unesp

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Glutationa como agente alostérico em Hemoglobina Bovina, Humana e de Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces)

Evandro dos Santos Ricardi

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Glutationa como agente alostérico em Hemoglobina Bovina, Humana e de Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces)

Evandro dos Santos Ricardi

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

2008

EVANDRO DOS SANTOS RICARDI

GLUTATIONA COMO AGENTE ALOSTÉRICO EM HEMOGLOBINA BOVINA, HUMANA E DE MATRINXÂ (*Brycon cephalus*, Pisces)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, área de Biologia Estrutural junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profª. Drª. Patrícia Caetano de Souza
Professor Doutor
Faculdade de Educação, Ciências Artes
Dom Bosco- Monte Aprazível

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 30 de Junho de 2008

Ricardi, Evandro dos Santos.
Glutationa como Agente Alostérico em Hemoglobina Bovina, Humana e Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces)/Evandro dos Santos Ricardi– São José do Rio Preto : [s.n.], 2008
81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobina. 2. Glutationa. 3. Efeito Alostérico. 4. Oxigenação - Hemoglobina. I. Bonilla Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho:

À minha família, meus pais Osmar Ricardi e Geraldina dos Santos Ricardi, e meus irmãos Simone, Fábio e Rogério dos Santos Ricardi, pelo incentivo dado à todo momento.

Agradeço:

À orientação do Profº Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela oportunidade de realizarmos esse trabalho, pela paciência, dedicação, postura científica e amizade.

Ao Profº Drº Francisco Langeani Neto (coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal) e ao Prof Dr Classius de Olveira (ex-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal) pelo incentivo, dedicação ao programa e apoio aos alunos do programa.

Aos Professores Dr. Fábio Renato Lombardi e Drª Patríca Caetano de Souza pela contribuição ao trabalho durante a argüição do Exame Geral de Qualificação.

À Profª Drª Cláudia Regina Bonini Domingos e Msc. Luciana de Souza Ondei por contribuir em umas das etapas da pesquisa.

À Patrícia C. Souza e Ana L. Ferrarezi pelos ensinamentos sobre as hemoglobinas, que me ajudaram muito no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de bioquímica pela cumplicidade, pelo carinho, incentivos, ajuda, amizade e companheirismo: Rejane Yuriko Ouchi, Ana Lúcia Ferrarezi, Patrícia Peres Polizelli, Débora Okamoto, Luciana Moro, Fernanda Fachini, Bárbara Bonini, Maraíssa Franco, Lílian Caroline, Laís Mendicino, Letícia Zanphorlin, e Luciana Polotto.

Ao amigo Prof. Dr. Hamilton Cabral, pela sua colaboração, incentivo e amizade.

À técnica do Laboratório de bioquímica Eliane Ohira, pelo apoio e dedicação em nos ajudar.

À funcionária Rita Seixas pelo auxílio e dedicação.

Aos amigos e companheiros Vitor Thomazine, Aline Cristina Ferreira Rodrigues e Leide Daiana de Castro.

A todos os companheiros do programa de pós-graduação em Biologia Animal.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Agradeço à Deus pela vida.

"A alegria que se tem em pensar e
aprender faz-nos pensar e
aprender ainda mais."
(Aristóteles)

RESUMO

A Glutationa (GSH) é um tripeptídeo presente nas células, que em sua forma reduzida age como antioxidante, mantendo os grupamentos tiólicos nas proteínas em estado reduzido. Ao exercer função protetora, a glutationa é oxidada para sua forma dissulfeto, expondo quatro cargas negativas. A glutationa oxidada (GSSG) poderia interagir não covalentemente com moléculas capazes de ligar ânions, como a hemoglobina. Essa condição nos levou a investigar as possíveis mudanças estruturais e funcionais das hemoglobinas bovina, humana e majoritária do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) quando interagem alostericamente com a glutationa. As amostras de sangue bovina e humana foram purificadas e submetidas à eletroforese para verificação de pureza. As propriedades de ligação com oxigênio e controle alostérico foram analisados por tonometria a 20°C, calculando a afinidade de ligação com o O_2 e a cooperatividade (n_{50}). As condições experimentais adotadas foram, *stripped*, cloreto e glutationa oxidada (GSSG), nessas condições, as hemoglobinas bovina e humana apresentaram efeito Bohr alcalino. O cloreto induziu o maior efeito de diminuição da afinidade em praticamente todas as condições. As hemoglobinas apresentaram processo cooperativo de ligação de oxigênio, em todas as condições e em toda faixa de pH. No caso da hemoglobina bovina adulta, a GSSG aumentou a afinidade por O_2, em toda a faixa de pH testada, enquanto para a humana isso ocorreu abaixo de pH 7,0. O cloreto capaz de diminuir a afinidade de forma efetiva em todas as condições. A hemoglobina bovina apresentou uma menor afinidade de ligação ao oxigênio em relação à hemoglobina humana. A glutationa oxidada atuou como efetor alostérico heterotrópico em hemoglobinas humana, bovina e matrinxã (Hb-II), aumentando a afinidade de ligação por oxigênio da hemoglobina. Entretanto, a glutationa na forma reduzida (GSH) diminui a afinidade das hemoglobinas humana e bovina pelo oxigênio. Assumimos a existência de um sítio de ligação para a GSSG, que estabilizou a estrutura das hemoglobinas no estado R, aumentando então, a afinidade de oxigenação, enquanto a GSH estabilizou a estrutura de menor afinidade de oxigenação (estado T).

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is an intracellular tripeptide, which in its reduced form acts as an antioxidant, keeping the cysteines in the reduced state. When exerting protective function, glutathione is oxidized to form its disulfide, exposing four negative charges. The oxidized glutathione (GSSG) could interact with molecules covalently able to bind anions, such as hemoglobin. That motivated us to investigate the possible structural and functional changes of bovine, human and a fish hemoglobin from the fish 'matrinxã' (*Brycon cephalus*) when they interact allosterically with glutathione. Samples of human and cattle blood were purified and subject to electrophoresis to verify their purity. The functional properties of oxygen binding and allosteric control were analyzed by the tonometric method at 20°C, calculating the affinity of O_2-binding and cooperativity (n_{50}). The tested experimental conditions involved hemoglobin in the absence (stripped) and in the presence of chloride and oxidized glutathione (GSSG). Under those circumstances, the human and bovine hemoglobins displayed an alkaline Bohr effect. Chloride induced the greatest effect of reducing affinity in all conditions. For all the experimental sets oxygen binding was cooperative. For bovine adult hemoglobin GSSG increased O_2-affinity for all the tested pH values, whereas it occurred for human Hb for pH values above 7.0. Bovine Hb displayed lower O_2-affinity than its human counterpart. Oxidized glutahione acted as a heterotropic allosteric effector in all the tested hemoglobins, increasing O_2-affinity. However, GSH decreased O_2-affinity of human and bovine Hbs. We assume that there is a binding site for GSSG at the R state, increasing O_2-affinity, and another one for GSH at the T state, stabilizing its conformation and therefore lowering O_2-affinity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01
1.1 Glutationa..... 02
1.2 Hemoglobina..... 08
1.2.1. Modelos Alostéricos..... 14
1.2.2. Alosteria Homotrópica..... 17
1.2.3. Alosteria Heterotrópica..... 20
1.2.3.a. Efeito Bohr..... 20
1.2.3.b. Efeito do íon cloreto..... 22
1.2.3.c. Efeito dos Fosfatos Orgânicos..... 23
1.3. Espécies de hemoglobinas estudadas..... 24

2. OBJETIVOS..... 27
2.1 Objetivos Gerais..... 28
2.2 Objetivos Específicos..... 28

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 29
3.1. Coleta das amostras de sangue..... 30
3.2. Procedimento de purificação..... 30
3.3. Verificação da pureza das amostras..... 31
3.4. Estudo das propriedades funcionais de ligação de O_2 em Hemoglobina Humana e Bovina..... 32
3.5. Cálculo da concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina..... 36
3.6. Titulação com Glutationa Oxidada..... 37
3.7. Titulação com Glutationa Reduzida..... 37
3.8. Análise espectral da transição T-R..... 38
3.9. Bloqueio da cisteína β93 na Hemoglobina..... 38

4. RESULTADOS..... 39
4.1. Pureza das amostras..... 40
4.2. Estudo funcional- Efeito Bohr..... 42
4.2.a. Hemoglobina Humana..... 42
4.2.b. Hemoglobina Bovina..... 46
4.2.c.Titulação com Glutationa Oxidada..... 50
4.2.d.Titulação com Glutationa Reduzida..... 55
4.2.e. Análise espectral de transição T-R..... 58
4.3. Bloqueio da cisteína β93 na Hemoglobina..... 59

5. DISCUSSÃO..... 62
5.1. Propriedades Funcionais..... 63

6. CONCLUSÃO..... 68

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 70

8. ANEXOS..... 77
8.1. Pressão atmosférica corrigida..... 78
8.2. Pressão de vapor..... 80
8.3. Coeficiente de extinção determinados para hemoglobina..... 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da Glutationa..... **2**

Figura 2. Estruturas da Glutationa Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG)..... **3**

Figura 3. Ilustração da Interconversão da Glutationa..... **4**

Figura4. Ilustração de Conjugação com Glutationa..... **5**

Figura 5. Diferentes tipos de glutationilação de hemoglobina nos eritrócitos..... **8**

Figura 6. Ilustração da estrutura quaternária da Hemoglobina Humana..... **9**

Figura 7. Esquema do grupo heme..... **10**

Figura 8. Grupo Prostético heme com átomo de Fe^{2+}..... **11**

Figura 9. Mudanças na estrutura quaternária na hemoglobina..... **12**

Figura 10. Esquema representando a movimentação da hemoglobina na transição do estado T para R..... **13**

Figura 11. Modelo de simetria do alosterismo ou modelo de Monod, Wyman e Changeux (MWC)..... **15**

Figura 12. Modelo seqüencial proposto pr Koshland, Nemethy e Filmer (KNF) para a cooperatividade..... **16**

Figura 13. Gráfico de Hill..... **19**

Figura 14. Efeito do pH e da concentração de CO_2 na afinidade da hemoglobina ao oxigênio..... **22**

Figura 15. Ilustração do sítio de ligação do 2,3 BPG na desoxi-hemoglobina..... **24**

Figura 16. Ilustração da Glutationa Oxidada..... **26**

Figura 17. Fotografia de um tonômetro..... **33**

Figura 18. Padrão eletroforético da Hemoglobina Humana..... **40**

Figura 19. Perfil cromatográfico da hemoglobina humana majoritária..... **41**

Figura 20. Padrão eletroforético da Hemoglobina Bovina..... **42**

Figura 21. Gráfico do efeito Bohr da hemoglobina humana Hb A_0 ($logP_{50}$ *versus* pH, a 20°C)..... **43**

Figura 22. Gráfico da cooperatividade da hemoglobina humana Hb A_0 (n_{50} *versus* pH, a 20°C)..... **44**

Figura 23. Gráfico do efeito Bohr da hemoglobina bovina Hb Bv-B ($logP_{50}$ *versus* pH, a 20°C)..... **47**

Figura 24. Gráfico da cooperatividade da hemoglobina bovina Hb Bv-B (n_{50} *versus* pH, a 20°C)..... **48**

Figura 25. Gráfico ilustrando efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb A_0 (humana adulta) em pH 7,5..... **51**

Figura 26. Gráfico ilustrando efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb Bv B (bovina adulta) em pH 7,5..... **52**

Figura 27. Ajuste da ligação de GSSG à hemoglobina humana a 20°C em pH 7,5..... **53**

Figura 28. Gráfico ilustrando efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb-II (matrinxã) em pH 7,5..... **54**

Figura 29. Gráfico ilustrando efeito da concentração da Glutationa Reduzida (GSH) na afinidade por oxigênio da Hb A_0 (humana adulta) em pH 7,5..... **56**

Figura 30. Gráfico ilustrando efeito da concentração da Glutationa Reduzida (GSH) na afinidade por oxigênio da Hb Bv B (bovina adulta) em pH 7,5..... **57**

Figura 31. Transição T-R da Hb A_0 (humana adulta)..... **58**

Figura 32. Transição T-R da Hb Bv-B (bovina adulta)..... **59**

Figura 33. Padrão eletroforético da Hb A_0 na presença de GSH, GSSG e IAA..... **60**

Figura 34. Padrão eletroforético da Hb Bv-B na presença de GSH, GSSG e IAA..... **61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ilustra os valores da P_{50} para Hemoglobina Humana em diferentes pH, nas condições *stripped* e GSSG 1mM, a 20°C..... **46**

ABREVIAÇÕES E SIMBOLOGIAS UTILIZADAS

ADA	Ácido N-(2-acetamida)-iminodiacético
ATP	Adenosina trifosfato
BPG	2,3-Bifosfoglicerato
CO_2	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
Hb A_0	Hemoglobina humana majoritária (adulta)
Hb Bv	Hemoglobina bovina (adulta)
HEPES	Tampão Ácido (2-hidroxietil) Piperazina-N-(2-etano Sulfônico)
H^+	Próton hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IAA	Iodoacetamida
IPP	Inositol Pentafosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
n_{50}	Coeficiente de Hill (cooperatividade)
P_{50}	Pressão de oxigênio necessário para saturar metade dos sítios de ligação de oxigênio da hemoglobina
pO_2	Pressão parcial de oxigênio (mm Hg)
TAPS	Tampão Ácido (N-Tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfônico
Tris	Tampão TRIS(hidroximetil)aminometano

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- Glutationa

A glutationa é um tripeptídeo de ocorrência comum; ela tem uma importância fisiológica considerável porque neutraliza agentes oxidantes, como o radical hidroxila ($OH^{-\bullet}$) e oxigênio único ($^1O_2$) (CAMPBELL, 2003; OGA, 2003), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (ROVER et al, 2001). Em termos da composição, ela é a γ-glutamil-L-cisteinilglicina (CAMPBELL, 2003).

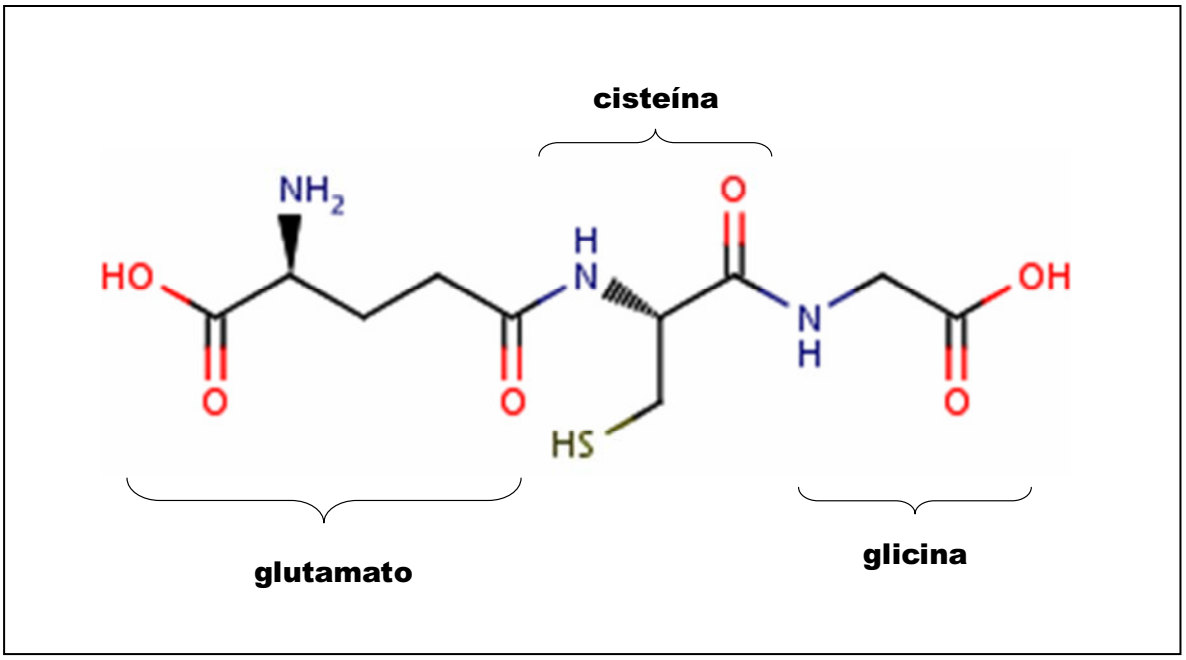


Figura 1. Estrutura química da Glutationa (γ-glutamil-L-cisteinilglicina (fonte:http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/gen_metab_summary_5.php?molName=L_glutathione_reduced).

A primeira etapa da síntese da glutationa é a formação de uma ligação peptídica incomum entre a carboxila γ do glutamato e a amina da cisteína, em uma reação catalisada pela *γ- glutamilcisteína sintetase*. A formação dessa ligação peptídica requer a ativação da carboxila γ, que é realizada por ATP. O acilfosfato resultante é, então, unido à amina da

cisteína. Na segunda etapa, que é catalisada pela *glutationa sintetase*; o ATP ativa a carboxila da cisteína para capacitá-la a condensar com a amina da glicina (STRYER, 2004).

A glutationa está presente em elevadas concentrações nas células dos mamíferos e demais vertebrados. Em condições normais há amplo predomínio da forma reduzida (~99%) (GSH), junto a quantidades menores de forma oxidada (~1%) (GSSG) (WILHELM et al, 2000).

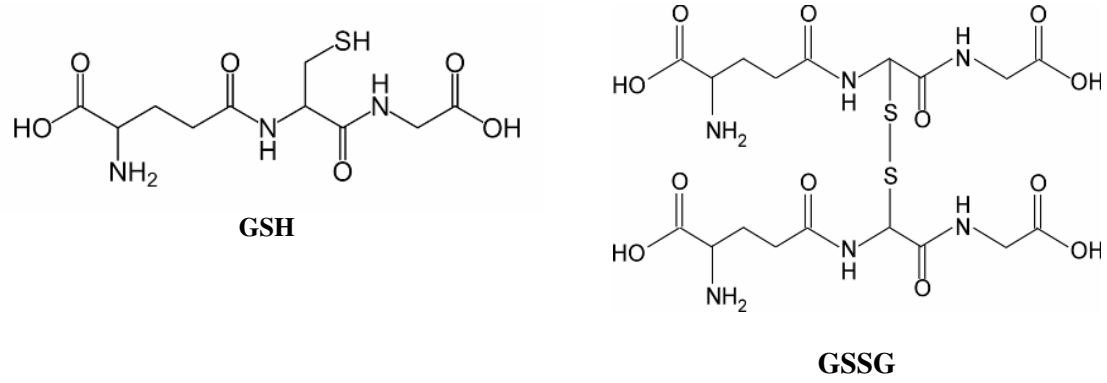


Figura 2. Estruturas da Glutationa Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG) (fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Glutathione-skeletal.png).

A glutationa reduzida (GSH) está envolvida em vários sistemas antioxidantes nas hemácias, onde age como um tampão sulfidrila mantendo os grupamentos tiólicos das proteínas e enzimas em estado reduzido. Em condições normais, quando as proteínas são expostas ao O_2, seus grupamentos sulfidrila podem oxidar, gradativamente, para formar pontes dissulfetos, intramolecular ou intermolecularmente com outras proteínas. A GSH reverte de forma não enzimática estas reações, levando à regeneração da forma ativa da enzima. Durante o curso de suas funções protetoras, a GSH é oxidada em sua forma dissulfeto, GSSH que, então, é regenerada pela ação da enzima glutationa redutase

dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) (BAYNES & DOMINICZAK, 2000).

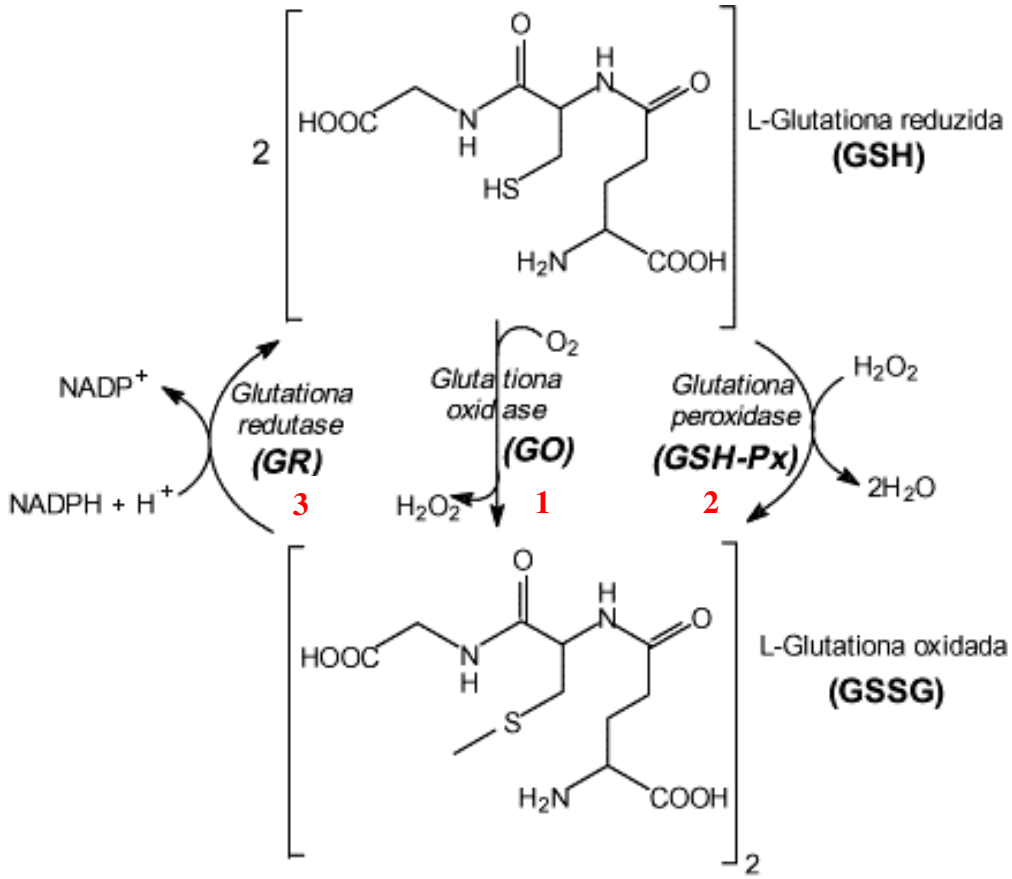


Figura 3. Interconversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas: 1- glutationa peroxidase (GSH-Px), 2 - glutationa oxidase (GO) e 3 - glutationa redutase(GR) (Fonte: ROVER et al, 2001).

Umas das principais funções da GSH nos eritrócitos, é a de eliminar redutivamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os hidroperóxidos orgânicos, que são metabólitos reativos do oxigênio, os quais podem danificar, irreversivelmente, a hemoglobina e clivar algumas ligações C-C dos fosfolipídeos presentes nas membranas celulares. O acúmulo descontrolado de peróxidos resulta no rompimento prematuro da célula. Os peróxidos são eliminados por meio da reação com glutationa, catalizada pela glutationa-peroxidase. A

GSH reduzida é regenerada pela redução de GSSG pelo NAPDH catalisada pela glutationa-redutase (VOET & VOET, 2004), conforme mostra a figura 3.

A forma reduzida da glutationa (GSH) está principalmente envolvida nos mecanismos de detoxificação através das reações de conjugação. A conjugação de agentes tóxicos, como clorofórmio, com a glutationa é catalisado, na sua fase inicial, por glutationa S-transferase. Os produtos conjugados sofrem sofrem hidrólise, dando derivados cisteínas, principalmente nos rins, esses derivados são acetilados para dar N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico), a qual será excretada pelos rins (ver figura 4).

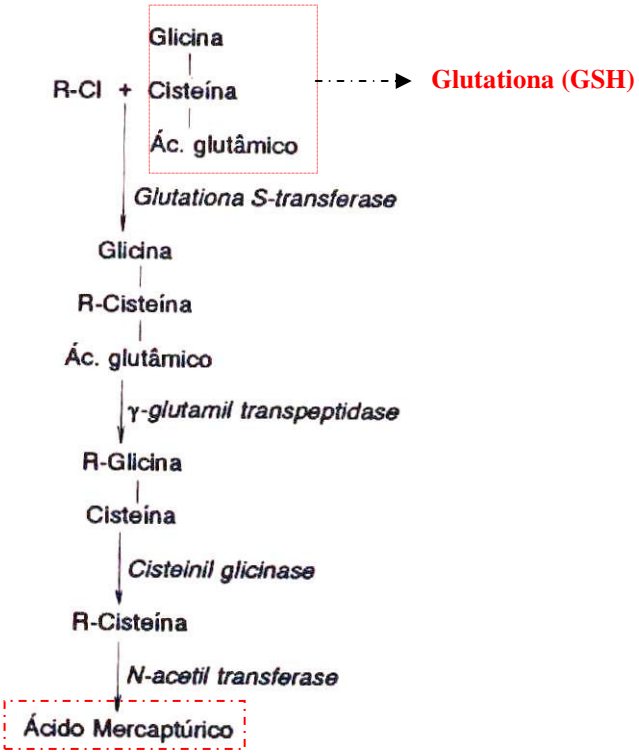


Figura 4. Conjugação com Glutationa e sua degradação (Fonte: OGA, 2003).

Outras funções incluem a transferência de grupos tiólicos e a inibição de radicais livres, tornando-se obrigatório para a célula manter altas concentrações intracelulares de GSH para protegê-la de efeitos nocivos de substâncias químicas (RANNA et al, 2002; OGA, 2003).

A GSH pode funcionar como um antioxidante de várias maneiras. Ela pode reagir, quimicamente, com íons superóxido e radicais hidroxilas e, portanto, funcionar como um varredor de radicais livres. A GSH pode estabilizar a estrutura da membrana celular por remover acil-peróxidos formados pela peroxidação dos lipídios (PRICE et al, 1990).

Os antioxidantes são os principais recursos do organismo para a proteção contra os diversos radicais livres e o sistema de defesa antioxidante é sofisticado e adaptativo, sendo a GSH, o constituinte central desse sistema (PARRIS,1997).

Define-se como radical livre toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição (WILHELM et al, 2000). O ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), radical hidroxila ($OH^{-\bullet}$) e o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) são exemplos de radicais livres. Existem, entretanto, compostos igualmente, reativos, como os radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada de valência e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres.

Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DROGE, 2002). A maioria dos radicais livres produzidos *in vivo* são oxidantes, sendo capazes de oxidar uma gama de moléculas biológicas, incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos (COOPER et al, 2002).

Em condições normais, as ROS produzidas em uma célula reagem com as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes do organismo se estabelece uma condição denominada de estresse oxidativo, em que os radicais livres, em excesso, começam a produzir danos a macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA,

gerando alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatóide e degeneração da hemoglobina (oxidação) promovendo destruição celular precoce (anemia) (BECKMAN & AMES, 1998).

Os eritrócitos circulantes são indicadores biológicos sensíveis dos efeitos do estresse oxidativo, graças à sua dinâmica fisiológica, que proporciona contato com as mais diversas estruturas, sua facilidade de obtenção e isolamento. Eles podem ser considerados "varredores" (*scavengers*) móveis de ROS e providenciam uma proteção antioxidante para outros tecidos e órgãos (WILHELM et al, 2000). A função principal dos eritrócitos é o transporte do oxigênio pela hemoglobina, além do tamponamento do pH, e, também, participam na atividade antioxidante (FIAMONCINI, 2002).

O grau desse estresse oxidativo é determinado pela capacidade antioxidante do organismo indicada pela relação GSH/GSSG e a atividade de enzimas antioxidantes (CESQUINI et al, 1998). A análise de moléculas antioxidantes é, potencialmente, importante para entender o papel do estresse oxidativo nas doenças. A glutationa reduzida (GSH) pode ser oxidada à forma dissulfeto (GSSG) em resposta a uma pertubação oxidativa (GIUSTARINI et al, 2003).

A forma reduzida da glutationa (GSH) previne a oxidação dos grupos sulfidrilas pelo estresse oxidativo. A "S-glutationilação de proteínas" é definida como formação de dissulfetos dos resíduos das cisteínas das proteínas com GSH e a glutationilação da hemoglobina pode existir nos eritrócitos. O primeiro tipo, é a ligação dissulfeto entre a glutationa reduzida e a hemoglobina, o segundo tipo é a ligação dissulfeto formada entre a cisteína 93 da cadeia β da Hemoglobina e a glutationa oxidada e, o terceiro tipo, é a ligação dissulfeto entre os outros resíduos de cisteínas da cadeia γ da metaemoglobina e/ou cadeia β da metaemoglobina e a glutationa oxidada (MAWATARI & MURAKAMI, 2003).

1. Hb + GSH Hb "S-glutationilada"

2. Cisteína-93 da metHb β + GSSG ⟶ G-Hb

3. Cisteína da metHb β e/ou α + GSSG ⟶ Hb glutationilada

Figura 5. Diferentes tipos de glutationilação de hemoglobina nos eritrócitos (figura adaptada de MAWATARI & MURAKAMI, 2003).

1.2- Hemoglobina

A hemoglobina de vertebrados é um tetrâmero que consiste de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α e duas cadeias β. As duas cadeias α são idênticas, assim como as duas cadeias β. A cadeia α tem 141 resíduos de extensão e a cadeia β 146[1], onde tanto a subunidade α quanto a β são formadas de 8 hélices nomeadas de A até H. Cada cadeia está associada a um grupo prostético, heme, onde o átomo de ferro encontra-se no estado ferroso (Fe^{2+}). As cadeias interagem entre si de maneira não-covalente e como resultado dessas interações podem ocorrer mudanças sutis na estrutura de um sítio de uma molécula de proteína causando mudanças drásticas nas propriedades de um sítio distante.

[1] O número de resíduos nas cadeias pode mudar em hemoglobinas animais, embora os números sejam próximos aos citados.

As proteínas que exibem essa propriedade são chamadas de alostéricas (CAMPBELL, 2003; NELSON & COX, 2005).

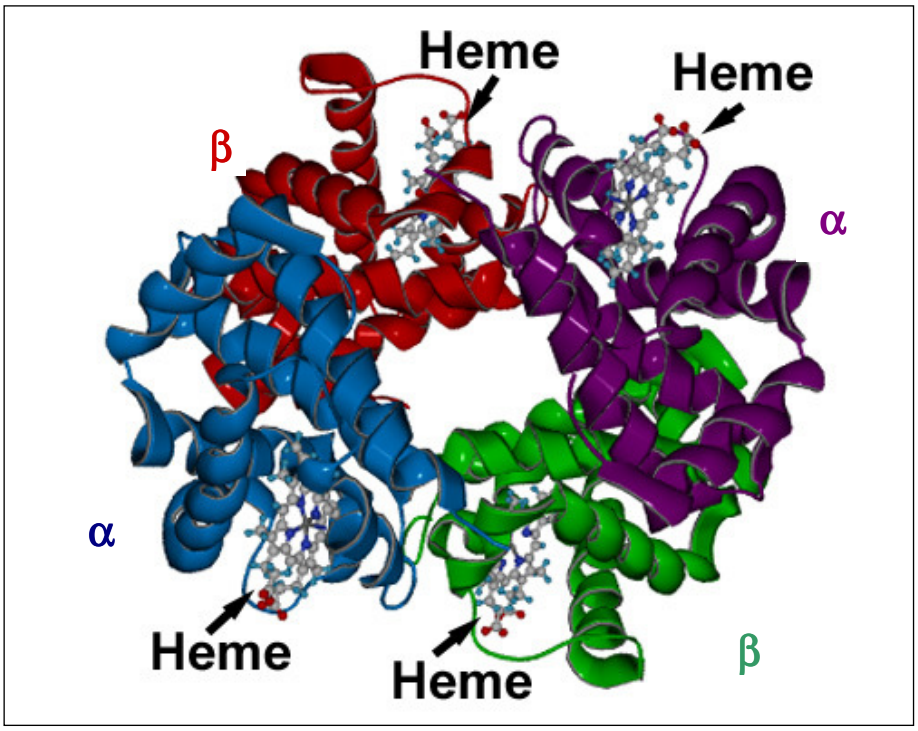


Figura 6. Estrutura da Hemoglobina (fonte: http://cmi.chemistry.wustl.edu.htm).

Análises por difração de raios X mostraram a molécula de hemoglobina como sendo, ligeiramente, esférica, com aproximadamente 5,5nm (ou 55 Å)de diâmetro. Cada uma das quatro cadeias de globina tem hélices alfa e uma estrutura terciária característica e compacta, que reunidas compõem um arranjo tetramérico, formando a estrutura quaternária da molécula (NELSON & COX, 2005).

Tanto a estrutura terciária quanto a quaternária das hemoglobinas nas diferentes espécies de vertebrados apresentam semelhanças entre si, quando analisadas por difração de raios X e por análises químicas (NELSON & COX, 2005).

A principal função da hemoglobina (Hb) é transportar o oxigênio (O_2) dos órgãos captadores (pulmões e brânquias, principalmente) para os tecidos e de parte (15%) do CO_2 produzido pelos tecidos, no sentido inverso (GARRET & GRISHAM,1995).

O grupamento heme é constituído por quatro grupos pirrólicos, um átomo de Fe^{2+} coordenado por quatro nitrogênios porfirínicos e um nitrogênio proveniente da Histidina proximal (His F8).

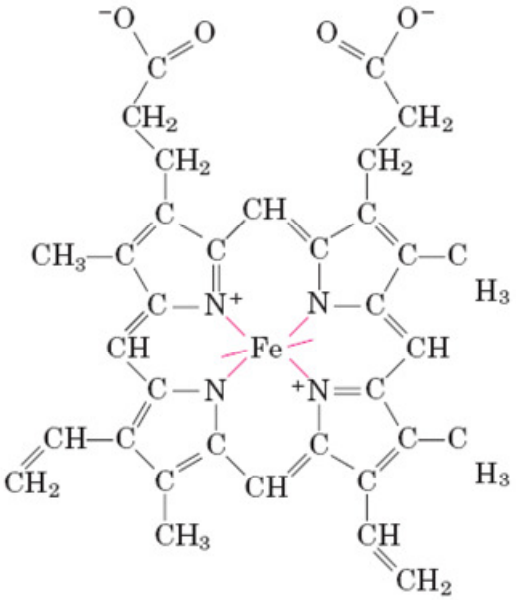


Figura 7. Grupo Heme e seu átomo de ferro (Fonte: NELSON & COX, 2005).

A ligação do O_2 ocorre na cavidade entre o átomo de ferro e a histidina distal (His E7), e o oxigênio forma pontes de hidrogênio entre o Fe e a His (Figura 8) (VOET & VOET, 2004). Quando o oxigênio está ligado à hemoglobina, diz-se que a molécula está oxigenada, essa reação de ligação é reversível. Então, quando o O_2 não está ligado, a molécula encontra-se desoxigenada.

Sob determinadas condições, o Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+}, onde ocorre a ligação de uma molécula de água, formando a meta-hemoglobina (Meta-Hb). Essa reação pode ser

revertida, fisiologicamente, pela meta-hemoglobina redutase, também denominada citocromo b5-redutase (PERCY & LAPPIN, 2008). Se a oxidação persistir, a hemoglobina é incapaz de ligar reversivelmente o oxigênio.

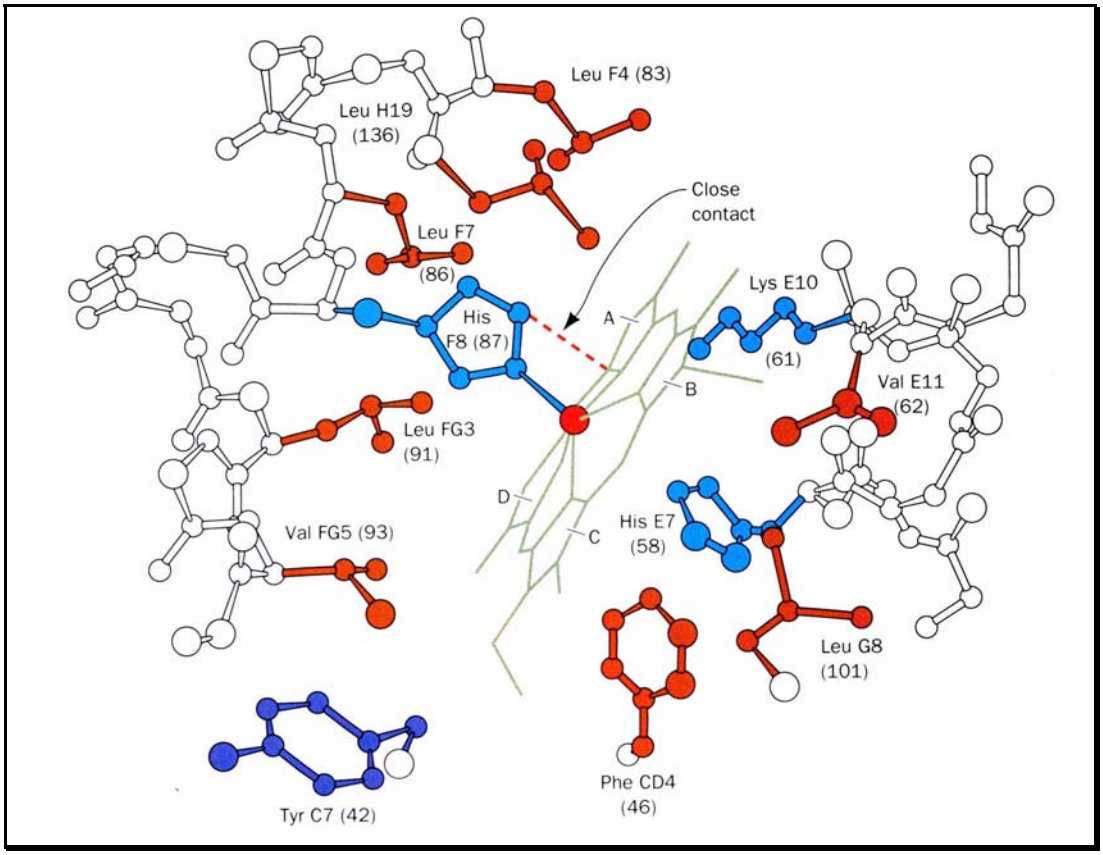


Figura 8. Grupo Prostético heme com átomo de Fe^{2+}, onde se liga o átomo de oxigênio (Fonte: VOET & VOET, 2004).

Os hemes estão a uma distância de 25 a 37 Å uns dos outros; como não podem interagir eletronicamente, eles interagem, mecanicamente, por movimentos da proteína (STRYER, 2004).

Quando a molécula está oxigenada, ocorre uma rotação de aproximadamente 15° de um dos dímeros αβ em relação ao outro, aproximando as subunidades β e diminuindo o canal central da hemoglobina (VOET & VOET, 2004).

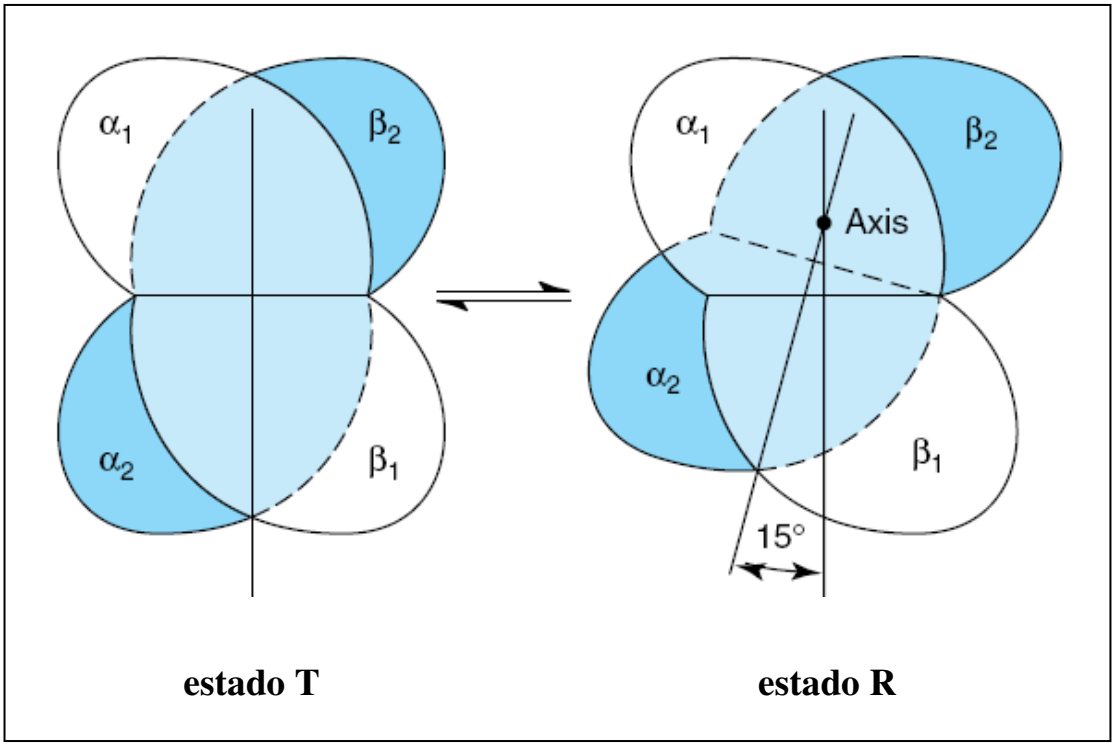


Figura 9. Esquema ilustrativo das mudanças na estrutura quaternária na hemoglobina (Fonte: MURRAY et al, 2003).

De acordo com o modelo alostérico simétrico de Monod, Wyman e Changeux (1965), a hemoglobina apresenta dois estados conformacionais estáveis com afinidade diferencial em relação ao oxigênio: o estado T (tenso) e o estado R (relaxado). A forma desoxi da hemoglobina é denominada "T" (tensa). Na forma T, os dois dímeros αβ interagem através de uma rede de ligações iônicas e pontes de hidrogênio que restringem o movimento das cadeias polipeptídicas. A forma T é a que possui baixa afinidade por oxigênio. A ligação do oxigênio à hemoglobina causa a ruptura de algumas das ligações iônicas e pontes de hidrogênio entre os dímeros αβ; isto leva a uma estrutura denominada "R" ou forma relaxada (oxi-hemoglobina), na qual as cadeias polipeptídicas têm mais

liberdade de movimento. A forma R é a forma da hemoglobina com alta afinidade por oxigênio (STRYER, 2004; CHAMPE, & HARVEY, 2002).

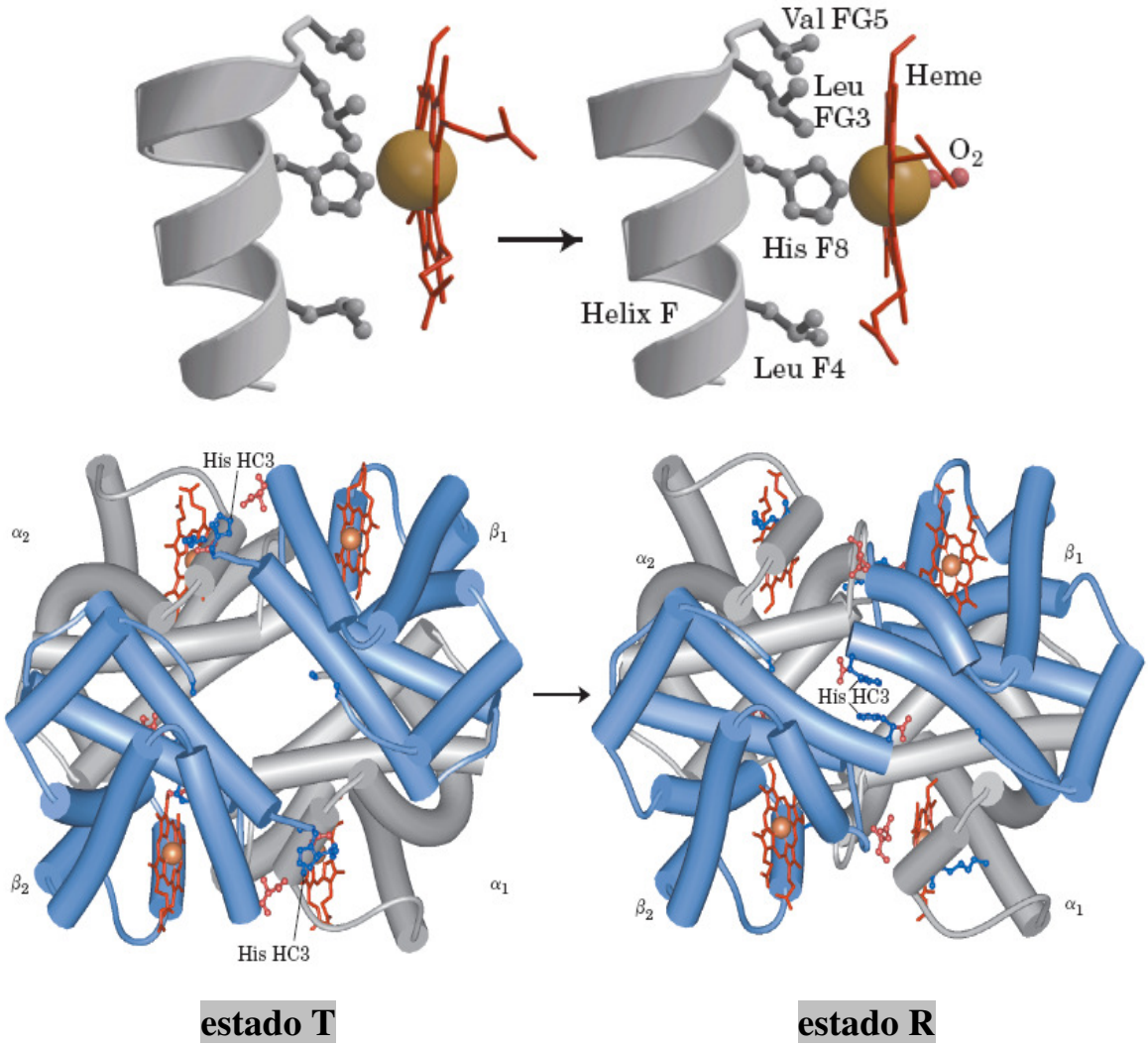


Figura 10. Esquema representando a movimentação que ocorre na mudança conformacional do estado T para R (Fonte: NELSON & COX, 2005).

A capacidade da hemoglobina de se ligar, reversivelmente, ao oxigênio é afetada pela pressão parcial de oxigênio, pH do ambiente, pressão parcial de dióxido de carbono e

a disponibilidade de 2,3-bifosfoglicerato. Estes são, coletivamente, denominados "efetores alostéricos heterotrópicos" (CHAMPE & HARVEY, 2002).

Ao mesmo tempo, a interação de um ligante a um grupo heme causa um efeito sobre a afinidade de ligação do próximo ligante ao outro sítio, de tal forma que a interação em um grupo heme facilita a ligação dos outros hemes no mesmo tetrâmero. Inversamente, a saída de O_2 em um heme, também, facilita a dissociação de O_2 dos outros sítios. Este fenômeno é chamado de cooperatividade ou alosteria homotrópica e ele torna a hemoglobina mais eficiente para o transporte de O_2 (STRYER, 2004).

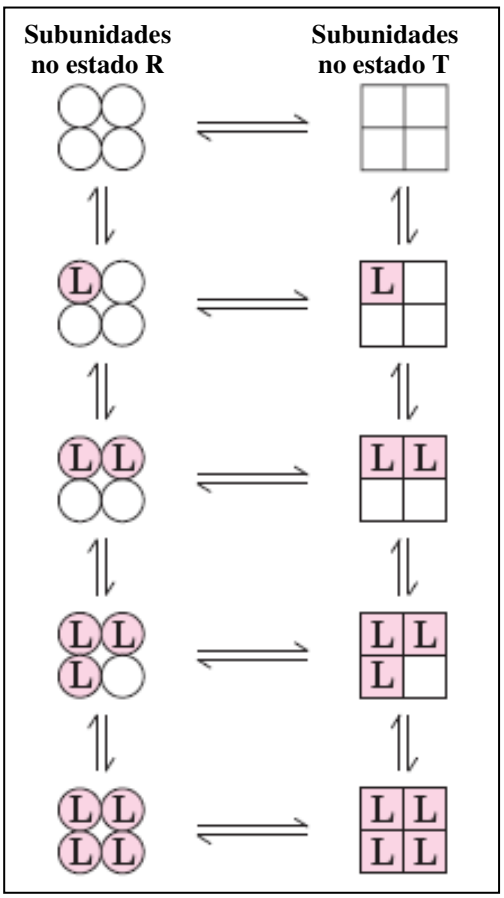
1.2.1. Modelos Alostéricos

Dois modelos principais foram propostos para tentar explicar as propriedades funcionais de ligação do O_2 à hemoglobina. O primeiro modelo, proposto por Monod, Wyman e Changeux (MWC) em 1965, considera a existência de apenas dois estados conformacionais, diferentes para a Hb. Um se encontraria desoxigenado, denominado estado T (tenso), e o outro estaria na forma oxigenada, chamado de estado R (relaxado).

A ligação do ligante a uma subunidade da molécula não tem efeito direto na afinidade dos outros sítios; o que se altera é o equilíbrio conformacional entre as formas T e R. De acordo com a teoria alostérica de MWC, a curva de ligação de O_2 é descrita pelas constantes microscópicas (K_T e K_R) de dissociação do O_2, a constante de transição entre as duas estruturas (T e R) e a constante "alostérica" de equilíbrio "L", na ausência de O_2 (L= [T]/[R]) (NELSON & COX, 2005; PERUTZ et al., 1998).

Mesmo quando uma molécula de O_2 se liga a um dos sítios heme da Hb, a molécula se mantém em T, até que em determinado momento ocorra a transição de T para R, de forma simétrica ou concertada. Isto confere à forma T uma baixa energia se comparada

com a energia da forma R. Após a ocupação de todos os sítios, a soma das energias de ligação desfavoráveis torna-se energeticamente favorável (Figura 11) (MONOD et al, 1965).


Subunidades no estado R
Subunidades no estado T
L
L L
L L
L
L L
L
L L

Nessa conformação, as subunidades não ocupadas apresentam maior afinidade pelo oxigênio. Como as subunidades na hemoglobina estão tão firmemente acopladas, essa única alteração provoca mudanças estruturais terciárias na subunidade, afetando a conformação quaternária de toda a proteína (VOET & VOET, 2004).

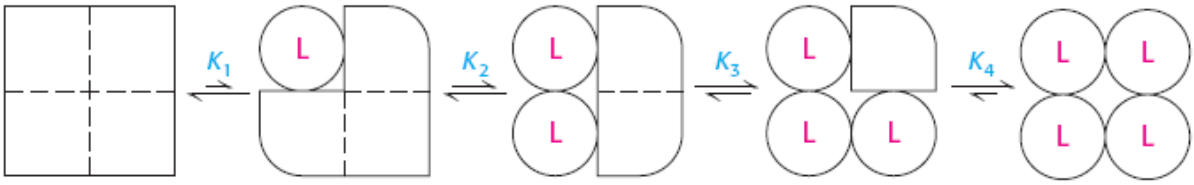


Figura 12. Modelo seqüencial proposto por Koshland, Nemethy e Filmer (KNF) para a cooperatividade (Fonte: STRYER, 2004).

Apesar do modelo MWC ser o mais aceito atualmente pela comunidade científica, ele se mostra insuficiente para explicar alguns achados recentes. Colombo & Seixas (1999) demonstraram a existência de um estado intermediário entre T e R, observado na desoxi-hemoglobina humana, na qual o equilíbrio alostérico ocorre devido à ligação de cloreto. O estado T_x é usado para representar a desoxi-hemoglobina complexada com cloreto e o estado T_0, representa o estado T na ausência do efetor (GIARDINA et al., 2004; JENSEN, 2004).

1.2.2. Alosteria Homotrópica

Archibald Hill em 1913 foi o primeiro a analisar matematicamente em uma equação, a curva de oxigenação da hemoglobina (PERUTZ et al., 1998), e considerou que a ligação do O_2 à Hb fosse representada pela seguinte equação (VOET & VOET, 2004):

$$Hb + nO_2 \longrightarrow Hb(O_2)n \qquad \textbf{(1)}$$

Onde n representa o grau de cooperatividade;

$$K = \frac{[Hb][O_2]^n}{[Hb(O_2)n]} \qquad \textbf{(2)}$$

Onde K é a constante de dissociação da oxi-hemoglobina; [Hb] e a concentração da hemoglobina desoxigenada; $[O_2]$ é a concentração do oxigênio e $[Hb(O_2)n]$ é a concentração da hemoglobina totalmente oxigenada;

A saturação fracional de oxigênio (Y) é definida como a fração ocupada de todos os sítios heme de ligação. O valor de Y varia de 0 (todos os sítios vazios) a 1 (todos os sítios ocupados):

$$Y = \frac{n[Hb(O_2)n]}{n([Hb]+[Hb(O_2)n])} \qquad \textbf{(3)}$$

Combinando as equações 2 e 3:

$$Y = \frac{\dfrac{[Hb][O_2]^n}{K}}{\dfrac{[Hb][O_2]^n}{K} + [Hb]} = \frac{\dfrac{[O_2]^n}{K}}{\dfrac{[O_2]^n}{K} + 1} \qquad \textbf{(4)}$$

Equação de Hill:

$$Y = \frac{[O_2]^n}{[O_2]^n + K} \qquad \textbf{(5)}$$

É conveniente expressar a concentração do O_2 em pO_2, que é a pressão parcial de oxigênio em mmHg ou Torr:

$$Y = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} \qquad \textbf{(6)}$$

Para expressar a fração de oxi-Hb (Y) sobre a fração de desoxi-Hb (1-Y):

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} * \frac{1}{1 - \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K}} \qquad \textbf{(7)}$$

Obtendo o logaritmo da equação 7:

$$\log\left[\frac{Y}{1-Y}\right] = n \log[pO_2] - n \log K \qquad \textbf{(8)}$$

Como para a hemoglobina $K=P_{50}$, substituindo na equação 8:

$$\log\left[\frac{Y}{1-Y}\right] = n \log[pO_2] - n \log P_{50} \qquad \textbf{(9)}$$

O gráfico de Hill é obtido pelo log (Y/1-Y) *versus* log pO_2, onde a curva de oxigenação da hemoglobina é sigmóide. Essa característica permite que o sangue transfira mais oxigênio para os tecidos do que transferiria se a curva fosse hiperbólica.

Esse tipo de curva também indica que existe uma interação cooperativa entre os sítios de ligação da proteína, que pode ser medida pela inclinação *n* da curva. O gráfico também permite calcular o log P_{50}, que é a pressão parcial de oxigênio (pO_2) necessária para saturar metade dos sítios de ligação da molécula de Hb. Esse valor é obtido quando a curva de oxigenação intercepta metade da oxigenação (Y=0,5), neste ponto, uma reta é extrapolada para o eixo x (log pO_2) (Figura 13).

Como podemos observar o gráfico de Hill da mioglobina é linear e apresenta uma inclinação de n=1, o que indica que ela não apresenta processo cooperativo. A inclinação observada para moléculas com processo cooperativo é de n>1, essa medida é chamada de coeficiente de Hill (n_H ou n_{50}). Em hemoglobinas humanas normais, essa constante varia de 2,8 a 3,0, mostrando uma alta cooperatividade, mas este número pode variar em Hb anormais e entre Hb de animais de espécies diferentes (VOET & VOET, 2004).

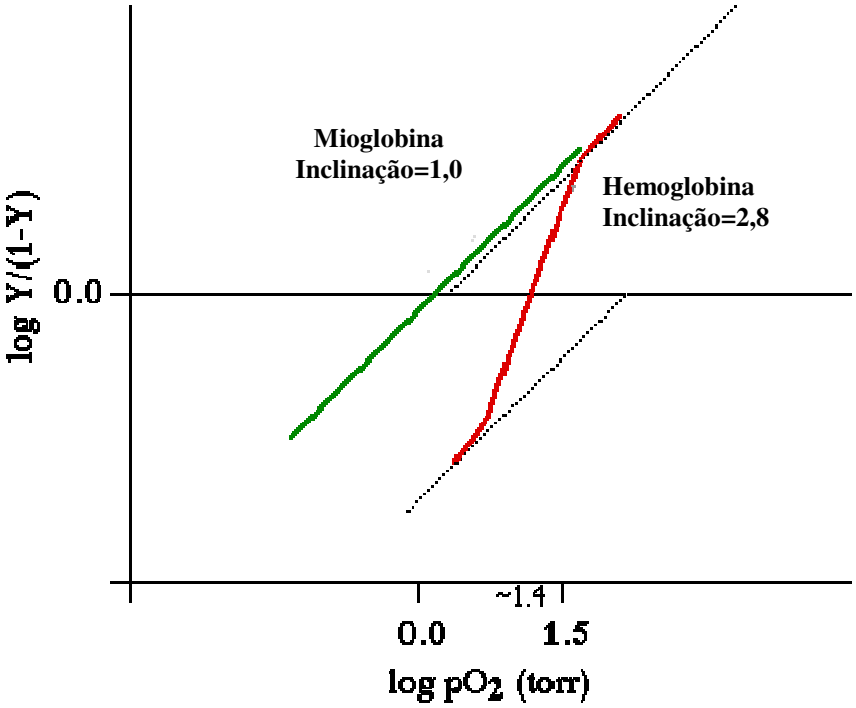


Figura 13. Gráfico de Hill, da Mioglobina (linha verde) e Hemoglobina (linha vermelha)(fonte: http://www.usm.maine.edu/~rhodes/Goodies/HillPlot.html).

1.2.3. Alosteria heterotrópica

A capacidade da hemoglobina de interagir com o oxigênio, não depende somente da concentração deste, no ambiente, mas também com a presença de um leque de outras substâncias na solução (BRITTAIN, 2005). A este tipo de interação denominamos de **interação heterotrópica**, essa interação é causada por vários tipos de moléculas: prótons (H^+), dióxido de carbono (CO_2), íons cloreto (Cl^-), fosfatos orgânicos (BPG, IPP, GTP, ATP), bicarbonato e água (PERUTZ et al., 1998; FAGO et al., 2001; COLOMBO & BONILLA-RODRIGUEZ, 1996).

O ajuste da função da hemoglobina causado por efetores heterotrópicos é baseado, conseqüentemente, na habilidade destas moléculas ligarem-se preferencialmente à conformação de baixa afinidade (T) ao oxigênio e estabilizar essa estrutura, formando pontes salinas dentro ou entre as subunidades (GIARDINA et al., 2004).

Em alguns casos, esses reguladores podem se ligar à forma R, como acontece no efeito Bohr ácido ou reverso (FAGO et al., 1995). Em seguida, será discutido um pouco de cada efetor heterotrópico.

1.2.3.a. Efeito Bohr

O efeito de H^+, ou efeito Bohr, é uma interação heterotrópica entre a hemoglobina e prótons (VOET & VOET, 2004).

Para a maioria das hemoglobinas existem dois tipos de efeito Bohr: alcalino e ácido. No primeiro caso, ocorre a captação de prótons que induz a desoxigenação por

diminuição da afinidade por oxigênio, o que se verifica por um aumento na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em pHs mais elevados (alcalinos).

Abaixo do pH 6,0, a hemoglobina ligada possui uma alta afinidade por H^+. O aumento da afinidade de oxigênio com o decréscimo do pH, aumenta também a afinidade por oxigênio. Esse fenômeno é conhecido como feito Bohr ácido ou reverso (BUSH & HO, 1990; MANNING, et al, 1998).

Em tecidos ativos, a diminuição do pH é ocasionada pela elevação da pCO_2 e pelo aumento da concentração de ácido láctico. O CO_2, dentro das hemácias, reage rapidamente com a água para formar ácido carbônico (H_2CO_3) pela ação da anidrase carbônica (reação 01):

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \quad \textbf{(reação 01)}$$

O ácido carbônico é instável, pois o seu pKa é 6,35 e o pH do sangue é 7,4. Desse modo, o ácido forma bicarbonato (HCO_3^-) e libera H^+. A maioria do gás carbônico é transportado pelo sangue em forma de bicarbonato dissolvido no plasma (85%) e o restante é transportado pela hemoglobina na forma de carbamato (15%) (reação 02) (CAMPBELL, 2000).

Quando o CO_2 entra no sangue em nível tecidual, ele facilita a descarga de O_2 da hemoglobina, e quando deixa o sangue nos pulmões, facilita a captação de O_2 pelo sangue (RANDALL et al., 2000; STRYER, 2004).

$$R\text{—}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R\text{—}NH\text{—}COO^- + H^+ \quad \textbf{(reação 02)}$$

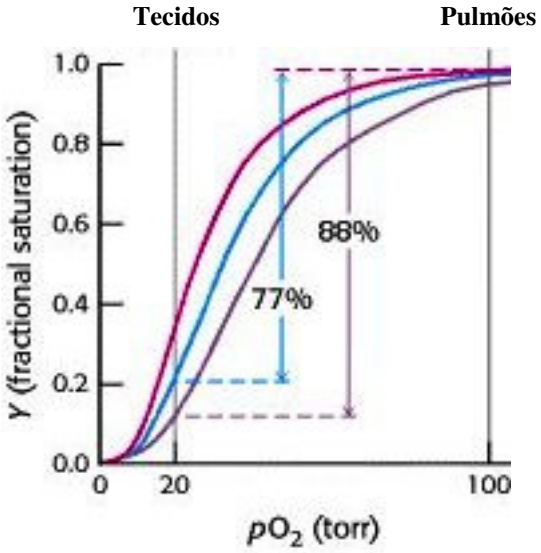


Figura 14. Efeito do pH e da concentração de CO_2 na afinidade da hemoglobina ao oxigênio.O abaixamento do pH de 7.4 (curva vermelha) para 7.2 (curva azul) resulta em libertação de O_2 pela oxi-hemoglobina. O aumento da pressão parcial de CO_2 de 0 para 40 torr (curva violeta), também promove a libertação de O_2 (Fonte: STRYER, 2004)

1.2.3.b. Efeito do íon Cloreto (Cl^-)

O íon cloreto altera a afinidade do O_2 pela hemoglobina de forma significativa, ligando-se à forma T. Na presença deste íon a afinidade diminui, e esta regulação ocorre por meio de interações eletrostáticas. Perutz et al (1994) propuseram que a ação do cloreto é neutralizar o excesso de cargas positivas da cavidade central da desoxi-hemoglobina. Na

ausência do íon, pode ocorrer um desequilíbrio da forma T, pois o excesso de cargas positivas leva à repulsão eletrostática desestabilizando o estado T.

1.2.3.c. Efeito dos Fosfatos Orgânicos

Fosfatos orgânicos estão presentes em todos os vertebrados e exercem um papel importante com relação ao controle da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

Dentro dos eritrócitos essa afinidade é menor do que a da hemoglobina em solução. Em 1921, Joseph Barcroft suspeitava tal relação; isto ficou claro com o trabalho de Benesch & Benesch (1967), que o 2,3-bifosfoglicerato (BPG), liga-se à hemoglobina e tem grande efeito em sua afinidade pelo oxigênio (STRYER, 2004)

Uma baixa pO_2 nos tecidos periféricos promove nos eritrócitos, a síntese de 2,3-bifosfoglicerato (BPG) a partir do intermediário 1,3-bifosfoglicerato da via glicolítica.
A molécula de BPG liga-se na cavidade central formada pelas quatros subunidades da hemoglobina. No entanto, o espaço entre as hélices H das subunidades β, somente é grande para acomodar o BPG, quando a hemoglobina estiver no estado T (tenso), onde são expostas as cadeias laterais da histidina 2 e 143, a lisina 82 (todas da cadeia β) e os grupos amino terminais de ambas as cadeias β.(Figura15) (MURRAY et al., 2003)

Esses resíduos criam uma região carregada positivamente, adequada à ligação de ânions (cloretos e fosfatos).

O BPG estabiliza a Hb no estado T, e quando ocorre a oxigenação, é expulso pois ocorre uma diminuição da cavidade e a exposição das cargas negativas dos resíduos C-terminal promovem repulsão eletrostática (ACKERS et al., 1992; VOET & VOET, 2004).

Em outros vertebrados, diferentes fosfatos orgânicos exercem o mesmo efeito. Em répteis, o ATP é um dos principais fosfatos orgânicos que exerce essa função. Outros tipos de fosfatos participam da regulação da oxigenação em alguns vertebrados em geral, como o IPP em aves. (COATES, 1975; GIARDINA et al., 2004).

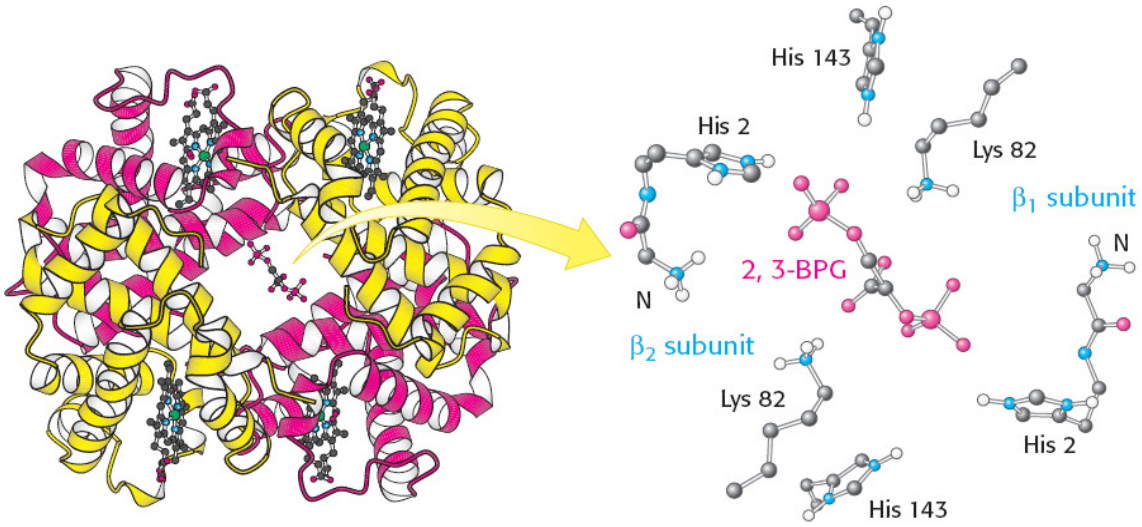


Figura 15. Ilustração do sítio de ligação do 2,3 BPG na desoxi-hemoglobina. (Fonte: STRYER, 2004).

1.3. Espécies de hemoglobinas estudadas

As hemoglobinas escolhidas para esta análise foram as hemoglobinas humana, bovina e do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*).

Existem dois tipos de hemoglobina bovina (Hb Bv), A e B. Elas diferem-se em três resíduos de aminoácidos nas cadeias β, em que ocorre a substituição da Gly(A12) por Ser, Lys(AB2), por His, e Lys(GH3), por Asn, da hemoglobina A para B, respectivamente (FRONTICELLI & BUCCI, 1994).

No presente estudo foi utilizado Hb Bv da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), essa espécie pode apresentar três fenótipos para hemoglobina, Hb A, Hb B e Hb AB (DI VITO et al., 2002).

A hemoglobina bovina difere estruturalmente da Hb humana em 40 aminoácidos em 40 aminoácidos e funcionalmente por ter baixa afinidade ao oxigênio. Esta característica tem sido apontada como resultado de modificações de resíduos das cadeias β, especialmente nas hélices A e E, com hidrofobicidade maior que a encontrada na Hb humana (FRONTICELLI et al., 1995).

Além disso, a Hb Bv possui o resíduo β1 deletado e tem na posição β2 uma metionina, resíduo hidrofóbico, diferente da humana que tem nesta posição uma histidina. Esta hidrofobicidade causa uma torção na porção inicial das cadeias β, que estabiliza a estrutura T, assim, ocorre uma diminuição na afinidade da Hb pelo O_2. Além destas diferenças, apontamos a perda de quatro resíduos de aminoácidos na cavidade central da Hb Bv: Val 1, his 2, Lys 82 e His 143 de ambas cadeias β (RAZYNSKA et al., 1990).

Essa modificação faz com que a Hb Bv interaja de maneira diferente que a Hb humana com o 2,3-BPG, que diminui significativamente a afinidade da Hb humana pelo O_2, e tem seu efeito muito enfraquecido na Hb Bv . O BPG existe em altas concentrações nos eritrócitos humanos (2,2 μmol/g Hb) e é praticamente inexistente nos bovinos (abaixo de 1,0 μmol/g Hb) (CAMBIER et al., 2004).

As hemoglobinas de várias espécies de vertebrados possuem grupos sulfidrilas (SH) reativos que tornam possível a formação de polímeros de hemoglobina ou a combinação com grupos SH não protéicos (GSH) por pontes dissulfetos. Alguns autores acreditam que esses grupos SH conferem proteção contra radicais livres gerados pelo estresse oxidativo (BARROS et al, 1998).

A única Cisteína livre ou reativa presente na oxi-hemoglobina A (β93) humana reage com reagentes sulfidrilas (MAKINO & SUGITA, 1982), aumentando a afinidade do oxigênio e reduzindo o efeito Bohr (GARH et al, 1982), pois a ligação de um grupo pode impedir o movimento dessa cisteína para o interior da proteína durante a transição do estado R para T, "travando" a hemoglobina no estado R.

A medida que durante um processo de estresse oxidativo a proporção de GSH/GSSG diminui, a forma dimérica (oxidada) pode interagir não covalentemente com moléculas capazes de ligar ânions, em especial a hemoglobina. A GSH tem duas cargas negativas, enquanto a GSSG possui quatro cargas negativas dadas pelos grupos α carboxila dos glutamatos e das glicinas (ver figura 16).

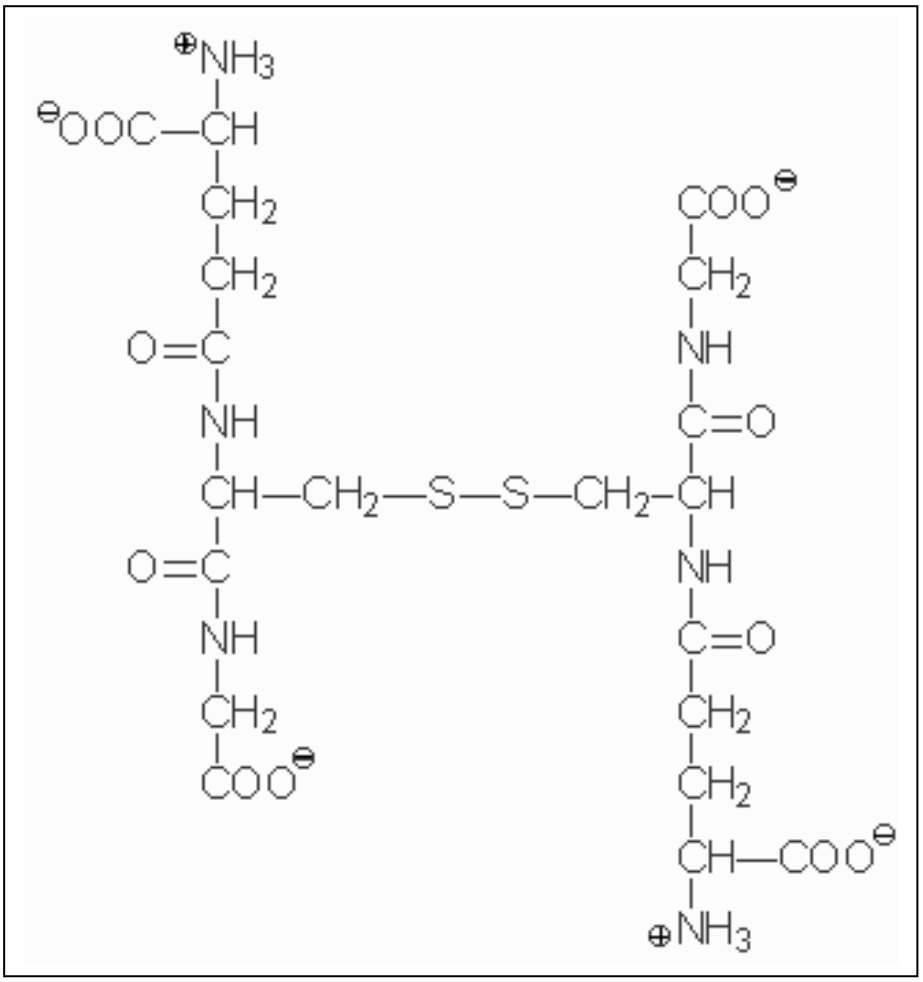


Figura 16. Glutationa Oxidada (fonte: http://www.bioon.com/book/biology/mwking/gssgfigure.gif).

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O projeto teve como finalidade verificar a existência de um quarto tipo de interação, alostérica, entre glutationa oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) com hemoglobina, promovendo mudanças conformacionais que se reflitam nas propriedades funcionais das hemoglobinas dos vertebrados. No presente estudo, foi realizada uma comparação estrutural e funcional entre hemoglobinas humana e bovina, tendo incluído também a hemoglobina majoritária do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar as propriedades de transporte de oxigênio e controle alostérico das hemoglobinas humana e bovina purificadas, na ausência e na presença de glutationa reduzida e oxidada.

Na medida em que um trabalho recente (POY, 2008) mostrou a ligação de fosfatos à forma oxigenada da hemoglobina majoritária do peixe matrinxã, fizemos também uma análise do efeito da ligação de GSSG, para termos mais uma referência de hemoglobina animal obtida nas mesmas condições experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras de sangue:

As amostras de sangue humano foram coletadas de um adulto saudável, não fumante, através de punção venosa da via cubital, utilizando EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), como anticoagulante. As amostras de sangue bovino adulto foram obtidas no Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), coletadas de bovino adulto saudável, através de punção venosa da via jugular, utilizando o anticoagulante acima citado. Após a coleta, todos os processos que se seguiram, foram realizados à temperatura de 4°C.

Retirado o plasma por centrifugação, lavou-se as hemácias 4 vezes com solução salina tamponada (Tris 50mM pH 8,0, 0,9% NaCl, 0,2% glicose e EDTA 1mM) em centrífuga *Jouan* CR3i a 1.356 xg por 10 minutos. Em seguida, promovemos a hemólise em tampão Tris 50mM pH 9,0 (Tampão de Hemólise) ; esta solução, com o hemolisado total, foi submetida a centrifugação por 40 minutos a 7.997 xg para clarificação. Os "debris" foram retirados com adição de clorofórmio (*Merk*), no mesmo volume que a solução da amostra hemolisada, sob constante agitação.

Posteriormente, concentramos o sobrenadante do hemolisado em centrífuga Incibrás, utilizando concentradores Centriprep 50 (*Amicon*). As amostras foram estocadas em *Freezer Thermo Electron Corporation* (-86°C) até a sua utilização.

3.2. Procedimento de Purificação :

O hemolisado humano ou bovino foi, primeiramente, aplicado a uma coluna de 2,6 x 22 cm (*Bio-Rad*) de filtração em gel preeenchida com Sephacryl S-100 HR (*Sigma*), com intuito de se excluir do hemolisado proteínas de massa molecular maiores e menores em

relação à hemoglobina. A resina, foi previamente, lavada com água bidestilada em abundância, e equilibrada com tampão Tris 10mM NaCl 0,2M pH 9,0 ($V_{tampão}$ = 3x o volume da resina). Foi realizada, simultaneamente, a retirada de sal e concentração das amostras, através de centrifugação em concentradores Centriprep 50 (*Amicon*) com tampão Tris 10 mM pH 9,0 e estocadas, em nitrogênio líquido, até a sua utilização.

Por fim, o hemolisado foi submetido a uma coluna 2,6 x 22cm (*Bio-Rad*) de troca aniônica DEAE *Sepharose Fast Flow* (*Pharmacia*). A coluna foi equilibrada com tampão Tris 10 mM pH 9,0 e a eluição da amostra foi feita com gradiente salino de 0 a 0,1M de NaCl.

Em seguida, foi realizada a retirada de sal e concentração das amostras de Hb A_0 humana e Hb Bv (bovina) eluidas , através de centrifugação em concentradores acima descrito com tampão Tris 10 mM pH 9,0 e alíquotas de pequeno volume foram armazenadas em *Freezer Thermo Electron Corporation* (-86°C), até serem utilizadas nos experimentos.

Obtivemos assim a forma *stripped* (Hb livre de íons orgânicos e inorgânicos) das hemoglobinas humana e bovina, para posterior estudo das propriedades funcionais de ligação de O_2.

As amostras da forma *stripped* da hemoglobina do peixe Matrinxã foram gentilmente cedidas pela Drª Cecília D. Poy.

3.3. Verificação da Pureza das Amostras :

A pureza da amostra de hemoglobina humana e bovina cromatografada foi aferida através de uma eletroforese nativa em poliacrilamida a 8% (Alfenas, 1998), com coloração do gel com *Coomassie brilliant Blue G-250.*

3.4. Estudo das Propriedades Funcionais de Ligação de O_2 em Hemoglobina Humana e Bovina :

Os experimentos para análise das propriedades de ligação de O_2 à hemoglobina humana e bovina, foram realizados diluindo a Hb concentrada em tampão apropriado, sendo a concentração final de hemoglobina, 60 M/heme. Foram utilizados os seguintes tampões: ADA 30mM (pH 6,0 e 6,5), HEPES 30mM (pH 7,0, 7,5 e 8,0) e TAPS 30mM (pH 8,5 e 9,0).

A concentração da hemoglobina foi determinada da seguinte forma:

$$\mathbf{[Hb]} = \frac{(\mathbf{Abs}_{576nm}) \cdot (\mathbf{V}_{diluição} + \mathbf{V}_{Hb})}{(\mathbf{15,8}) \qquad (\mathbf{V}_{amostra})} \qquad \textbf{(10)}$$

Onde, Hb é a concentração da hemoglobina em mM/heme, Abs_{576} corresponde a absorbância no pico de absorção em 576 nm para a oxi-Hb, $V_{diluição} + V_{Hb}$ é o volume total da amostra a ser lida no espectro e 15,8 mM^{-1} o coeficiente de extinção milimolar para a oxi-Hb em 576 nm (BENESCH et al., 1973)

As análises foram realizadas na ausência (*stripped)*, na presença de regulador alostérico (Cloreto 100mM) e na presença de Glutationa Oxidada 1mM. Para se evitar a formação de meta-hemoglobina foi acrescentado às soluções de Hb, as enzimas catalase (2 M) e superóxido dismutase (2,1 M), de forma a inibir a ação das espécies reativas de oxigênio íon superóxido e peróxido de hidrogênio.

O método experimental utilizado foi o tonométrico-espectrofotométrico (GIARDINA & AMICONI, 1981), baseado nas variações espectrais que ocorrem durante a mudança entre as formas oxigenada e desoxigenada, usando um espectrofotômetro UV--Visível Cintra 10e e para o cálculo dos parâmetros de afinidade por oxigênio e cooperatividade foram utilizados programas adequados escritos em BASIC.

Antes de se iniciar a desoxigenação foi feita a leitura da absorbância da oxigenação inicial da solução nos seguintes comprimentos de onda: 576, 540 e 555nm (picos da oxi-hemoglobina), 560nm (pico da desoxi-hemoglobina), 569nm (ponto isosbéstico), 630 (pico da meta-hemoglobina) e 690nm (linha de base).

As leituras foram realizadas em todas as etapas e os dados são utilizados para o cálculo da P_{50}, log P_{50}, n_{50} e medição da formação de meta-hemoglobina durante o experimento. Após a leitura inicial das absorbâncias antes citadas, era feito o processo de desoxigenação da solução de hemoglobina, passando gás nitrogênio umidificado pelo tonômetro (Figura 17), esse processo durava entre 2 e 3 min. Para auxiliar na desoxigenação era feito vácuo (com uma bomba de vácuo).

Figura 17. Fotografia de um tonômetro usado nos experimentos de estudos funcionais.

Após a desoxigenação era feita a leitura espectral, para a avaliação do grau de desoxigenação da solução de acordo com a proposta de Benesch et al (1965), onde Abs 555 e 540nm são as leituras de absorbância das formas desoxi e oxigenadas. Se o índice observado for maior ou igual a 1,24 (equação 11), a fase seguinte era iniciada:

$$\frac{\mathbf{Abs}_{555}}{\mathbf{Abs}_{540}} \geq \mathbf{1,24} \qquad \textbf{(11)}$$

A etapa seguinte consistiu na adição de quantidades conhecidas de ar no tonômetro com uma seringa. Entre uma adição e outra era esperado um tempo de 7 min (necessário para o equilíbrio entre a fase gasosa e a solução), durante o qual o tonômetro ficava em um banho com agitação lenta e com temperatura controlada (20°C). Após cada adição era feita a leitura da absorbância (540, 555, 569, 560, 576) para o cálculo da saturação da solução.

Os comprimentos em 576, 560 e 540nm, foram utilizados para o cálculo da saturação fracional (Y):

$$Y = \frac{(A^{\lambda} - A_0^{\lambda})}{(A_{100}^{\lambda} - A_0^{\lambda})} \qquad \textbf{(12)}$$

Onde λ é o comprimento de onda, A^{λ} leitura da absorbância da amostra, A_0^{λ} e A_{100}^{λ} as absorbâncias das formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente. Como as leituras foram feitas em três comprimentos de onda, consideraremos a variação total (ΔA_{REF}) das absorbâncias:

$$\Delta A_{REF} = (A_{100}^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_{100}^{560}) + (A_{100}^{576} - A_0^{576}) \qquad \textbf{(13)}$$

Após cada adição (i) foi feita a leitura das absorbâncias na solução equilibrada:

$$Y = \frac{(A_i^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_i^{560}) + (A_i^{576} - A_0^{576})}{\Delta A_{REF}} \qquad \textbf{(14)}$$

As leituras em 569nm (ponto isosbéstico) permitiram corrigir as medições espectrais. A pressão parcial de O_2 foi calculada pela equação 15 (GIARDINA & AMICONI, 1981), modificada pelo protocolo experimental seguido pelo laboratório do Prof. Dr. Joseph Bonaventura (Duke University, NC, EUA).

$$pO_2 = \frac{(O_2 * \frac{TB}{TA}) * (PBC - (PV*UR))}{VT - VA} *VI \qquad \textbf{(15)}$$

Onde a pO_2 (mmHg) é a pressão parcial de oxigênio, O_2 é fração do gás na atmosfera (0,21), PBC é a pressão atmosférica corrigida[2] (mmHg), PV é a pressão de vapor de água[3], UR é a umidade relativa (%), VT é o volume do tonômetro (mL), VA é o volume da amostra (mL), VI é o volume de ar injetado (mL), TB é a temperatura do banho (°C) e TA é a temperatura ambiente (°C).

As injeções de ar foram feitas até que se conseguissem altos níveis de saturação. Depois o tonômetro era aberto, e era feita a leitura da oxigenação final (100% de saturação). Os dados foram digitados em uma planilha do Excel (*Microsoft*) e a partir dele obtivemos os valores do log pO_2 e log (Y/1-Y) de cada etapa, que foram transferidos para o programa gráfico Origin 6.0 (*Microcal lnc.*), onde foi construído o gráfico de Hill para cada condição.

[2,3] Ver Anexos 01 e 02

A partir desse gráfico pudemos executar uma regressão linear (y= a + b*x) na região em torno de 50% de saturação (região da reta onde intercepta o eixo x), obtendo-se o n_{50}, que corresponde à inclinação da reta. Por sua vez, log P_{50} foi calculado utilizando-se a intersecção da reta no eixo y (-a/b) e $P_{50} = 10^{-a/b}$. Em cada condição era calculada a porcentagem de meta-hemoglobina formada, e os dados experimentais com 5% ou mais de meta-hemoglobina foram descartados

Para a verificação da quantidade de prótons liberada quando da ligação de O_2 à Hb, foi utilizada a seguinte equação (JENSEN, 2004):

$$-\Delta H^{+}/\text{Heme} = \Delta \log P_{50} / \Delta pH \qquad \textbf{(16)}$$

3.5. Cálculo da concentração de Oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina

Para a determinação da concentração de hemoglobina (oxi) e hemoglobina (meta) foram utilizadas as leituras espectrais em 576 e 630nm, com coeficientes de extinção[4] (ε_{576}^{meta}, ε_{576}^{oxi}, ε_{630}^{meta}, ε_{630}^{oxi}) determinados para hemoglobina humana (BENESCH et al., 1973).

O cálculo das concentrações foi realizado pelas equações 17 e 18, que correlaciona as absorbâncias (576 e 630nm) com os seus coeficientes de extinção:

$$Abs_{576} = [oxiHb]^* \varepsilon_{576}^{oxi} + [metaHb]^* \varepsilon_{576}^{meta} \qquad \textbf{(17)}$$

$$Abs_{630} = [oxiHb]^* \varepsilon_{630}^{oxi} + [metaHb]^* \varepsilon_{630}^{meta} \qquad \textbf{(18)}$$

[4] Ver Anexo 03

Dessa forma, a concentração das duas espécies (as duas incógnitas) pode ser resolvida conforme segue, onde "DET" é a determinante da matriz:

$$DET = \begin{vmatrix} \varepsilon_{576}^{oxi} & \varepsilon_{576}^{meta} \\ \varepsilon_{630}^{oxi} & \varepsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} \quad \textbf{(19)}$$

$$[metaHb] = \begin{vmatrix} \varepsilon_{576}^{oxi} & \varepsilon_{576}^{meta} \\ \varepsilon_{630}^{oxi} & \varepsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} / DET \quad \textbf{(20)}$$

$$[oxiHb] = \begin{vmatrix} \varepsilon_{576}^{oxi} & \varepsilon_{576}^{meta} \\ \varepsilon_{630}^{oxi} & \varepsilon_{630}^{meta2} \end{vmatrix} / DET \quad \textbf{(21)}$$

3.6. Titulação com Glutationa Oxidada :

Realizamos a titulação com Glutationa Oxidada em diferentes concentrações, para observar o efeito da GSSG sobre a afinidade das hemoglobinas bovina, humana e matrinxã por oxigênio. Também, foi realizada titulação na presença de ATP 1 mM com concentrações diferentes de GSSG.

O método utilizado foi o tonométrico-espectrofotométrico (GIARDINA & AMICONI, 1981) já descrito anteriormente. Utilizamos tampão Hepes 30 mM pH 7,5 com concentrações de 0,1 a 2,0 mM de Glutationa Oxidada (*SIGMA*).

3.7. Titulação com Glutationa Reduzida :

Realizamos, também, a titulação com Glutationa Reduzida em diferentes concentrações, para observar o efeito da GSH sobre a afinidade das hemoglobinas bovina e humana por oxigênio.

O método utilizado foi o tonométrico-espectrofotométrico, utilizamos tampão Hepes 30mM pH 7,5 com concentrações de 0,1 a 2,0mM de Glutationa Reduzida (*SIGMA*).

3.8. Análise espectral da transição T-R:

Avaliamos o efeito da Glutationa Oxidada na transição T $\longrightarrow$ R das hemoglobinas bovina e humana, a 60µM, utilizando espectrofotômetro (*Varian Scan 100*), na região UV entre 250 e 310nm. Foram realizadas três leituras em tampão Hepes 30mM, pH 7,5.

Para a primeira leitura, utilizamos a hemoglobina oxigenada na ausência total de GSSG, na segunda, foi adicionada GSSG 1,0mM à forma oxigenada e a terceira foi adicionado GSSG 1,0mM à hemoglobina desoxigenada. O primeiro espectro foi subtraído dos últimos dois.

3.9. Bloqueio da Cisteína β93 na hemoglobina :

As cisteínas β93 das amostras de Hb A_0 humana foram bloqueadas, segundo método de Mansouri (1979) com modificações. A amostra de Hb A_0 humana (1,0 ml) foi incubada por 1 hora na presença de 2,0 ml de Iodoacetamida 70mM a 25^0 C, no escuro.

A hemoglobina modificada foi aplicada em uma coluna 2,6 x 22cm (*Bio-Rad*) de filtração em gel preeenchida com Sephadex G-50 (*Sigma*), previamente equilibrada com tampão Tris 10mM pH 8,0 e eluída com o mesmo tampão, com o intuito de retirar o excesso de Iodoacetamida. A hemoglobina A_0 humana modificada foi analisada através de uma eletroforese nativa 8%. O mesmo procedimento foi realizado com a Hemoglobina Bovina.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS:

4.1.Pureza das amostras

A figura 18 mostra gel de poliacrilamida para checar a pureza da amostra de hemoglobina humana adulta majoritária (HbAo), permitindo visualizar, no poço 3, apenas uma banda de proteína.

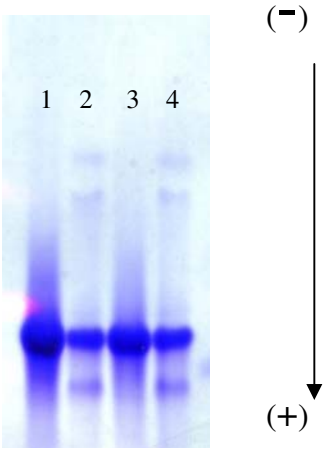


Figura 18. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 8%, corado por *Coomassie brilliant Blue G-250.* A banda na posição 1 representa a Hb humana antes da purificação (Hb Total), as posições 2 e 4 mostram a Hb após filtração em gel, a posição 3 representa a Hb A_0 após a purificação.

Nas análises feitas em *HPLC*[5], medimos o perfil cromatográfico da HbA_0. No cromatograma, mostrado na figura 19, notamos que a amostra purificada está dividida em 3 frações, contendo maior parte de HbA_0 (93,9%), Hb glicosilada denominada P2 (4,1%) e acetilada, denominada P3 (2,0%).

[5] O HPLC está configurado para realizar cromatografia de troca iônica.

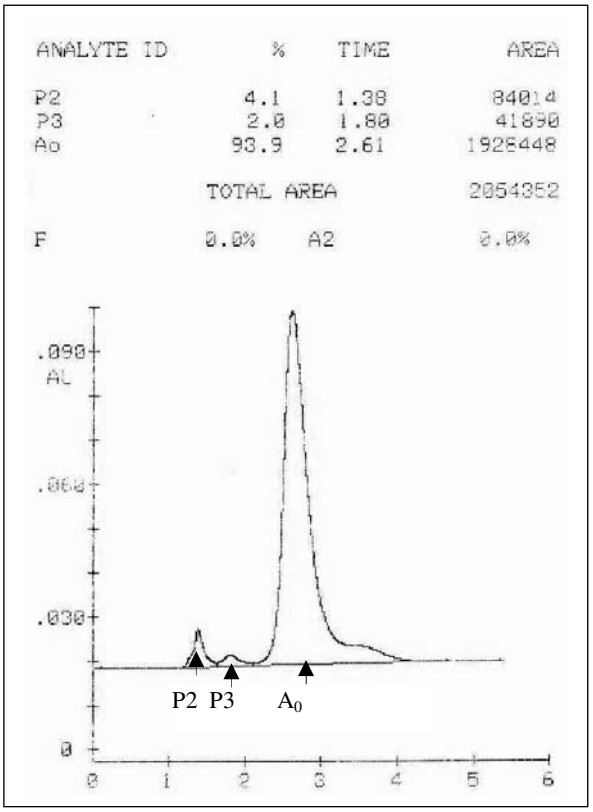


Figura 19. Perfil cromatográfico da hemoglobina humana majoritária (HbA_0) em HPLC.

A figura 20 mostra a análise eletroforética para checar a pureza da amostra de hemoglobina bovina adulta (Hb Bv). A eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 8%, corado por *Coomassie brilliant Blue* G-250, mostrou duas bandas para Hb Bv total, uma banda lenta para Hb Bv-A e uma banda rápida para Hb Bv-B, resultados encontrados, também, por Di Vito et al (2002) para z raça bovina Nelore.

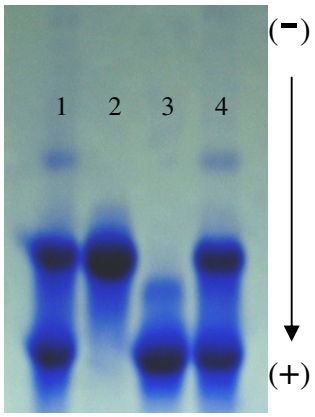


Figura 20. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 8%, corado por *Coomassie brilliant Blue G-250.* A banda nas posições 1e 4 representa a Hb bovina antes da purificação (Hb Bv Total), a posição 2 mostra a Hb Bv-A e a posição 3, a Hb Bv-B, após a purificação.

4.2.Estudo Funcional - Efeito Bohr :

4.2.a. Hemoglobina Humana:

As propriedades funcionais da hemoglobina A_0 humana (afinidade por oxigênio e cooperatividade) foram observadas a 20°C.

Analisando o gráfico de log P_{50} versus pH (Fig. 21) pode-se observar que a forma analisada (*stripped*) para hemoglobina humana apresentou efeito Bohr alcalino ou normal; Com a diminuição do pH, a afinidade da molécula pelo O_2 diminuiu, em virtude da ligação de prótons à forma desoxigenada, diminuindo a afinidade por oxigênio (evidente pelo aumento da P_{50}). Com o aumento do pH, a afinidade aumentou, sendo necessária uma menor pO_2 para saturar a hemoglobina.

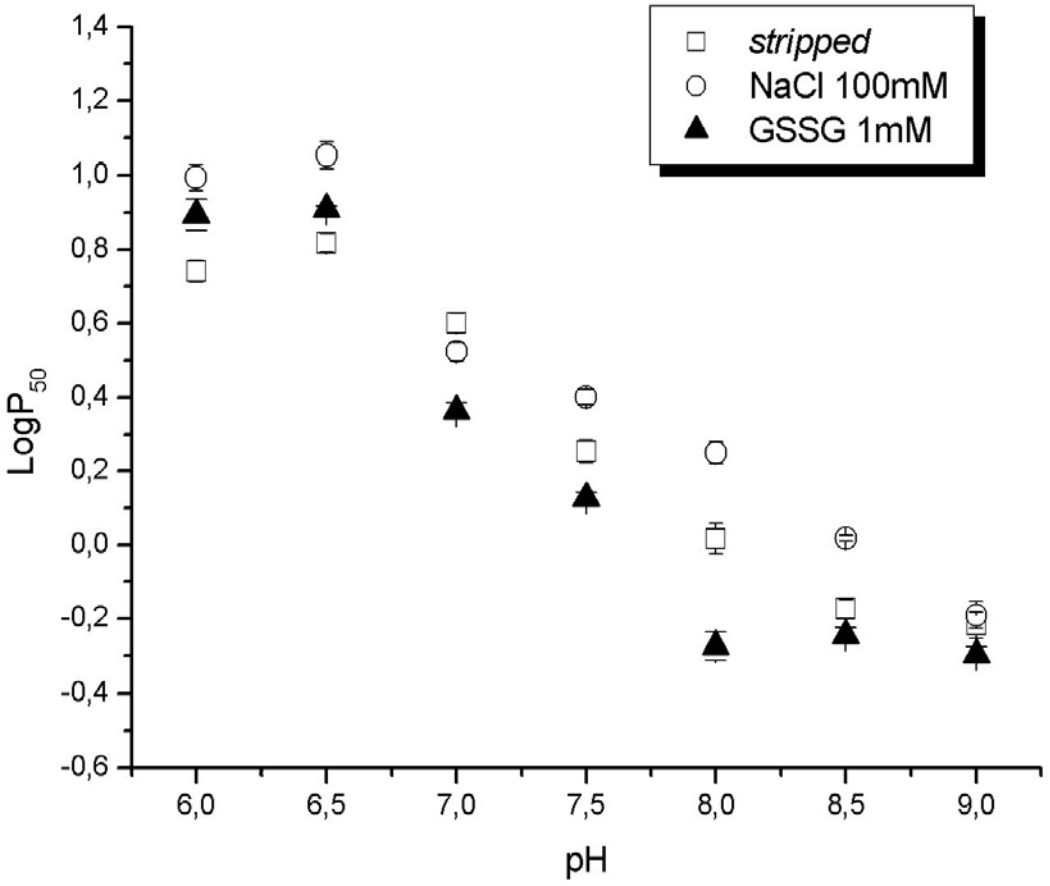


Figura 21. Gráfico log P_{50} *versus* pH para a HbAo (humana adulta), mostrando a afinidade pelo O_2 com a variação do pH, na forma *stripped*, na presença de NaCl e GSSG à temperatura de 20ºC.

Na forma *stripped*, na qual a amostra está livre de fosfatos e cloretos, os valores de P_{50} variam de 5,3 a 0,6mmHg, entre pH 6 e 9, respectivamente. O efeito Bohr ($\Delta H^+ = \Delta \log P_{50}/\Delta pH$) é medido pelo número de prótons liberados pela hemoglobina, que neste caso foi de -0,60±0,04H^+/heme ou -2,40H^+/molécula, na faixa de pH entre 7 e 8.

A oxigenação da hemoglobina humana foi cooperativa para a forma *stripped*. O coeficiente de Hill (n_{50}) mostrou-se variável de pH 6,0 a 9,0, com valores entre 1,6 e 1,8, respectivamente, apresentando um aumento da cooperatividade em torno do pH 7,0 (n_{50}= 2,2) em relação aos demais pH (Fig.22).

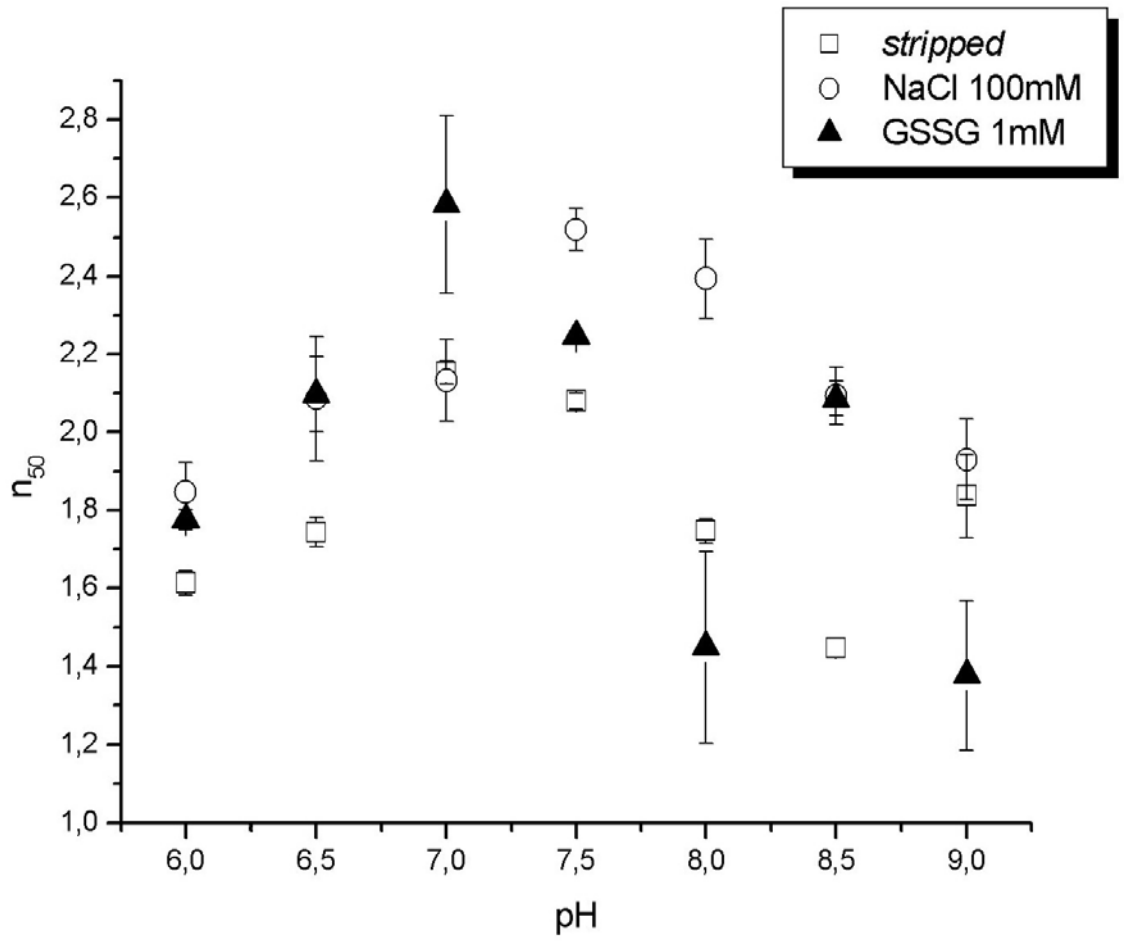


Figura 22. Gráfico da cooperatividade (n_{50}) *versus* pH para a Hemoglobina humana em diferentes pH a 20ºC. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 21.

Na presença de Cl^- (NaCl 0,1M) a hemoglobina humana apresentou efeito Bohr alcalino (–0,27±0,01H^+/heme). Os valores de P_{50} de 9,8 a 0,7mmHg entre pH 6,0 e 9,0. Esses valores mostram uma baixa afinidade da HbA_0 ao oxigênio, na presença de cloreto, pois necessita-se de uma maior pO_2 para saturar a molécula.

A oxigenação da hemoglobina humana, na presença de cloreto, também foi cooperativa. O coeficiente de Hill (n_{50}) mostrou-se variável nos extremos testados, pH 6,0 e 9,0, com valores ao redor de 1,9, apresentando um aumento da cooperatividade em torno do pH 7,5 (n_{50}= 2,5) (ver fig 22).

Na presença de Glutationa Oxidada (GSSG 1,0mM), o comportamento da hemoglobina não bloqueada, foi semelhante ao da forma *stripped*, apresentando um efeito Bohr alcalino, que neste caso foi de -0,57±0,1H^+/heme ou -2,28H^+/molécula, na faixa de pH entre 7 e 8. Os valores de P_{50} variam de 8,5 a 0,5mmHg entre pH 6,0 a 9,0, apresentando valores superiores para os pH 6,0 e 6,5 e inferiores para os demais pHs, em relação à forma *stripped* (ver Fig 21).

Observamos, então que na presença de GSSG, é necessária uma maior pO_2, em pH ácido para saturar a molécula, do que em relação à forma *stripped*. No entanto, em pH alcalino, a pO_2 é maior para a forma *stripped* do que na presença da GSSG.

Como na forma *stripped* e na presença de cloreto, a oxigenação da hemoglobina humana na presença de GSSG, também, foi cooperativa. O coeficiente de Hill (n_{50}) mostrou-se variável, entre pH 6,0 a 9,0, com valores entre 1,8 e 1,4, respectivamente, apresentando um máximo de cooperatividade em pH 7,0 (n_{50}= 2,6) (ver fig 22).

Nas três condições analisadas (*stripped*, cloreto e glutationa oxidada) observamos que com o aumento do pH da solução, a afinidade da proteína pelo oxigênio aumenta. Isso indica que a ligação de O_2 é acompanhada pela liberação de prótons. Esse aumento da afinidade da hemoglobina com o aumento do pH, implica que o equilíbrio conformacional desloca-se no sentido de estabilizar a conformação de mais alta afinidade por O_2, a conformação R. Portanto, essa observação, também, implica que a transição T→ R é seguida pela liberação de prótons.

Na presença de cloreto, a HbA_0 apresentou menor afinidade pelo O_2, em relação à forma *stripped* e na presença de Glutationa Oxidada. Isto é, para ocorrer a ligação com o O_2, foi necessária uma maior pressão parcial de oxigênio, que nesse caso variou de 9,8 a 0,7mmHg, as mais altas, se comparadas com as outras formas analisadas.

Segundo Perutz et al. (1994), em hemoglobinas de mamíferos, os íons cloretos agem como moduladores alostéricos que diminuem a afinidade ao oxigênio.

No entanto, em relação à presença de GSSG, a molécula apresentou menor afinidade entre pH 6,0 e 6,5 e maior afinidade para os demais pH analisados, em comparação à forma *stripped* (ver tabela 1). Segundo Huisman & Dozy (1962), um considerável aumento na afinidade da hemoglobina humana HbA_0, na presença de GSSG, foi verificada em pH 7,2 a 37,5° C, que nós verificamos.

pH	*Stripped* P_{50} (mmHg)	*GSSG 1mM* P_{50} (mmHg)
6,0	5,3 ±0,2	8,5 ± 0,4
6,5	6,6 ±0,5	8,1 ±0,1
7,0	4,0 ±0,2	2,3 ±0,1
7,5	1,9 ±0,5	1,3 ±0,1
8,0	1,0 ±0,1	0,5 ±0,1
8,5	0,6 ±0,1	0,6 ±0,1
9,0	0,6 ±0,1	0,5 ±0,04

Tabela 1. Valores da P_{50} para Hemoglobina Humana em diferentes pH, nas condições *stripped* e GSSG 1mM, a 20°C.

4.2.b. Hemoglobina Bovina:

As figuras 23 e 24 ilustram as propriedades de ligação do O_2 da hemoglobina bovina (Hb Bv-B) adulto com a variação do pH a 20°C.

Na figura 23, está representada a afinidade da Hb Bv-B em três condições: *stripped*, com NaCl 100mM e Glutationa Oxidada (GSSG) 1mM.

Os valores de P_{50}, na forma *stripped,* variam de 20,6 a 1,8mmHg, entre pH 6 e 9, respectivamente. Apresentando uma baixa afinidade por oxigênio, em toda a faixa de pH analisada, em relação à hemoglobina humana HbA_0. A Hb Bv-B mostrou, também, efeito Bohr alcalino, medido pela variação no número de H^+ ($\Delta H^+ = \Delta \log P_{50}/\Delta pH$) de -0,46±0,04 H^+/heme ou -1,84H^+/molécula, na faixa de pH entre 7 e 8.

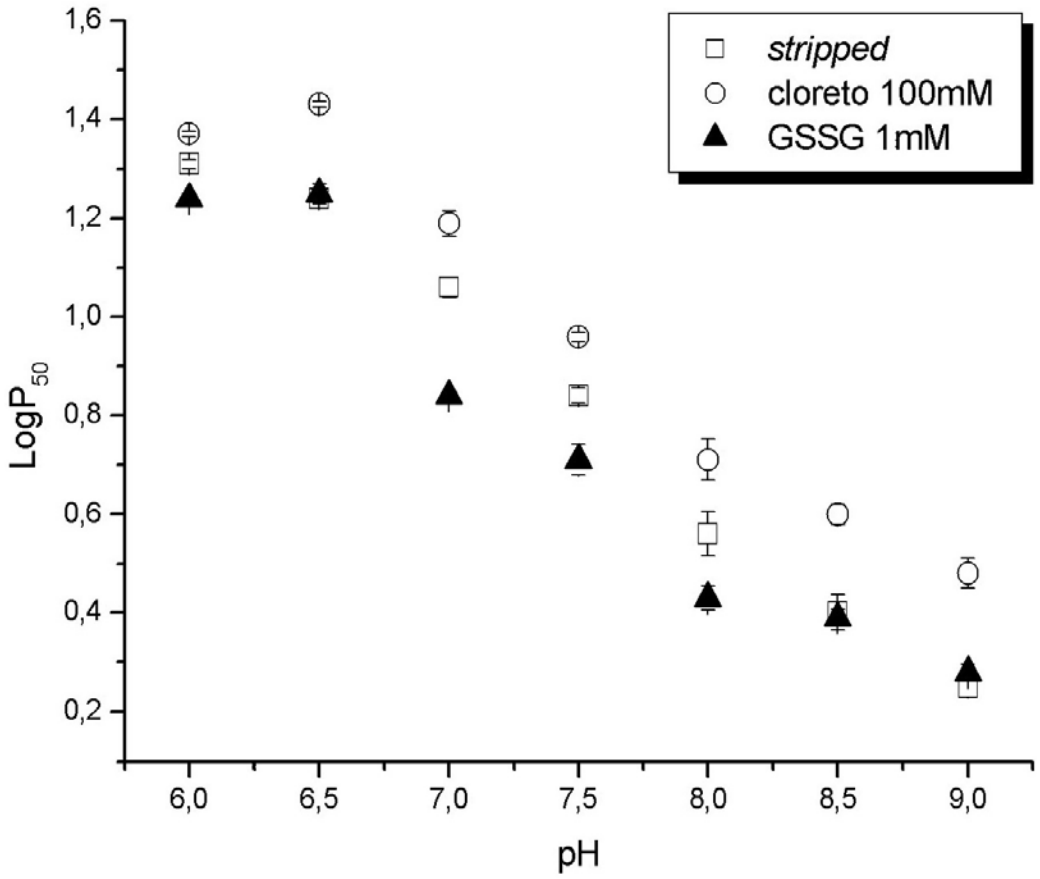


Figura 23. Gráfico log P_{50} *versus* pH. Mostrando a afinidade da Hemoglobina bovina Adulta, Hb Bv-B pelo O_2 com a variação do pH, na forma *stripped*, na presença de NaCl e GSSG à temperatura de 20ºC.

A oxigenação da hemoglobina bovina, também, foi cooperativa para a forma *stripped*. O coeficiente de Hill (n_{50}) mostrou-se variável entre pH 6,0 a 9,0, com valores entre 1,5 e 2,2, respectivamente. Apresentou um aumento da cooperatividade em pH 8,0 (n_{50}= 2,6) (Fig.24).

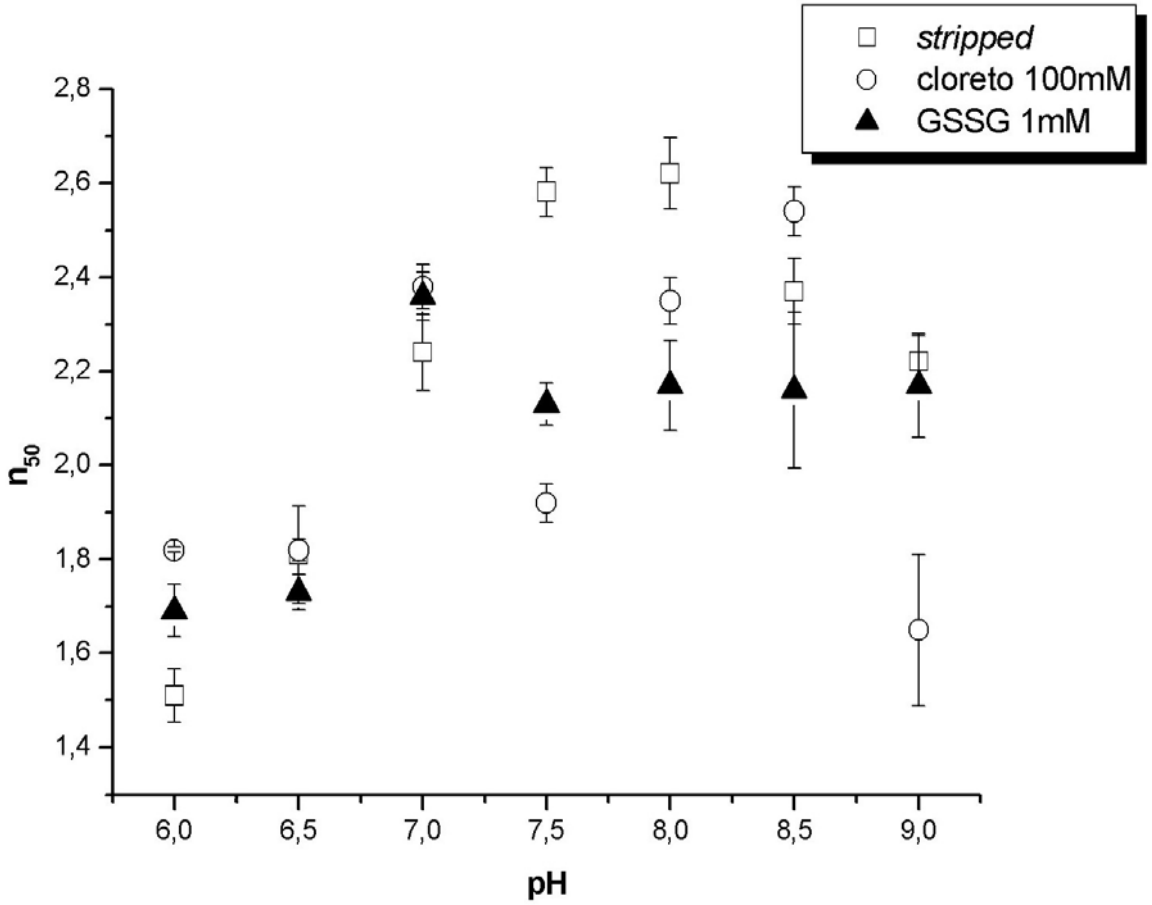


Figura 24. Gráfico da cooperatividade (n_{50}) *versus* pH para a Hemoglobina bovina adulta , Hb Bv-B, em diferentes pH a 20ºC. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 23.

Na presença de Cl^- (NaCl 0,1M), o comportamento da hemoglobina bovina foi semelhante ao da forma *stripped*, apresentando efeito Bohr alcalino (–0,47±0,01H^+/heme). Os valores de P_{50} variam de 23,8 a 3,0mmHg entre pH 6,0 e 9,0, sendo maiores em relação à forma *stripped*, indicando baixa afinidade ao oxigênio.

Os íons cloreto são moduladores alostéricos dominantes em hemoglobina bovina e, por causa disto têm sido reportados como grandes moduladores na afinidade da Hb bovina pelo O_2, em relação a Hb humana (PERUTZ et al., 1994).

Na presença de Glutationa Oxidada (GSSG 1,0mM), o comportamento da hemoglobina bovina é semelhante ao da forma *stripped*, variam de 18,1 a 2,0mmHg, entre pH 6,0 a 9,0, respectivamente. Contudo, a variação no número de prótons diminui, que nesse caso, foi de -0,39±0,05H^+/heme ou -1,56H^+/molécula, na faixa de pH entre 7 e 8.

A figura 24 ilustra um gráfico da cooperatividade, nas três condições experimentais analisadas (*stripped*, com NaCl 100mM e com Glutationa Oxidada 1mM), observamos em todas as faixas de pH, um processo cooperativo de ligação de oxigênio. Na forma *stripped*, a cooperatividade atinge valores máximos em pH 8,0 (n_{50}= 2,6).

O coeficiente de Hill (n_{50}) mostrou-se variável entre os pH 6,0 e 9,0, em todas as condições analisadas, mas nunca assume valores de n_{50} iguais a 1, o que caracterizaria processo não cooperativo de ligação de O_2, tal como, na mioglobina.

Na forma *stripped*, a hemoglobina humana apresentou valores de P_{50} inferiores aos da hemoglobina bovina, na variação do pH. Indicando que a hemoglobina bovina tem baixa afinidade ao oxigênio em relação à hemoglobina humana, o que confirma os achados de Abelson e Simon (1994).

Nas outras condições analisadas (cloreto e glutationa oxidada) a hemoglobina bovina, também, apresentou baixa afinidade ao oxigênio, se comparada à hemoglobina humana.

Em relação à cooperatividade, as formas analisadas, tanto para Hb humana quanto para a Hb bovina, apesar de ocorrer variação, sempre apresentaram processo cooperativo de ligação de O_2 (coeficiente de Hill maior que 1).

4.2.c. Titulação com Glutationa Oxidada :

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de Glutationa Oxidada para determinar a afinidade de ligação das hemoglobinas por oxigênio.

Como mostra a figura 25, a Hb A_0 (humana adulta) apresenta baixa afinidade por O_2, na forma *stripped*. Contudo, na presença de GSSG 0,1mM, o valor da P_{50} diminui de 1,8mmHg para 1,6mmHg, decréscimo que continua até atingir em torno de 1,1mmHg com 0,5mM de GSSG, não mostrando alterações significativas até valores iguais a 2,0mM.

Observa-se, assim, uma elevação em torno de 39% da afinidade por O_2. Em uma primeira avaliação, pois temos apenas três pontos, na fase inicial da titulação (concentrações até 0,5mM de GSSG) foi obtido, da inclinação do gráfico $\Delta\log P_{50}/\Delta\log[GSSG]$ (não mostrado), um Δx= -0,2/heme, sugerindo que haveria um sítio de ligação para GSSG por molécula de Hb, ao multiplicarmos aquele valor por quatro. Isso é confirmado pelo fato de acima de 0,5mM de GSSG não haver mais variação da afinidade (a inclinação é de -1,0/molécula).

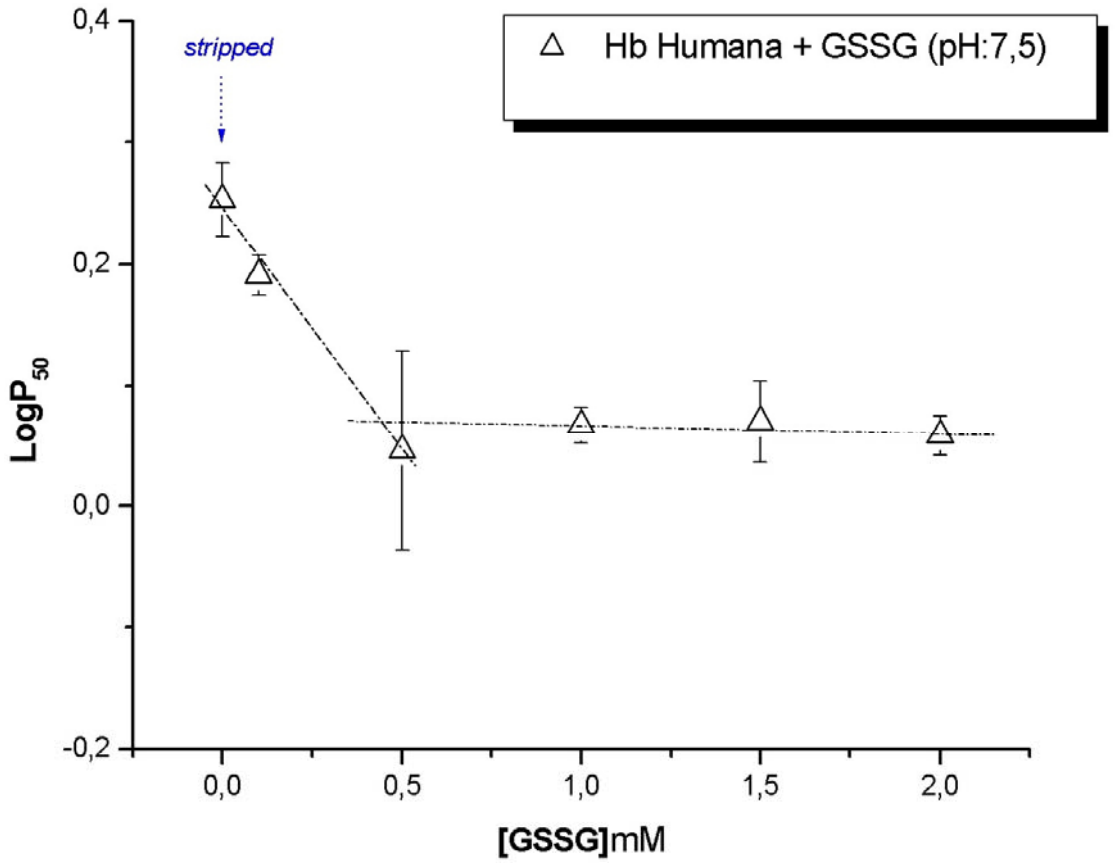


Figura 25. Efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb A_0 (humana adulta), na presença de tampão HEPES 30mM, pH 7,5 a 20ºC.

Na figura 26, observamos que a afinidade de ligação ao O_2 da Hb Bv-B (bovina adulta), também, apresentou o mesmo comportamento funcional: baixa afinidade na forma *stripped* com aumento inicial da afinidade e posterior manutenção dos valores de P_{50}. Também, podemos observar que entre 0 e 0,5mM de GSSG obtém-se ($\Delta logP_{50}/\Delta log[GSSG]$) um Δx= -0,2/heme. Este resultado é semelhante ao comportamento da Hb humana, indicando, também, que existe um sítio de ligação para GSSG por molécula de Hb.

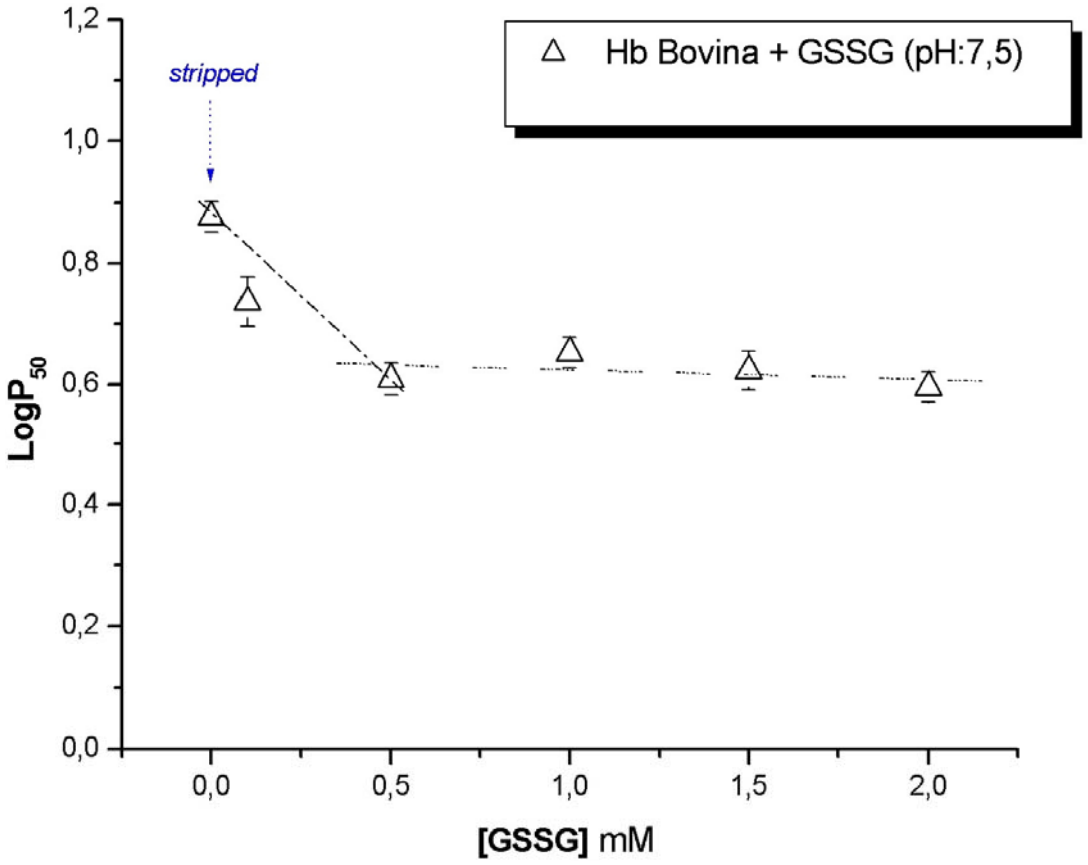


Figura 26. Efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb Bv-B (bovina adulta), na presença de tampão HEPES 30mM, pH 7,5 a 20ºC.

Devemos observar que a $\Delta\log P_{50}/\Delta\log[GSSG]$ foi uma adaptação da equação de interrelação (*linkage*) de Wyman ($-\Delta x = \Delta\log P_{50}/\Delta\log[X]$), onde Δx fornece o número de moléculas de um ligante qualquer "X" ligado por subunidade (AMICONI et al., 1985).

Dessa forma, ambas as hemoglobinas apresentam um padrão comum, independente das diferenças intrínsecas de afinidade por O_2. A elevação da afinidade mostra que a GSSG liga-se à forma R da hemoglobina, estabilizando-a. Isso contraria nossas expectativas iniciais de que o fato da GSSG carregar quatro grupos aniônicos em pH fisiológico causaria a diminuição da afinidade por oxigênio, por ligação ao sítio de ligação de fosfatos.

Uma análise da ligação da GSSG à hemoglobina humana aplicando a equação: $\log P_{50}^{x} = \log P_{50}^{o} + 1/4 * \log(1+K_D*x)/(1+K_O*x)$ (BONILLA et al., 1994), onde a afinidade por oxigênio na presença do ligante x (GSSG) é analisada em termos daquela na ausência de GSSG ($\log P_{50}^{o}$) e as constantes K_D e K_O são as constantes de ligação à forma desoxigenada e oxigenada, respectivamente.

Um ajuste não linear de parâmetros (figura 27) mostrou valores de $K_D = 4{,}5 \times 10^{-15} \pm 0$ e $K_O = 2{,}3 \times 10^{5} \pm 3{,}5 \times 10^{4}$M. Apesar de se tratar de uma análise preliminar, confirma o predomínio da ligação da GSSG à forma oxigenada, com ligação nula à desoxi-hemoglobina.

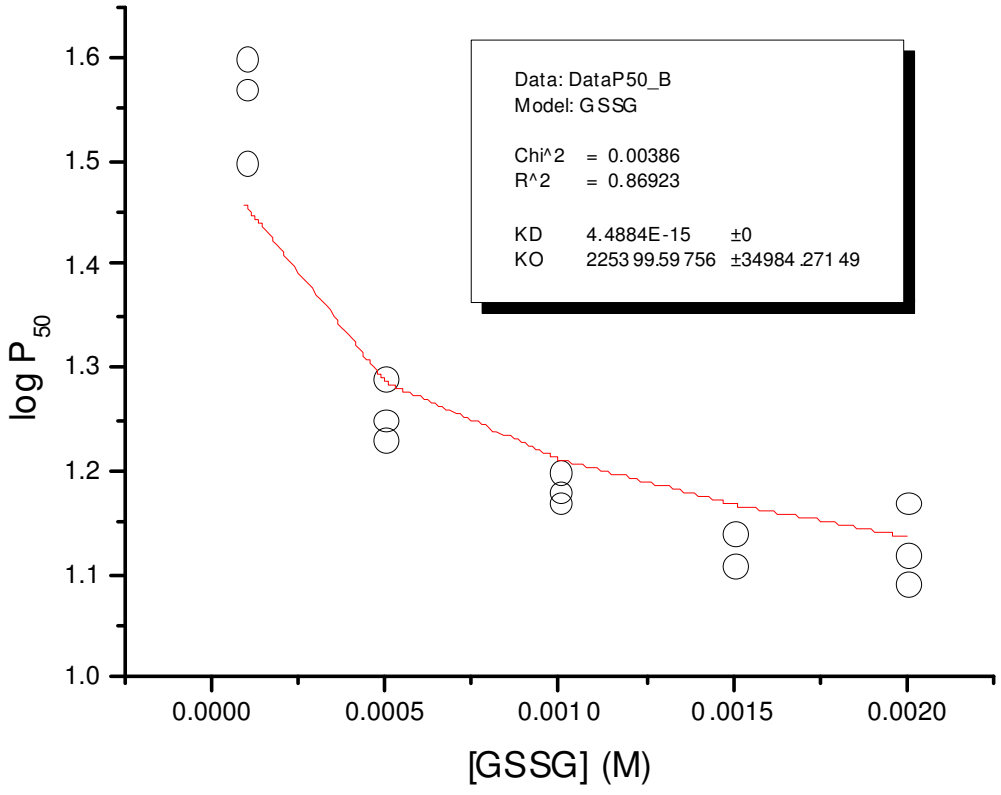


Figura 27. Ajuste da ligação de GSSG à hemoglobina humana a 20°C em pH 7,5.

A titulação com GSSG em diferentes concentrações na presença de ATP 1,0mM, para HbA_0, apresentou um pequeno aumento na afinidade por O_2. A amostra somente na presença de ATP, o valor da P_{50} foi de 8,0 mmHg, e quando foi adicionado GSSG 0,1 mM, a P_{50} diminuiu para 6,6 mmHg, mantendo-se constante até valores iguais a 2,0 mM.

No entanto, a Hb Bv-B, com a adição de GSSG, na presença de ATP, não mostrou diferença na afinidade por O_2, pois os valores da P_{50}, não tiverem diferenças significativas.

Avaliamos, também, o efeito de diferentes concentrações de Glutationa Oxidada para determinar a afinidade de ligação da Hb-II do matrinxã, peixe da espécie *Brycon cephalus,* por oxigênio.

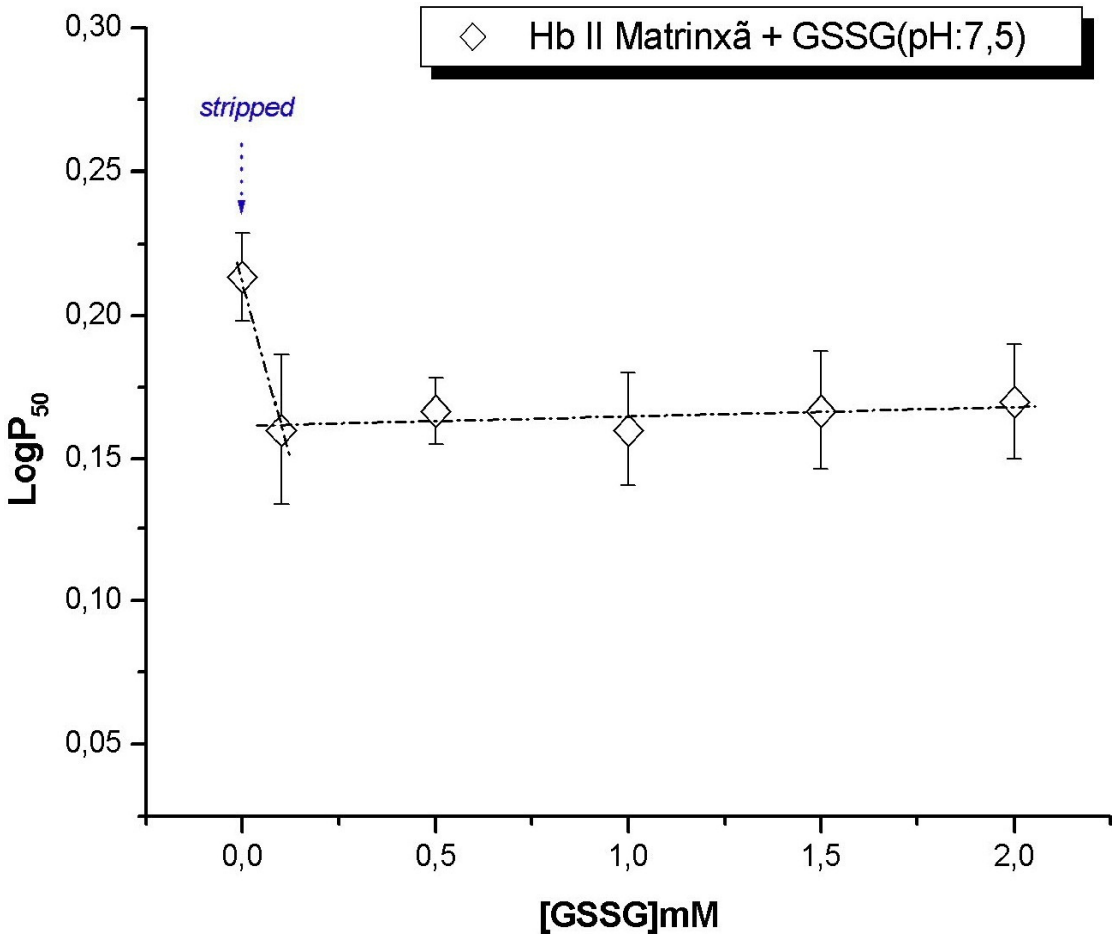


Figura 28. Efeito da concentração da Glutationa Oxidada (GSSG) na afinidade por oxigênio da Hb –II do matrixã, na presença de tampão HEPES 30mM, pH 7,5 a 20ºC.

Como mostra a figura 28, a Hb-II do matrixã, na presença de GSSG, apresentou elevação da afinidade por O_2. O valor da P_{50} foi de 1,63mmHg na forma *stripped*, enquanto, na presença de GSSG 0,1mM, o valor da P_{50} diminui para 1,46mmHg, não mostrando alterações significativas até valores iguais a 2,0mM. Na fase inicial da titulação (concentração até 0,1mM de GSSG) foi obtido, da inclinação do gráfico $\Delta\log P_{50}/\Delta\log[GSSG]$, um Δx= -0,2/heme, sugerindo que há um sítio de ligação para GSSG por molécula de Hb. Este resultado é semelhante ao comportamento da Hb humana e bovina.

4.2.d. Titulação com Glutationa Reduzida:

Investigamos o efeito de diferentes concentrações de Glutationa Reduzida para determinar, também, o efeito sobre a afinidade por O_2.

A figura 29 mostra claramente a influência da GSH na oxigenação da Hb A_0 (humana adulta). A diferença do antes relatado para a GSSG, podemos observar que à medida em que, a GSH foi adicionado à solução, a afinidade de ligação da Hb ao O_2 foi diminuindo, sem ter inflexões na faixa de concentração testada.

Na presença de GSH 0,1mM, o valor da P_{50} foi de 0,9mmHg (valor igual à forma *stripped*), contudo, com aumento da concentração de GSH, a P_{50} aumentou a 1,2mmHg, a 2,0mM de GSH.

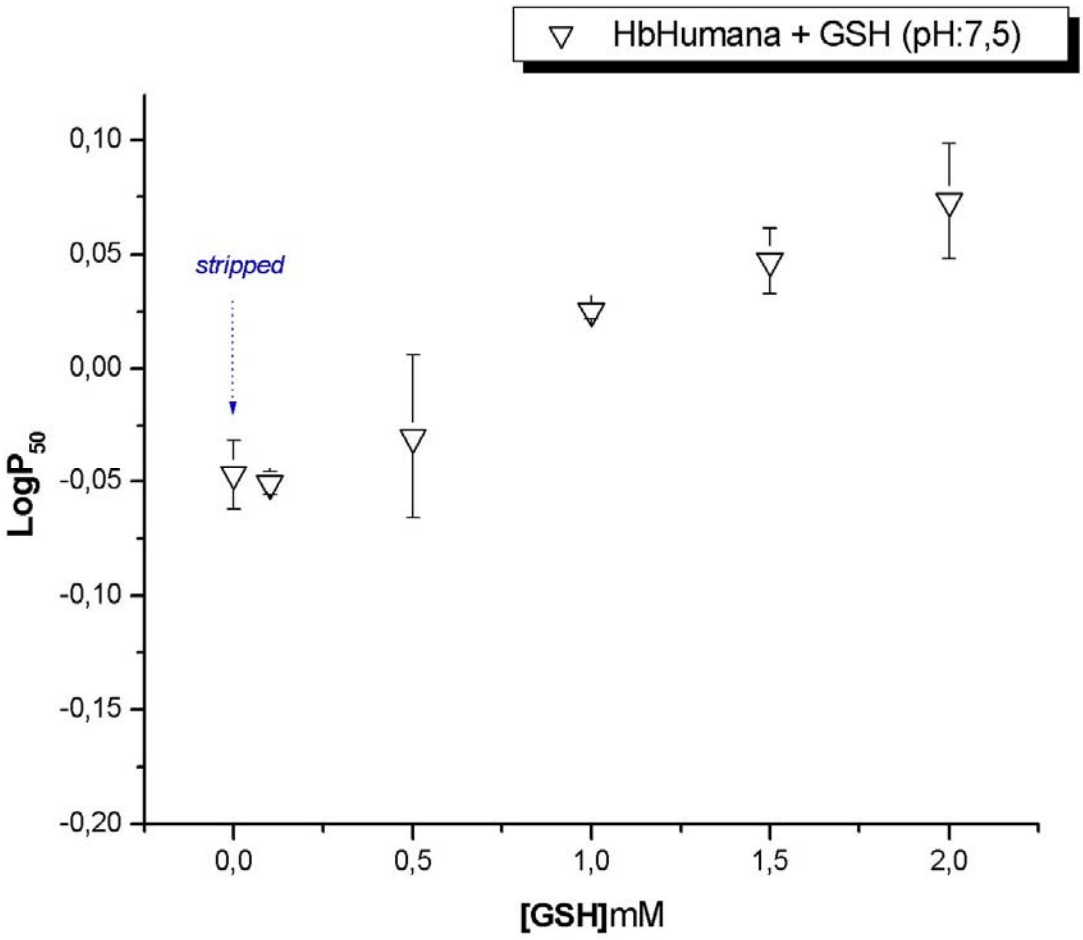


Figura 29. Efeito da concentração da Glutationa Reduzida (GSH) na afinidade por oxigênio da Hb A_0 (humana adulta), na presença de tampão HEPES 30mM, pH 7,5 a 20ºC.

Na figura 30, observamos que a afinidade de ligação ao O_2 da Hb Bv-B (bovina adulta), apresentou um comportamento funcional diferente. A medida, em que a GSH foi adicionado à solução, não ocorreram alterações significativas quanto à afinidade de ligação do O_2 .

Os valores da P_{50} variam de 3,4 a 3,5mmHg, entre a forma *stripped* e as concentrações de 0,1, 1,0 e 2,0mM de GSH, sendo que na presença de 0,5 e 1,5mM de GSH, o valor da P_{50}, foi de 4mmHg.

Dessa forma, a hemoglobina humana apresentou uma diminuição na afinidade de ligação do O_2, na presença de GSH, enquanto que a hemoglobina bovina, não apresentou alterações significantes na afinidade de ligação ao O_2, com o aumento da concentração de GSH.

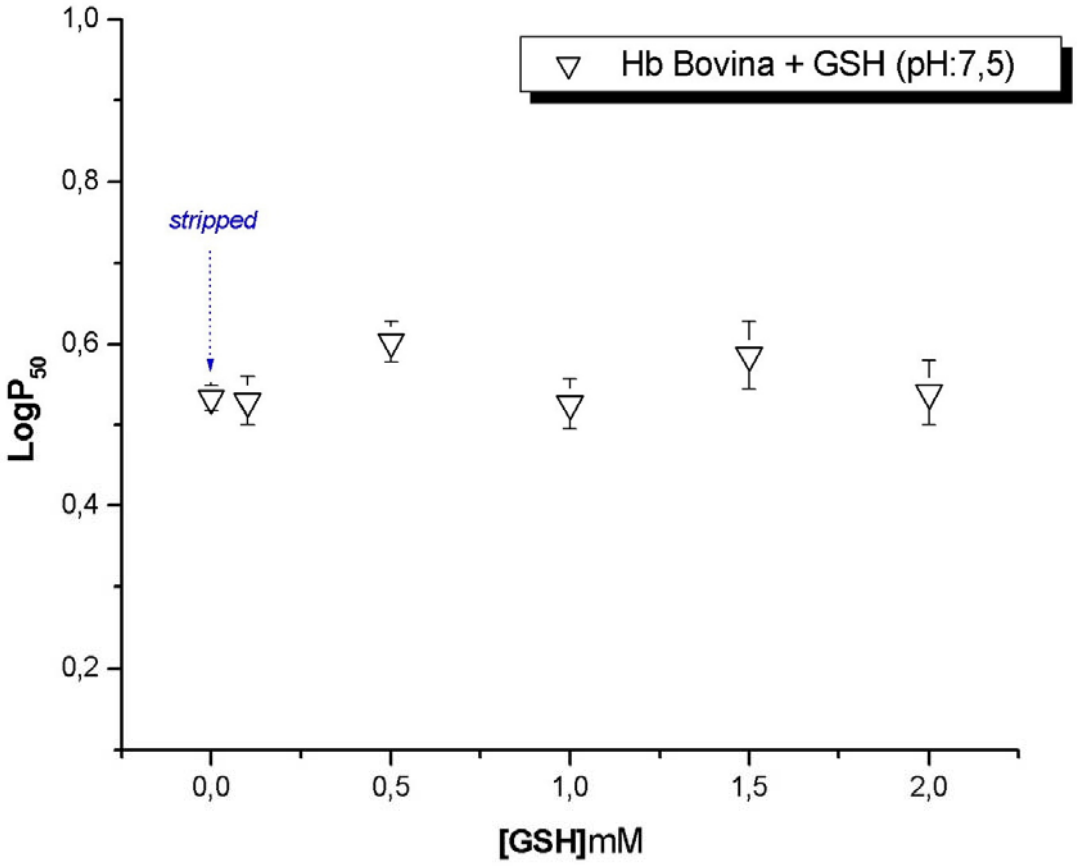


Figura 30. Efeito da concentração da Glutationa Reduzida (GSH) na afinidade por oxigênio da Hb Bv-B (bovina adulta), na presença de tampão HEPES 30mM, pH 7,5 a 20ºC.

4.2.e. Análise espectral da transição T-R:

Na medida em que os gráficos do efeito da ligação de GSSG sugerem ligação à forma oxigenada (R) da hemoglobina, no intuito de analisarmos se ocorre a transição T →R, tanto na hemoglobina humana, quanto da bovina, realizamos medidas espectrais na faixa de luz ultravioleta, na presença de GSSG (figuras 31 e 32).

As figuras mostram as diferenças espectrais que acompanham a transição T-R, em pH 7,5. A banda em 290, correspondente à forma T, não apareceu tanto na presença de GSSG à forma oxigenada, quanto na forma desoxigenada. Confirmando o predomínio da ligação da GSSG à forma oxigenada.

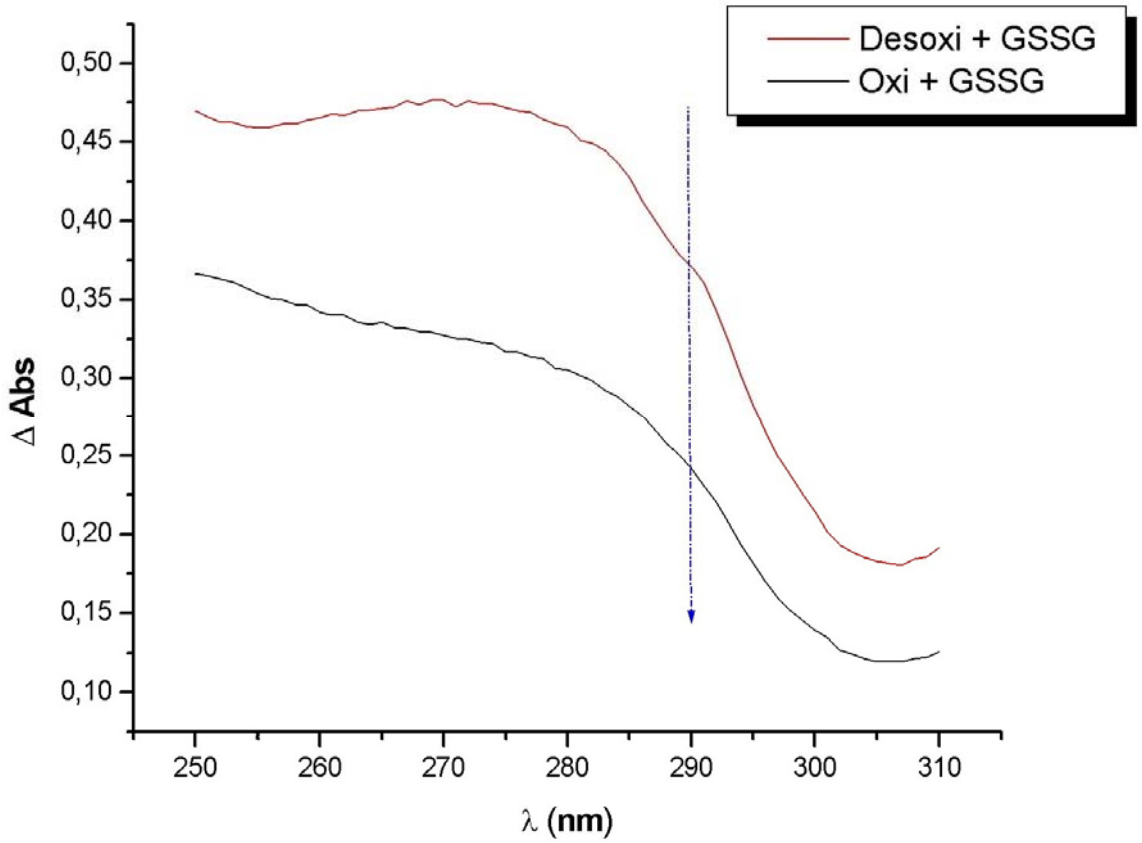


Figura 31. Transição T⟶R da Hb A_0 (humana adulta) induzida pela ligação da GSSG às formas desoxigenada e oxigenada, na presença de tampão Hepes 30mM, pH 7,5 e GSSG 1mM a 20ºC.

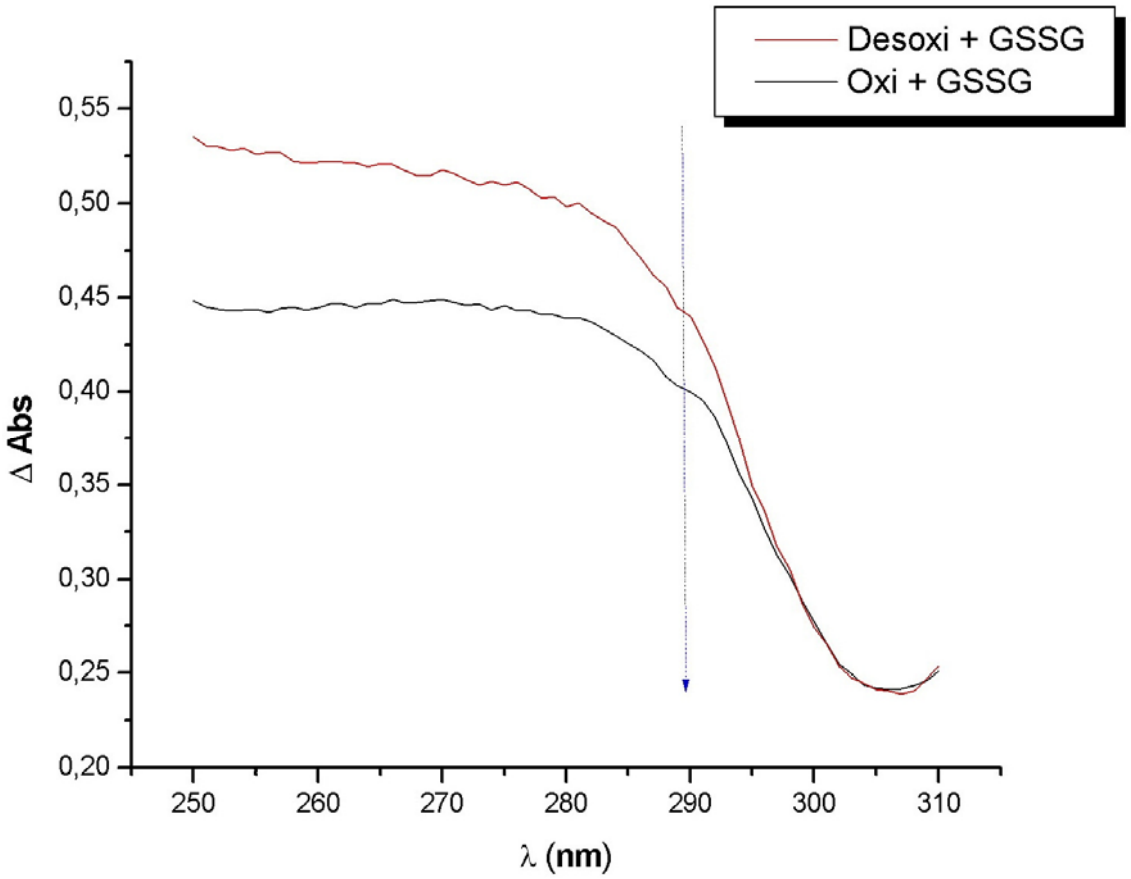


Figura 32. Transição T⟶R da Hb Bv-B (bovina adulta) induzida pela ligação da GSSG às formas desoxigenada e oxigenada, na presença de tampão Hepes 30mM, pH 7,5 e GSSG 1mM a 20ºC.

4.3. Bloqueio da Cisteína β93 na hemoglobina :

As figuras 33 e 34 mostram as análises eletroforéticas de amostras de hemoglobina humana e bovina, respectivamente, antes e depois do bloqueio das cisteínas β93.

Na figura 33, observamos a formação de uma nova banda eletroforética na posição 4, na qual representa a incubação da hemoglobina humana majoritária Hb A_0 com glutationa oxidada- GSSG, em relação à posição 1, representada somente pela Hb A_0.

A incubação da Hb A_0, na presença de GSSG, produz uma nova banda eletroforética, que representa a S-tiolação das cisteínas reativas da hemoglobina, aumentando a mobilidade na eletroforese (DAFRÉ & REISCHL, 2006; HUISMAN & DOZY, 1962).

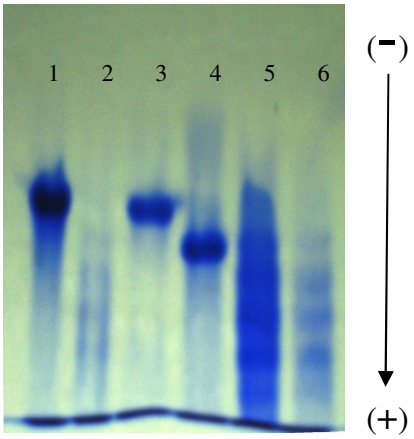


Figura 33. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 8% de amostras de Hb humana A. A banda na posição 1 representa a Hb A_0 após purificação, a posição 2 mostra a Hb A_0 modificada, a posição 3 representa a Hb A_0 na presença de glutationa na forma reduzia (GSH), a posição 4 representa Hb A_0 na presença de glutationa na forma oxidada (GSSG), a posição 5 representa Hb A_0 + GSH modificada e a posição 6 representa Hb A_0 + GSSG modificada.

Na figura 34, observamos também, a formação de uma nova banda eletroforética na posição 3, que representa a incubação da hemoglobina bovina- Hb Bv-B com a glutationa oxidada.

Nas posições 2, 5 e 6 (fig.33) e posições 4,5 e 6 (fig.34) verificamos a formação de várias bandas eletroforéticas, quando incubamos a hemoglobina humana e bovina com Iodoacetamida (IAA). A modificação da hemoglobina por reagentes sulfidrila como a Iodoacetamida, aumenta a susceptibilidade do heme à oxidação, promovendo intensa

polimerização da hemoglobina e a formação de misturas dissulfetos (TORSONI & OGO, 2000).

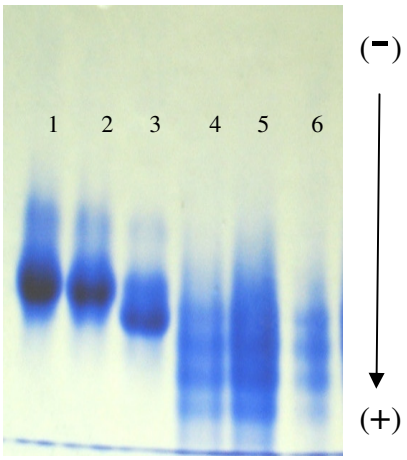


Figura 34. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 8% de amostras de Hb bovina. A banda na posição 1 representa a Hb Bv-B após purificação, a posição 2 representa Hb Bv-B na presença de glutationa na forma reduzia (GSH), a posição 3 representa Hb Bv-B na presença de glutationa na forma oxidada (GSSG), a posição 4 mostra a Hb Bv-B modificada, a posição 5 representa Hb Bv-B + GSH modificada e a posição 6 representa Hb Bv-B+ GSSG modificada.

De fato, observamos uma elevada concentração de meta-hemoglobina nas amostras bloqueadas com IAA, que prejudicaram as análises funcionais.

5 DISCUSSÃO

5. Discussão:

5.1. Propriedades Funcionais:

O presente trabalho demonstrou que ocorre influência tanto da Glutationa Oxidada, como da forma Reduzida, na afinidade de ligação das hemoglobinas estudadas, por oxigênio.

As hemoglobinas humana e bovina apresentaram efeito Bohr alcalino, nas condições experimentais estudadas (*stripped*, cloreto e GSSG). O processo de oxigenação da hemoglobina, para aquelas que apresentam efeito Bohr alcalino, ocorre com liberação de prótons (BRITTAIN, 2005). Com a diminuição do pH, a afinidade da hemoglobina pelo O_2 diminui, em virtude da ligação de prótons à forma desoxigenada; diminuindo a afinidade por oxigênio, evidente pelo aumento da P_{50}, verificado nas hemoglobinas humana e bovina.

A hemoglobina humana, tanto *stripped* quanto na presença de GSSG 1,0mM, apresentou maior afinidade de ligação ao O_2, do que na presença de cloreto (figura 22). Isso confirma que o cloreto reduz a afinidade do O_2 pela hemoglobina de mamíferos de forma significativa (PERUTZ et al., 1994). A diminuição da afinidade da hemoglobina por oxigênio com adição de cloreto, deve-se ao fato, que este íon age como efetor alostérico que estabiliza a estrutura quaternária desoxigenada, a qual se encontra predominantemente na forma tensa ou T.

Durante a desoxigenação, a molécula de hemoglobina muda sua conformação do estado R para o estado T, ocorrendo uma abertura da cavidade central do tetrâmero, expondo alguns resíduos carregados positivamente. Perutz et al. (1994) e Bonaventura et al. (1994), propuseram que o excesso dessas cargas da cavidade central da proteína, são

neutralizadas por condensação iônica de cloreto, ou seja, este ânion pode blindar parcialmente estas cargas positivas, diminuindo a repulsão eletrostática entre elas, deslocando assim o equilíbrio alostérico de volta à conformação T da proteína, o que diminui sua afinidade pelo O_2.

A hemoglobina bovina nas condições *stripped* e na presença de GSSG 1,0mM, também, como a hemoglobina humana, apresentou maior afinidade por O_2, do que na presença de cloreto (figura 24).

Hemoglobinas de ruminantes apresentam menor afinidade de ligação por oxigênio na presença de cloreto (DE ROSA et al., 2004; FRONTICELLI & BUCCI, 1994).

Estudos realizados por Di Vito et al. (2002), mostraram que os três fenótipos Hb Bv-A, B e AB, da raça Nelore, não apresentam diferenças na afinidade por O_2. Eles, também, observaram que na presença de NaCl, as hemoglobinas bovina, apresentaram menor afinidade de ligação por oxigênio, quando comparada à forma *stripped*. Resultados semelhantes foram obtidos, também, por Fronticelli & Bucci (1994) e Sasagawa et al. (2006).

A diminuição da afinidade da Hb Bv ao O_2 na presença de cloreto, deve-se ao fato desse ânion também, como na Hb A_0, estabilizar a estrutura quaternária desoxigenada.

Exceto pela substituição da Met-β1 na Hb Bv pela Val-β1 e na His-β2 na Hb A_O, os resíduos polares na cavidade central do tetrâmero são os mesmos nas duas espécies e o efeito alostérico do cloreto, também são iguais para ambas hemoglobinas (PERUTZ et al., 1994; FRONTICELLI et al., 1995).

A existência de sítios específicos de ligação de cloreto a hemoglobina envolvendo resíduos Lys-β76 e a Ala-β76 na Hb A_0, juntamente com os resíduos Lys-β8 e His-β77,presentes tanto na Hb A_0, como na Hb-Bv, constituem um novo sítio de ligação do O_2 (De ROSA et al., 2004).

A afinidade por oxigênio da hemoglobina bovina é regulada exclusivamente por íons cloretos (FRONTICELLI et al., 1984), enquanto para a hemoglobina humana, a regulação da oxigenação, deve-se principalmente ao fosfato orgânico, 2,3-BPG.

O 2,3-BPG, um composto fosfatado de caráter aniônico derivado de uma via auxiliar da glicólise, possui a propriedade de ligar-se fortemente à desoxi-hemoglobina. Esta especificidade de ligação do BPG, é devida à existência de um sítio de ligação desta proteína na estrutura T, localizado na cavidade central da hemoglobina (ARNONE, 1972). Existe, também, alguma ligação à forma oxigenada, porém em geral em grau bem menor; isso é levado em consideração ao fazer o cálculo das constantes de ligação de fosfatos ou outras moléculas à hemoglobina (BONILLA et al., 1994).

Pelos resultados obtidos em nossos experimentos, podemos observar que as hemoglobinas bovina, humana e de matrinxã, na presença de GSSG, apresentaram aumento da afinidade de ligação por O_2. Isso mostra um efeito oposto do antes descrito para o 2,3-BPG.

Podemos observar que em concentrações acima de 0,5mM de GSSG (figuras 26, 27 e 29) não ocorreu alterações significativas até valores iguais a 2,0mM, sugerindo, também, que há um sítio de ligação para GSSG por molécula de hemoglobina.

Para a hemoglobina humana, o valor encontrado para a constante de ligação à forma desoxigenada (K_D) e oxigenada (K_O) foi de $4{,}5x10^{-15}$±0M e $2{,}3x10^{5}$±$3{,}5x10^{4}$M, respectivamente, confirmando o predomínio de ligação da GSSG à forma oxigenada. Em contrapartida, De Rosa et al.(1998), relatou uma constante de ligação de ATP à forma desoxigenada da hemoglobina (K_D= $3{,}6x10^{4}$M), sugerindo predomínio de ligação de ATP à forma desoxigenada.

Nossas expectativas iniciais do trabalho, eram de que a GSSG, por possuir quatro grupos aniônicos em pH fisiológico, se ligaria aos sítios de ligação dos fosfatos,

diminuindo a afinidade de ligação por oxigênio, por estabilização da forma desoxigenada. No entanto, verificamos que a GSSG estabiliza a forma oxigenada.

Poy (2008) relatou um efeito que guarda certa semelhança para a hemoglobina majoritária (Hb-II) do peixe matrinxã na presença de ATP; esse fosfato se liga a dois sítios nessa proteína, e acima de certa concentração (3 mM) ou abaixo de pH 7,0, liga-se à forma oxigenada de forma significativa.

Embora seja conhecido que a interação da Glutationa Reduzida através de pontes dissulfeto, entre o grupo sulfidrila da cisteína do tripeptídio e o resíduo Cys-β93 da hemoglobina, seja capaz de aumentar a afinidade por O_2 (CRAESCU et al., 1986; GAREL et al., 1982), o fato das amostras terem atingido o estado desoxigenado (coeficiente de Benesch maior do 1,23) mostra que esse tipo de interação pode ser descartado, e o efeito deve-se à interação alostérica. Se houvesse a ligação à Cys-β93, a hemoglobina não conseguiria ser desoxigenada, pois a glutationa impediria esse resíduo de se "esconder" no interior da estrutura ao fazer a transição R→T.

Craescu et al. (1986) demostraram que a afinidade pelo O_2 da hemoglobina glutationil (G-Hb) humana, na presença de 2,3-BPG diminui, indicando que os sítios de ligação para fosfatos orgânicos não são alterados na G-Hb. O resíduo Cys-β93 reage com grupos sulfidrilas mais rapidamente na forma oxigenada que na desoxigenada. Nesta, a reação do grupo sulfidrila da Cys-β93 está bloqueado por pontes salinas entre a His-β146 e Asp-β94, sendo que na forma oxi, a ponte salina está quebrada (MAKINO & SUGITA, 1982; WODAK et al., 1986)).

Através de uma análise espectral da transição T-R, os gráficos do efeito de ligação de GSSG (figuras 32 e 33) tanto para hemoglobina humana, quanto bovina, sugerem ligação à forma oxigenada de ambas hemoglobinas. A banda em 290nm, correspondente à

forma T(desoxi), não aparece tanto na presença de GSSG adicionado à forma oxigenada, quanto na forma desoxigenada, confirmando o predomínio da ligação da GSSG à forma oxigenada.

Verificamos, também, o efeito da Glutationa Reduzida em diferentes concentrações, sobre a afinidade por O_2, nas hemoglobinas humana e bovina.

A influência da GSH na oxigenação da Hb A_0, mostrou-se diferente em relação à influência da GSSG. Podemos observar que a afinidade da hemoglobina ao oxigênio foi diminuindo, com o aumento da concentração da GSH (figura 30). No entanto, para a Hb Bv, não ocorreram alterações significativas quanto à afinidade de ligação do O_2, na medida em que, aumentássemos a concentração de GSH (figura 31). Esses resultados reforçam de tratar de uma ligação no sítio de fosfatos (estado T), pois a Hb Bv apresenta substituições de resíduos que enfraquecem a ligação de 2,3-BPG.

6 CONCLUSÃO

6. Conclusões:

De acordo com os resultados e discussões apresentados neste trabalho, concluímos que:

1. A Glutationa Oxidada atua como efetor alostérico heterotrópico em hemoglobinas humana, bovina e matrinxã (Hb-II), aumentando a afinidade de ligação ao oxigênio pela hemoglobina. A única condição na qual houve diminuição foi para a Hb humana em pH ácido.

2. As Hb A_0, Hb Bv-B e Hb-II (matrinxã) na presença de GSSG apresentaram predomínio de ligação à forma oxigenada da hemoglobina, estabilizando a conformação de mais alta afinidade por oxigênio. Essa ligação não afetou o efeito Bohr alcalino.

3. A oxigenação da Hb A_0 e Hb Bv-B sempre foi cooperativa, mostrando valores de $n_{50}>1$.

4. A hemoglobina humana na presença da GSH apresentou menor afinidade por O_2, quando comparada à forma *stripped* da hemoglobina, enquanto para a Hb Bv o efeito não foi perceptível.

5. O efeito diferente constatado para as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) da hemoglobina levanta a possibilidade da primeira exercer um efeito sinérgico com o de fosfatos em condições fisiológicas normais, enquanto sob estresse oxidativo a forma oxidada teria uma pequeno efeito contrário.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, J.N.; SIMON, M.I. **Methods in Enzymology**. New York:Academic Press, v.231, p. 150,1994.

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

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins:** Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos, Viçosa: UFV, 1998.

AMICONI, G.; BERTOLLINA, A.; BELLELLI, A.; COLETTA, M.; CONDÔ, S.G.;BRUNORI, M. Evidence for two oxygen-linked binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. **European Journal of Biochemitry**, v. 150, p.387-393, 1985.

BARROS, B.; STOPPA,G.R.; TORSONI, M.A.; VIANA R.I.; CESQUINI,M.;OGO S.H. Involvement of SH of Hb from *Geochelone carbonaria* in the oxidation kinetic. **Biochem Mol Biol Int**. 44(4):851-60. 1998.

ARNONE, A. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3 Diphosphoglicerate to Human Deoxyhaemoglobin. **Nature**, v.237, p. 146-149, 1972.

BAYNES, J.B.; DOMINICZACK,M.H. **Bioquímica Médica**.1 ed., Manole,2000.

BECKMAN, K.,B.; AMES, B.,N. The free radical theory of aging matures.**Physiol. Rev.** 78(2):547- 581, 1998.

BONAVENTURA, C.; ARUMUGAM, M.; CASHON, R.; BONAVENTURA, J.; MOO-PENN, W. F. Chloride masks effects od opposing positive charges in Hb A and Hb Hinsdale (beta 139 Asn->Lys) that ca modulate cooperativity as well as oxygem affinity. **J. Mol. Biol.**, v. 239, p. 561-568, 1994.

BONILLA, G.O.; NAGATOMO, C.L.; MATSUURA, M. S. A.; FOCESI JR, A. Interactions of Adenosine Triphosphate with Snake Hemoglobins. Studies in *Liophis Miliaris*, *Boa Constrictor* and *Bothrops Alternatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 109, n.4, p. 701-705, 1994.

BRITTAIN, T. Root effect hemoglobins. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V.99, p.120-129, 2005.

BUSH, M. R.; HO, C. Effects of anions on the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin. **Biophysical Chemistry**. v.37, p.313-322, 1990.

CAMBIER, C.; WIERINDRX, M.; CLERBAUX, T.; DETRY, B.; LIARDET, M. P.; MARVILLE, V.; FRANS, A.; GUSTIN, P. Haemoglobin oxygen affinity and regulating factors of the blood oxygen transport in canine and feline blood. **Research in Veterinary Science**, v.77, p. 83-88, 2004.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed., Artmed, 2003.

CESQUINI, M.; BARROS, B.F.;VIANA, R.I.; STOPPA, G.R.; TORSONI, M.A.; OGO,S.H. Effect of swim exercises on the antioxidant system of erythrocytes in rats. **Biochem Mol Biol Int.** 1998.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; **Bioquímica Ilustrada**. 2.ed.Porto Alegre: Artmed, 2002.

COATES, M. Hemoglobin function in the vertebrates: An evolutionary model. **Journal of Molecular Evolution,** v.6, n.4, p. 285-307, Dec., 1975.

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

COOPER, C.E.; VOLLAARD, N. B. J.;CHOUEIRI, T.;WILSON, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions,** vol.30, 280-285, 2002.

CRAESCU, C.T.; POYART, C.S.; GAREL, M.C.; KISTER, J.; BEUZARD, Y. Covalente binding of Glutathione to hemoglobin. II. Functional Consequences And Structural Changes Reflected In NMR Spectra. **J. Biol. Chem**. v. 261 (5), n.31, p. 14710-14716, 1986.

DAFRÉ, A. L.; REISCHL, E. Hemoglobin S-thiolation during peroxide-induced oxidative stress in chicken blood. **Comparative Biochemistry and Physiology**, C 142, 188-197, 2006.

DE ROSA, M.C.; CASTAGNOLA, M.; BERTONATI, C.; GALTIERI, A.; GIARDINA, B. From the Artic to fetal life: physiological importance and structural basis od an 'additional' chloride-binding site in haemoglobin. **Biochem J**., v.380, p. 889-896, 2004.

Di VITO,A.; SCHWANTES, A. R.; SCHWANTES, M., L., B. Functional properties of the three hemoglobin phenotypes of Nelore cattle. **Genetics and Molecular Biology,** v.25,nº 2,135-138, 2002.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev**.82:47-95, 2002.

FAGO, A.; GIANGIACOMO, L.; D'AVINO, R.; CARRATONE, V.; ROMANO, M.; BOFFI, A.; CHIANCONE, E. Hagfish Hemoglobins. Structure, Function and Oxygen-Linked Association**. J. Biol. Chem**. v.276, p. 274175-27423, 2001.

FIAMONCINI, R. L. **Análise do estresse oxidativo em jogadores juniores de futebol: comparação entre pré e pós-exercício aeróbico e anaeróbico**. 2002. 85 f Tese (Doutorado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina-Florianópolis.

FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. Conformational and Functional Characteristics of Bovine Hemoglobin**. Methods in Enzimology**, v.231, p. 150-163, 1994.

FRONTICELLI, C.; SANNA, M. T.; PEREZ-ALVARADO, G. C.; KARAVITIS, M.; LU, A. L. Allosteric Modulation by Tertiary Structure Mammalian Hemoglobins. Introduction of the Functional Characteristics of Bovine Hemoglobin into Human Hemoglobin by Five Amino Acid Substitutions. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.51, p.30588-30592, 1995.

FRONTICELLI, C.; BUCCI, E.; ORTH, C. Sovent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. Sensitivity of bovine hemoglobin to chloride ions. **J. Biol. Chem**., v. 259 (17), p. 10841-10844, 1984.

GAHR, M. C. ; BEUZARD ;Y. ;THILLET , J. ; DOMENGET, C. ; MARTIN, J. ; GALACTEROS, F. ; ROSA, J. Binding of 21 thiol reagents to human hemoglobin in solution and in intact cells. **Eur. J. Biochem**, 123-513, 1982.

GAREL, M.C.; DOMENGET, C.; CABURI-MARTIN, J.; PREHU, C.; GALACTEROS, F.; BEUZARD, Y. Covalente binding of Glutathione to hemoglobin.I. Inhibition Of Hemoglobin S Polymerization. **J. Biol. Chem**. v. 261 (5), n.31, p. 14704-14710, 1986.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Biochemistry.1st ed. Saunders College Publishing.1995.

GIARDINA, B.; AMICONI, G. Measurement of Binding of Gaseous and Nongaseous Ligands to Hemoglobin by Conventional Spectrophotometric Procedures. **Meth. Enzymol**. v. 76, p. 417-427, 1981.

GIARDINA, B.; MOSCA, D.; DE ROSA, M. C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to differente physiological requeriments. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, p. 229-244, 2004.

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE,I.; COLOMBO,R.; PETRALIA, S.; GIAMPAOLETTI, S.; MILZANI, A.; ROSSI, R. Protein Glutathionylation in Erythrocytes. **Clinical Chemistry**, 49 :327-330, 2003.

HUISMAN, T.H.J. e DOZY, A.M. Studies on the heterogeneity of hemoglobin.V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione.**J.Lab. & Clin.Med,** vol.60, n°2, pp 302-319.1962.

JENSEN, F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O_2 and CO_2 transport. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, p. 215-227, 2004.

KOSHLAND, D. E.; NEMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoreticals models in protein containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, p. 365-386, 1966.

MAKINO, N.; SUGITA, Y. The Structure of Partially Oxygenated Hemoglobin. **The Jornal of Biological Chemistry**, vol.257, nº 1, pp 163-168. 1982.

MANNING, J.; DUMOULIN, A.; LI, X.; MANNING, L. R. Normal and Abnormal Protein Subunit Interactions in Hemoglobins**. J. Biol. Chem**. V.273, p. 19359-19362, 1998

MAWATARI, S.; MURAKAMI, K. Different type of glutathionylation of hemoglobin can exist in intact erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, pp.108-114, 2003.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. On the nature allosteric transitions: a plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, p. 88-118, 1965.

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYERS, P.A., RODWELL, V.W. **Harper's Illustrated Biochemistry.** 26.ed., McGraw-Hill Companies, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry,** 4. ed., Freeman, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 2. ed., Atheneu, 2003.

PARRIS, M. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. **Alt Med Rev**. 2: 155-176, 1997.

PERCY, M. J., LAPPIN, T. R. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. **Br J Haematol.** 2008 May; 141(3):298-308.

PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J., PAOLI, M., DODSON, G. G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisted. **Annu.Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 27: 1-34, 1998.

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

POY, C.D. **Estudo funcional e estrutural da hemoglobina II do Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces)**. 2008 (Doutorado em Biofísica Molecular) – Unesp, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2008.

PRICE, A.; LUCAS, P.W. and LEA, P.J. Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: a leaf section approach. **J. Exptl. Bot**. 41:1309-1317, 1990.

RANA, S.V.; ALLEN, T.; SINGH, R. Inevitable glutathione, then and now. **Indian J. Exp. Biol**. 40: 706-16 ,2002.

RANDALL, D.; BURGGREN, W., FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4 ed. Guanabara Koogan, 2000.

RAZYNSKA, A.; FRONTICELLI, C.; DI CERA, E.; GRYCZYNSKI, C. Effect of Temperature on Oxygen Afinity and Anion Binding of Bovine Hemoglobin. **Biophysical Chemistry**, v.38, n. 1-2, p.111-115, 1990.

ROVER, L.; HOEHR, N.; VELLASCO, A. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim.Nova**, vol.24, nº1,pp.112-119,2001.

SASAGAWA, K.; IMAI, K.; KOBAYASHI, M. Influence of Allosteric Effectors and Temperature on Oxygen Binding properties and Bohr Effect of Bovine Hemoglobin. **Zoological Science,** v. 23, p. 565-572, 2006.

STRYER, L. **Biochemistry.** 5. ed., Freeman, 2004.

TORSONI, M. A.; OGO, S.H. Hemoglobin-sulfhydryls from (*Geochelone carbonaria*) can reduce oxidative damage induced by organic hydroperoxide in erythrocyte membrane. **Comparative Biochemistry and Physiology**, parte B 126, 571-577, 2000.

VOET, D.; VOET, J.C. **Biochemistry**. 4.ed. Toronto: John Wiley e Sons, 2004.

WILHELM, D.F. ; TORRES, M.A. ; MARCON, J. L. ; FRAGA, C. ; BOVERIS, A. Comparative antioxidant defences in vertebrates - emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 7, p. 37-45, 2000.

WODAK, S.J.; DE COEN, J.L.; EDELSTEIN, S.J.; DEMARNE, H.; BEUZARD, Y. Modification of human hemoglobin by glutathione. III. Perturbations of hemoglobin conformation analyzed by computer modeling. **J. Biol. Chem. v.** 261 (5), n.31, p.14717-14724, 1986.

8 ANEXOS

ANEXO-01

Procedimentos para correção da pressão barométrica (P.B.)

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

1000mBar (hPa) _____750,062 mmHg

Portanto: $x = \frac{n*750{,}062\ (mmHg)}{1000}$

Onde *x* é a pressão barométrica corrigida em mmHg e *n* a pressão (em hPa) lida no barômetro durante o experimento.

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

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

Exemplo: P.B.=757,5 mmHg e T=23,8ºC

P.B. / TºC	750 mmHg	757,5 mmHg	760 mmHg
23	2,81	X	2,84
23,8		Y	
24	2,93	Z	2,97

X e Z são determinados multiplicando a diferença entre o valor de correção da maior pressão e o valor de correção da menor pressão (ambos na mesma temperatura) pela diferença entre a P.B. medida e a menor P.B., dividido por 10. Somando-se a isto, o menor valor de correção.

X=[(2,84 – 2,81) * (757,5 – 750)/10] + 2,81=2,8325

Z=[(2,97 – 2,93) * (757,5 – 750)/10 + 2,93=2,96

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

$$Y=[(Z – X) * (tc\text{-}to)] + X = [(2{,}96 – 2{,}83250 * (23{,}8 – 23)] + 2{,}8325 = 2{,}9345.$$

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

ANEXO-02

PRESSÃO de Vapor

VAPOR PRESSURE OF WATER BELOW 100°C

Pressure of aqueous vapor over water in mm of Hg for temperatures from −15.8 to 100°C. Values for fractional degrees between 50 and 89 were obtained by interpolation.

Temp. °C	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
−15	1.436	1.414	1.390	1.368	1.345
−14	1.560	1.534	1.511	1.485	1.460
−13	1.691	1.665	1.637	1.611	1.585
−12	1.834	1.804	1.776	1.748	1.720
−11	1.987	1.955	1.924	1.893	1.863
−10	2.149	2.116	2.084	2.050	2.018
− 9	2.326	2.289	2.254	2.219	2.184
− 8	2.514	2.475	2.437	2.399	2.362
− 7	2.715	2.674	2.633	2.593	2.553
− 6	2.931	2.887	2.843	2.800	2.757
− 5	3.163	3.115	3.069	3.022	2.976
− 4	3.410	3.359	3.309	3.259	3.211
− 3	3.673	3.620	3.567	3.514	3.461
− 2	3.956	3.898	3.841	3.785	3.730
− 1	4.258	4.196	4.135	4.075	4.016
− 0	4.579	4.513	4.448	4.385	4.320
0	4.579	4.647	4.715	4.785	4.855
1	4.926	4.998	5.070	5.144	5.219
2	5.294	5.370	5.447	5.525	5.605
3	5.685	5.766	5.848	5.931	6.015
4	6.101	6.187	6.274	6.363	6.453
5	6.543	6.635	6.728	6.822	6.917
6	7.013	7.111	7.209	7.309	7.411
7	7.513	7.617	7.722	7.828	7.936
8	8.045	8.155	8.267	8.380	8.494
9	8.609	8.727	8.845	8.965	9.086
10	9.209	9.333	9.458	9.585	9.714
11	9.844	9.976	10.109	10.244	10.380
12	10.518	10.658	10.799	10.941	11.085
13	11.231	11.379	11.528	11.680	11.833
14	11.987	12.144	12.302	12.462	12.624
15	12.788	12.953	13.121	13.290	13.461
16	13.634	13.809	13.987	14.166	14.347
17	14.530	14.715	14.903	15.092	15.284
18	15.477	15.673	15.871	16.071	16.272
19	16.477	16.685	16.894	17.105	17.319
20	17.535	17.753	17.974	18.197	18.422
21	18.650	18.880	19.113	19.349	19.587
22	19.827	20.070	20.316	20.565	20.815
23	21.068	21.324	21.583	21.845	22.110
24	22.377	22.648	22.922	23.198	23.476
25	23.756	24.039	24.326	24.617	24.912
26	25.209	25.509	25.812	26.117	26.426
27	26.739	27.055	27.374	27.696	28.021
28	28.349	28.680	29.015	29.354	29.697
29	30.043	30.392	30.745	31.102	31.461
30	31.824	32.191	32.561	32.934	33.312
31	33.695	34.082	34.471	34.864	35.261
32	35.663	36.068	36.477	36.891	37.308
33	37.729	38.155	38.584	39.018	39.457
34	39.898	40.344	40.796	41.251	41.710
35	42.175	42.644	43.117	43.595	44.078
36	44.563	45.054	45.549	46.050	46.556
37	47.067	47.582	48.102	48.627	49.157
38	49.692	50.231	50.774	51.323	51.879
39	52.442	53.009	53.580	54.156	54.737
40	55.324	55.91	56.51	57.11	57.72
41	58.34	58.96	59.58	60.22	60.86
42	61.50	62.14	62.80	63.46	64.12
43	64.80	65.48	66.16	66.86	67.56
44	68.26	68.97	69.69	70.41	71.14
45	71.88	72.62	73.36	74.12	74.88
46	75.65	76.43	77.21	78.00	78.80
47	79.60	80.41	81.23	82.05	82.87
48	83.71	84.56	85.42	86.28	87.14
49	88.02	88.90	89.79	90.69	91.59
50	92.51	93.5	94.4	95.3	96.3
51	97.20	98.2	99.1	100.1	101.1
52	102.09	103.1	104.1	105.1	106.2
53	107.20	108.2	109.3	110.4	111.4
54	112.51	113.6	114.7	115.8	116.9
55	118.04	119.1	120.3	121.5	122.6
56	123.80	125.0	126.2	127.4	128.3
57	129.82	131.0	132.3	133.5	134.7
58	136.08	137.3	138.5	139.9	141.2
59	142.60	143.9	145.2	146.6	148.0
60	149.38	150.7	152.1	153.5	155.0
61	156.43	157.8	159.3	160.8	162.3
62	163.77	165.2	166.8	168.3	169.8
63	171.38	172.9	174.5	176.1	177.7
64	179.31	180.9	182.5	184.2	185.8
65	187.54	189.2	190.9	192.6	194.3
66	196.09	197.8	199.5	201.3	203.1
67	204.96	206.8	208.6	210.5	212.3
68	214.17	216.0	218.0	219.9	221.8
69	223.73	225.7	227.7	229.7	231.7
70	233.7	235.7	237.7	239.7	241.8
71	243.9	246.0	248.2	250.3	252.4
72	254.6	256.8	259.0	261.2	263.4
73	265.7	268.0	270.2	272.6	274.8
74	277.2	279.4	281.8	284.2	286.6
75	289.1	291.5	294.0	296.4	298.8
76	301.4	303.8	306.4	308.9	311.4
77	314.1	316.6	319.2	322.0	324.6
78	327.3	330.0	332.8	335.6	338.2
79	341.0	343.8	346.6	349.4	352.2
80	355.1	358.0	361.0	363.8	366.8
81	369.7	372.6	375.6	378.8	381.8
82	384.9	388.0	391.2	394.4	397.4
83	400.6	403.8	407.0	410.2	413.6
84	416.8	420.2	423.6	426.8	430.2
85	433.6	437.0	440.4	444.0	447.5
86	450.9	454.4	458.0	461.6	465.2
87	468.7	472.4	476.0	479.8	483.4
88	487.1	491.0	494.7	498.5	502.2
89	506.1	510.0	513.9	517.8	521.8
90	525.76	529.77	533.80	537.86	541.95
91	546.05	550.18	554.35	558.53	562.75
92	566.99	571.26	575.55	579.87	584.22
93	588.60	593.00	597.43	601.89	606.38
94	610.90	615.44	620.01	624.61	629.24
95	633.90	638.59	643.30	648.05	652.82
96	657.62	662.45	667.31	672.20	677.12
97	682.07	687.04	692.05	697.10	702.17
98	707.27	712.40	717.56	722.75	727.98
99	733.24	738.53	743.85	749.20	754.58
100	760.00	765.45	770.93	776.44	782.00
101	787.57	793.18	798.82	804.50	810.21

ANEXO-03

Coeficiente de extinção molar (ε) para a oxi-hemoglobina (x10^{-4}M).

λ (nm)	ε para a oxi-hemoglobina
540	1,46
560	0,87
570	1,18
576	1,58
630	0,014

Coeficiente de extinção molar (ε) da meta-hemoglobina em função do pH (x10^{-4}M).

pH	540	560	570	576	630
6,2	0,583	0,357	0,340	0,342	0,394
6,4	0,583	0,358	0,341	0,344	0,392
6,6	0,586	0,363	0,349	0,354	0,391
6,8	0,596	0,372	0,363	0,368	0,388
7,0	0,610	0,387	0,383	0,388	0,384
7,2	0,629	0,406	0,407	0,414	0,376
7,4	0,652	0,430	0,435	0,445	0,363
7,6	0,679	0,460	0,471	0,485	0,344
7,8	0,714	0,497	0,514	0,534	0,310
8,0	0,754	0,542	0,564	0,593	0,293
8,2	0,799	0,589	0,619	0,652	0,268
8,4	0,844	0,636	0,672	0,713	0,243
8,6	0,886	0,679	0,722	0,765	0,220
8,8	0,922	0,716	0,766	0,813	0,199