MARIA BERNADETE RUGGIERO COLOMBO

EFEITOS DE ÂNIONS E HIDRATAÇÃO EM REAÇÕES REDOX DE HEMOGLOBINA HUMANA

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

1910001307

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

MARIA BERNADETE RUGGIERO COLOMBO

EFEITOS DE ÂNIONS E HIDRATAÇÃO EM REAÇÕES REDOX DE HEMOGLOBINA HUMANA

São José do Rio Preto - SP
2004

MARIA BERNADETE RUGGIERO COLOMBO

EFEITOS DE ÂNIONS E HIDRATAÇÃO EM REAÇÕES REDOX DE HEMOGLOBINA HUMANA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

t. 1.307/04

Orientador: Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla-Rodrigues

São José do Rio Preto - SP
2004

577.3
C718e

21/10/2004
Doação
R$ 26,00
Autor
ND: 123/04 –
Proc. 047/04

Colombo, Maria Bernadete Ruggiero.
Efeitos de ânions e hidratação em reações redox de hemoglobina humana / Maria Bernadete Ruggiero Colombo– São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
127 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica. 2. Proteínas. 3. Hemoglobina - Hidratação. 4. Hemoglobina - Ânions. 5. Hemoglobina - Reação redox. 6. Biofísica molecular. I. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Ao “ Chiquinho”, meu companheiro desta e de todas as viagens...

Meus mais sinceros agradecimentos,

Ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo, pela ousadia e coragem com que encara qualquer desafio profissional, pela ética que sempre pautou sua carreira, pela solidariedade com que acompanha cada um de seus orientados,

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues, pela confiança no trabalho, pelas sugestões sempre pertinentes, pelo companheirismo e amizade,

Aos Professores : Marcelo Andrés Fossey e Ramon Beltran Abrego, por suas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho e pela amizade,

Aos meus queridos colegas de grupo de trabalho: Flávio, Osmar, Ocimar, Alexandre, Renato e Priscilla; por todo apoio, incentivo e torcida com que acompanharam este processo,

Aos colegas Hamilton, Fábio e Ceci, pela troca de experiências,

Aos meus colegas de pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal ; à Gláucia e Fátima, pelo carinho,

Aos queridos funcionários do Departamento de Física : à secretária Ilva, aos técnicos Paulinho e Barbosa e à Rose, que nunca mediram esforços para que pudessemos desenvolver melhor nosso trabalho,

As secretárias da Pós-Graduação Rosemar e Nanci,

unesp

Aos meus amigos Sandra e Divino, sempre presentes,

Aos meus pais, Alberto e Elizabeth, tão responsáveis pelo meu caráter e pela minha indignação perante as injustiças,

Aos meus irmãos : Roberto, Reinaldo, Rolando e Elizabeth, e às minhas cunhadas Ana Célia e Silvana, que mesmo distantes ficaram na torcida,

As minhas amadas filhas, Maira, Mariana e Natalia, por vocês existirem e serem exatamente como são,

Ao meu querido esposo, companheiro e amigo Marcio, pela confiança, paciência e estímulo e por me apresentar e ajudar a percorrer mais este caminho em minha vida,

À Deus, por permitir que eu cumprisse mais uma missão.

unesp

"Vencer não é nada, se não se teve muito trabalho, fracassar não é nada se se fez o melhor possível."

(*Nadia Boulanger, pianista*)

RESUMO

Estudos de ligação de oxigênio aos quatro sítios ferro-heme presentes em Hemoglobinas tetraméricas, e de oxi-redução destes sítios, demonstram várias semelhanças entre estes dois processos. Ambas as reações são cooperativas, isto é, a ligação do primeiro O_2, e a oxidação do primeiro heme, facilitam a ligação ou oxidação ao segundo sítio e assim por diante. A origem molecular deste fenômeno esta associada às mudanças conformacionais induzidas pela ligação do ligante, ou pela mudança do estado de oxidação do ferro, na estrutura protéica. O heme da Hb, em diferentes estruturas protéicas, apresenta estrutura eletrônica distinta. No estado totalmente desoxigenado a estrutura quaternária prevalecente corresponde à do estado alostérico T (desoxi-Fe^{2+}) de spin alto, enquanto a conformação do tetrâmero na forma totalmente oxigenada, ou oxidada, corresponde ao estado alostérico R, de spin baixo (oxigenada-Fe^{2+} ou oxidada-Fe^{3+}). As reações envolvidas nestes dois processos também são controladas por efetores heterotrópicos, como prótons e ânions, que modulam o equilíbrio conformacional entre diferentes estados alostéricos tais como os estados R e T. Estudos recentes em nosso grupo de pesquisa, sobre o efeito de ânions e de hidratação na reação de oxigenação da Hb humana, revelaram que a desoxi-Hb existe em dois estados alostéricos distintos, um na ausência total de ânions (estado-T_o), que possui afinidade por oxigênio e hidratação intermediárias entre as observadas entre o estados Tx, complexado com ânions, e o estado R. Estes resultados sugeriram investigar a influência dos ânions cloreto e IHP, e a influência da atividade de água, que mede a contribuição de diferenças de hidratação ao equilíbrio bioquímico, no potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$) da Hb

humana. Resultados destes estudos, e de estudos do efeito de ânions na cinética de transferência de elétrons entre Hb e citocromo-c, são apresentados nesta tese. Os resultados mostram que o potencial redox, medido pelo $E_{1/2}$ da reação meta-Hb(Fe3+) + 4 e- ⇔ desoxi-Hb(Fe2+), aumenta com a diminuição da atividade de água, com o aumento da concentração de Cl^-, e com o aumento da concentração de IHP na presença de Cl^-. Foi possível mostrar que o aumento do potencial redox da Hb humana induzidos por ânions esta linearmente correlacionado com o aumento de p_{50}, a pressão de O_2 necessária para atingir 50% da oxigenação. Estes resultados são consistentes com a proposição de que a força de ligação O_2 - Fe^{2+} tem caráter eletrostático, sendo tanto mais forte quanto maior for a diferença de eletronegatividade entre o O_2 (mais eletronegativo) e o complexo Fe-heme. A análise da dependência de $E_{1/2}$ com a concentração de ânions permitiu determinar as constantes de ligação dos ânions investigados às formas desoxi-Hb e meta-Hb: a ligação de IHP a desoxi-Hb, que ocorre com estequiometria 1 IHP/Hb tetrâmero, é mais forte na ausência do que na presença de Cl^-. Na ausência de NaCl, IHP liga-se também à forma meta-Hb, na proporção 1:1, travando a estrutura protéica na conformação quaternária T. Medidas espectrofotometricas suportam esta conclusão. Em condições de concentração de ânions constante, o potencial redox da Hb aumenta linearmente com a diminuição da atividade de água, promovida pela adição de sacarose à solução de medida. O aumento do $E_{1/2}$ com a diminuição da atividade de água pode ser atribuído à menor hidratação da conformação da Hb reduzida em relação à oxidada.

Citocromo-c é uma proteína monomérica, capaz de associar-se à Hb, e promover reações de transferência de elétrons entre grupamentos heme destas proteínas. Os estudos do efeito da concentração de NaCl e IHP sobre a cinética desta reação mostraram que o ânion cloreto diminui a velocidade de

unesp

oxidação da Hb por citocromo-c, enquanto que IHP acelera esta velocidade. O comportamento cinético destas reações varia com a razão entre as concentrações das duas proteínas e, é tanto mais complexo quanto maior a razão $[Hb]_{heme}/[cyt]$. Em baixas razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$, a cinética é mono-exponencial, enquanto que a razões ≥ 1 é bi-exponencial, evidenciando a heterogeneidade entre as cadeias α e β da Hb. Para a maior razão estudada (4/1) e na presença de 1 mM de IHP, foi observado que a oxidação rápida da Hb por citocromo-c é seguida por uma reversão da reação, i.é, de uma redução lenta e parcial da Hb. As constantes de velocidade obtidas foram relacionadas com as cadeias α e β da hemoglobina, que possuem diferentes potenciais de oxi-redução.

ABSTRACT

Several studies of the binding of oxygen molecules to the four heme sites of tetrameric Hemoglobins, as well as studies of the oxi-reduction of the heme irons, have shown strong similarity between the two process. Both reactions are cooperative, i.e., the binding of the first O_2 molecule, and the oxidation of the first heme, facilitates binding (or oxidation) of the subsequent sites, and so on. The molecular origin of cooperative effect is the changes in protein conformation that are associated with ligation and or with the change in the oxidation state of the iron. Thus, different Hb structures implicates in different electronic states of the heme binding sites. In the fully deoxygenated state, reduced Hb (desoxy-Fe^{+}) is in the T-quaternary state, and is high spin, whereas the conformation of fully oxygenated Hb, and of fully oxidazed Hb, is the quaternary R-state, of low spin. These reactions are also modulated by heterotropic effectors, such as protons and anions, which modulate the conformation equilibrium between different tertiary and quaternary structures of the protein. Recent investigations carried on our group on the effects of anion and hydration on the O_2-binding properties of Hb revealed the existence of two distinct allosteric states of deoxy-Hb, being the new allosteric state fully stabilized in the absence of anions (state-T_o). Compared to the canonical alosteric states of Hb, the deoxy-T_x complexed to anions and oxy-R forms, the state T has an intrinsic O_2 – affinity and an intrinsic hydration which are intermediate to those of states T_x and R. These results suggested to us the investigation of the influence of anions, such as chloride and IHP, and water activity, which measures the contribuition of differencial hydration to biochemical equilibrium, on the redox properties of human Hb. Results of such studies, as results from studies of the effect of anions on the kinetic of electron transfer between

Hb and cytocrome-c, are shown in this thesis. The results show that the redox potencial of Hb, measured by $E_{1/2}$ of the reaction met-Hb(Fe^{3+}) + 4 e^- $\Leftrightarrow$ desoxy-Hb(Fe^{2+}) , increases with the decrease of solution water activity, as well as with the increase of IHP and NaCl concentration. We show that the increase on the redox potential of Hb is linearly correlated with the increase in p_{50}, the oxygen pressure at half saturation. The binding constants of IHP and Cl^- to the desoxi and to the met-Hb species were also determined from the dependence of $E_{1/2}$ on anion concentration: IHP binds to deoxy-Hb in the ratio of 1:1 with higher affinity in the absence than in the presence of NaCl. In the absence of NaCl, one molecule of IHP also binds to one molecule of met-Hb: spectrofotometric measurements show that IHP binding induces a quaternary change on met-Hb structure, from the R to the T quaternary state. At constant ion concentration, the decrease on water activity promoted by the addition of sucrose to the test solution leads to the increase on the redox potential of Hb. This effect is ascribed to the lower hydration of deoxy-Hb as compared to the hydration of met-Hb.

The investigation of the effect of NaCl and IHP concentration on the kinetics of electron transfer between Hb and cytocrome-c demonstrate that while Cl^- ions decrease the rate of this reactions, IHP increases it. The complexity of the kinetic behavior of this reaction increases with the increase on the Hb/cyt ratio. At lower ratio [Hb(heme)]/[cyt] the kinetic is mono-exponential; at ratios ≥ 1 the kinetics is bi-exponential, evidencing Hb chain heterogeneity (α and β chains). At the higher ratio investigated, [Hb(heme)]/[cyt] = 4, and in the presence of 1 mM IHP, we observe that the fast oxidation of Hb is partially followed by a slow reduction of met-Hb previously formed. The different rate constants of Hb oxidation were related to the α and β chains, which have distinct redox potentials.

unesp

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 09

LISTA DE TABELAS 12

RESUMO 13

ABSTRACT 16

1. INTRODUÇÃO 18

1.1 A molécula de Hemoglobina 18

1.2 O equilíbrio da Hemoglobina com o oxigênio 23

1.3 O mecanismo da ação alostérica 26

1.4 Uma nova estrutura alostérica T_o 30

1.5 Oxi-redução da Hemoglobina e efeito alostérico 37

2. OBJETIVOS 40

3. MATERIAIS E MÉTODOS 42

3.1 POTENCIOMETRIA 42

3.1.1 Titulação de 50% desoxi/ 50% meta-Hb com IHP 42

3.1.2 Titulação de 50% desoxi/50% meta-Hb com NaCl 45

3.1.3 Medida de $E_{1/2}$ da hemoglobina em soluções com diferentes atividades de água, na presença e ausência de IHP 46

3.2 ESPECTROFOTOMETRIA 47

3.2.1 Titulação de meta hemoglobina com IHP 47

3.2.2 Titulação espectrofotométrica de desoxi-Hb com ferricitocromo-c 48

3.2.3 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c a diferentes proporções de $[Hb]_{heme}/[cyt\text{-}c]$ 49

3.2.4 Cinética de oxidação entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c nas proporções entre $[Hb]_{heme}/[cyt\text{-}c]$ de 1/1, 2/1 e 4/1 ; à diferentes concentrações de ânions 50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

4.1 Titulação potenciométrica de Hb com NaCl e IHP na presença e ausência de 100 mM NaCl 51

4.1.1 Titulação potenciométrica de Hb com NaCl 51

4.1.2 Titulação potenciométrica de Hb com IHP na presença de 100 mM de NaCl 55

4.1.3 Titulação potenciométrica de Hb com IHP na ausência de NaCl 61

4.2 Determinação espectrofotometrica da mudança na estrutura quaternária da meta-Hb induzida pela ligação de IHP 64

4.3 Equivalência entre os efeitos de ânions sobre a afinidade da Hb por oxigênio e o seu potencial redox 73

4.4 Potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$) da HbA_o em solução com atividade de água variável, na presença e ausência de IHP 76

4.5 Equilíbrio redox da Hemoglobina estudado através da transferência de elétrons da Hb para o citocromo-c, em diferentes atividades de água 84

4.6 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hb e Citocromo-c, variando a relação [Hb]/[Cyt] 91

4.7 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hb e Citocromo-c, na ausência e presença de ânions 99

5. CONCLUSÕES 116

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A Hemoglobina humana. 18

Figura 2 - A coordenação octaédrica do átomo de ferro. 19

Figura 3 - Rotação do dimero $\alpha_2\beta_2$ em relação ao dimero $\alpha_1\beta_1$, que ocorre na variação da estrutura quaternária da desoxi-Hb para a Hb-CO. 21

Figura 4 - Gráfico de Hill para ligações de O_2 a mioglobina e a Hb. 25

Figura 5 - Estrutura do sítio de ligação de DPG complexado a Hb. 30

Figura 6 - Distribuição das 10 espécies de ligação de ciano-meta-Hb em relação aos três níveis de energia livre de associação e cooperativa. 31

Figura 7 - Gráfico da variação de hidratação relacionada a oxigenação da Hb humana. 34

Figura 8 - Cela utilizada nas medidas de potencial de oxi-redução. 43

Figura 9 – Espectros de absorção característicos de oxi, desoxi e meta-Hb. 45

Figura 10 – Espectro de absorção de uma solução de ferricitocromo-c de coração de cavalo. 48

Figura 11 - Gráfico da variação do $E_{1/2}$ da HbA_o com a concentração de NaCl. 52

Figura 12 - Gráfico da variação do $E_{1/2}$ da HbA_o com a concentração de IHP, na presença de 100 mM de NaCl. 56

Figura 13 - Gráfico da variação do $E_{1/2}$ da HbA_o com a concentração de IHP livre em solução. 61

Figura 14- Gráfico da variação do $E_{1/2}$ da HbA_o com a concentração de IHP, na ausência de NaCl. 63

Figura 15 - Espectro diferença entre meta-Hb e meta-Hb-IHP. 66

Figura 16 - Detalhe da região espectral da figura 13 usada para o cálculo das áreas sob a curva. 67

Figura 17 - Gráfico da variação das áreas em função da razão [IHP]/[meta-Hb], na ausência de NaCl. 68

Figura 18 - Gráfico da variação das áreas em função da razão [IHP]/[meta-Hb], na presença de 100 mM de NaCl. 71

Figura 19 - Gráfico da variação das áreas sob as curvas em função da concentração de IHP livre em solução, na ausência e presença de NaCl. 72

Figura 20 - Gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\log(p_{50})$, em diferentes concentrações de IHP e NaCl. 74

Figura 21 - Gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\ln(a_w)$, na ausência e presença de 2mM de IHP. 78

Figura 22 - Gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\ln(a_w)$, na presença de 100 mM de NaCl e presença de 100 mM de NaCl e 2 mM de IHP. 79

Figura 23 - Titulação espectrofotométrica de desoxi-Hb com ferricitocromo-c, na ausência de sacarose. 86

Figura 24 - Titulação espectrofotométrica de desoxi-Hb com ferricitocromo-c, na presença de 66% de sacarose. 86

Figura 25 - Gráfico de $\ln([Hb^{3+}]/[Hb^{2+}])$ em função de $\ln([Cyt^{3+}]/[Cyt^{2+}])$ 89

Figura 26 - Cinética de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c [Hb(heme)]/[Cyt-c] = 0,15, em 550 nm. 93

Figura 27 - Cinética de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c [Hb(heme)]/[Cyt-c] = 6,0, em 550 nm. 94

Figura 28 - Constantes de velocidade de oxidação de Hb por cyt-c em função de diversas razões de [Hb(heme)]/[Cyt-c]. 97

Figura 29 - Fatores pré-exponenciais relacionados as constantes de velocidade de oxidação em função de diversas razões de [Hb(heme)]/[Cyt-c]. 97

Figura 30 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 1/1, a diferentes concentrações de NaCl. 100

Figura 31 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 2/1, a diferentes concentrações de NaCl. 101

Figura 32 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 4/1, a diferentes concentrações de NaCl. 101

Figura 33 – Gráfico do logaritmo das constantes de velocidade de oxidação de Hb por citocromo em função do logaritmo da concentração de NaCl. 103

Figura 34 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 1/1, na ausência e presença de 1 mM de IHP. 105

Figura 35 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 2/1, na ausência e presença de 1 mM de IHP. 105

Figura 36 - Cinética de transferência de elétrons entre Hemoglobina e citocromo-c a razão [Hb]/[Cyt-c] = 4/1, na ausência e presença de 1 mM de IHP. 106

Figura 37 – Espectros de absorção de [Hb]/[Cit-c] =1/1 na presença de 1 mM de IHP, entre 450 e 700 nm. 107

Figura 38 – Gráfico das constantes de velocidade de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c, na ausência e presença de 1 mM de IHP para as razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1, 2/1, 4/1. 109

Figura 39 – Variação do $E_{1/2}$ do citocromo-c com a concentração de IHP. 111

Figura 40 – Gráfico de $E_{1/2}$ em função da relação entre $[IHP]/[Hb]_{heme}$ e [IHP]/[cyt]. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação de hidratação aparente da HbA_o, em diferentes condições experimentais. 83

Tabela 2 -Valores de potencial redox ($E_{1/2}$) e cooperatividade (n) de HbA_o, na ausência e presença de sacarose. 90

Tabela 3 - Constantes de velocidade e pré-exponenciais a diferentes razões de [Hb]/[Cyt-c]. 96

Tabela 4 - Constantes de velocidade obtidas para as razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1, 2/1 e 4/1, na ausência e presença de 1 mM de IHP 108

Tabela 5 – Fração de meta-Hb formada durante a reação de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c nas razões de $[Hb]_{heme}/[Cyt\text{-}c]$ = 1/1, 2/1 e 4/1, na ausência e presença de diversas concentrações de NaCl e 1 mM de IHP. 110

1. INTRODUÇÃO

1.1 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular presente nos eritrócitos dos vertebrados, cuja principal função fisiológica é o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Em mamíferos, essa proteína possui massa molecular de ~ 64,5 KD e é tetramérica, ou seja, é constituída por quatro subunidades (monômeros). Cada uma destas subunidades possui uma cadeia polipeptídica e um grupo heme, que é um anel de protoporfirina cujo centro é um íon ferroso (Fe^{2+}), responsável pela ligação reversível de uma molécula de oxigênio. As quatro cadeias polipeptídicas possuem comprimentos similares. A Hb humana é constituída por duas cadeias alfa com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias beta com 146 resíduos de aminoácidos (Baldwin, 1975). A estrutura quaternária é arranjada pela justaposição de dois dímeros ($\alpha\ \beta$). A figura 1 mostra uma estrutura quaternária típica da Hb.

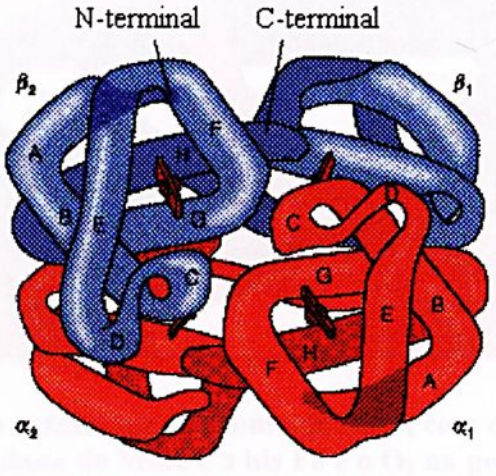


Figura 1- Hemoglobina humana (HbAo). Cadeias alfa em laranja, cadeias beta em lilás e grupo heme em vermelho (figura extraída de Mathews & Van Holde, Biochemistry (Mathews, 2000).

Ions ferrosos normalmente possuem geometria octaédrica, ou seja, possuem seis sítios de ligação. No grupo heme da hemoglobina, os átomos de nitrogênio do anel porfirínico são responsáveis pela ocupação de quatro destes sítios. Dos dois sítios remanescentes, um deles é ocupado pelo nitrogênio de uma histidina (histidina proximal ou histidina F8), que faz parte da hélice F da proteína. Na desoxi-Hb, o outro sítio remanescente encontra-se livre, e é ocupado por uma molécula de oxigênio na oxi- Hb. Desta forma, de um lado o oxigênio é coordenado ao ferro do grupo heme e do outro lado o O_2 liga-se a outra histidina (his distal ou his E7). A figura 2 mostra a geometria octaédrica do átomo de ferro e o bolsão do heme com as histidinas proximal e distal.

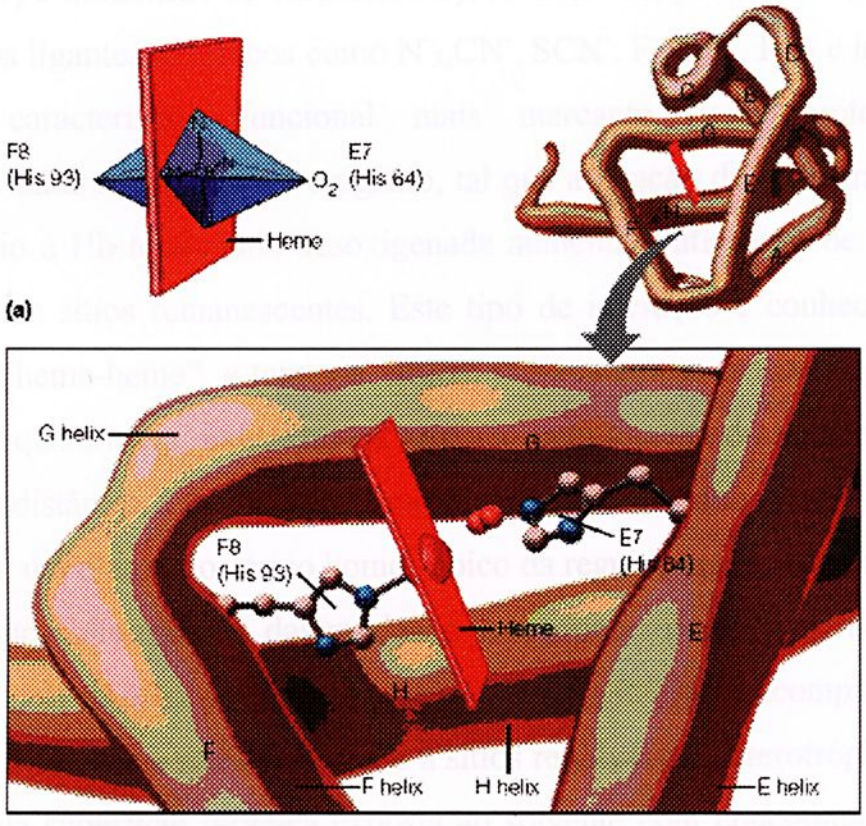


Figura 2- A coordenação octaédrica do átomo de ferro, com os quatro nitrogênios da porfirina com o Fe^{2+} no plano do heme e a his F8 e o O_2 na posição axial. Detalhes do bolsão do heme.

O íon ferroso do grupo heme livre em solução é facilmente oxidado pelo oxigênio. Quando ligado à molécula de hemoglobina, o heme encontra-se em um bolsão hidrofóbico formado pela cadeia polipeptídica, permitindo a ligação reversível do oxigênio sem mudança no estado de oxidação do ferro. Quando oxidada, a Hb não é funcional, visto que o oxigênio não se liga a forma férrica (meta-hemoglobina, Fe^{3+}). A condição funcional é mantida *in vivo* através de um eficiente sistema de redução enzimática presente nos eritrócitos (Hayashi, Suzuki *et al.*, 1973).

A hemoglobina, com o ferro do grupo heme no estado ferroso, pode ligar-se à outras moléculas além do oxigênio, como isocianetos, óxido nítrico(NO) e monóxido de carbono(CO). A meta-Hb, por sua vez, está apta a ligar vários ligantes aniônicos como N^-_3,CN^-, SCN^-, F^-, OH^-, H_2S e imidazol.

A característica funcional mais marcante desta proteína é a cooperatividade na ligação do oxigênio, tal que a ligação da primeira molécula de oxigênio à Hb totalmente desoxigenada aumenta a afinidade de ligação do oxigênio aos sítios remanescentes. Este tipo de interação é conhecido como interação "heme-heme", e tem sua origem nas mudanças estruturais, de ordem terciária e quaternária, induzidas na proteína pela ligação do ligante. Este tipo de ação à distância é conhecido como fenômeno alostérico, sendo o oxigênio neste caso, um efetor alostérico homotrópico da regulação funcional da Hb.

Como conseqüência das mudanças conformacionais da estrutura da Hb induzidas pela ligação de O_2, a oxigenação desta proteína é acompanhada pela liberação de ânions e prótons, ligados à sítios reguladores heterotrópicos, e pelo aumento da superfície protéica exposta ao solvente com concomitante ligação de um grande número de moléculas de água. A resolução da estrutura cristalográfica da Hb nos estados totalmente desoxigenado e oxigenado permitiu caracterizar as diferenças estruturais entre estas espécies. Estas

mudanças estruturais, analisadas por Max Perutz (Perutz, 1970) levou a proposição de um mecanismo estereo-químico dos efeitos cooperativos em hemoglobina.

A comparação entre as estruturas cristalográficas da desoxi-Hb e oxi-Hb mostra que com a oxigenação a estrutura quaternária da proteína se modifica, com uma rotação de cerca de 15° do dimero $\alpha_2\beta_2$ em relação ao dimero $\alpha_1\beta_1$, conforme mostrado na figura 3.

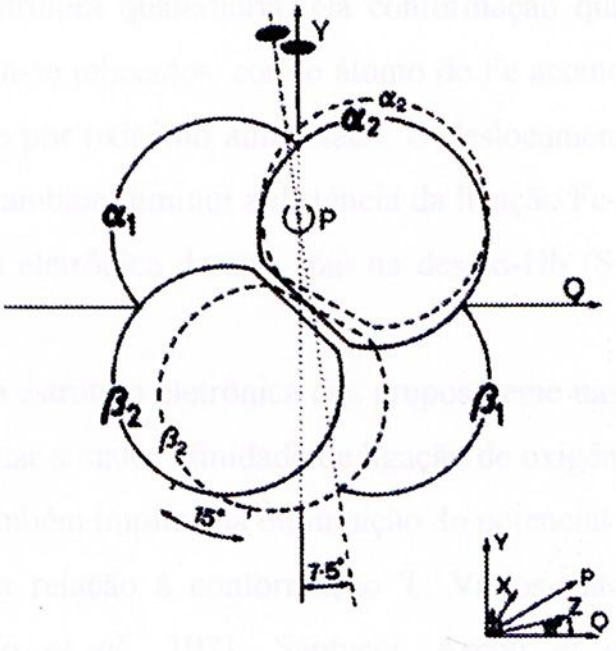


Figura 3 – Diagrama esquemático ilustrando a rotação do dimero $\alpha_2\beta_2$ em relação ao dimero $\alpha_1\beta_1$, que ocorre na variação da estrutura quaternária da desoxi-Hb (linhas sólidas) para a Hb-CO (linhas pontilhadas) (Baldwin e Chothia, 1979).

Concomitante à mudança quaternária do estado totalmente desoxigenado (conformação quaternária T - tensa) para o estado totalmente oxigenado (conformação quaternária R – relaxada), o ferro do grupo heme que se encontra fora do plano do heme na conformação T, desloca-se para o plano

do heme na conformação R. Segundo o modelo estereo-químico proposto por Perutz, o deslocamento do ferro em direção ao plano do heme puxa a hélice F da proteína através da his-F8. Este movimento da hélice propaga-se para a região C-terminal da cadeia beta provocando o rompimento de duas pontes salinas típicas da estrutura T. Como conseqüência destas mudanças terciárias, a interface $\alpha_1\beta_1$ /$\alpha_2\beta_2$ se desestabiliza, facilitando a transição quaternária T-R.

Este mecanismo propõe o caminho molecular pelo qual o estresse causado pela ligação de oxigênio aos grupos heme na estrutura T é suprimido com a mudança da estrutura quaternária. Na conformação quaternária R, os grupos heme encontram-se relaxados, com o átomo de Fe acomodado no plano do heme, e a afinidade por oxigênio aumentada. O deslocamento do íon ferro para o plano do heme também diminui a distância da ligação Fe-N na porfirina, alterando sua estrutura eletrônica de alto spin na desoxi-Hb (S=2) para baixo spin na oxi-Hb (S=0).

As diferenças na estrutura eletrônica dos grupos heme nas conformações T e R além de determinar a maior afinidade de ligação de oxigênio ao átomo de ferro na estrutura R, também implica na diminuição do potencial redox do heme na conformação R em relação à conformação T. Vários autores (Antonini, 1964; Brunori, Rotilio *et al.*, 1971; Santucci, Ascoli *et al.*, 1984) tem demonstrado, inclusive, que a oxidação da desoxi-Hb também é um processo cooperativo, regulado pelo mecanismo de interação alostérica, e similarmente à oxigenação, regulado pela ligação de ligantes heterotrópicos como íons cloreto, 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), inositol-hexafosfato (IHP) e prótons. Estes efetores ligam-se à hemoglobina em sítios de ligação distintos dos sítios de ligação de O_2, e interagem indiretamente com os sítios heme diminuindo a afinidade por O_2 e aumentando o potencial redox.

unesp

1.2 O EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM O OXIGÊNIO

As curvas de oxigenação da Hb são sigmoidais, o que caracteriza a ligação cooperativa de O_2. A descrição mais simples destas curvas foi proposta por Hill (HiIl, 1910), onde se assume a ligação de *n* moléculas do ligante *X* à proteína *P* para formar o complexo PX_n, conforme a reação:

$$P + n.X \Leftrightarrow PX_n \tag{1}$$

onde a constante de associação é dada por:

$$K = \frac{[PX_n]}{[P][X]^n} \tag{2}$$

onde $[PX_n]$, $[P]$ e $[X]$ são as concentrações da proteína contendo ligante, da proteína livre e do ligante livre, respectivamente. Para ligantes gasosos, a concentração do ligante na fase líquida é expressa pela pressão parcial na fase gasosa, segundo a lei de Henry. Portanto, [X] pode ser substituído por $K'p_x$ (onde $p_x = p(O_2)$) e a equação 2,

$$K'' = \frac{[PX_n]}{[P] \times p(O_2)^n} \tag{3}$$

onde K' é a constante de solubilidade do oxigênio na solução, ou a constante de Henry. K" = KK'.

No tratamento de dados experimentais é comum o emprego da fração de saturação da proteína , $\bar{Y}$, que é definida como:

$$\overline{Y} = \frac{n[PX_n]}{[P] + n[PX_n]} \tag{4}$$

Das equações 3 e 4, obtemos a equação de Hill

$$log\left(\frac{\overline{Y}}{1-\overline{Y}}\right) = log\, K'' + n \cdot log\, pO_2 \tag{5}$$

Desta forma, um gráfico de log ($\overline{Y}$/1-$\overline{Y}$) em função de log (pO_2), nos fornece o "gráfico de Hill" (Figura 4). A equação acima, aplicada na análise da oxigenação de uma proteína que possui um único sítio de ligação para o O_2, como a mioglobina, por exemplo, descreve a curva de ligação em todos os valores de pO_2. A mioglobina é uma proteína monomérica responsável pelo reserva do oxigênio nos músculos (Mathews, 2000). O gráfico de Hill para esta proteína é uma linha reta com inclinação (*n*) unitária e intercepto de log ($p_{1/2}O_2$), onde $p_{1/2}O_2$ é a pressão parcial de oxigênio quando metade dos sítios está saturado com ligante. O valor de $p_{1/2}O_2$ corresponde à constante de dissociação da mioglobina (Figura 4, curva 1).

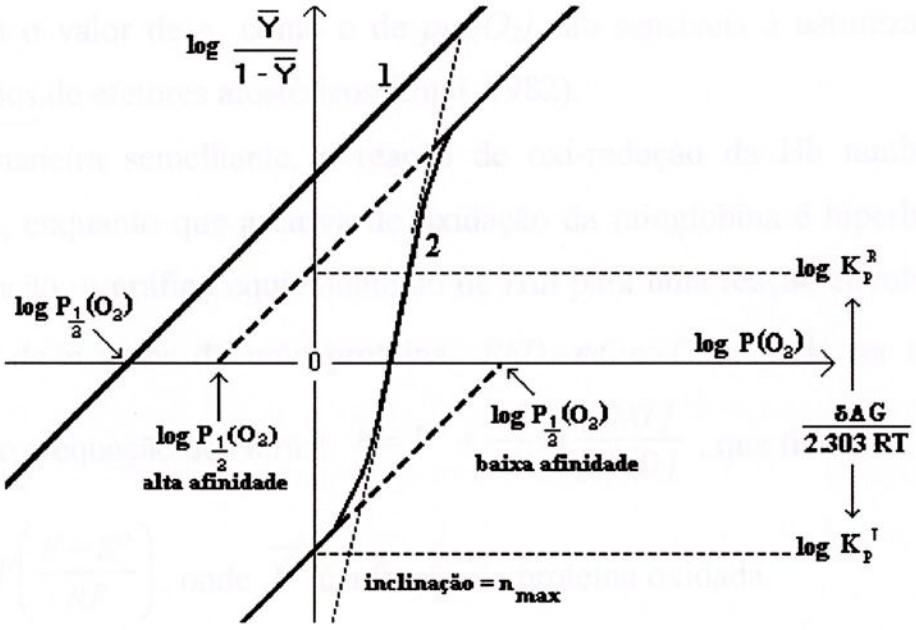


Figura 4 - Gráfico de Hill para ligações de O_2 a mioglobina (1) e a hemoglobina (2), onde a inclinação das curvas fornece a cooperatividade da reação (n) e o intercepto com o eixo x fornece a pressão de O_2 quando metade dos sítios de ligação da proteína estão saturados; adaptado de (Bertini, 1994).

Para a hemoglobina, o gráfico de Hill é mais complexo que uma reta devido as interações "heme-heme". Como pode ser visto no gráfico da figura 4, o valor de *n* é igual a unidade nos regimes de muito baixa e muito alta saturação. A região central da curva do gráfico de Hill para a Hb (Figura 4, curva 2) é próximo a uma linha reta, com inclinação (*n*) maior que 1. Neste caso, o valor de $n > 1$ reflete a cooperatividade da ligação e não o número total de sítios de ligação. Em condições fisiológicas, o valor de *n* para a Hb humana é de aproximadamente 2,8. Quando $n = 1$, como no caso da mioglobina, não existe cooperatividade na ligação. Quando $n > 1$, a cooperatividade é positiva, como no caso da hemoglobina.

Tanto o valor de *n*, como o de $p_{1/2}(O_2)$ são sensíveis à natureza e às concentrações de efetores alostéricos (Imai, 1982).

De maneira semelhante, a reação de oxi-redução da Hb também é cooperativa, enquanto que a curva de oxidação da mioglobina é hiperbólica. Na oxi-redução, o gráfico equivalente ao de Hill para uma reação envolvendo a oxidação de *n* sítios de uma proteína, $RED + ne^- \Leftrightarrow OXI$, pode ser obtido rearranjando a equação de Nernst $E = E^o + \frac{RT}{nF} ln \frac{[OXI]}{[RED]}$, que fica:

$ln \frac{\overline{Y}}{1-\overline{Y}} = nF\left(\frac{E-E^o}{RT}\right)$, onde $\overline{Y}$ é a fração de proteína oxidada.

Para a mioglobina, proteína monomérica com um único grupo heme, *n* =1 como esperado (Antonini e Brunori, 1971; Colombo, 1996). Para a hemoglobina, porém, o valor experimental de *n* situa-se em torno de 2, menor portanto que 4, o número de grupos heme da Hb. Este resultado é atribuído à cooperatividade da reação e *n* é um índice desta cooperatividade. Como apresentado adiante, o objetivo central deste trabalho foi a investigação dos efeitos de ânions e hidratação na cooperatividade da reação redox desta proteína.

1.3 O MECANISMO DA AÇÃO ALOSTÉRICA

O modelo de Perutz para fenômenos alostéricos em Hemoglobina é uma proposta de colocar em uma base estéreo-química o modelo de regulação alostérica de dois estados proposto por Monod, Wyman e Changeaux (MWC) em 1965 (Monod, Wyman *et al.*, 1965). No modelo de MWC, as interações homotrópicas e heterotrópicas de proteínas oligoméricas ocorrem devido à

existência de duas estruturas conformacionais quaternárias da macromolécula, uma de baixa afinidade pelo ligante (estado T - tenso) e outra de alta afinidade pelo ligante (estado R – relaxado). Na ausência de oxigênio, a estrutura T da Hb, de baixa afinidade por O_2, é mais estável que a estrutura R, de alta afinidade. A ligação de O_2 à proteína dirige necessariamente o equilíbrio para a estrutura de alta afinidade, resultando num aumento de afinidade à medida que a reação prossegue. Esse modelo prediz que modificações na proteína devem influenciar as interações cooperativas, através de seus efeitos sobre a afinidade dos estado T e R e sobre o equilíbrio entre as duas estruturas quaternárias. Moléculas que ligam-se mais fortemente a uma ou outra forma, afetarão o equilíbrio alostérico. De forma geral, os efetores alostéricos heterotrópicos ligam-se mais fortemente ao estado T, estabilizando a estrutura de baixa afinidade e , portanto, aumentando p_{50} (Imai, 1982) . Ions H^+, por exemplo, ligam-se tanto a oxi quanto à desoxi-Hb, porém a pH fisiológico (6,8) a desoxi-Hb tem uma afinidade maior por este íon. Portanto, a afinidade da Hb por oxigênio diminui quando o pH da solução diminui. Este efeito é conhecido por Efeito Bohr, e é responsável pela eficiente captação e liberação de oxigênio nos pulmões e tecidos, respectivamente. Dióxido de carbono também liga-se às duas formas da Hb, mas a desoxi-Hb tem maior afinidade por CO_2. De forma análoga à ligação de prótons, CO_2 é ligado pela desoxi-Hb nos tecidos e desligado quando a hemoglobina é oxigenada nos pulmões (Baldwin, 1975).

Alguns ânions monovalentes como Cl^-, I^-, Br^- e F^-, também agem de forma a estabilizar a estrutura de baixa afinidade T (Fronticelli, Bucci *et al.*, 1988; Razynska, Fronticelli *et al.*, 1990). Dentre estes ânions, o íon cloreto (Cl^-) tem importância especial, pois é o ânion mais abundante do meio fisiológico. Vários estudos tem sido feitos com o objetivo de estabelecer o

modo de ligação deste íon à Hb e de descrever seu papel no mecanismo de regulação alostérica da Hb. Os primeiros estudos, usando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (NMR), apontaram que ambas oxi e desoxi-Hb ligam cloreto à pelo menos dois sítios distintos de ligação; um de alta afinidade ($K_{Cl^-}^{oxi} = 10M^{-1} e K_{Cl^-}^{desoxi} = 100M^{-1}$) que está conectado à ligação de O_2, e outro de baixa afinidade ($K_{Cl^-} = 0,1M^{-1}$) (Chiancone, Norne *et al.*, 1975). Estes estudos identificaram os resíduos His- β146_ Asp- β94 e Val- α1_Arg- α141 ou as vizinhanças destes, como os prováveis sítios de alta afinidade de ligação ao íon cloreto. Além destes resíduos, a região de ligação para fosfatos orgânicos, como veremos a seguir, também seria propícia a ligar cloreto. Entretanto, nenhuma evidência estrutural teria comprovado estas sugestões. Perutz e colaboradores (Perutz, Fermi *et al.*, 1993; Perutz, Shih *et al.*, 1994) sugeriram que não existem sítios específicos de ligação para cloreto. O efeito deste íon seria devido simplesmente ao alargamento da cavidade central que ocorre na transição entre a estrutura R e a estrutura T, que permitiria que íons cloreto se difundissem, neutralizando o excesso de cargas positivas presente nessa região, sem no entanto ligarem-se a nenhuma delas. Conforme esta proposição, o aumento da afinidade da Hb por oxigênio deve-se à estabilização da estrutura quaternária T na presença de NaCl.

Um dos efetores mais abundantes em células de mamíferos é o 2,3-DPG (difosfoglicerato). A descoberta de que em células vermelhas humanas DPG e Hb encontram-se em concentrações aproximadamente equimolares, levou Benesh & Benesh a investigar o efeito deste fosfato orgânico na curva de dissociação de oxigênio da hemoglobina (Benesch, Benesch *et al.*, 1969). Estes autores demonstraram que DPG facilita a transferência de oxigênio das células vermelhas humanas para os tecidos, diminuindo a afinidade da

unesp

hemoglobina por O_2. Essa molécula liga-se preferencialmente à desoxi-Hb, numa razão de 1 mol de DPG para 1 mol de tetrâmero de Hb (Perutz, Fersht *et al.*, 1974). Cristalografia de Raios-X determinou que o sítio de ligação para o DPG, encontra-se na entrada da cavidade central, entre os N-terminais das cadeias β, que é uma região com alta densidade de cargas positivas (Arnone e Perutz, 1974) (Figura 5). A ligação de DPG à forma oxigenada da Hb ocorreria apenas em condições diferentes das fisiológicas, e com uma afinidade menor que a encontrada para a forma desoxigenada (Nelson, Miller *et al.*, 1974; Szabo e Karplus, 1976)

Outros ânions multivalentes também diminuem a afinidade de hemoglobinas por oxigênio, sendo que o mais efetivo é o IHP (inositol hexafosfato), que regula a afinidade por O_2 dos eritrócitos de aves. Quando na presença de NaCl, a constante de associação do IHP à oxi-Hb é da ordem de $10^6 M^{-1}$ (Gray e Gibson, 1971), enquanto que a do DPG é algo em torno de $10^4 M^{-1}$. Na ausência de NaCl, a afinidade de ligação do IHP à desoxi-Hb aumenta a ponto de impossibilitar a determinação da constante de associação nestas condições (Gerber, Berger *et al.*, 1973).

Arnone e Perutz (Arnone e Perutz, 1974), mostraram que o IHP liga-se ao mesmo sítio que o DPG na desoxi-Hb humana, com os seis fosfatos ligados com os mesmos grupos básicos que se ligam ao DPG, porém em adição a estes oito resíduos estão também conectados os aminogrupos das asparaginas 139 de ambas as cadeias beta.

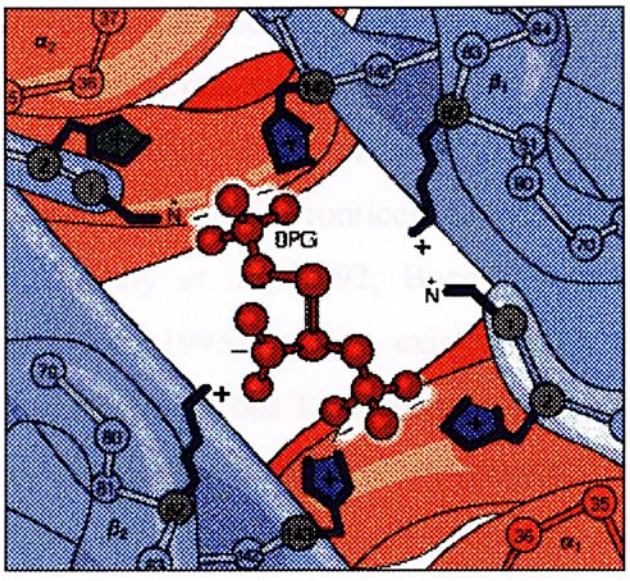


Figura 5 – Estrutura do sítio de ligação de DPG complexado. Este sítio esta localizado na entrada da cavidade central formada pelas duas cadeias β da molécula de desoxi hemoglobina. Mathew and van Holde, Biochemistry, 3ª Edição, 2000.

1.4 UMA NOVA ESTRUTURA ALOSTÉRICA – T_O

As estruturas R e T são definidas pelas distâncias entre os átomos de ferro e pelos contatos entre os resíduos das interfaces $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 2\beta 1$. Estes contatos são estabilizados por interações dentro e entre as subunidades, incluindo pontes salinas e ligação de hidrogênio (Perutz, Fersht *et al.*, 1974). A resolução cristalográfica destas duas estruturas vieram reforçar o modelo de dois estados (MWC), pois foi a primeira evidência estrutural que ajustava-se ao modelo teórico. No final dos anos oitenta porém, alguns autores (Kister, Poyart *et al.*, 1987) e (Marden, Kister *et al.*, 1988) sugeriram que a adição de efetores a Hb resultariam em novos estados alostéricos, distintos dos estados originais R e T. Marden *et al.* por exemplo, basearam suas observações, estudando a cinética de recombinação molecular de Hb com oxigênio e CO, na presença de dois efetores alostéricos: benzafibrato e IHP. Eles constataram

que a afinidade e as velocidades de religação dos ligantes na presença destes efetores não eram as mesmas que as dos estados T e R originais na ausência de efetores. Nos anos 90, outros estudos apresentaram evidências termodinâmicas e estruturais (Bucci, Fronticelli *et al.*, 1991; Ackers, Doyle *et al.*, 1992; Johnson, Ownby *et al.*, 1992; Bucci, Fronticelli *et al.*, 1993; Jayaraman, Rodgers *et al.*, 1995) para a existência de estados alostéricos intermediários entre as conformações T e R da hemoglobina.

Dentre os estudos acima citados, as investigações de Ackers foram capazes de demonstrar a existência de 3 níveis de energia de oxigenação à Hb. Utilizando uma estratégia experimental que combina o equilíbrio entre tetrâmeros de Hb oxidados e reduzidos, estes autores determinaram a energia livre de associação do oxigênio aos 10 micro-estados em que se pode ter Hb associada ao oxigênio (Figura 6).

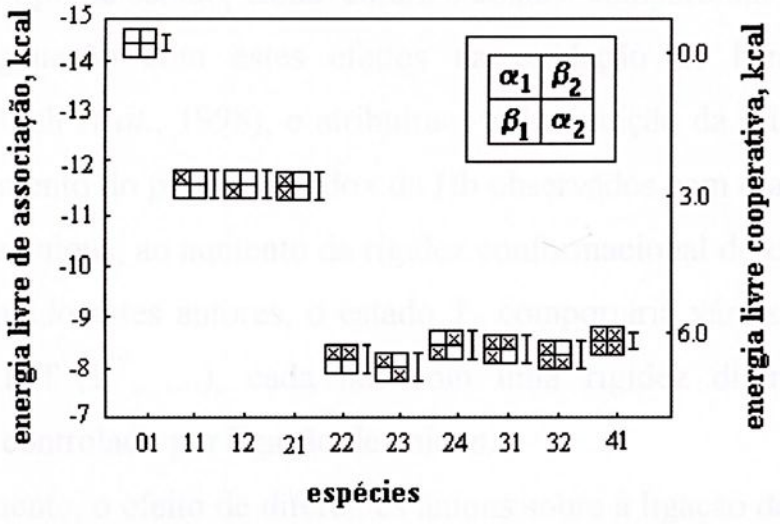


Figura 6- Distribuição das 10 espécies de ligação de ciano-meta-Hb em relação aos três níveis de energia livre de associação (esquerda) e cooperativa (direita). Os diagramas das espécies topográficas denotam as configurações das subunidades α e β em relação aos contatos intersubunitários (inserido). Os quadrados dentro de cada tetrâmero representam as subunidades ligadas (x) e não ligadas (branco). Extraído de (Daugherty, Shea *et al.*, 1991)

Ficou evidenciado nestes estudos que a ligação do segundo ligante dentro de um mesmo dímero à Hb ocorre com afinidade aumentada em virtude das variações conformacionais terciárias induzidas pela ligação do primeiro oxigênio. Existem 4 micro-estados da Hb com 2 moléculas de oxigênio ligados: 1 micro estado é o que tem as moléculas de O_2 ligadas dentro do mesmo dímero, enquanto os outros três micros-estados são formados pela ligação de uma molécula de O_2 em cada dímero. Experimentos de cinética de redução dos grupos –SH da cys-β93, indicaram que a primeira destas espécies encontra-se na conformação quaternária T. Portanto, estes autores propuseram a possibilidade de ligação cooperativa de O_2 dentro da estrutura quaternária T (Ackers, 1998). Embora esta proposta estivesse baseada em um conjunto de experimentos bastante consistente, a proposição da coexistência de dois estados alostéricos T distintos foi fortemente contestada (Perutz, Wilkinson *et al.*, 1998).

Em outro tipo de estudo, Bonaventura e colabs. compararam o efeito de ânions na oxigenação com estes efeitos na oxidação de hemoglobinas (Bonaventura, Tesh *et al.*, 1998), e atribuiram a diminuição da afinidade por oxigênio e o aumento do potencial redox da Hb observados com o aumento da concentração de ânions, ao aumento da rigidez conformacional do estado T da desoxi-Hb. Segundo estes autores, o estado T comportaria vários diferentes subestados (T,T',T'',T''', ...), cada um com uma rigidez diferente, cujo equilíbrio seria controlado por ligação de ânions.

Recentemente, o efeito de diferentes ânions sobre a ligação de O_2 na Hb humana foram estudados via medida da diferença de hidratação entre a desoxi e a oxi-Hb pelo método de estresse osmótico (Colombo e Seixas, 1999). Estes estudos evidenciaram que a desoxi-Hb livre de ânions assume uma nova

unesp

conformação alostérica denominada de T_o, com uma afinidade por O_2 que é intermediária entre os estados canônicos T e R.

O número diferencial de moléculas de água ligadas entre as conformações totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada foi determinado pelo método de estresse osmótico (Colombo, Rau *et al.*, 1992). Este método consiste em medir o parâmetro funcional p_{50} em função da atividade de água do meio, que é variada com a adição de solutos neutros. Estes dois parâmetros são correlacionados através da seguinte equação de "linkage" :

$$-4\left.\frac{d\ln p_{50}}{d\ln a_w}\right|_{a_i} = (n_w^{oxi} - n_w^{desoxi}) = \Delta n_w \qquad (6)$$

onde,

n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas as estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, respectivamente e

a_i é a atividade de todos os ligantes **i** diferentes da água que são mantidos constantes. Colombo & Seixas determinaram a dependência de Δn_w de oxigenação da hemoglobina humana em função da concentração de NaCl mostrada na figura 7.

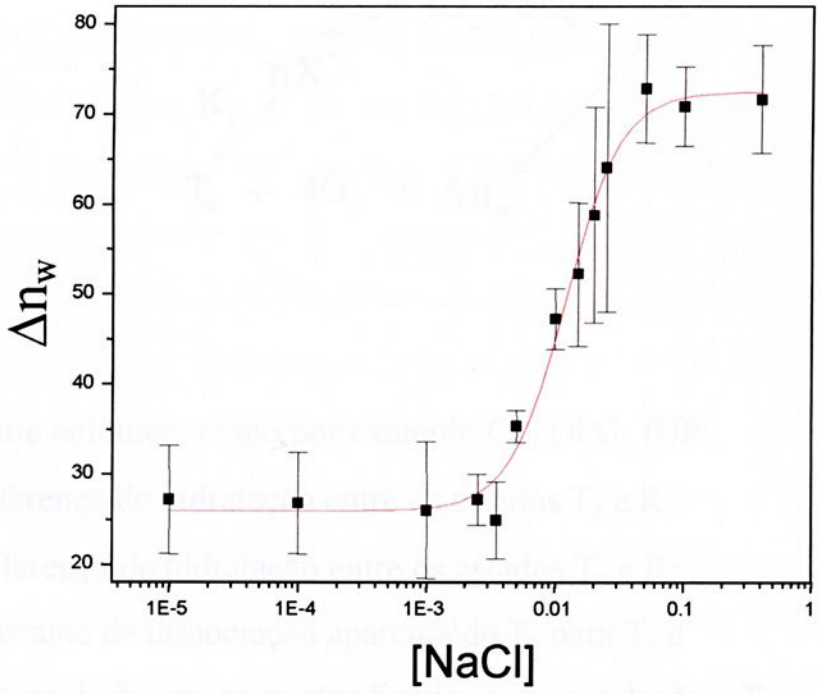
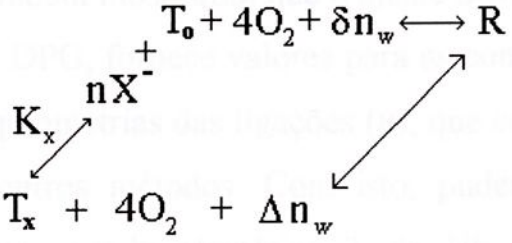


Figura 7 - Gráfico da variação de hidratação relacionada a oxigenação da Hb humana em tampão HEPES 10mM, pH 7,2, em função do logarítmo da concentração de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação 8 com os seguintes parâmetros: $\Delta n_w^{inicial} = 25,9 \pm 1,3$; $\Delta n_w^{final} = 72,4 \pm 1,65$; $K_{obs}=10,6 \pm 1,0$ mM, e $n=2,0 \pm 0,29$ (Colombo e Seixas, 1999).

A forma sigmoidal do gráfico de Δn_w de oxigenação versus log([NaCl]) mostrado nesta figura, foi descrita propondo-se a existência de dois estados alostéricos T distintos, T_x e T_o, onde T_x representa o estado desoxigenado com ânion ligado e T_o representa o estado desoxigenado na ausência de ânions, segundo o esquema :



Onde:

X é o ligante aniônico, como por exemplo Cl^-, DPG, IHP;

δn_w é a diferença de hidratação entre os estados T_o e R;

Δn_w é a diferença de hidratação entre os estados T_x e R;

K_x é a constante de dissociação aparente de T_o para T_x e

n_x é o número de ânions aparentes ligados a T em relação a T_o.

Com este esquema, considerando que a variação de hidratação observada, Δn_w^{obs}, durante a oxigenação da Hb, a uma determinada concentração do ânion, é dada por:

$$\Delta n_w^{obs} = f_{To}\delta n_w + f_{Tx}\Delta n_w \qquad (7)$$

onde f_{To} e f_{Tx} são as frações de Hb ligadas à oxigenação de T_o para R e de T_x para R. Considerando o equilíbrio entre $T_o + nX \Leftrightarrow T_x$, tem-se que

$$\Delta n_w^{obs} = \frac{(\delta n_w - \Delta n_w)}{\left[1 + \left(\frac{X}{K'}\right)^n\right]} + \Delta n_w \qquad (8)$$

Estes autores também mostraram que o ajuste dos parâmetros de ligação de cloreto (figura 7) e DPG, fornece valores para as constantes de ligação dos mesmos (*K*) e as estequiometrias das ligações (*n*), que estão de acordo com os valores obtidos por outros métodos. Com isto, puderam concluir sobre a existência de um novo estado alostérico T da Hb, que é maximamente estabilizado no estado desoxigenado e na ausência de ânions. Posteriormente, com a determinação da estrutura cristalográfica de amostras de desoxi-Hb desionizada, este novo estado foi classificado como um estado T_o, que se distingue do estado T_x pela ligação de ânions e pela maior área exposta de superfície acessível ao solvente (Seixas e Colombo, 2002).

Os resultados acima indicaram que o mecanismo de oxigenação da Hb envolve pelo menos três estados alostéricos T_o , T_x e R, e que o equilíbrio relativo entre estes estados pode ser controlado experimentalmente variando-se a concentração de ânions na solução. A existência de dois estados alostéricos T distintos foi detectada posteriormente por medidas de oxigenação de Hb encapsulada em sílica-gel (Shibayama e Saigo, 2001). Estudos posteriores realizados em nosso grupo de pesquisas, trouxeram novas evidências em apoio a este modelo de três estados. Caôn Filho demonstrou que a atividade de ânions em solução altera a Entalpia e a Entropia de oxigenação da Hb humana, segundo o modelo de três estados proposto (Tese de doutorado em andamento, a ser defendida este ano). Salvay e colaboradores (Salvay, Grigera *et al.*, 2003) utilizaram uma micro balança de quartzo para medir diretamente a hidratação de filmes de oxi-Hb e desoxi-Hb, na presença e ausência de ânions, e em equilíbrio com uma atmosfera de 98% de umidade relativa. Com isto, puderam determinar o efeito da ligação de íons cloreto nestas estruturas, bem como determinar o número de moléculas de água que ligam-se a Hb na transição de desoxi-T_o para a oxi-R, na transição

de desoxi-T_x para a oxi-R, e na transição de desoxi-T_o para desoxi-T_x, encontrando valores em concordância com aqueles medidos em solução pelo método de estresse osmótico.

1.5 OXI-REDUÇÃO DA HEMOGLOBINA E EFEITO ALOSTÉRICO

O equilíbrio de oxi-redução de uma reação eletroquímica reversível é estudado, medindo-se a diferença de potencial que se estabelece entre a interface metal inerte de um eletrodo / par redox de interesse em solução, e um eletrodo de referência. Para hemoproteínas este equilíbrio envolve a mudança do estado de oxidação do ferro do grupo prostético heme segundo a equação escrita para um único sítio:

$$Fe^{2+} \Leftrightarrow Fe^{3+} + e^{-} \qquad (9)$$

onde Fe^{2+} refere-se a proteína no estado ferroso e Fe^{3+} ao estado férrico. Para a hemoglobina, temos que:

$$desoxi - Hb \Leftrightarrow meta - Hb + 4e^{-}$$

A equação geral que descreve o equilíbrio redox de um grupo heme é dada pela equação de Nernst, que a pH constante é:

$$E = E^{0} + \frac{RT}{nF} ln \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]} \qquad (10)$$

onde,

R é a constante dos gases = 8,31441 $J.mol^{-1}.K$

T é a temperatura absoluta, K

F é a constante de Faraday = 96.485 $J.mol^{-1}.volt^{-1}$

n é o número de elétrons transferidos

E é o potencial do sistema com relação ao eletrodo normal de hidrogênio (E.N.H.), e mede a afinidade do par redox por elétron, em relação ao par H/H^+

E^0 ou $E_{1/2}$ é o potencial formal padrão de oxi-redução, que é igual a E quando as concentrações de Fe^{3+} e Fe^{2+} são iguais e portanto, metade dos sítios estão oxidados.

Antonini e Brunori (Antonini e Brunori, 1971), mostraram que existe um paralelismo entre os processos de oxigenação e oxi-redução. Essencialmente, p_{50} ou $p_{1/2}$, o parâmetro medido na oxigenação que avalia a afinidade do sítio ativo por oxigênio, e $E_{1/2}$, que avalia a capacidade do sítio ativo doar ou receber elétrons, apesar de envolverem processos químicos diferentes, apresentam várias semelhanças. Nestes estudos, os autores compararam os $E_{1/2}$ de várias Hbs normal e modificadas, com os $E_{1/2}$ calculados das diferenças observadas em $\log(p_{1/2}O_2)$ usando a relação $E_{1/2} = \left(2{,}03\frac{RT}{F}\right) \log P_{1/2}(O_2)$ e encontraram valores muito próximos. Alguns pesquisadores (Antonini, 1963b; Perutz, 1969) mostraram que as conformações da meta-Hb e da oxi-Hb são similares. Outro exemplo dessa semelhança é a cooperatividade observada em ambos os processos, quando do deslocamento do equilíbrio da conformação T (desoxi-Hb) para a conformação R (oxi ou meta- Hb). Assim como na oxigenação o coeficiente de Hill (n) reflete a cooperatividade do sistema, na oxi-redução da Hb, n perde

o significado original de nº de elétrons transferidos durante a reação e passa a ser um índice das interações entre os grupos heme (Wyman, 1964). O potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$) da Hb também é modulado por ligantes heterotrópicos, da mesma forma que p_{50}.

Por causa das similaridades apontadas anteriormente, vários estudos de equilíbrio redox tem sido usados como uma sonda alternativa para investigar variações conformacionais, induzida por ligantes, que ocorrem na hemoglobina. Nos primeiros experimentos de equilíbrio redox desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, estudamos o efeito de água no potencial de oxi-redução de hemoglobina humana e mioglobina equina (Colombo, 1996). Fazendo uso do método do estresse osmótico, com sacarose como soluto neutro, pudemos observar que a diminuição da atividade de água em solução provocava um aumento no $E_{1/2}$ da hemoglobina de 0,150 para 0,350 Volts, quando a concentração de sacarose variava de 0 à ~ 60%; e nenhuma variação no $E_{1/2}$ da mioglobina ($E_{1/2}$ ~ 0,050 V) nas mesmas condições. O aumento significativo de $E_{1/2}$ na Hb é indicativo de uma forte estabilização do estado T, ou seja, a adição de soluto neutro protege o íon ferroso contra a oxidação. Este comportamento coincide com o observado em medidas de equilíbrio de oxigenação que, na presença de diferentes osmólitos, provoca um aumento em p_{50} (Colombo, Rau *et al.*, 1992) e consequente estabilização da forma T.

2. OBJETIVOS

Considerando os estudos acima relatados, que:

1 - evidenciam que a interação de ânions com a desoxi-Hb desloca o equilíbrio alostérico entre dois estados alostéricos, T_o e T_x, com diferentes afinidades intrínsecas por oxigênio e diferentes hidratações;

2 – a exemplo da oxigenação, a reação de oxi-redução da Hb responde à mudanças na atividade de reguladores heterotrópicos, como ânions e moléculas de água, como conseqüência das mudanças terciárias e quaternárias que acompanham a oxidação dos heme da Hb, propusemo-nos a:

Determinar o efeito dos ânions IHP e Cl^- no potencial de oxi-redução da Hb humana ($E_{1/2}$), e a investigar o efeito destes ânions, e de água, na reação de transferência de elétrons desta proteína para uma proteína transportadora de elétrons típica, o citocromo-c.

Os objetivos principais destes estudos foram:

- Estabelecer de que forma os ânions IHP e cloreto influenciam o equilíbrio alostérico R/T da hemoglobina através de medidas de potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$).

- Verificar a possibilidade de relacionar a taxa de variação do potencial redox em relação a taxa de variação do potencial químico da água (alterada pela adição de solutos neutros à solução) com as variações de hidratação da hemoglobina determinadas, na ausência de ânions e na presença dos íon cloreto e IHP, a partir de medidas de oxigenação pelo método de estresse osmótico.

unesp

- Estudar o equilíbrio químico e a cinética de transferência de elétrons da reação entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c. Estimar de que forma os ânions IHP e cloreto afetam estes dois processos.
- Estimar de que maneira a diminuição da atividade de água em solução influencia o equilíbrio redox Hb/Cyt-c e a cinética de transferência de elétrons.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental utilizado na purificação da hemoglobina humana (HbA_o) é a metodologia proposta por Willians e Tsay (Williams, 1973) . Amostras de Hemoglobina humana (HbA_o) foram coletadas de voluntários saudáveis e não fumantes. As hemácias foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada (NaCl 0.9%, Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM pH 8,5). A hemólise ocorreu com a adição de solução hipotônica v/v (Tris-HCl + EDTA 1 mM, pH 8,5). Os "debris" foram retirados com adição de clorofórmio, sob agitação constante. Em seguida, centrifugou-se a 2.300 g por 90 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore 1,2 μm e dializado contra tampão Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM, pH 8,5. A desionização ocorreu em coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA. A amostra foi concentrada e estocada em nitrogênio líquido.

A Hemoglobina foi convertida para a forma férrica (meta-hemoglobina) pela adição de um excesso de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) e posterior passagem por coluna de Sephadex G-25 (SIGMA), equilibrada no mesmo tampão das medidas, para remoção de resíduos de ferri/ferrocianeto de potássio.

3.1 POTENCIOMETRIA

3.1.1 Titulação de 50% desoxi/ 50% meta-Hb com IHP

Medidas de potencial de oxi-redução foram feitas numa cela fechada, onde 100 μM de oxi e 100 μM de meta hemoglobina por tetrâmero foram

dissolvidas em tampão Hepes 10 mM, pH 7,2. NaCl foi adicionado a uma concentração final de 100mM. Solução estoque do mediador Tionina (SIGMA) foi preparado minutos antes de cada medida e adicionado a uma proporção de 4% da concentração da proteína (Clark, 1960). Pelo fato do par redox Hb^{3+}/Hb^{2+} demorar a atingir o equilíbrio e não fornecer potenciais estáveis, é comum o uso de pequenas quantidades de um mediador para acelerar o estabelecimento do potencial. Esta substância, atua como outro par redox reversível. Quando o mediador e o par redox estudado atingem o equilíbrio, ambos terão o mesmo potencial (Clark, 1960).

A cela estava equipada de um eletrodo de platina e um de calomelano saturado, conectados a um analisador de íons Corning 350. A figura 8 mostra um desenho da cela utilizada nestes experimentos.

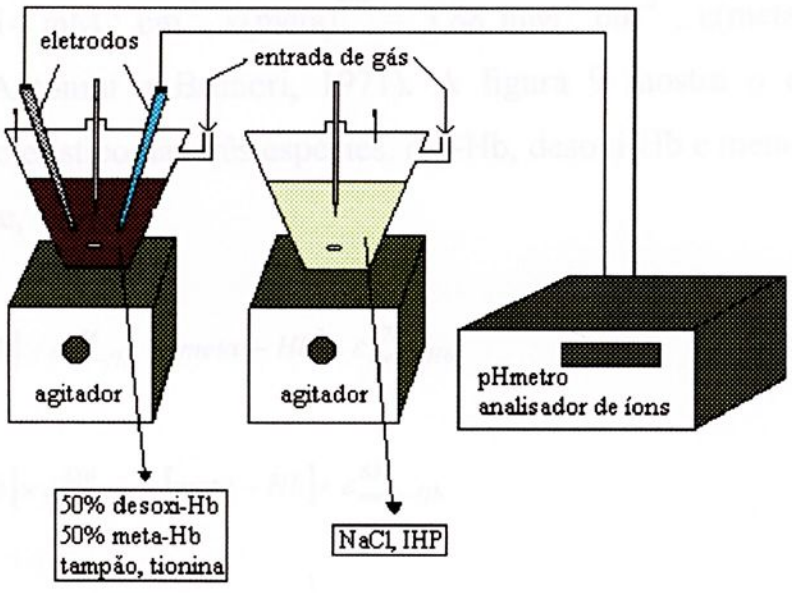


Figura 8 - Cela onde foram feitas as medidas de potencial de oxi-redução da hemoglobina ($E_{1/2}$).

Esse sistema foi desoxigenado por ~2 horas com um fluxo de nitrogênio. Solução estoque de inositol hexafosfato (IHP) 10 mM foi mantida sob fluxo de nitrogênio pelo mesmo tempo que a amostra. Alíquotas de IHP foram adicionadas com uma seringa de Hamilton à cela de medida e , após o estabelecimento do equilíbrio (~ 15 a 20 minutos), o potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$) foi registrado. As medidas foram repetidas na ausência de NaCl. A temperatura usada nos experimentos foi a ambiente (~25° C). Ao final de cada experimento, registrou-se um espectro da amostra utilizada.

A concentração de cada espécie no início e final dos experimentos foi determinada espectroscopicamente num espectrofotômetro VARIAN-CARY-3. A absorbância registrada em cada comprimento de onda (λ) é definida por uma somatória das espécies presentes em solução; oxi e meta Hb, e de seus correspondentes coeficientes de extinção molar; $\varepsilon(oxi)^{576} = 15{,}7\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, $\varepsilon(oxi)^{630} = 0{,}14\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, $\varepsilon(meta)^{576} = 3{,}88\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, $\varepsilon(meta)^{630} = 3{,}84\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (Antonini e Brunori, 1971). A figura 9 mostra o espectro de absorção característico das três espécies: oxi-Hb, desoxi-Hb e meta-Hb. Explicitamente,

$$A_{576} = [oxi - Hb] \times \varepsilon^{576}_{oxi-Hb} + [meta - Hb] \times \varepsilon^{576}_{meta-Hb} \quad (11)$$

$$A_{630} = [oxi - Hb] \times \varepsilon^{630}_{oxi-Hb} + [meta - Hb] \times \varepsilon^{630}_{meta-Hb} \quad (12)$$

Dessa forma, pode-se calcular as frações correspondentes a cada uma das espécies em solução no início e no final de cada experimento.

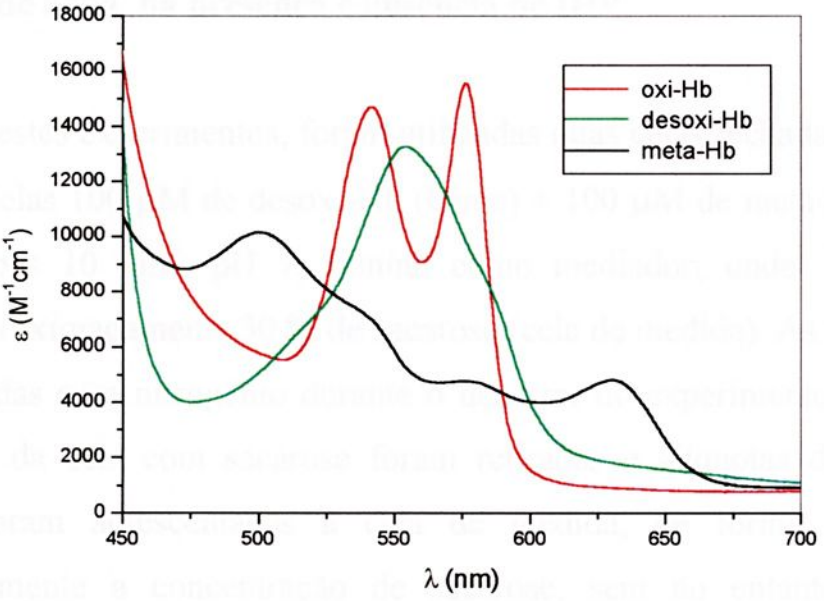


Figura 9 - Espectros de absorção característicos de três formas de hemoglobina: oxi, desoxi e meta. Tampão fosfato de potássio 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

3.1.2 Titulação de 50% desoxi/50% meta-Hb com NaCl.

Os experimentos foram feitos como descrito no ítem anterior, porém nas seguintes condições: Soluções contendo 100 μM de desoxi-Hb (heme), 100 μM de meta-Hb (heme), tampão Hepes 10 mM, tionina numa razão de 4% da concentração total de proteína, pH 7, T 25° C; foram tituladas com uma solução estoque de 2 M de NaCl previamente desoxigenada e o potencial de oxi-redução foi registrado quando atingido o equilíbrio.

3.1.3 Medida de $E_{1/2}$ da hemoglobina em soluções com diferentes atividades de água, na presença e ausência de IHP.

Para estes experimentos, foram utilizadas duas celas fechadas, contendo cada uma delas 100 μM de desoxi-Hb (heme) + 100 μM de meta-Hb (heme), tampão hepes 10 mM, pH 7, tionina como mediador; onde uma delas continha aproximadamente 30 % de sacarose (cela de medida). As celas foram desoxigenadas com nitrogênio durante o decorrer do experimento. Alíquotas da solução da cela com sacarose foram retiradas e alíquotas da cela sem sacarose foram acrescentadas à cela de medida, de forma a diminuir progressivamente a concentração de sacarose, sem no entanto alterar a concentração dos outros componentes. Desta forma, a cada diluição, o potencial $E_{1/2}$ pode ser lido diretamente, tão logo o equilíbrio fosse estabelecido. As alíquotas retiradas da cela de medida foram usadas para checar o pH da solução, a concentração das espécies (desoxi e meta-Hb) e também para medir a osmolalidade da solução.

A osmolalidade das soluções foi medida num osmômetro "Osmette A" modelo #5002 – Precision Systems Inc. e convertida em atividade de água (Colombo e Bonilla-Rodriguez, 1996) pela relação:

$$ln(a_W) = \frac{-Osmolalidade}{55{,}55} \qquad (13)$$

Assim como a equação de "linkage" relaciona p_{50} com a variação de hidratação entre as estruturas da oxi e da desoxi-Hb (Equação 6), pode-se

relacionar $E_{1/2}$ com a variação de hidratação entre as estruturas da meta e da desoxi-Hb, fazendo uso da relação entre $E_{1/2}$ e p_{50},

$$E_{1/2} \times \frac{F}{RT} \sim ln(p_{50}) \quad (14)$$

$$\frac{F}{RT}\frac{dE}{d\,ln(a_w)} = -(n^{oxidado} - n^{reduzido}) = \Delta n_w \quad (15)$$

Estas medidas foram feitas na ausência e presença de 2 mM de IHP. Um segundo experimento foi realizado, medindo diretamente $E_{1/2}$ quando se titulou uma solução com 50% de desoxi e 50% de meta-Hb, com uma solução concentrada de sacarose, na presença de 2 mM de IHP e 100 mM de NaCl.

3.2 ESPECTROFOTOMETRIA

3.2.1 Titulação de meta hemoglobina com IHP.

A fim de verificar se a meta-Hb sofria variação na sua estrutura quaternária, foram feitas medidas de titulação espectrofotometrica no intervalo de 240 a 350 nm, seguindo protocolo de Bellelli e Brunori (Bellelli e Brunori, 1994). Registrou-se o espectro diferença entre duas amostras, cada uma delas contendo 400μM de meta-Hb/tetrâmero em tampão Hepes 10 mM e pH 7,2,

onde uma delas foi titulada com solução de IHP 2mM ajustado ao mesmo pH. Estas medidas foram repetidas na presença de 100mM de NaCl. Após os *ajustes das curvas terem sido feitos, calculou-se a área sob as mesmas, entre 283 e 291 nm, como mostrado na figura 14.*

3.2.2 Titulação espectrofotometrica de desoxi-Hb com ferricitocromo-c

Uma determinada quantidade de ferricitocromo-c de coração de cavalo, (USB e SIGMA), foi dissolvida em água destilada. A amostra foi então centrifugada para retirada de possíveis impurezas. A concentração da proteína foi calculada, a partir da absorção medida em λ_{max}= 526 nm, com o correspondente coeficiente de extinção molar ε = 11,000 M^{-1} cm^{-1} (Lewis e Wrighton, 1981), como mostrado na figura 10.

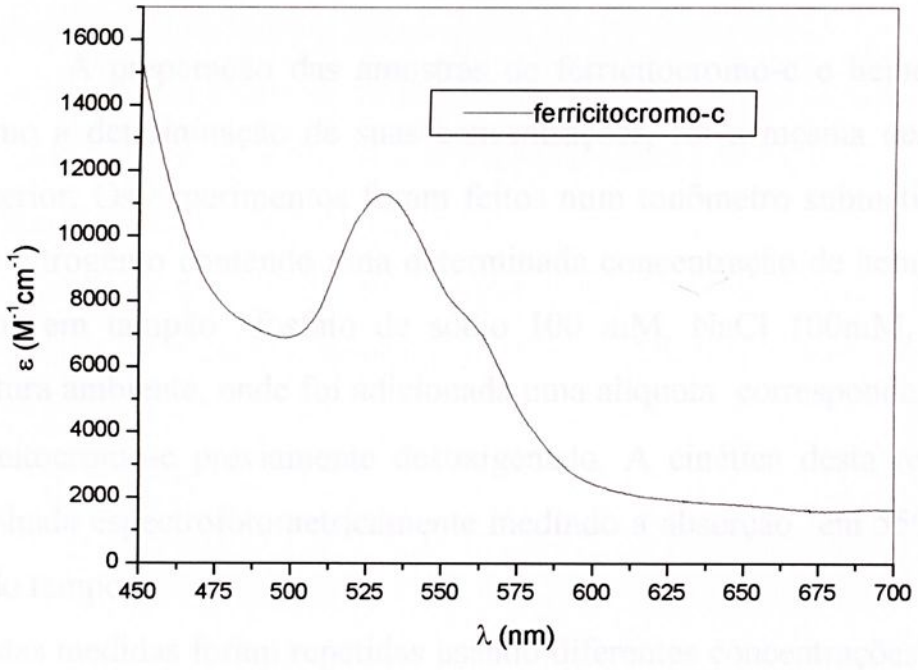


Figura 10 – Espectro de absorção de uma solução de ferricitocromo-c de coração de cavalo.

As medidas foram feitas em dois tonômetros. Em ambos foram colocados 60 μM de HbA_o, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7, 100 mM de NaCl, a temperatura ambiente. Nestas mesmas condições, o $E_{1/2}$ da hemoglobina humana é 0,150 V (Brunori, Rotilio *et al.*, 1971) e o $E_{1/2}$ do citocromo-c é 0,260 V (Rodckey, 1950). Um deles continha ~ 66 % de sacarose. Os tonômetros foram submetidos a um fluxo de nitrogênio até que as amostras estivessem completamente desoxigenadas, o que foi checado pela medida do espectro de absorção da solução de Hb. Titulou-se essas duas amostras com alíquotas de uma solução estoque de ferricitocromo-c 1,56 mM previamente desoxigenada, e os correspondentes espectros foram registrados.

3.2.3 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c a diferentes proporções de $[Hb]_{heme}/[cyt\text{-}c]$.

A preparação das amostras de ferricitocromo-c e hemoglobina, bem como a determinação de suas concentrações, foi a mesma descrita no item anterior. Os experimentos foram feitos num tonômetro submetido a um fluxo de nitrogênio contendo uma determinada concentração de hemoglobina dissolvida em tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 100mM, pH 7 e temperatura ambiente, onde foi adicionada uma alíquota correspondente a 20 μM de citocromo-c previamente desoxigenado. A cinética desta reação foi acompanhada espectrofotometricamente medindo a absorção em 550 nm em função do tempo.

Estas medidas foram repetidas usando diferentes concentrações de Hb e mantendo a de citocromo-c fixa em ~20 μM.

unesp

3.2.4 Cinética de oxidação entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c às proporções entre $[Hb]_{heme}$/[cyt-c] de 1/1, 2/1 e 4/1, e diferentes concentrações de ânions.

A preparação das amostras e determinação das concentrações das duas proteínas foram feitas como descrito no item 3.2.2. Os experimentos foram feitos num tonômetro, o tampão utilizado foi o Hepes numa concentração de 10 mM. O pH das medidas ficou em 7 e a temperatura utilizada foi a ambiente. Solução estoque de citocromo-c e solução tamponada de Hb foram submetidas a um fluxo de nitrogênio até completa desoxigenação de ambas. Um espectro da hemoglobina desoxigenada foi registrado antes de cada medida cinética.

Para estas medidas utilizou-se as proporções entre $[Hb]_{heme}$/[cyt-c]: 1/1, 2/1 e 4/1.

Cada uma destas medidas foi realizada nas seguintes condições:

a) sem nenhum ânion presente, ou seja apenas na presença do tampão,

b) na presença de tampão e 10, 50 e 100 mM de cloreto de sódio e

c) na presença de tampão e 1 mM de IHP.

A cinética destas reações foi acompanhada espectrofotometricamente medindo a absorção em 630 nm em função do tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Titulação potenciométrica de Hb com NaCl, e IHP na presença e ausência de 100 mM NaCl.

Estudos anteriores, revisados na Introdução, dão conta que a ligação de diversos íons, entre eles o íon cloreto, IHP e 2,3-DPG, à desoxi-Hb muda seu estado alostérico do estado T_o para T_x. Esta transição alostérica é acompanhada pela diminuição da afinidade intrínsica do estado desoxi-T pelo oxigênio, e pela diminuição da afinidade global da Hb por oxigênio, medida por p_{50}, a pressão de oxigênio a meia saturação. Dada a correlação entre p_{50} e o potencial redox $E_{1/2}$, o potencial a meia oxidação, determinamos o efeito da concentração de NaCl, e da concentração de IHP na presença e ausência de 100 mM de NaCl, no valor do potencial de oxi-redução $E_{1/2}$ da Hb-A_o.

4.1.1 Titulação potenciométrica de Hb com NaCl.

A figura 11 apresenta um gráfico de $E_{1/2}$ em função da concentração total de NaCl em solução, determinado de várias titulações potenciométricas de soluções contendo 100 μM de desoxi-Hb e 100 μM de meta-Hb, ambas por heme.

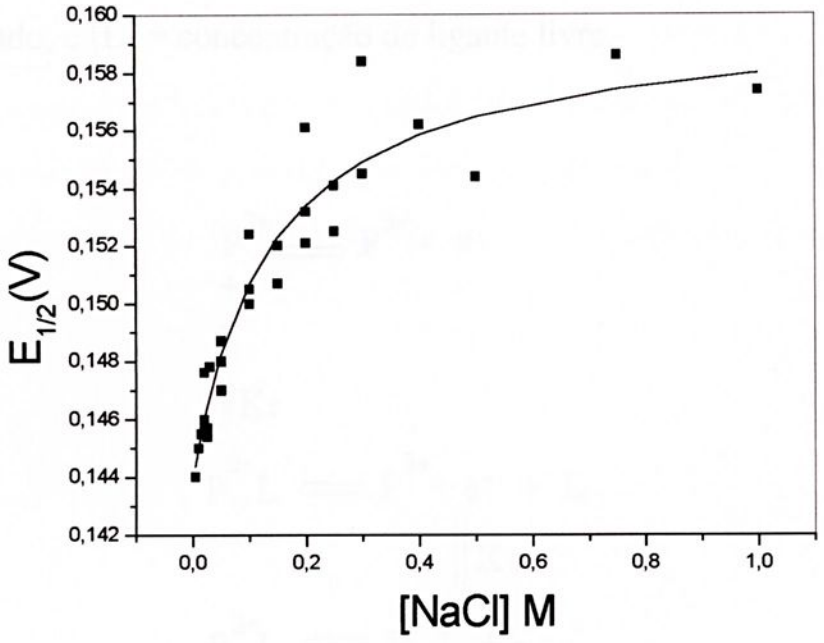


Figura 11 - Variação do $E_{1/2}$ de Hb humana ($[Hb]_{total}$ = 200 μM/tetrâmero) com o aumento da concentração de cloreto de sódio. Tampão Hepes 10 mM, pH 7,0; temperatura ambiente. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação (19) aos dados experimentais.

Observa-se que o valor de $E_{1/2}$ aumenta com o aumento da concentração de NaCl, ressaltando o caráter alostérico do íon cloreto. Se considerarmos que a ligação do íon cloreto à proteína modifica o potencial redox da espécie ligada em relação à especie livre, a pequena variação do $E_{1/2}$ obtida quando a concentração de NaCl varia entre 0 e 1 M, indica uma ligação fraca do íon a hemoglobina. Esta interpretação tem sua origem na análise que se segue.

O efeito de um ligante sobre o potencial de um sistema redox a um dado valor de pH, depende das constantes de equilíbrio do complexo oxidante-ligante (K_o), do complexo redutor-ligante (K_r) e de suas respectivas estequiometrias de ligação (n) (Clark, 1960).

Considerando que P^{2+} = $[Hb^{2+}]$ no estado reduzido, P^{3+} = $[Hb^{3+}]$ no estado oxidado, e [L] = concentração de ligante livre,

$$P^{2+} \rightleftharpoons P^{3+} + e^-$$
$$+$$
$$L$$
$$\| Kr$$
$$P^{2+}L \rightleftharpoons P^{3+} + e^- + L$$
$$\| Ko$$
$$P^{2+}L \rightleftharpoons P^{3+}L + e^-$$

As constantes de dissociação aparentes serão:

$$Kr = \frac{[P^{2+}][L]^{n_1}}{[P^{2+}L]} \quad (16) \qquad \text{e} \qquad Ko = \frac{[P^{3+}][L]^{n_2}}{[P^{3+}L]} \quad (17)$$

$$P^{2+}total = [P^{2+}] + [P^{2+}L]$$

$$P^{3+}total = [P^{3+}] + [P^{3+}L]$$

$$P_{total} = P^{3+}_{total} + P^{2+}_{total}$$

$$L_{total} = [L] + n_2[P^{3+}L] + n_1[P^{2+}L]$$

Quando K_o e K_r são muito grandes a concentração de ligante livre ([L]) é aproximadamente igual a concentração do ligante total em solução (L_{total}).

Esta aproximação também se justifica ao observar na figura 11, que a concentração de NaCl titulante (>25 mM até 1 M com metade da transição ~0,2 M) é sempre muito maior que a concentração total da proteína (200 μM). Com esta aproximação, [L] ≈ L_{total}, e isolando $[P^{2+}]$ e $[P^{3+}]$ em função de K_r e K_o, respectivamente e, substituindo na equação fundamental de equilíbrio de oxi-redução teremos:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{Ko}{Kr}\right) + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{Kr + [L]^{n_1}}{Ko + [L]^{n_2}}\right) + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{P^{3+}_{total}}{P^{2+}_{total}}\right) \quad (18)$$

No caso dos nossos experimentos, $P^{3+}_{total} = P^{2+}_{total}$ e suporemos que $n_1 = n_2 = 1$. Desta forma, a equação final que representará o $E_{1/2}$ em função da concentração de NaCl será:

$$E_{1/2} = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{Ko}{Kr}\right) + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{Kr + [L]}{Ko + [L]}\right) \quad (19)$$

Esta equação foi ajustada aos dados experimentais pelo método dos mínimos quadrados não linear (rotina implementada no Microcal Origin 6.0), que forneceu os seguintes parâmetros:

$E_{1/2} = 0{,}144$ V

$Kr = 0{,}098 \pm 0{,}12$ M

$Ko = 0{,}19 \pm 0{,}13$ M

Onde $E_{1/2}$ é o potencial redox na ausência de ânions e K_r e K_o são as constantes de dissociação. As constantes de associação, portanto, serão:

$K_r = 10{,}23\ M^{-1}$

$K_o = 5{,}3\ M^{-1}$

Estes resultados indicam que o sítio de ligação do ânion cloreto é duas vezes mais forte na desoxi-Hb que na meta-Hb.

Deve-se notar que esta análise do efeito de Cl^- sobre o potencial redox da Hb não explicita o possível efeito da força iônica (I) sobre a atividade das espécies oxidada e reduzida da Hb. Se a força iônica altera igualmente estas espécies, o efeito líquido de I sobre $E_{1/2}$ seria nulo, pois se cancelariam. Com a adição da [NaCl], a atividade de água na solução diminui na proporção de ~ exp(– 2*[NaCl]/55.5). Experimentos anteriores, e outros a serem mostrados a seguir, demonstram que $E_{1/2}$ da Hb aumenta com a dimunição da atividade de água. Portanto, ambos os efeitos; do aumento da força iônica e da diminiução da atividade de água, estão embutidos nos valores das constantes de ligação de cloreto determinadas no modelo acima. Isto implica que os valores das constantes K_o e K_r determinadas a partir dos experimentos mostrados na figura 11 são valores aparentes, e, além de representar o efeito da ligação deste íon à cada espécie da Hb, carregam as outras contribuições.

Outro aspecto a ser notado é que não é possivel distinguir, com estes experimentos, a transição da espécie T_o para T_x, que deve ocorrer na região de [NaCl] entre 2-50 mM.

4.1.2 Titulação potenciométrica de Hb com IHP na presença de 100 mM NaCl.

O gráfico da figura 12, mostra medidas do potencial redox de uma solução de Hb contendo 50% da espécie desoxi-Hb e 50% da espécie meta-

Hb, 100 mM de NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.2, em função da concentração de IHP. Os dados apresentados referem-se a duas medidas independentes.

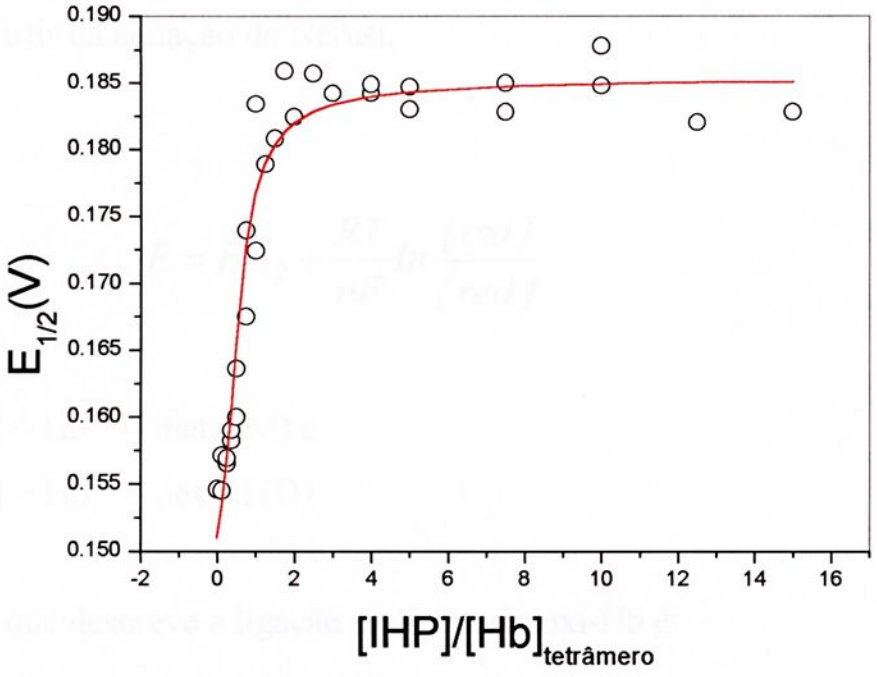


Figura 12 - Titulação potenciométrica de 100 μM desoxi-Hb + 100 μM meta-Hb ambas por tetrâmero,com IHP. Tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, 25°C; na presença de 100 mM de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação (23) aos dados experimentais.

Observa-se que $E_{1/2}$ aumenta, a medida que IHP é acrescentado, até atingir um patamar em ≈ 0.185Volts para razões de concentração $[IHP]_{Total}$ / $[Hb]_{tetrâmero}$ maiores que aproximadamente 2. Este comportamento é semelhante ao de p_{50} , quando IHP ou DPG ligam-se à hemoglobina em medidas de oxigenação. O aumento em $E_{1/2}$ e p_{50} com a concentração destes íons está relacionado ao deslocamento do equilíbrio alostérico T ⇔ R em direção ao estado reduzido T, induzido pela ligação preferencial destes ânions ao estado T. Após atingir esse valor, $E_{1/2}$ torna-se estável.

Para descrever o efeito da ligação de IHP no valor do potencial redox da Hb, mostrado nesta figura, considerou-se a ligação de IHP às duas espécies em solução, ou seja, desoxi e meta hemoglobina.

A partir da equação de Nernst,

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} ln \frac{[oxi]}{[red]} \qquad (20)$$

onde [oxi] = Hb^{3+} = meta (M) e

[red] = Hb^{2+} = desoxi (D)

a equação que descreve a ligação de IHP a desoxi-Hb é:

$D + X \xleftrightarrow{K_D} DX$ onde X = [IHP]

$$K_D = \frac{[DX]}{[D][X]} \rightarrow [DX] = K_D[D][X]$$

$$[D_{total}] = [D] + [DX]$$

$$[D_{total}] = [D](1 + K_D[X]) \rightarrow [D] = \frac{[D_{total}]}{1 + K_D[X]} \qquad (21)$$

Analogamente, a equação que descreve a ligação de IHP a meta-Hb é:

$$M + X \xleftrightarrow{K_M} MX$$

$$K_M = \frac{[MX]}{[M][X]} \qquad \rightarrow \qquad [MX] = K_M [M][X]$$

$$M_{total} = [M] + [MX]$$

$$[M_{total}] = [M](1 + K_M [X]) \qquad \rightarrow \qquad [M] = \frac{[M_{total}]}{1 + K_M [X]} \qquad (22)$$

Substituindo (21) e (22) em (20), teremos:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} ln \left(\frac{\frac{[M_{total}]}{1 + K_M [X]}}{\frac{[D_{total}]}{1 + K_D [X]}} \right)$$

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{1 + K_D [X]}{1 + K_M [X]}\right) + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{[M_{total}]}{[D_{total}]}\right) \qquad (23)$$

A equação (23) foi ajustada aos dados experimentais pelo método de mínimos quadrados não linear. A rotina de ajuste foi implementada no MATLAB, na qual a concentração de ligante livre, *[X]*, é calculada interativamente para cada valor das constantes K_D *e* K_M em cada valor de concentração de ligante total adicionado à solução. Dadas as condições experimentais, onde a razão de concentrações entre as espécies reduzida e

oxidada foram mantidas igual a 1 (i.é. $[M_{total}/D_{total}] = 1$), o potencial E, na equação (23), é determinado pelos dois primeiros termos do lado direito. O melhor ajuste da equação (23) aos dados experimentais da figura 12 forneceu os seguintes parâmetros:

$K_D = 3,5x10^5\ M^{-1}$
$K_M = 9,1x10^3\ M^{-1}$
$n = 2,55$
$E_{1/2} = 0,151\ V$

Os valores encontrados para as constantes de associação, tanto para meta como para desoxi-Hb, encontram-se em boa concordância com os descritos na literatura, para constantes medidas a partir de curvas de oxigenação (neste caso, para oxi e desoxi-Hb) feitos no mesmo pH e na presença de NaCl (Janig, Ruckpaul *et al.*, 1971).

A constante de ligação de IHP a meta-Hb obtida através de medidas de $E_{1/2}$ é da mesma ordem de grandeza da obtida independentemente por nós através de titulações espectrofotometricas de IHP à esta espécie (dados mostrados a frente). Além disso, destacamos que esta é a primeira descrição da obtenção da constante de ligação de IHP à meta-Hb, através de medidas de potencial de oxi-redução.

O valor de $E_{1/2} = 0,151$ V, obtido no ajuste do potencial de oxi-redução do par meta/desoxi em função da [IHP], corresponde ao valor do potencial redox da Hb na ausência de [IHP] e presença de [NaCl] = 100 mM. Este valor encontrado também está em concordância com os reportados na literatura (Antonini e Brunori, 1964).

O valor de $n = 2,55$, obtido no ajuste, representa o número aparente de életrons envolvidos na reação. Na prática, a reação de oxi-redução da Hb

envolve a oxidação de quatro grupos heme, e portanto, 4 elétrons. A observação de *n* inferior a quatro implica na cooperatividade da reação redox da Hb, a semelhança do coeficiente de Hill determinado a partir das curvas de ligação cooperativa de oxigênio à Hb. O *n* da reação redox, determinado pelo ajuste dos dados de $E_{1/2}$ versus [IHP], $n = 2,55$, é ligeiramente maior que o valor $n = 1,4$ determinado por Bonaventura et.al (Bonaventura, Tesh *et al.*, 1998) a partir da análise das curvas de titulação redox de Hb-Ao a [IHP] constante via gráficos de Hill. A despeito desta diferença, os resultados aqui apresentados confirmam que a reação de oxi-redução da Hb na presença de IHP e NaCl é cooperativa. Adicionalmente, os dados mostram que a cooperatividade da reação extende-se por todo o intervalo de concentração de IHP investigado.

A resolução da equação acima forneceu-nos, também, o valor das concentrações de ligante livre em solução, $[X]_{livre}$ em cada etapa do experimento, o que nos possibilitou construir um gráfico de $E_{1/2}$ em função do logarítmo de $[IHP]_{livre}$. A figura 13 mostra este gráfico: os pontos respresentam os dados experimentais, e a linha contínua passando por estes pontos, o gráfico da equação (23) com os parâmetros ajustados. A forma sigmoidal desta curva reflete a cooperatividade da reação.

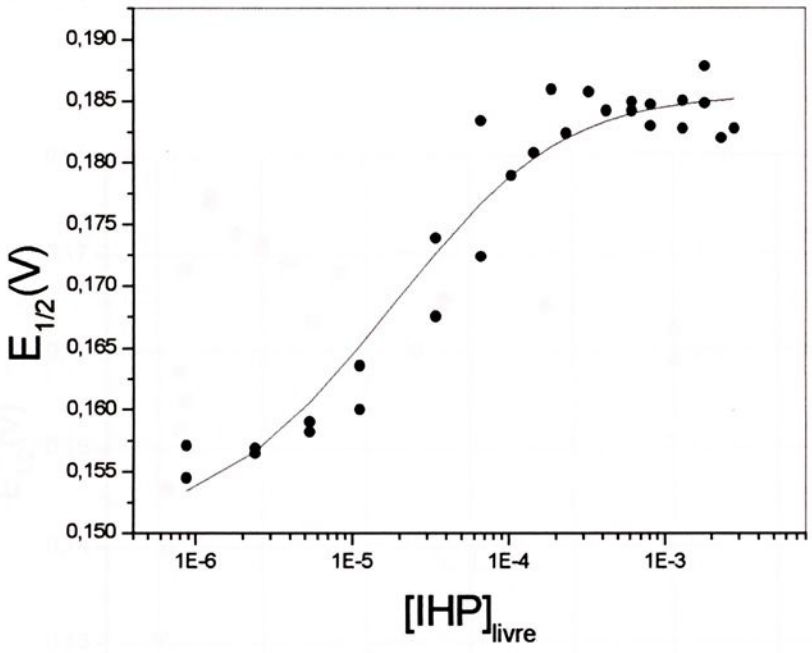


Figura 13 - Gráfico de $E_{1/2}$ de uma solução contendo 100 μM desoxi-Hb + 100 μM meta-Hb por tetrâmero em função da concentração de IHP livre em solução. Tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, temperatura ambiente, na presença de 100 mM de NaCl. A linha contínua representa o ajuste da equação (23).

4.1.3 Titulação potenciométrica de Hb com IHP na ausência de NaCl.

Os experimentos de titulação potenciométrica da Hb foram realizados também na ausência de NaCl. Dado que IHP tem seis cargas negativas, é de se esperar que a constante de afinidade deste íon pela Hb aumente com a diminuição da força iônica do meio, dificultando a liberação deste íon na transição quaternária T para R. Para investigar o possível efeito do aumento das constantes de afinidade da Hb por este íon, a figura 14 mostra o gráfico do

potencial $E_{1/2}$ da Hb, determinado em 10 mM Hepes, pH 7,2 e [NaCl] = 0, em função de $[IHP]_{total}/[Hb]_{total}$.

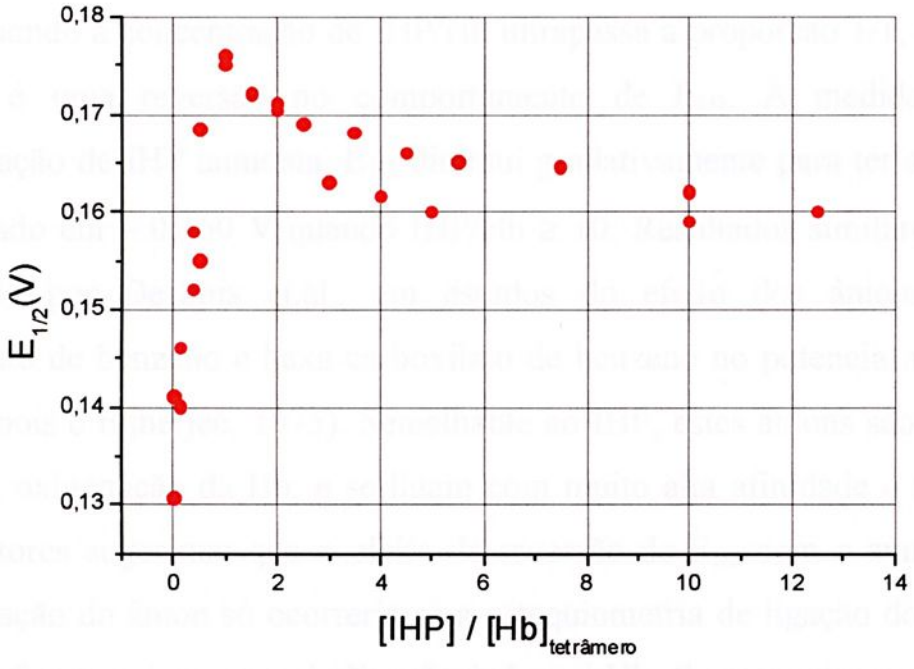


Figura 14- Titulação potenciométrica de 100 μM desoxi-Hb + 100 μM meta-Hb ambas por tetrâmero, com IHP. Tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, 25°C; na ausência de NaCl.

O valor médio de $E_{1/2}$ obtido nas medidas feitas na ausência de cloreto e antes de qualquer adição de IHP, foi de ~ 0,130 V. À medida que IHP foi acrescentado, $E_{1/2}$ teve seu valor aumentado progressivamente até atingir um pico correspondente a 0,175 V. O valor máximo de $E_{1/2}$ ocorre quando a proporção entre a concentração de $[IHP]/Hb_{tetrâmero}$ é igual a 1, ou seja, o ânion liga-se a Hb numa proporção de 1mol de IHP para 1 mol de Hb. Este tipo de gráfico, no qual a variável independente utilizada para acompanhar a complexação do ligante à proteína (no caso presente esta variável é o potencial da solução, $E_{1/2}$) cresce linearmente com a razão da concentração de ligante

total adicionado por proteina total (i.é, [IHP]/$Hb_{tetrâmero}$), e atinge seu valor máximo no valor desta razão igual a 1, é característico de ligação de ligante com muito alta afinidade. Nestas circunstâncias, praticamente todo o ligante adicionado à solução se associa a proteína na razão 1:1.

Quando a concentração de IHP/Hb ultrapassa a proporção 1/1, o que se observa é uma reversão no comportamento de $E_{1/2}$. À medida que a concentração de IHP aumenta, $E_{1/2}$ diminui gradativamente para ter seu valor estabilizado em ~ 0,160 V quando IHP/Hb ≥ 10. Resultados similares foram observado por Desbois et.al., em estudos do efeito dos ânions penta-carboxilato de benzeno e hexa carboxilato de benzeno no potencial redox da Hb (Desbois e Banerjee, 1975). Semelhante ao IHP, estes ânions são efetores fortes da oxigenação da Hb, e se ligam com muito alta afinidade à proteína. Estes autores sugeriram que o efeito da reversão de $E_{1/2}$ com o aumento da concentração do ânion só ocorreria se a estequiometria de ligação do ânion à meta-Hb fosse maior que a de ligação à desoxi-Hb. Se esta interpretação for utilizada no estudo presente, ela indicaria a existência de dois sítios de ligação à meta-Hb e um único sítio na desoxi-Hb. Entretanto, o IHP se associa muito mais fortemente à estrutura quaternária T da hemoglobina, e é nesta configuração que este íon desloca o equilíbrio alostérico entre T e R. Na estrutura quaternária T, IHP liga-se especificamente na entrada da cavidade central, no mesmo sítio de ligação ocupado por 2,3-DPG (Arnone e Perutz, 1974). Na transição da forma T para R, induzida pela ligação de oxigênio ou pela oxidação dos hemes, a cavidade central fecha, e o arranjo estereo-químico de cargas que caracteriza o sítio de ligação de fosfatos na desoxi-Hb se desestrutura. Portanto, seria de se esperar que com a transição T para R, induzida pela oxidação dos hemes, o IHP fosse liberado da Hb. Esta interpretação é inconsistente com a proposição de que a reversão do potencial

unesp

que mudam sua posição relativa na transição quaternária devido a rotação dos dímeros $\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$ (Bellelli e Brunori, 1994)

Nestes experimentos, investigou-se uma provável mudança estrutural entre os espectros de meta-Hb (R) e meta-Hb-IHP (T), monitorando a região do UV entre 240 e 350 nm.

A figura 15 mostra o espectro diferença entre meta-Hb e meta-Hb titulada com IHP na ausência de ânions. A partir da primeira alíquota de IHP adicionada, nota-se a formação de um pico de absorção próximo a 290 nm, que aumenta progressivamente a medida que a titulação prossegue. Este comportamento, também observado em experimentos semelhantes com HbO_2, indica que, meta hemoglobina quando complexada com IHP, sofre uma variação estrutural de R para T.

A fim de mensurar a magnitude da variação espectral nas vizinhanças do pico observado em 290 nm, calculou-se a área sob a curva entre 283 e 291 nm em cada etapa da titulação. A figura 16 apresenta um dos espectros obtidos, mostrando em vermelho a região usada para determinar a área. A diferença entre a integração de toda a curva neste intervalo (região em cinza + região em vermelho) e a integração entre os pontos extremos do mesmo intervalo (região cinza), nos fornece a área de interesse sob a curva (região em vermelho).

$E_{1/2}$ da Hb a altas concentrações de IHP ocorra devido a ligação de duas moléculas de IHP por meta-Hb.

Uma interpretação alternativa para a reversão do potencial observado é supor que a alta concentração de IHP livre em solução, a liberação do IHP complexado à conformação quaternária T da Hb é desfavorecido, e que a oxidação ocorra sem a liberação do ânion, e sem mudanças na estrutura quaternária da proteína. Consequentemente, ambos os estados oxidado e reduzido da Hb assumem a conformação quaternária T. Esta hipótese pode ser testada através de medidas espectrofotométricas de titulação de meta-Hb com IHP, a serem mostradas a seguir.

Antes de passar a apresentação dos dados espectrofotométricos, desejamos comentar que a equação utilizada para modelar o efeito de IHP sobre $E_{1/2}$ determinado na presença de NaCl (equação 23), não ajusta os dados experimentais obtidos na ausência deste ânion. A razão disto é que esta equação não contempla a mudança quaternária R/T da meta-Hb complexada com IHP.

4.2 Determinação espectrofotométrica da mudança na estrutura quaternária da meta-Hb induzida pela ligação de IHP.

A mudança da estrutura quaternária da hemoglobina pode ser acompanhada por medidas da diferença espectral no espectro de absorção no UV próximo. Ao passar da conformação R para a conformação T, uma pequena banda de absorção próxima a 290 nm aparece no espectro diferença entre estas duas estruturas. Essas diferenças são atribuídas aos resíduos aromáticos Tyr42α_1, Trp37β_2 e Phe41β_2, que se localizam na interface $\alpha_1\beta_2$, e

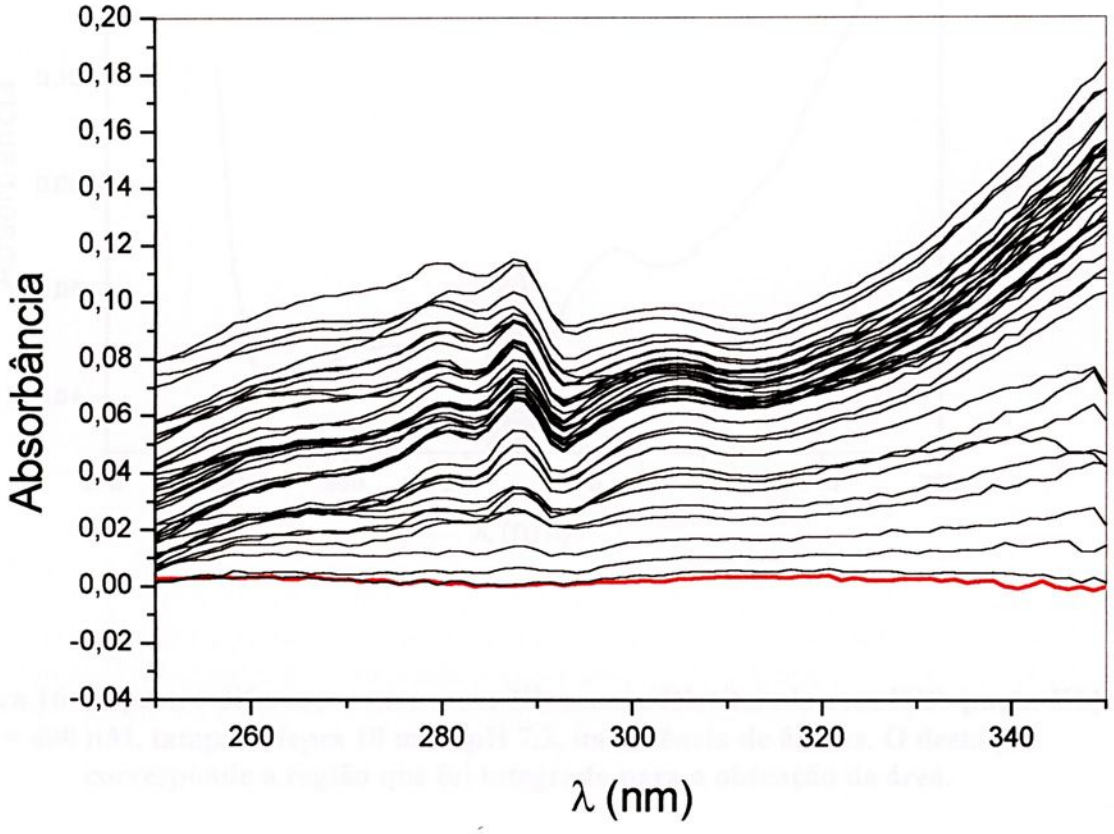


Figura 15 – Espectro diferença entre meta-Hb e meta-Hb-IHP. Tampão Hepes 10 mM, pH 7.2, 25°C. [meta-IHP] = 400 μM. [NaCl] = 0. O primeiro espectro (linha vermelha) corresponde ao ponto zero da titulação.

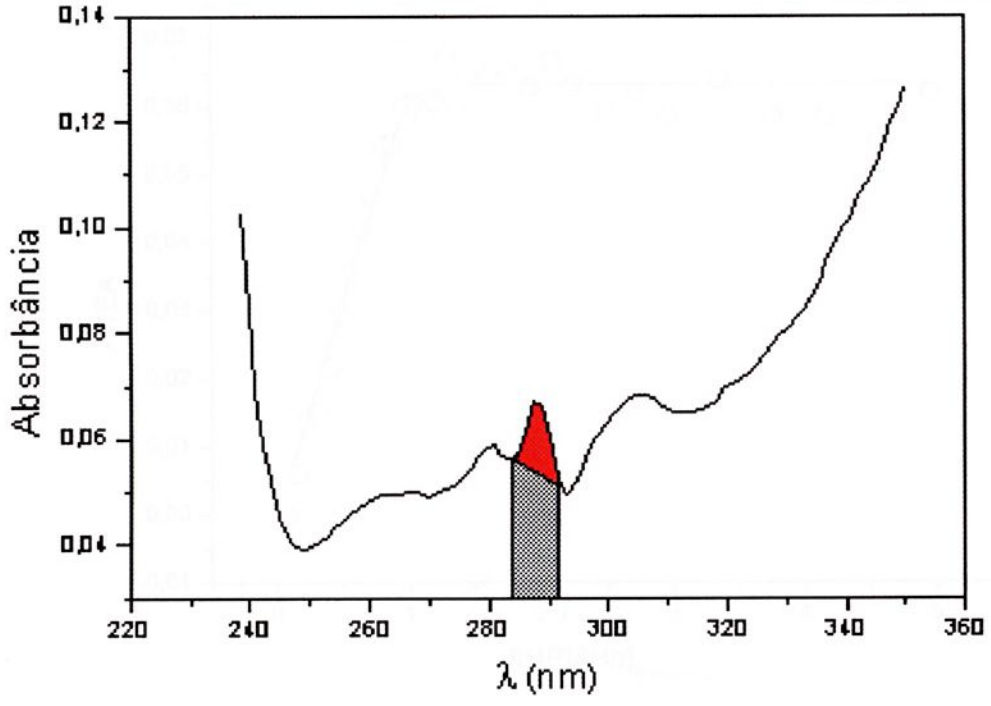


Figura 16- Espectro diferença entre meta-Hb e meta-Hb titulada com IHP. [meta-Hb] = 400 μM, tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, na ausência de ânions. O destaque corresponde a região que foi integrada para a obtenção da área.

De posse da área calculada sob cada curva de titulação, construimos um gráfico de área em função da razão [IHP]/[meta-Hb]. A figura 17 mostra o comportamento da área à medida que a proporção [IHP]/[Hb] é aumentada, na ausência de NaCl.

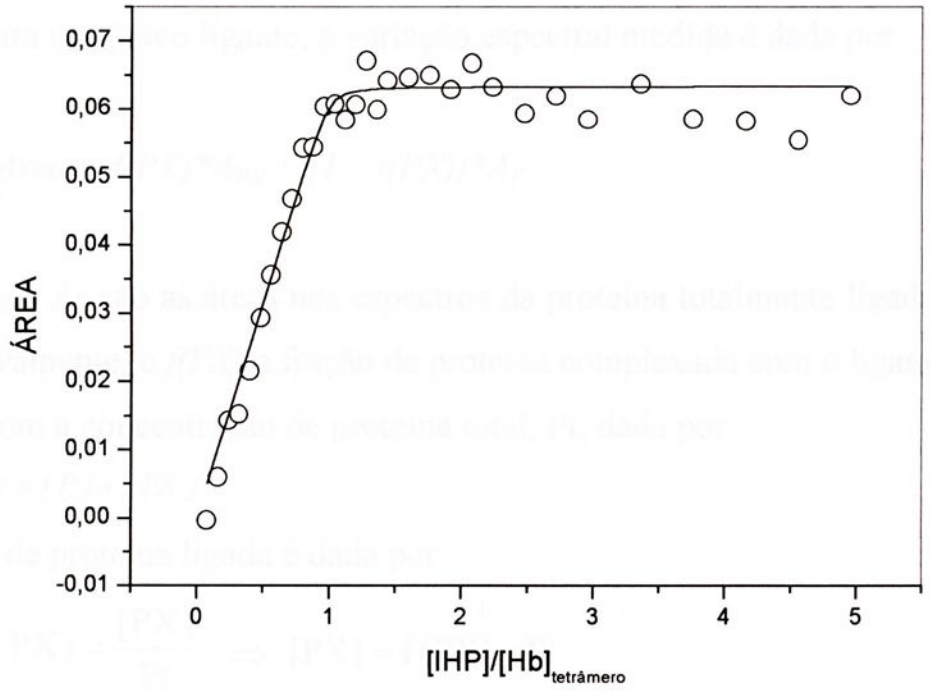


Figura 17 - Variação da área calculada a partir dos espectros da figura 14, em função da razão [IHP]/[meta-Hb], na ausência de ânions. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação (26) aos pontos experimentais, com $K = 1{,}26 \times 10^{-6}\ M^{-1}$.

A curva da figura 17 mostra que a ligação de IHP a meta-Hb é bastante forte. Além disso, a curva apresenta um ponto máximo quando [IHP]/[Hb] corresponde a unidade, indicando que na ausência de NaCl a ligação de IHP a meta-Hb dá-se na proporção de 1 mol de IHP para 1 mol de meta-Hb (tetrâmero). Portanto, esta curva ajustada com um modelo de ligação de um ligante X a um único sítio de ligação da proteína P.

$P + X \xleftrightarrow{K} PX$ onde

$$K = \frac{[PX]}{[P][X]} \qquad (24)$$

Para um único ligante, a variação espectral medida é dada por

$$\Delta Area = f(PX) * A_{PX} + (1 - f(PX)) * A_P \quad (25)$$

onde A_{PX} e A_P são as áreas nos espectros da proteína totalmente ligada e livre, respectivamente, e $f(PX)$ a fração de proteína complexada com o ligante.

Com a concentração de proteína total, Pt, dada por

$$Pt = [P] + [PX]$$

a fração de proteína ligada é dada por

$$f(PX) = \frac{[PX]}{Pt} \Rightarrow [PX] = f(PX) \times Pt$$

e a fração de proteína livre $f(P) = 1 - f(PX) \Rightarrow [P] = [1 - f(PX)] \times Pt$

Substituindo estas equações na constante de equilíbrio

$$K = \frac{f(PX)}{[1 - f(PX)] \times X_{livre}}$$

determina-se a fração de proteína ligada em função de K e $[X]_{livre}$

$$f(PX) = \frac{K[X]_{livre}}{1 + K[X]_{livre}}$$

que substituido na equação (25) obtém-se

$$\Delta Area = f(PX) * [A_{PX} - A_P] + A_P \quad (26)$$

que descreve como $\Delta Area$ depende da constante de equilibrio e da concentração de ligante livre. O ajuste desta equação aos dados experimentais mostrados na figura 17 fornece a constante de ligação K do IHP à meta-Hb. Para fazer este ajuste, entretanto, é preciso determinar $[X]_{livre}$, uma vez que só

conhecemos $[X]_{total}$. Com $[X]_{total} = [X]_{livre} + [PX]$, e com $[PX] = f(PX)*Pt$ obtemos

$$[X]_{total} = [X]_{livre} + \left(\frac{K[X]_{livre}}{1 + K[X]_{livre}} \right) \times Pt \qquad (27)$$

A solução da equação (27) para $[X]_{livre}$ e a equação (26) foram utilizadas para ajustar os dados da figura 15, pelo método de mínimos quadrados não linear (rotina implementada no MATLAB). A linha contínua, que passa pelos pontos experimentais, representa o melhor ajuste da equação (26) aos dados. O valor médio da constante de ligação de IHP a meta hemoglobina encontrado deste ajuste para os experimentos na ausência de NaCl foi de $10^{6.1}$ M^{-1}, isto é, $K = 1{,}26 \times 10^6$ M^{-1}. Deve-se notar que esta estimativa para K representa um valor inferior para a constante de ligação de IHP à meta-Hb, pois valores de K acima deste também forneceram um bom ajuste da eq. (26) aos dados experimentais. Não foi possível fazer uma comparação do valor de K obtido para a ligação de IHP à meta-Hb com resultados da literatura, pois os dados disponíveis foram todos obtidos na presença do ânion cloreto.

O experimento de titulação descrito acima foi repetido nas mesmas condições de pH, tampão e temperatura que o anterior, mas na presença de 100 mM de NaCl. Após o mesmo tratamento descrito anteriormente para determinar as áreas correspondentes a cada etapa da titulação, construiu-se o gráfico do aumento da área do pico em 290 nm versus a razão de concentração $[IHP]_{total}/[Hb]_{tetramero}$, mostrado na figura 18.

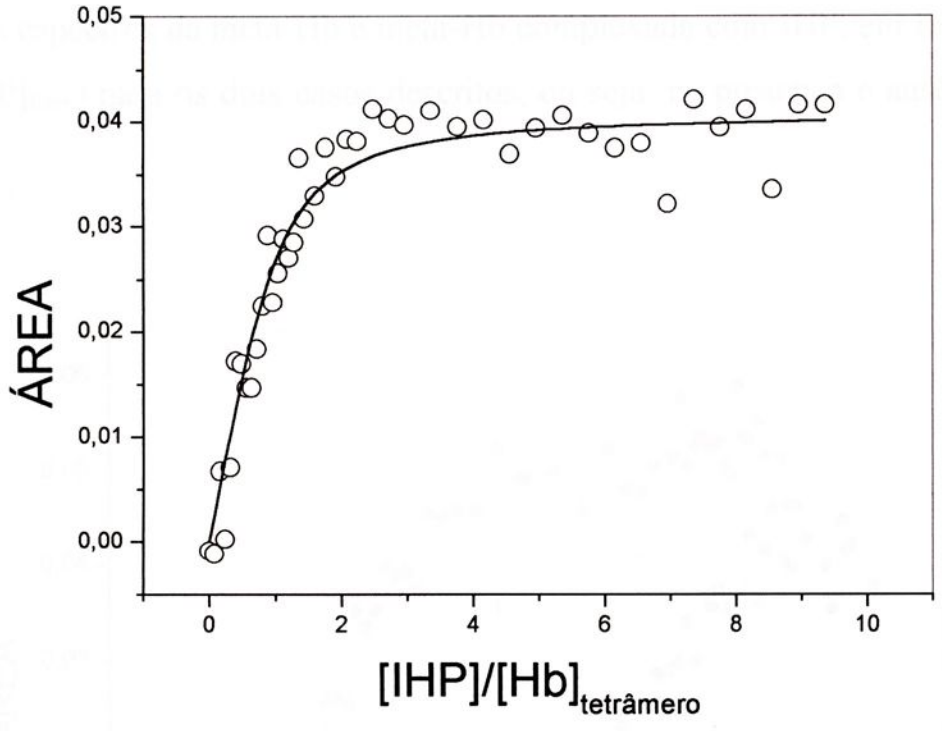


Figura 18 - Variação da área calculada a partir dos espectros de absorção medidos, em função da razão [IHP]/[meta-Hb], na presença de 100 mM de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação (26) aos dados experimentais, com K = 1,73x10^4 M^{-1}.

Nota-se neste caso, que a ligação de IHP na presença de NaCl é mais fraca que a observada na ausência de NaCl. A linha contínua que passa pelos pontos experimentais representa o melhor ajuste do modelo de ligação do IHP a um sítio de ligação da meta-Hb. O valor médio da constante de ligação nos experimentos feitos com 100 mM de NaCl foi de 1,73x10^4 M^{-1}. Este resultado encontra-se em boa concordância com valor encontrado na literatura para meta-Hb, determinados através de equilíbrio de diálise (Janig, Ruckpaul *et al.*, 1971).

Os ajustes dos dados de ligação de IHP à meta-Hb na presença e ausência de NaCl permitiu-nos avaliar as concentrações de IHP livre em cada

ponto da titulação, $[X]_{livre}$. Na figura 19 mostramos os gráficos da diferença de área dos espectros da meta-Hb e meta-Hb complexada com IHP, em função de $\log([IHP]_{livre})$ para os dois casos descritos, ou seja, na presença e ausência de NaCl.

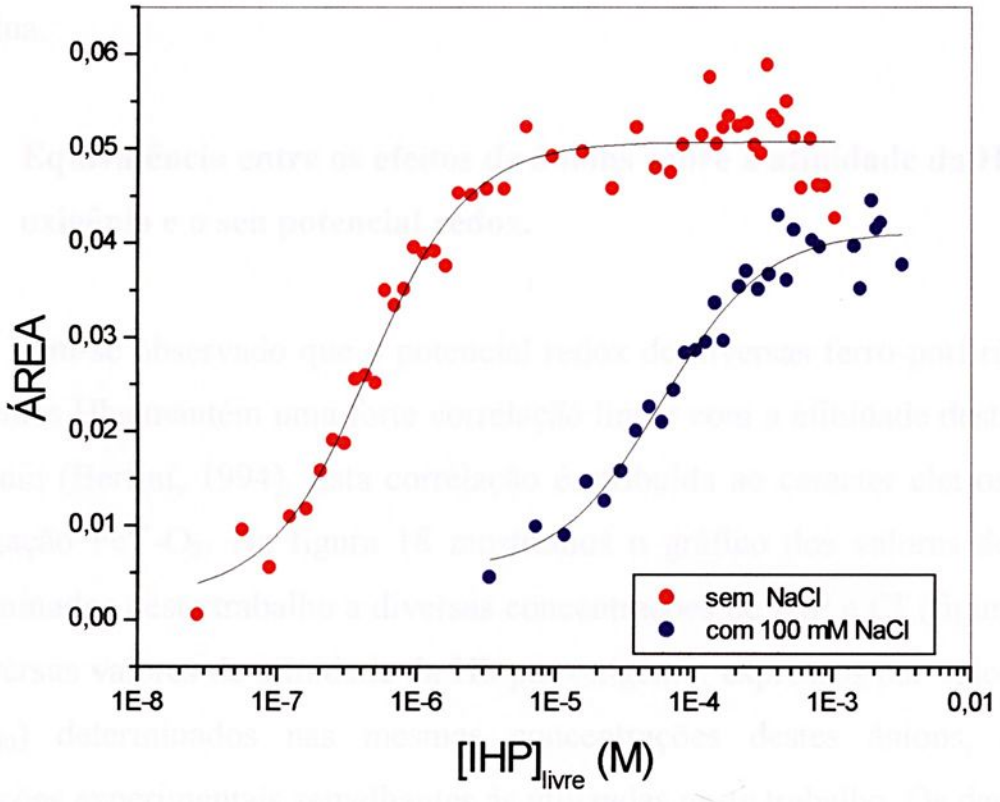


Figura 19 - Gráfico das áreas sob as curvas dos espectro diferença entre meta-Hb/meta-Hb-IHP, na ausência (•) ($K_{ass} = 1{,}26x10^6\ M^{-1}$) e presença (•) de 100 mM de NaCl ($K_{ass} = 1{,}73x10^4 M^{-1}$), em função da concentração de ligante livre em solução ($[IHP]_{livre}$).

Apesar de alguns autores sugerirem a existência de mais de um sítio de ligação para IHP na meta-Hb (Chanutin e Hermann, 1969; Desbois e Banerjee, 1975), os dados experimentais apresentados são consistentes com um único sítio de ligação.

A análise das curvas dá suporte, também, à hipótese inicial, de que a ligação de IHP a meta-Hb, induz mudanças na sua conformação quaternária, da forma R para a forma T no complexo meta-Hb-IHP. Tanto na presença quanto na ausência de 100 mM NaCl, o IHP liga-se com alta afinidade à meta-Hb, numa proporção de 1 mol de ânion para 1 mol de proteína. Esta estequiometria é aquela responsável pela mudança conformacional da proteína.

4.3 Equivalência entre os efeitos de ânions sobre a afinidade da Hb por oxigênio e o seu potencial redox.

Tem-se observado que o potencial redox de diversas ferro-porfirinas, e diferentes Hbs mantém uma forte correlação linear com a afinidade destas por oxigênio (Bertini, 1994). Esta correlação é atribuída ao caracter eletrostático da ligação Fe^{2+}-O_2. Na figura 18 mostramos o gráfico dos valores de $E_{1/2}$, determinados neste trabalho a diversas concentrações de IHP e Cl^- (figuras 9 e 10), versus valores de afinidade da Hb por oxigênio, expressos por valores de $\log(p_{50})$ determinados nas mesmas concentrações destes ânions, e em condições experimentais semelhantes às utilizadas neste trabalho. Os dados de p_{50} em função de IHP mostrados neste gráfico são os valores publicados por Janik et.al. (Janig, Ruckpaul *et al.*, 1971), e os dados de p_{50} a diversas concentrações de NaCl tem origem em nosso laboratório (Colombo e Seixas, 1999).

O gráfico mostra a alta correlação existente entre os valores de $E_{1/2}$ e $\log(p_{50})$, R=98,6%. Este gráfico também mostra que a ligação de ânions em sítios alostéricos reguladores da Hb-A_o altera equivalentemente a afinidade desta proteína por O_2 e o seu potencial redox. Isto implica que o potencial

redox da Hb também está sujeito ao controle alostérico que regula a oxigenação da proteína: a oxidação da Hb é cooperativa, i.é, o potencial de oxi-redução dos hemes diminui progressivamente a medida que o número de hemes oxidados aumenta; no caso dos ânions estudados, seu efeito sobre o potencial da reação se dá deslocando o equilíbrio alostérico da proteína por ligação diferencial às conformações quaternárias T e R. Estes resultados são consistentes com outras observações reportadas na literatura.

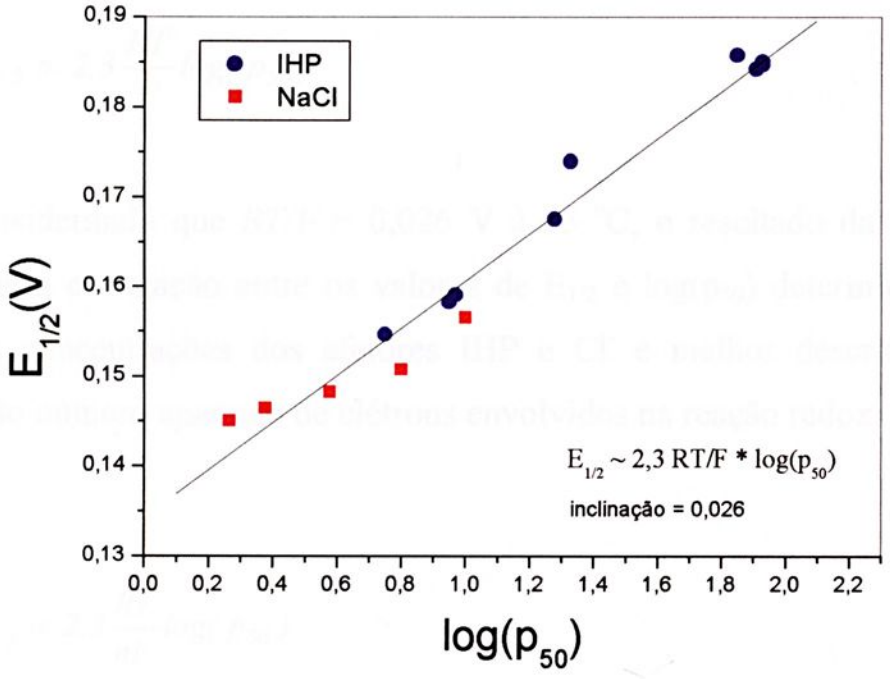


Figura 20 – Gráfico de $E_{1/2}$ versus log(p50) determinados a diversas concentrações de IHP (•) e NaCl (▪). Os valores de $E_{1/2}$ correspondem a valores mostrados nos figuras 9 e 10. Os valores de log(p50) em função da [IHP] correspondem a valores determinados por Janig, Ruckpaul *et al.* 1971, e os de log(p50) em função da [NaCl] a valores determinads por (Colombo e Seixas, 1999) . A inclinação do gráfico, determinada por regressão linear, é 0,026 +/- 0,001 V com R= 98,6%

A regressão linear que passa pelos dados experimentais mostrados na figura 20 determina a correlação quantitativa entre os valores de $E_{1/2}$ e de

$\log(p_{50})$ medidos à diferentes concentrações iônicas. Esta correlação é dada por

$$E_{1/2}(mV) = 0{,}134 + 0{,}026 \log(p_{50})$$

Esta relação é consistente com a equação proposta originalmente por Wyman (Wyman, 1964),

$$E_{1/2} \propto 2.3 \frac{RT}{F} \log(p_{50})$$

Considerando que RT/F = 0,026 V à 25 °C, o resultado da regressão sugere que a correlação entre os valores de $E_{1/2}$ e $\log(p_{50})$ determinados em diferentes concentrações dos efetores IHP e Cl^- é melhor descrita com a inclusão do número aparente de elétrons envolvidos na reação redox, n

$$E_{1/2} \propto 2.3 \frac{RT}{nF} \log(p_{50})$$

Comparando esta equação, como os valores obtidos pelo ajuste linear dos dados da figura 20, o valor de n = 2.3. Este número é consistente com a cooperatividade normalmente observada na curva de oxi-redução de Hbs (Antonini, 1964; Antonini e Brunori, 1971). Portanto, ele não se refere ao número efetivo de elétrons envolvidos na reação, 4. Este valor de n tem significado equivalente ao atribuído ao coeficiente de Hill determinado em curvas de oxigenação.

4.4 Potencial de oxi-redução ($E_{1/2}$) da HbA_o em solução com atividade de água variável, na presença e ausência de IHP.

Os resultados apresentados até aqui evidenciam que o efeito de ânions no potencial de oxi-redução da Hb ocorre via o deslocamento do equilíbrio alostérico entre as estruturas T e R da proteína, e eventual modificações nestas estruturas. Para investigar o efeito destes ânions na estrutura quaternária da Hb, e a contribuição da transição conformacional para a energética de oxi-redução, passamos a determinar a dependência do potencial redox com a atividade de água, pelo método de estresse osmótico (Colombo, Rau *et al.*, 1992). Uma série de estudos anteriores demonstraram que mudanças na atividade de água da solução, devido a adição de solutos neutros, deslocam o equilíbrio entre as espécies oxi-R e desoxi-T da Hb, em proporção à diferença de hidratação entre estes estados de conformação da proteína, conforme a equação de linkage (6)

$$\frac{d\log(p_{50})}{d\log(a_w)} = -\frac{(n_w^{oxi} - n_w^{deoxi})}{4}$$

Considerando a correlação entre $E_{1/2}$ e $\log(p_{50})$, é de se esperar que mudanças no potencial químico da água também alterem o valor de $E_{1/2}$ em proporção à diferença de hidratação entre as estruturas oxidada e reduzida da hemoglobina. Neste caso, a equação de linkage associada é dada por:

$$\frac{dE_{1/2}}{d\ln a_w} \propto \frac{RT}{F}\frac{d\log(p_{50})}{d\log(a_w)} = -\frac{RT}{F}\frac{(n_w^{oxi} - n_w^{deoxi})}{4} \qquad (28)$$

Esta expressão prediz que o potencial redox da reação deve aumentar linearmente com o decréscimo da atividade de água na solução, e em proporção à diferença de hidratação entre as espécies oxidada e reduzida. Portanto, eventuais efeitos da ligação de ânions na estrutura da Hb devem refletir variações de superfície protéica exposta ao solvente, e portanto mudanças na variação de hidratação medida.

A influência do potencial químico da água no potencial redox da Hb foi investigada medindo-se o $E_{1/2}$ de soluções contendo 50% de desoxi-Hb /50% de meta-Hb em diferentes concentrações de sacarose. Estudos anteriores mostraram que este soluto é excluído preferencialmente da superfície protéica, e seu efeito no equilíbrio da reação é indireto, via mudanças em a_w (Colombo, Rau *et al.*, 1992; Colombo e Bonilla-Rodriguez, 1996; Seixas, de Azevedo *et al.*, 1999).

A figura 21, mostra um gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\ln(a_w)$, na ausência e presença de 2 mM de IHP. Como previsto pela equação (28), o potencial redox da Hb dimuinui linearmente com o aumento da atividade de água. A inclinação destes gráficos é proporcional à variação de hidratação aparente entre os estados meta-Hb e desoxi-Hb. A inclinação negativa do gráfico implica que a ligação de moléculas de água acompanha a oxidação da proteína. Qualitativamente, este resultado é consistente com a maior área de superfície exposta ao solvente da meta-Hb em relação a desoxi-Hb, e com a maior hidratação do estado R em relação ao T, avaliado de medidas de estresse osmótico, e por medidas diretas de hidratação utilizando uma micro-balança de quartzo (Salvay, Grigera *et al.*, 2003).

unesp

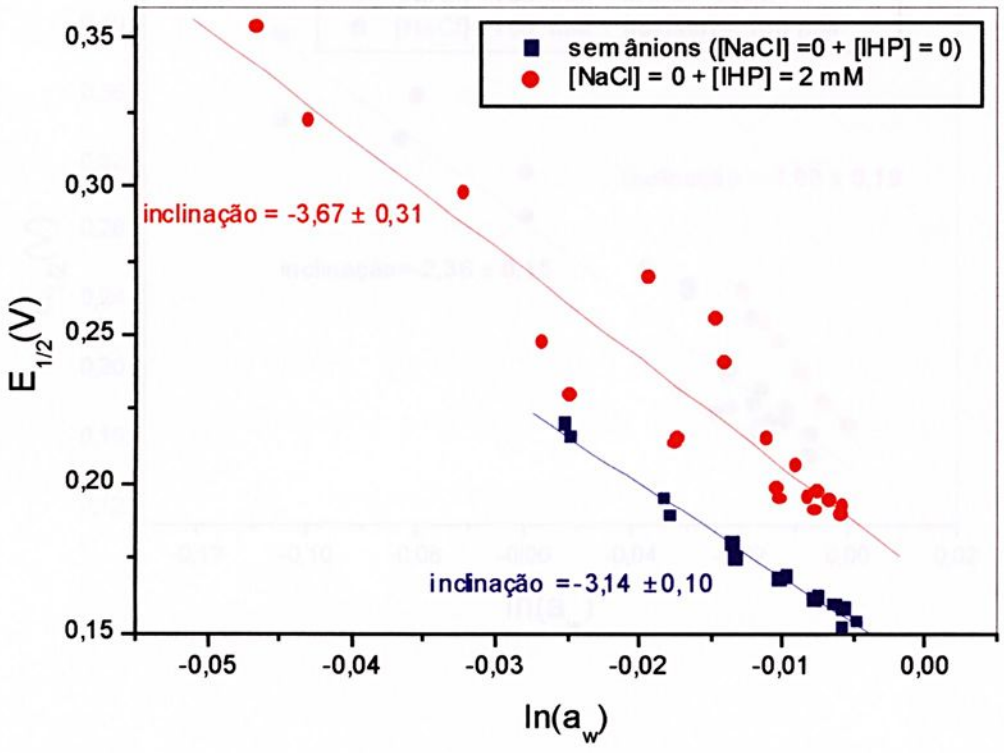


Figura 21 - Potencial de oxi-redução de HbA_o em função de $ln(a_w)$, na ausência de ânions (■) e presença de 2 mM de IHP (●). Tampão Hepes 10 mM, pH 7, 100 μM/heme de desoxi-Hb, 100 μM/heme de meta-Hb, 4% de tionina, temperatura ambiente.

A figura 22 mostra os gráficos de $E_{1/2}$ em função de $ln(a_w)$ determinados em duas condições iônicas distintas. Um dos gráficos refere-se a medidas realizadas na presença de 100 mM de NaCl e 100 mM de fosfato de sódio (referentes ao tampão), T = 30° C, e o outro a medidas realizadas na presença de 100 mM de NaCl e 2 mM de IHP.

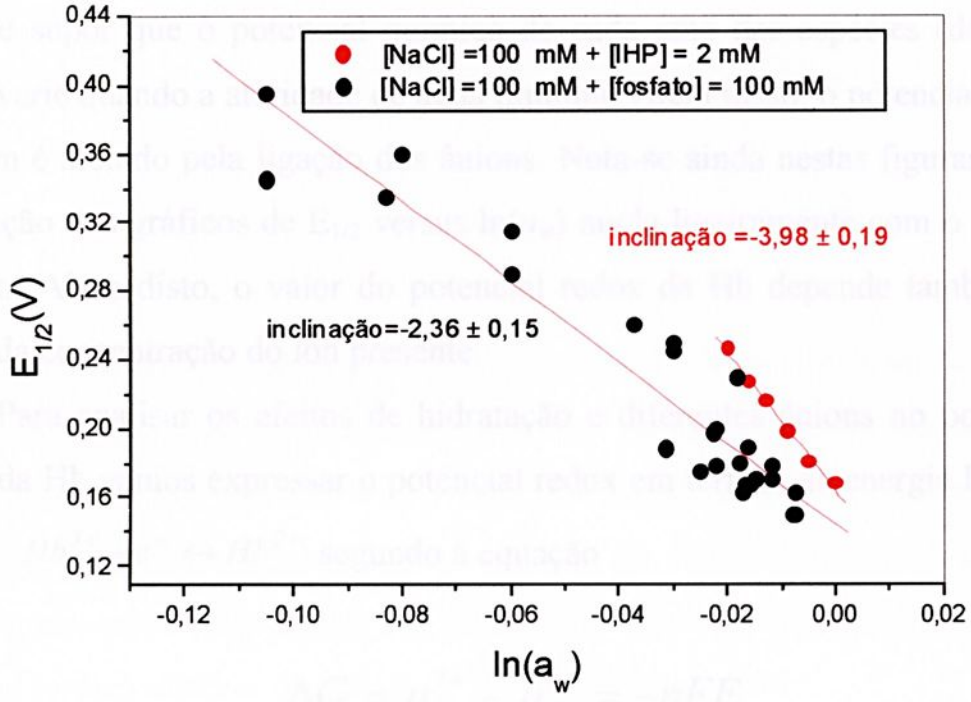


Figura 22 - Potencial de oxi-redução de HbA_o em função de $ln(a_w)$, na presença de 100 mM de NaCl (●) e presença de 100 mM de NaCl e 2 mM de IHP(●). Condições: (●) Tampão fosfato de sódio 100 mM, 100 μM/heme de desoxi-Hb + 100 μM/heme de meta-Hb, pH 7, 4% de tionina, 30°C. (●)Tampão Hepes 50 mM, pH 7, 100 μM/heme de desoxi-Hb, 100 μM/heme de meta-Hb, 4% de tionina, temperatura ambiente.

Os gráficos nesta figura, assim como o da figura 21, mostram um comportamento crescente do potencial de oxi-redução da hemoglobina, quando a atividade de água diminui. Em todos estes casos, $E_{1/2}$ é dependente da atividade de água, porque mudanças conformacionais da hemoglobina acompanham a mudança do seu estado de oxidação. Este comportamento não foi observado, por exemplo, em experimentos onde mediu-se $E_{1/2}$ da

mioglobina em função da atividade de água (Colombo, 1996). Desta forma, deve-se supor que o potencial químico de cada uma das espécies (desoxi e meta) varie quando a atividade de água diminui. Além disso, o potencial redox também é afetado pela ligação dos ânions. Nota-se ainda nestas figuras que a inclinação dos gráficos de $E_{1/2}$ versus $\ln(a_w)$ muda ligeiramente com o íon em solução. Além disto, o valor do potencial redox da Hb depende também do tipo e da concentração do íon presente.

Para analisar os efeitos de hidratação e diferentes ânions no potencial redox da Hb vamos expressar o potencial redox em termos da energia livre da reação $Hb^{3+} + e^- \leftrightarrow Hb^{2+}$ segundo a equação

$$\Delta G = \mu^{2+} - \mu^{3+} = -nFE \qquad (29)$$

onde μ^{2+} é o potencial químico da proteína no estado reduzido e μ^{3+} é o potencial químico da proteína no estado oxidado.

O próximo passo é considerar como a ligação de n_w moléculas de água e a ligação de um íon X, alteram o potencial químico destas espécies. Pode-se mostrar, usando o polinômio de ligação de Wyman (Wyman, 1964), que o potencial químico de cada espécie é dado por,

$$\mu^{2+} = \mu_o^{2+} + RT\ln(Hb^{2+}) - n_w^{2+}RT\ln(a_w) - RT\ln(1 + K^{2+} \times X) \qquad (30)$$

$$\mu^{3+} = \mu_o^{3+} + RT\ln(Hb^{3+}) - n_w^{3+}RT\ln(a_w) - RT\ln(1 + K^{3+} \times X) \qquad (31)$$

Fazendo a diferença entre (30) e (31) e dividindo tudo por $-nF$

$$\frac{\mu^{2+}-\mu^{3+}}{-nF}=\frac{\mu_o^{3+}-\mu_o^{2+}}{-nF}+\frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{Hb^{2+}}{Hb^{3+}}\right)+\frac{(n_w^{3+}-n_w^{2+})}{(-nF)}RT\ln a_w+\frac{RT}{(-nF)}\ln\left(\frac{1+K^{2+}\times X}{1+K^{3+}\times X}\right)$$

$$E=E^o+\frac{RT}{nF}ln\left(\frac{Hb^{3+}}{Hb^{2+}}\right)-\Delta n_w\frac{RT}{nF}ln\,a_w+\frac{RT}{nF}ln\left(\frac{1+K^{2+}\times X}{1+K^{3+}\times X}\right) \qquad (31)$$

A equação (31) descreve como o potencial de oxi-redução da Hb se altera com a mudança na atividade de água e com a ligação de um ânion X, com constante K^j à desoxi-Hb (j = 2+), e à meta-Hb (j = 3+). Como neste trabalho, os efeitos de hidratação e ligação de ânions sobre o $E_{1/2}$ foram investigados em condições tais que 50% da Hb se encontra na forma oxidada e 50% na forma reduzida, a equação (31) é simplificada para

$$E=E^o-\Delta n_w\frac{RT}{nF}ln\,a_w+\frac{RT}{nF}ln\left(\frac{1+K^{2+}\times X}{1+K^{3+}\times X}\right) \qquad (32)$$

Esta equação pode agora ser utilizada para analisar os efeitos de ânion e hidratação mostrados nas figuras 21 e 22. A atividade de água constante, o potencial muda devido a ligação diferencial do ânion aos estados oxidado e reduzido. Na figura 21 nota-se que as curvas de $E_{1/2}$ versus $\ln(a_w)$ medida na ausência de ânions e na presença e de 2mM IHP são aproximadamente paralelas. Segundo a equação (32), este paralelismo indica que Δn_w de oxi-redução é aproximadamente o mesmo nas duas condições experimentais. A curva medida na presença de IHP está deslocada cerca de + 40 mV daquela medida na ausência de ânions, i.é, *E(IHP)-E(0)* ~ +40 mV. Dado que Δn_w é o mesmo para as duas condições, este deslocamento deve refletir a contribuição

da ligação do IHP às formas oxidada e reduzida da proteina, que deve ser igual ao último termo da equação (32), i.é,

$$E(IHP) - E(0) \cong \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{1 + K^{2+} \times X}{1 + K^{3+} \times X}\right)$$

Tendo em conta que a constante de ligação de IHP a meta-Hb, determinado neste trabalho é da ordem de 10^6 M^{-1} , e que a constante de ligação deste íon à desoxi-Hb é pelo menos da ordem de 10^8 M^{-1} (Gray e Gibson, 1971), e também que a concentração de IHP = 2 mM, temos que

$$\frac{RT}{F} ln\left(\frac{1 + K^{2+} \times X}{1 + K^{3+} \times X}\right) \approx 120mV$$

Dado que o valor experimental de *E(IHP)-E(0)* ~ +40 mV, temos que *n*, o número aparente de elétrons envolvidos na reação, deve ser da ordem de 3. Este número é consistente com os dados experimentais.

A outra situação de aplicação da equação (32) é aquela onde a concentração de ânion é mantida constante, e a mudança do potencial redox da reação com a variação de $\ln(a_w)$ fornece o Δn_w aparente da reação. Esta análise forneceu a variação de hidratação aparente obtidas nos casos estudados, e são apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Variação de hidratação obtida de diferentes condições experimentais.

Condições experimentais	Δn_w
[NaCl]=0, [IHP] = 0	122 ± 4
[NaCl]=0, [IHP] = 2 mM	143 ± 12
[NaCl]=100mM,[fosfato] = 100mM	91 ± 6
[NaCl]=100 mM, [IHP] = 2 mM	155 ± 8

Os ajustes lineares das curvas da figura 21 apresentam inclinações similares, ou seja, a diferença de hidratação entre as medidas feitas na ausência total de ânions e as feitas na presença de 2 mM de IHP, é pequena. Deve-se notar também, que as diferenças de hidratação aparentes que acompanham o equilíbrio redox, em todos os casos estudados, são muito maiores que as obtidas na oxigenação. Isto provavelmente se deve ao fato de que o deslocamento do equilíbrio redox da Hb promove variações estruturais na proteína, e consequente reorganização das moléculas do solvente ao seu redor. A mudança do estado de oxidação do ferro também é acompanhada por mudanças na distribuição de cargas na superfície protéica, devido à liberação de prótons de Bohr, e eventual liberação de ânions ligados. Estas mudanças de estrutura e de carga da proteína levam à reorganização do solvente em contato direto com a proteína (água ligada), e provavelmente à reorganização das moléculas do solvente próximas à primeira camada de hidratação.

4.5 Equilíbrio Redox da Hemoglobina, estudado através da transferência de elétrons de Hb para o citocromo-c, em diferentes atividades de água .

Como observado nas figuras 21 e 22, o potencial de oxi-redução da Hb sofre um aumento considerável com a diminuição da atividade de água na solução, devido a adição de sacarose. Estudos anteriores também mostraram que o potencial de oxi-redução da Mioglobina, uma hemo-proteína monomérica, semelhante à cadeia β da Hb, é insensível à diminuição da atividade de água promovida pela presença de solutos (Colombo, 1996). A ausência de efeitos de água na função da Mb foi atribuida à ausência de transições alostéricas nesta proteína. Semelhante à Mb, o potencial redox de Citocromo-c também não é afetado por mudanças na atividade de água e/ou pela presença de solutos neutros na solução (De Sanctis, Maranesi *et al.*, 1996).

O Citocromo-c é uma proteína monomérica que possui massa molecular de ~ 12 KD, cuja principal função é a transferência de um elétron do citocromo-c redutase para o citocromo-c oxidase, que é uma enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons envolvida no processo respiratório da fosforilação oxidativa (Huang e Kimura, 1984). O grupo funcional do citocromo-c é uma ferro porfirina. Este grupo heme está complexado covalentemente à proteína, via ligação Fe-N_{ε} da histidina 18 e Fe-S da metionina 80 (Bertini, 1994). O citocromo-c é uma proteína altamente básica (ponto isoelétrico 10,05), cujos resíduos de lisina constituem a maior parte dos aminoacidos catiônicos. Estes resíduos de lisina formam pontes salinas com grupos carboxilatos do citocromo b_5, que também faz parte da cadeia respiratória, quando ambos se complexam. O $E_{1/2}$ do citocromo-c, medido em condições de tampão e pH semelhantes às utilizados em nossos nos

experimentos com Hb, é de 0,260 V (Lewis e Wrighton, 1981). Tomoda et.al., mostrou que ferri-citocromo-c oxida diretamente oxi-Hb e desoxi-Hb (Tomoda, Tsuji *et al.*, 1980). Dado que o potencial redox de citocromo-c é invariante com concentração de osmólitos, e que o potencial da Hb varia na presença de solutos e ânions, propomos investigar como estes agentes alteram as características da reação de transferência de elétrons entre ferri-citocromo/ferro-Hb.

Estes estudos foram realizados adicionando-se ferri-citocromo-c à solução de desoxi-Hb, e a reação acompanhada pelas mudanças espectrais na região do vísivel, que ocorrem devido à diferença dos espectros de absorção entre os estados oxidado e reduzido destas proteínas.

A figura 23 mostra um experimento típico de titulação de solução 60 μM desoxi-Hb, 100 mM NaCl, tampão fosfato, pH 7, com diferentes alíquotas de ferricitocromo-c. Nesta figura o primeiro espectro obtido, com uma banda larga centrada em λ ~550-560 nm, corresponde ao espectro puro da desoxi-Hb. Com adição de ferricitocromo-c, a desoxi converte-se em meta-Hb, com o aumento do pico em 630 nm, e ferricitocromo converte-se em ferrocitocromo, com o aparecimento do pico proeminente em ~550 nm. O pico que aparece na região de 520 nm contém contribuições dos espectros da meta-Hb e do ferricitocromo. Portanto, os picos de absorção característicos de cada espécie em solução são perfeitamente identificáveis, e o aumento do pico característico da meta-Hb (630 nm) e do pico do citocromo reduzido (550 nm) caracterizam a reação de oxidação da Hb e redução do citocromo-c. A figura 24 mostra um experimento semelhante ao da figura 23, porém na presença de 66% de sacarose.

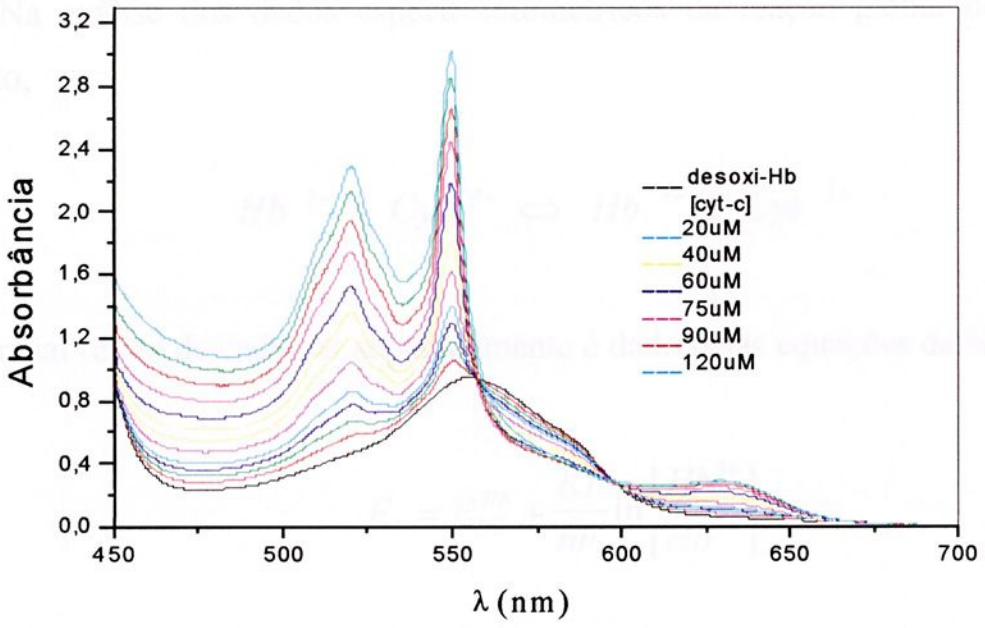


Figura 23 - Titulação de 60µM de desoxi-Hb com ferricitocromo-c, em tampão 100mM fosfato de potássio , pH 7, 100mM de NaCl, temperatura ambiente.

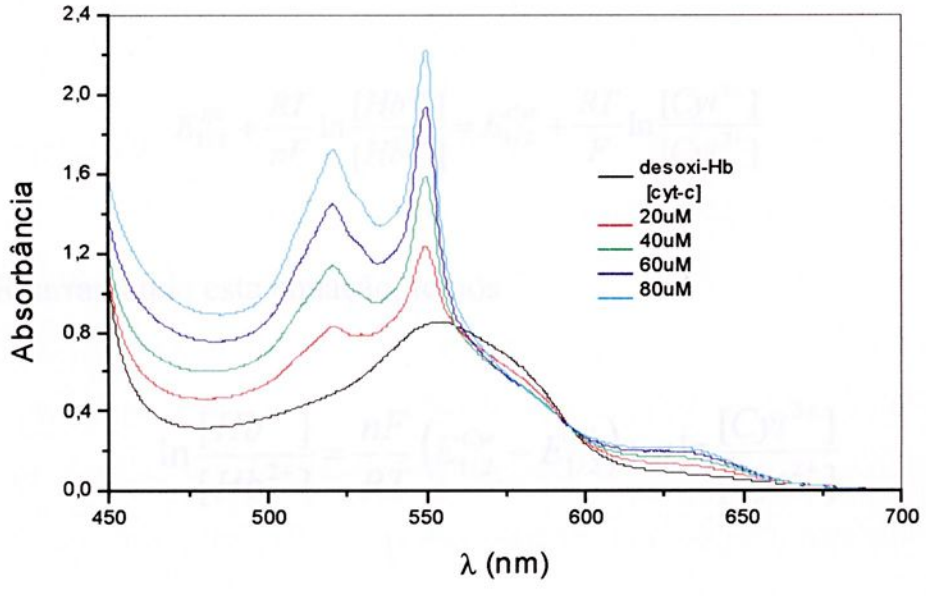


Figura 24 -Titulação de 60µM de desoxi-Hb com ferricitocromo-c, em tampão 100mM fosfato de potássio , pH 7, 100mM de NaCl, temperatura ambiente, com 66% de sacarose.

Na análise dos dados espectrofotométricos da reação global de oxi-redução,

$$Hb^{2+} + Cyt^{3+} \Leftrightarrow Hb^{3+} + Cyt^{2+} \quad (33)$$

o potencial redox de cada par separadamente é dado pelas equações de Nernst

$$E_1 = E_{1/2}^{Hb} + \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Hb^{3+}]}{[Hb^{2+}]} \quad (34)$$

$$E_2 = E_{1/2}^{Cyt} + \frac{RT}{F}\ln\frac{[Cyt^{3+}]}{[Cyt^{2+}]} \quad (35)$$

No equilíbrio, o potencial para ambos os pares é o mesmo, $E_1 = E_2$

$$E_{1/2}^{Hb} + \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Hb^{3+}]}{[Hb^{2+}]} = E_{1/2}^{Cyt} + \frac{RT}{F}\ln\frac{[Cyt^{3+}]}{[Cyt^{2+}]}$$

Rearranjando esta equação, temos

$$\ln\frac{[Hb^{3+}]}{[Hb^{2+}]} = \frac{nF}{RT}\left(E_{1/2}^{Cyt} - E_{1/2}^{Hb}\right) + n\ln\frac{[Cyt^{3+}]}{[Cyt^{2+}]} \quad (36)$$

que relaciona a razão entre Hb oxidada e reduzida à razão entre citocromo oxidado e reduzido, em função da diferença do potencial redox destes pares e do número de elétrons aparentes na reação de oxidação da Hb. Estas

constantes podem, então, ser determinadas do gráfico de $\ln([Hb^{3+}/\ Hb^{2+}])$ versus $\ln([Cyt^{3+}/\ Cyt^{2+}])$.

Com o objetivo de calcularmos as concentrações de cada uma destas espécies, em cada etapa da titulação de Hb com ferricitocromo, a partir dos espectros de absorção, determinamos inicialmente o espectro de absorção de cada espécie separadamente. Cada um dos espectros da mistura é dado, em função destes espectros das espécies puras, por

$$Abs(\lambda_1) = C_{desoxi} \times \varepsilon_{desoxi}(\lambda_1) + C_{meta} \times \varepsilon_{meta}(\lambda_1) + C_{ferri} \times \varepsilon_{ferri}(\lambda_1) + C_{ferro} \times \varepsilon_{ferro}(\lambda_1)$$

$$Abs(\lambda_2) = C_{desoxi} \times \varepsilon_{desoxi}(\lambda_2) + C_{meta} \times \varepsilon_{meta}(\lambda_2) + C_{ferri} \times \varepsilon_{ferri}(\lambda_2) + C_{ferro} \times \varepsilon_{ferro}(\lambda_2)$$

$$Abs(\lambda_3) = \cdots\cdots\cdots\cdots$$

$$\vdots$$

$$\vdots$$

$$\vdots$$

onde $C_{espécie}$ corresponde à concentração de cada espécie (*espécie = desoxi, meta, ferri, ou ferro*) , $\varepsilon_{espécie}$ (λ) corresponde aos coeficientes de extinção molar de cada espécie no comprimento de onda λ, e $A(\lambda_1)$ a absorbância da solução naquele comprimento de onda. Conhecido os espectros base, as concentrações foram calculadas resolvendo o sistema matricial pelo método de Análise de Componente Principal, implementado no MatLab. De posse das concentrações calculadas das espécies em solução, construiu-se um gráfico de $\ln \frac{[Hb^{3+}]}{[Hb^{2+}]}$ em função de $\ln \frac{[Cyt^{3+}]}{[Cyt^{2+}]}$.

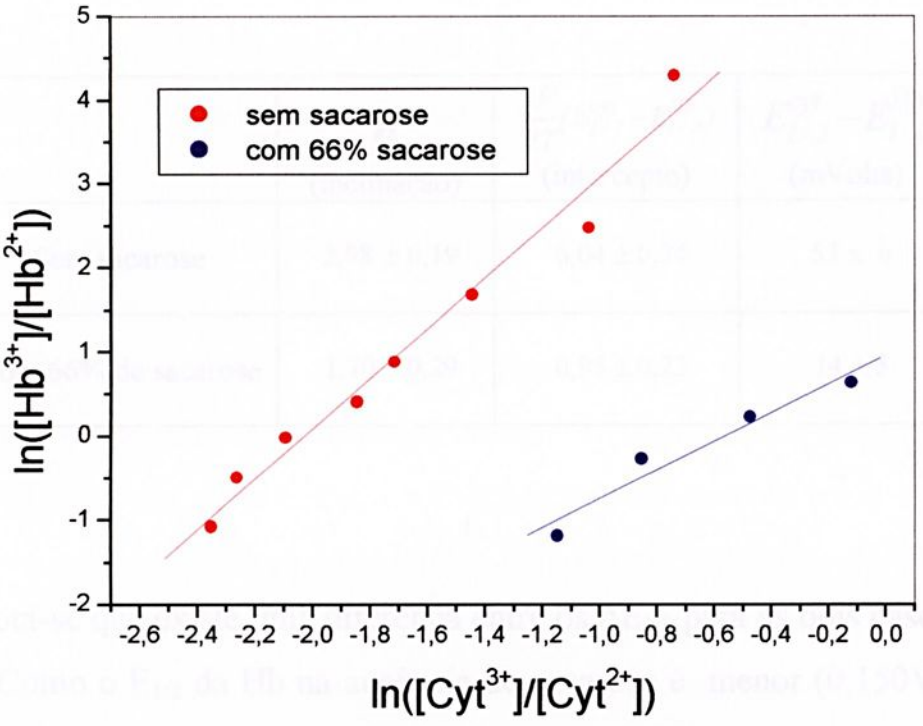


Figura 25 - Relação entre as espécies oxidada e reduzida de Hb e Cyt-c. Condições experimentais : Tampão fosfato 100 mM, NaCl 100mM, [Hb] = 60 μM, sem sacarose (•), com 66% (g/g) de sacarose (•). Temperatura ambiente.

Da equação (36), a inclinação da curva deste gráfico fornece o valor de *n*, que corresponde a cooperatividade do sistema, enquanto que o intercepto com o eixo *y* nos fornece $\frac{nF}{RT}(E_{1/2}^{Cyt} - E_{1/2}^{Hb})$

A tabela 2 nos fornece o valor das inclinações dos ajustes lineares das curvas, os interceptos das mesmas com o eixo y e o valor das diferenças entre os potenciais redox do citocromo-c e da hemoglobina.

Tabela 2- Valores estimados de *n* (cooperatividade) e $E_{1/2}$ da HbA_0 na ausência e presença de sacarose em solução.

	n (inclinação)	$\frac{nF}{RT}(E_{1/2}^{cyt} - E_{1/2}^{Hb})$ (intercepto)	$E_{1/2}^{cyt} - E_{1/2}^{Hb}$ (mVolts)
Sem sacarose	2,98 ± 0,19	6,04 ± 0,34	53 ± 6
Com 66% de sacarose	1,70 ± 0,29	0,95 ± 0,22	14 ± 5

Nota-se que existe uma diferença entre os $\Delta E_{1/2}$ para os dois casos, de ~ 40 mV. Como o $E_{1/2}$ da Hb na ausência de sacarose é menor (0,150V) que o $E_{1/2}$ na presença de sacarose, é de se esperar que a diferença $\Delta E_{1/2}$ ($E_{1/2}^{cit}$ - $E_{1/2}^{Hb}$) seja menor na presença do que na ausência deste soluto Sabendo-se que o potencial de oxi-redução do citocromo-c não é alterado quando se diminui a atividade de água (De Sanctis, Maranesi *et al.*, 1996), visto que essa é uma proteína monomérica que não está sujeita à interações entre hemes, essa diferença corresponde a quanto o $E_{1/2}$ da hemoglobina está aumentando nessa situação. A diferença de potencial entre o citocromo-c e a Hb, medida nestes experimentos, é entretanto menor que aquela esperada com base nas medidas diretas do potencial redox. Portanto a concordância é apenas qualitativa.

4.6 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hemoglobina e Citocromo-c, variando a relação [Hb]/[Cyt].

Como mostrado no ítem anterior, ferri-citocromo-c (Fe^{3+}) oxida ferro-hemoglobina (Fe^{2+}), formando ferro-citocromo-c (Fe^{2+}) e ferri-hemoglobina (Fe^{3+}). Para que ocorra transferência de elétrons entre os grupos heme destas moléculas, é necessário que ocorra primeiro a associação do citocromo à Hb tetramérica, formando um único complexo oligomérico. Mudanças terciarias e quaternárias na estrutura da Hb, induzida pela ligação de ligantes heterotrópicos, podem eventualmente alterar a constante de oligomerização entre estas proteínas, e/ou a taxa de transferência de elétrons entre os hemes, alterando a velocidade da reação. Para caracterizar a influência de ligação de ânions à essa reação, estudou-se a cinética da mesma, à diferentes razões de concentração de hemoglobina por concentração de citocromo-c e diferentes concentrações iônicas.

Como visto na figura 23, a desoxi-Hb (forma reduzida) apresenta um pico de absorção em 560 nm e praticamente não absorve na região de 630 nm. Com a adição de ferri-citocromo, a absorbância em 630 nm aumenta reportando a oxidação da Hb, e um pico de absorção proeminente em 550 aumenta de intensidade, devido à formação do citocromo-c reduzido.

A investigação das cinéticas desta reação foi realizada adicionando ~20μM de ferri-citocromo-c à desoxi-Hb e acompanhando a absorção em 550 nm em função do tempo. A taxa de variação temporal da absorbância medida é diretamente proporcional a taxa de variação da concentração de uma das espécies, pois a oxidação da Hb esta acoplada à redução do ferri-citocromo. Medindo-se a concentração de Hb por heme, tem-se que

- $d[Hb^{2+}] = d[Cyt^{2+}]$ e $d[Hb^{3+}] = -d[Cyt^{3+}]$;

Utilizando a relação acima, e a Lei de Beer-Lambert, encontra-se que a variação na absorbância em dado comprimento de onda, tendo como referência a formação da espécie Cyt^{2+}, é dado por

$$dAbs = (- \varepsilon_{desoxi} + \varepsilon_{meta} + \varepsilon_{ferro} - \varepsilon_{ferri}) * d[Cyt^{2+}]$$

onde ε_j corresponde ao coeficiente de extinção molar da espécie j no comprimento de onda λ. No comprimento de onda λ = 550 nm, o termo de proporcionalidade, $(- \varepsilon_{desoxi} + \varepsilon_{meta} + \varepsilon_{ferro} - \varepsilon_{ferri})$, entre *dAbs* e $d[Cyt^{2+}]$, é positivo. Portanto, o aumento da absorbância neste comprimento de onda reporta o aumento da concentração de Cyt^{2+}, e vice-versa.

A Figura 26 mostra uma cinética típica de transferência de elétrons da Hb para citocromo-c, em uma condição experimental ($Hb_{(heme)}$/cyt = 0,15), 100 mM tampão fosfato, 100 mM NaCl, pH 7. Nesta condição experimental, na qual há excesso de citocromo-c por heme de Hb, a cinética é descrita por uma exponencial crescente simples, como mostrado na linha contínua que passa pelos pontos experimentais.

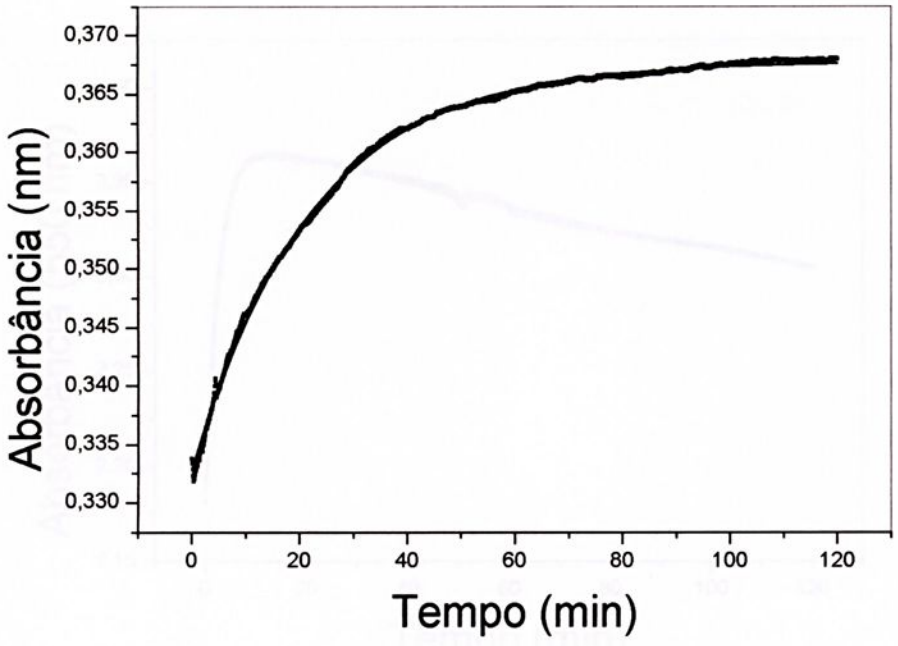


Figura 26 - Cinética de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c. [Hb(heme)]/[Cyt-c] = 0,15, 100 mM tampão fosfato, 100 mM NaCl, pH 7. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação $Y = Y_o + A(1- exp^{-x/t})$.

A figura 27 mostra uma condição experimental ($Hb_{(heme)}$/cyt) = 6,0), 100 mM tampão fosfato, 100 mM NaCl, pH 7. Nesta condição experimental, na qual há excesso de Hb por citocromo-c, a cinética é mais complexa. Na primeira fase, ocorre o aumento da [Cyt^{2+}] devido a oxidação da Hb. Esta fase é descrita por uma exponencial crescente simples. Numa segunda fase, a tempos maiores, observa-se um decréscimo consistente da absorbância indicando que parte do citocromo reduzido na primeira fase, se reoxida, portanto transferindo elétrons de volta à Hb. A linha contínua mostrada nesta figura representa o melhor ajuste da soma de uma exponencial crescente a uma decrescente.

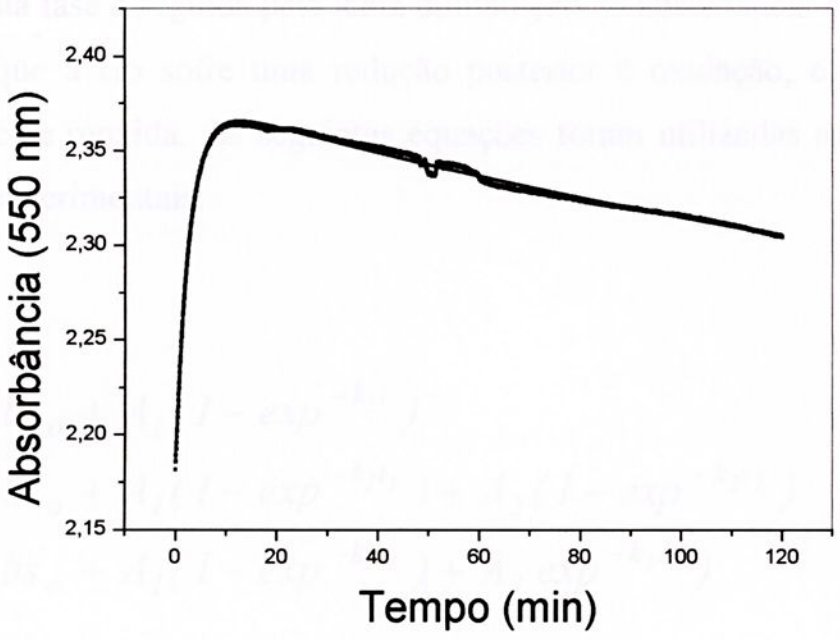


Figura 27 - Cinética de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c. [Hb(heme)]/[Cyt-c] = 6,0 , 100 mM tampão fosfato, 100 mM NaCl, pH 7. A linha contínua representa o melhor ajuste da equação $Y = Y_o + A\ (1- \exp^{-x/t1}) + A2\ (\exp^{-x/t2})$.

Os dados mostrados nas figuras 26 e 27 mostram, portanto, cinéticas de reação Hb/Cyt distintas à baixa e alta razões de concentração relativa Hb/Cyt. Medidas realizadas à diferentes concentrações relativas $Hb_{(heme)}$/citocromo-c mostraram que na presença de um excesso de citocromo-c (até [Hb]/[Cyt-c] ~ 0,5 = 1 heme/2 Cyt-c), a oxidação da Hb segue uma cinética mono-exponencial típica. Quando a razão entre as concentrações atinge 1/1, ou seja, uma molécula de citocromo para um heme de hemoglobina, a cinética de oxidação da Hb, e portanto redução do citocromo-c, passa a ser bi-exponencial. Quando se tem um excesso de hemoglobina em relação ao

citocromo, a cinética é caracterizada por uma fase inicial rápida na qual a Hb é oxidada. Esta fase é seguida pela lenta diminuição da absorbância em 550 nm, indicando que a Hb sofre uma redução posterior à oxidação, e portanto o citocromo-c se reoxida. As seguintes equações foram utilizadas na descrição dos dados experimentais:

$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t})$$
$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t_1}) + A_2(1 - exp^{-k_2 t_2})$$
$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t_1}) + A_3\, exp^{-k_3 t_3})$$

Onde *Abs* e Abs_o representam a absorção medida no tempo t e em t = 0, respectivamente. A_i mede a fração da espécie com constante de velocidade $k_i = 1/t_i$, onde t_i é a constante de tempo da reação. As constantes de velocidade k_1 e k_2, e as pré-exponenciais A_1 e A_2, correspondem ao processo de oxidação da Hb e redução do citocromo-c, enquanto k_3 e A_3, à um processo reverso, no qual ferro-citocromo se oxida e meta-Hb se reduz. A tabela a seguir fornece as constantes de velocidade e as frações das espécies, obtidas com os ajustes das curvas das cinéticas , determinados para diversas razões de concentração $[Hb]_{heme}/Cyt]$.

Tabela 3- Constantes de velocidade (k_1, k_2 e k_3) e frações das espécies, a diferentes razões $[Hb]_{heme}/[Cyt\text{-}c]$. As cinéticas nas condições Hb/Cyt:0,095 a 0,325, foram ajustadas com uma única exponencial crescente; 0,745 a 3,3 foram ajustadas com duas exponenciais crescentes; e 6,0 com uma exponencial crescente e uma decrescente. Nos dois últimos casos, as curvas foram bem ajustadas com a contribuição de 50 % de cada fator pré-exponencial (A_1 e A_2).

Hb_{heme}/Cyt	$k_1(min^{-1})$	$k_2(min^{-1})$	$k_3(min^{-1})$	$A_1(\%)$	$A_2(\%)$	$A_3(\%)$
0,095	0,068	_	_	100	_	
0,14	0,056	_	_	100	_	
0,155	0,045	_	_	100	_	
0,325	0,04	_	_	100	_	
0,745	0,066	0,018	_	50	50	_
0,95	0,13	0,018	_	50	50	_
1,72	0,195	0,049	_	50	50	_
3,3	0,265	0,084	_	50	50	_
6,0	0,34	_	0,004	50	_	50

A Figura 28 mostra o gráfico das constantes de velocidade da reação de transferência de elétrons em função da concentração relativa de Hb, medida por grupo heme, e citocromo-c. A figura 29 mostra as frações das espécies .

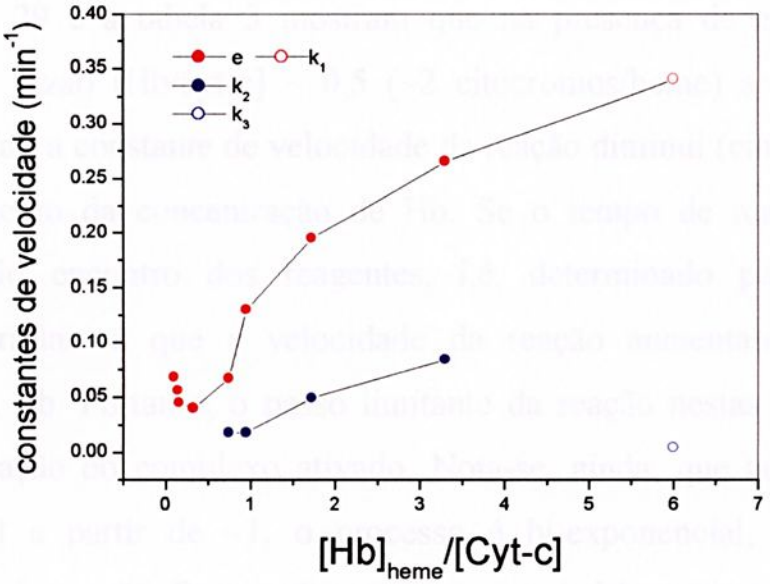


Figura 28 - Constantes de velocidade da reação de desoxi-Hb com ferri-citocromo-c, em diferentes razões de concentração [Hb]$_{heme}$/[Cyt-c]. k_1 (●,○) , k_2 (●) e k_3 (○)

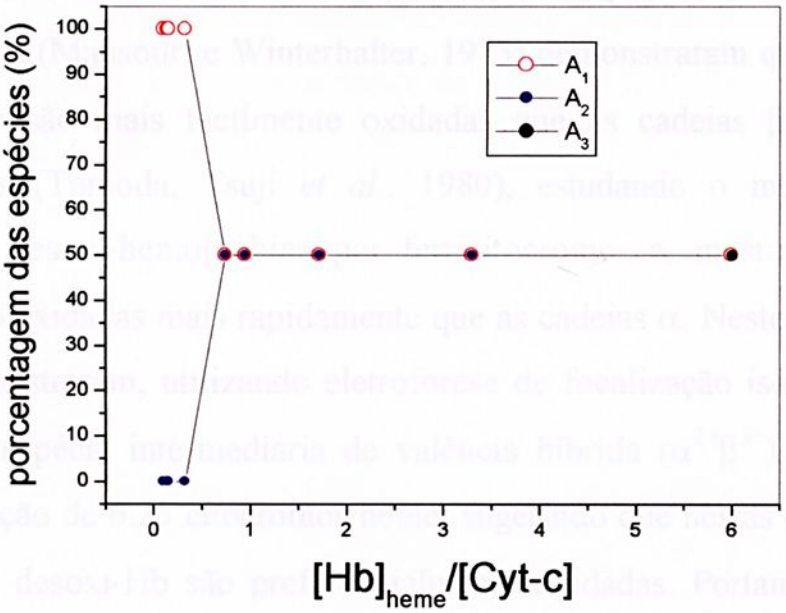


Figura 29 - Fatores pré- exponenciais da reação de desoxi-Hb com ferri-citocromo-c, em diferentes razões de concentração [Hb]$_{heme}$/[Cyt-c]. A_1 (○), A_2 (●) e A_3(●).

A figura 29 e a tabela 3 mostram que na presença de excesso de citocromo até a razão [Hb/cyt-c] ~ 0,5 (~2 citocromos/heme) a cinética é mono-exponencial, a constante de velocidade da reação diminui (cinética mais lenta) com aumento da concentração de Hb. Se o tempo de reação fosse determinado pelo encontro dos reagentes, i.é. determinado por difusão molecular, esperaríamos que a velocidade da reação aumentasse com a concentração de Hb. Portanto, o passo limitante da reação nestas condições deve ser a formação do complexo ativado. Nota-se, ainda, que aumento da razão [Hb/cyt-c] a partir de ~1, o processo é bi-exponencial, indicando heterogeneidade da reação. Para razões maiores que 1, há excesso de Hb em relação ao citocromo-c, e a oxidação do tetrâmero é parcial. Portanto, a heterogeneidade da reação pode estar associada às diferenças de velocidade de oxidação das cadeias α e β, que tem diferentes potenciais de oxi-redução aparentes dentro da molécula de hemoglobina (MacQuarrie e Gibson, 1971). Outros estudos (Mansouri e Winterhalter, 1973) demonstraram que as cadeias α da oxi-Hb são mais facilmente oxidadas que as cadeias β. Tomoda e colaboradores (Tomoda, Tsuji *et al.*, 1980), estudando o mecanismo de oxidação de desoxi-hemoglobina por ferricitocromo- c, mostraram que as cadeias β são oxidadas mais rapidamente que as cadeias α. Nestes estudos, os autores demonstraram, utilizando eletroforese de focalização isoelétrica, que apenas uma espécie intermediária de valência híbrida ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$) é produzida durante a reação de 6.25 citocromos/heme, sugerindo que nestas condições as cadeias β da desoxi-Hb são preferencialmente oxidadas. Portanto, podemos concluir que a cinética bi-exponencial observada reflete a heterogeneidade das cadeias da Hb, que possuem constantes de transferência de elétron aparentes distintas. Este comportamento é marcante à baixas razões de concentração

Hb/citocromo-c, onde os fatores pré-exponencias são iguais. Tomoda et.al., não fazem menção, entretanto, de ter observado a re-oxidação do citocromo após a primeira fase da reação, como observado neste trabalho.

4.7 Cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hemoglobina e Citocromo-c na ausência e presença de ânions.

Com o objetivo de aprofundar o estudo da reação de transferência de elétrons entre essas duas proteinas, e buscando encontrar alguma correlação entre ligação de ânions e mudança estrutural da desoxi-Hb induzida pela ligação dos ânions cloreto e IHP, foram feitas várias cinéticas mantendo a concentração de citocromo-c fixa (50 μM) e variando a concentração de Hb (50, 100 e 200 μM), ou seja, nas razões $[Hb]_{heme}/[Cyt\text{-}c]$ 1/1, 2/1 e 4/1. Estes experimentos foram feitos na presença de quatro concentrações distintas de NaCl: 0, 10, 50 e 100 mM, e na presença de 1 mM de IHP. As cinéticas foram feitas registrando o espectro de absorção em 630 nm em função do tempo.

Para descrever os dados experimentais obtidos na ausência e presença de NaCl, foram utilizadas as seguintes equações:

$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t_1}) + A_2(1 - exp^{-k_2 t_2})$$

$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t_1}) + A_3\, exp^{-k_3 t_3})$$

A primeira equação descreveu bem os dados de todas as cinéticas obtidas para a razão 1/1 e 2/1, na ausência e presença de NaCl; com duas exponenciais crescentes, com a contribuição de 50% de cada um dos fatores pré exponenciais (A_1 *e* A_2). A segunda equação foi usada para descrever os dados experimentais para a razão 4/1 e na presença de 1 mM de IHP, onde a cinética é uma soma de uma exponencial crescente e uma decrescente, com fatores pré exponenciais distintos.

Os ajustes das curvas forneceram para cada caso os valores das absorbâncias no tempo zero (Abs_o), das constantes de velocidade (k_1, k_2 e k_3) e dos fatores pré exponenciais (A_1, A_2 e A_3).

As figuras 30, 31 e 32 mostram as cinéticas de oxidação da Hb por citocromo-c nas razões [Hb]/[cit-c] = 1/1, 2/1 e 4/1 respectivamente.

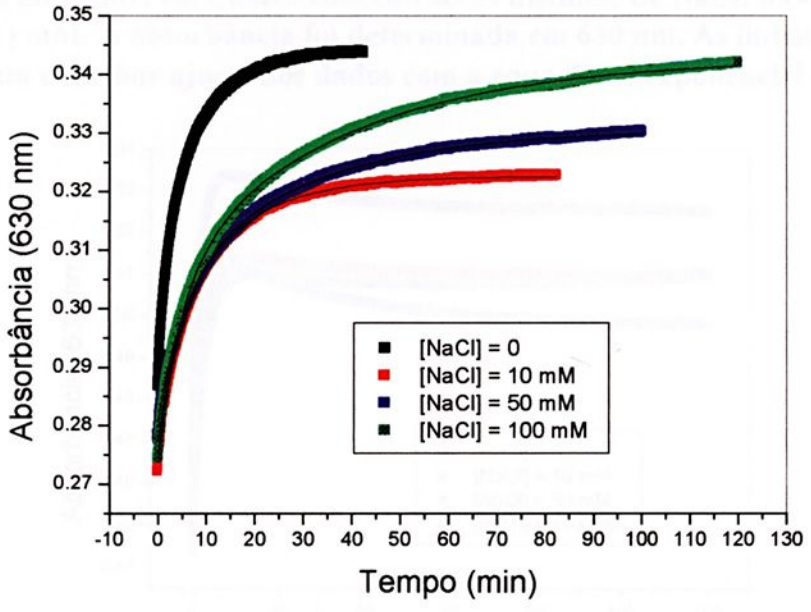


Figura 30 – Cinética de transferência de elétrons de desoxi-Hb para ferricitocromo-c na razão $[Hb]_{heme}$/[cit-c] =1/1, em 10 mM de Hepes, pH 7,0, temperatura ambiente, em quatro concentrações distintas de NaCl: 0 (▪), 10 (▪), 50 (▪) e 100 (▪) mM. A absorbância foi determinada em 630 nm. As linhas contínuas representam o melhor ajuste dos dados com a equação bi-exponencial crescente.

BIBLIOTECA

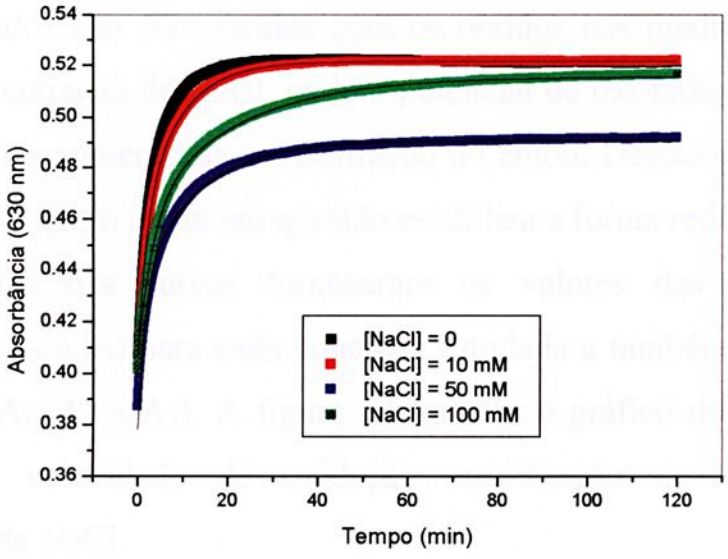


Figura 31 – Cinética de transferência de elétrons de desoxi-Hb para ferricitocromo-c na razão $[Hb]_{heme}/[cit\text{-}c]$ =2/1, em 10 mM de Hepes, pH 7,0, temperatura ambiente, em quatro concentrações distintas de NaCl: 0 (▪), 10 (▪), 50 (▪) e 100 (▪) mM. A absorbância foi determinada em 630 nm. As linhas contínuas representam o melhor ajuste dos dados com a equação bi exponencial crescente.

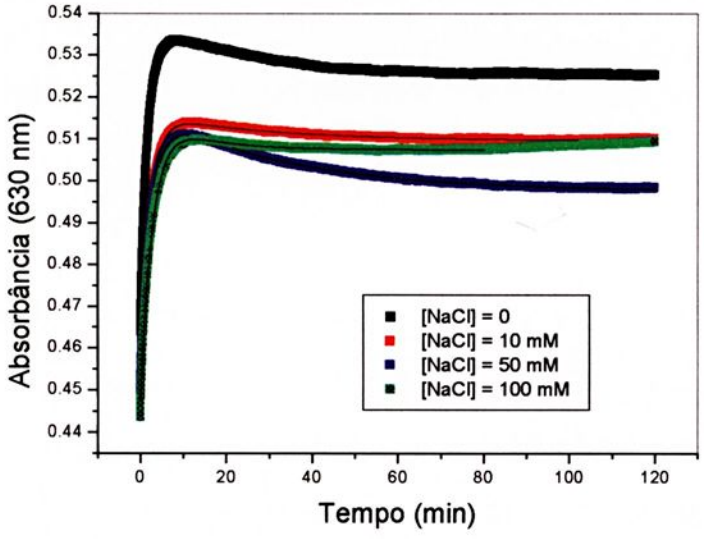


Figura 32 – Cinética de transferência de elétrons de desoxi-Hb para ferricitocromo-c na razão $[Hb]_{heme}/[cit\text{-}c]$ =4/1, em 10 mM de Hepes, pH 7,0, temperatura ambiente, em quatro concentrações distintas de NaCl: 0 (▪), 10 (▪), 50 (▪) e 100 (▪) mM. A absorbância foi determinada em 630 nm. As linhas contínuas representam o melhor ajuste dos dados com a equação bi-exponencial, uma crescente e outra decrescente.

As figuras 30, 31 e 32 mostram que em todas as razões estudadas, a oxidação da Hb por citocromo é menor na presença do que na ausência de NaCl. Estes dados são consistentes com os obtidos nas medidas de $E_{1/2}$ em função da concentração de NaCl, onde o potencial de oxi-redução da proteína aumentava com o aumento da concentração do ânion. Destes dois resultados, podemos afirmar que o ânion em questão estabiliza a forma reduzida da Hb.

Os ajustes das curvas forneceram os valores das constantes de velocidade (k_1, k_2 e k_3) para cada condição estudada e também os fatores pré exponenciais (A_1, A_2 e A_3). A figura 33, mostra o gráfico do logaritmo das constantes de velocidade de oxidação em função do logaritmo das concentrações de NaCl.

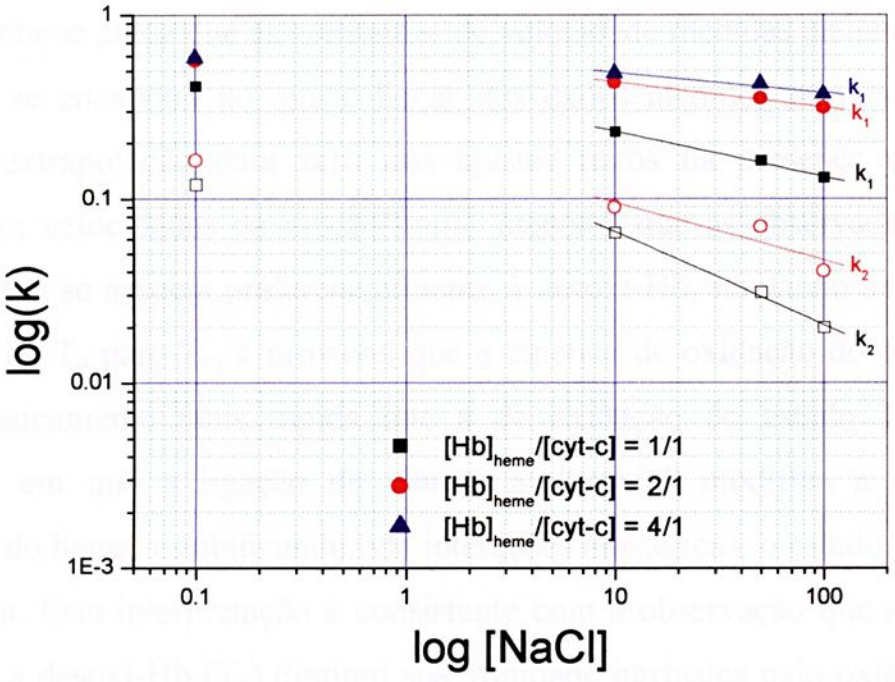


Figura 33 – Gráfico log-log das constantes de velocidade de oxidação da desoxi-Hb por ferricitocromo-c. Tampão hepes 10 mM, pH = 7,0, temperatura ambiente. Os dados foram obtidos dos ajustes não lineares dos gráficos das figuras 28, 29 e 30, sendo que para as razões 1/1 e 2/1 fez-se uso da expressão:

$y = 0{,}5(1 - e^{-k_1 \times t_1}) + 0{,}5(1 - e^{-k_2 \times t_2})$ **, onde y é a variação da absorbância normalizada, e cada processo cinético contribui com 50% da variação total. Para a razão 4/1, usou-se a expressão:**

$y = A_1(1 - e^{-k_1 \times t_1}) + A_3 \times e^{-k_3 \times t_3}$ **, com $A_1 \# A_3$.**

A inclinação dos gráficos da figura 33 mostram que para a proporção 1/1, a taxa de aumento da velocidade de reação mais lenta (k_2) é aproximadamente duas vezes mais sensível à [NaCl] do que a reação mais rápida (k_1). As equações bi-exponenciais usadas para o ajuste dos dados cinéticos e as duas constantes de velocidade distintas, são novamente indícios de que a oxidação do tetrâmero ocorre de forma parcial, com uma das cadeias sendo oxidada mais rapidamente do que a outra. Nossos resultados não nos

permite distingüir qual destas cadeias, α ou β, possui velocidade de oxidação maior . Nota-se ainda que as constantes de velocidade medidas na ausência de NaCl não se encaixam no ajuste linear dos dados medidos na presença de NaCl. A extrapolação para zero dos ajustes feitos na presença de NaCl forneceriam velocidades da reação muito menores que as observadas. Dado que o cloreto se associa preferencialmente à desoxi-Hb, mudando seu estado alostérico de T_o para T_x, é provável que a cinética de oxidação do estado T_o seja intrínsicamente mais rápida que a de oxidação do estado T_x. Isto implicaria em que a ligação de cloreto à desoxi-T modifica a estrutura eletrônica do heme, estabilizando, via interações alostéricas, o estado reduzido da proteína. Esta interpretação é consistente com a observação que a ligação de cloreto a desoxi-Hb (T_x) diminui sua afinidade intrínsica pelo oxigênio em relação a desoxi-Hb isenta de íons (T_o). A constante de velocidade k_3, permaneceu praticamente constante em todas as concentrações de NaCl estudadas (dados não apresentados).

As figuras 34, 35 e 36 mostram a cinética de oxidação de Hb por citocromo-c na ausência e presença de 1 mM de IHP, nas razões de $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1, 2/1 e 4/1, respectivamente.

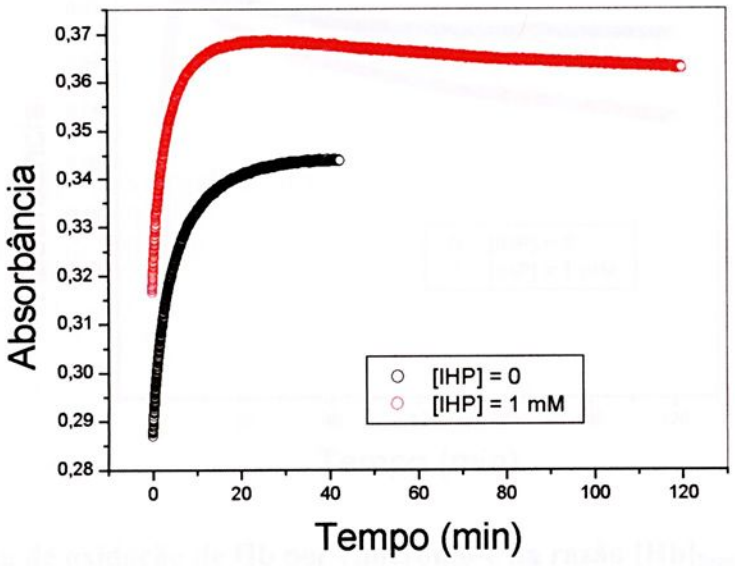


Figura 34 – Cinética de oxidação de Hb por citocromo-c na razão $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1, em tampão hepes 10 mM, pH 7.0, temperatura ambiente, na ausência (○) e presença (○) de 1 mM de IHP.

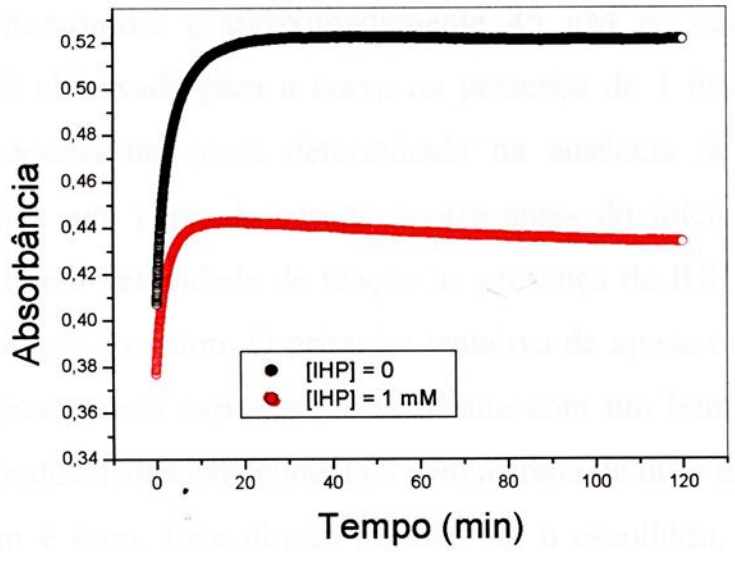


Figura 35 – Cinética de oxidação de Hb por citocromo-c na razão $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 2/1, em tampão hepes 10 mM, pH 7.0, temperatura ambiente, na ausência (○) e presença (○) de 1 mM de IHP.

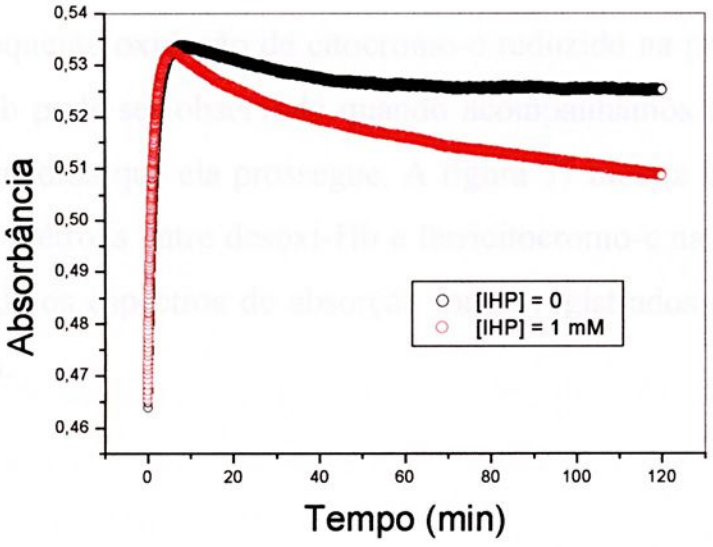


Figura 36 – Cinética de oxidação de Hb por citocromo-c na razão $[Hb]_{heme}/[cyt] = 4/1$, em tampão hepes 10 mM, pH 7.0, temperatura ambiente, na ausência (○) e presença (○) de 1 mM de IHP.

A figura 34 mostra que para a mesma concentração de hemoglobina e citocromo-c (aproximadamente 45 μM de cada uma), a absorbância inicial observada para a curva na presença de 1 mM de IHP é maior que a observada na curva determinada na ausência de IHP. Este deslocamento indica que parte da reação ocorre antes do início efetivo da medida, e sugere que a velocidade de reação na presença de IHP é maior do que aquela na ausência do ânion. O primeira tentativa de ajuste destas curvas foi realizada utilizando uma exponencial crescente com um bom ajuste. Por outro lado, o ajuste dos dados experimentais com a soma de duas exponenciais crescentes tambem é bom. Este último modelo foi o escolhido, por manter semelhança com outros resultados anteriores que sugeriram que a cinética de oxidação da Hb é bi-exponencial (tabela 3, pg 96).

Na reação de Hb/Citocromo na presença de IHP observa-se, também, que após a fase de oxidação inicial rápida, há uma reversão na direção da

reação: após cerca de 20 minutos, parte da Hb oxidada volta lentamente a se reduzir, com consequente oxidação de citocromo-c reduzido na primeira fase. Esta redução da Hb pode ser observada quando acompanhamos os espectros totais da reação a medida que ela prossegue. A figura 37 mostra uma cinética de transferência de elétrons entre desoxi-Hb e ferricitocromo-c na presença de 1 mM de IHP, onde os espectros de absorção foram registrados no intervalo entre 450 e 700 nm.

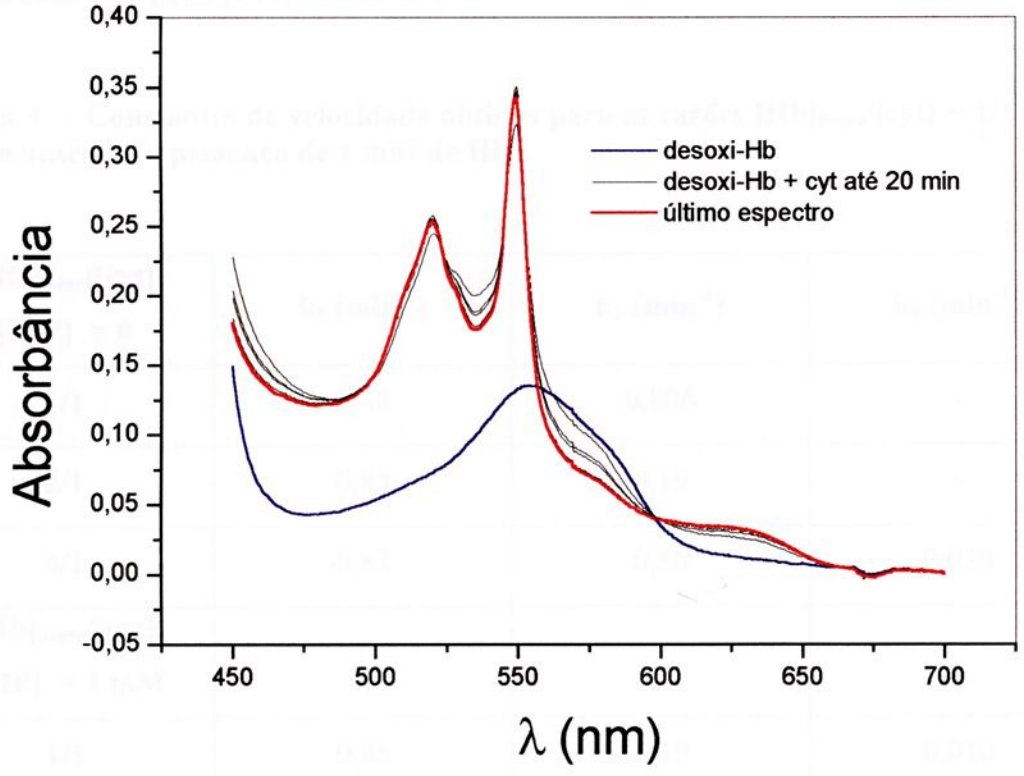


Figura 37 – Espectros de absorção de [Hb]/[Cit-c] =1/1 na presença de 1 mM de IHP. Tampão hepes10 mM, pH 7. O espectro em azul corresponde ao espectro da desoxi-Hb, os pretos correspondem aos espectros da reação da desoxi-Hb com o ferricitocromo-c até aproximadamente 25 minutos de reação e o espectro em vermelho corresponde ao último espectro registrado.

Baseados nestas considerações, os ajustes para os casos onde foi observada oxidação seguida de redução foram feitos usando a seguinte equação:

$$Abs = Abs_o + A_1(1 - exp^{-k_1 t_1}) + A_2(1 - exp^{-k_2 t_2}) + A_3(exp^{-k_3 t_3})$$

A tabela 4 apresenta os valores das constantes de velocidade obtidas pelos ajustes na ausência total de ânions e na presença de 1 mM de IHP, nas três razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$ estudadas.

Tabela 4 – Constantes de velocidade obtidas para as razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1, 2/1 e 4/1, na ausência e presença de 1 mM de IHP.

$[Hb]_{heme}/[cyt]$ [IHP] = 0	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	k_3 (min^{-1})
1/1	0,48	0,096	-
2/1	0,83	0,19	-
4/1	0,83	0,56	0,030
$[Hb]_{heme}/[cyt]$ [IHP] = 1 mM			
1/1	0,88	0,19	0,010
2/1	0,91	0,28	0,006
4/1	1,35	0,52	0,019

A figura 38 mostra um gráfico das constantes k_1 e k_2 obtidas em função da concentração de IHP.

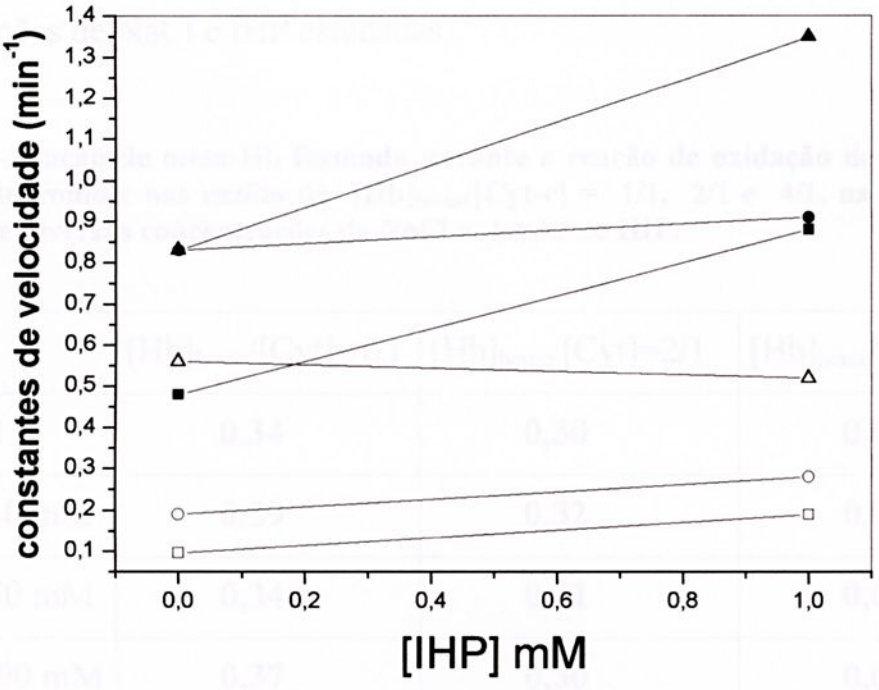


Figura 38 – Gráfico das constantes de velocidade k_1 (símbolos fechados) e k_2 (símbolos abertos) obtidas dos ajustes das curvas de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c, na ausência e presença de 1 mM de IHP para as razões $[Hb]_{heme}/[cyt]$ = 1/1 (▪) , 2/1 (●) e 4/1(▲)

A figura 38 mostra que as constantes de velocidade de oxidação k_1 e k_2 são maiores na presença do que na ausência de IHP.

A razão entre a soma dos fatores pré exponenciais ($A_1 + A_2$, para as curvas com duas exponenciais crescentes e $A_1 + A_2 - A_3$ para as curvas com duas exponenciais crescentes e uma decrescente) e o coeficiente de extinção molar da meta-Hb em 630 nm ($3,84 \times 10^{-3}$ M^{-1}), forneceu-nos a concentração de meta-Hb que foi produzida durante a reação, para cada uma das condições estudadas. Como antes de cada cinética foi registrado um espectro de absorção da Hb desoxigenada, foi possível calcular a concentração de hemoglobina

total antes da reação. De posse das concentrações de meta-Hb formada e de Hb total, calculou-se a fração de meta formada para cada caso. A tabela 5 mostra a fração de meta-Hb formada para todas as razões e todas as concentrações de NaCl e IHP estudadas.

Tabela 5 – Fração de meta-Hb formada durante a reação de oxidação de desoxi-Hb por ferricitocromo-c nas razões de $[Hb]_{heme}/[Cyt\text{-}c]$ = 1/1, 2/1 e 4/1, na ausência e presença de diversas concentrações de NaCl e 1 mM de IHP.

	$[Hb]_{heme}/[Cyt]$=1/1	$[Hb]_{heme}/[Cyt]$=2/1	$[Hb]_{heme}/[Cyt]$=4/1
[NaCl] = 0	**0,34**	**0,30**	**0,07**
[NaCl] = 10 mM	**0,29**	**0,32**	**0,07**
[NaCl] = 50 mM	**0,34**	**0,31**	**0,07**
[NaCl]= 100 mM	**0,37**	**0,30**	**0,09**
[IHP] = 1 mM	**0,15**	**0,11**	**0,06**

Uma comparação entre as figuras 33 e 38, juntamente com a tabela 5, nos mostra que a Hb possui velocidade de oxidação distinta para cada razão (1/1,2/1,4/1) e condição (Cl^- e IHP) estudada, sendo que a velocidade de oxidação aumenta com o aumento da relação Hb/Cyt e diminui com a concentração de NaCl. Porém, a fração de meta-Hb formada permanece praticamente a mesma dentro da mesma razão Hb/cyt, quando a concentração de NaCl é aumentada. Deve-se destacar que a fração de meta-Hb cai pela metade nas razões 1/1 e 2/1 quando 1 mM de IHP está presente em solução.

Uma provável explicação para a fração de meta-Hb formada durante a reação permanecer inalterada quando a concentração de NaCl aumenta,

unesp

provém do fato de que o $E_{1/2}$ do citocromo-c sofre uma diminuição no seu valor (~15 mV) quando a concentração de NaCl é aumentada de 10 para 100 mM (Battistuzzi, Loschi *et al.*, 1999) e de forma oposta o $E_{1/2}$ da Hb aumenta (~10mM) quando a concentração de NaCl aumenta de 10 para 100 mM (medidas descritas no presente trabalho). Desta forma, o efeito do ânion no $E_{1/2}$ de uma proteína anularia o efeito do mesmo no $E_{1/2}$ da outra proteína.

A fim de testarmos um provável efeito do IHP no potencial de oxi-redução do citocromo-c, acompanhamos a variação do $E_{1/2}$ de uma solução contendo 50% de ferri e 50 % de ferro- citocromo-c à medida que adicionavamos IHP. A figura 39, mostra o gráfico de $E_{1/2}$ do citocromo-c em função da concentração de IHP.

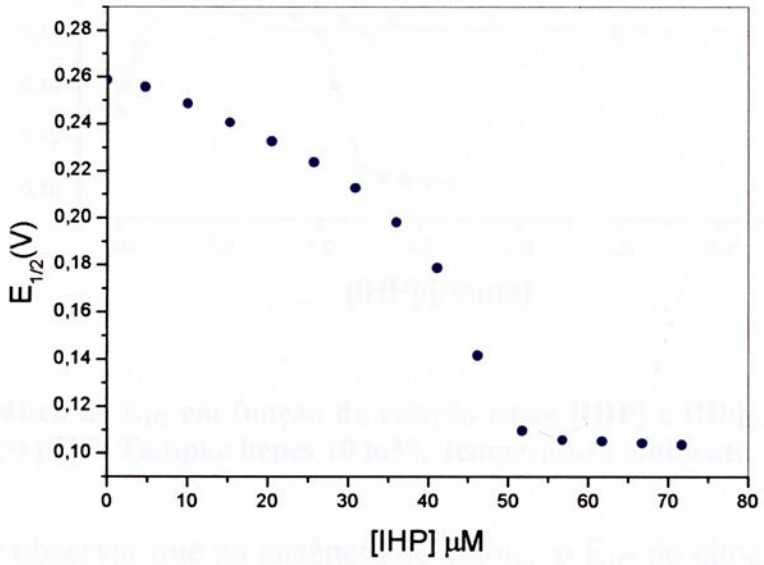


Figura 39 – Variação do $E_{1/2}$ do citocromo-c com a concentração de IHP. Solução com 50% de ferri/ 50% de ferro-citocromo-c ([citocromo total] = 50 µM) em tampão hepes 10 mM, pH 7.0, temperatura ambiente.

A figura 39 mostra que o $E_{1/2}$ do citocromo-c sofre uma diminuição de aproximadamente 160 mV, quando a concentação de IHP é aumentada de

zero à 50 μM. Nota-se também que à partir de 50 μM, o potencial de oxi-redução é estabilizado em 100 mV. A fim de compararmos o efeito do ânion IHP no $E_{1/2}$ das duas proteínas, foi feito um gráfico de $E_{1/2}$ em função da relação $[IHP]/[Hb]_{heme}$ (dados do experimento mostrado na figura 14) e [IHP]/[cyt-c] (dados da figura 39), mostrado na figura 40.

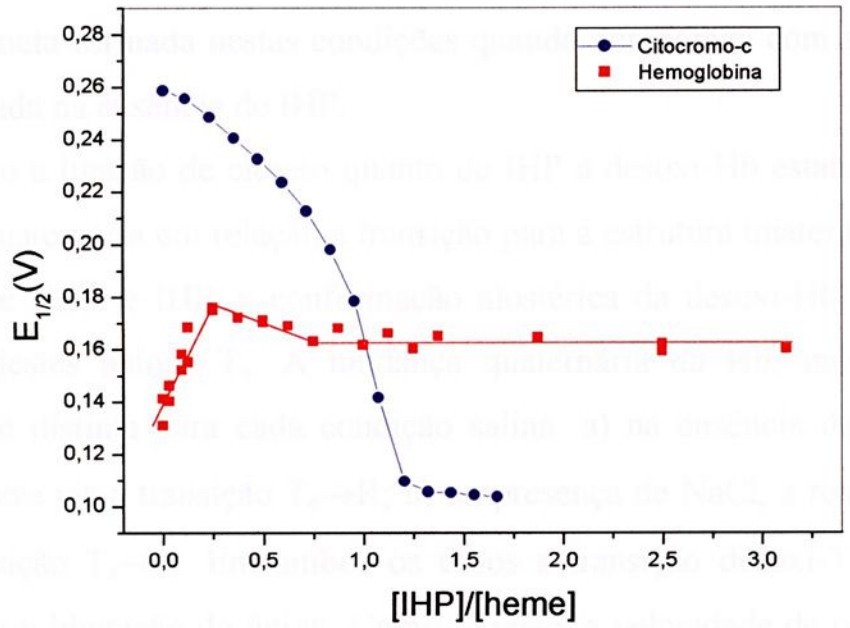


Figura 40 – Gráfico de $E_{1/2}$ em função da relação entre [IHP] e $[Hb]_{heme}$ (▪) pH 7,2 e [IHP] e [cyt-c] (•) pH 7. Tampão hepes 10 mM, temperatura ambiente.

Pode-se observar que na ausência de ânions, o $E_{1/2}$ do citocromo é muito maior que o da hemoglobina, o que faz do citocromo-c um forte oxidante para a Hb. Estes dados sugerem que há um único sítio de ligação forte de IHP ao citocromo. Com o aumento da concentração de IHP na solução, o $E_{1/2}$ da Hb aumenta até 1IHP/Hb(tetramero), decresce ligeiramente com o posterior aumento desta razão e atinge um patamar em torno de 160 mV. Já o $E_{1/2}$ do citocromo-c diminui até a razão de 1 IHP/citocromo-c e se estabiliza daí em

diante. Nesta região o $E_{1/2}$ da hemoglobina é maior que o do citocromo-c, passando a ter um maior poder oxidante que o citocromo-c. Esta reversão na diferença de potencial redox entre a Hb e o citocromo-c, induzida por IHP, pode explicar a segunda fase da reação de transferência de elétrons entre estas proteínas, na qual Hb passa a oxidar lentamente citocromo-c que foi reduzido na fase rápida da reação. Por outro lado, a menor diferença de potenciais redox entre estas proteínas observada na presença de IHP explica a menor fração de meta formada nestas condições quando comparada com a fração de meta formada na ausência de IHP.

Tanto a ligação de cloreto quanto de IHP à desoxi-Hb estabilizam esta estrutura quaternária em relação a transição para a estrutura quaternária R. Na ausência de NaCl e IHP, a conformação alostérica da desoxi-Hb é T_o, e na presença destes ânions T_x. A mudança quaternária da Hb, induzida pela oxidação, é distinta para cada condição salina: a) na ausência de ânions, a reação ocorre via a transição $T_o \rightarrow R$; b) na presença de NaCl, a reação ocorre via a transição $T_x \rightarrow R$. Em ambos os casos a transição desoxi-T – meta-R ocorre com a liberação do ânion. Como já visto, a velocidade de oxidação da Hb na ausência de NaCl é maior que na presença, sugerindo que a diminuição da velocidade de reação com a adição de NaCl se deve, inicialmente, à mudança do estado alosterico T em torno de 10 mM NaCl. Experimentos de nosso laboratório demonstraram que a 10 mM NaCl, aproximadamente 50 % da desoxi-Hb esta na conformação T_o e 50 % na conformação T_x (Colombo & Seixas, 1999). Com o posterior aumento da [NaCl] o equilibrio $T_o + nX \Leftrightarrow T_x$, está todo deslocado para a direita, e a oxidação da Hb deve ser descrita por $T_x \rightarrow R$. A diminuição das constantes de velocidade k_1 e k_2 mostrada na figura 33 deve refletir a liberação do íon cloreto nesta transição.

Na presença de 1 mM IHP e ausência de NaCl, a velocidade de oxidação da Hb por ferri-citocromo é mais rápida que na ausência destes ânions. Este comportamento confirma resultados anteriores de Tomoda e colaboradores, que observou que a reação de oxidação da Hb por ferri-citocromo-c é acelerada na presença de IHP (Tomoda, et.al. 1980). A oxidação é seguida por uma lenta e posterior redução de parte da proteína oxidada. Nossos experimentos espectrofotometricos de titulação de meta-Hb com IHP na ausência de NaCl, mostraram que o complexo meta-Hb-IHP assume a conformação quaternária T. Nossas medidas do potencial de oxi-redução em função da [IHP], mostraram que o potencial redox da Hb aumenta inicialmente com o aumento da [IHP] até atingir um valor máximo; o posterior aumento da concentração deste íon (> 1 mol.IHP/mol.Hb), induz a reversão do potencial, que dimuinui até atingir um valor intermediário. O menor valor de $E_{1/2}$ é medido na ausência de ânions, onde a transição quaternária $T_o \rightarrow R$ acompanha a oxidação da Hb. O valor máximo de $E_{1/2}$ é medido em condições tais que a oxidação da Hb induz a transição $T_x \rightarrow R$, com possível liberação do ânions ligado. O aumento da concentração de [IHP], que causa a diminuição do $E_{1/2}$ máximo, deve desfavorecer a liberação do ânion, e muito possivelmente a reação de oxidação da Hb ocorre sem a mudança quaternária, e consequentemente, sem liberação do ânion. Esta condição de excesso de [IHP], que trava a estrutura da Hb na conformação T, esteja ela oxidada ou reduzida, é a mesma condição na qual a cinética de oxidação mostrada na figura 34 foi realizada. É provavel que a ausência de mudança quaternária da Hb, na presença de IHP, seja o fator que determina a maior velocidade de oxidação da proteína por ferri-citocromo. Já a reversão atípica da direção da reação em tempos mais longos pode estar associada à diminuição da diferença

de potenciais redox entre as duas proteínas na presença de IHP, devido a ligação do ânion, tanto ao citocromo-c (diminuindo $E_{1/2}$) quanto a Hb (aumentando $E_{1/2}$).

A estrutura quaternária típica da meta-Hb é a conformação R enquanto a da desoxi-Hb é a T. Isto implica que em cada caso o heme assume uma configuração típica à estrutura quaternária e ao estado de oxidação. Caso o IHP trave a conformação da meta-Hb na estrutura quaternária T, a configuração do ferro do heme deverá encontrar-se distorcida em relação àquelas do ferro-heme na estrutura desoxi-T e do ferri-heme na estrutura R. Desta forma, a reação de oxidação da Hb, com sua estrutura quaternária travada na conformação T, pode explicar as mudanças cinéticas e de potencial redox observadas neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

Os experimentos de equilíbrio redox, espectro-fotométricos, e de cinética de oxidação da Hb por ferri-citocromo-c mostrados neste trabalho, procuraram comparar o efeito da ligação dos ânions cloreto e IHP na estrutura terciária e quaternária da Hb, a partir da perspectiva das propriedades eletrônicas do ferro do heme. A condição de referência nestes estudos é aquela na qual a Hb encontra-se na ausência de ânions. Como os trabalhos recentes de nosso laboratório evidenciaram pela primeira vez, nesta condição a desoxi-Hb assume um estado alostérico novo, distinto do estado alostérico desta espécie associada à ânions (Colombo e Seixas, 1999). Neste trabalho, investigamos como a ligação dos ânions Cl^- e IHP alteram o potencial redox da Hb e a cinética de transferência de elétrons entre Hb e citocromo-c, que são propriedades determinadas pelo estado eletrônico do heme, e que são moduladas pelas estruturas terciária e quaternária da Hb.

Demonstrou-se que a adição tanto de íons cloreto quanto de íons IHP elevam o potencial redox da Hb, figuras 11 e 12 respectivamente, em concordância com dados da literatura. Dados anteriores da literatura também sugeriam que existe um paralelismo entre o potencial redox, $E_{1/2}$, e a afinidade por oxigênio, $\log(p_{50})$, medidos para diferentes porfirinas e Hbs. Neste trabalho, pudemos demonstrar que os efeitos da ligação de Cl^- e IHP sobre $E_{1/2}$ da Hb humana estão linearmente correlacionados com o efeito destes mesmos ânions sobre a afinidade da proteína por oxigênio (figura 20). Estes ânions são efetores alostéricos, que ligam-se em sítios distintos do heme na estrutura da Hb. A mudança em $E_{1/2}$ implica que a ligação destes ânions alteram, à distância, a estrutura do heme. Dado o paralelismo entre $E_{1/2}$ e $\log(p_{50})$,

podemos concluir que mudanças na estrutura eletrônica do heme, mediada pela estrutura protéica, alteram a afinidade intrínsica da Hb por O_2.

Complementarmente, podemos interpretar as mudanças de $E_{1/2}$ induzidas pela ligação de ânions, em termos de mudanças conformacionais induzidas pela ligação de ligantes alostéricos. Os estudos anteriores do efeito da ligação de Cl^-, 2,3-DPG e IHP sobre o efeito de hidratação da Hb, medidos a partir da dependência de $\log(p_{50})$ com a atividade de água, sugeriram a exitência dos estados T_o e T_x da Hb, e mais, que a ligação de IHP à Hb, em altas concentrações deste ânion e na ausência de NaCl, induz a transição quaternária da oxi-R para a oxi-T. Dado que a meta-Hb, em condições padrões de tampão assume a mesma estrutura quaternária que a oxi-Hb (meta-R), determinamos, espectrofotometricamente, o efeito da ligação de IHP na estrutura da meta-Hb, e pudemos demonstrar que a ligação induz a transição R→T, e estabiliza a estrutura meta-T (figuras 15-16). O efeito desta transição quaternária sobre o $E_{1/2}$ da Hb pode ser observado em experimentos de equilíbrio redox em função da concentração de IHP na presença (figura 12) e ausência de NaCl (figura 14). Na presença de NaCl, o valor de $E_{1/2}$ da Hb aumenta com o aumento da [IHP], atingindo um patamar em concentrações do ânion maiores que 1 IHP/Hb, o que pode ser atribuido à ligação preferencial deste ânion à desoxi-T. Na ausência de NaCl, observou-se um aumento similar de $E_{1/2}$ até 1 IHP/Hb, seguido da diminuição gradativa deste valor para razões de IHP/Hb maiores que 1, e a estabilização de $E_{1/2}$ em um novo patamar intermediário. Concluimos que estes dados são consistentes com a estabilização da estrutura meta-T em altas concentrações de IHP. Além disso, estes dados são consistentes com dados cristalográficos, que mostram que na ausência de outros ânions, a Hb-CO-IHP encontra-se na estrutura T (Seixas, 2002). Neste complexo, a estrutura do heme apresenta-se bastante deformada

em relação àquelas estruturas que ele assume quando a Hb se encontra na conformação R, e na conformação desoxi-T.

Demonstramos tambem neste trabalho, que o potencial redox da Hb aumenta linearmente com a diminuição da atividade de água da solução. Este efeito foi atribuído à diferença de hidratação entre as estruturas desoxi-Hb e meta-Hb, tal que, a diminuição de a_w desloca o equilíbrio conformacional entre estas estruturas na direção da estrutura menos hidratada. Qualitativamente, o efeito de hidratação sobre $E_{1/2}$ é similar ao observado em experimentos de oxigenação de Hb. Quantitativamente, a sensibilidade de $E_{1/2}$ à mudanças na atividade de água foi interpretado com equações de linkage, para fornecer a diferença de hidratação entre as espécies desoxi-Hb e meta-Hb, Δn_w. O valor de Δn_w determinado à partir de $E_{1/2}$ é bastante maior que o determinado a partir da dependência de $\log(p_{50})$ versus $\log(a_w)$. A origem desta diferença não é clara. No caso de Δn_w determinado a partir da oxigenação da Hb, esta diferença de hidratação corresponde ao número diferencial de moléculas de água diretamente ligadas à oxi-Hb e à desoxi-Hb (Colombo, et.al, 1992; Salvay, et.al., 2003). Dado que um dos fatores que determina o potencial redox em reações de oxi-redução é a energia de reorganização do solvente, com reorientação de dipolos induzida pelas mudanças de carga que acompanham a reação, é possivel que um número maior de moléculas de água sintam as mudanças de carga da Hb, e assim contribuam para a maior sensibilidade de $E_{1/2}$ à mudanças no potencial químico da água.

Observamos, também, que a variação de hidratação da Hb na reação de oxi-redução varia com as condições iônicas do meio. Devido a dificuldade de se definir a extensão da estrutura da água de hidratação que contribui para o potencial redox de cada espécie conformacional da proteína, não é possível

unesp

muito de 1, i.é, para $1 \leq Hb/Cyt \leq 2$. Nestas condições, todas as cinéticas determinadas puderam ser descritas pela soma de duas exponenciais, cada uma contribuindo com 50% do processo.

Os estudos do efeito da concentração de NaCl na cinética de oxidação de Hb por citocromo-c mostraram que NaCl diminui a velocidade de reação de ambas as cadeias diferencialmente. Este efeito é cerca de duas vezes mais efetivo em uma cadeia que em outra, mostrando novamente que a heterogeneidade das cadeias é um fator importante para as características de oxidação desta proteína, e que estas velocidades respondem à presença de efetores alostéricos, como o íon cloreto.

Esta última conclusão é reforçada pelas medidas do efeito de IHP na cinética de oxidação, onde a ligação deste ânion aumenta a taxa de velocidade de reação de ambas as cadeias. Neste caso é provavel que a oxidação ocorra toda ela na conformação T da proteína. Portanto, podemos concluir que os efeitos da ligação dos ligantes heterotrópicos, cloreto e IHP, sobre a estrutura do heme, via interações alostéricas mediadas pela estrutura dos glóbulos protéicos, modulam a cinética de transferência de elétrons entre o doador (heme) e o receptor (citocromo-c).

vincular as diferenças de hidratação medidas na presença de diferentes ânions com as estruturas da Hb estabilizadas naquelas condições. A despeito disto, podemos concluir que o estado oxidado da Hb é mais hidratado que o reduzido, em concordância com outros dados funcionais e estruturais, e que a diminuição da atividade de água aumenta a estabilidade do estado funcional da proteína, o estado reduzido.

A maior estabilidade do estado reduzido da desoxi-Hb na presença de solutos neutros, como sacarose, foi confirmada por medidas de oxidação de Hb por ferri-citocromo-c (figura 25). Na presença de sacarose, o potencial de equilíbrio da mistura Hb/citocromo-c está deslocado para valores mais altos na presença que na ausência de sacarose. A princípio, os experimentos mostrados na figura 25 podem fornecer, quantitativamente, a diferença do potencial redox da Hb em relação ao potencial do citocromo-c, desde que o equilíbrio da reação seja garantido em cada ponto da titulação. Entretanto, como visto nos experimentos de cinética de transferência de elétron de desoxi-Hb para ferri-citocromo-c, esta cinética varia de maneira complexa com a concentração relativa de Hb/Cyt, e com a concentração de ânions na solução. A alta relação Hb/Cyt, a cinética é tal que após uma rápida oxidação inicial, o sistema reverte com re-oxidação de parte do ferricitocromo reduzido, e re-redução de parte da Hb oxidada na primeira fase. Estes resultados sugerem que quando há excesso de Hb em relação ao citocromo, a oxidação parcial do tetrâmero na fase inicial, leva o sistema para um ponto de oxidação além do ponto de equilíbrio final, e é seguido pela reversão em ordem de atingir o equilíbrio final. Este fenômeno pode ter sua origem na heterogeneidade das cadeias, e na diferença de velocidade de oxidação da cadeia α em relação à cadeia β.

A heterogeneidade das cadeias ficou bem caracterizada nas cinéticas determinadas em condições tais que a relação heme /citocromo-c não difere

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackers, G. K. (1998). "Deciphering the molecular code of hemoglobin allostery." Adv Protein Chem **51**: 185-253.

Ackers, G. K., M. L. Doyle, et al. (1992). "Molecular code of cooperativity in hemoglobin." Science **255**(5040): 54-63.

Antonini, E. and M. Brunori (1971). "Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands." Frontiers of biology (Amsterdam) v. 21: xx, 436.

Antonini, E., Wyman,J, Brunori,M, Taylor,JF, Rossi-Fanelli,A and Caputo, A (1964). "Studies on the Oxidation-Reduction Potentials of Heme Proteins. I. HUMAN HEMOGLOBIN." J. Biol. Chem. **239**: 907-912.

Antonini, E., Wyman,J, Moretti, R.and Rossi-Fanelli (1963b). Biochim Biophys Acta **71**: 124.

Arnone, A. and M. F. Perutz (1974). "Structure of inositol hexaphosphate-human deoxyhemoglobin complex." Nature **249**: 34-36.

Baldwin, J. and C. Chothia (1979). "Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism." J Mol Biol **129**(2): 175-220.

Baldwin, J. M. (1975). "Structure and function of haemoglobin." Prog Biophys Mol Biol **29**(3): 225-320.

Battistuzzi, G., L. Loschi, et al. (1999). "Effects of nonspecific ion-protein interactions on the redox chemistry of cytochrome c." J Biol Inorg Chem **4**(5): 601-7.

Bellelli, A. and M. Brunori (1994). "Optical measurements of quaternary structural changes in hemoglobin." Methods Enzymol **232**: 56-71.

Benesch, R. E., R. Benesch, et al. (1969). "The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration." Biochemistry **8**(6): 2567-71.

Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J., Valentine, J.S. (1994). Bioinorganic Chemistry. Mill Valley, CA.

Bonaventura, C., S. Tesh, et al. (1998). "Conformational fluctuations in deoxy hemoglobin revealed as a major contributor to anionic modulation of function through studies of the oxygenation and oxidation of hemoglobins A0 and Deer Lodge beta2(NA2)His -> Arg." Biochemistry **37**(2): 496-506.

Brunori, M., G. C. Rotilio, et al. (1971). "Evidence for cooperative effects in the oxidation of deoxyhemerythrin by ferricyanide." FEBS Lett **16**(2): 89-91.

Bucci, E., C. Fronticelli, et al. (1991). "Discontinuous release of heat at successive steps of oxygenation in human and bovine hemoglobin at pH 9.0." Biochemistry **30**(13): 3195-9.

Bucci, E., C. Fronticelli, et al. (1993). "Effect of intramolecular cosslink on the enthalpy and quaternary structure of the intermediates of oxygenation of human hemoglobin." Biochemistry **32**: 3519-3526.

Chanutin, A. and E. Hermann (1969). "The interaction of organic and inorganic phosphates with hemoglobin." Arch Biochem Biophys **131**(1): 180-4.

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

Clark, W. M. (1960). Oxidation-reduction potentials of organic systems. Baltimore,, Williams & Wilkins.

Colombo, M. B. R. (1996). Efeito de água no potencial de oxi-redução de hemoglobina humana e mioglobina equina. Departamento de Física. São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista: 63.

Colombo, M. B. R. (1996). Efeito de água no potencial de oxi-redução de hemoglobina humana e mioglobina eqüina. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto-SP, UNESP: 63.

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

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

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

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

Daugherty, M. A., M. A. Shea, et al. (1991). "Identification of the intermediate allosteric species in human hemoglobin reveals a molecular code for cooperative switching." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1110-4.

De Sanctis, G., A. Maranesi, et al. (1996). "Influence of glycerol on the structure and redox properties of horse heart cytochrome c. A circular dichroism and electrochemical study." J Protein Chem **15**(7): 599-606.

Desbois, A. and R. Banerjee (1975). "Effects of polyvalent anion binding to hemoglobin on oxygen and oxidation-reduction equilibria and their relevance to allosteric transition." J Mol Biol **92**(3): 479-93.

Fronticelli, C., E. Bucci, et al. (1988). "Modulation of oxygen affinity in hemoglobin by solvent components. Interaction of bovine hemoglobin with 2,3-diphosphoglycerate and monatomic anions." J Mol Biol **202**(2): 343-48.

Gerber, G., H. Berger, et al. (1973). "Interaction of haemoglobin with ions. Quantitative description of the state of magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bisphosphoglycerate, and human haemoglobin under simulated intracellular conditions." Eur J Biochem **38**(3): 563-71.

Gray, R. D. and Q. H. Gibson (1971). "The effect of inositol hexaphosphate on the kinetics of CO and O 2 binding by human hemoglobin." J Biol Chem **246**(23): 7168-74.

Hayashi, A., T. Suzuki, et al. (1973). "An enzymic reduction system for metmyoglobin and methemoglobin, and its application to functional studies of oxygen carriers." Biochim Biophys Acta **310**(2): 309-16.

Hill, A. V. (1910). J. Physiolog. **40**(IV-VII).

Huang, Y. Y. and T. Kimura (1984). "Thermodynamic parameters for the reduction reaction of membrane-bound cytochrome c in comparison with those of the membrane-free form: spectropotentiostatic determination with use of an optically transparent thin-layer electrode." Biochemistry **23**(10): 2231-6.

Imai, K. (1982). Allosteric effects in haemoglobin. Cambridge, Cambridge University Press.

Janig, G., K. Ruckpaul, et al. (1971). "Interaction of haemoglobin with ions binding of inositol hexaphosphate to human haemoglobin a." FEBS Lett **17**(2): 173-176.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18

Jayaraman, V., K. R. Rodgers, et al. (1995). "Hemoglobin allostery: resonance Raman spectroscopy of kinetic intermediates." Science **269**(5232): 1843-8.

Johnson, C. R., D. W. Ownby, et al. (1992). "Oxygen binding constants and stepwise enthalpies for human and bovine hemoglobin at pH 7.6." Biochemistry **31**(41): 10074-82.

Kister, J., C. Poyart, et al. (1987). "An expanded two-state allosteric model for interactions of human hemoglobin A with nonsaturating concentrations of 2,3-diphosphoglycerate." J Biol Chem **262**(25): 12085-91.

Lewis, N. S. and M. S. Wrighton (1981). "Electrochemical reduction of horse heart ferricytochrome c at chemically derivatized electrodes." Science **211**(4485): 944-7.

MacQuarrie, R. A. and Q. H. Gibson (1971). "Functional heterogeneity of the alpha and beta chains in the oxidation-reduction reaction of human hemoglobin." J Biol Chem **246**(2): 517-22.

Mansouri, A. and K. H. Winterhalter (1973). "Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation." Biochemistry **12**(24): 4946-9.

Marden, M. C., J. Kister, et al. (1988). "T-state hemoglobin with four ligands bound." Biochemistry **27**(5): 1659-64.

Mathews, C. K. v. H., K.E. (2000). Biochemistry.

Monod, J., J. P. Wyman, et al. (1965). "On the nature of allosteric transitions: a plausible model." J. Mol. Biol. **12**: 88-118.

Nelson, D. P., W. D. Miller, et al. (1974). "Calorimetric studies of hemoglobin function, the binding of 2,3-diphosphoglycerate and inositol hexaphosphate to human hemoglobin A." J Biol Chem **249**(15): 4770-5.

Perutz, M. F. (1969). "Structure and function of hemoglobin." Harvey Lect **63**: 213-61.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18

Perutz, M. F. (1970). "Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin." Nature **228**(273): 726-39.

Perutz, M. F., G. Fermi, et al. (1993). "A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin." J Mol Biol **233**(3): 536-45.

Perutz, M. F., A. R. Fersht, et al. (1974). "Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transitions in methemoglobin." Biochemistry **13**(10): 2174-86.

Perutz, M. F., D. T. Shih, et al. (1994). "The chloride effect in human haemoglobin. A new kind of allosteric mechanism." J Mol Biol **239**(4): 555-60.

Perutz, M. F., A. J. Wilkinson, et al. (1998). "The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 1-34.

Razynska, A., C. Fronticelli, et al. (1990). "Effect of temperature on oxygen affinity and anion binding of bovine hemoglobin." Biophys Chem **38**(1-2): 111-5.

Rodckey, F. L. e. B., E. G. (1950). J. Biol. Chem. **182**: 17-20.

Salvay, A. G., J. R. Grigera, et al. (2003). "The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin." Biophys J **84**(1): 564-70.

Santucci, R., F. Ascoli, et al. (1984). "Redox potentials of normal and SH(beta 93)-modified human hemoglobin. Effect of pH and D-glycerate 2,3-bisphosphate." Biochim Biophys Acta **789**(1): 20-5.

Seixas, F. A., W. F. de Azevedo, Jr., et al. (1999). "Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A(0) fully stripped of any anions." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(11): 1914-6.

Seixas, F. A. V. and M. F. Colombo (2002). A Molecular Motif for Chloride Binding in Human Hemoglobin. Hydration Foreces in Protein Folding and Protein Interactions: Osmotic and Hydrostatic Pressure Approaches., Rio de Janeiro - Brazil, Satellite Meeting of the XIV International Biophysics Congress.

Shibayama, N. and S. Saigo (2001). "Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin." FEBS Lett **492**(1-2): 50-3.

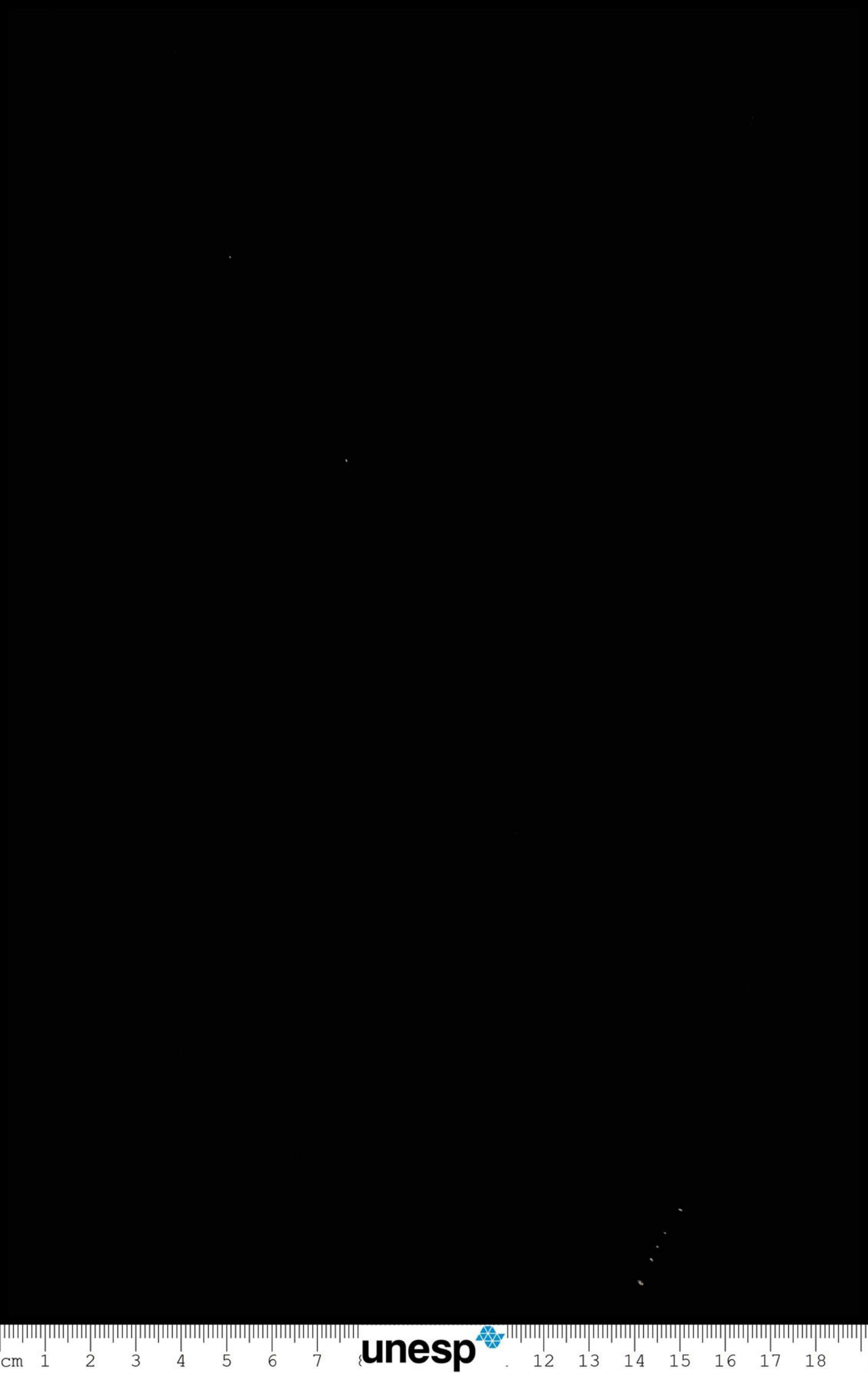
Szabo, A. and M. Karplus (1976). "Analysis of the interaction of organic phosphates with hemoglobin." Biochemistry **15**(13): 2869-77.

Tomoda, A., A. Tsuji, et al. (1980). "Mechanism of hemoglobin oxidation by ferricytochrome c under aerobic and anaerobic conditions." J Biol Chem **255**(16): 7978-83.

Williams, R. C. a. T., K. Y. (1973). Anal. Biochem. **54**: 137.

Wyman, J. (1964). Advances in Protein Chemistry **19**: 407.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18


cm 1 2 3 4 5 6 7 8 12 13 14 15 16 17 18
unesp