1,67
	0,152	-2,74.10 ⁻³	5,31	1,67
	0,331	-5,97.10 ⁻³	5,63	1,73
	0,483	-8,71.10 ⁻³	5,71	1,74
	0,594	-1,07.10 ⁻²	5,99	1,79
	0,888	-1,61.10 ⁻²	6,88	1,93
	1,181	-2,13.10 ⁻²	7,07	1,95
ATP 0,1 mM	0,048	8,64.10 ⁻⁴	3,62	1,29
	0,156	-2,81.10 ⁻³	3,84	1,35
	0,341	-6,14.10 ⁻³	3,84	1,34
	0,473	-8,51.10 ⁻³	4,25	1,45
	0,711	-1,28.10 ⁻²	4,71	1,55
	0,888	-1,59.10 ⁻²	4,98	1,60
	1,189	-2,14.10 ⁻²	5,06	1,62
NaCl 100 mM	0,235	-4,23.10 ⁻³	2,65	0,97
	0,281	-5,04.10 ⁻³	2,92	1,06
	0,549	-9,82.10 ⁻³	3,34	1,20
	0,654	-1,17.10 ⁻²	3,64	1,29
	0,849	-1,52.10 ⁻²	4,04	1,39
	1,230	-2,21.10 ⁻²	4,76	1,56
	1,351	-2,43.10 ⁻²	5,04	1,62
NaCl 100 mM + ATP 1mM	0,271	-4,88.10 ⁻³	8,04	2,08
	0,366	-6,59.10 ⁻³	8,26	2,11
	0,499	-8,98.10 ⁻³	9,18	2,21
	0,694	-1,25.10 ⁻²	9,43	2,24
	0,942	-1,69.10 ⁻²	9,61	2,26
	1,154	-2,07.10 ⁻²	9,72	2,27
	1,567	-2,82.10 ⁻²	9,45	2,24

Foi considerado, da mesma forma que para a Hb^{α} , para as próximas discussões apenas os ajustes feitos com a equação de Wyman, por ser a que melhor representa o comportamento da Hb nas condições estudadas.

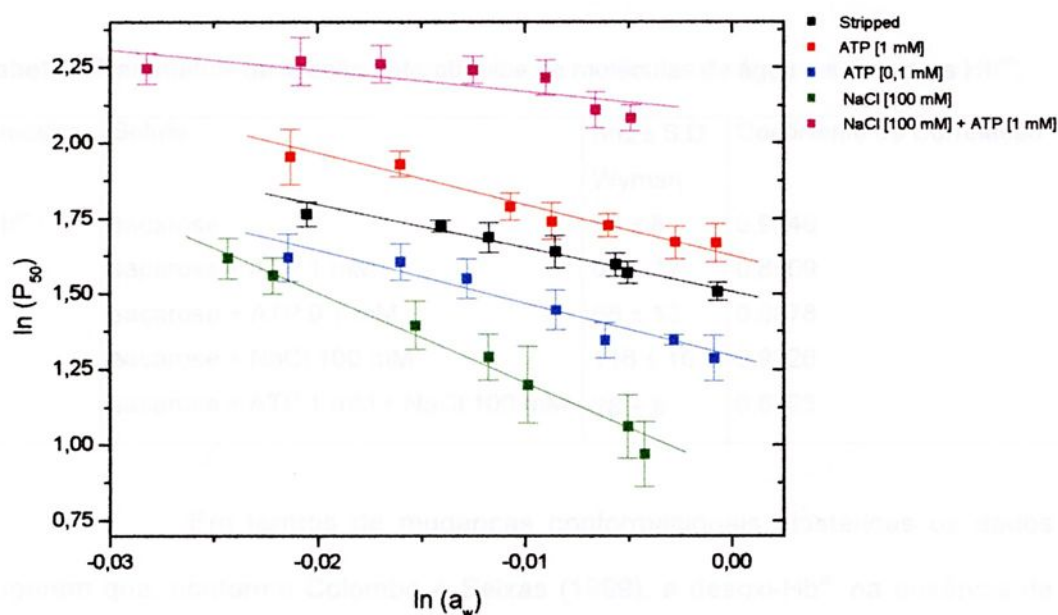


Figura 29. Gráficos da dependência de $\ln(P_{50})$ com a atividade de água $\ln(a_w)$. Experimentos realizados nas diversas condições experimentadas, com $60 \mu\text{M}$ /heme de Hb^{an} em Hepes 30 mM pH 7,5 a 20°C .

Os ajustes da equação (9) (tabela 6) aos dados experimentais de $\ln(P_{50})$ versus $\ln(a_w)$ da forma *stripped*, resultaram em valores de Δn_w de 58 ± 8 moléculas de água. Na presença de 0,1 mM e 1 mM de ATP este valor aumenta para 68 ± 12 , para ambas condições.

Na presença de NaCl o valor de Δn_w passa para 116 ± 16 moléculas de água, valor este próximo do encontrado para Hb anódica de enguia na

presença de KCl e GTP (~118). Na presença de 1 mM de ATP e 100 mM de NaCl encontra-se 28 ± 8 moléculas de água com a oxigenação. Os coeficientes de correlação para todas as condições estudadas indicam que a equação representa bem o comportamento dos dados experimentais.

Tabela 6. Parâmetros da ligação heterotrópica de moléculas de água e soluto para Hb^{an}.

Amostra	Soluto	$\Delta n_w \pm S.D$ Wyman	Coefficiente de Correlação
Hb ^{an}	sacarose	58 ± 8	0,9646
	sacarose + ATP 1 mM	68 ± 12	0,8909
	sacarose + ATP 0,1 mM	68 ± 12	0,8878
	sacarose + NaCl 100 mM	116 ± 16	0,9926
	sacarose + ATP 1 mM + NaCl 100 mM	28 ± 8	0,8725

Em termos de mudanças conformacionais alostéricas os dados sugerem que, conforme Colombo e Seixas (1999), a desoxi-Hb^{an} na ausência de ânions assume um novo estado conformacional, visto que o valor de Δn_w nesta condição é de ~58 e na presença de 100 mM de NaCl é de 116 moléculas de água, assumindo neste caso, a conformação (T_x).

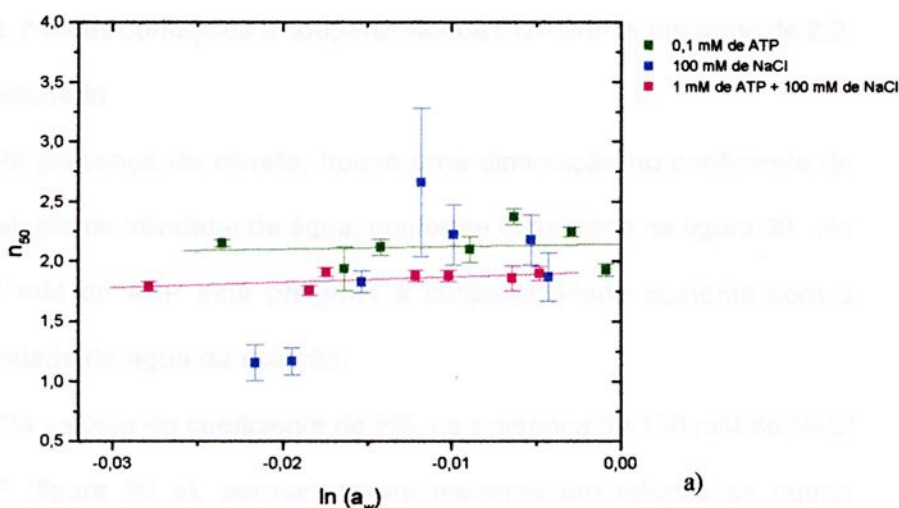
A afinidade da Hb^{an} é aumentada na presença de 100 mM de NaCl e 0,1 mM de ATP. Este fato, foi primeiramente reportado por Weber e colaboradores (2000) para esta Hb na presença de NaCl e de BPG acrescido de baixas concentrações de outros efetores em pH 7,5. Esse aumento inesperado na afinidade pelo O₂ induzida por Cl⁻ e baixa concentração de ATP pode ser resultado

da ligação destes efetores ao estado R. A Hb humana similarmemente fornece evidências para a ligação de Cl⁻ no estado oxigenado (Rollemá *et al.*, 1975).

Na presença do ânion ATP foi encontrado um valor entre a forma *stripped* (~58) e a estrutura T_x (~116), sendo este valor de ~68 moléculas de água, indicando que, nestas condições, o ATP se liga a oxi-Hb, independente da concentração deste, estabilizando-a em um estado conformacional similar ao estado desoxigenado.

Na condição onde NaCl e ATP são combinados, a estrutura oxigenada mantém-se em uma conformação muito semelhante ao estado T_x, visto que, esta condição apresenta os maiores valores de P₅₀.

Comparando-se a Hb humana e as Hbs, catódica e anódica de peixes, elas demonstram similar sensibilidade global às mudanças na atividade de água, a despeito da diversidade em suas propriedades físico-químicas.



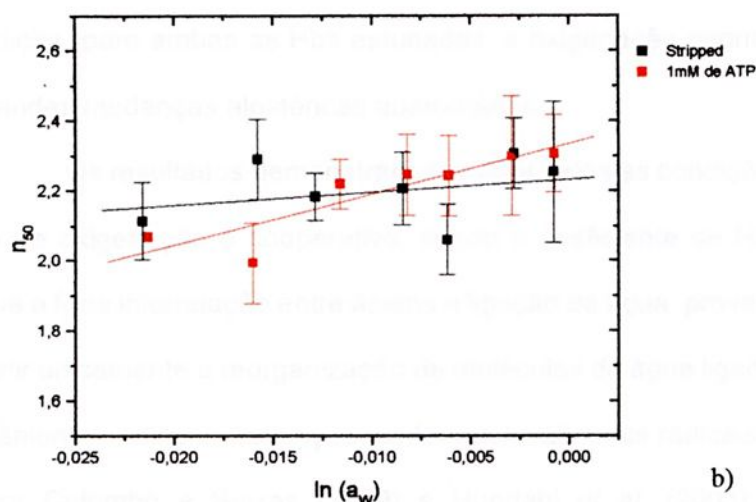


Figura 30. Gráficos da dependência de n_{50} com a atividade de água $\ln(a_w)$ na presença de 0,1 mM de ATP, 100 mM de NaCl e 100 mM de NaCl + 1mM de ATP (a) e 1mM de ATP e na condição *stripped* (b). Representação gráfica para a molécula de Hb^{ct}. Experimentos realizados em, pH 7,5 a 20 °C.

De uma maneira geral, a cooperatividade das condições *stripped* e 0,1 mM de ATP (figura 30 a e b) não mostra dependência com a variação da atividade de água. Nestas condições a cooperatividade mantêm-se em torno de 2,2, em toda a faixa estudada.

Na presença de cloreto, houve uma diminuição no coeficiente de Hill, a menores valores de atividade de água, conforme observado na figura 30. Na condição onde 1 mM de ATP está presente a cooperatividade aumenta com o acréscimo da atividade de água da solução.

Os valores do coeficiente de Hill, na presença de 100 mM de NaCl + 1 mM de ATP (figura 30 a), permaneceram menores em relação às outras condições estudadas, com uma pequena variação em função da atividade de água.

Nessa condição, para ambas as Hbs estudadas, a oxigenação acontece sem que ocorram grandes mudanças alostéricas quaternárias.

Os resultados demonstram que para todas as condições estudadas o processo de oxigenação é cooperativo, sendo o coeficiente de Hill $>$ que 1. E sugerem que a forte interrelação entre ânions e ligação de água, provavelmente não devem refletir unicamente a reorganização de moléculas de água ligadas no sítio de ligação de ânions e reflitam mudanças conformacionais mais radicais, assim como sugerido por Colombo e Seixas (1999) e Hundahl *et al.* (2003). Claramente, algumas diferenças estruturais básicas parecem existir nas mudanças conformacionais induzidas por ânions entre a Hb^{ct} e Hb^{an}.

4.6 Cálculo das Constantes de Associação de ATP às Formas Oxigenada e Desoxigenada ds Hb^{ct}

Os experimentos de titulação com ATP para a determinação da constante de ligação às formas oxigenada (K_O) e desoxigenada (K_D) das Hbs foram realizados a 20 °C, com concentrações crescentes de ATP, que variaram de 0 a 35 mM.

A inclinação das retas da figura 31 nos fornece o número diferencial de moléculas de ATP ligadas por heme entre o estado desoxigenado e oxigenado.

Obtivemos, de acordo com a equação 18, valores de Δx iguais a $0,23 \pm 8 \times 10^{-5}$ para Hb^{ct}, confirmando a ligação de uma única molécula de ATP por Hb, evidenciando assim a existência de um único sítio de ligação para o ATP por molécula de Hb.



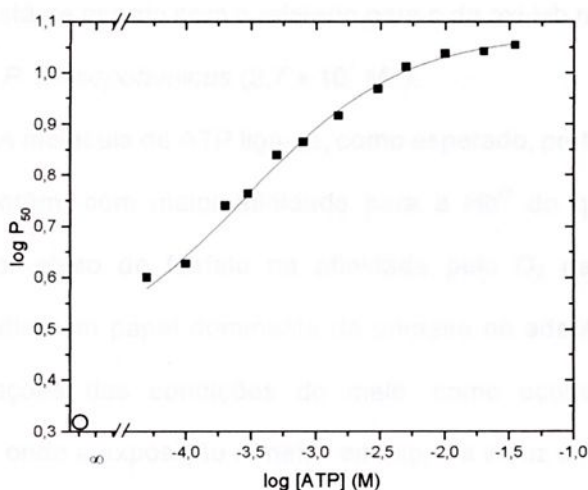


Figura 31. Variação da afinidade de oxigênio da Hb^{ct} em função da concentração de ATP, que varia de 0 a 35 mM. O símbolo ○ representa o valor de logP₅₀ na ausência de ATP.

Através dos resultados obtidos, foi possível estimarmos as constantes de associação de ATP a ambos estados conformacionais da Hb (oxigenado e desoxigenado) de acordo com a equação 19. O valor da constante de ligação de ATP na forma desoxigenada (K_D) para Hb^{ct} foi de $2,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e para a forma oxigenada (K_O) foi de $2,6 \times 10^2 \pm 3,3 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$.

O valor obtido para a constante de associação de ATP à forma desoxigenada (K_D) da Hb^{ct} é cerca de dez vezes maior em relação ao respectivo valor para a hemoglobina humana ($K_D = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (de Rosa *et al.*, 1998) sugerindo que o ATP se liga à Hb^{ct} mais fortemente do que BPG à hemoglobina humana. O valor para Hb^{ct} é semelhante ao encontrado para a Hb-II do peixe *Piaractus mesopotamicus* ($3,05 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Poy, 2001).

O valor obtido para a constante de associação de ATP à forma oxigenada (K_O) está de acordo com o relatado para o da oxi-Hb humana ($K_O = 3,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), e maior que *P. mesopotamicus* ($2,7 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$).

A molécula de ATP liga-se, como esperado, preferencialmente a forma desoxigenada, porém, com maior afinidade para a Hb^{ct} do que ocorre para a Hb humana. O maior efeito de fosfato na afinidade pelo O_2 da Hb^{ct} em *H. littorale* possivelmente indica um papel dominante da primeira na adaptação da afinidade do sangue às variações das condições do meio, como ocorre em *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, onde a exposição a meios em hipoxia induz a respiração acessória e diminui os níveis de ATP e GTP que possibilitam um aumento na afinidade pelo O_2 e a exploração das reservas destes durante a submersão (Weber *et al.*, 2000).



5. Conclusão

1. Embora a determinação experimental da estrutura tridimensional da hemoglobina catódica do peixe *H. littorale* não foi conseguida, as bases estruturais desta hemoglobina foram obtidas por modelagem molecular comparativa. Este estudo determinou um modelo o qual apresentou uma variação de área exposta ao solvente, entre as estruturas desoxigenada e oxigenada da Hb ($436 \text{ \AA}^2$), que concorda com o valor encontrado para de hidratação ocorrida com o processo de oxigenação (~41 moléculas de água) obtido por estresse osmótico. Sendo assim, as bases estruturais desta hemoglobina obtidas por modelagem molecular comparativa são adequadas e seguras à estudos comparativos com outras Hbs.

2. Foi encontrado neste estudo que ambas hemoglobinas aqui investigadas respondem a uma diminuição na atividade de água, estabilizando a conformação do estado T das Hbs. A variação do número de moléculas de água com a oxigenação é similar àquele encontrado com relação a outras de Hbs de peixes, sendo anódicas (HbA de enguia e HbIV de truta) ou catódicas (HbC de enguia e HbI de truta) e também assume-se que o caminho da oxigenação e a influência da presença de ânions na hidratação da molécula de hemoglobina, seguem o mesmo padrão encontrado para hemoglobina humana. As Hbs investigadas aqui coexistem em duas diferentes conformações alostéricas, T_x e T_0 , onde o equilíbrio relativo varia com a concentração de ânions, suportando a hipótese de que a desoxi-Hb livre de ânions assume uma nova conformação alostérica. Foi confirmado também, a descoberta de que a água é um efetor da



oxigenação das Hbs investigadas, e estas são, portanto, sensíveis às variações na sua atividade e a presença de ânions.

3. Não se observou a presença de um sitio adicional para ligação de fosfato no estudo de titulação com ATP para a Hb^{ct}.



6. Referências Bibliográficas

ACKERS, G. K. ; DOYLE, M. L. ; MYERS, D. ; DAUGHERTY, M. A. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*, v. 255, p. 54-63, 1992.

AMICONI, G. ; BERTOLLINI, A. ; BELLELLI, A. ; COLETTA, M. ; CONDO, S. G. ; BRUNORI, M. Evidence for two oxygen-linked binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. *Eur. J. Biochem.*, v. 150, p. 387-393, 1985.

ARNONE, A. ; PERUTZ, M. F. Structure of inositol hexaphosphate: human deoxyhaemoglobin complex. *Nature*, v. 249, n. 452, p. 34-36, 1974.

ATKINS, P. W. *Físico-química*. Tradução por Horácio Macedo. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 1999.

BALDWIN, J. ; CHOTHIA, C. Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, v. 129, p. 175-220, 1979.

BALDWIN, J. M. Structure and function of hemoglobin. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 29, p. 225-320, 1975.

BENESCH, R. ; BENESCH, R. E. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature*, v. 221, p. 618-622, 1969.

BENESH, R. ; MACDUFF, G. ; BENESH, R. E. Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer. *Anal. Biochem.*, v. 11, p. 81-87, 1965.

BONILLA, G. O. ; FOCESI JÚNIOR, A. ; BONAVENTURA, C. ; BONAVENTURA, J. ; CASHON, R.E. Functional properties of the hemoglobin from the south american snake *Matigodryas bifossatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 109A, p. 1085-1095, 1994.



BRITTAİN, T. The Root Effect. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 86B, n. 3, p. 473-481, 1987.

CARSON, M. *Methods Enzim.*, v. 277, p. 493-505, 1997.

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

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NO. 4, *Acta Cryst.*, v. D50, p. 760, 1994.

COLOMBO, M. B. R. *Efeito da água no potencial de oxi-redução de hemoglobina humana e mioglobina eqüina*. 1996. 86f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

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

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

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

COLOMBO, M. F. ; SANCHES, R. Hydration-dependent conformational states of hemoglobin. Equilibrium and kinetic behavior. *Biophys. Chem.*, v. 36, n. 1, p. 33-39, 1990.



COLOMBO, M. F. ; SEIXAS, F. A. V. A novel allosteric conformation of human Hb revealed by the hydration and anion effects on O₂ binding. *Biochemistry*, v. 38, n. 36, p. 11741-11748, 1999.

COMPANION WEBSITE FOR BIOCHEMISTRY. **Principles of biochemistry**. Disponível em : [http:// cw.prenhall.com/horton](http://cw.prenhall.com/horton). Acesso em :02 fev. 2004.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, v. 16, p.10881-10890., 1988.

DE ROSA, C. M. ; SANNA, T. M. ; MESSANA, I. ; CASTAGNOLA M. ; GALTIERI A.; TELLONE E. ; SCATENA R. ; BOTTA B. ; BOTTA, M. ; GIARDINA B. Glycated human hemoglobin (HbA_{1c}): functional characteristics and molecular modeling studies. *Biophysical Chemistry*, v. 72, p. 323-335, 1998.

DELATORRE, P. ; DELLAMANO, M. ; FADEL, V. ; HONDA, R. T. ; SMARRA, A. L. S. ; CANDURI, F. ; OLIVIERI, J. R. ; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. ; DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F. Crystallographic studies of fish hemoglobins. *Eclética Química*, v. 25, P. 147-159, 2000.

DRENTH, J. *Principle of protein X-ray crystallography*. 4. ed. New York: Springer, 1999.

DUCRUIX, A. ; GIEGÉ, R. *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach* 2. ed. Oxford: IRL, 1999. (Practical Approach Series (Paper), 210).



FADEL, V. ; HONDA, R. T. ; DELLAMANO, M. ; SMARRA, A. L. S. ; DELATORRE, P. ; OLIVIERI, J. R. ; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. ; DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of carboxyhaemoglobin II from the fish (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Cryst.*, v. D56, p. 366-367. 2000.

FAGO, A. ; CARRATORE, V. ; DI PRISCO, G. ; FEUERLEIN, R. J. ; JENSEN, L. S. ; WEBER, R. E. The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 18897-18902, 1995

FERMI, G. ; PERUTZ, M. F. ; SHAANAN, B. ; FOURME, R. The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 175, n. 2, p.159-174. 1984.

FERSHT, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. New York: W.H. Freeman, 1999.

FONSECA, J. C.L ; HONDA, R. T. ; DELATORRE, P. ; FADEL, V. ; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. ; DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F. Crystallization, preliminary X-ray analysis and molecular replacement solutions of hemoglobin-II from the fish *Brycon cephalus*. *Acta Cryst.*, v. D59, p. 752-754, 2003.

GELIN, B. R. ; LEE, A. W. -M. ; KARPLUS, M. Hemoglobin tertiary structure change on ligand binding: its role in the cooperative mechanism. *J. Mol. Biol.*, v. 171, p. 489-559, 1983.

GIARDINA, B. ; AMICONI, G. Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobin by conventional spectrophotometric procedures. *Methods Enzim.* v. 76, p. 417-427, 1981.



HONDA, R. T. *Estudo estrutural e funcional da hemoglobina I do Matrinxã (Brycon cephalus)*. 2001. 110f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

HUNDAHL, C. ; FAGO, A. ; MALTE, H. ; WEBER, R. E. Allosteric effect of water in fish and human hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 42769-42773, 2003.

IMAI, K. *Allosteric effects in haemoglobin*. Cambridge: University Cambridge Press, 1982.

ITO, N. ; KOMIYAMA, N. H. ; FERMI, G. Structure of deoxyhaemoglobin of the fish (*Pagothenia bernacchii*) with an analysis of the structural basis of the root effect by comparison of the liganded and unliganded haemoglobin structures. *J. Mol. Biol.*, v. 250, p. 648-658, 1995.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. *J. App. Cryst.*, v. 24, p. 409-411, 1991.

KENDREW, J. C. ; WATSON, H. C. ; STRANDVERG, B. E. ; DICKERSON, R. E. ; PHILLIPS, D. C. ; SHORE, V. C. The amino-acid sequence x-ray methods, and its correlation with chemical data. *Naturwiss Rundsch*, v. 190, p. 666-670, 1961.

KILMARTIN, J. V. Interaction of haemoglobin with prótons, CO₂, and 2,3 diphosphoglycerate. *Brit. Med. Bull.*, v. 32, p. 209-222, 1976.

KRAULIS, P. J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Applied Cryst.*, v 24, p. 946-950, 1991.



LASKOWSKI, R. A. ; MACARTHUR, M. W. ; SMITH, D. K. ; JONES, D. T. ; HUTCHINSON, E. G. ; MORRIS, A. L. ; NAYLOR, D. ; MOSS, D. S. ; THORTON, J. M. Procheck v.3.0: Program to check the stereochemistry quality of protein structures, *Operating instructions*. 1994.

LESK, A. M. ; CHOTHIA, C. Solvent accessibility, protein surfaces, and protein folding. *Biophys. J.*, v.32, p.35-47, 1980.

LU, T. ; PANNEERSELVAM, K. ; LIAW, Y. ; KAN, P. ; LEE, C. Structure determination of porcine haemoglobin. *Acta Cryst.*, v. D56, p. 304-312, 2000.

MCREE, D. E. XtalView/Xfit: a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struc. Biol.*, v. 125, p. 156-165, 1999.

MERRITT, E. A. ; MURPHY, M. E. P. Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst.*, v. D50, p. 869-873, 1994.

MIHAILESCU, M. ; RUSSU, I. M. A signature of the T-R transition in human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, n. 7, p. 3773-3777, 2001.

MONOD, J. ; WYMAN, J. ; CHANGEAUX, J. P. On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, v. 12, p. 88-118, 1965.

NICHOLLS, A. ; SHARP, K. ; HONIG, B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, v. 11, p. 281-296, 1991.



OLIVEIRA, C. ; TABOGA, S. ; SMARRA, A. L. S. ; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Microscopical aspects of acessorial air breathing, through a modified stomach in the armored catfish *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytobios*, v. 103, p. 153-162, 2001.

PARSEGIAN, V. A. ; RAND, R. P. ; RAU, D. C. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzym.*, v. 259, p. 43-94, 1995.

PARSEGIAN, V. A. ; RAND, R. P. ; RAU, D. C. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. *Methods Enzym.*, v. 127, p. 400-416, 1986.

PERUTZ, M. F. ; FERMI, G. ; POYART, C. ; PAGNIER, J. ; KISTER, J. A novel allosteric mechanism in haemoglobin: structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J Mol Biol*, v. 233, n. 3, p. 536-545, 1993.

PERUTZ, M. F. ; KILMARTIN, J. V. ; NISHIKURA, K. ; ROLLEMA, H. S. Identification of residues contributing to the bohr effect of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v. 138, p. 649-670, 1980.

PERUTZ, M. F. ; SHIH, D. T. ; WILLIAMSON, D. The chloride effect in human haemoglobin. A new kind of allosteric mechanism. *J Mol Biol*, v. 239, n.4, p. 555-60, 1994.

PERUTZ, M. F. ; WILKINSON, A. J. ; PAOLI, M. ; DODSON, G. G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 27, p. 1-34, 1998.

PERUTZ, M. F. Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, v. 208, p. 135-162, 1980.



POY, C.D. *Purificação e caracterização parcial das hemoglobinas de pacu (Piaractus mesopotamicus, Pisces)*. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

RAMACHANDRAN, G.N. ; RAMAKRISHNAN, C. ; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol.*, v. 7, p. 95-9, 1963.

RICCIO, A. ; TAMBURRINI, M. ; GIARDINA, B. ; DI PRISCO, G. Molecular dynamics Analysis of a second phosphate site in the hemoglobins of the seabird, south polar skua: Is there a site-site migratory mechanism along the central cavity? *Biophys. J.*, v. 81, p. 1938-1946, 2001.

RICHARD, V. ; DODSON, G. G. ; MAUGUEN, Y. Human deoxyhaemoglobin-2,3-diphosphoglycerate complex low-salt structure at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 233 p. 270, 1993.

RIGGS, F. A. Properties of fish hemoglobins. *Fish Phys.*, v. 4, p. 209-252, 1970.

RIGGS, F. A. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 1073-1084, 1998.

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

SALI, A. ; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, v. 234, p. 779-815, 1993.



- SALI, A. ; POTTERTON, L. ; YAUAN, F. ; VAN VLIJMEN, H. ; KARPLUS, M. Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. *Proteins*, v. 23, n. 3, p. 318-326, 1995.
- SALI, A. ;. SANCHEZ, R. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. *Methods Mol. Biol.*, v. 143, p. 97-129, 2000.
- SALVAY, A. G. ; GRIGERA, J. R. ; COLOMBO, M. F. The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked of water binding to hemoglobin. *Biophys. J.*, v. 84, p. 564-570, 2003.
- SCOPES, R. K. *Protein purification: principles and practice*. 3. ed., New York: Springer, 1994.
- SHAANAN, B. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 171, n. 1, p. 31-59, 1983.
- SMARRA, A. L. S. ; DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F. ; FADEL, F. ; DELATORRE, P. ; DELLAMANO, M. ; COLOMBO, M. F. ; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification, crystalization and preliminary X-ray análisis of haemoglobin I from the armored catfish (*Liposarcus anisitsi*). *Acta Cryst.*, v. D56, p. 495-497, 2000.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed., New York: WH Freeman, 1995.
- TAMBURRINI, M. ; RICCIO, A. ; ROMANO, M. ; GIARDINA, B. ; DI PRISCO, G. Structural and functional analysis of the two haemoglobins of the antarctic seabird *Catharacta maccormicki*: characterization of an additional phosphate binding site by molecular modeling. *Eur. J. Biochem.*, v. 267, p. 6089-6098, 2000.
- TAME, J. R. ; WILSON, J. C. ; WEBER, R. E. The crystal structures of trout Hb I in the deoxy and carbonmonoxy forms. *J. Mol. Biol.*, v. 259, n.4, p. 749-60, 1996.



TOSQUI, P. ; SEIXAS, F. A. V. ; COLOMBO, M. F. *Estudo do efeito de ânions nas hemoglobinas humana e bovina através do método de stress osmótico*. In: XI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA..2000, São José do Rio Preto. Anais... São José do Rio Preto, p.82, 2000.

VAL, A.L. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. In: VAL AL, ALMEIDA-VAL VMF & RANDALL DJ (Ed), *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, 1996.

VERDE, C. ; CARRATORE, V. ; RICCIO, A. ; TAMBURRINI, M. ; PARISI, E. The functionally distinct hemoglobins of the arctic spotted wolffish *Anarhichas minor*. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 36312-36320, 2002.

VOET, D. ; VOET, J.G. *Fundamentos de Bioquímica*. 2.ed. w York: John Wiley & Sons, 1995.

WEBER, R. E. ; FAGO, A. ; VAL, A. L. ; BANG, A. ; VAN HAUWAERT, M. L. ; DEWILDE, S. ; ZAL, F. ; MOENS, L. Isohemoglobin differentiation in the bimodal-breathing Amazon catfish *Hoplosternum littorale*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 17297-17305, 2000.

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



7. Anexos

Anexo 1

1. Determinação da Concentração de Oxi e Meta-Hb

Apenas dois comprimentos de onda, foram utilizados 576 e 630 nm:

$$\text{Abs}_{576} = [\text{OxiHb}] \cdot \epsilon_{\text{oxi}576} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{\text{meta}576} \quad (20)$$

$$\text{Abs}_{630} = [\text{OxiHb}] \cdot \epsilon_{\text{oxi}630} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{\text{meta}630} \quad (21)$$

Dessa forma, a concentração da espécie meta-hemoglobina pode ser resolvida conforme segue, onde "Det" é o determinante da matriz:

$$\text{Det} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{oxi}576} & \epsilon_{\text{meta}576} \\ \epsilon_{\text{oxi}630} & \epsilon_{\text{meta}630} \end{vmatrix} \quad (22)$$

$$[\text{Meta-Hb}] = \frac{\begin{vmatrix} \epsilon_{\text{oxi}576} & \text{abs}_{576} \\ \epsilon_{\text{oxi}630} & \text{abs}_{630} \end{vmatrix}}{\text{Det}} \quad (23)$$

O coeficiente de extinção molar da meta-Hb pode variar com o pH.



Quadro 1. Variação dos coeficientes de extinção molar de acordo com o pH.

pH	540	560	570	576	630
6,2	0,583	0,357	0,340	0,342	0,394
6,4	0,583	0,358	0,341	0,344	0,392
6,6	0,586	0,363	0,349	0,354	0,391
6,8	0,596	0,372	0,363	0,368	0,388
7,0	0,610	0,387	0,383	0,388	0,384
7,2	0,629	0,406	0,407	0,414	0,376
7,4	0,652	0,430	0,435	0,445	0,363
7,6	0,679	0,60	0,471	0,485	0,344
7,8	0,714	0,497	0,514	0,534	0,310
8,0	0,754	0,542	0,564	0,593	0,293
8,2	0,799	0,589	0,619	0,652	0,268
8,4	0,844	0,636	0,672	0,713	0,243
8,6	0,886	0,679	0,722	0,765	0,220
8,8	0,922	0,716	0,766	0,813	0,199

Para a concentração de oxi-hemoglobina utilizou-se as leituras de absorvância em 576 e 690nm, com coeficiente de absortividade ϵ_{576}^{oxi} , de acordo com o que segue:

$$\text{Concentração} = \frac{Abs_{576} - Abs_{690}}{\epsilon_{576}} \times \frac{volumetotal}{volumeamostra} \tag{24}$$

Quadro 2. Coeficiente de extinção molar da oxi-Hb ($\times 10^4$)

λ (nm)	Oxi-Hb
540	1,46
560	0,867
570	1,18
576	1,58
630	0,014

Anexo 2

2. Cristalização de Macromoléculas Biológicas

2.1 Introdução

Os métodos cristalográficos permitem determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas na cela unitária do cristal. A cristalização de proteínas é um procedimento no qual a proteína é suavemente precipitada de uma solução (Drenth, 1999).

O conhecimento de detalhes da arquitetura molecular tem fornecido modelos de como as proteínas reconhecem e ligam outras moléculas e como se enovelam.



2.2 Princípios Gerais para Cristalização de Macromoléculas Biológicas

Uma das partes mais críticas na resolução da estrutura de uma macromolécula biológica é a sua cristalização.

A seguir descreveremos três dos principais parâmetros a serem controlados num experimento de cristalização de uma macromolécula biológica.

2.2.1 Pureza da Macromolécula Biológica

Devido ao fato que as macromoléculas são extraídas de complexas misturas biológicas, a purificação é um passo importante para a cristalogênese. Como regra geral pode-se dizer que a baixa pureza da macromolécula biológica é a causa mais comum da falta de sucesso na cristalização da mesma.

2.2.2 Estabilização e Armazenagem

Macromoléculas biológicas devem ser armazenadas em solução que possua propriedades próximas as do meio celular de onde foram retiradas, para que sua conformação seja mantida.

2.2.3 Nucleação, Crescimento e Cessação de Crescimento

A cristalização começa com a fase de nucleação que é seguida pela fase de crescimento. A nucleação requer um estado de supersaturação maior do que aquele da fase de crescimento, a velocidade da cristalização aumenta com a supersaturação.



A cessação de crescimento de uma macromolécula biológica pode ter diversas causas, como remoção da macromolécula do meio de cristalização, defeitos de crescimento, envenenamento das faces, ou envelhecimento da macromolécula (Ducruix & Giege, 1999).

2.2.4 Conceitos sobre Solubilidade

As interações necessárias para solubilizar as macromoléculas num solvente são similares, e podem ser competitivas com as interações intermoleculares que são responsáveis pela estrutura tridimensional da macromolécula.

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução baseia-se na competição das interações solvente-soluto com interações intramoleculares as quais são necessárias para manter a estrutura da macromolécula. O balanço das interações que controlam a solubilidade e/ou a conformação de uma macromolécula podem ser modificadas por temperatura, pH, sais, competidores de ligações de hidrogênio, aditivos hidrofóbicos e solventes orgânicos (Ducruix & Giege, 1999).

2.2.4.1 Salting-in e Salting-out

O aumento da solubilidade de uma macromolécula biológica a baixa concentração salina ($<0,5M$) é chamada *salting-in*. Este fenômeno é explicado pelas interações eletrostáticas não específicas entre a macromolécula carregada e as espécies iônicas do sal. Se os íons são adicionados à solução eles



blindam os grupos carregados na macromolécula e aumentam a sua solubilidade (figura 32).

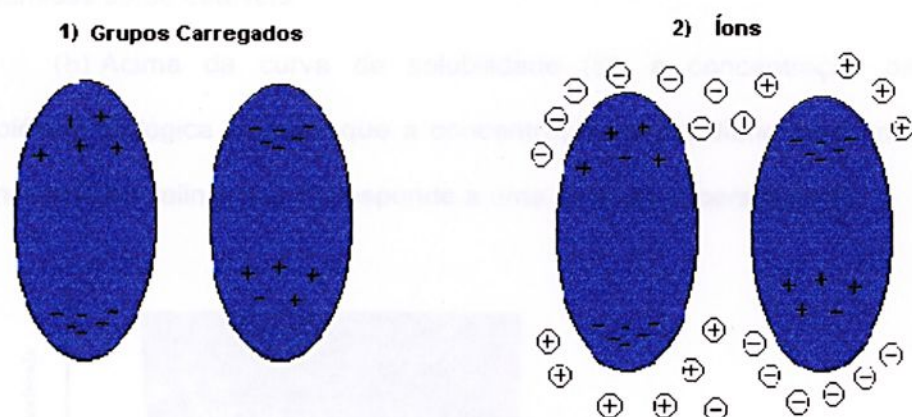


Figura 32. Representação de Macromolécula sem íons dissolvidos (1) e com íons dissolvidos (2), mostrando o efeito dos íons na sua solubilidade.

Outra forma de precipitar uma macromolécula é pela adição de sal (*salting-out*), este serve para imobilizar as moléculas de água, desta forma aumentando a concentração efetiva da macromolécula, ou seja, diminuindo a sua solubilidade.

2.2.5 Diagramas de Fase de Macromoléculas Biológicas

Um diagrama bidimensional é uma representação da solubilidade (mg/ml ou mM de macromolécula em solução) como função de um parâmetro, com todos outros sendo mantidos constantes (Ducruix & Giege, 1999). Um diagrama deste tipo está representado na figura 33, e compreende as seguintes zonas:

(a) A curva de solubilidade (S) separa as zonas supersaturadas e hiposaturadas. Abaixo da curva de solubilidade (S) a solução está hiposaturada e a macromolécula biológica nunca irá cristalizar, visto que as condições termodinâmicas estão estáveis.

(b) Acima da curva de solubilidade (S), a concentração da macromolécula biológica é maior que a concentração no equilíbrio para uma dada concentração salina. Isto corresponde a uma zona de supersaturação.

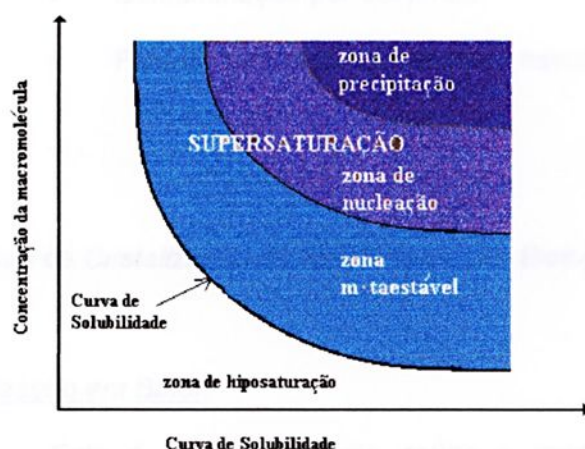


Figura 33. Diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.

2.2.6 Fatores que Influenciam o Crescimento de Cristais

Físico-químicos:

- Supersaturação (concentração de macromoléculas e precipitante).
- Flutuações no pH e na temperatura.
- Tempo (necessário para atingir o equilíbrio).

- Força iônica e pureza dos reagentes.
- Difusão e convecção.
- Volume e geometria da amostra.
- Efeitos da densidade e viscosidade (diferenças entre o cristal e líquido-mãe).

Biológicos:

- Dificuldade de obtenção da maioria das moléculas biológicas.
- Contaminação por bactérias.
- Fontes biológicas e estados fisiológico de organismos ou células.

2.3 Técnicas de Cristalização de Macromoléculas Biológicas

2.3.1 Cristalização em Batch

Este é o método mais antigo e também mais simples para cristalização de proteínas, onde a macromolécula a ser cristalizada é misturada a um agente cristalizante numa concentração tal que permita atingir a supersaturação instantaneamente (Drenth, 1999).

2.3.2 Cristalização por Difusão de Vapor

Uma gota de uma solução contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma



concentração mais alta do que na gota (figura 34). O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca da água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente, a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização, alcançando assim, a supersaturação. Os mesmos princípios se aplicam para gotas penduradas (*hanging drops*), gotas sentadas (*sitting drops*) e gotas sanduíches (*sandwich drops*) (Drenth, 1999; Ducruix & Giege, 1999).

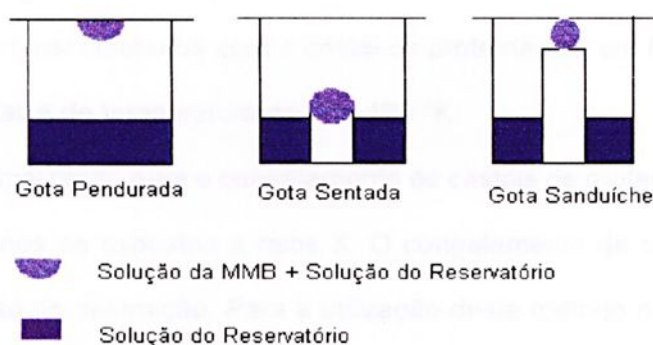


Figura 34. Representação dos processos de Difusão de Vapor.

2.4 Método da Matriz Esparsa (Fatorial)

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização se assemelhavam, ou seja, havia uma concentração de resultados positivos de cristalização de macromoléculas biológicas usando-se um número limitado de precipitantes, tampões e aditivos.

Dentro deste raciocínio a Dra. Jaru Jancarick da UC Berkeley propôs o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991) onde diversas condições são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica. Foram escolhidas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais, são estes: pH e materiais tampões, aditivos e agentes precipitantes.

2.5 Montagem dos Cristais para a Coleta de Dados

Para se processar a coleta de dados dos cristais pode-se assumir dois métodos: Os cristais devem ser acondicionados em capilares finos de vidro ou os dados podem ser coletados com o cristal de proteína sob um fluxo de nitrogênio gasoso numa faixa de temperatura de 100-120 °K.

A principal razão para o congelamento de cristais de proteína é que eles são passíveis a danos se expostos a raios X. O congelamento de cristais torna mais lento o processo de destruição. Para a utilização deste método o cristal deve estar na presença de um protetor criogênico, que pode ser glicerol, MPD, etilenoglicol e PEG.



Anexo 3**3. Procedimento para a Correção da Pressão Barométrica (P.B.)**

1-Transformar a leitura do barômetro, se for em mBar (hPa), em mmHg:

$$1000\text{mBar(hPa)} = 750,062\text{mmHg}$$
$$\text{assim, } x = \frac{n \cdot 750,062(\text{mmHg})}{1000} \quad (26)$$

onde, x é a P.B. corrigida (mmHg) e n a pressão em mBar (hPa).

2- Determinar o fator de correção da P.B. interpolando o valor baseado na tabela de correção.

Note que a P.B. da tabela varia de 10 em 10 unidades e a temperatura de 1. Desta forma o cálculo para valores intermediários de P.B. ou de temperatura é realizado da seguinte maneira:

Exemplo: P.B. = 757,5 mmHg e T=23,8°C

P.B.	750 mmHg	757,5 mmHg	760 mmHg
T°C			
23,0	2,81	x	2,84
23,8		Y	
24,0	2,93	Z	2,97

x e z é determinado multiplicando-se a diferença entre o valor de correção da maior pressão e o valor de correção da menor pressão, (ambas na mesma temperatura) pela diferença entre a P.B. medida e a menor P.B. dividido por 10. Somando-se a isto, o menor valor de correção.

$$x = [(2,84 - 2,81) \cdot (757,5 - 750)]/10 + 2,81 = 2,8325$$



$$z = [(2,97 - 2,93) \cdot (757,5 - 750)]/10 + 2,93 = 2,96$$

A determinação de y é realizada pela multiplicação da diferença entre x e z com o valor da diferença entre a temperatura medida com a menor temperatura. Soma-se a isto o valor de x:

$$y = [(z - x) \cdot (t_c - t_o)] + x = [(2,96 - 2,8325) \cdot (23,8 - 23)] + 2,8325 = 2,9345$$

2,9345 é o fator de correção a ser subtraído da P.B. lida.

A tabela de correção barométrica pela temperatura e a tabela de pressão de vapor d'água foram obtidos no Handbook of Chemistry and Physics, 52 ed., 1971-1972. Published by the Chemical Rubber, Co. Cranwood Parkway, Cleveland, Ohio.



