

Osmar Caôn Filho

**Determinação de Curvas de Equilíbrio
de Ligação de Oxigênio a Hemoglobinas
em Soluções Viscosas Usando uma Cella
Espectropolarimétrica Modificada**





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

OSMAR CAÔN FILHO

**DETERMINAÇÃO DE CURVAS DE EQUILÍBRIO DE
LIGAÇÃO DE OXIGÊNIO A HEMOGLOBINAS EM
SOLUÇÕES VISCOSAS USANDO UMA CELA
ESPECTROPOLARIMÉTRICA MODIFICADA.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO FRANCISCO COLOMBO

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO ORLANDO BONILLA-
RODRIGUEZ**



852/99

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

São José do Rio Preto - SP
1997



Opções este trabalho

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



AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho

À minha mãe, Prof. Dr. Carolina Orlando Benelli-Rodrigues, pela presença e exemplo de vida, e ao meu pai, Osmar Caôn, pelo apoio, incentivo e confiança.

À Prof. Dr.ª Maria Tereza Rodrigues, pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

A meus pais, **Letícia Fonseca Benelli Caôn** e **Osmar Caôn**, e a minha esposa, **Maruza Iara Cristiano Caôn**, cujo apoio, incentivo e confiança foram de extrema importância.

AGRADECIMENTOS

É com carinho muito especial que agradeço ao **Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo**, pela orientação dedicada, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção.

Ao querido mestre e amigo **Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez**, pela orientação dedicada e cujo exemplo de postura científica me estimulou a seguir a caminho que agora percorro.

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

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

Aos Profs. Drs. **Marcelo Andres Fossey** e **Marinônio Lopes Cornélio**, pela colaboração prestativa na análise deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física, **Prof. Dr. Jonny Rizzieri**, **Prof. Dr. Elso Drigo Filho**, **Prof. Dr. José Ramon Abrego**, **Prof. Dr. Jorge Chahine**, **Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto**, **Prof. Dr. Eloi Feitosa**, **Prof. Dr. Richard Ward**, **Prof. Dr. Raguvir Arni**, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Aos técnicos do departamento de Física, **Paulinho** e **Toninho Barbosa**, cujo auxílio foi de fundamental importância na confecção, polimento e implementação da cela espectropolarimétrica.

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

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



Fernanda, Fábio, Leandra, João Ricardo e Murilo por cultivarem um ambiente propício ao trabalho.

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

Às funcionárias **D^a Cida e Toninha**, pelo carinho com que acompanham nosso trabalho diário.

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

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

A minha amada esposa e amiga **Maruza**, pela paciência, carinho, amizade e confiança, sem as quais certamente não teria chegado até aqui.

A meus pais, **Leticia** e **Osmar**, que acreditaram em mim e aos meus irmãos **Rogério**, **Gustavo**, **Giovana**, que sempre me incentivaram.

A minha sogra, **Maria Aparecida**, e meu sogro, **Antônio**, pela confiança e pelo incentivo no decorrer deste trabalho.

A **CAPES** pelo suporte financeiro.

A **Deus**, pela vida.

NOTAÇÕES

ABREVIações

2,3 BPG	2,3-Bifosfoglicerato ou 2,3-Difosfoglicerato.
ATP	Adenosinatrifosfato.
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético.
Hb	Hemoglobina.
Hb A₀	Principal componente da hemoglobina de humano adulto.
Hepes	Ácido (2 Hidroxietyl) Piperazina - N - (2 Etano Sulfônico).
meta-Hb	Meta hemoglobina.
MWC	Monod, Wyman e Changeux.
O.E.C.	Curva de equilíbrio de oxigenação

osm.	Osmolalidade.
PAGE	Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida.
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano.

SÍMBOLOS

$\bar{Y}$	Saturação fracional da hemoglobina com oxigênio.
λ	Comprimento de onda.
μ_{Hb}	Potencial químico da hemoglobina.
μ_L	Potencial químico do ligante L.
μ_{O_2}	Potencial químico do oxigênio.
ΔASA	Área de superfície acessível ao solvente
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs.

ΔH	Variação da entalpia.
Δn_{Cl^-}	Número de íons de cloreto ligados à Hb durante a transição T→R.
Δn_{H^+}	Número de prótons liberados pela Hb durante a transição desoxi - Hb para oxi-Hb.
Δn_w	Número de moléculas de água ligadas à Hb durante a transição desoxi-oxi.
ΔS	Variação de entropia.
a_L	Atividade do ligante L.
a_{O_2}	Atividade do oxigênio.
a_w	Atividade de água.
E^0	Potencial padrão de redução
K	Constante de associação de O_2 à hemoglobina.
K_H	Constante de Henry.

n	Número de sítios de ligação da hemoglobina à oxigênio.
n_{50}	Inclinação do gráfico de Hill em 50% de saturação pelo O_2 .
n_w^{desoxi}	Número de moléculas de água ligadas à estrutura da desoxi-Hb.
n_w^{oxi}	Número de moléculas de água ligadas à estrutura da oxi-Hb.
pO_2	Pressão parcial de oxigênio.
R	Estrutura relaxada da hemoglobina; ou constante dos gases.
T	Estrutura tensa da hemoglobina; ou temperatura absoluta.
V_i	Voltagem no <i>inésima</i> etapa da oxigenação/desoxigenação.
V_{max}	Voltagem máxima (solução oxigenada).
V_{min}	Voltagem mínima (solução desoxigenada).

RESUMO DO TRABALHO

O presente trabalho apresenta uma modificação em um sistema de oxigenação espectropolarimétrico, baseado na cela de Imai, que permite a determinação precisa e continua das curvas de oxigenação de hemoproteínas em diferentes atividades de água.

O método de Imai combina a determinação simultânea da pressão parcial de oxigênio (pO_2) e as mudanças espectrais que acompanham a ligação ou liberação de O_2 à Hb. Estas propiciam a obtenção da curva contínua de saturação desta proteína em função da pO_2 .

A partir das curvas contínuas de saturação é possível determinar parâmetros termodinâmicos de oxigenação, tais como, P_{50} , n_{50} , ΔH , ΔG , ΔS e as constantes de ligação de O_2 por passos (constantes de Adair), com precisão.

A determinação da contribuição da água de hidratação das diferentes conformações da Hb aos parâmetros de ligação requer a obtenção das curvas de oxigenação em diferentes atividades de água.

Experimentalmente, a_w é ajustada pela adição de solutos neutros às soluções de Hb. Em decorrência, a viscosidade da solução de medida aumenta.

O desenho original da cela de Imai não é adequado, entretanto, para a obtenção de curvas de oxigenação com soluções viscosas. Nestas circunstâncias, a medida da O.E.C. não é reprodutiva porque os gases não se distribuem homogeneamente na solução.

Para solucionar esse problema introduzimos na cela espectropolarimétrica um dispositivo que auxilia na agitação da solução. Este dispositivo permite a distribuição uniforme do oxigênio em soluções bastante viscosas. Com a modificação da cela de Imai proposta, as curvas de ligação de oxigênio são reprodutíveis.

Curvas de oxigenação de Hb foram obtidas em diferentes atividades de água ajustadas com a adição de sacarose. O número diferencial de moléculas de água ligadas à Hb entre os estados oxigenado e desoxigenado foi determinado e confirma aquele determinado anteriormente por Colombo e colaboradores (Colombo et al., 1992, 1994, 1996) utilizando outros métodos de determinação das curvas de saturação (Hem-O-Scan e método Tonométrico).

Adicionalmente, apresentamos resultados preliminares do estudo do efeito da água sobre a entalpia e entropia da reação de oxigenação da Hb.

ABSTRACT

The present work presents a modification on a spectropolarimetric oxygenation system based on the Imai Cell, which permits a continuous and precise determination of oxygenation equilibrium curves (OEC) for hemoproteins at varying water activities.

The Imai cell combines the simultaneous determination of the oxygen partial pressure (pO_2) and the spectral changes which follow oxygen binding or dissociation to hemoglobin.

Accordingly, it is possible to obtain a continuous O_2 -saturation curve of Hb as a function of oxygen pressure. These precise determinations allow to calculate thermodynamic parameters linked to oxygenation, such as oxygen-affinity (P_{50}) and O_2 median activity (P_m), Hill coefficient cooperativity (n_{50}), ΔH , ΔG and ΔS , as well as the Adair stepwise association constants.

The determination of the contribution of-solvation to the equilibrium among different hemoglobin conformations and to the binding parameters requires gathering oxygenation curves at different water activities.

Experimentally this is achieved by adding neutral solutes to hemoglobin solutions, what increases solution viscosity.



The original design of the Imai Cell, however, is not suitable to deal with viscous solutions. Under these circumstances, OEC measurements are not reproducible, since dissolved gases do not achieve a homogeneous distribution.

This work presents the development of a modified Imai Cell which incorporates a new device designed to improve solution's mixing. This device allows a uniform distribution for oxygen even for viscous solutions and allow the determination of reproducible curves OEC. From these OEC obtained at several water activities adjusted with sucrose, we determined the differential number of water molecules bound to hemoglobin between the oxygenated and deoxygenated forms. The results agree with those previously reported by Colombo and coworkers (Colombo et al., 1992, 1994, 1996) using other methods.

In addition we present preliminary results of the study of the water effect on the enthalpy and entropy linked to hemoglobin oxygenation.



ÍNDICE

1) Introdução.....	01
1.1) Hemoglobina.....	01
1.2) A Ligação Cooperativa de Oxigênio.....	02
1.3) Regulação Alostérica.....	07
1.4) Efeito Bohr.....	08
1.5) Efeito do CO ₂	10
1.6) Efeito de Fosfatos Orgânicos.....	12
1.7) Efeito do Cloreto.....	13
1.8) Efeito de Água.....	14
1.9) Efeito da Temperatura.....	22
2) Objetivos do Trabalho.....	25
3) Materiais e Métodos.....	27
3.1) Purificação da Hemoglobina.....	27
3.2) Estudos Funcionais pelo Método de Imai.....	29

3.3) Descrição da Cella Espectropolarimétrica.....	31
3.3.1) O Funcionamento do Eletrodo de Oxigênio.....	33
3.3.2) Preparação do Eletrodo.....	36
3.3.3) Calibração Estática do Oxímetro.....	37
3.4) Determinação da Saturação Fracional por Espectofotometria....	39
3.4.1) A Lei de Beer-Lambert.....	40
4) Determinação Dinâmica da Curva de Oxigenação no Equilíbrio.	41
4.1) O Gráfico de Hill.....	48
4.2) Controle do Fluxo dos Gases.....	49
5) Resultados.....	51
5.1) O Efeito da Concentração de Sacarose na Solubilidade de O ₂ ...	51
5.2) Medidas das Curvas de Oxigenação na Presença e Ausência de Sacarose.....	53
5.2.1) Dificuldades Iniciais.....	53
5.2.2) A Adaptação de um Agitador Auxiliar.....	56
6) Resultados com a Nova Cella Espectropolarimétrica.....	58

6.1) Efeito da Atividade de Água ($\ln a_w$) sobre a Afinidade da Hb por O_2 (P_{50}).....	60
6.1.1) Comparação entre P_{50} e a Atividade Média do Ligante P_m	65
6.2) Efeito da Atividade de Água ($\ln a_w$) sobre a Constante de Associação do primeiro O_2 à Hb (K_1).....	69
6.3) O Efeito da Temperatura e da Atividade de Água sobre a Afinidade da Hb por Oxigênio.....	73
6.4) Análise Termodinâmica dos Resultados.....	75
7) Conclusões.....	80
8) Bibliografia.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Hemoglobina humana (Hb A ₀).....	01
Figura 2: Gráfico de Hill para ligação de O ₂ a Hb.....	05
Figura 3: Eletroforese das Frações de Hb purificada.....	28
Figura 4: Equipamentos utilizados pelo Método de Oxigenação Automática.....	33
Figura 5: Circuito eletrônico desenvolvido para o eletrodo de O ₂	35
Tabela 1: Valores experimentais da calibração do Oxímetro.....	38
Figura 6: Curva de calibração do Oxímetro.....	38
Figura 7: Espectros de absorção da Hb, na região do visível.....	39
Figura 8: Curva de Equilíbrio de Oxigenação (OEC) da Hb A ₀	42
Figura 9: Extrapolação para determinar A _{oxi}	46

Figura 10: Extrapolação para determinar A_{desoxi}	47
Figura 11: Gráfico de Hill exemplificando a determinação de P_{50} e n_{50}	48
Tabela 2: Comportamento da solubilidade de O_2 em diversas concentrações de sacarose.....	52
Figura 12: Comportamento da solubilidade de O_2 em diversas concentrações de sacarose.....	53
Figura 13: Curva de saturação ($\bar{Y}$ versus pO_2) da Hb A_0	54
Figura 14: Curva de desoxigenação e posterior oxigenação da Hb A_0 obtidas na cela Imai em seu desenho original.....	55
Tabela 3: Valores de P_{50} , $\log P_{50}$, n_{50} , obtidos em diversas concentrações de Sacarose.....	56
Figura 15: Esboço da Cella Espectropolarimétrica utilizada pelo método de oxigenação automático.....	58
Figura 16: Comparação entre OEC obtidas pela cela de Imai modificada e pelo método Tonométrico:.....	59
Figura 17: Comportamento da afinidade da Hb A_0 por O_2 quando variamos a_w	61
Tabela 4: Dependência de P_{50} da Hb em função de $\ln a_w$	63

Figura 18: Gráfico de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$	65
--	-----------

Figura 19: Curva de saturação ($\bar{Y}$ versus pO_2) da Hb A ₀ , que demonstra como calcular P_m	67
---	-----------

Tabela 5: Dependência da atividade média do ligante em função da atividade de água.....	68
--	-----------

Figura 20: Gráfico de $\ln P_m$ versus $\ln a_w$	69
---	-----------

Figura 21: Gráfico de Hill em diversas atividades de água.....	70
---	-----------

Tabela 6: Comportamento de K_1 em função de $\ln a_w$	71
--	-----------

Figura 22: Gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$	72
---	-----------

Figura 23: Gráfico de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ em diferentes temperaturas.....	74
--	-----------

Tabela 7: Tabela de Δn_w em diferentes temperaturas.....	75
---	-----------

Figura 24: Gráfico de van't Hoff ($\ln P_{50}$ versus $1/T$) para Hb.....	76
--	-----------

Tabela 8: Tabela de ΔH em diversas osmolalidades de sacarose.....	77
--	-----------

1) INTRODUÇÃO

1.1) HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína existente nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados, tendo como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. A Hb é uma proteína globular com diâmetro de 6,4 nm e massa molecular de aproximadamente 64,5 kD.

Quatro subunidades polipeptídicas compõem a Hb, cada uma contendo um grupo prostético heme, o qual é um complexo de protoporfirina IX e um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{+2}) (Stryer, 1980).

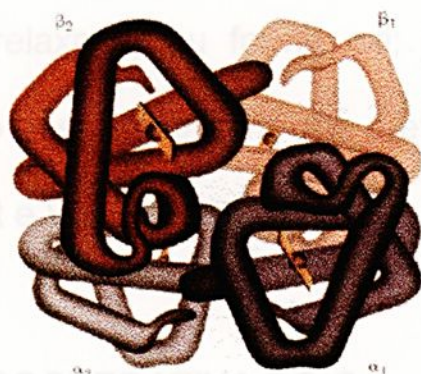


Figura 1: Hemoglobina humana (Hb A₀). Essa proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias (cinza claro e cinza escuro) com 141 resíduos de aminoácidos (cadeias α) e duas cadeias (marrom claro e marrom escuro) com 146 resíduos de aminoácidos (cadeias β). Cada cadeia polipeptídicas contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O_2 . Extraído de Garrett and Grisham, 1995.

O oxigênio liga-se reversivelmente aos átomos de ferro, totalizando quatro moléculas do gás por molécula de proteína. O Fe (II) da Hb pode ser oxidado a Fe (III) e formar metaemoglobina (meta-Hb), que não liga O₂. Os eritrócitos contêm a enzima meta-Hb redutase, que converte pequenas quantidades de meta-Hb, formada espontaneamente, ao estado ferroso. Vale citar que o estado ferroso é mantido tanto na forma oxigenada como na forma desoxigenada.

A Hb predominante em eritrócitos de seres humanos adultos é a Hb A₀, constituída por duas cadeias α e duas cadeias β , com 141 e 146 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A molécula é um tetrâmero do tipo $\alpha_2\beta_2$ (Mathews e van Holde, 1990).

Quando a Hb encontra-se totalmente oxigenada ela assume a conformação R (relaxada) ou forma oxi; já quando ela não se encontra ligada ao gás, a estrutura que prevalece é a T (tensa) ou forma desoxi (Voet e Voet, 1990).

1.2) A LIGAÇÃO COOPERATIVA DO O₂

O transporte de O₂ é a principal função da Hb, que é descrita pela “Curva de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio”. A primeira



tentativa de analisar esta curva foi formulada por Archibald Hill em 1910 (Voet, e Voet, 1990), que considerou a ligação de O_2 como sendo representada genericamente pela equação de equilíbrio :



onde K' é uma constante de associação e n representaria o número de moléculas de oxigênio que se associariam à proteína.

Por definição:

$$K' = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb][O_2]^n} \quad (2)$$

onde $[Hb(O_2)_n]$ é a concentração da hemoglobina totalmente oxigenada, $[Hb]$ é a concentração da hemoglobina totalmente desoxigenada e $[O_2]$ é a atividade do oxigênio.

Segundo a lei de Henry, a atividade de ligantes gasosos na fase líquida é expressa pela pressão parcial desses ligantes na fase gasosa, portanto a atividade de O_2 é dado por:



$$[O_2]_{\text{solução}} = pO_2 \cdot K_H \quad (3)$$

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

Introduzindo a equação (3) na equação (2) podemos reescrevê-la da seguinte maneira:

$$\frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb]} = K \cdot (pO_2)^n \quad (4)$$

onde $K = K' \cdot (K_H)^n$.

Aplicando à equação (4) o termo de saturação fracional¹ ($\bar{Y}$) chegamos a seguinte expressão:

$$\frac{\bar{Y}}{(1 - \bar{Y})} = K \cdot (pO_2)^n \quad (5)$$

que na forma logarítmica:

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}\right) = n \cdot \log(pO_2) + \log K \quad (6)$$

¹ Saturação fracional é a razão entre o número de sítios ligados e o número total de sítios.



O gráfico de $\log(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\log(pO_2)$, **gráfico de Hill**, para a ligação cooperativa de O_2 à hemoglobina, é representado a seguir:

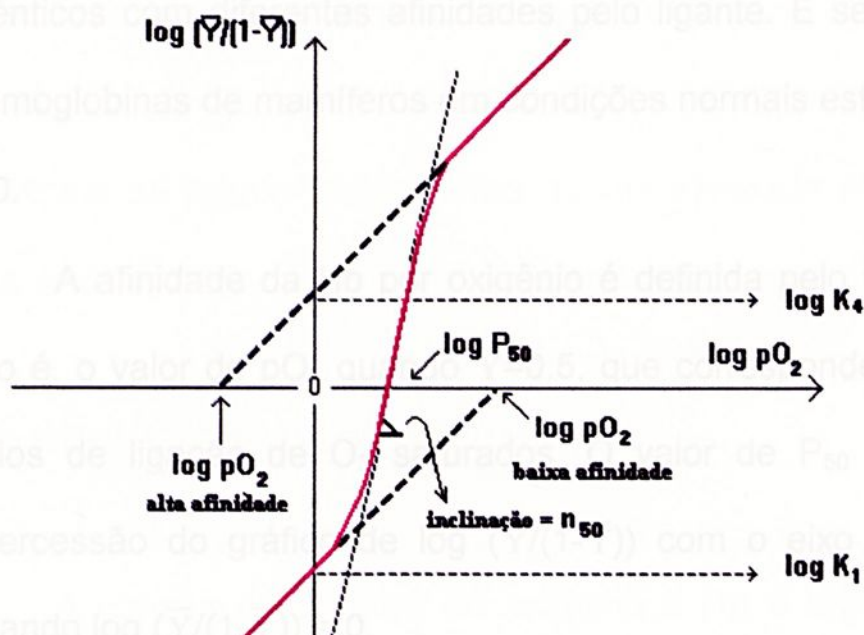


Figura 2: Gráfico de Hill para ligações de O_2 à hemoglobina, onde a inclinação da curva fornece a cooperatividade da reação (n_{50}) e o intercepto com o eixo de $\log pO_2$ fornece a pressão de O_2 quando metade dos sítios de ligação da proteína estão saturados. Os valores de K_1 e K_4 são referentes às constantes de associação de O_2 ao primeiro e ao quarto sítio de ligação da Hb, para esse gás, respectivamente (adaptado de Bertini et al., 1994).

O formato sigmoide da curva caracteriza a interação cooperativa entre os sítios de ligação da proteína, isto é, mostra que a associação do primeiro ligante favorece a ligação do segundo, e assim sucessivamente. No caso da Hb, a ligação da primeira molécula de O_2 aumenta a afinidade da proteína para a ligação da segunda molécula e assim por diante. A cooperatividade é medida

pelo coeficiente de Hill (n_{50}) obtido da inclinação do gráfico de Hill, no intervalo de saturação de 0,2 - 0,8. Um valor de $n_{50} > 1$, que caracteriza uma curva sigmoidal, indica a presença de sítios idênticos com diferentes afinidades pelo ligante. E seu valor para hemoglobinas de mamíferos em condições normais está entre 2,8 e 3,0.

A afinidade da Hb por oxigênio é definida pelo valor de P_{50} , isto é, o valor de pO_2 quando $\bar{Y}=0.5$, que corresponde a 50% dos sítios de ligação de O_2 saturados. O valor de P_{50} é obtido da intercessão do gráfico de $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ com o eixo de $\log pO_2$, quando $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) = 0$.

Do gráfico de Hill é possível também obtermos os valores das constantes de ligação da primeira e quarta molécula de O_2 à Hb, K_1 e K_4 , respectivamente. Estes valores são obtidos extrapolando as retas que interpolam os valores de ligação nas extremidades do gráfico de Hill. O intercepto da reta que passa pelos pontos à baixa saturação com $\log (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) = 0$ e define $\log K_1$; já o intercepto da reta que passa pelos pontos a alta saturação define $\log K_4$.

A comparação das estruturas da hemoglobina totalmente desoxigenada e totalmente oxigenada sugere que a cooperatividade entre os sítios origina-se na mudança conformacional na estrutura



quaternária da molécula (Kilmartin et al,1977; Baldwin et al.,1982), como foi proposto por Monod e seus colaboradores em 1965 (Monod, Wyman e Changeaux, 1965). Neste modelo, estas duas estruturas quaternárias estão em equilíbrio (Desoxi (T) $\rightleftharpoons$ Oxi (R)), sendo que a forma de baixa afinidade (T) é mais estável na ausência de ligante, que a forma de alta afinidade (R). À medida que a Hb se oxigena, este equilíbrio desloca-se para a forma R.

1.3) REGULAÇÃO ALOSTÉRICA

A ligação cooperativa do oxigênio à Hb é um exemplo de interações alostéricas (nestas interações a ligação de um ligante a um sítio da proteína, influencia a afinidade de ligação dos demais sítios não ligados). Estas interações ocorrem entre ligantes do mesmo tipo, e neste caso o O₂ (interações homotrópicas), ou de tipos diferentes (heterotrópicas), H⁺, CO₂, ATP, 2,3-BPG, Cl⁻ (Imai, 1980), e como mostrado recentemente, a água, (Colombo *et al*,1992).

O efeito destas interações alostéricas é bem explicado pelo modelo proposto por Jacques Monod e colaboradores antes citado (Mathews e van Holde,1990.). Neste modelo (Modelo de MWC), os



autores propuseram que as proteínas alostéricas apresentam organização oligomérica, ou seja, são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica (subunidade) e tem mais de um sítio de ligação a ligantes por molécula de proteína.

A ligação de O_2 à proteína desloca o equilíbrio para a direção da estrutura de alta afinidade, o estado R (Relaxado), resultando num aumento da afinidade pelo O_2 à medida que a reação ocorre. Qualquer molécula que se ligue mais fortemente a uma ou outra estrutura (T ou R) ou com estequiometria diferente entre estes dois estados conformacionais, afetará o equilíbrio alostérico. Consequentemente, a interação destes ligantes heterotrópicos modula a afinidade da proteína por O_2 através de mudanças no equilíbrio alostérico.

1.4) EFEITO BOHR

Quando a hemoglobina liga-se a oxigênio em pH fisiológico, ela sofre uma mudança conformacional que a torna ligeiramente ácida, estimulando assim a liberação de prótons. Por sua vez, o aumento do pH facilita a transição da conformação T para R, e a liberação de H^+ . Consequentemente a afinidade da Hb por oxigênio



é aumentada. Este fenômeno é conhecido como Efeito Bohr. O mecanismo desse efeito pode ser explicado pelo mesmo modelo que foi usado para explicar a ligação cooperativa de O_2 à hemoglobina (Bucci e Fronticelli, 1981).

O pK_a , a constante de dissociação de ácido - base, de grupos é distinto para a forma desoxi em relação à forma oxi da Hb. Na forma de baixa afinidade por O_2 , a principal contribuição para o efeito Bohr é a do resíduo de histidina 146 β (Mathews e van Holde, 1990). Na forma desoxi da Hb, esse resíduo forma pontes salinas com o Asp 94 β , e o pK_a da histidina aumenta em relação àquele medido para a forma oxi onde esta ponte não existe. Esta ponte salina formada estabiliza o próton ligado, dificultando sua dissociação; na forma oxi essa ponte não pode ser formada, e o pK_a desta histidina retorna ao valor normal de aproximadamente 6,5. Consequentemente, em pH sanguíneo ($\approx$ pH 7,4), a His 146 está predominantemente na forma não protonada na oxi-Hb (Mathews e van Holde, 1990).

Como consequência desse efeito, o aumento da concentração de prótons favorece a estabilização da forma desoxi, facilitando a liberação de oxigênio. O efeito Bohr pode ser medido tanto através da variação da afinidade de O_2 com o pH, quanto pela



determinação do número de prótons dissociados da Hb após a adição de oxigênio.

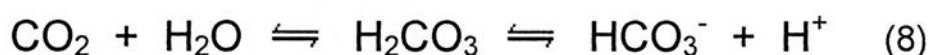
O número de prótons liberados da proteína, com a oxigenação, pode ser calculado pela relação diferencial desenvolvida por Wyman (Bucci e Fronticelli, 1981):

$$\left. \frac{d \log P_{50}}{d \text{ pH}} \right|_{a_i} = -\Delta n_{\text{H}^+} \quad (7)$$

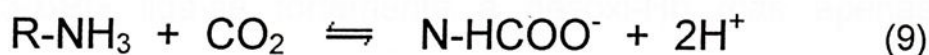
onde P_{50} é a pressão parcial de oxigênio quando 50% dos sítios de ligação por O_2 da Hb estão saturados e Δn_{H^+} o número de prótons liberados da proteína após a oxigenação (Bucci e Fronticelli, 1981).

1.5) EFEITO DE CO_2

O dióxido de carbono modula a ligação direta de O_2 à proteína através de dois caminhos. O primeiro, algumas moléculas de CO_2 reagem com água resultando em ácido carbônico, liberando prótons, que contribui para diminuir o pH da solução. Com isto, a afinidade da Hb por O_2 diminui facilitando a desoxigenação da proteína (Efeito Bohr).



O segundo caminho é aquele onde o próprio CO_2 reage diretamente com a hemoglobina, ligando-se aos amino grupos N-terminais das cadeias polipeptídicas para formar carbamatos, como resume a equação abaixo:



Esta reação de carbamatação é reversível e, portanto, permite o transporte, de parte do CO_2 liberado pelos tecidos para os pulmões. Os carbamatos ligados formam pontes salinas que estabilizam a forma T, portanto a ligação de CO_2 abaixa a afinidade da Hb pelo oxigênio. A reação inversa que ocorre nos pulmões é igualmente importante, pois neste órgão a concentração de O_2 favorece a oxigenação e por isso a forma oxi da molécula. Quando esta mudança ocorre, a estabilidade do N-terminal carbamatado é diminuída e o CO_2 é liberado (Voet e Voet, 1990).

1.6) EFEITO DE FOSFATOS ORGÂNICOS

A hemoglobina purificada tem uma maior afinidade pelo oxigênio do que a Hb encontrada no sangue. A partir desta observação, em 1967, Reinhold e Ruth Benesch demonstraram que uma substância ligava-se à proteína e diminuía a afinidade desta pelo O_2 (Voet e Voet, 1990). Esse composto fosfatado de caráter aniônico é conhecido como 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG).

O 2,3-BPG liga-se fortemente à desoxi-Hb mas apenas fracamente à oxi-Hb (Mathews e van Holde, 1990). Isso se dá devido à existência de um único sítio específico de ligação na estrutura T para o 2,3-BPG, localizado na entrada da cavidade central desta estrutura com a participação de resíduos das cadeias β (Armone, 1972).

A conseqüente diminuição da afinidade de O_2 pela ação do BPG aumenta a quantidade desse gás liberado pela hemoglobina aos capilares. Outros polifosfatos orgânicos, tais como inositol pentafofato (IPP), o inositol hexafofato (IHP) e adenosina trifosfato (ATP), também tem este efeito sobre a Hb. De fato, em aves, o IPP e o IHP substituem funcionalmente o BPG, enquanto o ATP predomina em peixes, répteis e anfíbios.



1.7) EFEITO DO CLORETO

Outro efector alostérico fisiologicamente importante é o cloreto que também contribui para a regulação da afinidade da Hb por oxigênio. Esse íon reduz a afinidade da hemoglobina, estabilizando a estrutura T (Perutz *et al.*, 1994).

Durante muitos anos acreditava-se que os íons cloreto ligavam-se à sítios específicos da proteína; ao N-terminal do amino da Val 1 α_2 e o grupo guanidino da arg 141 α_1 , resíduo C terminal (Kilmartin *et al.*, 1978). Recentemente, entretanto, Perutz e colaboradores propuseram que a regulação da afinidade por O₂ por Cl⁻ ocorre por interações eletrostáticas não específicas (Perutz *et al.*, 1994). Segundo esta proposição, o ânion cloreto não possui um sítio de ligação específico na hemoglobina, mas neutraliza o excesso de cargas positivas existentes na região da cavidade central da desoxi-Hb (Perutz *et al.*, 1993) por condensação iônica.

Dado que o Cl⁻ interage fracamente com a⁻ Hb, seu efeito é observado à altas concentrações (>10 mM). Nestas soluções salinas a atividade de água varia significativamente podendo alterar o equilíbrio entre as conformações R e T devido a diferença de hidratação entre estas estruturas. Este efeito foi alvo de uma



recente reavaliação da ação alostérica do cloreto onde constatou-se que variações na hidratação da proteína contribuem para o efeito do cloreto observado (Colombo *et al.*, 1994).

Foi calculado que um simples Cl^- ($\Delta n_{\text{Cl}^-} = 1.02$) é liberado na oxigenação da Hb, durante à transição da estrutura quaternária da Hb T para R, enquanto aproximadamente 65 moléculas de água ligam-se a essa proteína (Colombo *et al.*, 1994) devido à ligação dos 4 O_2 . Este efeito da água na oxigenação da hemoglobina esta descrito a seguir.

1.8) EFEITO DE ÁGUA

A comparação entre as conformações oxi e desoxi da hemoglobina mostra que vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente durante a transição T→R. Esta mudança estrutural implica numa diferença de superfície protéica exposta ao solvente entre estas conformações e, conseqüente, ligação de moléculas de água à proteína com a oxigenação (Colombo *et al.*, 1992). Este efeito se reflete na dependência da afinidade da Hb por O_2 com a atividade de água.



O papel da água sobre o controle alostérico tem sido estudado usando como modelo a oxigenação da Hb pelo chamado método de “stress” osmótico (Colombo *et al.*, 1992). O princípio deste método reside em usar solutos neutros, que são preferencialmente excluídos da superfície da proteína (Timasheff e Arakawa, 1982), para ajustar a atividade de água na solução.

Estudos anteriores (Haire e Hedlund, 1983) mostraram que o aumento da concentração do soluto neutro (etileno glicol) na solução de Hb, acarreta num aumento de P_{50} , ou seja, a diminuição da afinidade da proteína por O_2 . Essa relação inversamente proporcional ocorre sem que haja alteração na cooperatividade e foi interpretada, por aqueles autores, como devido à uma ligação preferencial fraca do soluto à desoxi-Hb.

Para analisar o efeito dos solutos neutros sobre as características de ligação de O_2 à Hb, dois casos devem ser considerados: a ligação direta do soluto com a proteína e o efeito indireto do soluto sobre a atividade de água. Para fazer a distinção entre estes dois casos Colombo e colaboradores utilizaram solutos diferentes, sendo encontrados uma dependência comum entre a afinidade por O_2 e a atividade de água, a_w (Colombo *et al.*, 1992, 1994, 1996). Esta independência em relação à natureza do soluto,



reforça a suposição da exclusão destes solutos pela camada de solvatação que envolve a proteína, e de qualquer espécie de interação direta com as estruturas T ou R.

O efeito de solvatação pode ser determinado quantitativamente em termos do número diferencial de moléculas de água ligadas entre os dois extremos conformacionais da proteína como mostrado em trabalhos recentes (Colombo *et al*, 1992, 1994, 1996).

A associação de um ligante, L , à Hb pode ser descrita pela equação de Gibbs-Duhem. Consideremos que n_{O_2} moléculas de O_2 e n_L moléculas de um ligante alostérico, L , estejam ligados a um mol de Hb, a temperatura e a pressão hidrostática constantes. Para esta reação, no equilíbrio, a variação da energia livre total deste sistema ($dG=0$) é dada por:

$$dG = n_{O_2} d\mu_{O_2} + n_L d\mu_L + d\mu_{Hb} = 0 \quad (10)$$

onde $\mu_{O_2} = \mu_{O_2}^0 + RT \ln p_{O_2}$ é o potencial químico do O_2 (10.a)

$\mu_L = \mu_L^0 + RT \ln a_L$ é o potencial químico do ligante L (10.b)

e μ_{Hb} é o potencial químico da Hb (10.c)

A energia livre expressa na equação 10 depende portanto do número de moléculas de ligantes (O_2 e L) ligados, bem como do potencial químico destes ligantes e da proteína. Rearranjando a equação (10) obtemos:

$$- d\mu_{Hb} = n_{O_2} d\mu_{O_2} + n_L d\mu_L \quad (11)$$

que expressa a forma com que o potencial químico da Hb μ_{Hb} varia com a saturação e com a atividade dos ligantes, isto é:

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d\ln p_{O_2} + n_L d\ln a_L \quad (12)$$

Como, no equilíbrio, a ligação de O_2 e do ligante L à hemoglobina é um processo reversível, o potencial químico da proteína é uma propriedade de estado e $d\mu_{Hb}$ é uma diferencial exata, o que nos permite escrever a seguinte expressão de Maxwell (Colombo et al., 1992) :

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_L} \right|_{p_{O_2}} = \left. \frac{\partial n_L}{\partial \ln p_{O_2}} \right|_{a_L} \quad (13)$$

que é uma das equações de “linkage” propostas por Wyman (Wyman, 1964). Esta equação correlaciona a variação da saturação da Hb por O₂, devido às mudanças em a_L sob pO₂ constante, com a variação na saturação da Hb por L devido a mudanças na pO₂ com a_L constante.

A partir da expressão 13 podemos derivar como a afinidade da hemoglobina por oxigênio, P₅₀, varia com a_L (Wyman, 1964; Wyman e Gill, 1990). A equação de “linkage” que resulta deste procedimento tem a seguinte forma:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{(n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}})}{4} \quad (14)$$

onde P₅₀ tem o significado antes citado; a_L é a atividade do ligante L, a_i indica que a atividade de outros ligantes que não L, é mantida constante, Δn_L é a diferença do número de moléculas de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb. Esta análise é correta apenas quando a atividade de um ligante varia e a atividade de qualquer outro ligante presente na solução é mantida constante (o

que está indicado pelo subscrito a_i). Quando o ligante alostérico L é a água, esta relação escreve-se;

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}}{4} \quad (15)$$

onde, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb e a_i é a atividade de um ligante i, diferente da água.

Posteriormente, a equação 13 foi estendida para permitir a análise daqueles casos em que a ligação do soluto e de água pode ser concomitantemente analisada (Colombo *et al.*, 1994, 1996) resultando em outra equação de linkage, que descreve como $\ln P_{50}$ devido a ligação diferencial de água e do soluto cuja concentração varia e promove mudanças em a_w . Para tanto vamos considerar, inicialmente, uma solução binária composta por N_w moles de solvente e N_s moles de soluto (por Kg de água) onde a atividade de água, a_w , e do soluto, a_s , não são variáveis independentes, a seguinte equação de Gibbs-Duhem pode ser escrita:



$$N_w d \ln a_w + N_s d \ln a_s = 0 \quad (16)$$

Na presença de hemoglobina outra relação de Gibbs-Duhem pode ser escrita, expressão esta que correlaciona as variações do potencial químico da Hb devido a ligação de ligantes. Especificamente, em temperatura e pressão hidrostática constantes, o efeito da ligação de O_2 , água e soluto sobre o potencial químico da Hb, $d\mu_{Hb}$, é dada por:

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d \ln p_{O_2} + n_s d \ln a_s + n_w d \ln a_w \quad (17)$$

combinando a equação (16) e (17), temos:

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d \ln p_{O_2} + n_s \left(-\frac{N_w}{N_s} d \ln a_w \right) + n_w d \ln a_w \quad (18)$$

ou,

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d \ln p_{O_2} + \left(n_w - \frac{N_w}{N_s} n_s \right) d \ln a_w \quad (19)$$

que nos permite escrever a seguinte relação de Maxwell:

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_w} \right|_{pO_2} = \frac{\partial}{\partial \ln pO_2} \left(n_w - \frac{N_w}{N_s} n_s \right) \Big|_{a_w} \quad (20)$$

Usando as propriedades da equação de Maxwell (Wyman, 1990) conforme descrito por Colombo *et al.* (1996) e integrado da equação 20 entre os estados totalmente oxigenado e desoxigenado da Hb, chegamos a seguinte relação usada para analisar as variações concomitantes entre a água e soluto ligados:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{pO_2} = 4 \left[\frac{N_w}{N_s} \Delta n_s - \Delta n_w \right] \quad (21)$$

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

1.9) EFEITO DA TEMPERATURA

O aumento da temperatura diminui a afinidade da Hb por oxigênio. Este resultado evidencia que a constante de associação do oxigênio diminui com o aumento de temperatura, e portanto, que a ligação de O_2 à Hb é exotérmica (Benesch *et al.*, 1969 ; Bucci *et al.*, 1990).

A análise do efeito da temperatura sobre a variação de oxigenação da hemoglobina, pode ser realizada considerando a dependência da energia livre de Gibbs (G^0), da reação de oxigenação com a temperatura, isto é,

$$\Delta G^0 = 4RT \ln P_{50} \quad (22)$$

onde R é a constante universal dos gases ($R = 1,987 \text{ cal/}^0\text{C. mol}$), T é a temperatura Kelvin e P_{50} é a afinidade da Hb por O_2 .

Da segunda lei da termodinâmica a energia livre de Gibbs também é definida como:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (23)$$



onde ΔH^0 é a variação da entalpia e ΔS^0 é a variação da entropia da reação. Se ΔH^0 independe da temperatura, então:

$$\Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 = 4RT \ln P_{50} \quad (24)$$

Tal como a entalpia e a entropia, o G^0 é uma função de estado, ou seja, as suas variações dependem dos estados inicial e final do sistema. Usando duas temperaturas diferentes, T_i e T_j e rearranjando a equação 24, temos:

$$\ln P_{50j} = \frac{\Delta H^0}{RT_j} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad (24.a)$$

$$\ln P_{50i} = \frac{\Delta H^0}{RT_i} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad (24.b)$$

Assumindo que ΔH^0 e ΔS^0 são independentes da temperatura e subtraindo a equação 24.a pela 24.b, obtemos:

$$\ln P_{50} = \frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T_j} - \frac{1}{T_i} \right) \quad (24)$$



Esta equação pode ser usada para calcular a constante de equilíbrio em diferentes temperaturas. Medidas das constantes de equilíbrio em diferentes temperaturas são extensivamente utilizadas para determinar o ΔH^0 a partir do gráfico de $\ln P_{50}$ versus $1/T$, gráfico esse conhecido como gráfico de van't Hoff. A derivada de $\ln P_{50}$ em função de $1/T$, fornece:

$$-\frac{d \ln P_{50}}{d(1/T)} = 4 \frac{\Delta H^0}{R} \quad (26)$$

A inclinação do gráfico de $\ln P_{50}$ versus $1/T$, fornece portanto o valor de $-\Delta H^0$.

2) OBJETIVOS DO TRABALHO

Colombo e colaboradores têm demonstrado que a água tem papel fundamental no controle alostérico da hemoglobina durante a mudança dos extremos conformacionais, R→T, (Colombo, *et al.*, 1992, 1994, 1996).

O objetivo inicial deste trabalho foi construir e por em funcionamento um método automático e preciso para determinar as curvas de desoxigenação/oxigenação de hemoproteínas, baseado na medida espectropolarimétrica das curvas de oxigenação em uma cela de medida originalmente proposta por Imai (Imai, K., 1980). Com isto seria possível determinar as OEC de Hb na presença de solutos neutros, como açúcares e polióis e o efeito da atividade de água sobre as propriedades termodinâmicas da reação de oxigenação da Hb poderiam ser exploradas em diversas condições experimentais, tais como a diferentes temperaturas.

Destes estudos objetivamos determinar as propriedades funcionais da hemoglobina, calcular os parâmetros de Adair, que são as constantes de ligação de O₂ à Hb a cada passo da reação e utilizar a equação de Gibbs-Duhem para a obtenção dos perfis de hidratação da hemoglobina. Por demais, pretende - se estender os



estudos sobre a contribuição da água para a energética desta ligação, determinando a dependência de ΔG de oxigenação com a temperatura e portanto, ΔH e ΔS . Neste trabalho, descrevemos a experiência adquirida ao montar uma cela espectropolarimétrica para determinar as OEC, as modificações da cela original que tiveram que ser realizadas para a obtenção de curvas de oxigenação no equilíbrio de soluções viscosas e, finalmente, os resultados iniciais da investigação do efeito da atividade de água sobre ΔH e ΔS da reação.



3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) PURIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA

O sangue foi obtido de indivíduos adultos, sadios e não fumantes. O plasma foi retirado por centrifugação, a 2500 g. As hemácias foram lavadas cinco vezes em solução salina tamponada (NaCl 0.9%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.5 + EDTA 1 mM). A hemólise ocorreu com a adição do tampão Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8.5 e o passo seguinte foi a retirada de "debris" com a adição de clorofórmio na amostra sob agitação constante. Em seguida houve a centrifugação a 2.300 g por 40 minutos.

O sobrenadante foi filtrado em membrana Milipore 1.6 μ m e a amostra foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8,5 por 24 horas para remoção de fosfatos.

A purificação da amostra foi feita por cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex A-50 com gradiente de pH, em força iônica constante e igual à 50 mM. No gradiente de pH usamos como tampão A, Tris-HCl 15 mM em pH 8,4; e tampão B, Bis-Tris-HCl 15 mM em pH 7,0.



Novamente a amostra é passada em uma coluna, mas agora de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA, para desionização da solução, sendo posteriormente concentrada por centrifugação em microconcentrador Amicon e estocada em N₂ líquido.

Para checar a purificação da Hb, alíquotas dessa proteína foram submetidas a uma eletroforese não desnaturalante - PAGE, corada por impregnação de nitrato de prata (Laemmli *et al.*, 1970). A figura 3 mostra as frações de Hb humana antes e após a purificação.



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

Nota-se, na figura 3, que a Hb A₀ esta purificada pois nas posições 1, 2, 5, 7, 8, 9 e 10 existe apenas uma fração.

3.2) ESTUDOS FUNCIONAIS PELO MÉTODO DE IMAI.

O método de Imai foi originalmente desenvolvido para proporcionar um meio mais preciso para estudar as propriedades funcionais de Hb, e tem sido aplicado com sucesso para muitas espécies desta proteína com a finalidade de revelar suas particularidades funcionais (Imai, 1981). O método de oxigenação automática é uma combinação da determinação polarimétrica da concentração de oxigênio (O_2) dissolvido em solução com a determinação espectrofotométrica da saturação ($\bar{Y}$) da Hb por O_2 .

A combinação de ($\bar{Y}$) e pO_2 determina a curva de equilíbrio de oxigenação continuamente de hemoglobinas naturais ou modificadas sob uma variedade de condições. Com estes dados é possível determinar as constantes de Adair e os parâmetros de alguns modelos alostéricos (Adair, 1925; Monod *et al.*, 1965).

A curva de equilíbrio de ligação de O_2 à Hb é determinada pela interdependência entre a pO_2 (pressão parcial de O_2) e a fração de saturação de O_2 ($\bar{Y}$) naquela pO_2 . Diversos métodos têm sido desenvolvidos para determinar esta curva. Em cada um destes métodos a atividade de O_2 dissolvido em solução é determinada diretamente ou então calculada. A saturação fracional de O_2 ($\bar{Y}$) é



calculada a partir das variações espectrais que acompanham a combinação de O_2 à heme da Hb.

A construção da OEC pode ser feita por métodos classificados em duas categorias: Dinâmico e Estático. No primeiro, a pO_2 varia continuamente, mas em condições que se possa manter o equilíbrio da reação à qualquer momento. A pO_2 e $\bar{Y}$ são determinados simultaneamente o que possibilita a medida de uma curva contínua.

Por sua vez, no Método Estático, no qual a variação de pO_2 não é contínua, a curva é determinada ponto a ponto, onde a pressão parcial de oxigênio e a saturação são determinados constantemente, e através dos vários pontos obtidos a curva é construída. Para exemplificar o Método Estático pode-se citar a tonometria (Giardina e Amicone, 1981), que é uma técnica que consiste na utilização de um tonômetro. Neste, uma solução de Hb é equilibrada com uma mistura de gases de pO_2 conhecida.

Geralmente o método dinâmico tem as seguintes vantagens sobre o método estático: (a) a curva de equilíbrio contém muito mais informações do que uma reunião de pontos, especialmente quando a curva não é uma sigmoíde simples; (b) é mais preciso; (c) a aquisição, o processamento e a estocagem de dados são



facilmente feitas; (d) a obtenção da curva realizada pelo método dinâmico nos permite acompanhar o curso do experimento através do teste visual da curva. Devido a estas vantagens o método tonométrico clássico (Giardina e Amicone, 1981) vem sendo gradualmente substituído por este método automático (Ackers, 1980).

3.3) DESCRIÇÃO DA CELA ESPECTROPOLARIMÉTRICA.

A figura 4 mostra um esquema de toda a aparelhagem utilizada na montagem da cela espectropolarimétrica, baseada na cela de Imai, construída em nosso laboratório.

Nesse sistema de oxigenação uma solução de oxi-Hb é colocada em uma cela de acrílico termostatizada, equipada com um eletrodo de oxigênio, com caminho óptico de 12 mm, montada no compartimento para cela de um espectrofotômetro Cary 13E Varian que possui uma janela óptica que permite a passagem de luz pela cela. A solução de Hb é agitada constantemente por um agitador magnético conectado a uma fonte Sincler SPS 2520A, mantida a uma tensão constante de 3,5 V.



A temperatura é previamente estabelecida e controlada por um banho Neslab RTE 221. A entrada de gás Nitrogênio ocorre por intermédio de um capilar que está acoplado na região inferior da cela. O gás N_2 passa primeiro numa câmara umidificadora acoplada à própria cela. Em seguida, o gás atravessa um capilar que interliga as duas câmaras, que compõe a cela e entra em contato com a solução. Um gradiente de pressão de O_2 entre a fase gasosa de N_2 e a solução é criado induzindo a desoxigenação da solução, que ocorre gradativamente com a liberação do oxigênio ligado a proteína. Após a completa desoxigenação da amostra, monitorada pela constância da voltagem do eletrodo e da absorbância medida, o fluxo de N_2 é suspenso e ar ou O_2 é introduzido na fase gasosa da cela e procede-se à medida de reoxigenação da amostra.



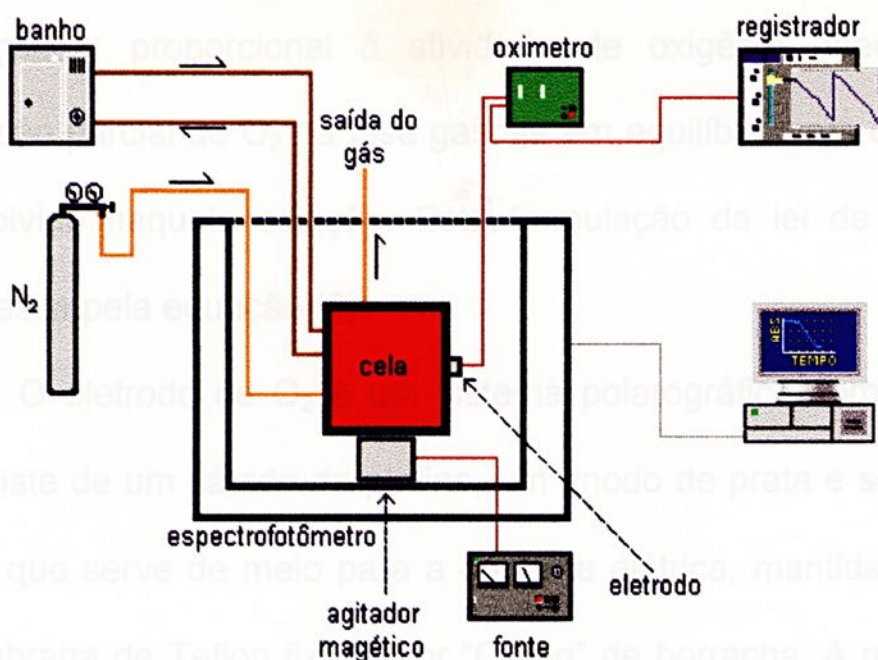


Figura 4: A figura acima esquematiza os equipamentos utilizados pelo método de oxigenação automática. A parte central representa a cela montada em um suporte para cela de um espectrofotômetro Cary 13E Varian. Um agitador magnético, que está ligado a uma fonte Sincler SPS 2520A, é montado sob o suporte. A entrada do N_2 gasoso ocorre pela parte inferior da cela. O eletrodo de O_2 é monitorado por um circuito que envia os sinais para um registrador Rikadenki. A temperatura do sistema é controlada por um banho Neslab RTE 221. A mudança da absorbância da solução de Hb, quando sobre ela variamos a pO_2 , em apenas um comprimento de onda, é acompanhada visualmente e armazenada em um computador para posterior cálculos dos parâmetros funcionais da proteína.

3.3.1) O FUNCIONAMENTO DO ELETRODO DE OXIGÊNIO.

A determinação da concentração de oxigênio, $[O_2]$, dissolvido na solução é feita utilizando um eletrodo de O_2 (YSI 5331) que proporciona um caminho direto para a medida da pO_2 da amostra. O valor de $[O_2]_{\text{dissolvido}}$ é, para uma dada solução de composição

designada, proporcional á atividade de oxigênio, medida pela pressão parcial de O_2 na fase gasosa em equilíbrio com o oxigênio dissolvido naquela solução. Esta formulação da lei de Henry, é expressa pela equação (3).

O eletrodo de O_2 é um sistema polarográfico completo que consiste de um cátodo de platina, um ânodo de prata e solução de KCl, que serve de meio para a corrente elétrica, mantida por uma membrana de Teflon fixada por "O-ring" de borracha. A membrana fina de Teflon forma uma barreira mecânica e elétrica entre o eletrólito e a solução contendo o gás.

Quando uma voltagem polarizada (0,8 V) é aplicada entre o cátodo e o ânodo, o oxigênio existente sobre a membrana é reduzido, produzindo uma corrente.



onde E^0 é o potencial padrão de redução do oxigênio (Atkins, 1990)

Devido ao gradiente de oxigênio entre a fase da solução e o eletrodo, o O_2 difunde através da membrana em uma velocidade diretamente proporcional à concentração do gás dissolvido na solução. Com as condições de equilíbrio atingidas, a corrente

gerada no eletrodo é proporcional à concentração de O_2 na solução. Este sinal de corrente é enviado à um medidor de oxigênio, contendo um circuito previamente montado em nosso laboratório, que converte a corrente gerada no eletrodo em voltagem ao longo da queda de potencial de um resistor. Este circuito está representado na figura 5:

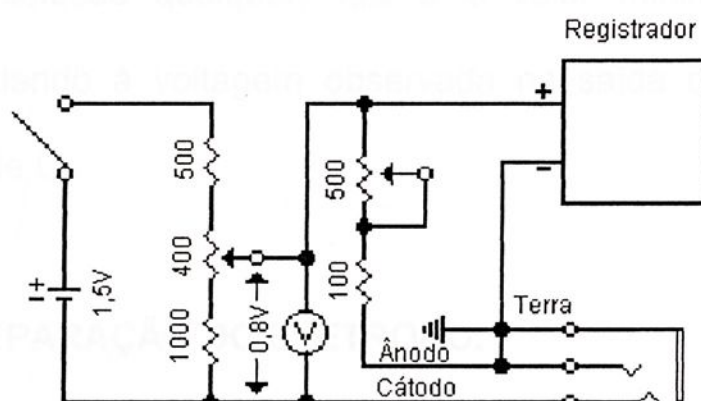


Figura 5: Circuito utilizado para polarizar o eletrodo com uma diferença de potencial (d.d.p.) de 0.8 V. Quanto maior for a concentração de O_2 na solução, menor é a resistência elétrica no circuito, e quanto menor for a concentração de O_2 na solução, maior é a resistência elétrica no circuito. Assim essa variação de O_2 é diretamente proporcional a variação de tensão a ser registrada ("Instructions for YSI 5331 Oxygen Probe"-YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio 45387 USA).

A tensão medida a todo instante é registrada por um registrador Rikadenki. Estes valores de tensão são posteriormente convertidos em valores de pO_2 pela expressão de calibração do eletrodo a seguir:

$$pO_2 = p_T \cdot \left(\frac{V_i - V_{\min}}{V_{\max} - V_{\min}} \right) \quad (28)$$

onde p_T é a pressão de oxigênio² usada para calibrar o eletrodo e $V_{\max}$ a tensão correspondente à esta pressão; V_i é o valor da voltagem correspondente à uma determinada concentração de O_2 em uma solução qualquer; $V_{\min}$ é o valor mínimo de tensão correspondendo à voltagem observada na saída do eletrodo na ausência de O_2 .

3.3.2) PREPARAÇÃO DO ELETRODO.

Ao dar início aos experimentos, a primeira tarefa a ser executada foi a preparação do eletrodo. Uma membrana de Teflon é fixada por um “O-ring” ao eletrodo. Entre a membrana e o eletrodo é colocada uma ou duas gotas de solução saturada de KCl (3 molar), que serve de meio condutor para a corrente elétrica. Além da função de fixar a membrana ao eletrodo, o “O-ring” também é utilizado para vedar o encaixe do eletrodo na cela, garantindo assim o gradiente de pressão de oxigênio.

² A pressão total é calculada da pressão barométrica, P_b , pressão de vapor de água, P_w , e da quantidade de oxigênio (%) na mistura gasosa, isto é, $P_T = (\%O_2 / 100) \times (P_b - P_w)$



A velocidade de leitura do eletrodo de oxigênio depende da espessura da membrana, ou seja, a resposta é mais rápida com a membrana "High Sen's" (7230-R53(YSI 5776)) do que com a "Standart" (7230-R50(YSI 5775)).

3.3.3) CALIBRAÇÃO ESTÁTICA DO OXÍMETRO.

A calibração do oxímetro é feita fazendo-se passar gases de concentrações conhecidas de O_2 (20%, 5%, 3% de O_2 e N_2) na cela contendo água para cada mistura gasosa. O tempo necessário para a estabilização da leitura do eletrodo foi de aproximadamente 20 minutos.

Após a obtenção da leitura da voltagem do eletrodo em equilíbrio com a mistura gasosa correspondente a 20% de O_2 é feita à passagem do N_2 para obter o valor de voltagem do eletrodo na ausência de O_2 . Estes dois pontos representam o máximo e mínimo de O_2 dissolvido na solução, respectivamente. A seguir a calibração é confirmada com as misturas de gases contendo 3 e 5% de oxigênio.

Os dados obtidos, apresentados na tabela 1, mostram uma calibração típica do oxímetro.



Concentração de gases	Leitura do Oxímetro (mV)
0% de O ₂ (N ₂ puro)	0
3% de O ₂	23,2
5% de O ₂	37,7
20% de O ₂	149,1

Tabela 1: Valores experimentais da calibração do oxímetro com nitrogênio puro e misturas gasosas de oxigênio em diferentes concentrações (3%, 5% e 20 %).

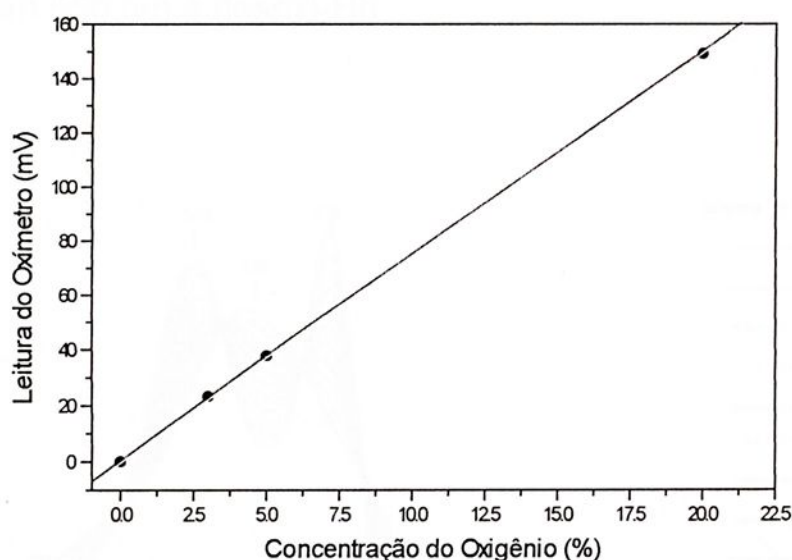


Figura 6: Curva de calibração do oxímetro com nitrogênio puro e misturas gasosas de oxigênio a 3, 5 e 20 % de concentração. A correlação, para o ajuste feito nesta calibração, foi de 0.9998.

A figura 6 mostra o gráfico da tensão do oxímetro para cada valor de concentração de O₂ nas misturas especiais de gases usados para calibração do eletrodo. O alinhamento destes pontos demonstra que a resposta do eletrodo é linear com a concentração de O₂ dissolvido na solução.



3.4) DETERMINAÇÃO DA SATURAÇÃO FRACIONAL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

A figura 7 mostra o espectro da Hb para diversas saturações e as variações espectrais que acompanham a liberação ou ligação do O₂. O espectro com picos de absorção em 540 nm e 576 nm correspondem à Hb totalmente oxigenada e o espectro com pico de absorção em 550 nm à desoxi-Hb.

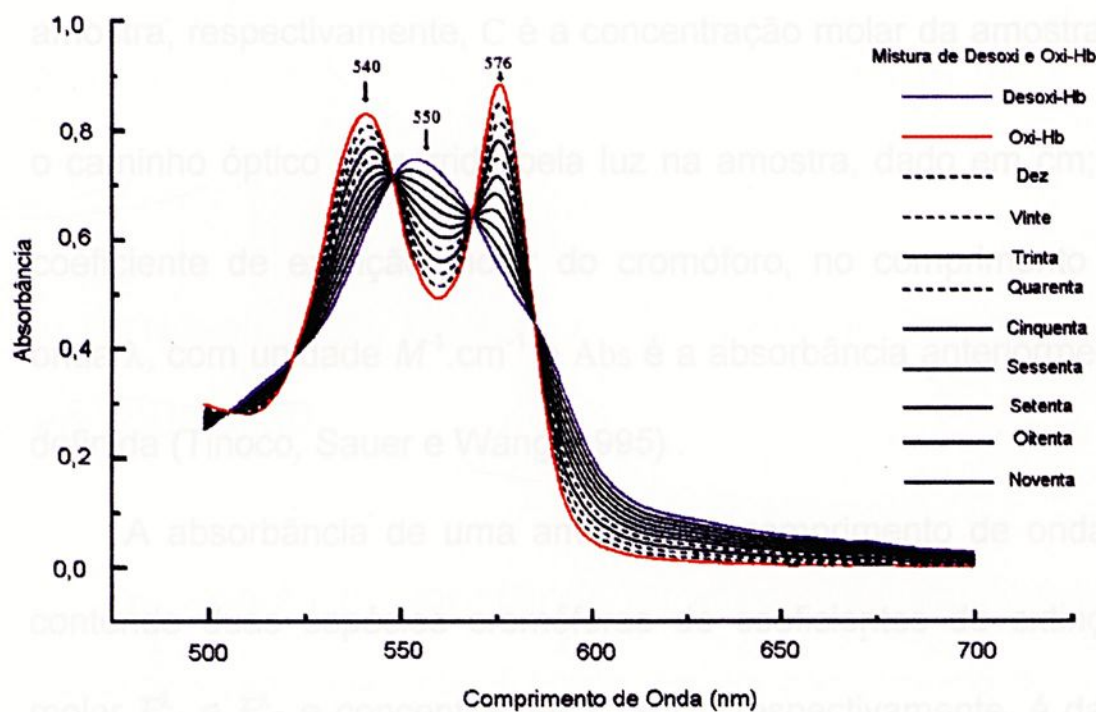


Figura 7: A figura acima mostra os espectros de absorção da desoxi-Hb (—) da oxi-Hb (—), na região do visível. Os espectros intermediários são referentes à diferentes saturações que a Hb apresenta durante o processo de desoxigenação e/ou oxigenação.



3.4.1) A LEI DE BEER-LAMBERT.

A absorbância de uma espécie cromófora é dada pela Lei de Beer-Lambert, ou seja,

$$\text{Abs} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon^\lambda \cdot \ell \cdot C \quad (29)$$

onde I_0 e I são a intensidade da luz incidente e emergente da amostra, respectivamente, C é a concentração molar da amostra, ℓ o caminho óptico percorrido pela luz na amostra, dado em cm; ϵ^λ coeficiente de extinção molar do cromóforo, no comprimento de onda λ , com unidade $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e Abs é a absorbância anteriormente definida (Tinoco, Sauer e Wang, 1995) .

A absorbância de uma amostra no comprimento de onda λ contendo duas espécies cromóforas de coeficientes de extinção molar ϵ_1^λ e ϵ_2^λ e concentrações C_1 e C_2 , respectivamente, é dada por

$$\text{Abs} = \epsilon_1^\lambda C_1 \cdot \ell + \epsilon_2^\lambda C_2 \ell \quad (30)$$



Para uma reação na qual ocorre a interconversão da espécie 1 em 2, ou vice e versa, a absorbância medida varia dependendo de quão E^{λ}_1 difere de E^{λ}_2 , portanto, pode ser acompanhada espectrofotometricamente.

No presente estudo acompanhamos a oxigenação e ou desoxigenação da Hb pela variação da absorção em $\lambda=576$ nm que corresponde à um dos picos da absorção da oxi-Hb. Neste comprimento de onda o coeficiente de extinção molar da oxi é $1,53 \times 10^4 M^{-1}.cm^{-1}$ e da desoxi é $0.98 \times 10^4 M^{-1}.cm^{-1}$ (Riggs, 1981).

4) DETERMINAÇÃO DINÂMICA DA CURVA DE OXIGENAÇÃO NO EQUILÍBRIO.

A variação da absorbância da solução de Hb durante a desoxigenação/oxigenação é obtida em um comprimento de onda fixo ($\lambda=576$ nm). Um exemplo destas medidas é apresentado na figura 8, onde está pontuado o valor da Abs da Hb em função da pressão de oxigênio.



A obtenção desta curva é feita medindo-se simultaneamente a variação da absorbância (ΔAbs) e da voltagem do oxímetro enquanto um fluxo de N_2 ou O_2 é mantido sobre a superfície da solução.

Os valores da pO_2 , apresentados neste gráfico, foram calculados a partir dos valores de voltagem pela expressão 28:

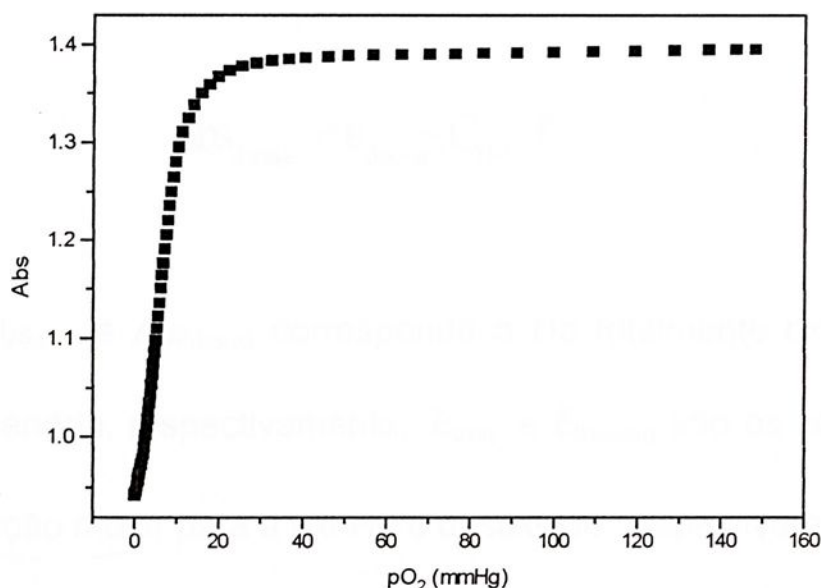


Figura 8: Curva de equilíbrio de oxigenação (OEC) da hemoglobina humana A_0 em solução contendo $60 \mu\text{M}$ heme, tampão Hepes 50 mM , NaCl 100 mM , pH $7,3$ à 298 K . Os pontos obtidos são referentes a etapa de desoxigenação. A absorbância foi medida em um comprimento de onda fixo ($\lambda = 576 \text{ nm}$). A pO_2 no início do experimento era de 148 mmHg e quando a amostra estava totalmente desoxigenada o valor da pO_2 é zero mmHg .

A partir dos dados apresentados na figura 8 a fração de sítios ocupados ($\bar{Y}$), em cada valor de pO_2 é dada por,

$$\bar{Y} = \frac{[\text{oxi. Hb}]}{[\text{Hb}_{\text{total}}]} = \frac{[\text{oxi. Hb}]}{[\text{oxi. Hb}] + [\text{desoxi. Hb}]} \quad (31)$$

Como a hemoglobina apresenta duas espécies cromóforas, a oxi-Hb e a desoxi-Hb, se aplicarmos a lei de Beer-Lambert (equação 28) para cada espécie pura teremos,

$$\text{Abs}_{\text{oxig.}} = \varepsilon_{\text{oxig.}} \cdot C_{\text{HbT}} \cdot \ell \quad (32)$$

e

$$\text{Abs}_{\text{desoxig.}} = \varepsilon_{\text{desoxig.}} \cdot C_{\text{HbT}} \cdot \ell \quad (33)$$

onde Abs_{oxi} e $\text{Abs}_{\text{desoxi}}$ corresponde à Hb totalmente oxigenada e desoxigenada, respectivamente, $\varepsilon_{\text{oxig.}}$ e $\varepsilon_{\text{desoxig.}}$ são os coeficientes de extinção molar para a oxi-Hb e desoxi-Hb, respectivamente.

À uma dada $p\text{O}_2$ na qual a concentração de oxi-Hb é C_{oxi} e de desoxi-Hb, C_{desoxi} , a absorvância Abs_i é dado por:

$$\text{Abs}_i = \left(\varepsilon_{\text{oxig.}} C_{\text{oxig.}} + \varepsilon_{\text{desoxig.}} C_{\text{desoxig.}} \right) \cdot \ell \quad (34)$$

Substituindo $E_{\text{oxig.}}$ e E_{desoxig} (equações 32 e 33) acima, e C_{HbT}
 $= C_{\text{oxi}} + C_{\text{desoxi}}$, chegamos à seguinte expressão,

$$Abs_i = Abs_{\text{oxig.}} \frac{C_{\text{oxig.}}}{C_{\text{HbT}}} + Abs_{\text{desoxig.}} \frac{C_{\text{desoxig.}}}{C_{\text{HbT}}} \quad (35)$$

onde C_{HbT} é a concentração total da hemoglobina na solução.

Pela expressão 34 pode-se obter a absorvância da Hb (Abs_i) em qualquer instante da desoxigenação ou oxigenação.

Sabendo que $\frac{C_{\text{oxig.}}}{C_{\text{HbT}}} + \frac{C_{\text{desoxig.}}}{C_{\text{HbT}}} = 1$, que a razão entre a concentração de Hb oxigenada e a concentração total da Hb é igual a saturação, $\bar{Y} = \frac{C_{\text{oxig.}}}{C_{\text{HbT}}}$, e a razão entre a concentração de Hb totalmente desoxigenada e a concentração total da Hb é igual a $(1 - \bar{Y})$, podemos escrever a expressão 35 da seguinte maneira:

$$Abs_i = Abs_{\text{oxig.}} \bar{Y} + Abs_{\text{desoxig.}} (1 - \bar{Y}) \quad (36)$$

que rearranjada a partir das absorvâncias medidas a saturação da Hb por O_2 é dada por:



$$\bar{Y} = \frac{Abs_i - Abs_{desoxi}}{Abs_{oxi} - Abs_{desoxi}} \quad (37)$$

onde Abs_i : é a absorbância em uma dada pO_2 ,

Abs_{oxi} : absorbância da amostra totalmente oxigenada,

Abs_{desoxi} : absorbância da amostra totalmente desoxigenada.

Os valores das absorbâncias para a solução desoxigenada (Abs_0 ou Abs_{desoxi}) e solução oxigenada (Abs_∞ ou Abs_{oxi}) são obtidos por extrapolações dos pontos iniciais e finais da curva de equilíbrio de ligação de oxigênio. Assim é possível determinar os valores da saturação nos extremos da curva de equilíbrio de oxigenação com precisão (Imai, 1994).

O valor da absorbância na forma oxigenada (Abs_{oxi}) é obtido pela extrapolação da porção superior do gráfico de Abs versus $1/pO_2$, quando a pO_2 tende ao "infinito" ($1/pO_2 \rightarrow 0$).



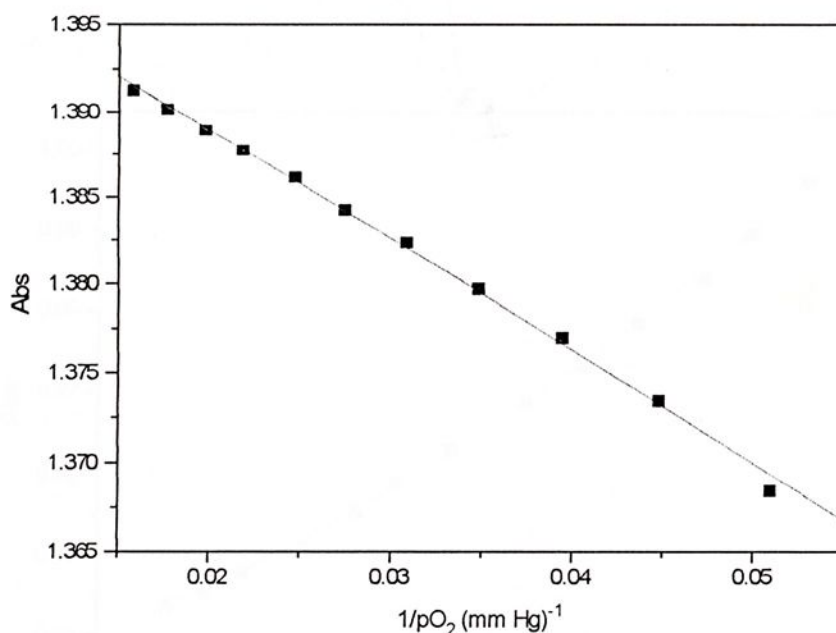


Figura 9: A figura acima mostra a extrapolação da absorbância *versus* $1/pO_2$, quando $1/pO_2 \rightarrow 0$. A solução continha $60 \mu\text{M}$ heme, tampão Hepes 50 mM , NaCl 100 mM , pH $7,3$ à 298 K . Os valores de absorbância foram medidos em 576 nm . O ajuste da porção superior da curva foi feito por regressão linear ($y=mx+b$) e o valor da absorbância quando Hb esta totalmente oxigenada (Abs_{oxi}) foi de $1,3918$.

Por sua vez o valor de Abs_0 é obtido pela extrapolação do gráfico de Abs com pO_2 indo para zero. Esta extrapolação é realizada pelo ajuste de uma função quadrática ($\text{Abs} = ax^2 + bx + c$) para os pontos que se encontram na região inicial da curva.

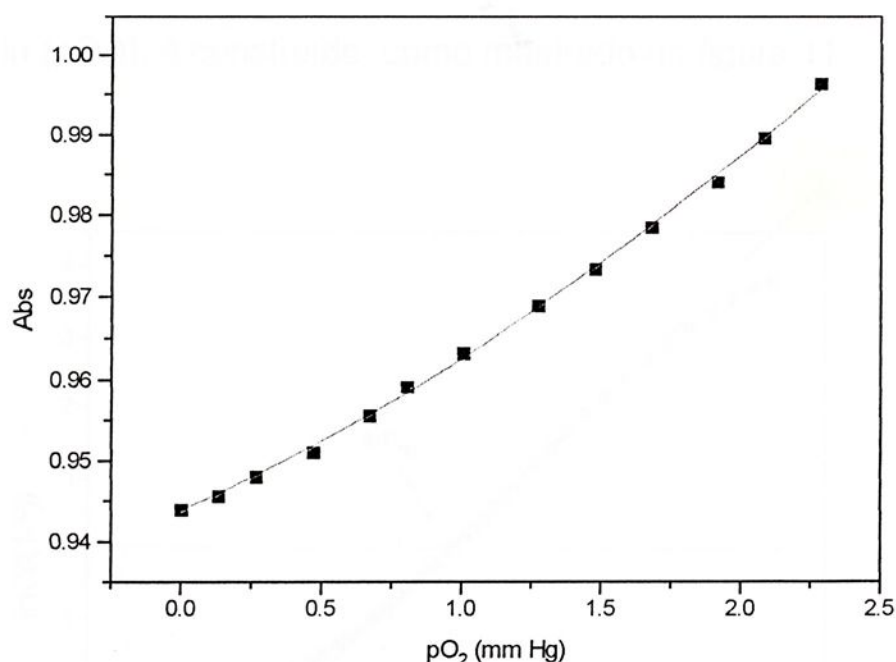


Figura 10: A extrapolação da absorbância *versus* pO₂. A solução continha 60 μ M heme, tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K. Os valores de absorbância foram medidos em 576 nm. O ajuste da porção inferior da curva foi feito pela função quadrática descrita no texto e o valor da absorbância quando à Hb esta totalmente desoxigenada (Abs_{desoxi}) foi igual a 0,9436.

Uma vez determinados os valores de Abs_{oxi} e Abs_{desoxi} , a curva de oxigenação expressa em termos de Absorbância (Abs) *versus* pO₂ é normalizada em termos da fração de sítios ocupados, $\bar{Y}$, conforme a equação 37.

4.1) O GRÁFICO DE HILL.

A partir dos valores de $\bar{Y}$ e pO_2 , o gráfico de Hill ($\ln (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\ln (pO_2)$), é construído, como mostrado na figura 11.

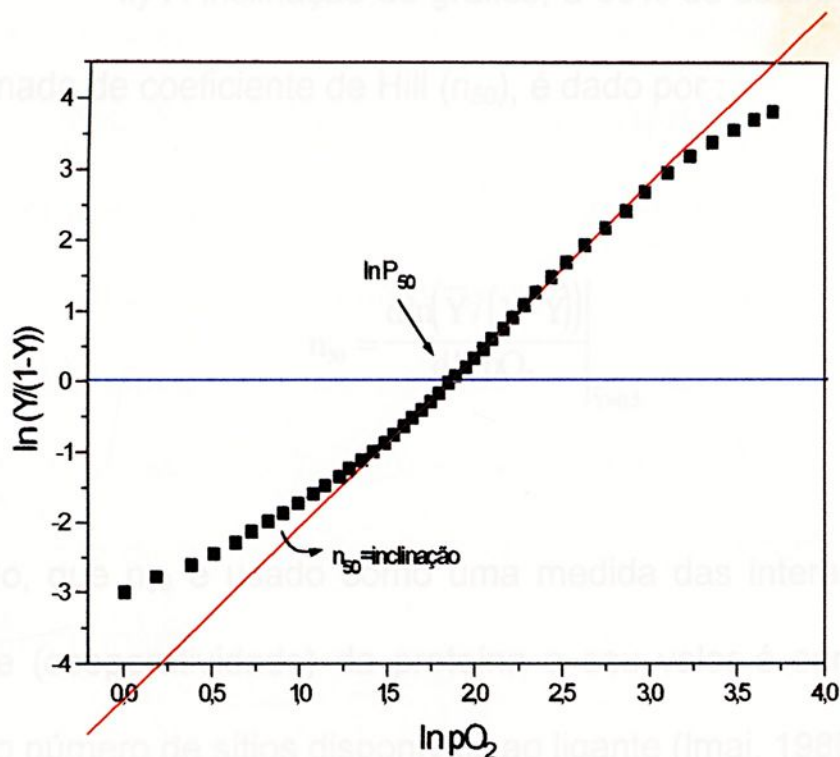


Figura 11: Gráfico de Hill ($\ln (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\ln pO_2$) da Hb A₀ em solução contendo 60 μ M heme, tampão Hepes 50 mM, 100 mM NaCl, pH 7,0 à 298 K. Os pontos obtidos são referentes ao processo de desoxigenação. O valor da afinidade ($P_{50} = 6,48 \pm 0,32$ mm Hg) foi obtido da interseção deste gráfico com o eixo de $\ln pO_2$ e o da cooperatividade ($n_{50} = 2,43 \pm 0,06$) é a inclinação do mesmo.

O gráfico de Hill descreve parâmetros funcionais da Hb, tais como a afinidade (P_{50}) e a cooperatividade (n_{50}) que são obtidos do seguinte modo:

I) A interseção deste gráfico com o eixo de $\ln pO_2$ à $\ln (\bar{Y}/(1-\bar{Y})) = 0$, fornece o valor de $\ln P_{50}$, que é a pressão de O_2 quando metade dos sítios de ligação da proteína estão saturados.

II) A inclinação do gráfico, a 50% de saturação também chamada de coeficiente de Hill (n_{50}), é dado por :

$$n_{50} = \left. \frac{d \ln(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))}{d \ln pO_2} \right|_{\bar{Y}=0.5} \quad (38)$$

sendo, que n_{50} é usado como uma medida das interações heme-heme (cooperatividade) da proteína e seu valor é sempre menor que o número de sítios disponíveis ao ligante (Imai, 1980).

4.2) CONTROLE DO FLUXO DOS GASES.

O controle do fluxo de N_2 é necessário durante a desoxigenação, sendo que tal controle não se faz presente na reoxigenação uma vez que o capilar é aberto e ocorre a entrada de ar no interior da cela. A velocidade de desoxigenação e reoxigenação depende de fatores tais como a taxa de difusão dos



gases na solução e da quantidade de oxigênio dissolvido na solução. A taxa de difusão de O_2 entre as fases depende da diferença de pO_2 entre a fase gás e líquido, da viscosidade da amostra e da temperatura da cela. À medida que N_2 gasoso é injetado na cela, o oxigênio existente na fase gasosa é retirado e o O_2 da solução difunde para a fase gasosa por gradiente de concentração. A diminuição da concentração de O_2 dissolvido em solução diminui a velocidade de desoxigenação.

Outro fator que afeta o tempo de medida é a concentração de Hb na solução, uma vez que com o aumento da concentração a quantidade de oxigênio ligado à proteína na sua forma oxigenada também é maior.



5) RESULTADOS.

5.1) O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA SOLUBILIDADE DE O_2 .

A solubilidade de gases na solução depende da composição desta. Para investigar como a solubilidade de O_2 dissolvido na solução muda com a concentração de sacarose foi realizado um experimento onde obteve-se um gráfico de voltagem em função da concentração de sacarose na solução. Para cada concentração de sacarose, o primeiro passo foi desoxigenar a solução com a passagem de N_2 seguida da passagem de uma mistura especial de gás (contendo 20% de O_2). O valor da voltagem referente a essa mistura especial de gás contendo 20% de O_2 é diretamente proporcional a concentração de O_2 para cada condição experimental.

Notamos que à medida que a concentração de sacarose aumenta o valor da voltagem medida pelo oxímetro diminui. Os dados obtidos estão representados na tabela 2.



Massa de soluto (sacarose) (g/ 5ml de H ₂ O)	Conc. Molal da solução	Leitura do Oxímetro (mV)
0	0	149,1
0,824	0,25	139,2
1,584	0,5	120,2
2,88	1,0	108,6
3,898	1,5	100,3
4,706	2,0	92,1
5,556	2,5	84,6

Tabela 2: Valores experimentais de voltagem obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Esta tabela foi montada para mostrar que a solubilidade de O₂ muda com a concentração de sacarose.

O decréscimo da corrente no eletrodo, e portanto da tensão medida a cada concentração de sacarose está relacionado à diminuição da solubilidade do oxigênio na solução. Este resultado reflete a dependência da constante de Henry com a composição da solução. Entretanto, a atividade de O₂ (a_{O_2}) permanece inalterada quando a pO_2 na fase gasosa é mantida constante. Os resultados estão ilustrados na figura 12.



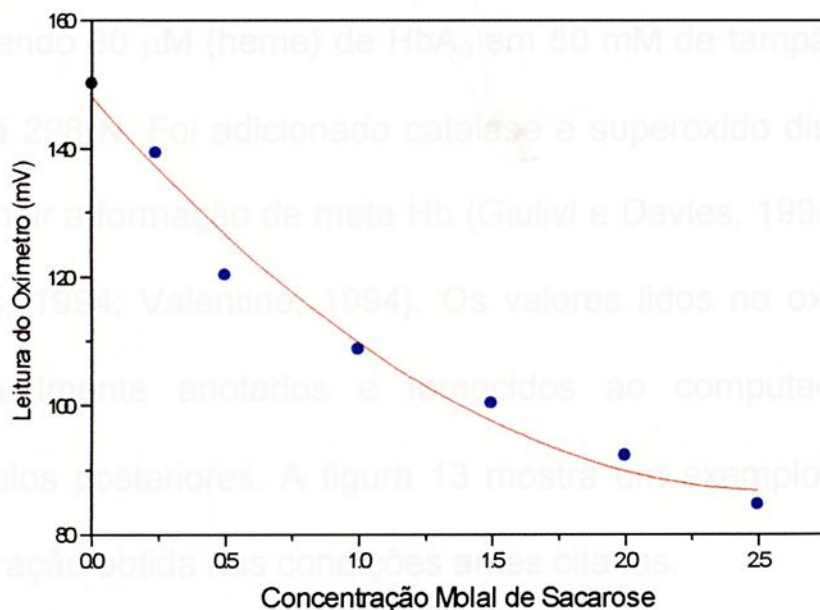


Figura 12: O gráfico de concentração Molal de sacarose *versus* voltagem (mV), mostra o comportamento da pO_2 à medida que a concentração de sacarose é aumentada.

O experimento acima demonstra como a constante de solubilidade de O_2 (constante de Henry - K_H) varia com a composição da solução. O gráfico mostra que o aumento da concentração de sacarose diminui a constante de Henry.

5.2) MEDIDAS DAS CURVAS DE OXIGENÇÃO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SACAROSE.

5.2.1) DIFICULDADES INICIAIS.

Os experimentos iniciais foram realizados em solução contendo 60 μM (heme) de HbA_0 em 50 mM de tampão Hepes, pH 7,0 à 298 K. Foi adicionado catalase e superóxido dismutase para diminuir a formação de meta Hb (Giulivi e Davies, 1990; Jameson e Ibers, 1994; Valentine, 1994). Os valores lidos no oxímetro foram manualmente anotados e fornecidos ao computador para os cálculos posteriores. A figura 13 mostra um exemplo de curva de saturação obtida nas condições antes citadas.

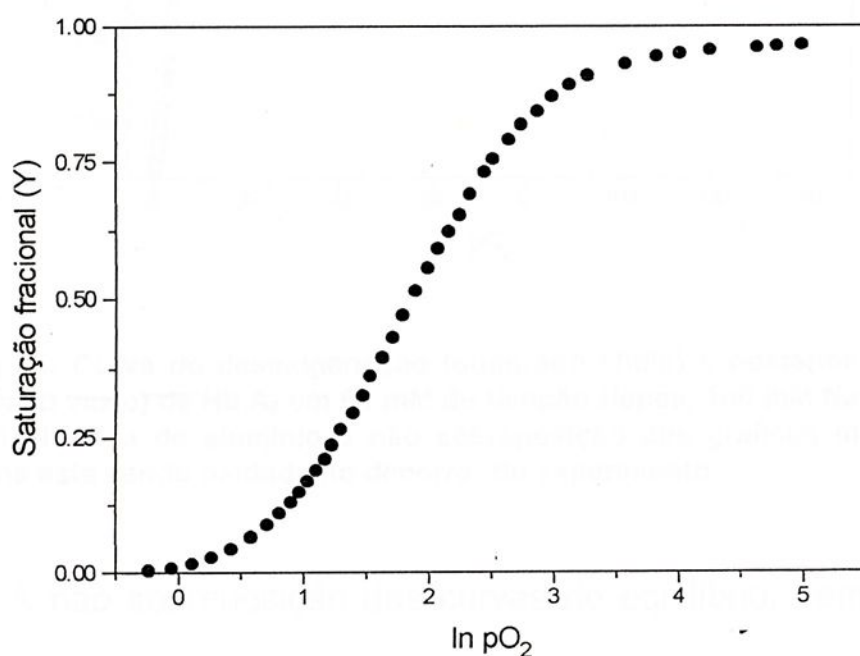


Figura 13: Curva de saturação ($\bar{Y}$ versus $\ln p\text{O}_2$) de hemoglobina humana (HbA_0) em solução contendo 60 μM heme, tampão Hepes 50 mM, pH 7,0 à 298 K. Os pontos obtidos são referentes ao processo de desoxigenação. Os valores da afinidade ($P_{50} = 1,6 \text{ mm Hg}$) e cooperatividade ($n_{50} = 2,7$) estão de acordo com dados obtidos por experimentos realizados nas mesmas condições (Imai, 1981).

Com o eletrodo acoplado ao registrador trabalhamos para obter as curvas de equilíbrio de oxigenação e desoxigenação, como mostra a figura 14. Neste gráfico nota-se a não reversibilidade da reação.

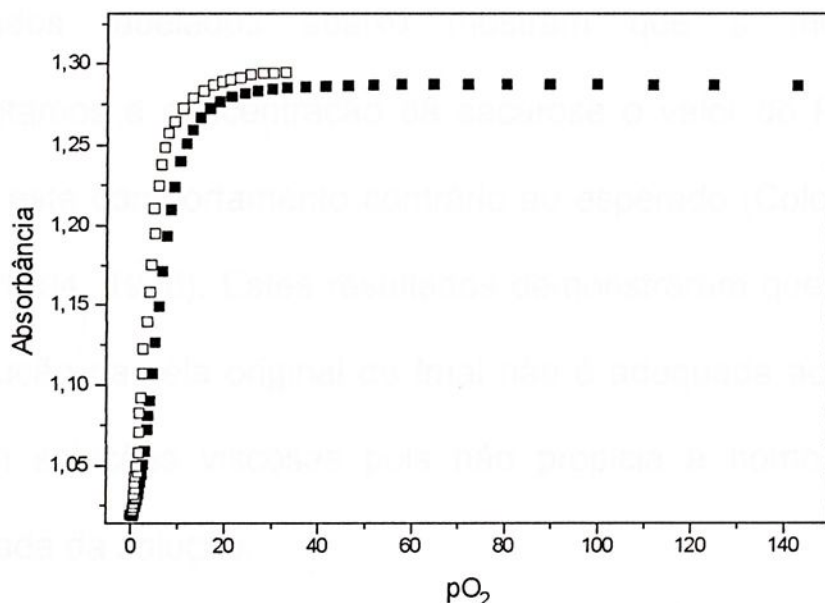


Figura 14: Curva de desoxigenação (quadrado cheio) e posterior oxigenação (quadrado vazio) da Hb A₀ em 60 mM de tampão Hepes, 100 mM NaCl à 298 K e pH 7,0. Na cela de alumínio a não sobreposição dos gráficos mostra que a proteína está sendo oxidada no decorrer do experimento.

A não sobreposição das curvas de equilíbrio, bem como as alterações espectrais ao final do experimento, nos levou a concluir que o alumínio que compunha a estrutura da cela estava oxidando a hemoglobina no decorrer das medidas. A solução encontrada para resolver esse problema foi a confecção de uma nova cela em acrílico.

5.2.2) A ADAPTAÇÃO DE UM AGITADOR AUXILIAR.

Foram realizados vários experimentos, usando tampão Hepes 50 mM, pH 7.3, onde variávamos a concentração de sacarose com o objetivo de medir o efeito de água na afinidade da Hb. Os resultados tabelados abaixo mostram que a medida que aumentamos a concentração da sacarose o valor do P_{50} diminui, sendo este comportamento contrário ao esperado (Colombo *et al.*, 1992, 1994, 1996). Estes resultados demonstraram que a agitação da solução na cela original de Imai não é adequada ao estudo de Hb em soluções viscosas pois não propicia a homogeneização adequada da solução.

Conc. Molal de sacarose	0	0,5	0,8	1,0
P_{50} (mm Hg)	7,37	4,84	5,12	5,4
$\ln P_{50}$	1,99	1,57	1,63	1,68
n_{50}	2,61	2,8	2,4	2,02

Tabela 3: Os valores são referentes a P_{50} , $\log P_{50}$ e n_{50} utilizando a cela de Imai, com solução contendo 60 μM heme, tampão Hepes 50 mM, pH 7,0 à 298 K, em várias concentrações de sacarose.



A figura 15 mostra como solucionamos esse problema de não homogeneização. A idéia foi adaptar um dispositivo auxiliar para deslocar a solução presente na região superior da câmara para a região inferior, e vice-versa. Para executar essa idéia acoplamos à cela uma broca (de $\cong 2,35$ mm de diâmetro) inserida em um suporte.

O suporte consiste de um pequeno tubo cilíndrico de acrílico contendo dois orifícios, um próximo a superfície da solução e próximo da base da cela. Esse cilindro foi adaptado no interior da cela de tal modo que não atrapalhe a passagem da luz enviada pelo espectrofotômetro.

Para movimentar a broca foi adaptado um motor de 12 volts ao suporte de cela. Quando a broca está em movimento, a solução de Hb, que se encontra na superfície da câmara, entra no orifício superior do cilindro de acrílico e é empurrada para baixo, saindo pelo orifício inferior em um movimento contínuo. A agitação proporcionada pelo agitador ("peixinho") e pela circulação de solução auxiliar (broca) resultam numa melhor homogeneização da solução.



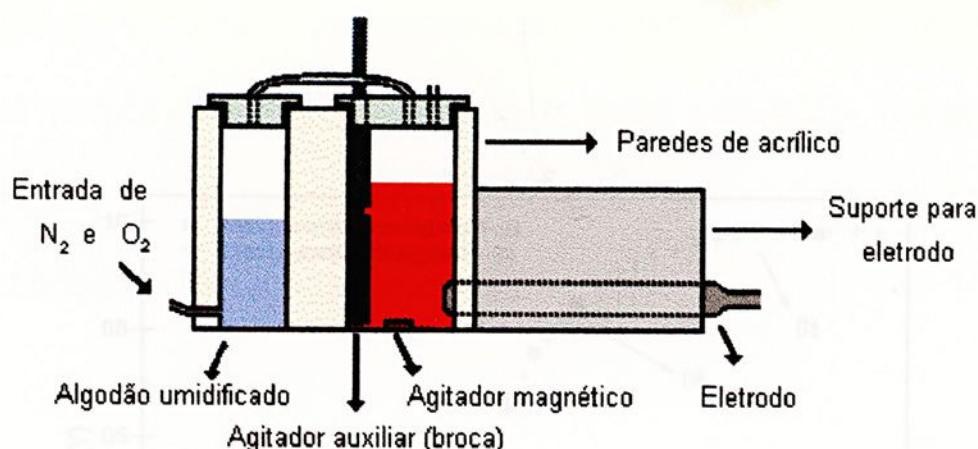


Figura 15: Esboço da cela utilizada nos experimentos. A cela é composta por duas câmaras sendo que a primeira contém algodão umedecido por onde passa o gás (N_2 e O_2). Dessa câmara o gás vai, por intermédio de um capilar, para a segunda onde está a solução de Hb. Nessa câmara se encontra o agitador auxiliar.

6) RESULTADOS COM A NOVA CELA ESPECTROPOLARIMÉTRICA.

A figura 16 mostra uma curva de oxigenação típica obtida pelo método tonométrico (a) e a curva de equilíbrio de oxigenação obtida com a nova cela (b).

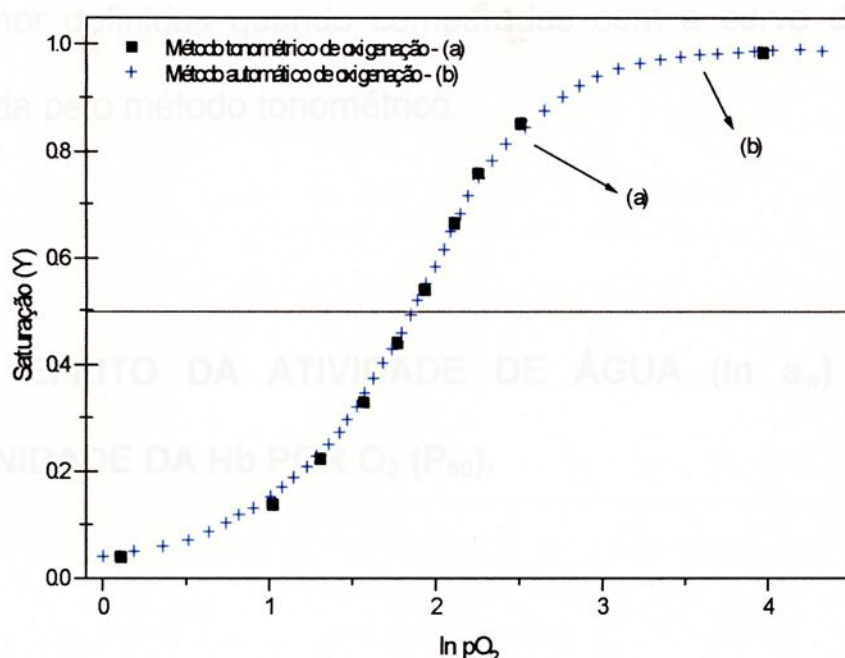


Figura 16: Curvas de equilíbrio de oxigenação (OEC) da hemoglobina humana A₀ obtidas por dois métodos de oxigenação distintos. A curva de saturação obtida pelo método tonométrico (a) continha uma solução com 60 μ M heme, tampão Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 a 298 K e os valores calculados para afinidade e cooperatividade são $P_{50} = 6,23 \pm 0,25$ mm Hg e $n_{50} = 2,8 \pm 0,05$, respectivamente (A curva de saturação obtida pelo método tonométrico foi gentilmente cedida por Flavio Augusto Seixas). Já para a curva de saturação obtida pelo método automático de oxigenação (b), contendo uma solução com 60 μ M heme, tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3, a 298 K, a afinidade calculada foi de $P_{50} = 6,5 \pm 0,32$ mm Hg e a cooperatividade foi de $n_{50} = 2.43 \pm 0,06$.

Pode-se perceber que as duas curvas (a e b) apresentam a região central, onde calculamos a afinidade e a cooperatividade, muito bem definidas. Porém a curva de saturação obtida pelo

método automático de oxigenação contém um número muito maior de pontos. As regiões de alta e baixa saturação, portanto, são melhor definidas quando comparadas com a curva de saturação obtida pelo método tonométrico.

6.1) EFEITO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ($\ln a_w$) SOBRE A AFINIDADE DA Hb POR O_2 (P_{50}).

As curvas de oxigenação em várias concentrações de sacarose foram obtidas com a nova cela espectropolarimétrica. O efeito da adição de sacarose sobre a afinidade da Hb A₀, por O_2 , medido em tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 é mostrado na figura 17. Nesta figura estão representadas as curvas de saturação parcial da Hb em função de $\ln pO_2$ em cada condição experimental.



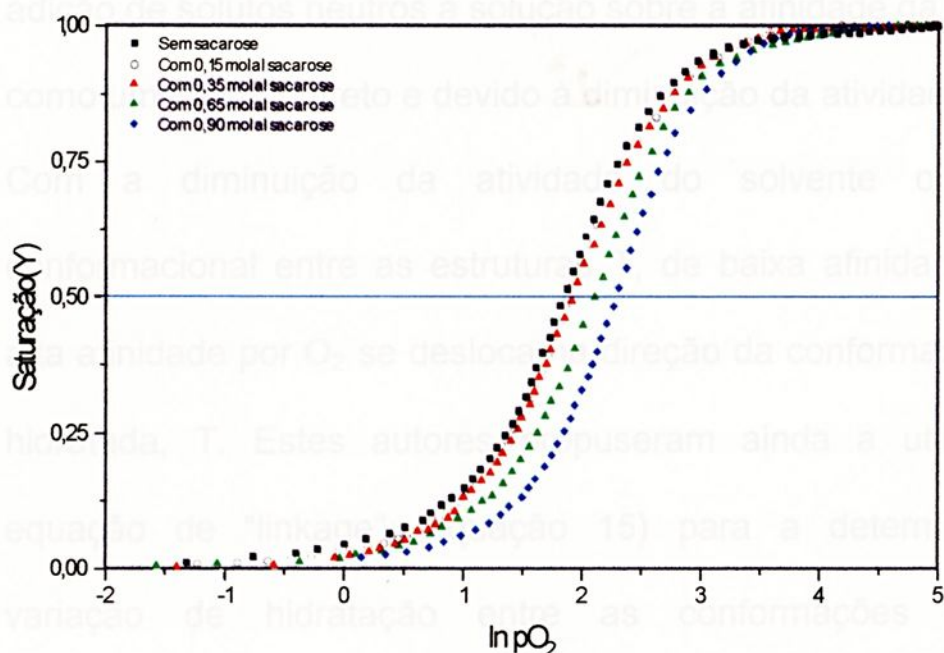


Figura 17: Comportamento da afinidade da Hb A₀ por O₂ em soluções contendo, tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 em várias concentrações de sacarose, como mostra a legenda. Esse comportamento foi observado durante a desoxigenação da proteína a 298 K.

Nesta figura observamos que a afinidade da Hb por O₂ diminui com o aumento da concentração de sacarose.

O comportamento aqui observado está de acordo com o verificado em trabalhos recentes realizados por Colombo e colaboradores (Colombo, *et al.*, 1992, 1994, 1996) utilizando outros métodos de determinação das curvas de saturação (Hem-O-Scan³ e o método Tonométrico). Estes autores, interpretaram o efeito da

³ As OEC são obtidas por este método de oxigenação, fazendo-se passar O₂ em uma câmara termostatzada e humidificada de um espectrofotômetro. Essa câmara contém um filme, composto por uma solução de Hb que está delimitada entre duas membranas permeáveis ao gás. A luz passa pela amostra e o sistema fotodetector monitora a diferença entre as absorbâncias em dois comprimentos de onda. Esta diferença na Abs ocorre com a variação da saturação da Hb por O₂ () e é registrada no eixo y de um gráfico x-y. Um eletrodo de oxigênio monitora a pressão parcial



e o método Tonométrico). Estes autores, interpretaram o efeito da adição de solutos neutros à solução sobre a afinidade da Hb por O_2 , como um efeito indireto e devido à diminuição da atividade de água. Com a diminuição da atividade do solvente o equilíbrio conformacional entre as estruturas T, de baixa afinidade, e R de alta afinidade por O_2 se desloca na direção da conformação menos hidratada, T. Estes autores propuseram ainda a utilização da equação de "linkage" (equação 15) para a determinação da variação de hidratação entre as conformações totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada. A partir de dados de oxigenação obtidos com a nova cela determinamos os valores de P_{50} para cada valor de osmolalidade de solução.

As osmolalidades das soluções contendo Hb (**osm**) foram determinadas por medidas de depressão do ponto de congelamento da solução, usando um osmômetro Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.). As osmolalidades das soluções foram determinadas depois da obtenção das curvas de oxigenação da Hb, em cada condição experimental. O logaritmo da atividade de água foi então obtido através da seguinte relação (Colombo et al., 1996):

registra no eixo x do gráfico. Um gráfico de $Abs \times pO_2$ é obtido com o aumento da pO_2 de 0 até níveis em que a amostra encontra-se totalmente saturada (Bonaventura et al, 1981).



$$\ln a_w = \frac{\Delta_{fpd}}{K_f M_w} = \frac{-osm}{55,5} \quad (39)$$

onde Δ_{fpd} é o decaimento do ponto de congelamento, $K_f = 1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$ é a constante crioscópica, e $M_w = 55,5$ é a molaridade da água pura e **osm** é o valor da osmolalidade da solução medida após a obtenção da curva de equilíbrio de saturação. (Atkins, 1994). Na tabela 4 são mostrados os valores de P_{50} determinados nas diversas osmolalidades e os valores de $\ln a_w$ correspondentes.

Osm (mOsm)	$\ln a_w$	P_{50} (mm Hg)	$\ln P_{50}$
0,247	-0,00445	$6,29 \pm 0,23$	$1,84 \pm 0,04$
0,366	-0,00658	$6,55 \pm 0,32$	$1,88 \pm 0,06$
0,548	-0,00987	$6,82 \pm 0,28$	$1,92 \pm 0,05$
0,682	-0,01230	$7,69 \pm 0,34$	$2,04 \pm 0,04$
0,888	-0,01600	$7,92 \pm 0,30$	$2,07 \pm 0,05$
1,045	-0,01883	$8,67 \pm 0,60$	$2,16 \pm 0,06$
1,185	-0,02135	$8,84 \pm 0,48$	$2,18 \pm 0,05$
1,419	-0,02561	$9,78 \pm 0,43$	$2,28 \pm 0,05$
1,661	-0,02993	$10,27 \pm 0,50$	$2,33 \pm 0,05$
2,108	-0,03799	$11,82 \pm 0,70$	$2,47 \pm 0,05$

Tabela 4: Dependência da afinidade da Hb em função da atividade de água.

Nota-se, na tabela 4, que à medida que aumenta a osmolalidade da solução, a afinidade da Hb por O₂ diminui, estabilizando portanto a estrutura de menor afinidade por oxigênio.

Na figura 18 mostramos o gráfico dos valores de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$. Notamos neste gráfico que $\ln P_{50}$ varia linearmente com $\ln a_w$. A inclinação $d(\ln P_{50})/d(\ln a_w)$, corresponde a 76 ± 3 moléculas de água, por tetrâmero de hemoglobina, envolvidas durante a transição T para R. Esse valor de Δn_w é coerente com a diferença de área de superfície acessível ao solvente entre as estruturas Desoxi (T) e a Oxi (R) da hemoglobina. Chothia e colaboradores (Chothia *et al.*, 1985) mostraram que a proteína oxigenada expõe de 500 a 800 Å² mais de superfície do que a proteína na forma desoxi da Hb. Considerando que uma molécula de água pode cobrir aproximadamente de 9 a 10 Å² de superfície, calcula-se que de 55 a 90 moléculas de água são necessárias para hidratar a superfície extra da forma oxi da Hb (Colombo *et al.*, 1992, 1996).



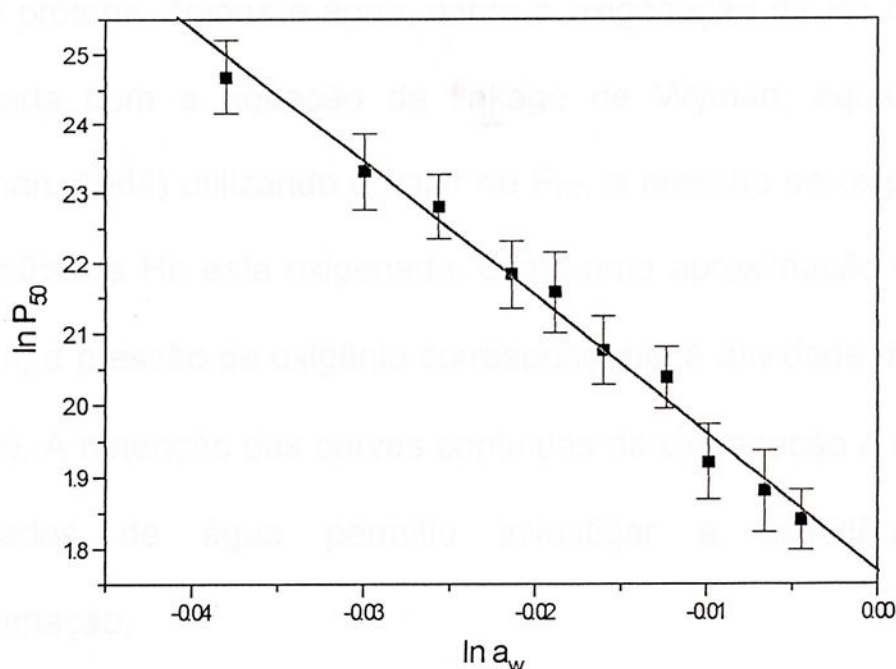


Figura 18: Gráfico de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ obtido de soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K em várias osmolalidades de sacarose que foi de 0,247 a 2,108 mOsm. Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de P_{50} sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra P_{50} foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação.

Portanto as 76 moléculas de água obtidas no gráfico mostrado na figura 18 estão de acordo com a área de superfície acessível ao solvente apresentada pela Hb durante a transição T para R.

6.1.1) COMPARAÇÃO ENTRE P_{50} E A ATIVIDADE MÉDIA DO LIGANTE (P_m).



A análise do efeito de efetores heterotrópicos alostéricos, como prótons, ânions e água, sobre a oxigenação da Hb tem sido realizada com a equação de linkage de Wyman, equação 15, (Wyman, 1964) utilizando o valor de P_{50} , a pressão de oxigênio na qual 50% da Hb esta oxigenada, como uma aproximação do valor de P_m , a pressão de oxigênio correspondente à atividade média do ligante. A obtenção das curvas contínuas de oxigenação à diversas atividades de água permitiu investigar a exatidão desta aproximação.

Wyman propôs estimar o ΔG de oxigenação da Hb calculando o trabalho para transferir δn_{O_2} moléculas de oxigênio do estado de referência, onde o potencial químico do ligante é $\mu_{O_2}^0$, para a proteína em meio no qual o potencial químico do ligante é μ_{O_2} , pela integral (Wyman, 1964),

$$\int_{\text{desoxi}}^{\text{oxi}} \delta G = \int_0^4 (\mu_{O_2} - \mu_{O_2}^0) \delta n_{O_2} \quad (40)$$

ou

$$G_{\text{oxi}} - G_{\text{desoxi}} = \int_0^4 RT \ln pO_2 \delta n_{O_2} = 4RT \ln P_m \quad (41)$$

que resulta a variação de energia livre total da proteína entre seu estado totalmente saturado e seu estado totalmente insaturado. Wyman demonstrou que o valor desta integral é diretamente proporcional ao logaritmo de P_m , a atividade média do ligante. Para curvas de oxigenação simétricas em torno do valor de pO_2 onde a Hb encontra-se 50% oxigenada, P_m é igual a P_{50} . Um exemplo de como é possível obter P_m das curvas de oxigenação contínua é dado na figura 19. Nesta figura o valor da área hachurada é igual a $R.T.\ln P_m$.

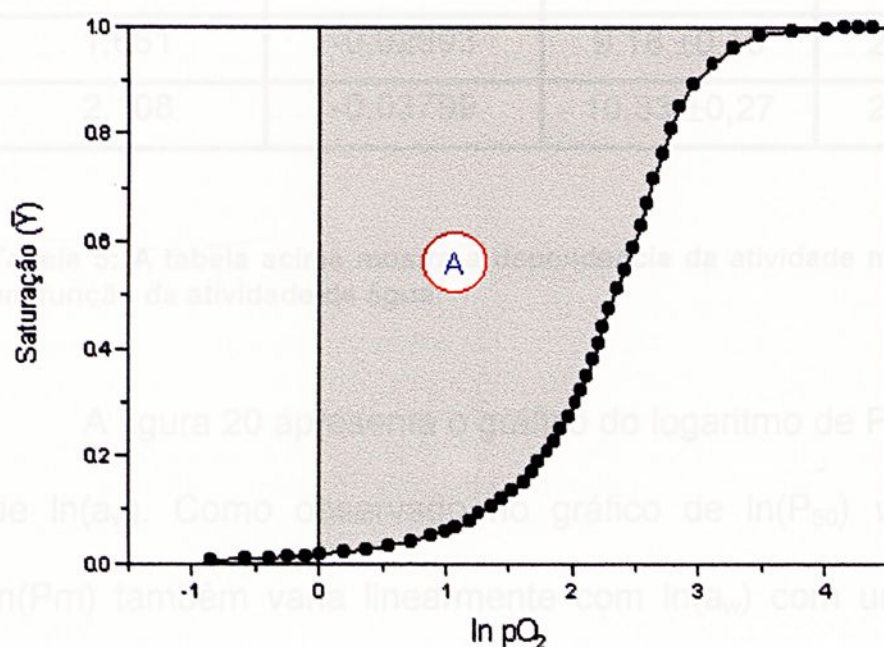


Figura 19: Curva de desoxigenação da Hb A₀ obtido de soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, 1,661 mOsm de sacarose, pH 7,3 à 298 K. A atividade média do ligante é definida pela área hachurada que é igual a $R.T.\ln P_m$ e para esta condição experimental vale 9,21 mm Hg.

Na tabela 5 são mostrados os valores de P_m determinados nas diversas osmolalidades.

Osm. (mOsm)	$\ln a_w$	P_m (mm Hg)	$\ln P_m$
0,247	-0,00445	$5,99 \pm 0,49$	$1,79 \pm 0,09$
0,366	-0,00658	$6,17 \pm 0,38$	$1,82 \pm 0,06$
0,548	-0,00987	$6,33 \pm 0,32$	$1,84 \pm 0,05$
0,682	-0,01230	$7,58 \pm 0,16$	$2,02 \pm 0,02$
0,888	-0,01600	$7,24 \pm 0,56$	$1,97 \pm 0,08$
1,045	-0,01883	$7,66 \pm 0,16$	$2,04 \pm 0,02$
1,185	-0,02135	$7,94 \pm 0,92$	$2,07 \pm 0,12$
1,419	-0,02561	$8,78 \pm 0,10$	$2,17 \pm 0,01$
1,661	-0,02993	$9,18 \pm 0,10$	$2,22 \pm 0,01$
2,108	-0,03799	$10,33 \pm 0,27$	$2,33 \pm 0,03$

Tabela 5: A tabela acima mostra a dependência da atividade média do ligante em função da atividade de água.

A figura 20 apresenta o gráfico do logaritmo de P_m em função de $\ln(a_w)$. Como observado no gráfico de $\ln(P_{50})$ versus $\ln(a_w)$, $\ln(P_m)$ também varia linearmente com $\ln(a_w)$ com um coeficiente angular que corresponde à ligação de 70 ± 6 moléculas de água ao tetrâmero de hemoglobina devido à ligação de quatro moléculas de oxigênio. Portanto, podemos concluir que o valor de P_{50} é uma boa

aproximação para o valor da atividade média do ligante, P_m , como anteriormente proposto (Imai, 1982).

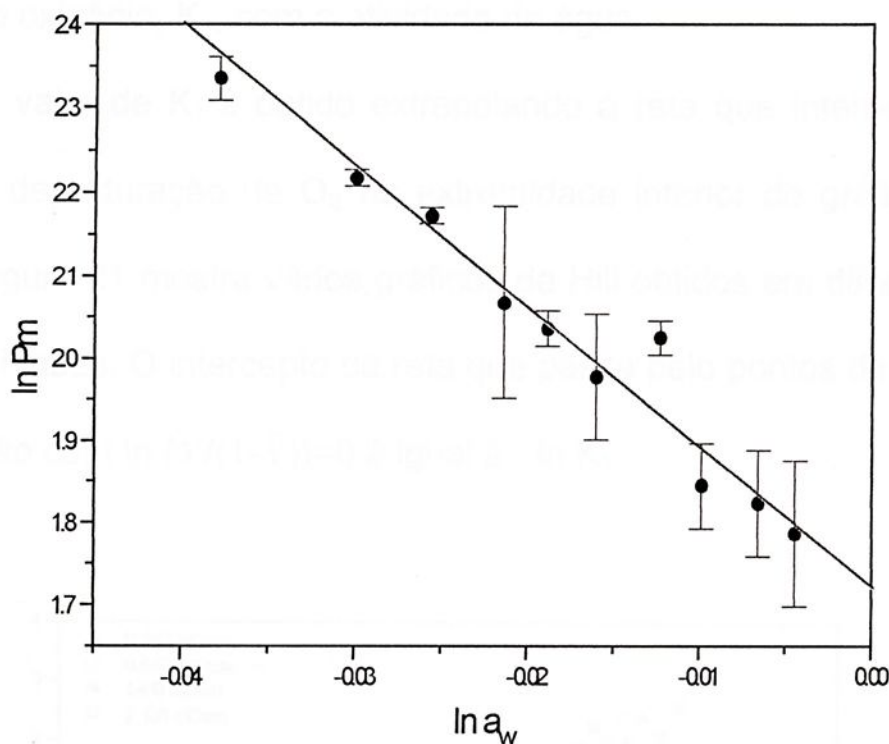


Figura 20: Gráfico de $\ln P_m$ versus $\ln a_w$ obtido de soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K em várias concentrações de sacarose. Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de P_m sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra P_m foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação. Assim como o valor de P_{50} o valor de P_m também aumentou (afinidade diminuiu), numa variação da concentração de sacarose que foi de 0,247 a 2,108 mOsm.

6.2) EFEITO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ($\ln a_w$) SOBRE A CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO PRIMEIRO O_2 À Hb (K_1).

Com o objetivo de utilizar a medida da variação de hidratação que acompanha a oxigenação da Hb como uma sonda das mudanças estruturais induzidas na proteína pela ligação do ligante, determinamos a dependência da constante de associação do primeiro oxigênio, K_1 , com a atividade de água.

O valor de K_1 é obtido extrapolando a reta que interpola os valores de saturação de O_2 na extremidade inferior do gráfico de Hill. A figura 21 mostra vários gráficos de Hill obtidos em diferentes osmolalidades. O intercepto da reta que passa pelo pontos de baixa saturação com $\ln (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))=0$ é igual à $-\ln K_1$.

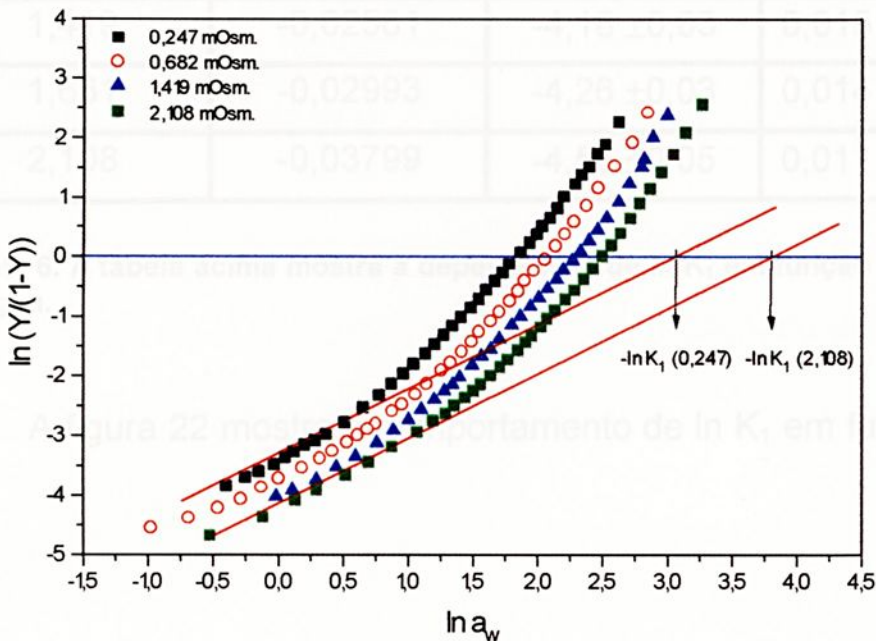


Figura 21: Gráficos de Hill ($\ln (\bar{Y}/(1-\bar{Y}))$ versus $\ln pO_2$) da Hb A₀ em solução contendo 60 μ M heme, tampão Hepes 50 mM, pH 7,0 à 298 K em diversas osmolalidades de sacarose como mostra a legenda. Os pontos são referentes a etapa de desoxigenação.

Nestes gráficos notamos que a medida que a atividade da água diminui, o valor de $\ln K_1$ também diminui. Este efeito pode ser visto na tabela 6, que mostra os valores K_1 determinados para várias a_w .

Osm. (mOsm)	$\ln a_w$	$\ln K_1$	$K_1 \text{ (mmHg)}^{-1}$
0,247	-0,00445	$-3,03 \pm 0,03$	$0,048 \pm 0,0018$
0,366	-0,00658	$-3,12 \pm 0,07$	$0,044 \pm 0,0028$
0,548	-0,00987	$-3,29 \pm 0,05$	$0,037 \pm 0,0006$
0,682	-0,01230	$-3,56 \pm 0,02$	$0,028 \pm 0,0022$
0,888	-0,01600	$-3,62 \pm 0,1$	$0,027 \pm 0,0034$
1,045	-0,01883	$-3,83 \pm 0,03$	$0,022 \pm 0,0008$
1,419	-0,02561	$-4,18 \pm 0,03$	$0,015 \pm 0,0005$
1,661	-0,02993	$-4,26 \pm 0,03$	$0,014 \pm 0,0016$
2,108	-0,03799	$-4,53 \pm 0,05$	$0,011 \pm 0,0018$

Tabela 6: A tabela acima mostra a dependência de $\ln K_1$ em função da atividade de água.

A figura 22 mostra o comportamento de $\ln K_1$ em função de $\ln a_w$.



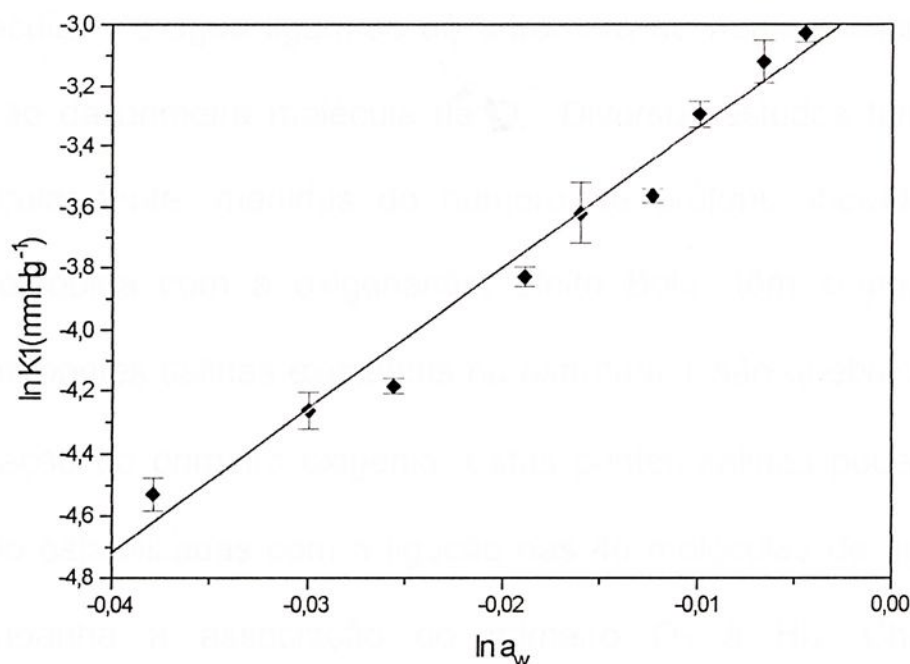


Figura 22: Gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ obtido de soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K em várias concentrações de sacarose. Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de K_1 sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra K_1 foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação. O valor de K_1 aumentou numa variação da concentração de sacarose que foi de 0,247 a 2,108 mOsm.

A exemplo da equação de linkage entre $\ln P_{50}$ e $\ln a_w$, a dependência de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ fornece a variação de hidratação com a ligação do primeiro oxigênio conforme a equação abaixo

$$\frac{d\ln K_1}{d\ln a_w} = \Delta n_w \quad (42)$$

A inclinação do gráfico da figura 22 estabelece que 46 ± 2 moléculas de água ligam-se ao tetrâmero de hemoglobina com a ligação da primeira molécula de O_2 . Diversos estudos funcionais, particularmente, medidas do número de prótons liberados pela hemoglobina com a oxigenação, efeito Bohr, têm sugerido que várias pontes salinas existentes na estrutura T são quebradas com a ligação do primeiro oxigênio. Estas pontes salinas podem estar sendo estabilizadas com a ligação das 46 moléculas de água que acompanha a associação do primeiro O_2 à Hb. Chothia e colaboradores (Chothia *et al.*, 1985) calcularam que a quebra das pontes salinas da Hb expõe uma superfície de aproximadamente $450 \text{ \AA}^2$ ao solvente. Se considerarmos que cada molécula de água cobre aproximadamente de 9 a $10 \text{ \AA}^2$ de superfície os dados de Chothia e colaboradores sugerem que de 45 a 50 moléculas de água ligam-se a Hb, com a quebra destas pontes.

Estes resultados reforçam a sugestão de que a ligação do primeiro ligante é acompanhada pela quebra das pontes salinas existentes na estrutura desoxi (T).

6.3) O EFEITO DA TEMPERATURA E DA ATIVIDADE DE ÁGUA SOBRE A AFINIDADE DA Hb POR OXIGÊNIO.



Com o objetivo de verificar qual a contribuição da ligação de água à Hb para a variação de entalpia, ΔH , e a variação de entropia, ΔS , de oxigenação determinamos a dependência da afinidade com a temperatura a diversas osmolalidades fixas.

A dependência mútua entre a afinidade da Hb por O_2 e a energética de ligação de água à proteína é mostrada nos gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$, representados na figura 23, determinados às temperaturas de 293 K, 298 K, 303 K e 308 K.

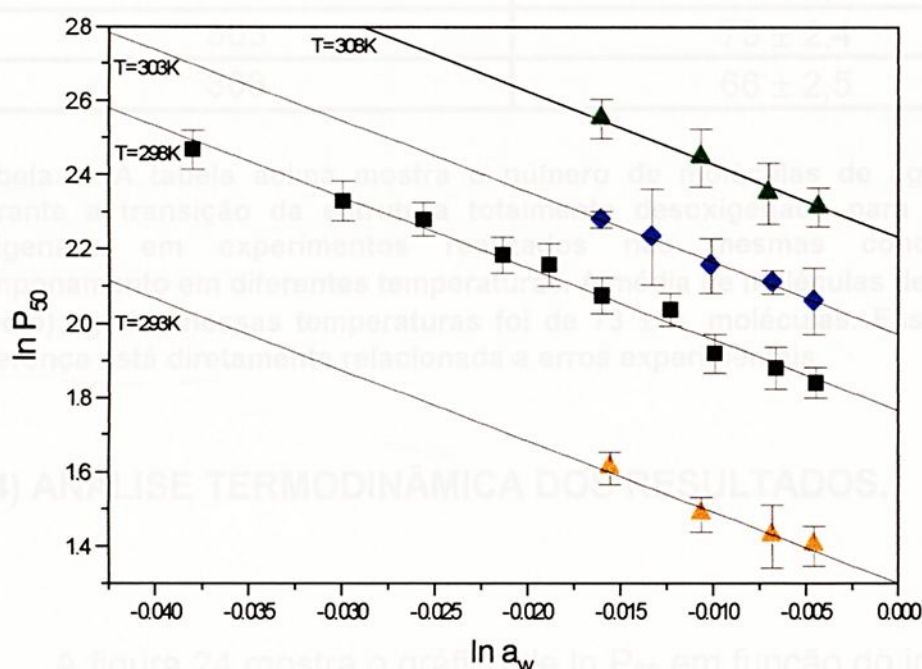


Figura 23: Gráfico da afinidade da Hb A_0 em função da atividade de água realizado em quatro temperaturas distintas. Cada ponto experimental representa a média de quatro medidas de P_{50} sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra P_{50} foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e desoxigenação. Os símbolos olivas correspondem a experimentos realizados à temperatura de 308 K, os símbolos azuis à 303 K, os pretos à 298 K e os símbolos alaranjados à 293 K. Todos os pontos foram obtidos em solução contendo tampão Hepes 50 mM, 100 mM NaCl e pH 7,3 em diferentes osmolalidades de sacarose.

Os valores da variação de hidratação, Δn_w , medido a cada uma das temperaturas estão mostrados na tabela 7. Estes dados mostram que, dentro de um erro experimental, Δn_w aparentemente independe da temperatura. Este é um resultado esperado se considerarmos que as conformações da desoxi e da oxi-Hb não são alteradas pela variação da temperatura no intervalo investigado.

Temperatura (K)	Δn_w
293	$76 \pm 8,0$
298	$76 \pm 3,0$
303	$73 \pm 2,4$
308	$66 \pm 2,5$

Tabela 7: A tabela acima mostra o número de moléculas de água ligadas durante a transição da estrutura totalmente desoxigenada para totalmente oxigenada em experimentos realizados nas mesmas condições de tamponamento em diferentes temperaturas. A média de moléculas de água (Δn_w médio) ligadas nessas temperaturas foi de 73 ± 4 . moléculas. Essa pequena diferença está diretamente relacionada a erros experimentais.

6.4) ANÁLISE TERMODINÂMICA DOS RESULTADOS.

A figura 24 mostra o gráfico de $\ln P_{50}$ em função do inverso da temperatura, gráfico de van't Hoff, determinado à quatro osmolalidades distintas de sacarose, 0,241; 0,369; 0,549 e 0,888 mOsm.



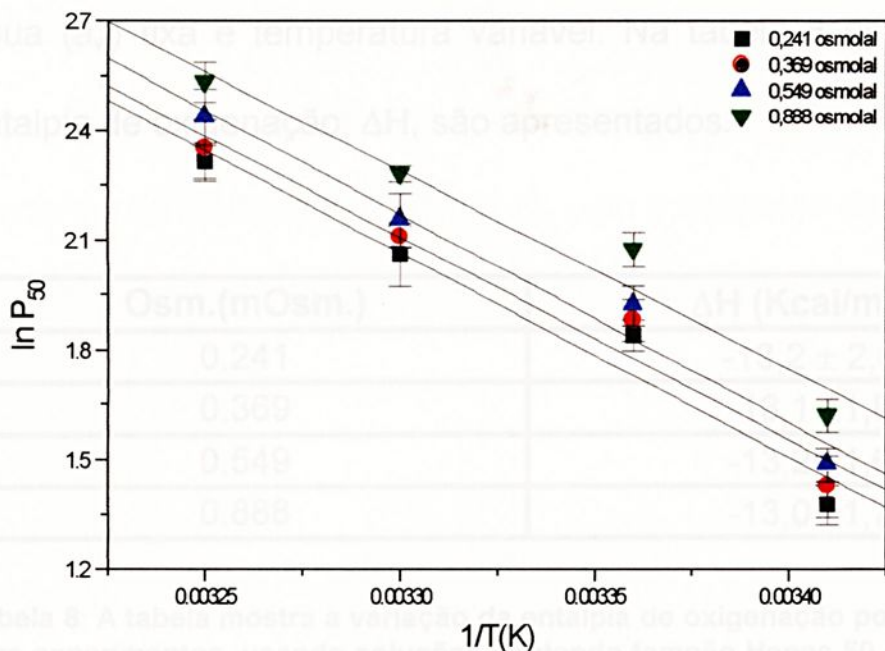


Figura 24: O Gráfico de van't Hoff, acima, mostra a dependência da afinidade da Hb A₀ por O₂ pelo inverso da temperatura. Os pontos foram obtidos em quatro temperaturas distintas (293 K, 298 K, 303 K e 308 K) usando soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM pH 7,3 em diferentes osmolalidades de sacarose, 0,241; 0,369; 0,549 e 0,888 mOsm. O ajuste foi feito de acordo com a equação (20) e a inclinação ($-\Delta H^0/R$) nos dá o valor do calor envolvido no processo.

As linhas contínuas nestes gráficos representam o melhor ajuste de equação 26,

$$\frac{d \ln P_{50(a_w, T)}}{d(1/T)} = -4 \frac{\Delta H^0}{R}$$

onde $\ln P_{50(a_w,T)}$ representa o valor de P_{50} medido à atividade de água (a_w) fixa e temperatura variável. Na tabela 8 os valores de entalpia de oxigenação, ΔH , são apresentados.

Osm.(mOsm.)	ΔH (Kcal/mol)
0.241	$-13,2 \pm 2,0$
0.369	$-13,1 \pm 1,8$
0.549	$-13,2 \pm 1,6$
0.888	$-13,0 \pm 1,7$

Tabela 8: A tabela mostra a variação da entalpia de oxigenação por heme de Hb para experimentos, usando soluções contendo tampão Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 e diferentes osmolalidades de sacarose.

Os valores médio da entalpia de oxigenação apresentado na tabela acima estão em concordância com os resultados descritos na literatura (Johnson *et al.*, 1992).

Dentro do intervalo limitado de variação de a_w e de temperatura, os dados apresentados na figura 24 e na tabela 8 indicam que a variação de entalpia média para a ligação de cada molécula de O_2 à Hb é independente tanto da atividade de água quanto da temperatura.

A independência de ΔH de oxigenação com a temperatura indica que a variação da capacidade térmica associada à reação de oxigenação independe da temperatura e, portanto, que as



estruturas da oxi e desoxi-Hb, no intervalo térmico investigado, são invariantes.

Como ΔH de oxigenação também independe de μ_w , a mudança da afinidade da Hb por O_2 com a mudança de a_w deve ser atribuída exclusivamente à variação da entropia associada à ligação diferencial de água entre as estruturas R e T. Dado que,

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$$

a dependência destas quantidades com μ_w é dada por,

$$\frac{d\Delta G}{d\mu_w} = \frac{d\Delta H}{d\mu_w} - \frac{T d\Delta S}{d\mu_w} = -\left(n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}\right) \quad (43)$$

com $\frac{d\Delta H}{d\mu_w} = 0$ isto implica em

$$d\Delta S = d\left(S_{\text{oxi}} - S_{\text{desoxi}}\right) = \left(n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}\right) R d \ln a_w \quad (44)$$

Portanto, a variação da entropia de oxigenação com a_w é dada por:

$$d\Delta S = \Delta n_w R d\ln a_w \quad (45)$$

e a variação de $d\Delta G$ com a_w por

$$d\Delta G = -Td\Delta S = -\Delta n_w RT d\ln a_w \quad (46)$$

Com o decréscimo de a_w , $d\ln a_w$, a variação da entropia de oxigenação é negativa. Esta variação de entropia de oxigenação reflete, portanto, a perda de entropia das 70 moléculas de água que se ligam à Hb no seu estado oxigenado.

7) CONCLUSÕES

A comparação entre as curvas de oxigenação obtidas pelo método tonométrico e pelo método automático, mostrada na figura 16, demonstra que o método desenvolvido por Imai (método automático) facilita a obtenção e o detalhamento das curvas de oxigenação, particularmente à baixa concentração de O_2 . Isso é verificado pois a curva de oxigenação obtida pelo método automático apresenta aproximadamente 60 pontos, contra 12 do método tonométrico, e as regiões de baixa e alta saturação são bem definidas, quando comparadas com as curvas obtidas pelo tonômetro. Além disso a aquisição, o processamento e a estocagem dos dados são facilmente realizadas. Outra vantagem apresentada pelo método de Imai é que este possibilita o acompanhamento visual, em todo o decorrer do experimento.

O desenho original da cela de Imai não é adequado, entretanto, para a obtenção de curvas de oxigenação com soluções viscosas. Nestas circunstâncias, a medida da OEC não é reprodutiva porque os gases não se distribuem homogeneamente na solução. Esta dificuldade foi resolvida com a adaptação de um dispositivo constituído por uma broca perfeitamente ajustada no



interior de um cilindro aberto próximo à superfície e próximo à base da cela. Posto a girar, este dispositivo capta a solução que se encontra na superfície da solução e a transfere para o fundo da cela. Este fluxo vertical da solução propicia que o oxigênio se distribua adequadamente em soluções bastante viscosas. A partir dessa modificação as curvas de ligação de oxigênio e desoxigenação obtidas com a cela espectro-polarimétrica coincidem e são reprodutíveis.

Destas curvas de oxigenação, obtidas em diferentes atividades de água, ajustadas com a adição de sacarose, determinamos o número diferencial de moléculas de água ligadas a Hb entre os estados oxigenado e desoxigenado. Os resultados encontrados estão em concordância com aqueles determinados anteriormente por Colombo e colaboradores (Colombo et al., 1992, 1994, 1996).

O efeito da variação da atividade de água sobre as características de oxigenação da Hb havia sido analisado anteriormente utilizando a seguinte equação de "linkage" (equação 15) (Colombo et al., 1992);



$$\frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} = - \frac{(n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}})}{4}$$

Como apontado por Colombo e colaboradores (Colombo *et al.*, 1992, 1994, 1996) esta expressão usa o valor de P_{50} como uma aproximação do valor da atividade média do ligante - P_m , a grandeza termodinâmica verdadeira que mede o trabalho para saturar a Hb com ligantes (Wyman, 1964; Wyman *et al.*, 1990).

A obtenção das curvas contínuas de oxigenação à diversas atividades de água nos permitiu testar a validade desta aproximação.

A figura 19 mostra o comportamento da atividade média do ligante (P_m) em função da a_w . A Δn_w associada à oxigenação determinada neste gráfico está em comum acordo com aquela determinada pelos gráficos de $\ln P_{50}$ versus $\ln a_w$ e justificam o uso desta aproximação.

A figura 19 mostra que à medida que diminuímos a atividade de água, $\ln P_m$ também diminui. Isto se deve ao fato de que a adição de soluto neutro impõe, um débito energético para a formação do estado R. (Colombo *et al.*, 1992). Consequentemente, para a Hb atingir o mesmo nível de saturação por O_2 à baixas

atividades de água, o valor da atividade de oxigênio deve ser maior que aquele requerido à maior a_w . Este aumento de P_m para um certo grau de saturação se atingido à menores a_w , é o débito energético pago pela estabilização do estado T da Hb.

Dentre as análises feitas a partir dos dados obtidos em nossos experimentos, uma que nos estimulou bastante foi verificar a variação de hidratação da Hb associada à ligação da primeira molécula de O_2 à Hb. Para tal determinamos como K_1 varia com a_w , como mostra a figura 22.

O valor de K_1 foi determinado a partir do gráfico de Hill (figura 21). Verificou-se que a medida que atividade de água diminui, o valor de $\ln K_1$ também diminui, ou seja, diminuindo a atividade de água da solução dificulta a ligação da primeira molécula de O_2 à Hb.

Pela análise do comportamento de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ (figura 22 e tabela 6) determinamos que 46 ± 2 moléculas de água por tetrâmero de hemoglobina devido à ligação da primeira molécula de O_2 , são associadas.

Uma série de estudos tem sugerido que a ligação do primeiro O_2 à Hb induz a quebra das pontes salinas que estabilizam a estrutura T. Portanto podemos supor que a ligação de 46 moléculas



de água que acompanha a ligação do primeiro ligante hidrata estas pontes salinas expostas, estabilizando-as. Esta hipótese está em acordo com os cálculos da variação da superfície acessível ao solvente de proteína (ΔASA) computada por Chothia e colaboradores (Chothia *et al.*, 1985) a partir das estruturas cristalográficas da oxi e desoxi-Hb.

A dependência de ΔG de oxigenação com a temperatura à diversas atividades de água foi investigada. Os resultados mostraram que Δn_w aparentemente independe da temperatura.

A análise dos gráficos de van't Hoff ($\ln P_{50}$ versus $1/T$), determinados à diferentes osmolalidades mostrou que ΔH de oxigenação é insensível à atividade de água. Este resultado levou-nos à interpretação de que o efeito da variação de hidratação da Hb durante a transição $T \rightarrow R$ sobre o ΔG é um efeito basicamente entrópico, já que ΔH permanece constante.



8) BIBLIOGRAFIA

- 1) **ACKERS, G.K.** Energetics of Subunit Assembly and Ligand Binding in Human Hemoglobin. *J. Biophys*, v.80 , p.331-346, 1980.
- 2) **ACKERS, G.K., DOYLE, M.L., MYERS, D. & DAUGHERTY, M.A.** Molecular Code For Cooperativity in Hemoglobin. *Science*. v. 255.p. 54-62, 1992
- 3) **ADAIR, G.S.** The Hemoglobin System IV. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin. *J.Biol. Chem.* V.63, p.529-538, 1925
- 4) **ARNONE, A.** X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3 Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. *Nature*. V.237, p.146-149, 1972
- 5) **ATKINS, P.W.** *Physical - Chemistry* 5^a ed. Oxford: Press Oxford University. 1994. 1031p.
- 6) **BENESCH, R.E., BENESCH, R. & CHI, I.Y.** The Oxygenation of Hemoglobin in the Presence of 2,3 Diphosphoglycerate. Effect of Temperature, pH, Ion Strength, and Hemoglobin Concentration. *Biochemistry*. v.8, p.2567-2571, 1969.
- 7) **BUCCI, E. & FRONTICELLI, C.** Measurement of Bohr Effect: Dependence on pH of Oxygen Affinity Hemoglobin. *Meth. Enzymol.* v.76, p.523-533. 1981.
- 8) **CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R.** *Biophysical Chemistry : the Conformation of Biological Macromolecules. Structure of Proteins.* New York: W. H. Freeman and Company, 1980. p. 41-206.



- 9) **CAÔN FILHO, O., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. & COLOMBO, M.F.** *Settling of a Dynamic Method for Hemoglobin Oxygen-Binding Studies Based on the Imai Cell.* In: Anais da XXIV^a Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 1995, Anais... Caxambú. Resumo dos trabalhos apresentados na sessão de painéis, p.M. 126.
- 10) **CAÔN FILHO, O., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. & COLOMBO, M.F.** *Settling of a Dynamic Method for Hemoglobin Oxygen-Binding Studies Based on the Imai Cell.* In: Congresso Sobre Biomoléculas. Comemoração aos Dez Anos do Depto de Física, 1, 1996. Anais... São José do Rio Preto: Depto de Física, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 1996, p.37.
- 11) **CAÔN FILHO, O., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. & COLOMBO, M.F.** *Determination of the oxygenation Equilibrium Curve of Hemoglobin in Viscous Solutions using a Modified Spectropolarimetric Cell.* In: Anais da XXVI^a Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. 1997, Anais... Caxambú. Resumo dos trabalhos apresentados na sessão de painéis, p.M. 81.
- 12) **CHOTHIA, C., WODAK, S., & JANIN, J.** Role of Subunit Interfaces in the Allosteric Mechanism of Hemoglobin. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* v.73, p.3793-3797, 1976.
- 13) **COLOMBO, M.B.R.** *Efeito de Água no Potencial de Oxi - Redução de Hemoglobina Humana e Mioglobina Equina.* Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) São José do Rio Preto: IBILCE - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, 1996. 60p.



- 14) **COLOMBO, M.F., RAU, D.C. & PARSEGIAN, V.A.** Protein Solvation In Allosteric Regulation: A Water Effect On Hemoglobin. *Science*. v.256, p.655-659, 1992.
- 15) **COLOMBO, M.F.; RAU, D.C. & PARSEGIAN, V.A.** Reevaluation of Chloride's Regulation of Hemoglobin Oxygen Uptake: The Neglected Contribution of Protein Hydration in Allosterism. *Proc.Natl. Acad. Sci U.S.A.* v.91, p.10517-10520, 1994.
- 16) **COLOMBO, M.F. & BONILLA-RODRIGUEZ, G.O.** The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/ Glycine Solutions. *The J. Biol. Chem.* v.271, p.4895-4899, 1996.
- 17) **DI CERA, E. & GILL, S.J.** A New Method For The Determination Of Equilibrium Constants Through Binding Capacity Measurements. *Biophysis. Chem.* v.32, p.149-152, 1988.
- 18) **GARRETT, R.H. & GRISHLAM, C.M.** *Biochemistry*. Enzyme Specificity and Allosteric Regulation. Orlando: Saunders College Publishing. 1995. p. 387 -423.
- 19) **GIARDINA, B. & AMICONI, G.** Measurement of Binding of Gaseous and Nongaseous Ligands to Hemoglobins by Conventional Spectrophotometric Procedures. *Meths. Enzymol.* v.76, p.417-438, 1981.
- 20) **GIULIVI, C. & DAVIES, K.J.A.** A Novel Antioxidant Role for Hemoglobin: The Coproportionation of Ferrylhemoglobin with Oxyhemoglobin. *The J. Biol. Chem.* v.265, p.19453-19460, 1990.



- 21) HAIRE, R.E. & HEDLUND, B.E. Hemoglobin Function in the Water-Ethylene glycol Cosolvent System; Linkage between Oxygen Binding and Hydration. *Biochem.* v.22, p.327-334, 1983.
- 22) IMAI, K & ADAIR, G. S. A Simple Method For Calculating The Fractional Population Of Deoxy, Oxy, And Intermediate Molecular Species Of Haemoglobin As Function Of Oxygen Saturation. *Biochem. Biophys. Acta.* v.490,n.2, p.456-461, 1977.
- 23) IMAI, K. Analysis of Ligand Binding Equilibria. *Meth. Enzymol.* v.76, p.470-486, 1981.
- 24) IMAI, K. Measurement of Accurate Oxygen Equilibria Curves by an Automatic Oxygenation Apparatus. *Meth. Enzymol.* v.76, p.438-449, 1981.
- 25) IMAI, K. *Allosteric Effects In Haemoglobin*. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 275p.
- 26) IMAI, K. Adair Fitting to Oxygen Equilibrium Curves of Hemoglobin. *Meth. Enzymol.* v.232, p.559-577, 1994.
- 27) JAMESON, G.B., IBERS, J.A. *Biological and Synthetic Dioxygen Carries*. In: BERTINI, I., GRAY, H. B., LIPPARD, S, J., & VALENTINE, J. S. *Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley: University Science Books. 1994, cap.4, p.167-252.
- 28) JOHNSON, C.R., OWNBY, D.W., GILL, S.J., & PETERS, K.S. Oxygen Binding Constants and Stepwise Enthalpies for Human and Bovine. Hemoglobin at pH 7.6. *Biochemistry.* v.31, p.10074-10082, 1992.



29) JORDAN, J., ACKERMAN, E. & BERGER, R.L.

Polarographic Coefficients of Oxygen Defined by Activity Gradients in Viscous Media. *J. Phys. Chem.* v.78, p.2979-2981, 1956.

30) KILMARTIN, J.V., IMAI, K.; JONES, R.T., FARUQUI, A.R. &

BALDWIN, J.M. Role of Bohr Group Salt Bridges in Cooperativity in Hemoglobin. *Biochem. Biophys. Acta.* v.534, p.15-25, 1978.

31) KOSHLAND, D.E. Jr., NÉMETHY, G. & FILMER, D.

Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry.* v.5, 365, 1966.

32) LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage. *Nature*, v. 227, 680-685, 1970.

33) LAPENNAS, N., COLACINO, J.M., & BONVENTURA, J. Thin-Layer Methods for Determination of Oxygen Binding Curves of Hemoglobin Solutions and Blood. *Meth. Enzymol.* v.76, p.449-470, 1981.

34) LEE, A.W., KARPLUS, M., POYART, C. & BURSAUX, E.

Analysis of Proton Release in Oxygen Binding by Hemoglobin: Implications for the Cooperative Mechanism. *Biochemistry.* V. 27, 1285-1301, 1988.

35) LESK, A.M., JANIN, J., WODAK, S., & CHOTHIA, C.,

Haemoglobin: The Surface Buried Between the $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$ Dimers in the Deoxy and Oxy Structures. *J. Mol. Biol.* V.183, 297-270, 1985.



- 36) **MARDEN, C. M., KISTER, J. & POYART, C.** Fitting Abnormal Oxygen Equilibrium Curves of Hemoglobin. *Biophys. Chem.* v.37, p.363-369, 1990.
- 37) **MATHEWS, C.K. & van HOLDE, K.E.** *Biochemistry. Protein Function and Evolution.* Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1990. p. 216 - 256.
- 38) **MILLS, F.C. & ACKERS, G.K.** Thermodynamic Studies on the Oxygenation and Subunit Association of Human Hemoglobin. *The Journal Biol. Chem.* v.254, p.2881-2887, 1979.
- 39) **MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P.** On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* v.12, p.88-118, 1965.
- 40) **PARSEGIAN, V.A., RAND, R.P. & RAU, D.C.** Macromolecules and Water: Probing with Osmotic Stress. *Meth. Enzymol.* v.259, p.43-94, 1995.
- 41) **PERUTZ, M.F., FERMI, G.; POYART, C., PAGNIER, J. and KISTER, J.** A Novel Allosteric Mechanism in Haemoglobin: Structure of Bovine Deoxyhaemoglobin, Absence of Specific Chloride-binding Sites and Origin of Chloride-linked Bohr Effect in Bovine and Human Haemoglobin. *J. Mol. Biol.* v.233, p.536-545, 1993.
- 42) **PERUTZ, M. F., SHIH, D. T. & WILLIAMSON, D.** The Chloride Effect in Human Haemoglobin: A New Kind of Allosteric Mechanism. *J. Mol. Biol.* v.239, p.555-560, 1994.
- 43) **RAZYNSKA, A., FRONTICELLI, C., DI CERA, E., GRZYCZYNSKI, Z. & BUCCI, E.** Effect of Temperature on Oxygen Affinity and Anion Binding of Bovine Hemoglobin. *Biophys. Chem.* v.38, p.111-115. 1990.



44) **STRYER, L.** *Biochemistry*. 3ª ed. Tradução por João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo e Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988, 881p. Original em inglês.

45) **TINOCO Jr., I., SAUER, K., WANG, J.C.** *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*. 3ª ed. New Jersey: Prentice - Hall, Inc. 1995. 761p.

46) **TIMASHEFF, S.N., & ARAKAWA, T.** Stabilization of Protein Structure by Sugars. *Biochemistry*. v.21, p.6536-6544, 1982.

47) **VALENTINE, J.S.** *Dioxygens Reactions*. In: BERTINI, I., GRAY, H. B., LIPPARD, S. J., & VALENTINE, J. S. *Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley: University Science Books. 1994, cap.5, p.253-314.

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

49) **WYMAN, J. & GILL, S. J.** *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* Mill Valley: University Science Books. 1990. 330p.



