



Fábio Renato Lombardi

ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE HEMOGLOBINAS DE OFÍDIOS

Orientador: Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

Tese apresentada no programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - São José do Rio Preto, S.P., para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

**São José do Rio Preto
2005**

Dedico este trabalho

À minha esposa Luciana C. Cardoso Lombardi e ao meu filho Leonardo Cardoso Lombardi, por serem as pessoas que me alimentam de amor e carinho no dia a dia, tornando a vida uma caminhada prazerosa.

**À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro (processo número:
98/12.807-4).**

AGRADECIMENTOS

É com grande satisfação que agradeço ao Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez pela orientação neste trabalho. Sempre estando disposto a ajudar e colaborar cientificamente, com palavras de incentivo tanto em momentos de êxito quanto nos momentos de dificuldades.

Ao Prof. Dr. Walter F. De Azevedo Júnior, pela orientação durante os experimentos de cristalização e pela inestimável ajuda na parte final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio F. Colombo, pelas críticas sempre construtivas a este trabalho, além de permitir o uso constante de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Arif Cais, pela amizade e pelo seu empenho irrestrito em nos ajudar a transpor os obstáculos burocráticos das leis brasileiras, as quais dificultam as pesquisas, mas são coniventes com pessoas que realizam e fiscalizam contra-bandos de animais.

À Prof. Dra. Eleni Gomes, pela amizade e por ser a pessoa que me mostrou o início do caminho para a pesquisa. Dando uma exata noção de como pesquisar e orientar.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela amizade e esclarecimentos prestados durante este trabalho.

À Prof. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos e componentes de seu grupo de pesquisa, pela amizade e ajuda durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri e seu aluno de doutorado Giovanni César dos Santos, pela amizade e colaboração na obtenção das curvas de SAXS para as hemoglobinas de serpentes.

Aos demais professores do Departamento de Física, Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey, Prof. Dr. Marinômio Lopes Cornélio, Prof. Dr. João Ruggiero Neto, Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, Prof. Dr. Eloi Feitosa, Prof. Dr. Elso Drigo Filho, Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto, Prof. Dr. Raghuvir K. Arni, Prof. Dr. Jorge Chahine, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Ao sempre amigo Hamilton Cabral, pela sua colaboração, idéias, capacidade profissional e, acima de tudo, pelo seu companheirismo. O meu eterno agradecimento.

À amiga Fernanda Canduri, pela amizade e pela sua enorme humildade e capacidade profissional, sempre se mostrando disposta a colaborar, a minha gratidão e respeito.

À amiga Patrícia Perez, pela amizade e pela inestimável ajuda durante a modelagem molecular da hemoglobina de *Liophis miliaris*.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Patrícia Caetano, Cecília, Adriana, Fernando, Débora, Rejane, Telma, Vítor, Maristella, Laura, Rubens, Giulliana.

À todo Departamento de Zoologia e botânica, pela ajuda no tratamento das serpentes durante este trabalho.

À técnica do laboratório de Bioquímica, Eliani Ohira, pelo incentivo e dedicação em nos ajudar.

Aos funcionários João Rodrigues dos Santos, Rita Beatriz de Seixas, Paulo Roberto Salinas, Antônio Aparecido Barbosa, Ilva Cecílio Bernardes e Claudinei, pelo auxílio e dedicação no desenvolvimento de suas funções.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, por ceder seu laboratório e tempo em análises para determinação da massa molecular das hemoglobinas de serpentes.

À minha querida e companheira esposa, Luciana C. Cardoso Lombardi, pelo amor, carinho, incentivo dispensado a todo momento. E pelo lindo filho que me deu.

Aos meus pais, Antônio Lombardi Filho e Cleonice da Cruz Lombardi, que são os grandes e verdadeiros responsáveis pela minha chegada até aqui.

Ao meu sogro e sogra, Neguito e Arlete, que sempre incentivam e torcem pelo meu sucesso acadêmico.

À todos os meus familiares, que de forma direta ou indireta me desejam sorte.

Aos queridos colegas do Departamento de Física

À Deus pela vida

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

“Sou Professor a favor da descência contra o despudor, a favor da liberdade contra o autoritarismo, da autoridade contra a licenciosidade, da democracia contra a ditadura de direita ou de esquerda.

Sou Professor a favor da luta constante contra qualquer forma de discriminação, contra a dominação econômica dos indivíduos ou das classes sociais.

Sou Professor contra o desengano que me consome e imobiliza”.

Paulo Freire

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.a. A Molécula de Hemoglobina: Uma Proteína Alostérica.....	1
I.b. Modelos Teóricos de Alostéria.....	3
I.c. Modelo Alostérico de Três Estados.....	5
I.d. Modelo de Dissociação e Transporte de oxigênio, <i>in vivo</i> , proposto para as hemoglobinas de Serpentes.....	7
I.e. A Ligação Cooperativa de Oxigênio: Interação Alostérica Homotrópica	10
I.f. A Regulação da Função: Efetores Alostéricos Heterotrópicos.....	14
I.f.1. Ligação de Prótons (H^+): O Efeito Bohr.....	14
I.f.2. Efeito do Íon Cloreto (Cl^-).....	16
I.f.3. Fosfatos Orgânicos.....	17
I.g. O Papel da Interface Dimérica na Manutenção da Estabilidade Tetramérica.....	19
I.h. Hemoglobinas de Animais.....	27
II. OBJETIVOS.....	32
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
III.a. Obtenção dos Espécimes e Coleta de Sangue.....	33
III.b. Procedimento de Purificação.....	34
III.c. Verificação da Pureza da Amostra.....	35
III.d. Estudos das Propriedades Funcionais de Ligação de O_2	37
III.e. Cálculo da Concentração de Oxi-hemoglobina e Meta-hemoglobina	40
III.f. O Efeito da Atividade de Água na Ligação de O_2	41
III.g. Titulação com ATP.....	44
III.h. Determinação da Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado (4K_2).....	44

III.i. Modelagem Molecular por Homologia.....	49
III.j. Coleta de Dados de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo.....	53
III.k. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da Hb-II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	54
III.l. Análise das Estruturas Quaternárias.....	55
III.m. Evidências Espectroscópicas de Transição Conformacional T \Rightarrow R na Forma <i>Stripped</i> , em Solução, da Hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i>	57
IV. RESULTADOS.....	58
IV.a. Purificação do Hemolisado de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	58
IV.b. Propriedades Funcionais de Ligação de Oxigênio das Hemoglobinas de Serpentes.....	60
IV.b.1. Hemoglobina II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	60
IV.b.2. Hemoglobinas de <i>Helicops modestus</i>	64
IV.c. Titulação com ATP para Determinação da Constante de Ligação nas Formas Oxi e Desoxigenada.....	66
IV.d. Análise das Mudanças Conformacionais das Hemoglobinas de Serpentes Através do Método de Estresse Osmótico.....	67
IV.d.1. Hemoglobina II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	67
IV.d.2. Hemoglobinas de <i>Helicops modestus</i>	69
IV.d.3. Hemoglobinas de <i>Liophis miliaris</i>	71
IV.e. Determinação da Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado (4K_2).....	73
IV.f. Coleta de Dados de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS).....	80
IV.g. Coleta de Dados de Difração de Raios X da Hb-II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	84
IV.h. Modelagem Molecular por Homologia da Hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i>	87
IV.i. Análise Estrutural da Molécula de <i>Liophis miliaris</i> Modelada.....	93

IV.j. Evidências da Existência de uma Transição Conformacional T-R na Forma Stripped em Solução.....	94
V. DISCUSSÃO.....	96
V.a. Padrão Eletroforético.....	96
V.b. Propriedades Funcionais.....	98
V.c. Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado.....	105
V.d. A Hemoglobina Oxigenada de <i>Liophis miliaris</i> é Dimérica ou Tetramérica?.....	110
VI. CONCLUSÕES.....	125
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXO 1.....	144
ANEXO 2.....	146
ANEXO 3.....	147
ANEXO 4.....	148
ANEXO 5.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da estrutura quaternária da oxi-hemoglobina humana.....	1
Figura 2. Ilustração do grupo heme.....	2
Figura 3. Modelo sequencial de alosterismo.....	3
Figura 4. Modelo de simetria do alosterismo.....	4
Figura 5. Modelo representativo do processo de oxigenação da hemoglobina humana proposto por Colombo & Seixas (1999).....	7
Figura 6. Efeito do ATP sobre o equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina de <i>Helicops modestus</i>	9
Figura 7. Modelo de transporte de oxigênio proposto para as hemoglobinas de serpentes.....	10
Figura 8. Figura ilustrativa do gráfico de Hill.....	13
Figura 9. Ilustração do sítio de ligação do 2,3-BPG na desoxi-hemoglobina humana.....	18
Figura 10. Representação esquemática dos resíduos que compõem as interfaces $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_1\beta_2$	20
Figura 11. Representação dos contatos entre os resíduos que mantêm o dímero $\alpha_1\beta_1$ da hemoglobina.....	21
Figura 12. Representação esquemática da movimentação entre os dímeros ($\alpha\beta$) da hemoglobina.....	22
Figura 13. Figura de uma <i>Crotalus durissus terrificus</i>	35
Figura 14. Figura de uma <i>Liophis miliaris</i>	35
Figura 15. Figura de uma <i>Boa constrictor</i>	35
Figura 16. Figura de uma <i>Helicops modestus</i>	35
Figura 17. Espectros da desoxi e oxi-hemoglobina.....	37
Figura 18. Figura de um tonômetro usado nos estudos funcionais.....	38
Figura 19. Perfil de eluição total da Hb-II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	45

Figura 20. Curva transformada.....	45
Figura 21. Relação entre volume de eluição e a área calculada.....	46
Figura 22. Ilustração dos passos de uma modelagem molecular por homologia.....	50
Figura 23. Padrão eletroforético de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	59
Figura 24. Gráfico ilustrando a dependência do log P ₅₀ , da Hb-II de <i>Crotalus</i> , com a variação do pH a 20°C.....	60
Figura 25. Gráfico ilustrando o comportamento do coeficiente de Hill da Hb-II de <i>Crotalus</i> a 20°C.....	61
Figura 26. Gráfico ilustrando a dependência do log P ₅₀ , da Hb-II de <i>Crotalus</i> , com a variação do pH a 30°C.....	62
Figura 27. Gráfico ilustrando o comportamento do coeficiente de Hill da Hb-II de <i>Crotalus</i> a 30°C.....	63
Figura 28. Dependência da afinidade por O ₂ do hemolisado de <i>Helicops modestus</i> em diferentes pH.....	65
Figura 29. Comportamento da cooperatividade do hemolisado de <i>Helicops modestus</i> em relação à variação do pH.....	65
Figura 30. Figura ilustrando o ajuste feito para determinação da constante de associação de ATP às formas desoxigenada e oxigenada da Hb-II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	66
Figura 31. Comportamento da Hb-II de <i>Crotalus</i> em diferentes valores de atividade de água.....	67
Figura 32. Comportamento do coeficiente de Hill, da Hb-II de <i>Crotalus</i> , em diferentes valores de atividade de água.....	68
Figura 33. Gráfico ilustrando o comportamento do hemolisado de <i>Helicops modestus</i> em função da variação da atividade de água.....	69
Figura 34. Gráfico ilustrando o comportamento da cooperatividade, do hemolisado de <i>Helicops modestus</i> , em função da atividade de água.....	70
Figura 35. Gráfico do efeito da atividade de água sobre a afinidade por oxigênio para a Hemoglobina da serpente <i>Liophis miliaris</i>	71
Figura 36. Gráfico da cooperatividade em diferentes atividades de água da hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i>	72

Figura 37. Gráfico do comportamento do volume de eluição de várias hemoglobinas de serpentes.....	74
Figura 38. Gráfico do comportamento do volume de eluição do hemolisado <i>stripped</i> de <i>Boa constrictor</i>	77
Figura 39. Gráfico do comportamento de eluição do hemolisado <i>stripped</i> de <i>Liophis miliaris</i> (primeiro conjunto de dados).....	78
Figura 40. Gráfico do ajuste feito por regressão não-linear do hemolisado <i>stripped</i> de <i>Liophis miliaris</i> (segundo conjunto de dados).....	79
Figura 41. Gráfico da p(r) da Hb-humana e das hemoglobinas de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , <i>Helicops modestus</i> , <i>Boa constrictor</i> e <i>Liophis miliaris</i>	81
Figura 42. Figura ilustrando o alinhamento entre a hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i> e <i>Gallus gallus</i>	91
Figura 43. Ilustração da hemoglobina tetramérica de <i>Liophis miliaris</i> modelada.....	92
Figura 44. Gráfico de Ramachandran da hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i> modelada.....	93
Figura 45. Gráfico ilustrando a transição T - R pela diferença de absorção em 290nm entre as formas oxi e desoxigenada para a hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i>	95
Figura 46. Figura representativa da interface dimérica da hemoglobina Rothschild.....	110
Figura 47. Ilustração da interface dimérica da hemoglobina humana (1HHO).....	112
Figura 48. Alinhamento das seqüências primárias das cadeias α e β das Hb de <i>Liophis miliaris</i> , Humana, <i>Gallus gallus</i> , <i>Oncorhyncos mykiss</i>	113
Figura 49. Figura ilustrando a sobreposição das hemoglobinas humanas (1BBB e 1HHO), mostrando o resíduo Glu101(β).....	115
Figura 50. Figura ilustrando a sobreposição de duas hemoglobinas humanas (1BBB e 1HHO), mostrando o resíduo Glu43(β).....	116
Figura 51. Ilustração da hemoglobina D de <i>Gallus gallus</i> mostrando o resíduo Glu101(β).....	117

Figura 52. Ilustração da hemoglobina D de <i>Gallus gallus</i> mostrando a substituição do resíduo Glu 43(β).....	117
Figura 53. Ilustração da hemoglobina I de truta mostrando a substituição do resíduo Glu 101(β) \Rightarrow Asp.....	118
Figura 54. Ilustração da hemoglobina I de truta mostrando a substituição do resíduo Glu 43(β).....	118
Figura 55. Ilustração do resíduo Thr 43(β) da hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i> modelada.....	119
Figura 56. Ilustração do contato de Van der Waals entre Val 101(β) e Val 96(β) na oxi-hemoglobina modelada de <i>Liophis miliaris</i>	120
Figura 57. Sobreposição das hemoglobinas humana, <i>Liophis miliaris</i> , <i>Gallus gallus</i> e truta, ilustrando os resíduos da posição 101.....	122
Figura 58. Sobreposição das hemoglobinas humana, <i>Liophis miliaris</i> , <i>Gallus gallus</i> e truta, ilustrando os resíduos da posição 43.....	122
Figura 59. Ilustração da cavidade central da hemoglobina humana (1HHO).....	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tabela ilustrando os parâmetros funcionais associados à constante de dissociação tetrâmero-dímero da Hb A0 e de algumas hemoglobinas humanas mutantes.....	25
Tabela 2. Tabela ilustrando a variação no número de moléculas de água por tetrâmero para as hemoglobinas de <i>Crotalus</i> , <i>Helicops</i> e <i>Liophis</i>	73
Tabela 3. Dados de raio de giro e dimensão máxima para as hemoglobinas de serpentes e humana.....	82
Tabela 4. Tabela com os valores de Coeficiente de Correlação obtidos da comparação entre as $p(r)$ teórica da hemoglobina humana e as $p(r)$ das hemoglobinas de serpentes obtidas experimentalmente.....	84
Tabela 5. Estatística da coleta de dados de difração de raios X para a Hb-II de <i>Crotalus</i>	86
Tabela 6. Dados comparativos sobre a porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos das hemoglobinas comparadas.....	90
Tabela 7. Valores de desvios de r.m.s obtidos nas sobreposições da hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i> com outras hemoglobinas.....	121

Abs - Absorbância	IEF -Isoeletrofocalização ou Focalização isoeétrica
ADA - Ácido N-(2-acetamida)-iminodiacético	IHP - Inositol Hexafosfato
ATP - Adenosina Trifosfato	IPP - Inositol Pentafosfato
Å - Angström ($1\text{Å}=10^{-10}\text{m}$)	K_D - Constante de associação do ATP à forma desoxigenada
a_w - Atividade de água	KNF - Modelo seqüencial de ligação de oxigênio proposto por Koshland, Nemethy e Filmer
BPG - 2,3-Bifosfoglicerato	K_O - Constante de associação do ATP à forma oxigenada
C.C. - Coeficiente de correlação	K_R - Constante de ligação do oxigênio para a forma oxigenada
CM - Carboximetil	K_T - Constante de ligação do oxigênio para a forma desoxigenada
CO - Monóxido de Carbono	L - Constante alostérica
DEAE - Dietilaminoetil	M.M. - Massa Molecular
DET - Determinante da matriz	M_w - Molaridade da água pura
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético	MWC - Modelo de simetria de ligação de oxigênio proposto por Monod, Wyman e Changeux
GTP - Guanosina Trifosfato	n₅₀ ou n_H - coeficiente de Hill (cooperatividade)
Hb A₀ - Hemoglobina humana normal (Adulta)	nm - nanômetro ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$)
Hb - Hemoglobina	O₂ - Oxigênio
Hb F₁ - Hemoglobina fetal acetilada	
Hb F - Hemoglobina fetal	
Hb R - Hemoglobina Rotschild	
HEPES - Ácido (2-hidroxi)etil Piperazina-N-(2-etano Sulfônico)	

P₅₀ - Pressão de oxigênio necessário para saturar metade dos sítios de ligação de oxigênio da hemoglobina

pCO₂ - Pressão parcial de Dióxido de Carbono

pI - Ponto isoelétrico

pO₂ - Pressão parcial de oxigênio

R - Estado alostérico da Hemoglobina no estado oxigenado ou Relaxado

r.m.s.d. - *root-mean square deviation*
(Desvio da raiz quadrada média)

SAXS - *Small Angle X ray Scattering*
(Espalhamento de raios X a baixo ângulo)

T₀ - Novo estado alostérico da desoxi-hemoglobina humana, encontrado na ausência de ânions

T_x - Estado alostérico da Hemoglobina no estado desoxigenado ou Tenso

TCA - Ácido tricloroacético

TRIS -TRIS (hidroximetil) aminometano

Y - Saturação Fracional

Δn_w - Variação no número de moléculas de água entre os estados oxigenado e desoxigenado

ε - Coeficiente de absorvidade

RESUMO

Vários trabalhos reportados na literatura (Focesi *et al.*, 1987; *J. Med. Biol. Res.* v. 20, pp. 861; Oyama *et al.*, 1993; *Comp. Biochem. Physiol.* v. 105B: pp. 271; Bonilla *et al.*, 1994a; *Comp. Biochem. Physiol.* v. 109A, pp. 1085; Bonafé *et al.*, 1999; *J. Biol. Chem.* v. 274, pp. 1196) propuseram a existência de um mecanismo de transição oxidímero - desoxitetrâmero em algumas espécies de serpentes, tais como, *Boa constrictor* (Jibóia), *Helicops modestus* (cobra d'água), *Bothrops alternatus* (urutu cruzeiro) e *Liophis miliaris* (cobra d'água).

De acordo com tal hipótese, as hemoglobinas destas serpentes, quando no estado desoxigenado, possuem predominantemente estrutura quaternária tetramérica ($\alpha_2\beta_2$). Contudo, ao sofrerem oxigenação, essas proteínas formariam dímeros ($\alpha\beta$).

Segundo Matsuura *et al.*, (1989; *J. Biol. Chem.* v. 264, pp. 5515) esta dimerização ocorreria devido à substituição dos resíduos Glu 43(β) \Rightarrow Thr e Glu 101(β) \Rightarrow Val, que são resíduos que constituem a interface dimérica ($\alpha_1\beta_2$). A falta das duas cargas negativas promoveria a desestabilização do tetrâmero.

Segundo Bonafé *et al.*, (1999; *J. Biol. Chem.* v. 274, pp. 1196) o hemolisado de *Helicops modestus*, na forma *stripped*, mostra ligação não cooperativa de oxigênio, um comportamento encontrado em hemoglobinas diméricas de vertebrados.

O objetivo principal de nosso trabalho foi analisar as hemoglobinas de algumas serpentes (*Crotalus durissus terrificus* (Cascavel), *Helicops modestus*, *Boa constrictor* e *Liophis miliaris*) com o intuito de realizarmos a caracterização funcional, assim como, determinarmos o grau de dissociação destas proteínas, a fim de comprovarmos a existência ou não do mecanismo de dimerização dependente do processo de oxigenação destas hemoglobinas.

Os resultados obtidos com cromatografia analítica de filtração em gel para a obtenção da constante de associação dímero-tetrâmero, mostraram que a forma

oxigenada das quatro hemoglobinas de serpentes analisadas são formas tetraméricas estáveis em solução.

Análises de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), mostraram que o raio de giro e a dimensão máxima determinados para as hemoglobinas de serpentes, são similares aos encontrados para a hemoglobina humana.

Os resultados das propriedades funcionais de ligação de O₂ nos revelaram que, a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* e o hemolisado de *Helicops modestus*, possuem efeito Bohr alcalino, na forma *stripped*, não devido à tetramerização induzida pela desoxigenação, mas sim devido a um efeito alostérico presente nas formas tetraméricas de hemoglobinas.

As hemoglobinas destas serpentes apresentaram também ligação cooperativa de oxigênio, em toda a faixa de pH analisado, tanto na presença como na ausência de ATP.

Os dados coletados usando o método de estresse osmótico mostraram que a desoxi-hemoglobina humana de *Crotalus* e *Helicops*, na ausência de ânions, assume um estado conformacional, denominado estado T₀, como proposto por Colombo e Seixas, (1999; *Biochemistry*. v. 38, pp. 11741) para a hemoglobina humana.

Para a hemoglobina de *Liophis miliaris* os dados de estresse osmótico sugerem que a desoxi-hemoglobina desta serpente, na forma *stripped*, não assume o estado T₀, mas sim o estado T_x (estado desoxigenado) clássico.

Devido à falta de evidências que sustentem a hipótese de dissociação, realizamos uma modelagem molecular por homologia da hemoglobina de *Liophis miliaris*, uma vez que a seqüência primária desta hemoglobina está depositada no PDB (codigo de acesso:P16417 (cadeia α) e P16418 (cadeia β)). Este procedimento foi realizado, a fim de analisarmos a interface dimérica desta proteína para tentarmos compreender o real efeito das substituições e o porquê da ausência de dissociação.

Para isso, realizamos uma análise estrutural comparativa entre a hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada e as hemoglobinas de *Onchorhynchus mykiss* (Truta), *Gallus gallus* (ave) e humana.

Os resultados mostraram que os resíduos Glu 43(β) e Glu 101(β) não são resíduos de fundamental importância na manutenção da forma tetramérica, já que as hemoglobinas de ave e peixe também possuem estes resíduos substituídos nestas posições e nem por isso são hemoglobinas diméricas (Knapp *et al.*, 1999; *J. Biol. Chem.* v. 274, pp. 6411; Tame *et al.*, 1996; *J. Mol. Biol.* v.259, pp. 749), ou seja, a “base molecular” do mecanismo de dissociação é uma suposição incorreta.

Sendo assim, concluímos que não há provas sobre a existência do mecanismo de dimerização proposto na literatura para a hemoglobina de *Liophis miliaris* nem como para outras hemoglobinas de serpentes.

ABSTRACT

A series of articles published from 1987 to 1999 (Focesi *et al.*, 1987; *J. Med. Biol. Res.* v. 20, pp. 861; Oyama *et al.*, 1993; *Comp. Biochem. Physiol.* v. 105B: pp. 271; Bonilla *et al.*, 1994a; *Comp. Biochem. Physiol.* v. 109A, pp. 1085; Bonafe *et al.*, 1999; *J. Biol. Chem.* v. 274, pp. 1196) report evidences of a dimer-tetramer transition mechanism in some snake hemoglobins, such as *Liophis miliaris*, *Boa constrictor*, *Helicops modestus* and *Bothrops alternatus*.

According to this hypothesis, hemoglobins of these species, when in the deoxygenated state would predominate as tetramers ($\alpha_2\beta_2$). Nevertheless, when oxygenated, these proteins would split into dimers ($\alpha\beta$).

According to Matsuura *et al.*, (1989; *J. Biol. Chem.* v. 264, pp. 5515) this dissociation should occur due to substituted residues (Glu 43(β) \Rightarrow Thr e Glu 101(β) \Rightarrow Val) in the $\alpha_1\beta_2$ -interface. The lack of these two negative charges should favor the dissociation into dimers.

According to Bonafe *et al.*, (1999; *J. Biol. Chem.* v. 274, pp. 1196) the *Helicops modestus* hemoglobin, in the stripped form, shows a non-cooperative oxygen binding, a behavior found in vertebrate dimeric hemoglobins.

The aim of our work was to analyze hemoglobins of some snake species (*Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus*, *Boa constrictor* and *Liophis miliaris*) in order to perform functional characterization and to determine the level of dissociation of those proteins, in order to confirm the existence or not of the dissociation mechanism linked to oxygenation.

The results obtained with analytical gel filtration chromatography for the determination of the dimer-tetramer association constant showed that snake hemoglobins analyzed in this work, are stable tetrameric forms in solution.

The data above were confirmed by SAXS analysis, which showed radius of gyration and dimension maximum very similar to finding to human hemoglobin.

The functional properties (oxygen binding) and the analysis of the association constant showed that, Hb-II from *Crotalus durissus terrificus* and hemolysate from *Helicops modestus*, have an alkaline Bohr effect, in the stripped form, without any link to association/dissociation phenomena.

The hemoglobins of these snakes showed cooperative oxygen binding, in the whole tested pH range, both in the presence as in the absence of ATP.

The data gathered using osmotic stress showed that deoxy-hemoglobins from *Crotalus* and *Helicops*, in the absence of anions, assume a conformational state, denominated T_0 state, as proposed by Colombo & Seixas, (1999) for human hemoglobin.

For the *stripped* hemoglobin from *Liophis miliaris* osmotic stress data showed that deoxy-hemoglobin of this snake does not assume the T_0 state, but the T_X state, in the absence of anions.

Due to the lack of evidences supporting the dissociation hypothesis, we performed a molecular modeling of *Liophis miliaris* hemoglobin, in order to analyze the dimeric interface of this protein to understand the real effect of the residues' substitution and the lack of dissociation.

With that purpose, we carried out a comparative structural analysis between modeled hemoglobin from *Liophis miliaris* and *Oncorhynchus mykiss* (fish; Trout), *Gallus gallus* and human hemoglobins.

The results showed that residues Glu 43(β) and Glu 101(β) are not essential in the maintenance of the tetrameric form. Some chicken and fish hemoglobins possess these residues substituted in the same positions, not being reported as dimeric hemoglobins, in other words, the "molecular basis" of the dissociation mechanism is an incorrect assumption.

In conclusion, we refute the proposed mechanism of dissociation for *Liophis miliaris* hemoglobin, and for other snake hemoglobins.

I. INTRODUÇÃO

I.a. A Molécula de Hemoglobina: Uma Proteína Alostérica

A hemoglobina (Hb) é uma hemoproteína contida nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados. Sua principal função é transportar o oxigênio (O_2) dos órgãos captadores (pulmões e brânquias, principalmente) para os tecidos

e de parte do CO_2 , produzido pelos tecidos, no sentido inverso.

A Hb humana é formada por quatro cadeias polipeptídicas chamadas subunidades, sendo duas denominadas cadeias α , com 141 resíduos de aminoácidos, e as outras duas são denominadas cadeias β , com 146 resíduos.

Estas subunidades estão arranjas em uma estrutura quaternária tetramérica de forma aproximadamente esférica

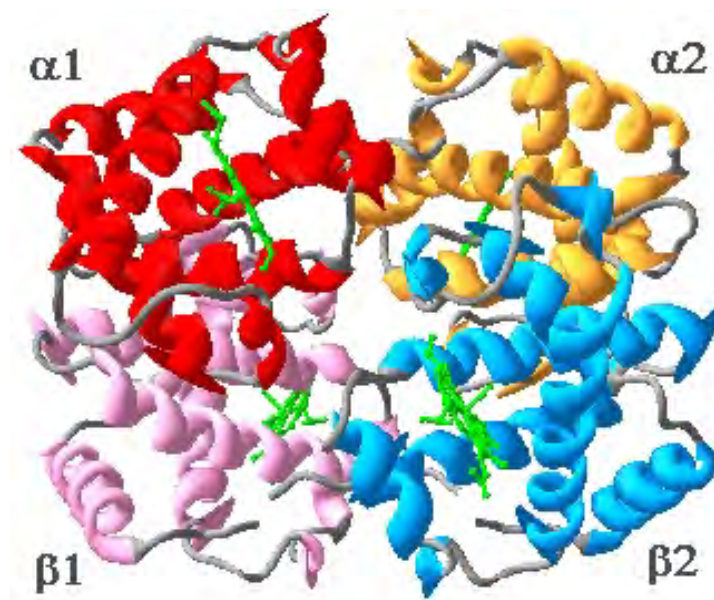


Figura 1. Ilustração da estrutura quaternária da oxihemoglobina humana (código PDB: 1HHO). Os grupos heme estão representados em verde e cada cadeia de globina, com suas α -hélices, em cores diferentes. A figura foi gerada no programa computacional Swiss-PdbViewer versão 3.7 de domínio público.

(figura 1), cujo diâmetro é de 64 \AA e massa molecular de aproximadamente 64 kD (Garret & Grisham, 1995).

Cada subunidade da molécula de Hb acomoda um anel de ferro-porfirina (grupo heme) que é o sítio de ligação reversível de O_2 . Portanto, quatro moléculas de oxigênio podem se ligar à hemoglobina. A ligação do O_2 só acontece quando o átomo de ferro se encontra na forma Fe^{2+} (ferrosa).

Quando este encontra-se oxidado (Fe^{3+} ou forma férrica) e, portanto, incapaz de realizar a ligação do oxigênio, temos a forma conhecida como meta-hemoglobina (Meta-Hb). Um ambiente extremamente compacto e hidrofóbico em torno do grupo heme é essencial para que se evite a formação de Fe^{3+} , pois sabe-se que o anel de ferro-porfirina isolado em solução é rapidamente oxidado pelo oxigênio (Stryer, 1992).

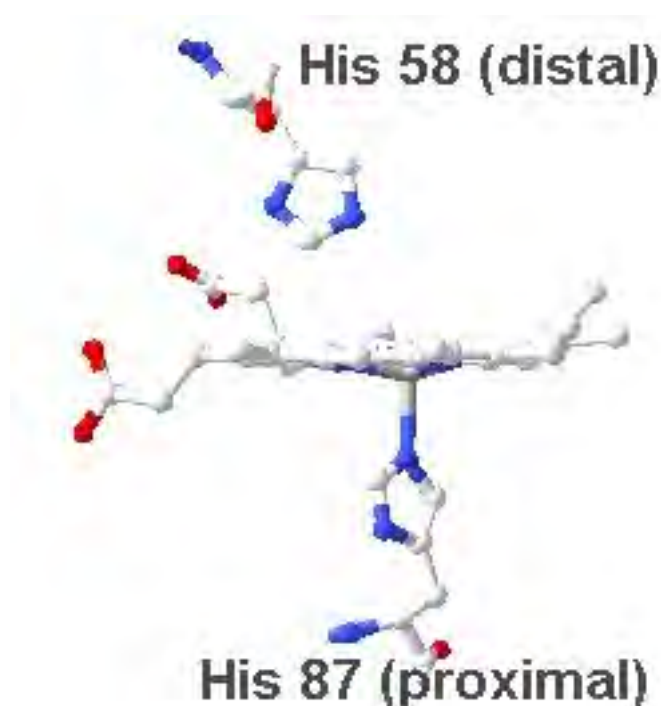


Figura 2. Ilustração do grupo heme da desoxi-hemoglobina humana (código PDB: 1A00) com as His 58 (E7 distal) e His 87 (F8 proximal) da cadeia α . A figura foi gerada no programa computacional Swiss-PdbViewer versão 3.7 de domínio público.

molécula de oxigênio tem-se a forma oxigenada, e na forma oxidada (meta-hemoglobina) há uma molécula de água ligada (Baldwin & Chothia, 1979).

A estrutura quaternária da hemoglobina torna possível a interação entre os sítios de ligação de oxigênio, e destes com outros ligantes presentes no meio. Essas interações caracterizam a alosteria, e possibilitam o “ajuste fino” da função da hemoglobina às necessidades fisiológicas.

Dois resíduos de histidina (His) são importantes na ligação do oxigênio à molécula de Hemoglobina. De um lado do plano do heme (figura 2) o átomo de ferro está diretamente ligado à histidina proximal (His F8). Do outro lado, está o sítio de ligação do oxigênio, onde se encontra a Histidina distal (His E7), que está próxima do heme, mas não ligada a ele. Quando esta ligação está livre, tem-se a forma desoxigenada; quando há uma

I.b. Modelos Teóricos de Alosteria

Koshland *et al.*, (1966) propuseram um modelo teórico a fim de tentar explicar como as propriedades funcionais de ligação de O₂ à Hemoglobina são moduladas por efetores homo e heterotrópicos.

Neste modelo, conhecido como KNF (devido às iniciais dos seus autores Koshland, Nemethy e Filmer), propõe-se que as subunidades da Hb se encontram em uma determinada conformação no estado desoxigenado. Conforme ocorre a ligação do primeiro ligante, este provoca uma alteração na subunidade onde se ligou. Esta alteração é, então, transmitida as outras subunidades vizinhas através das interfaces entre elas, promovendo assim uma mudança conformacional na estrutura quaternária da molécula (figura 3).



Figura 3. Modelo sequencial de alosterismo, conhecido também por KNF (Figura retirada de Voet, Voet & Pratt, 2000).

Outro modelo, anterior ao KNF, que tenta explicar as mudanças conformacionais da Hb durante sua oxigenação é o modelo de Monod, Wyman e Changeux (MWC) (Monod *et al.*, 1965). Para Monod e colaboradores haveria duas formas moleculares da Hb. Uma que predominaria no estado desoxigenado, denominada forma Tensa (T) com baixa afinidade por O₂ e outra predominante no estado oxigenado, denominada forma Relaxada (R), com elevada afinidade pelo gás (figura 4).

No modelo MWC a ligação do ligante a uma subunidade da molécula não tem efeito direto na afinidade dos outros sítios; o que se altera é o equilíbrio conformacional entre as formas T e R. De acordo com a teoria alostérica de MWC,

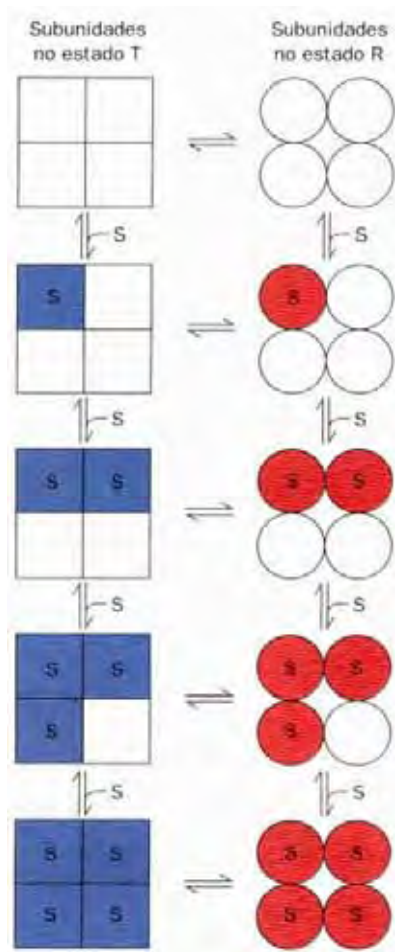


Figura 4. Modelo de simetria do alosterismo ou modelo de Monod, Wyman e Changeux (MWC) (Figura retirada de Voet, Voet & Pratt, 2000).

a curva de ligação de O_2 é descrita pelas constantes microscópicas (K_T e K_R) de dissociação do O_2 , a constante de transição entre as duas estruturas (T e R) e a constante “alostérica” de equilíbrio “L”, na ausência de O_2 ($L=[T]/[R]$).

No modelo MWC, quando uma molécula de O_2 liga-se a uma das subunidades da hemoglobina, esta permanece na sua conformação terciária não ligada (T) no sentido de conservar a simetria; isto lhe confere uma baixa energia de ligação quando comparada à sua estrutura terciária na forma R.

Após a ligação de outras moléculas de oxigênio, o somatório das energias de ligação desfavoráveis torna-se energeticamente mais favorável à forma R.

Esta transição brusca da forma T para R rompe algumas ligações na interface dimérica, assim, o tetrâmero converte-se para a forma R apresentando todas as suas subunidades em suas formas terciárias relaxadas (R).

O modelo KNF considera que a passagem da forma T para a forma R ocorre por alterações na estrutura terciária de cada subunidade, assim essas alterações refletem-se nas demais subunidades através da estrutura quaternária. Desta forma, o modelo KNF aceita formas intermediárias em equilíbrio com as formas T e R.

Outra diferença é que o modelo MWC considera a presença das formas Relaxada e Tensa mesmo na ausência de ligante. O modelo KNF propõe que a forma R só se formará no momento da ligação do ligante (Creighton, 1993).

O modelo MWC é o mais aceito na comunidade científica mundial, contudo, atualmente se mostra insuficiente para explicar as descobertas de estados intermediários entre as formas T e R (Ackers, 1992; Silva *et al.*, 1992; Colombo & Seixas, 1999).

Silva *et al.*, (1992) cristalizaram e elucidaram a estrutura de um intermediário alostérico denominado estado R2. Os autores observaram diferenças conformacionais entre as estruturas terciárias da forma R canônica e do novo estado alostérico R2 descrito por eles, essas diferenças situam o estado alostérico R2 entre os estados **R-R2-T**, sugerindo que tais estados coexistam em solução.

Colombo & Seixas, (1999) mostraram que a desoxi-hemoglobina humana coexiste em duas conformações alostéricas distintas, cujo equilíbrio alostérico é determinado pela ligação de cloreto. Essas duas conformações da desoxi-hemoglobina humana são: **1-** o estado T_x , para a forma complexada com cloreto e **2-** o novo estado alostérico T_0 , para a forma não complexada com cloreto. No próximo item descrevemos em detalhes a existência destes dois estados alostéricos da forma desoxigenada.

I.c. Modelo Alostérico de Três Estados

_____ Baldwin & Chothia (1979) mostraram que, durante a transição da forma desoxigenada para a oxigenada, alguns contatos entre as subunidades são rompidos, uma vez que ocorre um giro de 15° entre os dímeros $\alpha\beta$, e como conseqüência disso, a proteína oxigenada é mais exposta ao solvente.

Estas mudanças implicam numa diferença de hidratação entre os dois estados conformacionais da hemoglobina humana e, conseqüentemente, ligação de água com a oxigenação (Colombo *et al.*, 1992), já que a forma oxigenada é mais hidratada que a forma desoxigenada (Lesk *et al.*, 1985).

O método de estresse osmótico tem sido utilizado para estudar o papel da água sobre o controle alostérico da hemoglobina (Colombo *et al.*, 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996; Colombo & Seixas, 1999; Müller *et al.*, 2003; Hundahl *et al.*, 2003).

_____ Este método permite determinar o número de moléculas de água (Δn_w) que se ligam à Hb durante o processo de oxigenação. O método de estresse osmótico utiliza solutos neutros: polietilenoglicol (PEG), sacarose, glicose, etc, que são excluídos da superfície de hidratação da proteína (Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996), como osmólitos que reduzem a atividade de água e, permitem determinar como a afinidade da Hb por O₂ varia em diferentes atividades de água.

_____ Colombo *et al.*, (1992) mostraram que, durante a oxigenação da Hb humana, na presença de 100mM de NaCl, 70 moléculas de água se ligam à oxi-hemoglobina. Os autores encontraram estas 70 moléculas de água em vários experimentos e, utilizando diferentes solutos neutros (PEG-150, PEG-400, estaquiose e sacarose). Estes experimentos também confirmaram que a oxi-hemoglobina é um estado conformacional mais hidratado em relação à desoxi-hemoglobina.

Em continuidade ao trabalho citado acima, Colombo & Seixas, (1999) propuseram um modelo alostérico de três estados. Os autores encontraram que a hemoglobina humana, na ausência de cloreto, liga 25 moléculas de água (δn_w), durante a transição conformacional da desoxi para oxi-hemoglobina. Em contraste, com 72 moléculas de água (Δn_w) que se ligam à oxi-Hb humana, na presença de cloreto (figura 5).

Estes resultados indicaram que a desoxi-hemoglobina humana coexiste em dois estados alostéricos diferentes, o estado T_x (que é o estado T clássico) e um novo estado alostérico T₀, intermediário entre T_x e R, o equilíbrio entre T₀ e T_x é dependente da presença ou não de cloreto em solução.

O método de estresse osmótico abriu uma nova perspectiva para se sondar alterações conformacionais que acompanham a transição entre a forma oxigenada e desoxigenada da hemoglobina humana e de outras espécies, com uma abordagem simples e confiável, como corroborado por medidas diretas da ligação de água à proteína (Salvay *et al.*, 2003).

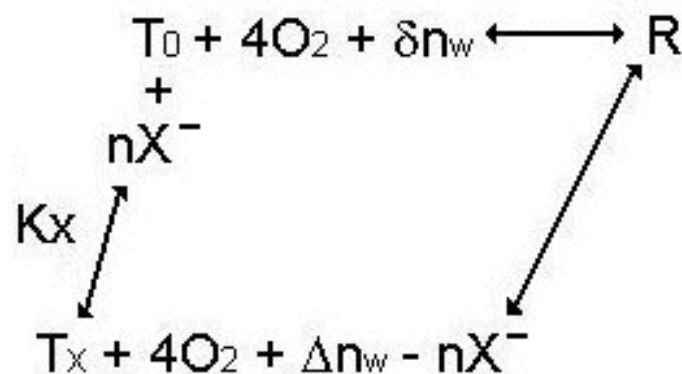


Figura 5. Modelo representativo do processo de oxigenação da hemoglobina humana, onde a forma desoxigenada é representada em dois estados conformacionais diferentes, T_x e T_0 . No esquema, δn_w e Δn_w representam o número de moléculas de água que se ligam à Hb humana na transição entre as formas T_0 e R e T_x e R, respectivamente. K_x é a constante de dissociação do ânion ao estado T_x e nX^- é a relação estequiométrica do ânion com a desoxi-Hb para a estabilização desse estado da Hb. Figura retirada do modelo proposto por Colombo & Seixas, (1999).

I.d. Modelo de dissociação e transporte de oxigênio, in vivo, proposto para as hemoglobinas de serpentes

Foi proposto para a hemoglobina da serpente *Liophis miliaris* um mecanismo de dissociação dependente da oxigenação (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987, 1989; Focesi *et al.*, 1990).

Os autores sustentavam a existência de tal mecanismo devido as peculiaridades apresentadas pelas propriedades funcionais dessa hemoglobina, tanto na ausência como na presença de fosfatos orgânicos.

De acordo com esses autores, na ausência de ATP, a Hb de *Liophis miliaris*, possui alta afinidade por O₂, baixo ou nenhum efeito Bohr alcalino e ausência de cooperatividade.

Na presença de fosfatos orgânicos (ATP), ocorreria uma acentuada diminuição da afinidade da Hb por O₂, um efeito Bohr alcalino tornaria-se evidente, e a ligação de O₂ passaria a ser cooperativa (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Focesi *et al.*, 1990).

Bonafe *et al.*, (1999) estudaram as propriedades funcionais de ligação de O₂ e o potencial redox da hemoglobina de *Helicops modestus*, com o intuito de verificar se o mecanismo de dissociação proposto para *Liophis miliaris* também existiria para a hemoglobina de *Helicops modestus*.

Os dados das propriedades de ligação de O₂ mostraram que a hemoglobina de *Helicops modestus*, na ausência de fosfatos orgânicos (ATP), possuía alta afinidade por O₂ e ausência de cooperatividade.

Quando fosfatos orgânicos foram adicionados à solução de Hb, a afinidade por O₂ diminuiu bruscamente e a ligação de O₂ tornou-se cooperativa ($n_H=2,0$), entre pH 7,0 e 7,5. Acima de pH 7,5, a Hb gradualmente diminuiu a cooperatividade ($n_H=1$) e a afinidade por O₂ aumentou, sugerindo um enfraquecimento das interações eletrostáticas entre ATP e Hb. Como consequência disso, a Hb tende a assumir as propriedades funcionais da forma sem ATP.

Analisando o potencial redox da Hb de *Helicops modestus*, na ausência de ATP, os autores encontraram que este não se alterou até pH 7,6, mas em valores de pH acima de 7,6 o potencial redox diminuiu bastante. Este resultado é similar ao encontrado para a mioglobina, sugerindo que a Hb de *Helicops modestus*, na

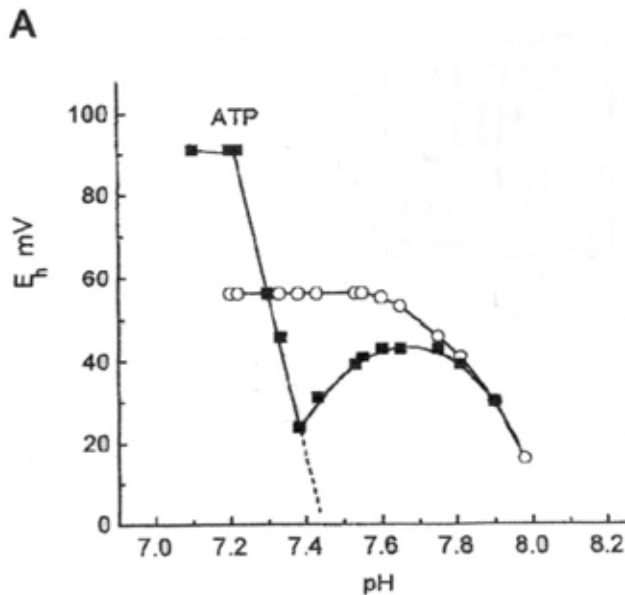


Figura 6. Efeito do ATP sobre o equilíbrio de óxido-redução da Hemoglobina de *Helicops modestus* em diferentes valores de pH. Os círculos abertos se referem a hemoglobina livre de ATP e os fechados à hemoglobina com ATP. A linha tracejada indica o comportamento teórico do tetrâmero. Os experimentos foram realizados em tampão Tris-HCl 0,1M contendo 0,1M de NaCl a 20°C. A concentração de hemoglobina foi de 140 μ M. Figura adaptada de Bonafe *et al.*, (1999).

ausência de ATP, estaria dissociada, mesmo na forma desoxigenada.

Na presença de ATP, o potencial redox possuía um valor alto de ± 90 mV, entre pH 7,0 e 7,22, este valor diminuiu para ± 20 mV até pH 7,4, o que é consistente com curvas redox para a hemoglobina tetramérica.

Entre pH 7,4 e 7,8, a curva de

potencial redox encontrada é compatível com um equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros com ATP ligado. Acima de pH 8,0 (figura 6), ocorreu a sobreposição das curvas redox na ausência de ATP e na presença de ATP, indicando a completa liberação do ATP do seu sítio de ligação. A porcentagem de dímeros estimada, em pH 7,8, foi de 98%.

Em virtude dos dados acima relatados, Bonafe *et al.*, (1999) propuseram um modelo geral de dissociação e transporte de O₂ para as hemoglobinas de serpentes.

Os autores propuseram que o ATP induz tetramerização na Hb de *Helicops modestus*. Neste modelo, durante o processo de dormência, quando o transporte de O₂ é baixo e o pH é alto, a Hb existe em uma forma dimérica que funciona como um reservatório de O₂, algo parecido com a função da mioglobina (em animais que têm altas concentrações desta proteína). Em situações de “stress” ou hiperatividade, uma diminuição no pH promoveria tetramerização da Hb induzida por ATP. Isto

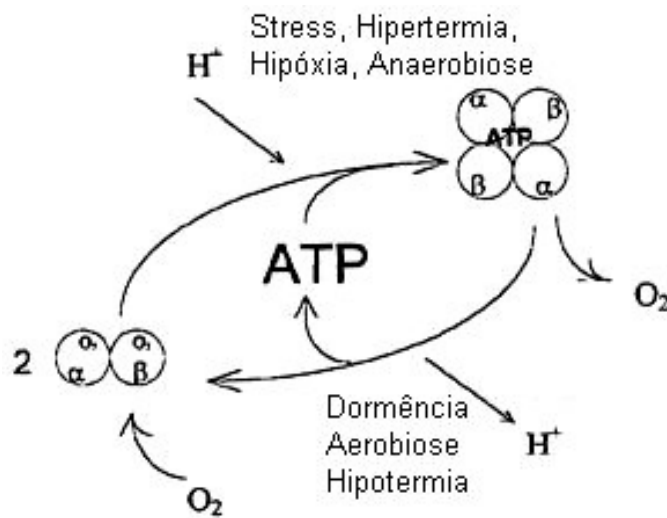


Figura 7. Modelo de dissociação e transporte de oxigênio (*in vivo*) para hemoglobinas de serpentes, proposto por Bonafe *et al.*, (1999).

resultaria numa significativa liberação de O₂, suprindo as necessidades fisiológicas de O₂ do animal.

O que não fica claro neste esquema de oxigenação proposto por Bonafé *et al.* (1999) é a respeito do período em que as serpentes estão em dormência.

Sabemos que serpentes podem passar 3 ou 4 meses em estado de dormência (durante o período de outono e inverno). Durante este período onde o metabolismo do animal é extremamente baixo (metabolismo basal), não se observam alterações no pH, não há atividade celular intensa e os níveis de fosfatos orgânicos diminuem consideravelmente (Wood, 1980). Sendo assim, pergunta-se: como seria então realizada a liberação do oxigênio, uma vez que alguns efetores alostéricos não estão disponíveis e a forma dimérica possui uma afinidade maior que a forma tetramérica? (figura 7). Além do mais, a hipóxia induz a liberação de epinefrina, cujo efeito final é a elevação do pH dentro do eritrócito (Pelster & Decker, 2004).

I.e. A Ligação Cooperativa de Oxigênio: Interação Alostérica Homotrópica

Archibald Hill em 1913 analisou pela primeira vez a curva de oxigenação da Hb (Voet *et al.*, 2000). Hill considerou que a ligação de O₂ poderia ser representada pela seguinte equação genérica:



onde K é a constante de dissociação e n representa o grau de cooperatividade.

Por definição:

$$K = \frac{[Hb] * [O_2]^n}{[Hb * (O_2)_n]} \quad \text{Eq. 2}$$

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 concentração de oxigênio.

A saturação fracional Y, é expressa como (Voet *et al.*, 2000):

$$Y = \frac{n[Hb(O_2)_n]}{n([Hb] + [Hb(O_2)_n])} \quad \text{Eq. 3}$$

combinando as equações 2 e 3 obtém-se:

$$Y = \frac{[Hb] * [O_2]^n}{K} * \frac{K}{[Hb] * [O_2]^n + K[Hb]} \quad \text{Eq. 4}$$

após alguns rearranjos e o cancelamento de alguns termos, chega-se à equação de Hill, onde:

$$Y = \frac{[O_2]^n}{[O_2]^n + K} \quad \text{Eq. 5}$$

como O_2 é gás, é conveniente expressar sua concentração em termos de pO_2 , que é a pressão parcial de oxigênio (em mmHg ou Torr) na atmosfera em torno da solução, assim a equação 6 é expressa como:

$$Y = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} \quad \text{Eq. 6}$$

ao expressar a fração de oxi-Hb (Y) sobre a fração de desoxi-Hb (1-Y) tem-se:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} * \frac{1}{1 - \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K}} = \frac{[pO_2]^n}{K} \quad \text{Eq. 7}$$

Obtendo-se o logaritmo de ambos os lados da equação 7, obtém-se:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log[pO_2] - \log K \quad \text{Eq. 8}$$

A partir de um gráfico de $\log(Y/(1-Y))$ versus $\log[pO_2]$ obtém-se o gráfico de Hill da hemoglobina. Este gráfico permite o cálculo dos valores de P_{50} e n_H que descrevem as propriedades funcionais da Hb (Figura 8).

A cooperatividade é medida pelo coeficiente de Hill (n_H ou n_{50}). Este valor é obtido pela inclinação do gráfico de Hill, no ponto médio de saturação ($Y=0,5$). Um $n_H=1$ caracteriza um processo não cooperativo, que em um gráfico da saturação versus o $\log pO_2$ é representado por uma curva hiperbólica, como no caso da mioglobina. Um $n_H>1$ caracteriza um processo cooperativo, processo este representado por uma curva sigmoidal, no gráfico antes citado. Para a hemoglobina

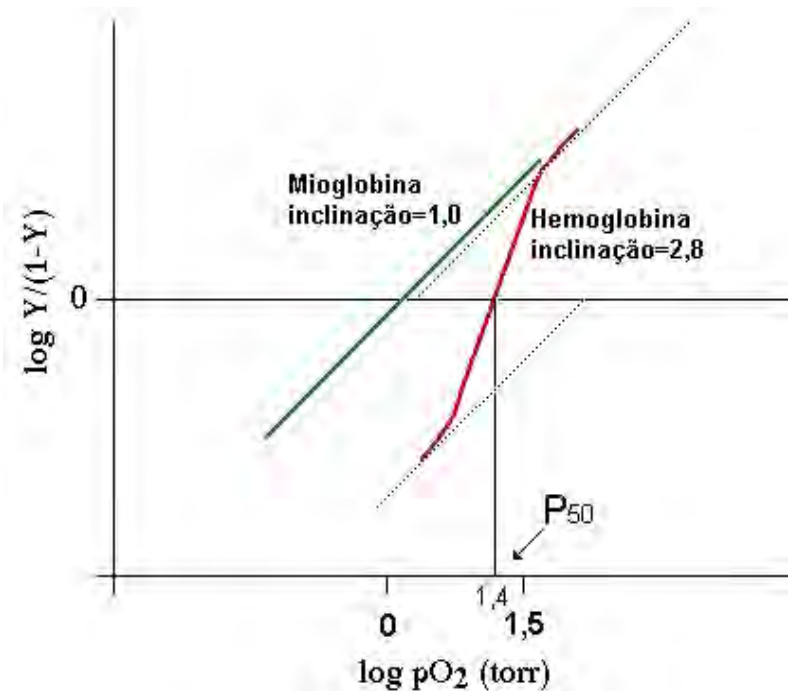


Figura 8. Gráfico de Hill da Mioglobina (linha verde) e Hemoglobina (linha vermelha). (fonte: <http://www.usm.maine.edu/~rhodes/goodies/hillplot.html>)

humana o valor de n_H é ao redor de 2,8 (em tampão Hepes-NaOH 10mM pH 7,5 a 25°C).

Deste gráfico também é possível obter o valor de P_{50} , isto é, o valor de pO_2 necessário para saturar metade dos sítios de ligação de O_2 . A P_{50} é obtida quando a curva de oxigenação da hemoglobina ou mioglobina cruza $Y=0,5$, neste ponto, extrapolando

uma reta até o eixo de $\log pO_2$ temos o valor de P_{50} .

Fisiologicamente, a cooperatividade é muito importante para uma boa oxigenação dos tecidos em atividade. Ela permite que a Hb nos pulmões seja 98% oxigenada e, nos tecidos, um mínimo de 66% do O_2 seja liberado para consumo celular. Se imaginarmos um carreador hipotético de oxigênio, tendo a mesma afinidade por este, porém não apresentando cooperatividade, ocorreria uma má oxigenação nos pulmões (por volta de 79% de oxigenação) e somente 36% do O_2 seria liberado para os tecidos (Garrett & Grisham, 1995).

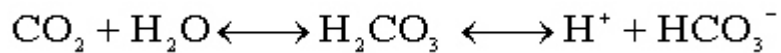
I.f. A Regulação da Função: Efeitores Alostéricos Heterotrópicos

Diferentemente do efeito homotrópico (item I.b.) existe um segundo tipo de interação que pode modular a função da molécula de Hb. Esta interação ocorre quando um determinado ligante A, interfere na ligação de um outro ligante B, em sítios de ligação diferentes, na mesma molécula. A este tipo de interação denomina-se **interação heterotrópica**, e as moléculas que promovem este efeito são conhecidas como **efetores heterotrópicos ou agentes alostéricos**. Estes na sua maioria ligam-se preferencialmente à forma desoxigenada, conseqüentemente, deslocando o equilíbrio entre a forma T e R para a primeira, conforme o modelo de MWC (Monod *et al.*, 1965). No entanto, em algumas hemoglobinas estes efetores podem se ligar à forma oxigenada e deslocar o equilíbrio para o estado R, tal como se observa no efeito Bohr reverso ou ácido (Fago *et al.*, 1995).

Exemplos de efetores heterotrópicos são: prótons (H^+), íons cloreto (Cl^-), fosfatos orgânicos (BPG, IPP, GTP, ATP), bicarbonato, dióxido de carbono (CO_2) e água (Focesi *et al.*, 1987; Fago *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996; Colombo & Seixas, 1999). Em seguida, será discutido um pouco de cada efetor heterotrópico.

I.f.1. Ligação de Prótons (H^+): O Efeito Bohr

A associação do oxigênio com a hemoglobina humana é fortemente dependente do pH. Em pH ácido a hemoglobina é estimulada a liberar oxigênio, já que um abaixamento do pH ocasiona uma redução na afinidade da Hb pelo O_2 . Este processo causado pelo acúmulo de prótons é conhecido como **Efeito Bohr normal ou alcalino**, constituindo uma propriedade muito importante em termos fisiológicos.



Em tecidos ativos, observa-se uma redução do pH ocasionado por uma elevação da P_{CO_2} e pelo aumento da concentração de ácido láctico. O CO_2 em solução reage rapidamente com H_2O por ação da anidrase carbônica eritrocitária produzindo ácido carbônico (H_2CO_3), o qual é muito instável e libera íons H^+ e HCO_3^- , segundo a reação abaixo:

O H_2CO_3 é extremamente instável porque seu pK_a é 6,35 e, o pH do sangue é 7,4. O resultado disso é que, nestas condições, aproximadamente 90% do CO_2 estará na forma de HCO_3^- (íon bicarbonato), liberando H^+ . Sendo assim, a maior parte do CO_2 é transportada na forma de bicarbonato (85%), os outros 15% são transportados pela própria hemoglobina na forma de carbamato (Campbell, 2000).

O mecanismo do efeito Bohr envolve o N-terminal da cadeia α e as cadeias laterais dos resíduos His 122 α e His 146 β (Perutz *et al.*, 1980; Kilmartin *et al.*, 1980). Na forma oxigenada, a His 146 β possui uma liberdade rotacional muito grande, enquanto que, na forma desoxigenada, este resíduo de aminoácido participa de várias interações.

Nesta última condição, este resíduo está muito próximo do resíduo Aspartato 94 que possui carga negativa, e a proximidade aumenta o pK_a da His 146 β (Kilmartin *et al.*, 1980). Sendo assim, na transição de oxi para desoxi-Hb, a His 146 β torna-se mais básica, já que seu ambiente local fica com carga negativa. Em decorrência, a oxigenação torna a Hb mais ácida, levando a liberar no meio os prótons ligados a ela.

Os ambientes imediatos dos outros dois grupamentos envolvidos também ficam com carga negativa na desoxi-Hb, devido à mudança de estrutura quaternária induzida pela liberação de O_2 .

Fisiologicamente, o efeito Bohr é muito importante pois, conforme o sangue arterial irriga os tecidos, o CO_2 difunde-se nas hemáceas, reduzindo o pH e a afinidade por O_2 , promovendo assim a liberação do O_2 , além de contribuir para a manutenção do pH sanguíneo por volta de 7,4. Outro fator que contribui é a liberação de ácido láctico pelo tecido muscular em exercício vigoroso.

Nos pulmões, o íon bicarbonato combina-se com o H^+ liberado, em virtude da oxigenação da hemoglobina, produzindo assim ácido carbônico (H_2CO_3). Por sua vez, o H_2CO_3 libera o CO_2 , que é, então, exalado (Campbell, 2000).

1.f.2. Efeito do Íon Cloreto(Cl^-)

O íon cloreto também é um efetor alostérico heterotrópico que, como os outros já descritos, contribui diminuindo a afinidade da Hb por O_2 .

Durante algum tempo imaginou-se que os íons cloreto possuíam sítios de ligação específicos na Hb (Kilmartin *et al.*, 1978). Contudo, Perutz *et al.*, (1994) propuseram que os íons cloreto se ligavam ou na cavidade central, formada na desoxi-Hb, ou na parte externa da molécula, de forma não específica.

Na hemoglobina humana e, em algumas Hbs humanas anormais, esta cavidade central possui um excesso de cargas positivas; isto, segundo Bonaventura e Bonaventura, (1978) favorece a forma R, pois por repulsão eletrostática desestabiliza a forma T. Foi observado para a Hb Hinsdale (Asn H17(139) $\beta \Rightarrow$ Lys), que possui 4 cargas na cavidade central e elevada afinidade por oxigênio (em comparação com a Hb humana), que o íon cloreto liga-se a sítios não específicos, estabilizando a forma T (Bonaventura *et al.*, 1994; Perutz *et al.*, 1994).

Na Hb Turriff (Lys G6(99) $\alpha \Rightarrow$ Glu), que possui carga zero na cavidade central, a influência do íon cloreto praticamente inexistente, sendo o gráfico de Hill

desta e da Hb humana muito semelhantes na presença de 500mM de Cl⁻. O número de Cl⁻ liberados durante a oxigenação desta hemoglobina é de 0,035 por heme. Já nas Hbs Dallas (Asn G4(97) $\alpha \Rightarrow$ Lys) e Abruzzo (His H21(143) $\beta \Rightarrow$ Arg), que possuem duas cargas positivas a mais na cavidade central, o efeito do íon cloreto é mais efetivo em relação à hemoglobina Turriff, uma vez que o número de Cl⁻ liberados durante a oxigenação é de 0,70 e 0,69 por heme, respectivamente (Perutz *et al.*, 1994).

I.f.3. Fosfatos Orgânicos

A afinidade da hemoglobina pelo O₂ dentro das hemáceas é menor do que a da hemoglobina em solução. Isto ficou claro com o trabalho de Benesch & Benesch, (1967). Eles mostraram que o 2,3-bifosfoglicerato (BPG)¹ liga-se à Hb humana e exerce um grande efeito em sua afinidade pelo O₂. Este fosfato orgânico está presente dentro das hemáceas em uma concentração molar de 1:1 em relação à Hb.

Na ausência de BPG e outros sais a P₅₀ da Hb humana é de 1,7mmHg, em tampão HEPES 0,01M pH 7,2 a 25°C; contudo, na sua presença, a P₅₀ eleva-se para 5,0mmHg (Colombo & Seixas, 1999). Portanto, esse fosfato tem como principal efeito diminuir a afinidade da Hb por oxigênio, permitindo a liberação do O₂ nos capilares dos tecidos (Arnone, 1972).

O sítio de ligação do BPG é formado adequadamente na forma desoxigenada. Nesta condição ocorre a formação de uma cavidade central (entre as subunidades) na molécula de Hb, onde são expostas as cadeias laterais da histidina 2 e 143 de

¹Parte da literatura usa a denominação antiga, 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

ambas as cadeias β , a lisina 82 de ambas as cadeias β e os grupos amino terminais de ambas as cadeias β (Arnone, 1972), como ilustrado na figura 9.

Estes resíduos criam uma região, na desoxi-Hb, carregada positivamente, sendo um sítio potencial de ligação de ânions (2,3 BPG e cloreto) (Arnone, 1972). O BPG estabiliza a estrutura da desoxi-Hb e durante a oxigenação é expulso da cavidade central, pois com a mudança estrutural a cavidade diminui de tamanho e as cargas negativas dos resíduos C-terminais promovem repulsão eletrostática.

Em Hbs de serpentes o ATP é o fosfato orgânico que exerce maior controle na função da hemoglobina dentro da hemácea (Ragsdale *et al.*, 1995).

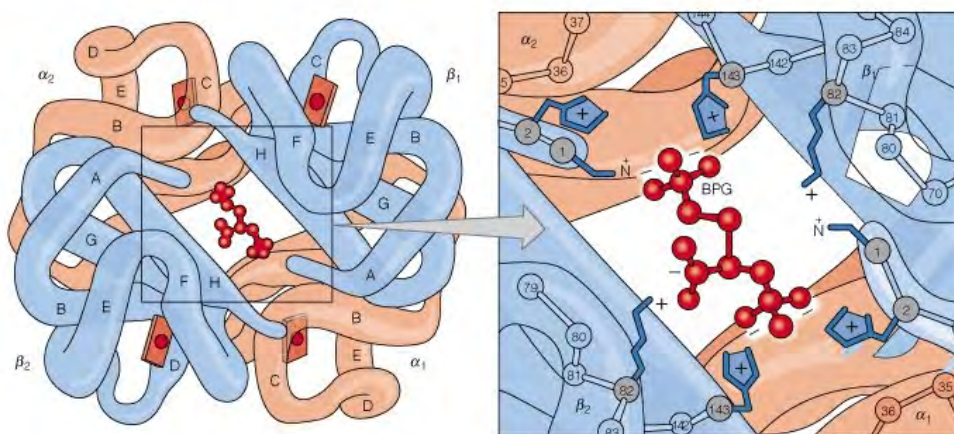


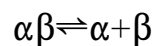
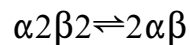
Figura 9. Ilustração do sítio de ligação do 2,3-BPG na desoxi-hemoglobina humana. Figura retirada de <http://www2.mcdaniel.edu/Chemistry/CH3321JPGs/Proteins/HbBPGbinding.jpg>

Focesi *et al.*, (1987) sugeriram que na “cobra d’água”, *Liophis miliaris*, o ATP acentua consideravelmente o efeito Bohr alcalino, já observado na forma *stripped*², além de induzir cooperatividade em pH 8,0, o que não se observa na forma *stripped* no mesmo pH.

²Na condição usada pelos autores, é a Hb desprovida de fosfatos orgânicos.

I.g. O Papel da Interface Dimérica na Manutenção da Estabilidade Tetramérica

A hemoglobina tetramérica pode sofrer dissociação reversível em dímeros ($\alpha\beta$) e, até mesmo, em monômeros α e β . O equilíbrio de dissociação pode ser representado pelo seguinte esquema (Antonini & Brunori, 1971):



A hemoglobina humana (Hb) é uma estrutura estável na concentração intraeritrocitária (um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, figura 10). Com a diminuição da concentração de Hb, o tetrâmero se dissocia em dímeros $\alpha\beta$ com constantes de dissociação tetrâmero-dímero distintas para as formas oxi e desoxigenadas da Hb.

A constante de dissociação para a forma oxigenada é de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-6} M (Atha & Riggs, 1976; Manning *et al.*, 1996) e para a forma desoxigenada de 10^{-10} M (Turner *et al.*, 1981), ou seja, esta última sofre uma dissociação muito menor.

A ligação de oxigênio (O_2) à Hb induz alterações terciárias e quaternárias nesta proteína, tornando cada vez mais fácil a ligação do próximo O_2 (cooperatividade). Conseqüentemente, toda a estrutura do tetrâmero é alterada, de forma que as estruturas da desoxi-hemoglobina (forma T) e da oxi-hemoglobina (forma R) são bem diferentes, portanto, qual é a base para a dissociação da Hb ocorrer principalmente entre dímeros $\alpha\beta$?

As subunidades α e β , em ambas as formas, estabelecem contatos entre si, os quais são responsáveis por manter a conformação oligomérica da Hb (Manning *et al.*, 1998; Voet *et al.*, 2000).

Os contatos na interface $\alpha_1\beta_1$ (e o seu equivalente $\alpha_2\beta_2$, figura 10) envolvem 35 resíduos de aminoácidos e os da interface dimérica $\alpha_1\beta_2$ (e o seu equivalente

$\alpha_2\beta_1$) envolvem 19 resíduos de aminoácidos. Os contatos estabelecidos entre as globinas α e β em cada dímero, são na sua maioria interações hidrofóbicas, embora estejam também envolvidas várias pontes de hidrogênio e pares iônicos (Voet *et al.*, 2000).

As interações entre $\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$ são muito fracas e não exercem grandes influências sobre o tetrâmero de Hb, porque estes pares de subunidades estão

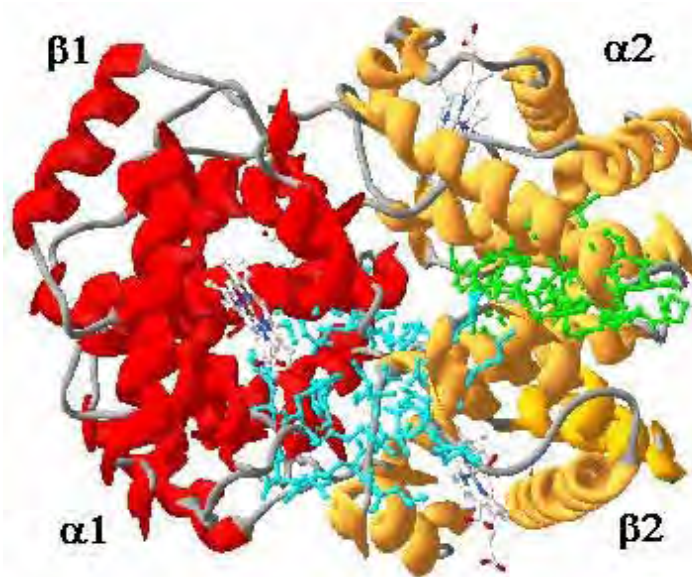


Figura 10. Representação esquemática da estrutura quaternária da oxi-hemoglobina humana. Os resíduos de aminoácidos que mantêm o dímero de hemoglobina ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$) estão representados pela cor verde, enquanto que os resíduos que compõem a interface dimérica ($\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$), responsáveis pela manutenção do tetrâmero, estão representados pela cor azul clara. Figura gerada no programa computacional Swiss-PdbViewer versão 3.7 de domínio público.

separados por um canal central de 20Å de diâmetro. Na forma desoxigenada este canal é o local de ligação de ânions (fosfatos orgânicos e Cl⁻), os quais estabilizam a desoxi-Hb (forma T) (Voet *et al.*, 2000).

Apesar do grande número de resíduos de aminoácidos constituintes da interface $\alpha_1\beta_1$ e o seu equivalente $\alpha_2\beta_2$, estes pares de dímeros não sofrem mudanças significativas durante a transição conformacional entre os estados tetraméricos

desoxigenado e oxigenado, já que esta interface possui uma quantidade expressiva de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (figura 11) (Manning *et al.*, 1998; Abraham *et al.*, 1997).

Contudo, quando a molécula de O₂ se liga à molécula de Hb, ocorre uma rotação de 15° de um dos dímeros em relação ao outro. Isto é o resultado do

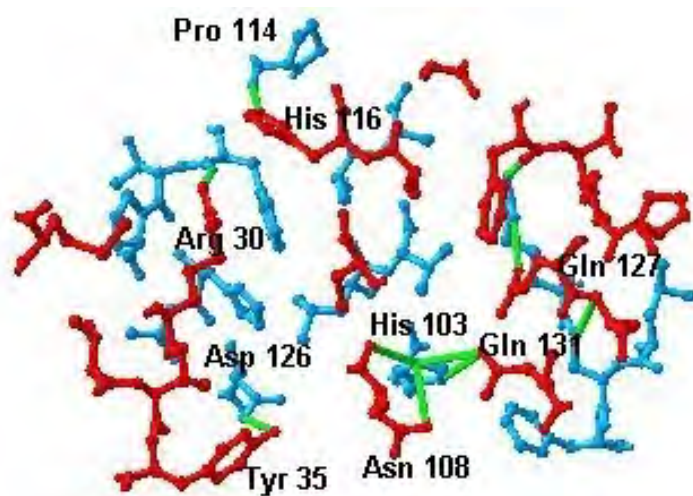


Figura 11. Representação esquemática dos resíduos que compõem a interface $\alpha_1\beta_1$ da desoxi-hemoglobina humana (código PDB: 1B86). Em azul claro, estão representados os resíduos da cadeia α_1 e, em vermelho, os resíduos da cadeia β_1 . As linhas em verde representam as pontes de hidrogênio que estabilizam este dímero. Os contatos de van der Waals, que também contribuem para a manutenção do dímero $\alpha_1\beta_1$, não foram mostrados. A figura foi gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

rompem as ligações que mantinham este efetor alostérico ligado à forma desoxigenada, além de que, com o estreitamento da cavidade central ocorre choques estéricos entre o resíduo de His 143 (β_2) e a molécula de 2,3 BPG, tornando instável sua permanência na cavidade central.

Entretanto, consta na literatura algumas Hemoglobinas humana variantes como dímeros, por exemplo, a Hb Rothschild (Gacon *et al.*, 1977), Hb Kansas (Bonaventura e Riggs, 1968) e algumas Hbs recombinantes D99K(β) e N102A(β), bem como várias Hbs de animais que se apresentam como dímeros e até mesmo como monômeros (Edelstein *et al.*, 1976; Ito *et al.*, 1995; Mylvaganam *et al.*, 1996; Pardanani *et al.*, 1997; Focesi Jr. *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1989; Fago *et al.*, 2001).

deslocamento entre os dímeros $\alpha_1\beta_2$ (e o seu equivalente $\alpha_2\beta_1$), onde as subunidades β se aproximam e promovem o estreitamento do canal central da Hb (figura 12), levando a molécula para o seu estado oxigenado (Voet *et al.*, 2000).

O deslizamento dos dímeros $\alpha_1\beta_2$, durante o processo de oxigenação, promove a liberação do 2,3 BPG, uma vez que se

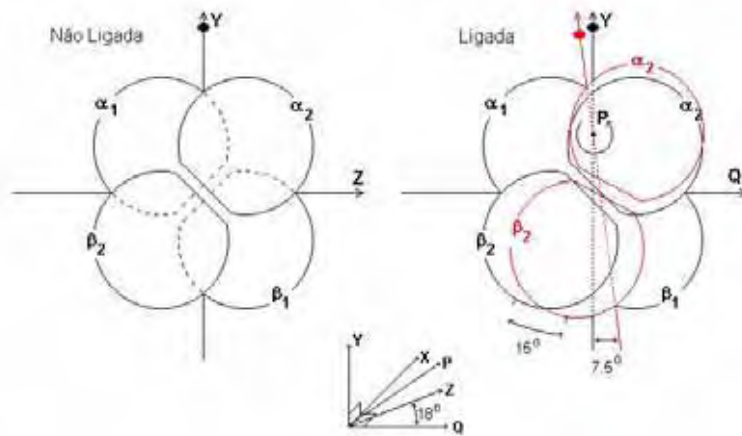


Figura 12. Representação esquemática da movimentação entre os dímeros ($\alpha\beta$) da hemoglobina. A figura mostra que há uma movimentação de 15° do dímero $\alpha_2\beta_2$ em relação ao dímero $\alpha_1\beta_1$ durante a oxigenação da hemoglobina (<http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/valmir/Tese/TeseESE2.php>)

Este resíduo de aminoácido estabelece contatos com Arg92(α), Val93(α), Asp94(α), Pro95(α) e Tyr140(α).

A substituição de um resíduo hidrofóbico por um carregado positivamente, e com uma cadeia lateral comprida, afeta significativamente a estabilidade da forma oxigenada, além de que existe o resíduo Arg92(α) muito próximo do local da mutação, o que resultará em uma repulsão entre as duas cargas positivas (Sharma *et al.*, 1980).

Experimentos de filtração em gel realizados com a hemoglobina Rothschild mostraram que, no estado desoxigenado, esta proteína assume predominantemente a conformação tetramérica. Na forma ligada, com O_2 ou CO, a hemoglobina Rothschild está quase completamente dissociada em dímeros, mesmo com a adição de IHP (Inositol Hexafosfato), que usualmente é capaz de impedir a dissociação de tetrâmeros em dímeros (Sharma *et al.*, 1980).

Estudos de ultracentrifugação mostraram que a hemoglobina Rothschild possui coeficiente de sedimentação de 2,7 S (Sharma *et al.*, 1980), indicando que

Gacon *et al.*, (1977)

identificaram uma Hb mutante natural denominada Hb Rothschild. Na hemoglobina Rothschild ocorre a substituição do resíduo Trp37(β) pela Arg. Estudos cristalográficos realizados por Perutz *et al.*, (1968) indicam que o resíduo Trp37(β) participa de contatos na interface

esta proteína, na forma oxigenada, está predominantemente na forma dimérica, uma vez que os coeficientes de sedimentação encontrados para a Hb A₀ tetramérica e dimérica são de 4,65 e 2,85 S, respectivamente (Edelstein *et al.*, 1970).

Kavanaugh *et al.*, (1992) determinaram a estrutura tridimensional da desoxi hemoglobina Rothschild a alta resolução (2,0Å). Eles observaram, sobrepondo as subunidades individualmente das Hb A₀ e hemoglobina Rothschild, na forma desoxigenada, que as mudanças na estrutura terciária estão restritas aos resíduos da interface $\alpha_1\beta_2$, com mudanças relativamente pequenas no sítio de mutação, mas com mudanças mais acentuadas ocorrendo ao longo da interface $\alpha_1\beta_2$, a partir do sítio de mutação, na porção FG da subunidade α , estendendo-se até a hélice G. A substituição Trp37(β) \Rightarrow Arg empurra os resíduos dessa hélice ao longo da interface e leva a subunidade α a girar aproximadamente 1°.

Um ponto a ser ressaltado como consequência desta substituição na hemoglobina Rothschild foi o surgimento de um sítio de ligação de Cloreto na interface $\alpha_1\beta_2$. Na hemoglobina nativa, o resíduo Trp37 está bloqueado na interface $\alpha_1\beta_2$, onde o seu nitrogênio indol forma uma ponte de hidrogênio com Asp94(α). Com a substituição do Trp 37 pela Arg, a interação com o Asp94(α) é mantida, mas um vazio é produzido com a eliminação da cadeia lateral do Trp. O íon Cloreto preenche este vazio e fornece um contra-íon para manter uma neutralidade elétrica local dentro da interface $\alpha_1\beta_2$ (Kavanaugh *et al.*, 1992).

Ponder & Richards, (1987) sugeriram que a cadeia lateral da Arg não pode ser acomodada adequadamente na interface $\alpha_1\beta_2$, de modo que esta tenha ângulos diedros (ϕ e Ψ) permitidos. Além de que, na forma oxigenada, a hemoglobina Rothschild “esconde” a cadeia lateral da Arg deixando-a sem um contra-íon, o que intensifica as forças de repulsão (Kavanaugh *et al.*, 1992).

Esta substituição afeta as propriedades funcionais de ligação de O₂ da hemoglobina Rothschild com acentuada diminuição da cooperatividade ($n_H=1,3$), em

relação à HbA ($n_H=2,8$). A afinidade por O_2 da hemoglobina Rothschild (4,28 mmHg) é maior do que a afinidade da Hb A₀ (9,16 mmHg), em tampão fosfato 0,1M pH 7,8, a 20°C.

Yanase *et al.*, (1994 e 95) expressaram duas hemoglobinas recombinantes com substituições na interface $\alpha_1\beta_2$, Asp99(β) \Rightarrow Lys e Asn102(β) \Rightarrow Ala, com o intuito de estudarem as conseqüências dessas substituições na transição entre as formas oxigenada e desoxigenada.

Utizando métodos de filtração em gel, ligação à haptoglobina e espalhamento de luz, os pesquisadores observaram que a Hb recombinante Asp99(β) \Rightarrow Lys possui um grau de dissociação mais elevado, tanto na forma desoxigenada quanto na oxigenada, em relação à Hb A₀.

A porcentagem de dímeros na desoxi-hemoglobina recombinante foi de 71% e para a desoxi-hemoglobina humana foi de 19%. Na forma oxigenada, a porcentagem de dímeros foi de 72% para a hemoglobina recombinante, enquanto que para a hemoglobina humana foi de 69%, em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0, em temperatura ambiente e $[Hb]=2\mu M$ (Yanase *et al.*, 1994).

O comportamento de dissociação da hemoglobina recombinante Asn102(β) \Rightarrow Ala, analisado pela ligação à haptoglobina, foi muito semelhante ao da Hb A₀, onde ambas apresentaram 14% de dímeros, na forma desoxigenada. Na forma oxigenada, a hemoglobina recombinante apresentou 67% de dímeros e a HbA₀ 74%, todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato de potássio pH 7,0, em temperatura ambiente e $[Hb]=0,5\mu M$ (Yanase *et al.*, 1995).

Estes resultados indicam que a substituição de Asp99(β) \Rightarrow Lys promove a desestabilização da interface $\alpha_1\beta_2$ com conseqüente aumento do grau de dissociação dessa hemoglobina recombinante, já que o resíduo de lisina possui uma cadeia lateral longa e com carga positiva, ao contrário do ácido aspártico, que possui uma cadeia lateral menor e é carregado negativamente (Yanase *et al.*, 1995).

Corroborando com esta hipótese, a hemoglobina recombinante Asn102(β) \Rightarrow Ala, indica que a substituição do resíduo de asparagina por alanina preserva a integridade da interface $\alpha_1\beta_2$, uma vez que desoxi-hemoglobina mutante apresenta a mesma porcentagem de dímeros que a desoxi-hemoglobina humana.

Shih *et al.*, (1985) estudaram as propriedades de ligação de O₂ de quatro hemoglobinas humana variantes, todas elas com substituição no resíduo Glu101 (β): Hb Rush (Gln), Hb British Columbia (Lys), Hb Alberta (Gly) e Hb Potomac (Asp). O resíduo Glu101(β) está localizado entre os resíduos 99(β) e 102(β), na interface $\alpha_1\beta_2$.

Os autores observaram que estas substituições de aminoácidos influenciam na afinidade de ligação do O₂ em relação a Hb A₀. No entanto, estas mutações não influenciam drasticamente a constante de dissociação destas hemoglobinas variantes, como pode ser visto na tabela 1.

A exceção é a Hb British Columbia (Lys), a qual possui alta afinidade por O₂, em relação Hb A₀ e as demais hemoglobinas variantes, comportamento que pode ser explicado pela sua maior propensão em formar dímeros ($\alpha\beta$), devido à presença do resíduo de Lys na interface dimérica, como discutido acima para a hemoglobina recombinante Asp99(β) \Rightarrow Lys.

Tabela 1. Tabela ilustrando os parâmetros funcionais associados com a constante de dissociação tetrâmero-dímero da Hb A₀ e das hemoglobinas mutantes. Os experimentos foram realizados em tampão bis-Tris 0,05M pH 7,4 a 25°C. Tabela retirada de Shih *et al.*, (1985).

	Hb A ₀ (Glu)	Hb Alberta (Gly)	Hb British Columbia (Lys)	Hb Rush (Gln)
P ₅₀ (mmHg)	5,1	0,86	2,1	6,2
n _H	2,7	2,0	2,3	2,8
Constante de dissociação (M)	6x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁶

Em outro estudo, analisou-se a Hb Yakima, que é uma hemoglobina variante, esta Hb apresenta uma substituição no mesmo sítio da Hb recombinante Asp99(β) \Rightarrow Lys, contudo em vez de um resíduo de Lys, esta apresenta um resíduo de His. Os dados de avaliação do grau de dissociação dessa Hb mostraram que ela está na conformação tetramérica e que, na verdade, é menos dissociável em relação à Hb A (Benesch & Kwong, 1995; Turner *et al.*, 1992).

Sugere-se que o tamanho relativo das cadeias laterais dos aminoácidos, em questão, seja responsável pelo comportamento atípico de dissociação entre estas Hbs (Manning *et al.*, 1996).

A hemoglobina fetal (Hb F) é composta por duas cadeias α e duas γ . Sabe-se que a Hb F possui interações diferentes entre seus pares de dímeros em relação à Hb A. A principal característica dessa diferença é a baixa interação do 2,3-Bifosfoglicerato (2,3-BPG) com a Hb F (Wind *et al.*, 1976), devido a substituição do resíduo His 143(β) por serina, ocasionando a diminuição do número de cargas positivas no sítio de ligação do 2,3-bifosfoglicerato (Perutz, 1970; Arnone, 1972).

Dumoulin *et al.*, (1997) realizaram a substituição Glu 43 da Hb A para Asp 43 da Hb F, uma vez que esta Hb dissocia-se cerca de 70 vezes menos do que a Hb A. A Hb recombinante, denominada Hb A/F, mostrou propriedades de dissociação do tetrâmero e resposta ao 2,3-BPG que foram intermediárias entre as Hbs A e F, indicando que outros aminoácidos em locais diferentes da seqüência podem ter uma função no controle da interface dimérica.

A acetilação do N-terminal também influencia a taxa de dissociação de Hbs, no sentido de aumentá-la. Na hemoglobina fetal humana ocorre uma forma não acetilada (Hb F₀ ou simplesmente Hb F) e outra acetilada (Hb F₁). A Hb F₁ difere-se da Hb F por possuir uma maior propensão a dissociar-se em dímeros, assemelhando-se à Hb A₀ (Dumoulin *et al.*, 1997).

Sugere-se que este comportamento da Hb F₁ é devido a presença do grupo N-acetil no fim da cavidade central, enfraquecendo os contatos entre os pares de dímeros no tetrâmero, como consequência da falta das duas cargas positivas dos grupos –terminais.

Gershey *et al.*, (1968) sugerem que a acetilação pode representar um mecanismo geral de desestabilização das interações entre proteína-proteína ou proteína-ácido nucléico.

I. h. Hemoglobinas de Animais

As hemoglobinas de répteis possuem características de ligação de O₂ e cooperatividade bem diferentes das Hbs de mamíferos (Perutz, 1983).

Focesi *et al.*, (1987) estudaram as frações purificadas da serpente semi-aquática *Liophis miliaris*. Neste trabalho, o hemolisado total, quando submetido a uma cromatografia de troca catiônica (CM-celulose) com gradiente de pH 6 - 8,5, mostra ser constituído de duas frações, uma fração que elui rapidamente, denominada fração I (com ponto isoelétrico abaixo da fração II) e a segunda fração que só elui com o aumento do pH do gradiente, denominada fração II (com ponto isoelétrico em torno de 8,1). A fração I que elui em pH baixo foi considerada como a forma tetramérica e a fração II como a forma dimérica do sangue de *Liophis miliaris*.

Estes dados foram sustentados por determinações de massa molecular por filtração em gel e dados das propriedades das ligações de O₂ destas frações. Os dados mostravam que na forma *stripped* a Hb de *L.miliaris* apresentava alta afinidade por O₂ (P₅₀ ≈ 1mmHg, em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 7,5 a 25°C), ausência de cooperatividade (nH ≈ 1,0, nas mesmas condições experimentais

descritas para a P_{50}) e de efeito Bohr, o que para os pesquisadores caracterizaria o estado dimérico da Hb (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987).

Na presença de fosfatos orgânicos, o comportamento da Hb de *L. miliaris* se alterava. O processo cooperativo tornava-se evidente e a afinidade por O_2 diminuía (Focesi *et al.*, 1987). De uma forma geral, a forma tetramérica só seria evidente na presença de fosfatos orgânicos e pH abaixo de 8. A forma dimérica seria predominante em pH 8 ou maior, tanto na forma *stripped* como na presença de fosfatos orgânicos (Focesi *et al.*, 1992).

Uma possível explicação estrutural para a formação desses dímeros foi elaborada por Matsuura *et al.*, (1989) e Padovan, (1996). Eles mostraram, analisando a seqüência primária das cadeias α e β de *L. miliaris*, que vários resíduos de aminoácidos estavam substituídos na Hb da serpente semi-aquática em relação à hemoglobina humana.

Contudo, duas substituições foram consideradas alterações chaves no processo de formação dos dímeros, são elas: Glu CD2(43) $\beta_2 \Rightarrow$ Ser e Glu CD2(43) $\beta_1 \Rightarrow$ Thr. Esses dois resíduos de Glu seriam, na opinião daqueles autores, importantes na estabilização da interface $\alpha_1\beta_2$, pois realizam pontes de hidrogênio com o grupo guanidina Arg FG4(92) α . Com as substituições ocorreria a desestabilização do tetrâmero e dissociação em dímeros (Matsuura *et al.*, 1989; Padovan, 1996).

Embora ocorram várias substituições na interface $\alpha_1\beta_1$ (em relação à Hb humana) entre elas: Leu G13(106) $\alpha_1 \Rightarrow$ His; Pro GH2(114) $\alpha_1 \Rightarrow$ Arg; Pro H3(125) $\beta_1 \Rightarrow$ Asn; Val B15(33) $\beta_1 \Rightarrow$ Ile, as conseqüências para as propriedades alostéricas são muito menores que as derivadas das substituições na interface $\alpha_1\beta_2$. Uma substituição na interface $\alpha_1\beta_2$ pode alterar drasticamente o mecanismo de cooperatividade e afinidade por O_2 (Padovan, 1996).

Chiancone *et al.*, (1981) purificaram duas frações de hemoglobina do molusco *Scapharca inaequivalvis* denominadas Hb-I (homodimérica) e Hb-II (heterotetramérica). Ambas apresentam processo cooperativo de ligação de O₂, no entanto, bem diferente do apresentado pelas Hbs tetraméricas de vertebrados.

Royer *et al.*, (1990) mostraram que a interface da Hb homodimérica é formada pelas hélices E e F, de modo que seus dois grupos heme estão em contato direto via seus grupos ácidos propiônicos, através de um conjunto de 17 moléculas de água ordenadas simetricamente (Royer *et al.*, 1996, 97).

A ligação do O₂ ao grupo heme faz com que o átomo de ferro se desloque para o plano da porfirina, como nas Hbs de vertebrados. Mudanças associadas à forma do heme pressionam o resíduo Phe 97 para fora da cavidade do heme na interface, levando este resíduo de aminoácido a entrar em contato com a outra subunidade.

Essas mudanças rompem o ordenamento das 17 moléculas de água e 6 são liberadas. Os hemes movem-se para mais longe na cavidade, de modo que os grupos propiônicos de cada subunidade movem-se ao longo de outra subunidade. Estas mudanças locais na cavidade do heme e na interface adjacente são os processos responsáveis pela ligação cooperativa de O₂. Este mecanismo também é conhecido como processo de dissociação induzido pelo ligante (Royer *et al.*, 1996; Riggs, 1998).

A estrutura tridimensional da Hb heterotetramérica de *Scapharca* mostra que a estrutura do heterodímero dentro do arranjo tetramérico é muito similar àquele da Hb homodimérica (Royer *et al.*, 1995).

Ainda entre os invertebrados, as Hbs de *Caudina arenicula* (equinodermata), são diméricas quando oxigenadas e tetraméricas quando desoxigenadas. Estas Hbs também apresentam cooperatividade de ligação de O₂, como nas Hbs de *Scapharca*,

e o processo responsável por isso também é a dissociação induzida pelo ligante (Mitchell *et al.*, 1995).

As lampréias e peixes bruxas, que são os mais primitivos vertebrados vivos, também apresentam Hbs que se dissociam. As Hbs de lampréia são monoméricas em pH 7 quando no estado oxigenado e se auto-associam a dímeros e tetrâmeros na forma desoxigenada (Dohi *et al.*, 1973).

A área de contato do dímero na interface, na forma desoxigenada das Hbs de lampréia, é composta por quatro resíduos de aminoácidos da “dobra” AB e 5 resíduos de aminoácidos da hélice E (cadeias laterais Tyr30, Glu31, Arg71, Glu75 e o grupo carbonila da Ser28) de cada subunidade e são estabilizadas por pontes de hidrogênio e por interações de van der Waals com as cadeias laterais de Trp72 e Asn79. A substituição da Tyr30 para Phe é o suficiente para inibir a formação de dímeros em uma Hb recombinante de lampréia (Qiu *et al.*, 2000).

Fago *et al.*, (2001) purificaram e caracterizaram três componentes (Hb-I, Hb-II e Hb-III) do sangue de peixe-bruxa (*Myxine glutinosa*) e encontraram algumas similaridades entre as Hbs de lampréia e peixe-bruxa.

Os pesquisadores observaram que estes componentes são capazes de interagir entre si formando homo e hetero-oligômeros. Contudo, nem todas as combinações de associação entre eles são permitidas. Somente a Hb-II é capaz de se auto-associar e se combinar com Hb-I e Hb-III. As frações Hb-I e Hb-III não se combinam.

Estudos de ultracentrifugação mostraram que a Hb-I e Hb-III são monoméricas tanto na forma oxigenada quanto na forma desoxigenada. A análise da sequência de aminoácidos revela que a substituição de Arg71 \Rightarrow Lys tanto na Hb-I quanto na Hb-III e Glu75 \Rightarrow Ser na Hb-I, pode da mesma maneira (como na Hb recombinante de lampréia) impedir a formação de dímeros na forma desoxigenada.

A substituição His(distal)73 \Rightarrow Gln impede a formação de dímeros na forma desoxigenada de lampréias e peixes-bruxas, que ocorre de forma natural nas Hb-I

e Hb-III do peixe-bruxa (Fago *et al.*, 2001). Na Hb recombinante de lampréia esta substituição inibe a auto-associação em pHs neutro e levemente ácidos (Qiu *et al.*, 2000).

II. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho, envolvendo hemoglobinas de várias espécies de serpentes, é:

Realizar a análise criteriosa da existência ou não de transição dímero-tetrâmero, através da determinação da constante de associação dímero-tetrâmero para a forma ligada, em diferentes pH.

Os objetivos específicos deste trabalho, são:

1. Caracterizar as propriedades funcionais de ligação de O₂ das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* e *Helicops modestus*, do ponto de vista alostérico: 1- efeito de fosfatos, 2- cloreto, 3- prótons.

2. Determinar através do método de estresse osmótico, o número diferencial de moléculas de água ligadas entre as formas desoxigenada e oxigenada das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris*. Com o intuito de investigarmos possíveis mudanças conformacionais, pela ligação de O₂ e de efetores alostéricos como cloreto e ATP.

3. Utilizar o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) como forma de se investigar a estrutura quaternária em solução.

4. Fazer a modelagem molecular da hemoglobina de *Liophis miliaris*, a fim de se realizar uma análise estrutural com o intuito de se investigar a proposição da existência ou não de dissociação.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.a. Obtenção dos Espécimes e Coleta do Sangue

No início do projeto, os espécimes de *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel, figura 13) e *Liophis miliaris* (Cobra d'água, figura 14) foram fornecidos pelo Instituto Butantan - S.P.. No entanto, um ano depois enfrentamos dificuldades para a obtenção de exemplares impostas pelo IBAMA. Durante este período, para obtermos exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Boa constrictor* (Jibóia, figura 15) contamos com a ajuda do Departamento de Zoologia deste câmpus, na figura do Prof. Dr. Arif Cais, quem sempre esteve disponível para nos ajudar.

Nesse período, o Bosque de São José do Rio Preto, que gentilmente nos cedeu exemplares de *Crotalus durissus terrificus*. Nos últimos meses do projeto, o Instituto Butantan nos cedeu dois exemplares de *Liophis miliaris*. Os espécimes de *Helicops modestus* (cobra d'água, figura 16) foram capturados em um lago dentro de um condomínio em São José do Rio Preto.

Para a coleta do sangue, todos os animais foram devidamente anestesiados com éter etílico. Posteriormente, com o auxílio de um bisturi, fizemos um corte na porção ventral do corpo do animal e, em seguida, com uma seringa, fizemos punção direta da aorta.

O sangue foi colocado em tubos contendo solução salina tamponada (Tris-HCl 50mM pH 8,0, 0,9% NaCl, 0,2% glicose e EDTA 1mM), com o intuito de não permitir o rompimento das hemáceas. Fizemos no mínimo três lavagens do sangue coletado em centrífuga Incibrás a 290 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, promovemos a hemólise em tampão Tris-HCl 50mM pH 9,2 (Tampão de hemólise); esta solução, com o hemolisado total, foi submetida a centrifugação por 90 minutos

a 1.162 x g em centrífuga Incibrás refrigerada a 4°C, para a retirada de material celular.

Posteriormente, concentramos o sobrenadante na mesma centrífuga a 653 x g a 4°C, utilizando concentradores Centriprep 50 (Amicon). As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido (-180°C) até sua utilização.

III.b. Procedimento de Purificação

O hemolisado de cascavel foi primeiramente aplicado a uma coluna 2,6 x 22cm (Bio-Rad) de filtração em gel preenchida com Sephadex G-25 (Sigma), para exclusão de moléculas de baixa massa molecular (entre 100-5.000 Da). Em seguida, aplicamos o hemolisado total a uma coluna de dimensões iguais a descrita acima, a qual foi preenchida com Sephacryl S-100 HR(Sigma), com o intuito de se excluir do hemolisado proteínas de massa molecular acima e abaixo da hemoglobina.

Ambas colunas foram equilibradas com tampão Tris-HCl 50mM pH 9,2. Adicionamos à coluna com Sephacryl S-100 cloreto de sódio 0,2M, para inibir a adsorção de amostra à resina. Na coluna contendo Sephadex G-25 adicionamos cloreto de sódio 20mM, com o mesmo propósito.

Por fim, o hemolisado foi submetido a uma coluna 2,6 x 22cm (Sigma) de troca aniônica (DEAE *Sepharose Fast Flow* (Pharmacia)). A coluna foi equilibrada com tampão TRIS-HCl 50mM pH 9,2 e a eluição da amostra foi feita com gradiente salino de 0 a 50mM de NaCl.

Amostras de sangue das outras espécies (*Boa*, *Liophis* e *Helicops*) foram submetidas somente a passagem nas colunas de filtração em gel. Tentamos várias vezes fazer o isolamento de frações de Hb presentes no sangue destas espécies, utilizando cromatografia de troca iônica, no entanto, sem sucesso.



Figura 13. Foto de uma *Crotalus durissus terrificus*, conhecida popularmente como Cascavel. Figura retirada de <http://www.fauacps.cnpm.embrapa.br/reptil/cascavel.html>



Figura 14. Foto da serpente semi-aquática *Liophis miliaris*, conhecida popularmente como cobra d'água. Figura retirada de <http://www.butantan.gov.br/museu>



Figura 15. Foto de uma *Boa constrictor*, cujo nome popular é Jibóia. Figura retirada de <http://home.wanadoo.nl/d.vandorp/slangennamen.htm>



Figura 16. Foto da serpente *Helicops modestus*, também conhecida popularmente como cobra d'água. <http://www.butantan.gov.br/museu>

III.c. Verificação da Pureza da Amostra

Para constatação da pureza da amostra cromatografada foi elaborada uma focalização isoelétrica em gel de agarose, que proporciona uma excelente resolução das frações do hemolisado total pelos seus pontos isoelétricos (pI).

Para a confecção do gel pesamos 0,22g de agarose em Erlenmeyer de 50mL e adicionamos a esta 13,2mL de água bidestilada. Em seguida, colocamos o

erlemeyer em banho maria para que a agarose se dissolvesse (± 3 minutos a 100°C). Após a dissolução da agarose, acrescentamos à solução os anfólitos nas seguintes proporções: 0,8mL de anfólito (faixa de pH 3-10) e 0,8mL de anfólito (faixa de pH 8-10,5).

Posteriormente, a solução foi rapidamente distribuída sobre uma placa de vidro (5 x 7cm) que suporta 5mL de gel. Em poucos segundos o gel solidificou-se e, então, foi colocado nas extremidades da placa contendo o gel, duas tiras de papel de filtro (5x 0,5cm, com 1mm de espessura) embebidas em uma com solução de NaOH 1M (extremidade catódica) e outra solução de H_3PO_4 1M (extremidade anódica).

A seguir, colocamos a placa numa caixa de isopor contendo gelo no seu interior, para dissipação do calor, e sobre a placa, colocamos uma tampa de acrílico com os eletrodos sobre as tiras, permitindo assim a passagem de corrente elétrica pelo gel de agarose. Esta etapa é chamada de pré-focalização. Durante a pré-focalização foi aplicado uma corrente de 5mA por 10-15 minutos, a fim de que os anfólitos se distribuam pelo gel, formando o gradiente de pH.

Durante a pré-focalização preparamos tiras de 1mm de espessura, medindo 1 x 5cm cada uma, nas quais aplicamos a amostra de Hb. Após a pré-focalização, retiramos a placa com os eletrodos e colocamos as tiras embebidas com solução de Hb no meio do gel, durante o processo de transferência da amostra, da fita para o gel, mantivemos a corrente de 5mA constante, o tempo de transferência é variável, sendo analisado visualmente. Após uma razoável transferência da amostra, elevamos a corrente elétrica para 8mA constante, iniciando a corrida de aproximadamente 40 minutos.

No fim da corrida, fixamos o gel com TCA 20% (Ácido Tricloroacético) por três minutos e, em seguida, cobrimos o mesmo com papel de filtro para secagem. Se

necessário, após uma boa desidratação do gel, é feita a coloração com Ponceau ou Negro de Amido.

III.d. Estudo das Propriedades Funcionais de Ligação de O_2

Os experimentos para determinarmos as características funcionais de ligação de O_2 da hemoglobinas foram realizados dissolvendo a Hb concentrada em tampão apropriado. Utilizamos tampão Tris-HCl 50mM (para pH acima de 8,0) e ADA-NaOH 50mM (para os pH 7,0 e 7,5). A concentração final da hemoglobina nestes experimentos foi de $60\mu\text{M}/\text{heme}$. Realizamos as análises na ausência (forma stripped) e na presença de efetores alostéricos (cloreto e ATP).

O método experimental utilizado foi o espectrofotométrico - tonométrico

(Giardina & Amiconi, 1981), o qual se baseia nas mudanças espectrais que ocorrem durante a transição entre as formas desoxigenada e oxigenada (Figura 17).

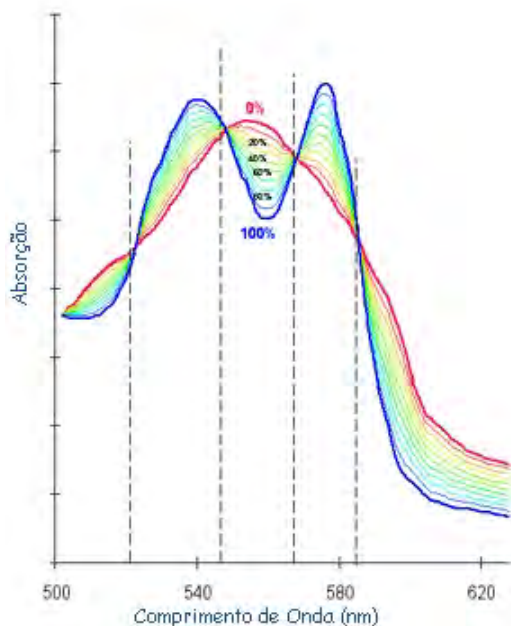


Figura 17. Diferença entre os espectros das formas desoxigenada (linha vermelha) e oxigenada (linha azul). As linhas tracejadas indicam os pontos isobésticos

Antes de iniciarmos a desoxigenação da Hemoglobina, fizemos uma leitura da absorvância da oxi-hemoglobina inicial, dados utilizados para os cálculos de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_{50} .

Em seguida, iniciamos a desoxigenação da Hemoglobina passando nitrogênio

umidificado pelo tonômetro (figura 18).

Devido à alta afinidade de várias hemoglobinas, foi necessário que fizéssemos

também vácuo (com uma bomba de vácuo) no tonômetro, para auxiliar na desoxigenação da amostra.



Figura 18. Tonômetro de vidro, usado para os experimentos de caracterização funcional das hemoglobinas de serpentes.

Após a desoxigenação da amostra, que inicialmente foi avaliada visualmente, colocamos o tonômetro em banho com temperatura controlada e, após sete minutos, fizemos a avaliação do grau de desoxigenação da solução de acordo com a proposta de Benesch & Benesch, (1965):

$$\frac{Abs_{555}}{Abs_{540}} \geq 1,24$$

tonômetro em banho com temperatura controlada e, após sete minutos, fizemos a

avaliação do grau de desoxigenação da solução de acordo com a proposta de Benesch & Benesch,

(1965):

Eq. 9

onde Abs 555 e 540 nanômetros são os coeficientes de absorvidade das formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente. Esta relação indica a desoxigenação; se o índice obtido for igual ou maior que 1,24 iniciamos a fase seguinte. A obtenção da forma desoxigenada não pode ser um processo lento, pois pode ocorrer a formação de meta-hemoglobina, o que prejudicaria todo o experimento.

Obtido um bom índice, fizemos a leitura de absorbância da forma desoxigenada e, então, iniciamos a adição de quantidades conhecidas de oxigênio no tonômetro, com uma seringa.

Entre uma adição e outra esperávamos no mínimo sete minutos para a leitura das absorbâncias, que foram realizadas em: 630, 690, 576, 569, 560 e 541nm. Este tempo foi necessário para permitir o total equilíbrio entre a fase gasosa e a solução.

As leituras em 576, 560 e 541nm, foram usadas para o cálculo da saturação fracional Y de acordo com a seguinte equação:

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

Eq. 10

onde λ é o comprimento de onda, A^λ é a leitura de absorvância da amostra, A_0^λ e A_{100}^λ as absorvâncias das formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente. Como fizemos leituras em 3 comprimentos de onda, consideramos a variação total de absorvância entre oxi e desoxi-hemoglobina:

$$\Delta A_{REF} = (A_{100}^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_{100}^{560}) + (A_{100}^{576} - A_0^{576}) \quad \text{Eq. 11}$$

como referencial (ΔA_{REF}).

Após cada adição “i”, foi feita a leitura de absorvância na amostra equilibrada permitindo calcular a saturação:

$$Y = \frac{(A_i^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_i^{560}) + (A_i^{576} - A_0^{576})}{\Delta A_{REF}} \quad \text{Eq. 12}$$

As leituras de absorvância em 569nm (ponto isobéstico) permitiram corrigir as medições espectrais.

Por sua vez, a pO_2 (pressão parcial de oxigênio) foi calculada pela equação 13 (Giardina & Amiconi, 1981) modificada por Bonaventura³:

$$pO_2 = \frac{(O_2 * \frac{TB}{TA}) * (PBC - (PV * UR))}{VT - VA} * VI \quad \text{Eq.13}$$

onde pO_2 (mmHg): é a pressão parcial de oxigênio. O_2 é a fração do gás na atmosfera (0,21), PBC é a pressão atmosférica corrigida (mmHg) (no anexo 1 consta o procedimento para correção da pressão barométrica), PV é a pressão de vapor de água (anexo2), UR é a umidade relativa (%), VT é o volume do tonômetro (mL), VA é o volume de amostra (mL), VI é o volume de ar injetado (mL), TB é a temperatura do banho (°C) e TA é a temperatura ambiente (°C).

³Esta modificação constitui protocolo experimental padrão do laboratório do Prof. Joseph Bonaventura (Duke University, Beaufort, NC,EUA).

As adições prosseguiram até que se alcançasse elevados níveis de saturação. Por fim, o tonômetro era aberto para que fizéssemos a leitura da oxi-hemoglobina final (100% saturada após o experimento).

Posteriormente, os valores de absorbância obtidos eram digitados em um programa que mostra a representação gráfica de Hill e executa os cálculos de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_H , pelos procedimentos antes descritos. Após cada experimento, a quantidade de meta-hemoglobina inicial e final foram quantificados de acordo com o procedimento mostrado a seguir. Os dados experimentais com mais de 5% de meta-hemoglobina inicial ou final foram descartados.

III.e. Cálculo da Concentração de Oxi-hemoglobina e Meta-hemoglobina

A determinação da concentração da oxi e meta-hemoglobina foi realizada utilizando as leituras em 576 e 630 nm, com coeficientes de extinção (ϵ_{576}^{meta} , ϵ_{576}^{oxi} , ϵ_{630}^{meta} e ϵ_{630}^{oxi}) determinados para a hemoglobina humana (Benesch *et al.*, 1973) (anexo 3).

O cálculo da concentração de meta-hemoglobina foi obtido determinando as absorvâncias em 576 e 630 nm para depois correlacioná-las com seus respectivos coeficientes de extinção na seguinte equação:

$$\text{Abs}_{576} = [\text{oxiHb}] \cdot \epsilon_{576}^{oxi} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{576}^{meta} \quad \text{Eq. 14}$$

$$\text{Abs}_{630} = [\text{oxiHb}] \cdot \epsilon_{630}^{oxi} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{630}^{meta} \quad \text{Eq. 15}$$

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

$$DET = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & \epsilon_{576}^{meta} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} \quad \text{Eq. 16}$$

$$[metaHb] = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & Abs_{576} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & Abs_{630} \end{vmatrix} / DET \quad \text{Eq. 17}$$

$$[oxiHb] = \begin{vmatrix} Abs_{576} & \epsilon_{576}^{meta} \\ Abs_{630} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} / DET \quad \text{Eq. 18}$$

_____ Como no caso da meta-hemoglobina os coeficientes ϵ variam com o pH, usamos os valores de acordo com a condição experimental (anexo 3).

III.f. O Efeito da atividade de Água na Ligação de O₂

O método utilizado para avaliar a variação de hidratação das hemoglobinas de serpentes foi o método de estresse osmótico (Colombo *et al.*, 1992), que consiste em usar solutos neutros, que são excluídos da superfície da molécula, e diminuem a atividade de água em solução.

Basicamente, estes experimentos seguem o esquema utilizado no item III.d. Utilizamos o método espectrofotométrico - tonométrico (Giardina & Amiconi, 1981) e realizamos os mesmos preparativos. A concentração de hemoglobina utilizada no experimento também foi de 60 μ M/heme.

Preparamos uma solução estoque que possui 32% de sacarose (soluto neutro), dissolvida no tampão que será utilizado. Conforme o experimento a ser realizado esta solução estoque é diluída em diferentes porcentagens com o mesmo tampão.

Realizamos os experimentos primeiramente sem soluto neutro, para a obtenção de dados na ausência desta substância e, em seguida, adicionamos diversas proporções de sacarose.

Ao final dos experimentos, os dados de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_{50} foram obtidos como descrito no item III.d. Antes disso, para cada amostra foi realizada a medida de osmolalidade da solução (Osmoles/Kg) em osmômetro “Osmomette A” modelo #5002 - PRECISION SYSTEMS INC. A relação entre a osmolalidade e a atividade de água da solução é dada por:

$$\ln(a_w) = \frac{-\text{Osmolalidade}}{55,55} \quad \text{Eq. 19}$$

onde 55,55 é a molaridade da água pura.

Como proposto por Colombo *et al.*, (1992) o efeito de solvatação pode ser determinado quantitativamente em termos do número diferencial de moléculas de água ligadas entre as formas desoxi e oxigenadas, através da utilização da equação de *linkage* proposta por Wyman (Wyman, 1964).

A equação de *linkage* que determina o número diferencial de moléculas de um ligante L que se liga à Hb com ligação de oxigênio é expressa da seguinte forma:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{n_L^{oxi} - n_L^{desoxi}}{4} \quad \text{Eq. 20}$$

onde P_{50} tem o significado antes citado; a_L é a atividade de ligante L, a_i corresponde a atividade de outros ligantes que não L; Δn_L é o número diferencial de moléculas

de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb e 4 é o número de sítios de ligação de O₂ existentes na proteína. 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. Quando o ligante alostérico L é a água, esta relação pode ser escrita como:

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{n_w^{oxi} - n_w^{desoxi}}{4} = \frac{\Delta n_w}{4} \quad \text{Eq. 21}$$

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, Δn_w é o número diferencial de moléculas de água ligadas no estado totalmente oxigenado em relação ao totalmente desoxigenado.

A partir de um gráfico do $\ln P_{50}$ versus $\ln (a_w)$ é feita uma regressão linear, cuja inclinação fornece o número de moléculas de água que se ligam à Hb por subunidade com a oxigenação completa (Colombo *et al.*, 1992).

As inclinações obtidas por regressão linear foram analisadas estatisticamente aos pares usando a análise de covariância de acordo com Zar (1999) usando o programa “Prism” (GraphPad, E.U.A.). Testamos as inclinações contra a hipótese nula (H_0), de que as mesmas não seriam diferentes entre si. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

III.g. Titulação com ATP

Determinamos as constantes de associação com ATP na ausência e na presença de ATP, utilizando rotina para estimativa não linear de parâmetros do programa Sigma Plot versão 7.0, de acordo com o modelo abaixo. O efeito do ATP sobre a afinidade por O₂ foi analisado pelo método espectrofotométrico-tonométrico (Giardina & Amiconi, 1981).

$$\log(P_{50})_p = \log(P_{50})_a + \frac{1}{4} \log\left(\frac{1 + K_D[X]}{1 + K_O[X]}\right) \quad \text{Eq. 22}$$

onde $\log(P_{50})_p$ é a medida na presença de ATP, $\log(P_{50})_a$ na sua ausência, K_D e K_O , são as constantes de associação às formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente, e X é a concentração molar de ATP livre.

III.h. Determinação da Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado (4K_2)

Utilizamos a técnica de cromatografia de Filtração em Gel para a determinação da constante de associação dímero-tetrâmero do estado ligado (4K_2), proposta por Ackers (1975). Uma coluna de 1 x 20cm (Pharmacia) foi preenchida com Sephadex G-75 (Sigma) e equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. A resina cromatográfica Sephadex G-75, nos permite isolar proteínas com massas moleculares entre 3.000 - 80.000 Da.

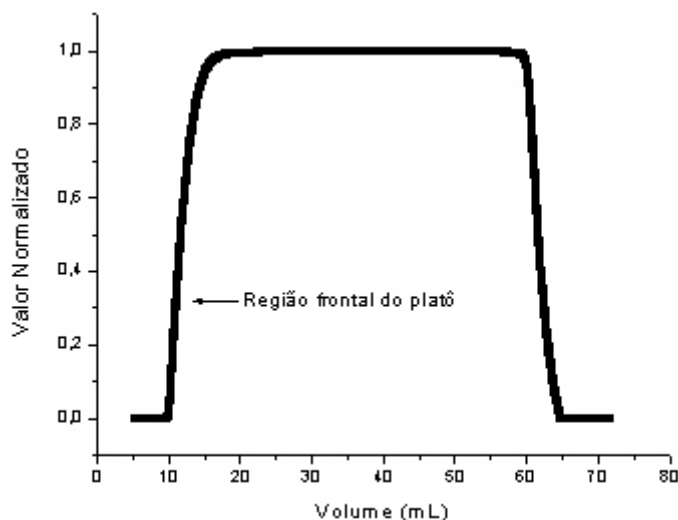


Figura 19. Exemplo de um perfil de eluição total da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. Como padrões, para calibragem da coluna, passamos: 1- Mioglobina de coração de cavalo M.M. 16.800 (Sigma M-1882), 2- Anidrase Carbônica M.M. 29.000 (Sigma C-4831), 3- Azul Dextran M.M. 2.000.000 (Sigma D-5751), Glicil Glicina M.M. 168,5 (Sigma G-1127) e ATP M.M. 551, 1 (Sigma A-2383).

Aplicamos também a hemoglobina de matrinxã (*Brycon cephalus*) em duas concentrações. Este método já foi empregado por Colombo e Bonilla-Rodriguez (1995 a,b) para estudar o

Para obtenção da constante de associação dímero - tetrâmero do estado ligado (4K_2) aplicamos as seguintes amostras estabilizadas com monóxido de carbono em volumes saturantes: 1- Hb humana A₀, 2- hemolisado de Urutu (*Bothrops alternatus*), 3- Hb da cobra d'água (*Helicops*

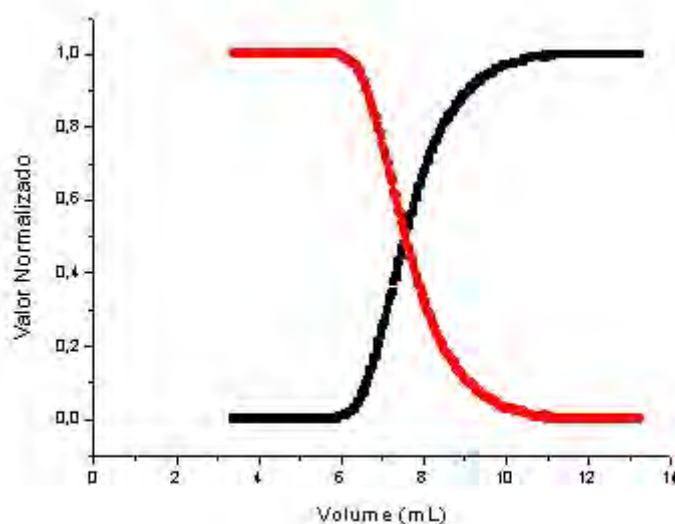


Figura 20. Curva transformada (1-valor normalizado) em vermelho, criada para cálculo do volume de eluição.

efeito da atividade de água sobre a dissociação de hemoglobina humana. Aplicamos

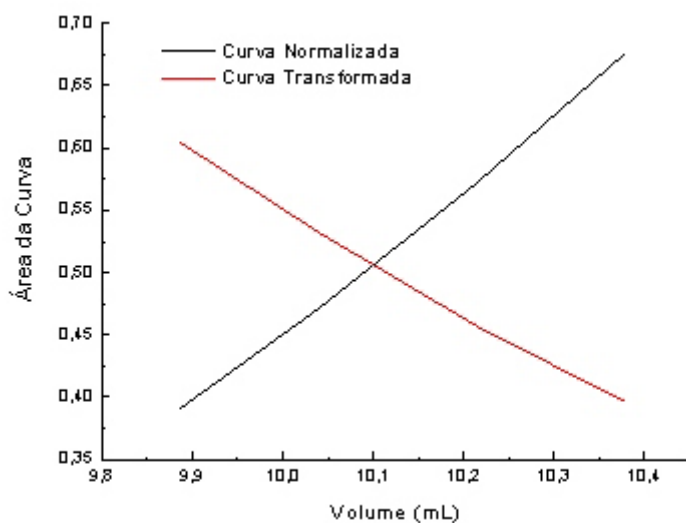


Figura 21. Gráfico ilustrando a relação entre o volume de eluição e a área calculada para cada curva (normalizada e transformada). O ponto onde as retas se cruzam é o centróide, ou seja, é o volume de eluição correspondente a uma determinada concentração da amostra.

as amostras com auxílio de bomba peristáltica (Pharmacia P-1) com fluxo constante de 12,0mL/h.

A amostra passava por uma cela de fluxo, acoplada em espectrofotômetro Cary 100 (Varian) e as leituras de absorbância foram

continuamente registradas em 280, 541 ou 412 nm, dependendo da proteína e sua

concentração. Os

experimentos foram executados na faixa de concentração de 60 a 1 μ M/heme e temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

O eluente foi coletado em provetas, as quais foram devidamente pesadas antes e depois dos experimentos, para que se determinasse precisamente o fluxo após cada experimento, conforme recomendação de Nenortas & Beckett (1994).

Os dados foram exportados em formato ASCII e tratados em um programa gráfico (Origin versão 6.0), onde o volume de eluição correspondente a região frontal do platô obtido foi calculado por integração da área acima e abaixo da curva normalizada entre 0 e 1 (figura 19).

O cálculo da curva acima do platô foi obtido usando uma segunda curva transformada da original (1-valor normalizado) (figura 20). Com este gráfico calculamos a área acima e abaixo da curva, obtendo-se o volume de cada área calculada. A partir do gráfico dos dados de volume pelas áreas calculadas, foi obtido o volume do centróide (figura 21).

O coeficiente de partição sigma (σ) é um parâmetro que expressa como uma molécula se comporta numa cromatografia de exclusão molecular. Este parâmetro é proporcional ao grau de interação da molécula com a malha da resina. O sigma pode ser calculado pela fórmula (Ackers, 1975):

$$\sigma = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad \text{Eq. 23}$$

onde V_e é o volume de eluição da molécula, V_0 é o volume de exclusão (medido pela passagem de azul dextran) e V_i é o volume interno (obtido pela passagem de glicil glicina ou ATP). V_0 e V_i representam os extremos de “não interação” e “interação completa” com a resina, que corresponde aos valores limites de sigma de 0 a 1, respectivamente.

Utilizamos a anidrase carbônica como padrão próximo do volume de eluição da espécie dimérica. A mioglobina também foi utilizada como padrão de monômero, sendo aplicada tanto em pequeno volume quanto em volume saturante, sendo lida em 412nm. O padrão de tetrâmero foi obtido pela passagem de Hb humana na forma desoxigenada e na presença de ATP e ditonito de sódio. Segundo Valdes *et al.*, (1978) a constante de associação da desoxi-hemoglobina é extremamente elevada, sendo esta a melhor maneira para se obter o padrão de tetrâmeros. O tampão foi previamente desoxigenado por borbulhamento de nitrogênio e adição de ditonito de sódio a 0,1%.

O método utilizado para estimar os valores da constante foi o proposto por Nenortas & Beckett (1994). O modelo de associação dímero-tetrâmero pode ser representado pela equação:



onde a fração de dímeros será:

$$f_d = \frac{Hb_d}{(Hb_d + Hb_t)} \quad \text{Eq. 25}$$

A constante de associação (4K_2) para o estado ligado é representada por:

$${}^4K_2 = \frac{f_t}{f_d^2 * Hb} = \frac{(1 - f_d)}{f_d^2 * Hb} \quad \text{Eq. 26}$$

Assim, a concentração total de hemoglobina é $f_t + f_d$, e a equação anterior seria re-arranjada para:

$${}^4K_2 \cdot f_d^2 \cdot Hb + f_d - 1 = 0 \quad \text{Eq. 27}$$

ou seja, tem-se uma equação quadrática com $f_d = X$. Pode-se, então, calcular a raiz f_d :

$$f_d = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a} = \frac{-1 + \sqrt{1 - 4 \cdot {}^4K_2 \cdot Hb \cdot (-1)}}{2 \cdot {}^4K_2 \cdot Hb} \quad \text{Eq. 28}$$

e achar uma expressão que relaciona a fração de dímeros com a concentração de hemoglobina total.

Essa fórmula, incluída na equação a seguir, fornece uma expressão dos parâmetros a serem estimados: 4K_2 , σ_d e σ_t em função da concentração da proteína Hb:

$$\sigma_w = (f_d(\sigma_d - \sigma_t)) + \sigma_t \quad \text{Eq. 29}$$

onde o valor de σ_t foi estimado independentemente pela passagem de Hb desoxigenada, e o de σ_d pela média dos coeficientes de partição da forma tetramérica e a mioglobina (Nenortas & Beckett, 1994): $\sigma_d = \frac{1}{2}(\sigma_t + \sigma_{Mb})$,

permitindo restringir o ajuste a apenas dois parâmetros.

Essa equação é um modelo ao qual pode-se tentar fazer o ajuste dos dados obtidos na filtração analítica em gel. Fez-se também um ajuste no qual substituiu-se os sigmas pelos valores de eluição, não tendo diferenças na estimativa. Assim, optamos por usar os volumes de eluição dos centróides de forma a simplificar o cálculo.

III.i. Modelagem Molecular por Homologia

Modelagem molecular por homologia é o método escolhido quando há uma evidente relação de identidade entre a seqüência da proteína de estudo (alvo) e uma proteína de estrutura tridimensional conhecida (modelo).

Proteínas de mesma família possuem estrutura terciária mais conservada do que suas seqüências primárias (Lesk & Chothia, 1980). Portanto, se há uma grande identidade na seqüência primária entre duas proteínas, certamente estas proteínas terão estrutura terciária muito semelhantes.

No início das análises de modelagem molecular por homologia utilizamos o programa computacional BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)(Altschul, *et al.*, 1990). O BLAST é um conjunto de programas que possibilita ao usuário encontrar seqüências (modelos), tanto de proteínas como de ácidos nucleicos, depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), a fim de se comparar com a seqüência alvo.

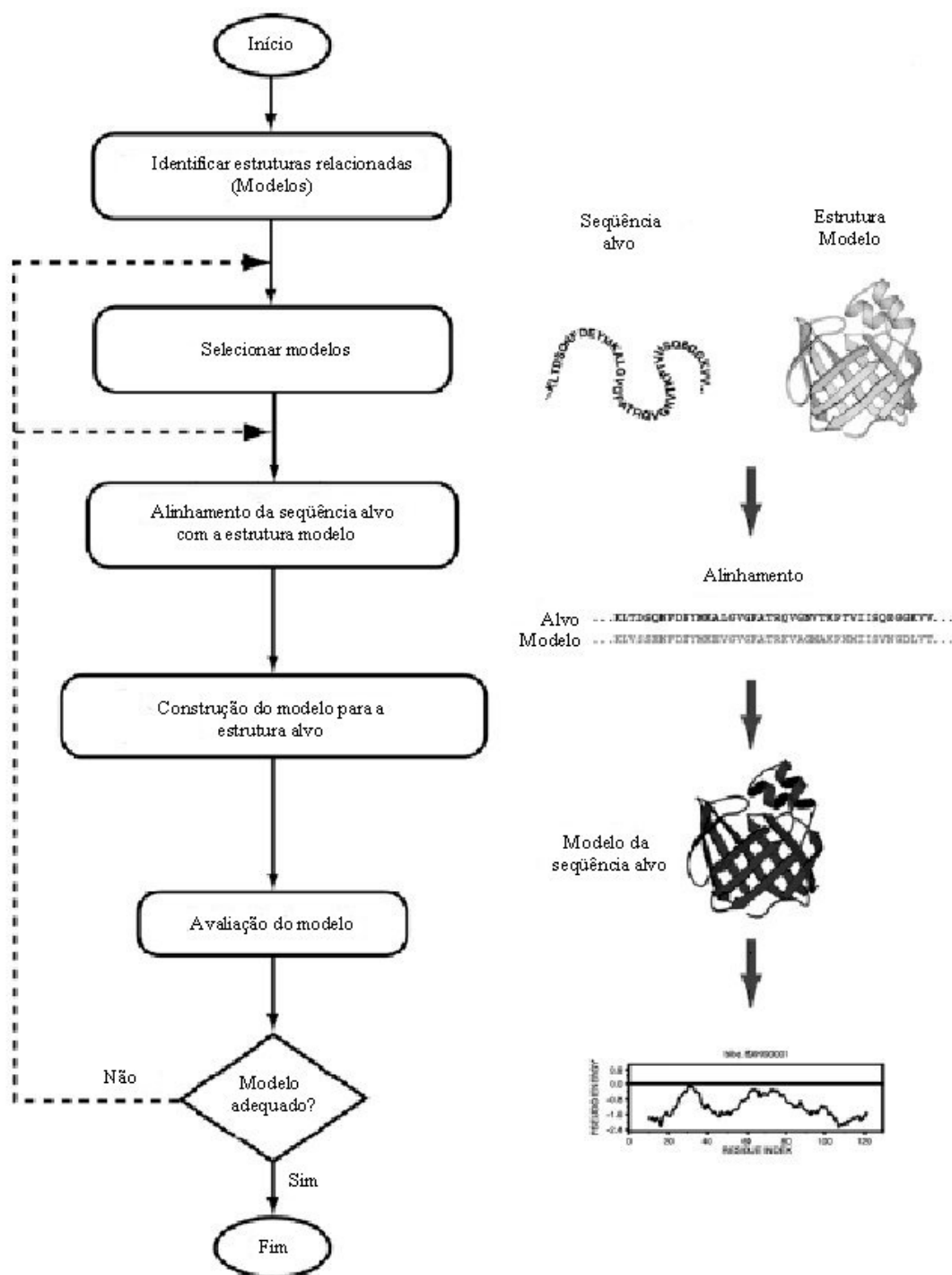


Figura 22. Representação esquemática dos passos de uma modelagem molecular por homologia. Figura retirada de Sanchez & Sali, 1997.

Utilizamos o BLAST com o intuito de obtermos uma seqüência primária de hemoglobina (modelo), a qual possuísse coordenadas tridimensionais depositadas no PDB, que apresentasse a mais alta identidade com a seqüência primária da hemoglobina alvo, no caso a hemoglobina da serpente semi-aquática *Liophis miliaris*, para que, em seguida, fosse possível se propor um modelo tridimensional para esta proteína.

Como a hemoglobina é um tetrâmero composto por duas cadeias alfa e duas beta, foi necessário que fizéssemos a procura das seqüências primárias das cadeias isoladamente, ou seja, primeiro realizamos a pesquisa para a cadeia alfa e depois para a cadeia beta.

De posse dos resultados, realizamos o alinhamento entre as seqüências primárias das proteínas modelo e alvo. Para isso, utilizamos o programa MultAlign (Corpet, 1988).

Feito o alinhamento, utilizamos o programa MODELLER para modelar a hemoglobina de *Liophis miliaris*. De uma maneira geral, o MODELLER utiliza as coordenadas tridimensionais da proteína modelo para extrair as distâncias entre os átomos e calcular as restrições de ângulos diedros. Em seguida, o programa utiliza o alinhamento feito, entre a proteína modelo e alvo, para acomodar os resíduos de aminoácidos da proteína alvo, nas coordenadas tridimensionais da proteína modelo.

Finalmente, o modelo gerado para a proteína alvo sofre uma otimização que minimiza algumas violações de ângulos diedros e distâncias entre átomos até que um modelo que satisfaça as restrições espaciais seja obtido. A seguir, ilustramos uma representação esquemática dos passos da modelagem molecular por homologia (figura 22).

Após a proteína alvo ter sido modelada, é importante avaliar possíveis erros. Devemos levar em consideração dois tipos de avaliação: (I) avaliação interna de sua consistência intrínseca que verifica se o modelo satisfaz ou não as restrições calculadas e (II) avaliação externa que confia em informações que não foram usadas no cálculo do modelo.

Uma das maneiras de se localizar regiões incertas de um modelo é avaliar a estereo-química (ângulos diedrais e sobreposição de átomo-átomo) do modelo com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1994).

Este procedimento é de grande importância durante os experimentos de modelagem comparativa, já que erros de estereo-química são comuns e, uma vez detectados esses erros, os mesmos podem ser corrigidos, dando maior credibilidade ao modelo gerado.

Finalmente, uma ferramenta de avaliação importante é o conhecimento experimental sobre a estrutura e função da proteína. Um modelo deve ser consistente com as observações experimentais, como por exemplo, dados de *cross linking*, ligações dos ligantes e assim por diante.

Com o programa LSQKAB, do pacote de programas do CCP4 (CCP4, 1994), reunimos as coordenadas tridimensionais da cadeia alfa gerada, com as da cadeia beta, num mesmo arquivo, formando-se assim, o dímero. Em seguida, com o mesmo LSQKAB aplicamos ao arquivo contendo as coordenadas do dímero, uma matriz inversa de translação e rotação, gerando o dímero correspondente. Estes novos dados são reunidos em um mesmo arquivo formando o tetrâmero.

Caso algum resíduo de aminoácido esteja fora de posição, é feito um ajuste manual deste resíduo e, em seguida, uma minimização de posição. Utilizamos novamente o gráfico de Ramachandram para avaliar a qualidade do modelo de tetrâmero gerado para *Liophis miliaris*.

III.j. Coleta de Dados de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

As coletas de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram realizadas no laboratório de baixo ângulo e cristalografia de raios X, do Departamento de Física, em colaboração com o Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri e o aluno de doutoramento Geovanni César dos Santos.

O equipamento utilizado nas coletas de dados de SAXS foi um gerador de raios X com ânodo rotatório, RIGAKU RU 300, com capacidade máxima de 18 KW (60 KV - 300 mA). O gerador possui um sistema de janelas (esquerda e direita) de saída de feixes de raios X com dois perfis, linha e ponto, permitindo seu uso simultâneo tanto para coleta de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo quanto na coleta de dados de difração de raios X (cristalografia).

Analizamos as amostras de hemoglobina em tampão HEPES 30 mM em pH 7,0 e 8,0, uma vez que se propõe que a forma dimérica prevaleça em pH 8,0 e a tetramérica em pH 7,0 (Focesi *et al.*, 1987).

Colocamos as amostras em capilares de vidro de diâmetro interno de 1 mm. No início dos experimentos, coletamos dados de SAXS em quatro concentrações diferentes (30, 25, 20 e 17 mg/ml) para cada pH (7,0 e 8,0) para posterior extrapolação para a concentração “zero”. O tempo de coleta para cada concentração foi de 4 horas à temperatura de 20°C.

Após alguns experimentos, optamos por realizar uma única coleta de dados a 10 mg/ml de proteína, aumentando o tempo de coleta (6 horas), pois observamos que não havia diferenças entre as curvas de SAXS para os dois métodos adotados, evitando sim, o gasto desnecessário de amostra.

Ao final de cada experimento foi avaliada a porcentagem de meta-hemoglobina em solução, descartamos valores de meta-hemoglobina acima de 5% e realizamos novas medidas. Antes das coletas de dados, aplicamos a todas as

amostras monóxido de carbono, a fim de se estabilizar a molécula, evitando assim a formação de meta-hemoglobina.

III.k. Cristalização e Coleta de Dados de Difração de Raios X da Hb-II de Crotalus durissus terrificus

Após a purificação, a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* foi lavada três vezes em uma solução de Tris-HCl 10mM pH 9,0 a 4°C e, em seguida, borbulhamos monóxido de carbono (CO) na amostra de Hb-II com o intuito de estabilizar a proteína.

Realizamos as primeiras triagens, para obtenção de monocristais apropriados para a coleta de dados de difração de raios X, utilizando o método da matriz esparsa proposto por Jancarik & Kim (1991), através do método de cristalização por difusão a vapor (sistema *hanging drop*). A concentração de proteína nestes experimentos foi de 10mg/mL.

Conseguimos monocristais de Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* em solução de sulfato de lítio 2M, Tris-HCl 0,1M e PEG 4000 20%.

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), em Campinas.

Coletamos os dados de difração de raios X a um comprimento de onda de 1.544Å, em uma placa detectora de imagens MAR de 34,5cm (Polikarpov *et. al.*, 1998a, 1998b), a distância do cristal ao detector foi de 250.0mm a temperatura de 8°C. Usando um ângulo de oscilação de 1.0°, coletamos 80 imagens e as integramos, a 4.5Å de resolução, usando o programa DENZO. Fizemos o escalonamento com o programa SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

III.1. Análise das Estruturas Quaternárias

Com o intuito de propormos uma explicação estrutural para a ausência de dimerização em hemoglobinas de serpentes, optamos por fazer uma análise estrutural dos resíduos que compõem a interface dimérica em hemoglobinas, avaliando quais resíduos contribuem para a manutenção do tetrâmero na forma oxigenada.

Consideramos os seguintes resíduos que compõem a interface dimérica ($\alpha_1\beta_2$ e sua recíproca) (figura 10, na introdução): **1- Cadeia alfa:** Pro C2 (37), Thr C3(38), Lys C5(40), Thr C6(41), Tyr C7(42), Pro CD2(44), Ala F9(88), Leu FG3(91), Arg FG4(92), Asp G1(94), Pro G2(95), Val G3(96), Asn G4(97), LeuG7(100). **2- Cadeia beta:** Val B16(34), Tyr C1(35), Pro C2(36), Trp C3(37), Gln C5(39), Arg C6(40), Phe C7(41), Glu CD2(43), His FG4(97), Val FG5(98), Asp G1(99), Pro G2(100), Glu G3(101), Asn G4(102), Leu G7(105), conforme Perutz *et al.*, (1968) e Abraham *et al.*, (1997).

Para alcançarmos nosso propósito de análise buscamos no PDB (*Protein Data Bank*) as estruturas terciárias de quatro moléculas comprovadamente tetraméricas: 1- Estrutura da oxi-hemoglobina humana determinada em alta concentração de NaCl (código no PDB: 1HHO; Shaanan, 1983); 2- Estrutura da oxi-hemoglobina humana determinada em baixa concentração de NaCl (código no PDB: 1BBB; Mercedes Silva *et al.*, 1992); 3- Estrutura da oxi-hemoglobina de *Gallus gallus* (código no PDB: 1HBR; Knapp *et al.*, 1999) e 4- Estrutura da Carboxi-hemoglobina-I de Truta (*Oncorhynchus mykiss*)(código no PDB: 1OUU; Tame *et al.*, 1996). As coordenadas da hemoglobina de *Liophis miliaris* foram obtidas por modelagem molecular por homologia.

Utilizamos o programa de visualização gráfica Swiss-PdbViewer versão 3.7, de domínio público, para realizar as análises de estrutura quaternária. O programa também nos possibilitou avaliar as distâncias entre os átomos constituintes das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que integram a interface dimérica,

sendo possível, dessa maneira, avaliar se naquela determinada distância poderia ocorrer ou não algum tipo de interação, tal como, uma ponte de hidrogênio ou um contato de van der Waals.

Realizamos também a sobreposição das estruturas quaternárias para medirmos o grau de semelhança de tais estruturas. Esta avaliação foi feita através do valor dos desvios de r.m.s.d. (*root-mean square deviation* ou desvio médio quadrático). Este número indica a média da distância entre os carbonos alfa das proteínas comparadas. Quanto menor o valor do r.m.s., maior o grau de semelhança estrutural.

A sobreposição das estruturas quaternárias foi realizada utilizando todos os carbonos alfa das hélices B, G e H, uma vez que estas hélices são menos afetadas pelas mudanças terciárias (Baldwin & Chothia, 1979). A hemoglobina humana (1BBB) e as hemoglobinas de animais foram sobrepostas sobre a Hb humana (1HHO).

A análise relativa à região interdimérica foi conduzida com os seguintes critérios: foram consideradas pontes de hidrogênio se um determinado átomo é um bom doador de hidrogênio e o outro é um bom aceptor de hidrogênio com uma distância de 3,6 a 3,0Å (Abraham *et al.*, 1997).

Os contatos de van der Waals foram calculados da seguinte maneira: somaram-se os raios de van der Waals dos átomos que possivelmente estão em contato, se a distância entre eles fosse igual ou menor à soma dos raios de van der Waals desses átomos, considerou-se que eles estabelecem contato de van der Waals. Foram considerados os seguintes raios de van der Waals para cada átomo: 1- Carbono da carbonila da cadeia principal: 1,8Å, oxigênio da carbonila da cadeia principal: 1,52Å, todos os átomos das caeias laterais e grupos: 1,8Å (Bondi, 1964).

III.m. Evidências Espectroscópicas de Transição Conformacional T \rightleftharpoons R na Forma Stripped, em Solução, da Hemoglobina de Liophis miliaris

A proposta mais recente envolvendo a Hb de *Liophis miliaris*, feita por Bonafé *et al.* (1999), supõe que a ligação de ATP à forma desoxigenada mantém o tetrâmero unido, ou seja, assume que a forma stripped não teria a conformação T.

Enoki & Tyuma, (1964) mostraram que as formas oxigenada e desoxigenada da hemoglobina tetramérica, possuem espectros de absorção distintos na região do ultravioleta entre 270 e 300nm. A diferença entre estes espectros, mostra uma pequena banda de absorção centrada em 290nm, que está localizada bem no topo da larga banda de absorção da porfirina. Os autores atribuem a origem desta banda à absorção óptica dos resíduos aromáticos localizados na interface dimérica ($\alpha_1\beta_2$). São eles: Tyr 42(α), Trp 37 (β) e Phe 41(β). Esta banda é o único marcador espectroscópico conhecido da transição alostérica T \rightleftharpoons R.

Diferentemente da região visível que vai de 500 à 700nm, a banda em 290nm está diretamente relacionada a variações que ocorrem na estrutura da cadeia protéica, e não ao grupo heme (Briehl & Hobbs, 1970).

O experimento foi realizado com tampão HEPES 30mM pH 7,5 com a hemoglobina na forma *stripped*.

IV. RESULTADOS

IV.a. Purificação do hemolisado de Crotalus durissus terrificus

Devido à proximidade entre os pontos isoelétricos (diferença essa de centésimos de unidade de uma fração para outra) das frações que compõem o hemolisado de serpentes, a purificação destas isoformas é muito dificultada.

A primeira tentativa foi utilizar uma coluna de troca aniônica preenchida com DEAE Sephadex (Sigma), a fim de se obter uma separação das frações. Para isso, utilizamos um gradiente de pH com tampões Hepes 50mM pH 7,6 e TRIS-HCl 50mM pH 9,0.

No entanto, a tentativa foi frustrada pois, a eluição da amostra se deu sem que se observasse nenhuma separação das frações, o que se confirmou, posteriormente, com a leitura de absorbância em 576nm dos tubos coletados.

Optamos, primeiramente, por utilizar o Rotofor (Bio-Rad), cujo princípio básico é o de uma isoeletrofocalização. Contudo, no Rotofor o meio de migração da macromolécula não é sólido (gel) e sim líquido.

Durante três meses tentamos otimizar a purificação das amostras de hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops alternatus*. Os fabricantes do aparelho propunham que o mesmo tinha a capacidade de separar isoformas com até 0,05 de diferença nos seus pIs. Entretanto, nunca conseguimos a formação de um gradiente com uma faixa tão estreita de um pH para outro, o que impossibilitava uma boa separação entre as frações.

Foi então que decidimos testar uma purificação na resina de troca aniônica DEAE-Sepharose (Pharmacia), utilizando um gradiente salino linear de 0 a 50mM para a eluição das frações da Hb. Os resultados foram satisfatórios e serão apresentados a seguir.

O hemolisado de *Crotalus durissus terrificus* revelou a presença de sete frações de hemoglobinas (figura 23). A fração II foi identificada como a fração majoritária (35%), seguida pela fração III (30%). As frações I, IV, V, VI e VII apresentaram-se como frações minoritárias do hemolisado de *Crotalus durissus terrificus*. Já que a fração II, denominada por nós como Hb-II, era o componente obtido em maior quantidade, esta tornou-se nosso objeto de estudo. A fim de comprovar a pureza da amostra, realizamos um gel de isoeletrofocalização. A figura 23, mostra que houve uma boa purificação da Hb-II, além de comprovar que esta fração é o componente principal do sangue desta serpente. Devemos ressaltar que não observamos variações intra-específicas no padrão eletroforético das hemoglobinas de serpentes.

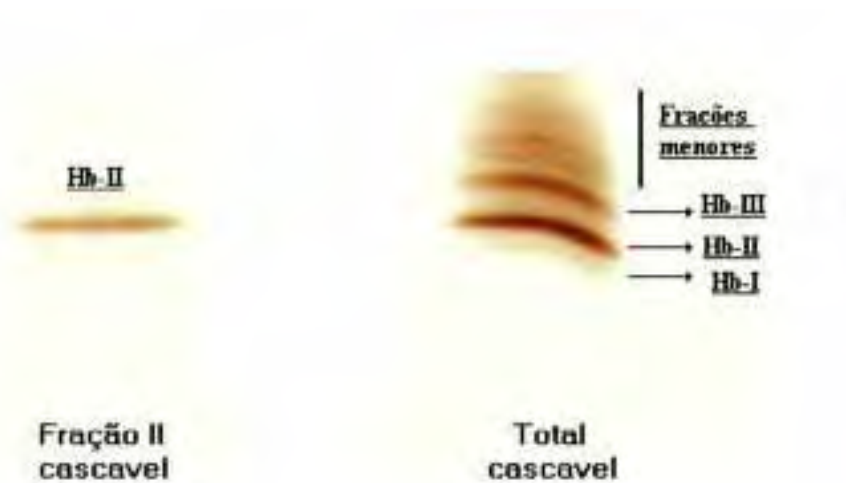


Figura 23. A figura ilustra um gel de isoeletrofocalização (IEF), mostrando as várias frações de Hb que compõem o hemolisado de *Crotalus durissus terrificus*. Observa-se também a Hb-II purificada.

IV.b. Propriedades Funcionais de Ligação de Oxigênio das Hemoglobinas de Serpentes

IV.b.1. Hemoglobina II de Crotalus durissus terrificus

A figura 24 mostra como as propriedades funcionais de ligação de O₂ da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* varia em diferentes pH a 20°C. No gráfico do log P₅₀ versus pH, observamos que a forma *stripped* possui alta afinidade por oxigênio.

Os valores de P₅₀ variam de 1,7 a 0,7 mmHg, na faixa de pH entre 7 e 9, respectivamente. Fica evidente também a presença de efeito Bohr alcalino, que pode ser medido pela variação no número de H⁺ ($\Delta H^+ = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$), de -0,39 H⁺/heme entre pH 7 e 8.

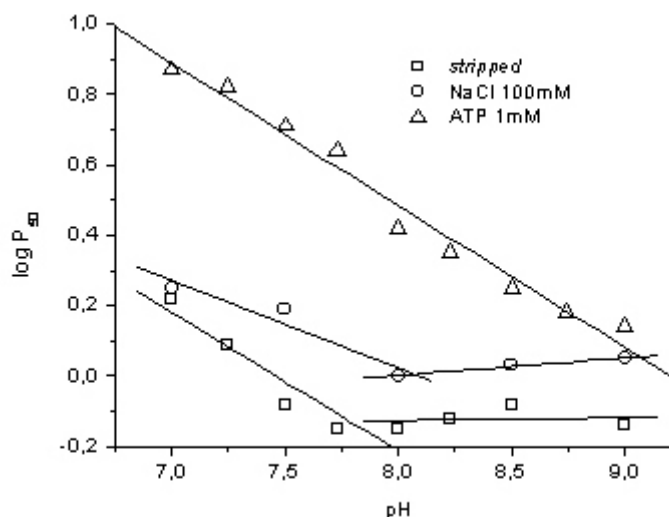


Figura 24. Dependência do log P₅₀ com a variação do pH a 20°C, da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. Os dados foram obtidos em tampão ADA 50mM (em pH 7,0 e 7,5) e Tris-HCl 50mM (acima de pH 8,0). A concentração da amostra foi de ± 60µM/heme. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

Na presença de Cl⁻ (NaCl 100mM) o comportamento da Hb-II é parecido ao da forma

stripped, porém a a finidade por O₂ decresce acima de pH 7,5. O efeito Bohr, na presença de cloreto, cai para -0,25 ± 0,13 H⁺/heme

Na presença de ATP 1mM, observamos uma acentuada diminuição da afinidade da Hb-II por O₂ em relação à sua forma *stripped*, na mesma faixa de pH. Em pH 7,0, a P₅₀ eleva-se para 7,4 mmHg, um decréscimo de 4,4 vezes na afinidade.

Verificamos também um aumento no efeito Bohr alcalino para $-0,44 \pm 0,06$ H^+ /heme, aproximando-se do valor encontrado para Hb humana ($-0,5 H^+$ /heme) (Duguet & Acher, 1975). Este comportamento, na presença de ATP, já foi descrito para outras hemoglobinas de serpentes, tais como, *Bothrops alternatus* (Oyama *et al.*, 1993), *Helicops modestus* (Bonafe *et al.*, 1999) e *Liophis miliaris* (Focesi *et al.*, 1987).

O coeficiente de Hill (n_H), da forma *stripped* (figura 25), mostrou uma

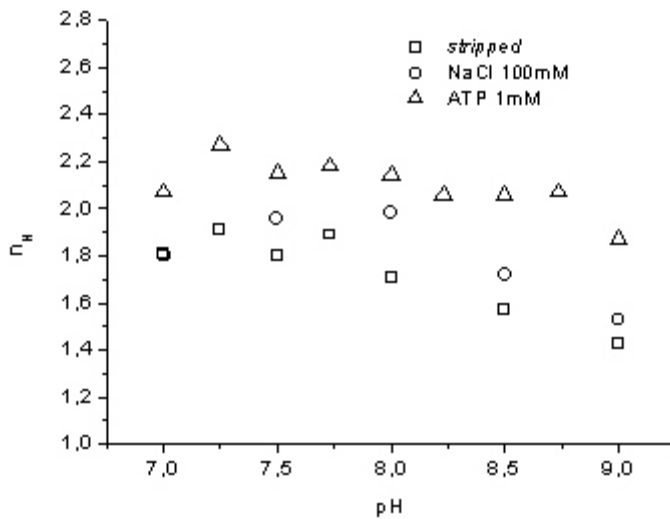


Figura 25. Comportamento do coeficiente de Hill (n_H) da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* em diferentes pH a 20°C. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 24. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

dependência do pH, uma vez que o aumento do pH diminuiu os valores de cooperatividade, de 1,9 para 1,4 entre pH 7,0 e 9,0, mas todos os valores obtidos indicam processo cooperativo de ligação de oxigênio à Hb-II.

Na presença de Cl⁻ há

um discreto aumento da cooperatividade entre pH 7,0 e 8,0 ($n_H = 1,8$ e $n_H = 1,98$, respectivamente). Acima de pH 8,0 observamos uma diminuição do n_H . Na presença de ATP, a cooperatividade ficou acima das encontradas na presença de NaCl e *stripped*, em toda a faixa de pH estudada. Pela análise do gráfico, observamos que a cooperatividade varia com o pH, atingindo um máximo ao redor do pH 7,5.

O menor valor de cooperatividade obtido acima de pH 8,0 foi 1,87, mostrando que acima de pH 8,0, mesmo na presença de ATP, ocorre processo cooperativo de ligação de oxigênio para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*.

A figura 26 mostra a dependência das propriedades funcionais de ligação de oxigênio à Hb-II em diferentes pH a 30°C.

Observamos que houve um aumento na P_{50} nas três condições experimentais (*stripped*, na presença de Cl^- e na presença de ATP), em relação à 20°C.

Na forma *stripped* houve um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na P_{50} a pH 7,0 (de 1,7 a 20°C para 4,2 a 30°C). Outro ponto importante foi a diminuição do efeito Bohr alcalino, com o aumento da temperatura, na forma *stripped* e na presença de Cl^- .

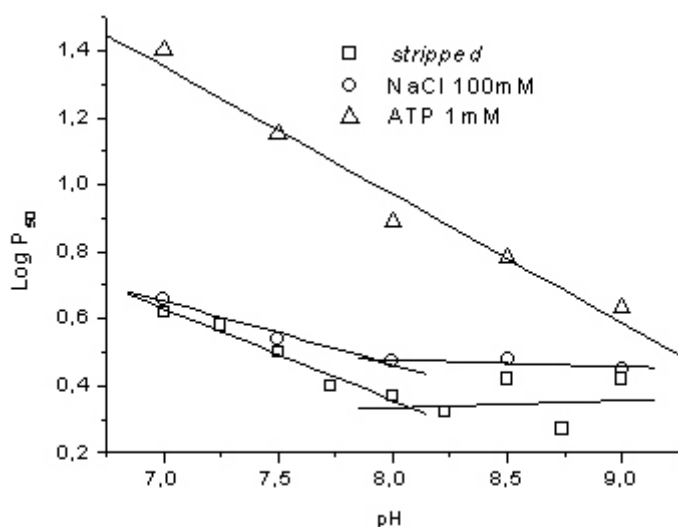


Figura 26. Dependência do $\log P_{50}$ com a variação do pH a 30°C da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. Os dados foram obtidos em tampão ADA 50mM (pH 7,0 e 7,5) e Tris-HCl 50mM (acima de pH 8,0). A concentração da amostra foi de $\pm 60\mu\text{M}/\text{heme}$. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

Na forma *stripped*, o valor de $\Delta H^+/\text{heme}$ diminuiu de $-0,39 \pm 0,08$ a 20°C para $-0,27 \pm 0,03$ a 30°C e na presença de Cl^- diminuiu de $-0,25 \pm 0,1$ a 20°C para $-0,19 \pm 0,03$ a 30°C. Entretanto, na presença de ATP 1mM, o que ocorre é um aumento do efeito Bohr alcalino de $-0,44 \pm 0,06$ a 20°C para $-0,51 \pm 0,01$ a 30°C.

Com relação ao n_H (figura 27), constatamos uma dependência deste com a variação do pH. Na forma *stripped* e na presença de Cl^- , essa dependência já havia sido detectada a 20°C e se manteve a 30°C, sendo que,

em pH 8,0 a forma *stripped* apresenta um n_H igual $1,64 \pm 0,03$ e na presença de Cl^- igual a $1,71 \pm 0,06$, confirmando a presença de processo cooperativo também a $30^\circ C$.

Na presença de ATP também constatamos uma maior dependência do n_H com a variação do pH. Em $30^\circ C$, a cooperatividade elevou-se de 2,03, em pH 7,0, até 2,36 em pH 8,0. Acima deste pH houve uma diminuição desta até pH 9,0 cujo valor foi de 1,83, confirmando também a presença de processo cooperativo de ligação de oxigênio à temperatura de $30^\circ C$, acima de pH 8,0 (figura 27).

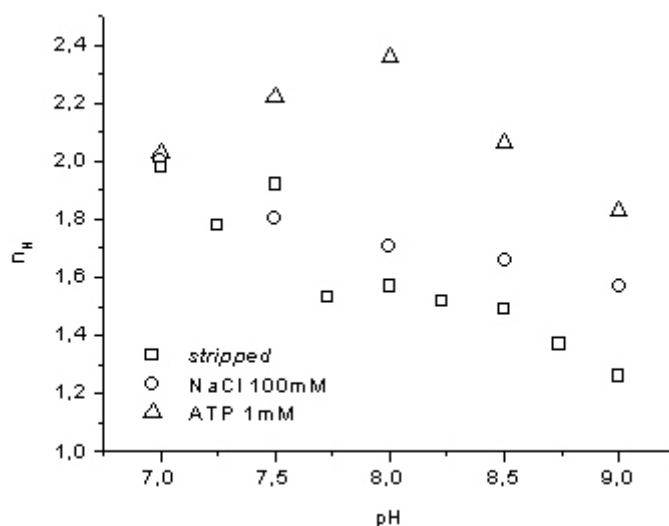


Figura 27. Comportamento do coeficiente de Hill (n_H) com a variação do pH a $30^\circ C$ da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 26. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

IV.b.2. Hemoglobinas de Helicops modestus

As figuras 28 e 29 ilustram as propriedades de ligação do O₂ do hemolisado de *H. modestus* com a variação do pH a 20°C. Na figura 28, está representada a afinidade da Hb total de *H. modestus* em três condições: *stripped*, com NaCl 100mM e com ATP 1mM.

Observamos que, na forma *stripped* e com NaCl 100mM, a Hb total de *H. modestus* possui uma alta afinidade por O₂, por toda a faixa de pH analisada. Na forma *stripped*, o valor da P₅₀ em pH 7,0 é de 1,21 ± 0,04 mmHg, este valor diminui até pH 8,0 (0,37 ± 0,02 mmHg), mostrando um efeito Bohr alcalino, medido pela variação no número de H⁺ ($\Delta H^+ = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) de -0,53 ± 0,1 H⁺/heme, nesta faixa de pH. Acima de pH 7,7 não observamos variação na afinidade por O₂ nem efeito Bohr.

Na condição que contém NaCl 100mM, os dados da P₅₀ são muito semelhantes aos da forma *stripped*, contudo, a variação no número de prótons diminui (-0,30 ± 0,05 H⁺/heme), sugerindo que os íons Cl⁻ se ligam à resíduos de aminoácidos responsáveis pelo efeito Bohr, sobrepondo o efeito dos prótons.

Quando adicionamos ATP 1mM à solução a afinidade por O₂ diminui drasticamente entre os pH 7,0 e 8,5, em relação às formas *stripped* e com NaCl. Entretanto, a partir do pH 8,0 a afinidade por O₂ aumenta até pH 9,0. O efeito Bohr alcalino apresentado com ATP foi de -0,67 ± 0,06 H⁺/heme, entre pH 7,0 e 8,5.

A figura 29 ilustra um gráfico da cooperatividade pelo pH a 20°C, do hemolisado total de *H. modestus*. Nas três condições analisadas (*stripped*, com NaCl e com ATP), observamos, em toda a faixa de pH, processo cooperativo de ligação de O₂. Na forma *stripped*, a cooperatividade atinge valores máximos em pH 7 (n_H=2,58±0,1). Acima de pH 7,5 a cooperatividade sofre uma redução para valores em torno de n_H=1,4, mas, nunca assume valores de n_H iguais a 1, o que caracterizaria

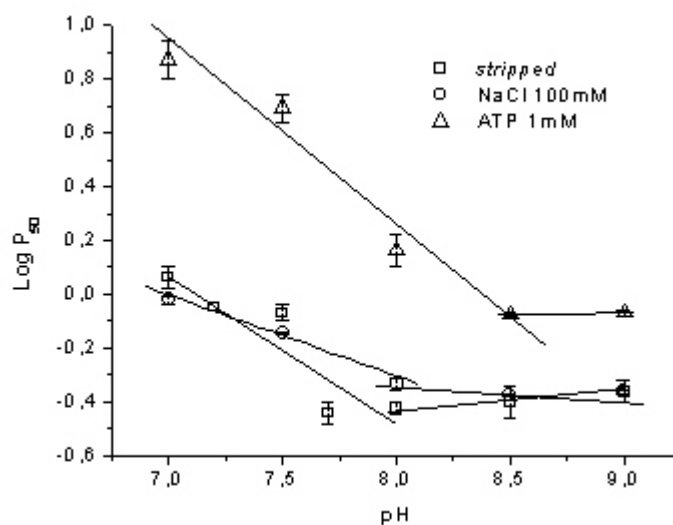


Figura 28. Dependência do $\log P_{50}$ do hemolisado de *Helicops modestus*, em diferentes pH a 20°C. Os experimentos foram realizados com tampão ADA e TAPS-NaOH 30mM. A concentração da amostra foi $\pm 60\mu\text{M/heme}$. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

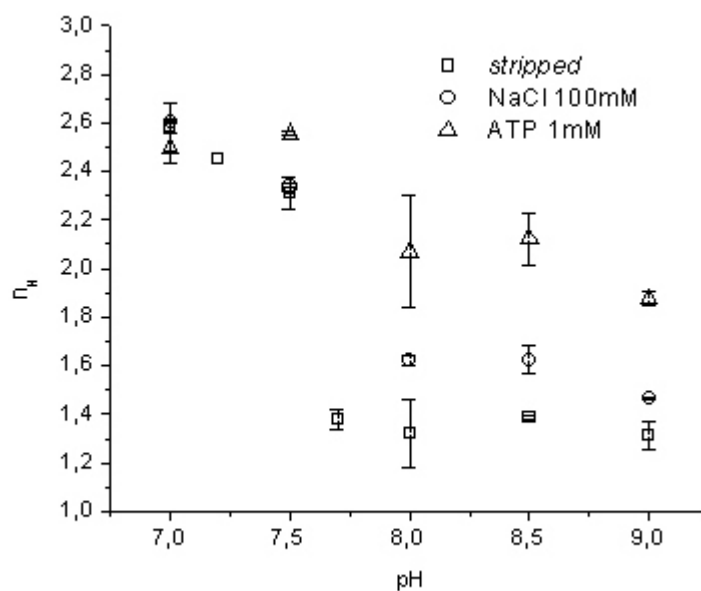


Figura 29. Comportamento da cooperatividade do hemolisado de *Helicops modestus* em diferentes valores de pH. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 28. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

processo não cooperativo de ligação de O₂, tal como, na mioglobina.

Na presença de cloreto (NaCl 100mM), o comportamento da cooperatividade é muito semelhante ao da forma *stripped*, ocorrendo um discreto aumento da mesma entre pH 8,0 e 9,0.

Na presença de ATP, fica evidente um processo cooperativo de ligação de O₂ em toda a faixa de pH analisada, sendo que, em pH 7,5, ocorre o maior valor registrado n_H=2,55 e, em pH 9,0, o menor valor obtido: n_H=1,87.

IV.c. Titulação com ATP para Determinação da Constante de Ligação nas Formas Oxigenada e Desoxigenada

Os experimentos de titulação com ATP para determinação da constante de ligação às formas oxi (K_O) e desoxigenada (K_D) foram realizados com concentrações crescentes de ATP, usando a equação 20.

Os resultados obtidos indicam um $\Delta x = -0,25$ /heme confirmando a existência de um sítio de ligação para o ATP por molécula de Hb (ATP:Hb tetrâmero), conforme equação de interrelação de Wyman ($-\Delta x = \Delta \log P_{50} / \Delta \log [ATP]$), onde Δx fornece o número de

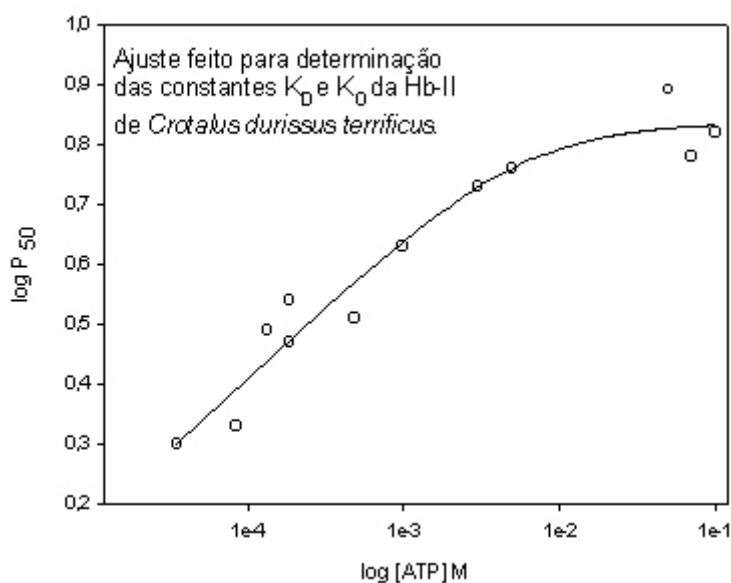


Figura 30. Efeito da concentração de ATP na afinidade por oxigênio da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. A linha contínua representa o ajuste feito para a determinação das constantes de associação de ATP às formas desoxigenada (K_D) e oxigenada (K_O), conforme equação 20. Os experimentos foram realizados em tampão TRIS-HCl 50mM pH 7,5, 43mM de cloreto a 20°C. A concentração de ATP variou de 0,5µM a 100mM e a concentração de amostra foi de ± 60µM/heme. Figura gerada com o programa gráfico SigmaPlot versão 7.0

moléculas de ATP ligado por subunidade. O valor da constante de ligação de ATP na forma desoxigenada (K_D) foi de $5,13 \times 10^5 \pm 0,85 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ e para forma oxigenada (K_O) foi de $1,92 \times 10^2 \pm 0,63 \times 10^2 \text{M}^{-1}$, conforme ilustra o ajuste feito na figura 30.

IV.d. Análise das Mudanças Conformacionais das Hemoglobinas de Serpentes Através do Método do Estresse Osmótico

IV.d.1. Hemoglobina II de Crotalus durissus terrificus

Os experimentos de estresse osmótico foram realizados a fim de se analisar a variação da área exposta ao solvente e, dessa forma, sondar as mudanças conformacionais que ocorrem durante o processo de oxigenação da Hb-II e de outras hemoglobinas de serpentes.

As análises foram realizadas na forma *stripped* e na presença de ânions (cloreto ou ATP).

Os dados obtidos (figura 31) mostraram que, para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, na forma *stripped*, o número de moléculas de água que se ligam a mais à Hb na forma oxigenada, durante o processo

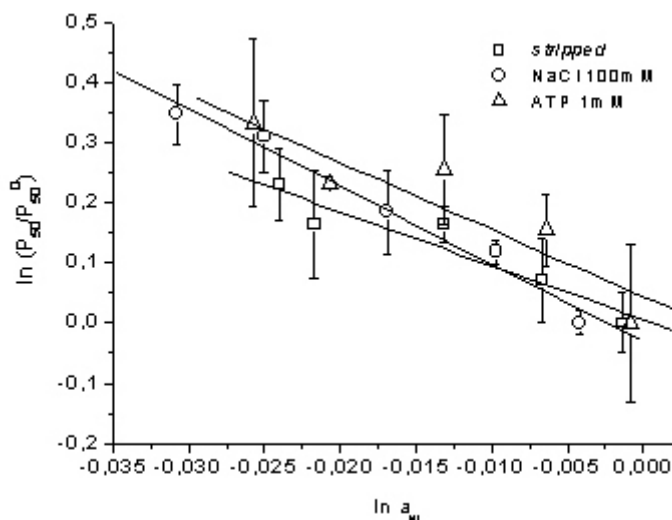


Figura 31. Comportamento da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* em diferentes valores de atividade de água. Os experimentos foram realizados em tampão HEPES-NaOH 30mM pH 7,5 a 20°C. A concentração da amostra foi de $\pm 60\mu\text{M}/\text{heme}$. Figura gerada com o programa gráfico Origin 6.0.

de oxigenação, foi de 36 ± 7 moléculas de água. Na presença de cloreto este número elevou-se para 52 ± 5 moléculas de água e na presença de ATP 45 ± 11 moléculas de água.

A análise estatística não mostrou diferenças significativas da inclinação para a comparação entre a forma *stripped* e com cloreto ($P=0,094$), e para a comparação *stripped* com ATP ($P=0,496$).

A figura 32 ilustra o comportamento da cooperatividade versus a atividade de água.

O gráfico mostra que nas três condições experimentais estudadas (*stripped*, com cloreto e com ATP) o processo de oxigenação da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* foi cooperativo. Na forma *stripped* e na presença de cloreto, a cooperatividade manteve-se entre 2,2 e 2,6 em toda a faixa de atividade de água estudada.

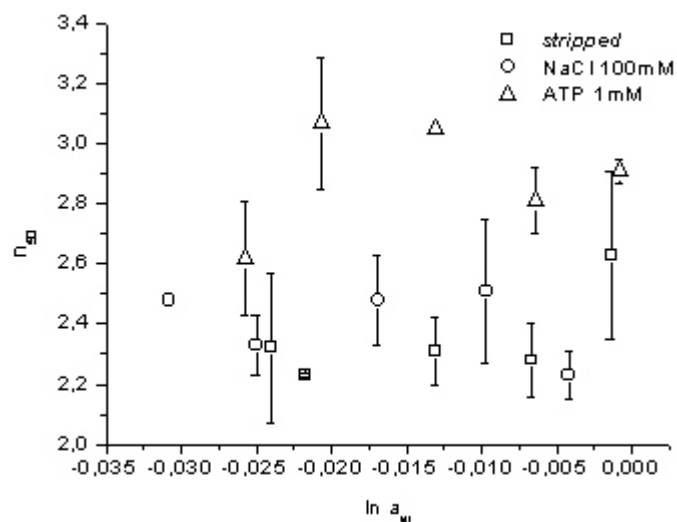


Figura 32. Comportamento da cooperatividade da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, em diferentes valores de atividade de água. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 31. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

Na presença de ATP, o coeficiente de Hill possui um valor maior em relação a forma *stripped* e na presença de cloreto. A cooperatividade nesta condição manteve-se entre 2,6 e 3,1.

IV.d.2. Hemoglobinas de *Helicops modestus*

A figura 33 ilustra a dependência do $\ln P_{50}$ versus a variação da atividade de água ($\ln a_w$) do hemolisado de *Helicops modestus*.

Na forma *stripped*, observamos que 24 ± 7 moléculas de água se ligam à Hb na forma oxigenada. Na presença de ATP medimos um total de 20 ± 2 moléculas de água, sendo este resultado muito semelhante ao encontrado para a forma *stripped*.

Na presença de cloreto, 56 ± 4 moléculas de água ligam-se a mais à Hb na forma oxigenada, do hemolisado de *Helicops modestus*, sugerindo que esta hemoglobina assume uma conformação quaternária diferente na forma

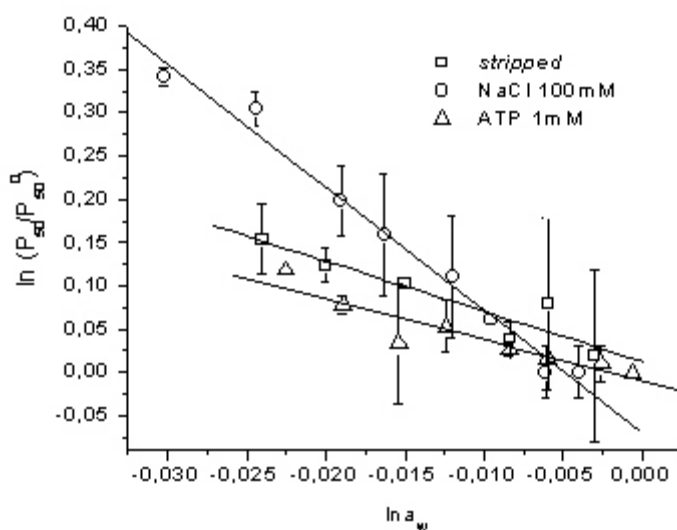


Figura 33. Comportamento do hemolisado de *Helicops modestus* em função da variação da atividade de água. Os experimentos foram realizados com tampão TAPS 30mM pH 8,0 a 20°C. A concentração da amostra foi de $\pm 60 \mu\text{M}/\text{heme}$. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

desoxigenada, em relação à desoxi-hemoglobina da forma *stripped* e na presença de ATP. Este mecanismo será discutido com mais detalhes no item discussão.

A análise estatística das interações mostrou diferença significativa entre as regressões da forma *stripped* e com cloreto ($P < 0,0001$), porém não há diferença significativa entre a regressão da forma *stripped* e na presença de ATP ($P = 0,429$).

A figura 34 ilustra um gráfico de n_H (cooperatividade) versus a atividade de água ($\ln a_w$).

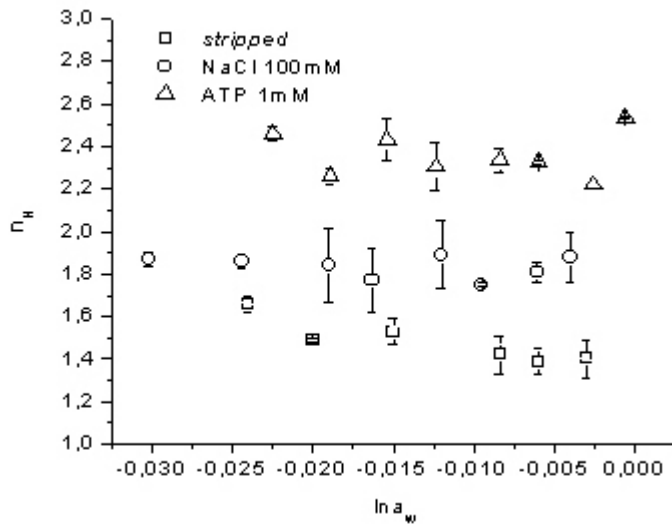


Figura 34. Comportamento da cooperatividade do hemolisado de *Helicops modestus* em função da atividade de água. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 33. Figura gerada com o programa gráfico Origin e versão 6.0.

Pela análise da figura observamos que o hemolisado de *Helicops modestus* liga oxigênio cooperativamente nas três condições estudadas (*stripped*, na presença de cloreto e na presença de ATP).

Na presença dos efetores alostéricos (cloreto e ATP) constatamos que não há dependência da cooperatividade com a variação da atividade de água. Na presença de cloreto, a cooperatividade manteve-se entre 1,77 e 1,89 em toda a faixa analisada. Na presença de ATP, embora a cooperatividade tenha mostrado valores superiores, em relação às formas *stripped* e com cloreto, não houve uma dependência desta com relação a variação da atividade de água. Os valores de n_H , na presença de ATP, permaneceram entre 2,2 e 2,53.

Na forma *stripped*, observamos uma discreta dependência da cooperatividade em relação à variação da atividade de água. Em valores altos de atividade de água ($a_w=154\text{mOsm}$) a cooperatividade foi de 1,39, enquanto que em valores baixos de atividade de água, tal como, $a_w=1.292\text{mOsm}$, o valor de n_H passou para 1,65.

IV.d.3. Hemoglobinas de *Liophis miliaris*

A figura 35 ilustra o comportamento do $\ln P_{50}$ versus a atividade de água do hemolisado de *Liophis miliaris*.

Os resultados mostram que 62 ± 4 moléculas de água se ligam a mais à Hb *stripped* de *Liophis miliaris*, na forma oxigenada, enquanto que na presença de cloreto e ATP este número diminui para 50 ± 6 e 57 ± 7 moléculas de água, respectivamente.

A análise estatística mostrou diferenças entre a forma *stripped* e na presença

de cloreto ($P=0,025$), porém não na comparação entre a forma *stripped* e com ATP ($p=0,146$).

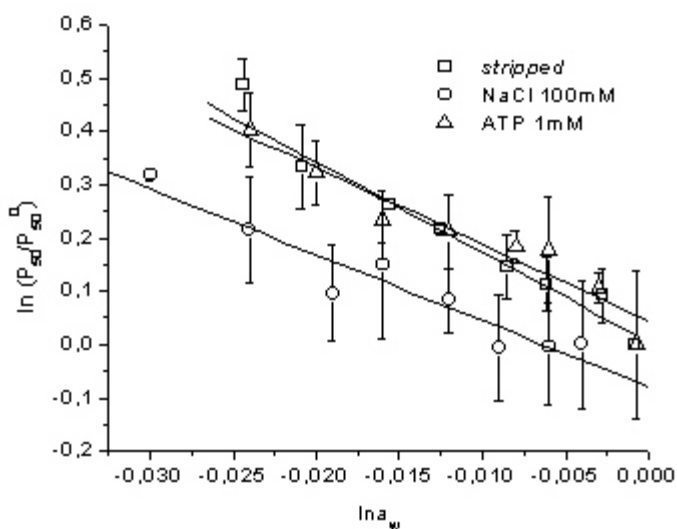


Figura 35. Comportamento do hemolisado de *Liophis miliaris* em diferentes atividades de água. Os experimentos foram realizados em tampão TAPS 30mM pH 8,0 a 20°C. A concentração da amostra foi de $\pm 60\mu\text{M/heme}$. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

A figura 36 mostra o comportamento da cooperatividade do hemolisado de *Liophis miliaris* em diferentes atividades de água.

De uma maneira geral a cooperatividade das três condições analisadas (*stripped*, com cloreto e com ATP) não mostrou dependência com a variação da atividade de água, como pode ser visto na figura 36.

Na forma *stripped*, a cooperatividade manteve-se entre 1,2 e 1,4 em toda a faixa estudada. Na presença de cloreto houve um aumento no índice de Hill, em

relação à forma *stripped*, na mesma faixa de atividade de água analisada. Os valores de n_H , na presença de cloreto, permaneceram entre 1,63 e 1,8.

Na presença de ATP, o aumento da cooperatividade foi bem mais acentuado em relação às outras duas condições estudadas (*stripped* e com cloreto), confirmando a forte influência que este efector alostérico exerce sobre as hemoglobinas de serpentes

A tabela 2 mostra um resumo da variação no número de moléculas de água (Δn_w) por tetrâmero, durante a transição do estado desoxigenado para o oxigenado, para as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris*.

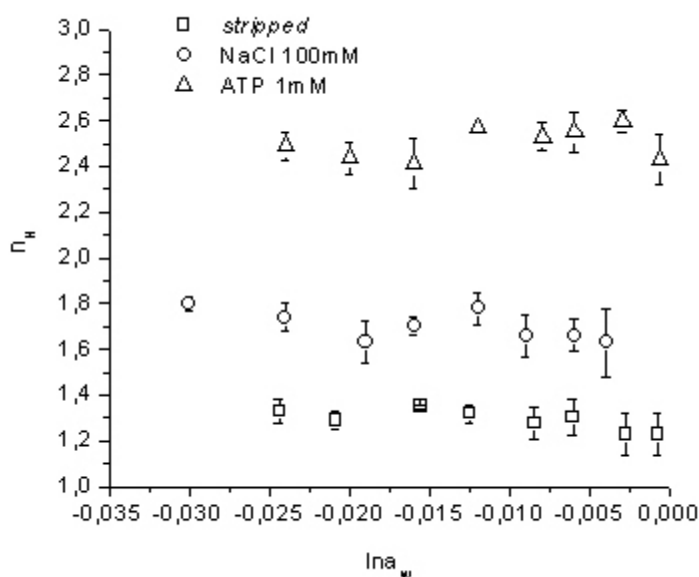


Figura 36. Comportamento da cooperatividade do hemolisado de *Liophis miliaris*, em diferentes atividades de água. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 35. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

Tabela 2. Tabela ilustrando a variação no número de moléculas de água (Δn_w) por tetrâmero, durante a transição do estado desoxigenado para o estado oxigenado, para as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris*.

Amostra	Condição		Δn_w	Análise
	Experimental			
Hb-II de <i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	<i>stripped</i>		36 ± 7 molec. água	Referência
	NaCl		52 ± 10 molec. água	ns
	ATP		45 ± 11 molec. água	ns
Hemolisado de <i>Helicops modestus</i>	<i>stripped</i>		24 ± 7 molec. água	Referência
	NaCl		56 ± 4 molec. água	P<0,0001
	ATP		20 ± 2 molec. água	ns
Hemolisado de <i>Liophis miliaris</i>	<i>stripped</i>		62 ± 4 molec. água	Referência
	NaCl		50 ± 6 molec. água	P=0,025
	ATP		57 ± 7 molec. água	ns

* A análise estatística de comparações das inclinações usou a forma *stripped* como referência. As diferenças foram consideradas significativas para P<0,05. ns=não significativo (P>0,05). O valor P é um parâmetro de probabilidade, ou seja, valores de P pequenos sugerem que há diferença estatística entre as duas condições experimentais analisadas. No entanto, valores de P grandes sugerem que a diferença observada experimentalmente é eventual.

IV.e. Determinação da Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado (4K_2)

Em virtude de dificuldades relativas às colunas utilizadas, as determinações para as várias hemoglobinas analisadas foram executadas em conjuntos diferentes.

A figura 37 ilustra um gráfico do volume de eluição do centróide versus a concentração de hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus* e *Bothrops alternatus*.

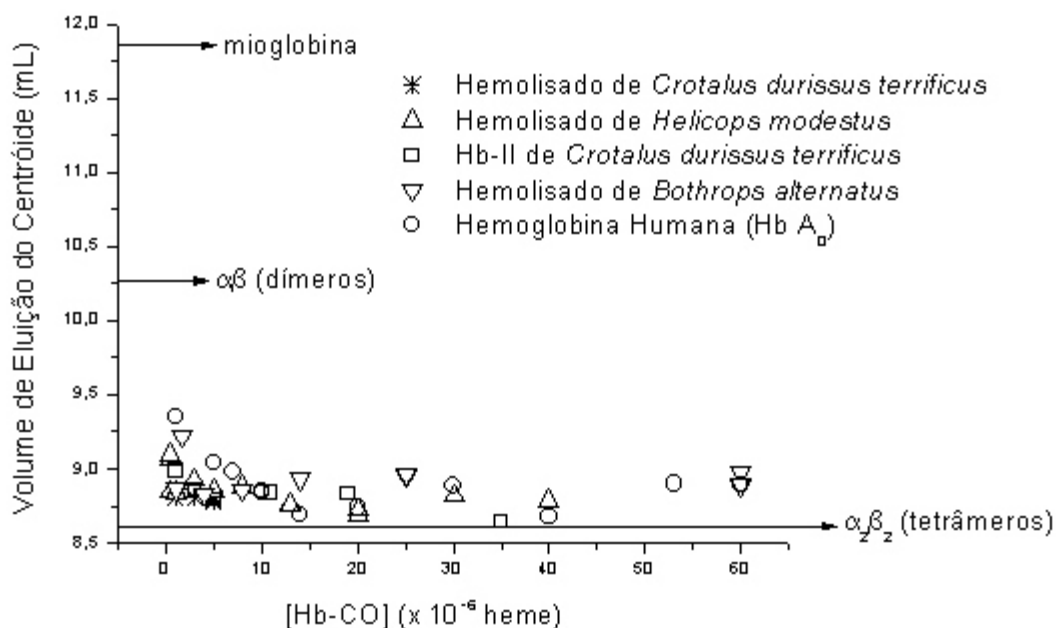


Figura 37. Comportamento do volume de eluição do centróide de várias hemoglobinas de serpentes (todas na forma *stripped*) em função da concentração de hemoglobina. Os experimentos foram realizados em tampão TAPS 30mM pH 8,0 a temperatura ambiente, foi aplicado monóxido de carbono (CO) em todas as amostras de Hb, a fim de prevenir a formação de meta-hemoglobina. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

Para uma avaliação qualitativa dos procedimentos executados, fizemos a passagem da hemoglobina humana a fim de medirmos o volume de eluição e a constante de associação para esta hemoglobina comprovadamente tetramérica em solução.

Os resultados mostraram que a hemoglobina humana, entre 14-60μM, elui em $8,80 \pm 0,11$ mL. Abaixo de 10μM, torna-se evidente a dissociação da hemoglobina humana devido à diluição da amostra (Chiancone, 1968; Valdes *et al.*, 1978; Dumoulin *et al.*, 1997), ocorrendo assim, um aumento no volume de eluição desta proteína (9,35mL a 1μM). Deve-se ressaltar que o volume de eluição do dímero foi estimado em 10,26mL, como mostra a figura 37.

O cálculo da constante de associação dímero-tetrâmero forneceu um valor de $2,0 \pm 0,2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$, em boa concordância com valores reportados na literatura por Nenortas & Beckett, (1994), que situam a constante por volta de $1,2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$.

Neste conjunto de dados observamos que, de uma maneira geral, as hemoglobinas analisadas de serpentes possuem volumes de eluição semelhante ao encontrado para a hemoglobina humana.

O volume de eluição do centróide da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, na forma *stripped*, foi de 8,98mL a $1 \mu\text{M}$, indicando que esta hemoglobina é menos propensa à dimerização do que a hemoglobina humana. Fizemos também a passagem do hemolisado de *Crotalus durissus terrificus* a fim de observarmos se há diferença no volume de eluição do centróide da forma purificada e não purificada.

Os resultados mostraram que o volume de eluição do centróide, para o hemolisado de *Crotalus durissus terrificus*, foi de 8,80mL a $1 \mu\text{M}$, indicando que não há grandes diferenças entre as amostras citadas acima, na faixa de concentração analisada.

Na concentração de $5 \mu\text{M}$ de hemoglobina, a semelhança entre os volumes de eluição dos centróides, entre as formas purificada e não purificada, é ainda maior, sendo de 8,79 e 8,78mL, respectivamente.

A constante de associação dímero-tetrâmero estimada para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* foi de $1,5 \pm 0,24 \times 10^7 \text{M}^{-1}$.

Os dados obtidos para o hemolisado *stripped* de *Helicops modestus* foram muito parecidos aos encontrados para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. A hemoglobina de *Helicops modestus* mostrou um volume de eluição do centróide de 8,82mL em $30 \mu\text{M}$ e 9,07mL em $0,5 \mu\text{M}$. A constante de associação dímero-tetrâmero estimada para esta hemoglobina foi de $1,6 \pm 0,17 \times 10^7 \text{M}^{-1}$.

Observamos também o comportamento de eluição do hemolisado *stripped* da serpente *Bothrops alternatus* (Urutu). A hemoglobina desta serpente apresentou

volumes de eluição do centróide muito parecido com os observados para as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus* e humana.

Na concentração de 1 μ M, o valor do volume de eluição do centróide foi de 8,86mL. Devido à má qualidade dos dados apresentados para esta hemoglobina não foi possível estimar a constante de associação dímero-tetrâmero com confiabilidade.

Novas análises deveriam ser realizadas a fim de se buscar um melhor ajuste da curva, no entanto, foi impossível obter novos exemplares desta espécie junto ao Instituto Butantan.

Em outro conjunto de dados avaliamos o comportamento de eluição do hemolisado *stripped* de *Boa constrictor* por cromatografia analítica de filtração em gel, como ilustra a figura 38.

A figura 38 mostra o volume de eluição do centróide em função da concentração de hemoglobina. Pela análise do gráfico, verificamos que a hemoglobina de *Boa constrictor* possui um volume de eluição próximo à forma tetramérica, como descrito para as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Helicops modestus*, *Bothrops alternatus* e humana.

A análise estatística realizada por regressão não-linear para este conjunto de dados forneceu uma estimativa de ${}^4K_2=1,0 \pm 0,36 \times 10^7 M^{-1}$. Estes dados concordam com os dados determinados para as constantes de associação dímero-tetrâmero de *Crotalus durissus terrificus* ($1,5 \pm 0,24 \times 10^7 M^{-1}$), *Helicops modestus* ($1,6 \pm 0,17 \times 10^7 M^{-1}$) e humana ($2,0 \pm 0,2 \times 10^6 M^{-1}$).

O valor obtido para a constante de associação da Hb de *Boa constrictor*, permite estimar que a fração de dímeros dentro da hemácia seria de apenas 0,7%. Em condições experimentais (60 μ M) a fração de dímero seria de 4%.

Em um outro conjunto de dados, fizemos a análise da constante de associação da hemoglobina *stripped* de *Liophis miliaris*. Os dados revelaram que esta hemoglobina também possui volume de eluição próximo ao da forma

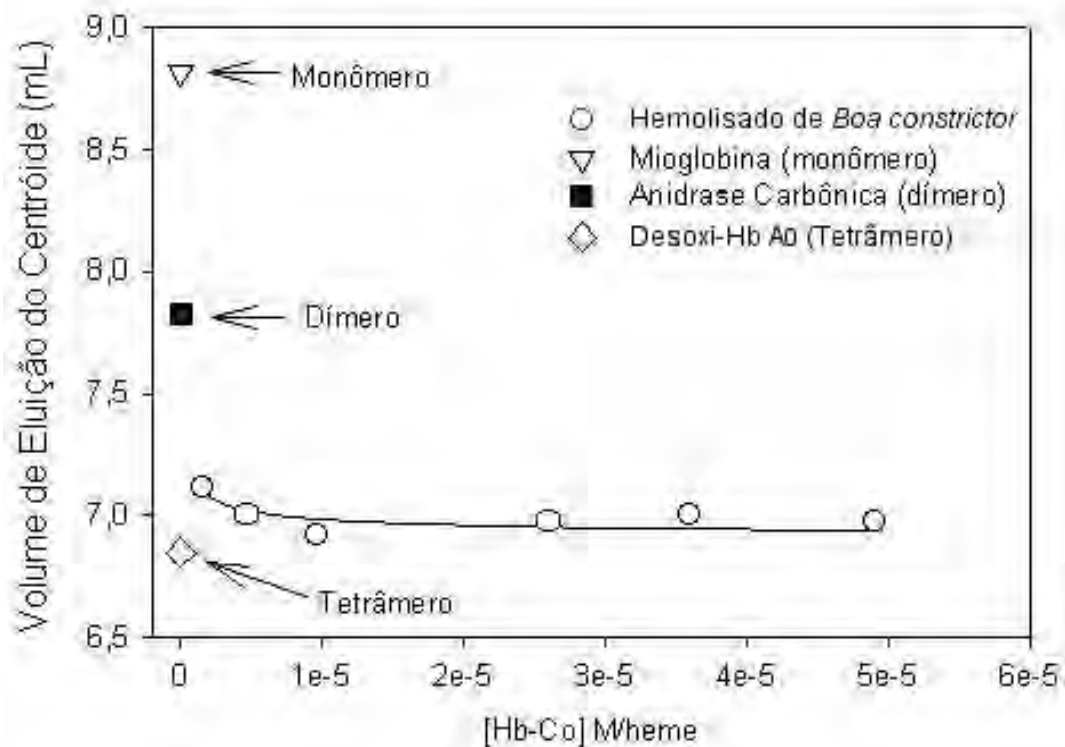


Figura 38. Comportamento do volume de eluição do hemolisado *stripped* de *Boa constrictor* em função da concentração de hemoglobina. Os experimentos foram realizados com tampão TAPS-NaOH 30 mM pH 8,0 a temperatura ambiente. A amostra de hemoglobina foi saturada com monóxido de carbono (CO). Figura gerada com o programa gráfico SigmaPlot versão 7.0

tetramérica, já que o volume de eluição do padrão de tetrâmeros (desoxi-hemoglobina humana com IHP e ditionito de sódio) foi de 6,49mL e o volume de eluição para a hemoglobina de *Liophis miliaris* foi em torno de 6,91mL até a concentração de 10 μ M.

Abaixo desta concentração há um aumento no volume de eluição como apresentado pelas outras hemoglobinas de serpentes. O volume de eluição para a espécie dimérica foi de 7,65mL (figura 39).

O valor da constante de associação dímero-tetrâmero obtido foi de $1,2 \pm 4 \times 10^6 \text{M}^{-6}$. O erro associado a estimativa da constante da hemoglobina de *Liophis miliaris* não nos agradou e, um segundo conjunto de dados foi estimado a fim de obtermos dados mais confiáveis. Aparentemente, houve uma alteração na coluna.

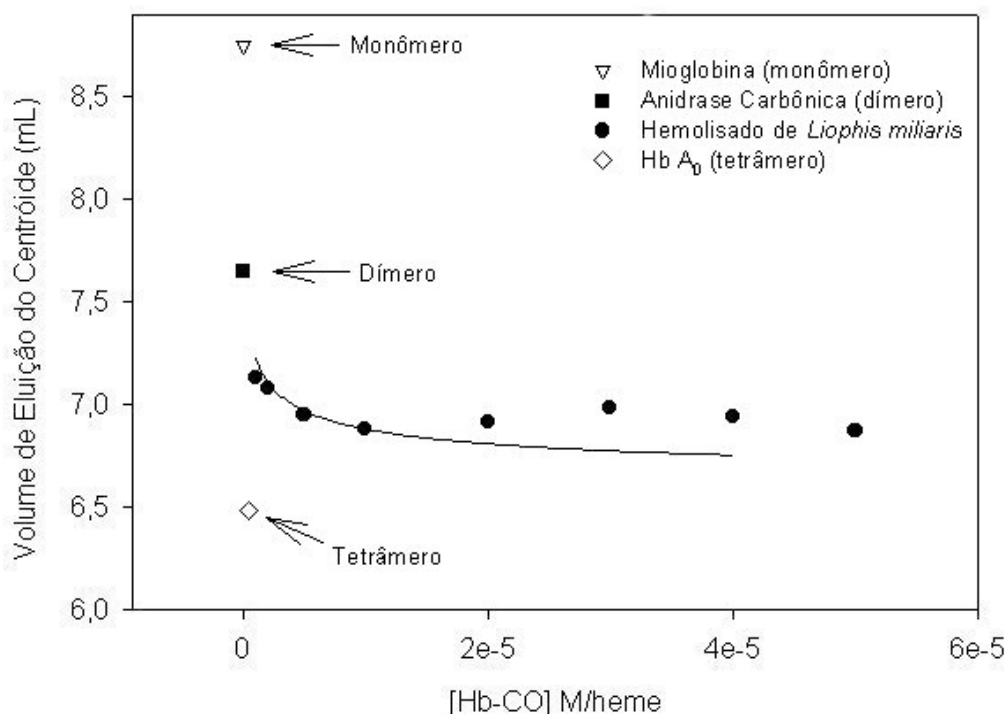


Figura 39. Comportamento de eluição do hemolisado de *Liophis miliaris* em função da concentração de hemoglobina (primeiro conjunto de dados). Os experimentos foram realizados com tampão TAPS-NaOH 30mM pH 8,0 a temperatura ambiente. A amostra foi saturada com monóxido de carbono (CO). Figura gerada com o programa gráfico SigmaPlot versão 7.0

Não foi possível confirmar o valor da Hb humana após as passagens da Hb de *Liophis miliaris*.

Neste segundo conjunto de dados, podemos observar que a hemoglobina de *Liophis miliaris* manteve o mesmo padrão de eluição apresentado no primeiro conjunto de dados (figura 40), eluindo próximo ao volume de eluição da forma tetramérica. O volume de eluição do tetrâmero (desoxi-Hb A₀) foi de 12,31mL (6µM), enquanto que a estimativa para eluição da forma dimérica eluiu com um volume de 14,22mL. A hemoglobina de *Liophis miliaris* apresentou em 44µM um volume de eluição do centróide de 12,33mL e, em 1µM de 12,68mL, como podemos observar na figura 40.

O valor da constante de associação dímero-tetrâmero, para este segundo conjunto de dados, foi de $2,89 \pm 0,35 \times 10^7 \text{M}^{-1}$. Este resultado corrobora os dados obtidos para as outras hemoglobinas de serpente, comprovando que estas hemoglobinas possuem uma estrutura quaternária tetramérica.

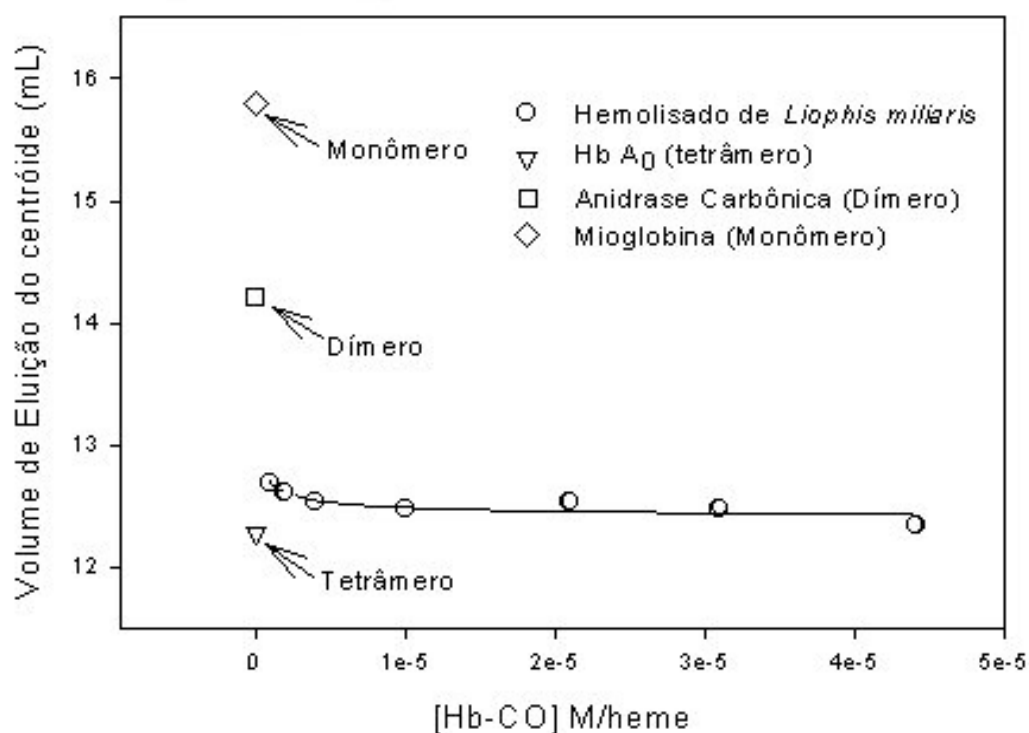


Figura 40. Comportamento do volume de eluição do hemolisado de *Liophis miliaris* em função da concentração de hemoglobina (segundo conjunto de dados). Os experimentos foram realizados em tampão TAPS-NaOH 30mM pH 8,0 a temperatura ambiente. A amostra foi saturada com monóxido de carbono (CO). Figura gerada com o programa gráfico SigmaPlot versão 7.0.

De posse do valor da constante de associação dímero-tetrâmero, podemos sugerir que em condições experimentais ($60 \mu\text{M}/\text{heme}$) apenas 2,5% da hemoglobina de *Liophis miliaris* esta na forma dimérica, enquanto que nas condições *in vivo*, ou seja, no interior das hemáceas, este número é de 0,4%.

IV.f. Coleta de Dados de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS)

As propostas elaboradas para Hb de *Liophis miliaris* e outras espécies sempre propuseram a existência de espécies diméricas predominantes na forma oxigenada, como mecanismo operacional *in vivo*. Por isso, decidimos fazer medidas de SAXS em amostras mais concentradas do que as usadas nas metodologias anteriores.

O raio de giro e a máxima dimensão de uma molécula são parâmetros importantes que caracterizam espécies moleculares com massas moleculares bem distintas, por exemplo, um tetrâmero de hemoglobina (64 KDa) e a sua forma dimérica (32 KDa).

Diante destes dados, foram realizados experimentos de SAXS para se tentar mostrar como as hemoglobinas de diferentes espécies de serpentes se comportam em solução, em dois pHs diferentes, pH 7,0 e 8,0, uma vez que consta na literatura que em pH 7,0 as hemoglobinas desses animais, estão na forma tetramérica e, em pH 8,0, na forma dimérica (Focesi, *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1989).

Os cálculos revelaram que a hemoglobina humana tetramérica possui um raio de giro de 23 Å e uma dimensão máxima de 63 Å. Para a forma dimérica encontramos um raio de giro de 17 Å e uma dimensão máxima de 50 Å, valores usados para comparação com os dados experimentais coletados para as hemoglobinas de serpentes.

A fim de ratificar os dados teóricos, realizamos a análise experimental da hemoglobina humana em pH 7,0 e 8,0. Os resultados obtidos experimentalmente concordam com os dados teóricos, já que o valor do raio de giro obtido foi de 23Å e a dimensão máxima da molécula foi de 63, nos dois pH analisados (Tabela 3).

A tabela 3 reúne os valores de raio de giro e dimensão máxima das hemoglobinas de serpentes (dados experimentais) e hemoglobina humana (dados teóricos e experimentais).

Como pode ser observado na tabela 3, os resultados mostram que os valores de raio de giro e dimensão máxima encontrados para as hemoglobinas de serpentes são muito semelhantes aos valores encontrados para a forma tetramérica da hemoglobina humana, corroborando com os dados obtidos para a constante de associação e propriedades funcionais de ligação de O₂, discutidos anteriormente.

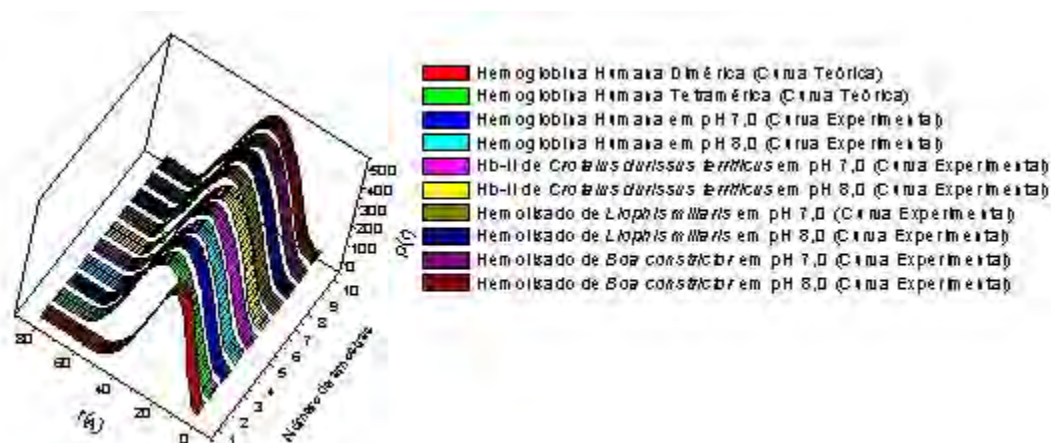


Figura 41. Figura ilustrando as funções de distribuição das distâncias $p(r)$ da hemoglobina humana dimérica (fita vermelha) e tetramérica (fita verde) (dados teóricos). São mostradas também as funções $p(r)$ obtidas experimentalmente para a hemoglobina humana em pH 7,0 (fita azul) e em pH 8,0 (fita azul claro), bem como para as hemoglobinas de serpentes. Osexperimentos foram realizados com tampão HEPES-NaOH 30mM pH 7,0 e 8,0 em temperatura ambiente. A concentração das amostras foi de 600 μ M. Todas as amostras foram saturadas com monóxido de carbono. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

A figura 41 mostra as funções de distribuição das distâncias $p(r)$ ⁴ das hemoglobinas das serpentes: *Crotalus durissus terrificus*, *Boa constrictor* e *Liophis miliaris*, comparada à função de distribuição da hemoglobina humana (Hb A₀).

⁴ $p(r)$ expressa a distância (r) entre dois pares de elétrons no interior de uma macromolécula. Contêm informações sobre a forma da macromolécula.

Os resultados revelaram que, tanto em pH 7,0 quanto em pH 8,0, as funções de distribuição das hemoglobinas de serpentes acompanham a função $p(r)$ da hemoglobina tetramérica, sendo que, a $p(r)$ da forma dimérica da hemoglobina humana fica bem deslocada à direita do gráfico, dando uma boa noção da diferença entre a forma dimérica e tetramérica (figura 41).

Os dados de raio de giro para a hemoglobina de *Helicops modestus* foram obtidos através do gráfico de Guinier, os resultados encontrados indicam que em pH 7,0 o raio de giro da hemoglobina de *Helicops modestus* é de 24,6Å e em pH 8,0 é de 25, corroboram com os valores encontrados para a hemoglobina humana e para as outras hemoglobinas de serpentes.

Tabela 3. Valores experimentais de raio de giro e dimensão máxima obtidos para as hemoglobinas de serpentes e humana (teóricos e experimentais), tanto pelo gráfico de Guinier quanto pela $p(r)$. Todos os experimentos foram realizados com as amostras na forma *stripped* (saturadas com monóxido de carbono) e em tampão HEPES-NaOH 30mM em pH 7,0 e 8,0. A concentração das amostras foi de 600µM.

Hemoglobina	pH	Raio de Giro (Å)		Dimensão Máxima (Å)	
		Guinier	$p(r)$	Teórico	Experim.
Humana Dimérica		-----	Teórico 17*	-----	Teórico 50*
		-----		-----	-----
Tetramérica	7,0		23*	23,2	63*
	8,0			22,9	63
Hb-II de <i>C. d. terrificus</i>	7,0	-----		22,6	63
	8,0	26,1		22,6	63
<i>Liophis miliaris</i>	7,0	-----		24,1	63
	8,0	-----		24,2	64
<i>Helicops modestus</i>	7,0	24,6	-----	-----	-----
	8,0	25	-----	-----	-----

<i>Boa constrictor</i>	7,0	25	23,2	63
	8,0	26,3	22,8	63

*Não foi considerado no cálculo teórico do raio de giro e máxima dimensão o pH, como indicado na tabela.

Com o intuito de verificarmos a confiabilidade de nossos dados calculamos os coeficientes de correlação entre as curvas teóricas e experimentais das hemoglobinas humana e de serpentes.

Primeiramente, comparamos as curvas teóricas (da hemoglobina tetramérica) com as curvas experimentais da hemoglobina humana. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram de 0,999 (em pH 7,0) e 0,997 (em pH 8,0), já que valores mais próximos de 1,0 indicam alta similaridade entre as curvas de SAXS.

A comparação entre as curvas da hemoglobina humana e as curvas da hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* forneceram coeficientes de correlação de 0,999 (em pH 7,0) e 0,998(em pH 8,0).

Os valores de coeficientes de correlação obtidos entre as curvas da hemoglobina humana e de *Boa constrictor* foram de 0,999 (em pH 7,0) e 0,998 (em pH 8,0). E para as curvas da hemoglobina humana e de *Liophis miliaris* foram de 0,994 (em pH 7,0) e 0,989 (em pH 8,0). Todos os valores obtidos de coeficiente de correlação estão expostos na tabela 4.

Tabela 4. Valores dos coeficientes de correlação obtidos após a comparação da $p(r)$ teórica da hemoglobina humana tetramérica com as $p(r)$ das hemoglobinas de serpentes obtidas experimentalmente.

Hemoglobina	pH	Coefficiente de Correlação
Humana Teórico/Humana experimental	7,0 8,0	0,999 0,997
Humana Teórico/Hb-II de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	7,0 8,0	0,999 0,998
Humana Teórico/Hemolisado de <i>Boa constrictor</i>	7,0 8,0	0,999 0,998
Humana Teórico/Hemolisado de <i>Liophis miliaris</i>	7,0 8,0	0,995 0,989

IV.g. Coleta dos Dados de Difração de Raios X da Hb-II de Crotalus durissus terrificus

Assim que conseguimos estabelecer um protocolo de purificação para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* iniciamos os experimentos de cristalização. No início, conseguimos alguns cristais, no entanto, o tamanho e a ordem interna dos mesmos impediram uma boa coleta de dados de difração de raios X.

Realizamos novos experimentos de cristalização adotando alguns procedimentos para estabilizar a proteína. Entre estes procedimentos podemos citar: 1- saturar a amostra de sangue, antes do rompimento das hemáceas, com monóxido de carbono (CO), 2- acrescentar inibidores de proteases, para evitar a degradação da proteína e, 3- adição de ácido iodoacético, para evitar a formação de aglomerados de hemoglobina, devido aos resíduos de cisteína livres na superfície da molécula.

Com esses procedimentos conseguimos obter pela primeira vez um padrão de difração de raios X dos cristais de Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*.

O cristal escolhido para os experimentos de difração de raios X tinha dimensões de 0,2x0,2x0,2mm. Este apresentou grupo espacial P2 ou P2₁ e era monoclinico.

Os parâmetros de cela foram de : $a=64,3\text{Å}$, $b=92,1\text{Å}$, $c=162\text{Å}$, $\beta=95,3^\circ$ e $\alpha=\gamma=90^\circ$. O volume da cela unitária estimado foi de $9,55 \times 10^5 \text{Å}^3$. Assumindo três tetrâmeros na unidade assimétrica, o valor do V_m calculado foi de $2,49 \text{Å}^3 \text{Da}^{-1}$ (Mathews, 1968). O conteúdo de solvente e a densidade do cristal foram de 50,6% e $1,18 \text{gcm}^{-3}$, respectivamente.

Os cristais de Hb-II, no início da coleta de dados de difração de raios X, difrataram a $3,0\text{Å}$, contudo, conforme o passar do tempo houve um decaimento na resolução dos dados. Tentamos, então, colocar os cristais em condições criogênicas, usando procedimentos de congelamento instantâneo (de Azevedo *et al.*, 1996; de Azevedo *et. al.*, 1997), que têm como objetivo aumentar o tempo de exposição do cristal sem que este sofra danos, no entanto, os resultados não foram favoráveis, pois os cristais não produziram difração. Sendo assim, só foi possível uma coletar um conjunto completo de dados a $4,5\text{Å}$ de resolução a 8°C . A tabela 5 ilustra a estatística da difração de raios X.

Tabela 5. Estatística da coleta de dados de difração de raios X para o cristal de Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*.

Faixa de Resolução (Å)	30,0 - 4,5
Número total de observações ($I > 1\sigma$)	17,076
Número de reflexões únicas	9,194
Completeza (%)	82,0
Redundância	1,86
I/σ total	7,19
* R_{merge} (%)	11,3
R_{merge} na mais alta camada de resolução (4,66 - 4,5 Å)	25,3
Completeza na mais alta camada de resolução (%)	85,8
Redundância na mais alta camada de resolução	1,8
I/σ na mais alta camada de resolução	3,32

* $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} [\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)] / \sum_{hkl,i} (I_{hkl,i})$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de reflexões com índices h, k e l e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades destas reflexões.

Em seguida, tentamos resolver a estrutura da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* pelo método padrão de substituição molecular usando o programa AMORé (Navaza, 1994). As coordenadas atômicas de oito hemoglobinas de peixes e uma de ave, depositadas no PDB (*Protein data Bank*), foram usadas como modelos para pesquisa.

Funções de rotação cruzada foram calculadas numa faixa de resolução de 10 - 4,5 Å usando passos de 2,5°. Estes cálculos foram realizados com raio de integração de 28 Å. As rotações que geraram os mais altos coeficientes de correlação (CC) foram aplicadas aos modelos e usados nos subseqüentes cálculos da função de translação, baseado em dados na mesma faixa de resolução. A substituição molecular usando nove modelos diferentes para pesquisa não produziu uma solução. Isto provavelmente ocorreu em virtude da alta resolução apresentada.

Conseguir cristais de hemoglobina não é uma tarefa muito difícil; entretanto, isto não se estende as Hbs de répteis, pois não consta nenhuma delas no PDB. Deve ficar claro que o uso do termo “baixa resolução” em cristalografia significa que a imagem obtida (mapa de densidade eletrônica) pode ser bem visualizada e com detalhes. Portanto, quando uma estrutura terciária é obtida à 1.8Å, diz-se que esta estrutura foi determinada em baixa resolução. Contudo, ao se obter uma estrutura terciária a 6Å, diz-se que esta estrutura foi obtida a alta resolução e, conseqüentemente, é impossível a visualização detalhada dos resíduos que constituem esta proteína e as possíveis interações existentes entre eles e outros compostos.

Realizamos vários outros experimentos de cristalização sem sucesso. Sendo assim, decidimos realizar a modelagem molecular da hemoglobina de *Liophis miliaris*, já que esta hemoglobina possuía seqüência primária depositada no banco de dados.

IV.h. Modelagem Molecular por Homologia da Hemoglobina de Liophis miliaris

Após análises funcionais, de cromatografia de filtração em gel e SAXS, verificamos que as hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus*, *Boa constrictor*, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris* apresentam-se como estruturas tetraméricas estáveis.

No entanto, a literatura relativa a estas hemoglobinas afirma que elas são diméricas no estado oxigenado. Esta afirmação se sustenta em dados de propriedades funcionais (Focesi *et al.*, 1987, 1992; Matsuura *et al.*, 1987) e pela análise da seqüência primária elaborada por Matsuura *et al.*, (1989), como já discutido na introdução.

Matsuura *et al.*, (1989) seqüenciaram duas cadeias de globinas de *Liophis miliaris* e, propuseram que na região de contato entre os dímeros (interface dimérica) $\alpha_1\beta_2$ há duas substituições na seqüência de aminoácidos. O resíduo Glu 43 β (CD2) é substituído por Thr e o resíduo Glu 101 β (G3) por Val. Sendo assim, a perda dessas duas cargas negativas na interface dimérica levaria à instabilidade do tetrâmero, favorecendo a formação de dímeros. Essa proposição atribui, implicitamente, um papel essencial a ambos os glutamatos na manutenção do arranjo tetramérico, por interações iônicas.

Com o intuito de comprovarmos os dados coletados experimentalmente durante o doutorado, realizamos uma modelagem molecular por homologia para a hemoglobina de *Liophis miliaris*, como apresentado acima.

Em seguida, decidimos comparar esta hemoglobina modelada com estruturas terciárias de hemoglobinas, comprovadamente tetraméricas, depositadas no PDB (*Protein Data Bank*).

Antes disso, realizamos uma análise de seqüência primária a fim de encontrarmos hemoglobinas com alta identidade em relação à hemoglobina de *Liophis miliaris*.

De posse dos resultados decidimos utilizar, para comparação com a nossa hemoglobina modelada, uma hemoglobina de *Gallus gallus* (ave), uma de peixe (truta - *Oncorhyncus mykiss*) e duas coordenadas tridimensionais diferentes de hemoglobina humana: 1- uma determinada em alta concentração de sal (1HHO) e outra em baixa concentração de sal (1BBB).

Os resultados obtidos da análise da seqüência primária estão resumidos na tabela 6.

Os resultados mostraram que a hemoglobina de *Gallus* é a que possui maior identidade com a hemoglobina de *Liophis miliaris*. A segunda hemoglobina com maior identidade foi a hemoglobina humana, seguida da hemoglobina de truta. Deve-

se ressaltar que todas as cadeias de hemoglobina apresentaram alta identidade (>50%) com as cadeias de globina de *Liophis miliaris*; isto reforça a idéia de que se as estruturas primárias são parecidas, as estruturas terciárias e quaternárias também o serão.

A única exceção foi a cadeia α da hemoglobina de truta, a qual apresentou 47% de identidade com a cadeia α de *Liophis miliaris*. No entanto, esta identidade ainda é considerada excelente, pois considera-se um bom template (modelo), para se modelar uma proteína, aquele que possui até 30% de identidade (comunicação pessoal do Prof. Dr. Walter F. De Azevedo Júnior⁵).

O modelo escolhido para a modelagem molecular da hemoglobina de *Liophis miliaris* foram as cadeias alfa e beta da hemoglobina D de *Gallus gallus* (1HBR) resolvidas a 2.3Å, uma vez que estas apresentaram 52% e 73% de identidade com as cadeias alfa e beta da hemoglobina de *Liophis miliaris*, respectivamente.

Este resultado torna o modelo confiável, uma vez que estruturas tridimensionais de proteínas da mesma família (como no caso hemoglobinas) são mais conservadas que suas seqüências primárias. Portanto, se há grande similaridade entre duas proteínas nas suas seqüências primárias, certamente uma alta similaridade para as estruturas tridimensionais pode ser assumida (Sanchez & Sali, 1997). A figura 42 mostra os alinhamentos feitos para as cadeias alfa e beta utilizando o programa MultAlin (Corpet, 1988). Os asteriscos ressaltam os resíduos de aminoácidos idênticos.

⁵ Co-orientador deste projeto e Professor no Departamento de Física da UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto - S.P.

Tabela 6. Dados comparativos sobre a porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos das hemoglobinas comparadas.

Espécies comparadas	Identidade (%)	
<i>Liophis miliaris/Gallus gallus</i>	cadeia α =52	Cadeia β =74
<i>Liophis miliaris/Oncorhyncus mykiss</i>	cadeia α =47	Cadeia β =53
<i>Liophis miliaris/Homo sapiens</i>	cadeia α =51	Cadeia β =66

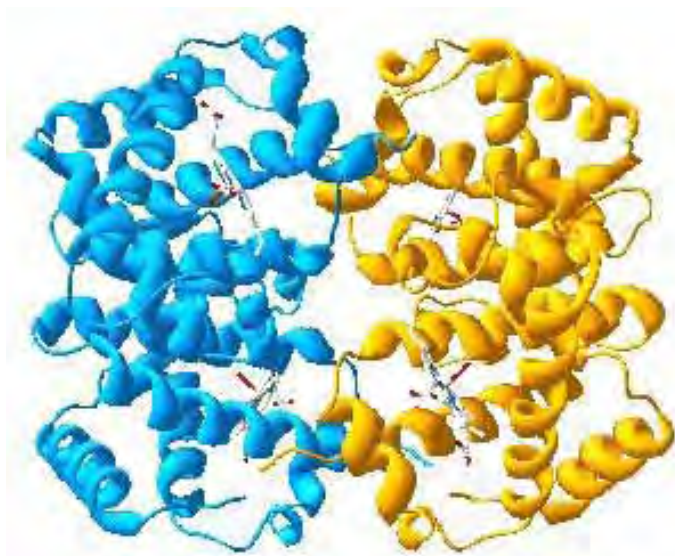


Figura 43. Ilustração do modelo proposto para a hemoglobina de *Liophis miliaris*, com base nas seqüências primárias obtidas por Matsuura et al., (1989). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

Já que nossos dados, tanto por filtração analítica em gel como por SAXS, confirmam a presença da forma tetramérica em solução, não existindo influência do pH, foi proposto um modelo de tetrâmero para a hemoglobina da serpente *Liophis miliaris* (figura 43), utilizando as seqüências de Matsuura *et al.*, (1989).

Para avaliar a qualidade do modelo gerado, utilizou-se o gráfico de Ramachandran. A análise deste gráfico, mostra que 91,5% dos resíduos de aminoácidos encontram-se nas regiões muito favoráveis, 8,1% em regiões permitidas e apenas 0,8% em regiões generosamente permitidas. Vale destacar que nenhum resíduo de aminoácido ocupou posições não permitidas, excetuando os resíduos de glicina (triângulos pretos) que devido à sua pequena cadeia lateral possui uma liberdade de ângulos phi e psi muito grande. A prolina também ocupa esta posição no gráfico devido a restrições estéricas da sua cadeia lateral cíclica, como pode ser observado na figura 44.

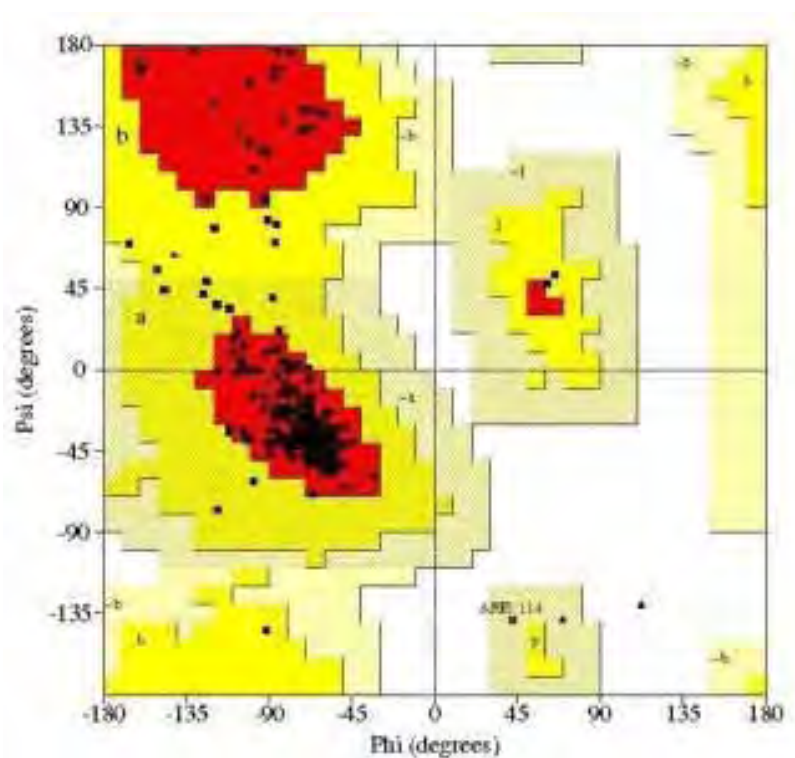


Figura 44. Gráfico de Ramachandran para o modelo de tetrâmero proposto para a hemoglobina de *Liophis miliaris*. Em vermelho estão as regiões muito favoráveis, em amarelo estão as regiões permitidas e, em amarelo claro estão as regiões generosamente permitidas. Em branco está a região não permitida. Os resíduos de glicina e prolina são mostrados como triângulos.

IV.i. Análise Estrutural da Molécula de Liophis miliaris Modelada

Após análise da seqüência primária, passamos a fase seguinte analisando a estrutura da oxi-hemoglobina modelada de *Liophis miliaris* e das oxi-hemoglobinas escolhidas para comparação. Nosso critério de análise centrou-se na interface dimérica e, mais especificadamente, nos resíduos de aminoácidos Glu 43(β) e Glu 101(β).

Os resultados mostraram que os resíduos Glu 43(β) e Glu 101(β) não fazem nenhum tipo de interação na interface dimérica das oxi-hemoglobinas analisadas. Com exceção da oxi-hemoglobina humana (1BBB), onde o resíduo de Glu 43(β) realiza uma ponte de hidrogênio com o NH₂ da Arg 92(α), o resíduo de Glu 101(β) não realiza nenhuma interação na interface dimérica.

Estes resultados sugerem que tais resíduos de aminoácidos não contribuem de forma significativa para a manutenção do tetrâmero na forma oxigenada. No item discussão, fazemos uma análise criteriosa da relação destes resíduos de aminoácidos com a interface dimérica, em todas as hemoglobinas citadas.

IV.j. Evidências da Existência de uma Transição Conformacional T-R na Forma stripped em Solução

A fim de testarmos se a hemoglobina de *Liophis miliaris* assume a conformação desoxigenada “T” na forma *stripped*, realizamos o seguinte experimento.

Medimos o espectro da oxi-hemoglobina *stripped* (sem ânions) na presença de tampão HEPES-NaOH 30mM, pH 7,5. Em seguida, iniciamos a desoxigenação da hemoglobina de *Liophis miliaris* e, após 10 minutos, realizamos a leitura do espectro da desoxi-hemoglobina. Por fim, subtraímos o espectro da oxi-hemoglobina em relação ao da desoxi-hemoglobina.

Os resultados mostraram que a oxi-hemoglobina de *Liophis miliaris* sofre mudanças conformacionais $T \Rightarrow R$ durante o processo de oxigenação. A figura 45 destaca a área indicada que aparece somente no espectro de diferença (Abs oxi-Hb - Abs desóxi-Hb). A linha reta representada no gráfico ao longo do eixo $y=0$, mostra que o espectro da conformação oxi não varia.

A banda de absorção observada em 290nm (figura 45) representa a exposição de resíduos de aminoácidos aromáticos (Tyr 42 α , Trp 37(β) e Phe 41(β)) durante

o processo de oxigenação da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, indicando

transição alostérica na Hb-II.

Isto só ocorreria em hemoglobinas tetraméricas.

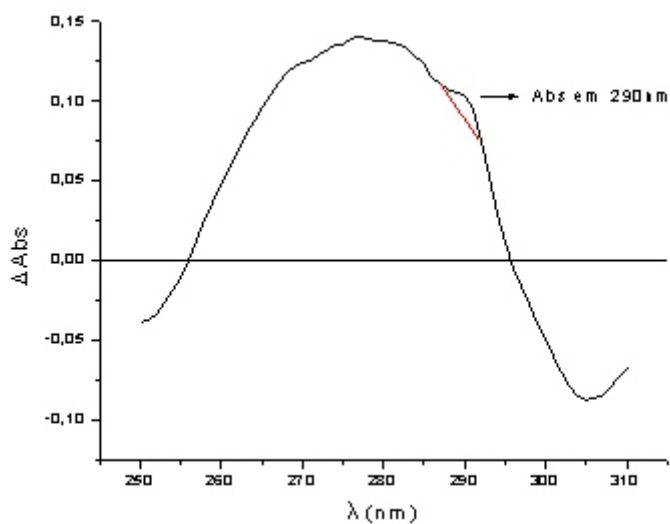


Figura 45. Diferença de absorção entre as formas desoxi e oxigenada da hemoglobina de *Liophis miliaris*. O pico em 290nm representa a diferença de absorção entre os estados conformacionais T e R. Figura gerada com o programa gráfico Origin versão 6.0.

V. DISCUSSÃO

V.a. Padrão Eletroforético

O hemolisado de *Crotalus durissus terrificus*, como mostrado em resultados, é composto por sete frações de hemoglobina, sendo que o segundo componente (Hb-II) é a fração principal.

A presença de várias isoformas é comum em serpentes, como mostrado na literatura. Focesi *et al.*, (1987) encontraram para a serpente semi-aquática, *Liophis miliaris*, que o sangue total desta espécie é composto por duas frações de hemoglobina. Dados semelhantes foram descritos para as serpentes *Bothrops alternatus*, *Mastigodryas bifossatus* e *Laticauda laticaudata*, onde se constatou também a presença de dois componentes hemoglobínicos presentes no hemolisado destes animais. O método de análise utilizado foi gel de poliacrilamida (Oyama *et al.*, 1993; Bonilla *et al.*, 1994; Eguchi & Eguchi, 2002).

Seymor *et al.*, (1981), utilizando IEF como método de análise de padrão eletroforético, investigaram o hemolisado da serpente aquática *Acrochordus arafurae* e encontraram que este é composto por quatro frações de hemoglobina.

Análises por IEF, em nosso laboratório, com o hemolisado do sangue das serpentes *Helicops modestus*, *Liophis miliaris* e *Bothrops alternatus*, mostraram que o sangue total destas serpentes possui quatro, seis e quatro frações de hemoglobinas, respectivamente. A heterogeneidade pode sofrer alterações devido ao polimorfismo intraespecífico, variação pelo sexo, idade, época do ano, etc.

Aparentemente, o número de frações de hemoglobina também pode depender do método de análise utilizado, onde eletroforeses utilizando IEF parecem ser mais sensíveis do que gel de poliacrilamida.

Isto é conseqüência da proximidade que existe entre o pI das frações que constituem o sangue total destes animais. A diferença de pI de uma fração para outra pode ser de 0,05 unidades ou ainda menor.

Sendo assim, o gel de poliacrilamida não possui capacidade suficiente para discriminar frações com pI tão próximos. Já no gel de IEF o mesmo não ocorre, pois o gel de IEF é confeccionado com substâncias (anfólitos) que induzem a formação de um gradiente de pH. O gradiente de pH formado é extremamente restrito, podendo diferenciar proteínas com até 0,02 unidades nos seus pI.

Tal sensibilidade obriga a estabilizar as amostras com monóxido de carbono, para evitar o aparecimento de bandas devido à auto-oxidação.

Pérez *et al.*, (1995) analisaram o hemolisado de centenas de espécies de peixes utilizando gel de amido e poliacrilamida. Os resultados mostraram que o número de frações encontradas no gel de amido foi sempre superior ao número de frações encontradas no gel de poliacrilamida, confirmando a dependência dos achados em relação à metodologia.

A presença de várias isoformas de hemoglobina nas hemáceas destes animais pode estar relacionada com a prevenção da precipitação da desoxi-hemoglobina (uma vez que a desoxi-hemoglobina é menos solúvel que a oxi-hemoglobina), quando o animal é submetido a um ambiente de hipóxia (Weber, 1990).

Sugere-se, também, que pode ocorrer uma vantagem adaptativa para suportar mudanças ambientais e/ou fisiológicas (Powers, 1980), ou mesmo, ser vestígios evolutivos, os quais têm pouca ou nenhuma conseqüência para o animal (Kimura, 1989).

V.b. Propriedades Funcionais

Como já discutido anteriormente, as hemoglobinas de serpentes são descritas, na literatura, como moléculas que, na ausência de fosfatos orgânicos, possuem alta afinidade por O₂, baixo ou nenhum efeito Bohr alcalino (acima de pH 8,0) e ausência de cooperatividade de ligação de O₂.

Coefficiente de Hill igual a 1,0 caracterizaria processo não cooperativo de ligação de O₂, tal como, apresentado pela mioglobina, que é uma molécula monomérica.

Entretanto, quando fosfatos orgânicos são adicionados à solução de hemoglobina, observa-se uma acentuada diminuição na afinidade por O₂, um efeito Bohr alcalino torna-se evidente e ocorre aumento da cooperatividade. (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Focesi *et al.*, 1990; Bonafé *et al.*, 1999).

As propriedades funcionais de ligação de O₂ das hemoglobinas de *Crotalus durissus terrificus* e *Helicops modestus* também mostram alta afinidade por O₂ e ausência de efeito Bohr alcalino (acima de pH 8,0), mas não apresentam ausência de cooperatividade.

Tanto a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* como o hemolisado de *Helicops modestus* apresentaram coeficiente de Hill (n_H) superior a $n_H=1,0$, indicando presença de cooperatividade de ligação de O₂ (figuras 25 e 29, respectivamente).

Focesi *et al.*, (1987) propuseram que a hemoglobina de *Liophis miliaris*, na forma *stripped* (sem cloreto e ATP), acima de pH 8,0, sofre dissociação dependente da oxigenação. Os pesquisadores sustentam esta proposta através de dados funcionais desta proteína, onde eles mostraram que existe ausência de efeito Bohr e cooperatividade.

Contudo, a hemoglobina *stripped* de *Liophis miliaris* apresenta efeito Bohr alcalino, entre pH 7,0 e 8,0. Este efeito Bohr também foi descrito para os componentes Hb-I e Hb-II (na forma *stripped*) de *Bothrops alternatus* ($\Delta H^+ = -0,38$) (Oyama *et al.*, 1993) e *Mastigodryas bifossatus* ($\Delta H^+ = -0,30$) (Bonilla *et al.*, 1994).

Focesi *et al.*, (1987) sugeriram que a presença deste efeito Bohr alcalino, observado na forma *stripped*, pode ser explicado pela transição do desoxi-tetrâmero à oxidímero durante o processo de oxigenação, pois espécies diméricas têm como características funcionais ausência de cooperatividade e ausência de efeito Bohr (Atha & Riggs, 1976; Bonafé *et al.*, 1999).

Entretanto, o sequenciamento das quatro cadeias globínicas de *Liophis miliaris* (A($\beta^{1,Lm}$), B($\alpha^{1,Lm}$), C($\alpha^{2,Lm}$) e D($\beta^{2,Lm}$)) (Matsuura *et al.*, 1989; Padovan, 1996) mostraram que os principais resíduos responsáveis pelo efeito Bohr alcalino (His 146 (β), Asp 94 (β) e Val 1 (α)) (Ho & Russu, 1987) estão conservados na hemoglobina desta serpente.

Portanto, o efeito Bohr encontrado por Focesi *et al.*, (1987), na hemoglobina de *Liophis miliaris*, não é em consequência da transição do desoxi-tetrâmero à oxidímero, mas sim devido à presença dos resíduos de aminoácidos responsáveis por este efeito.

A ausência de efeito Bohr também não é uma propriedade exclusiva de hemoglobinas diméricas. Quando Smarra (1997) estudou as propriedades funcionais de ligação de O₂ da Hb-I de *Lioposarcus anisitsi* (cascudo), constatou que a forma *stripped* desta hemoglobina não possuía efeito Bohr alcalino, em toda a faixa de pH estudada (pH 6,5 a 9,0) e, que a cooperatividade em pH 8,5 era de $n_H = 1,2$.

Quando analisada por cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-75), calibrada com hemoglobina humana e outras proteínas de massa molecular conhecida, mostrou-se que a Hb-I de *Liposarcus anisitsi* possui um volume de

eluição próximo ao volume de eluição da hemoglobina humana, o que comprova que esta hemoglobina possui uma estrutura tetramérica estável.

Embora a Hb-I do cascudo possua como características funcionais baixa cooperatividade e ausência de efeito Bohr alcalino (características de espécies diméricas) estas propriedades por si só não sustentam a idéia de que tal hemoglobina seja propensa a dissociação durante o processo de oxigenação.

O mais interessante desses dados foi a possibilidade de compará-los com os apresentados por Bonafé *et al.*, (1999).

Os dados de P_{50} apresentados por eles mostraram uma semelhança com os nossos, quando se diz respeito à presença de ATP. No entanto, na forma *stripped*, os dados apresentados por Bonafé *et al.*, (1999) mostraram que o hemolisado de *H. modestus* não responde a uma variação do pH a 20°C (efeito Bohr ausente), sendo que a P_{50} fica próxima a 1mmHg em toda a faixa de pH analisada.

Os dados apresentados em nosso trabalho, mostram um efeito Bohr alcalino evidente e os valores de P_{50} caem de $1,16 \pm 0,04$ mmHg, em pH 7,0, para $0,3 \pm 0,02$ mmHg, em pH 8,0. Fica claro, dessa forma, que há uma resposta da forma *stripped* à concentração de prótons (presença de alosterismo). Devemos ressaltar que a porcentagem de meta-Hb foi monitorada antes e após cada experimento, e os valores de meta-Hb não ultrapassaram 3%.

Isto é resultado de uma postura rígida adotada pelo grupo com respeito ao controle de meta-Hb durante os experimentos. A chegada de um aparelho de água ultrapura ELGA Scientific, que possibilita a retirada de íons, os quais contribuem para a formação de meta-Hb, também foi imprescindível para os bons resultados alcançados. A tudo isso, soma-se o uso de nitrogênio de altíssima pureza, que possibilita a rápida obtenção da forma desoxigenada, em dois ou três minutos.

A cooperatividade apresentada em nossos experimentos também se diferencia bastante em relação aos dados apresentados por Bonafé *et al.*, (1999).

Nas três condições analisadas (*stripped*, com cloreto e ATP), observamos processo cooperativo de ligação de O₂, em toda a faixa analisada de pH. Os dados mais significativos são os da forma *stripped*, entre pH 7 e 7,5, nossos dados apresentaram cooperatividade de $2,58 \pm 0,1$ e $2,31 \pm 0,07$. Segundo Bonafé *et al.*, (1999) a forma *stripped* do hemolisado total de *H. modestus* não responde cooperativamente em toda a faixa de pH analisada (entre 7,0 a 9,0).

Outro dado de grande importância, diz respeito à cooperatividade na presença de ATP, acima de pH 8,0. Em nossos dados, observamos uma cooperatividade de $2,12 \pm 0,11$ (pH 8,5) e $1,87 \pm 0,03$ (pH 9,0). Bonafé *et al.*, (1999) encontraram ausência de cooperatividade ($n_H=1$), entre pH 8,0 e 9,0.

Bonafé *et al.*, (1999) propõem que os dados relatados por eles são compatíveis com a presença de dímeros em solução tanto na ausência como na presença de ATP. Nossos dados vêm em direção oposta aos apresentados pelos pesquisadores citados. Na verdade, nossos dados funcionais sustentam a presença de formas tetraméricas em solução.

Nossos dados funcionais concordam com os apresentados por Sullivan, (1967), os quais estudaram as propriedades funcionais da serpente aquática *Natrix taxispilota*. Os resultados obtidos mostraram que o hemolisado *stripped* desta serpente possui alta afinidade por O₂, efeito Bohr alcalino (entre pH 7,0 e 8,0) e cooperatividade igual a 2,0, em pH 8,0.

Em relação à Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, os dados de titulação com ATP indicam a presença de um sítio de ligação de ATP por tetrâmero. O valor obtido para a constante de associação de ATP à forma desoxigenada (K_D) foi de $4,6 \pm 0,77 \times 10^5 M^{-1}$. Este valor é cerca de dez vezes maior em relação ao respectivo valor para K_D da hemoglobina humana ($K_D=10^4 M^{-1}$) (de Rosa *et al.*, 1998), sugerindo que o ATP se liga à Hb-II mais fortemente do que à hemoglobina humana.

No entanto, quando comparamos o K_D da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* com os K_D obtidos por Bonilla *et al.*, (1994B) para *Liophis miliaris*, *Bothrops alternatus* ($10^6 M^{-1}$) e *Boa constrictor* ($K_D=10^7 M^{-1}$), constatamos que as constantes de associação de ATP à forma desoxigenada são cerca de 10 e 100 vezes maior em relação à Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, sugerindo uma maior afinidade dessas hemoglobinas pelo ATP.

O valor encontrado para a constante de associação de ATP à forma oxigenada (K_O) foi de $1,66 \pm 0,57 \times 10^2 M^{-1}$, este valor está de acordo com o relatado para o K_O da oxi-hemoglobina humana ($K_O=10^2 M^{-1}$) (de Rosa *et al.*, 1998) e para K_O das hemoglobinas de *Liophis miliaris* e *Boa constrictor* ($10^2 M^{-1}$) (Bonilla *et al.*, 1994B).

A influência de ânions nas propriedades funcionais e na estrutura da hemoglobina tem sido estudada por Colombo *et al.*, (1992; 96) usando o método de estresse osmótico, o qual permite determinar o número de moléculas de água que se ligam à hemoglobina durante o processo de oxigenação.

A mudança de hidratação entre os estados T e R da hemoglobina, reflete diferenças nos estados conformacionais das formas oxigenada e desoxigenada, podendo dessa forma nos fornecer informações sobre mudanças conformacionais durante a ligação de O_2 .

Conforme Colombo e Seixas (1999) descreveram para a hemoglobina humana, os dados referentes à Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* e ao hemolisado de *Helicops modestus*, sugerem que, na ausência de cloreto, estas hemoglobinas assumem um novo estado conformacional, denominado estado T_0 .

Este novo estado conformacional T_0 seria uma estrutura intermediária entre as formas desoxigenada (T_x) e oxigenada (R) da hemoglobina. Portanto, a desoxi-hemoglobina coexistiria em duas conformações alostéricas, o estado T_x e o estado T_0 , que dependeria da presença ou não de cloreto (Colombo e Seixas, 1999).

Isto fica claro, quando observamos os resultados obtidos para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* e para o hemolisado de *H. modestus*, na ausência de cloreto. A Hb-II apresentou uma variação de hidratação de 36 ± 7 moléculas de água e o hemolisado de *H. modestus* 24 ± 7 moléculas de água, durante o processo de oxigenação. Colombo e Seixas, (1999) obtiveram aproximadamente 25 moléculas de água.

Entretanto, quando cloreto foi adicionado à solução de hemoglobina, o comportamento de hidratação da molécula é alterado. Em concentrações acima de 50mM de cloreto, a molécula não mais assume o estado T_0 , mas sim a conformação T_x ; tal suposição é comprovada pela variação de hidratação da hemoglobina humana, que foi de 70 moléculas de água na presença de NaCl 100mM (Colombo e Seixas, 1999).

Em nossos experimentos, com a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* (52 ± 10 molec. de água) e o hemolisado de *H. modestus* (56 ± 4 molec. de água), observamos resultados semelhantes ao da hemoglobina humana, na mesma concentração de sal.

Com o ânion BPG (para hemoglobina humana) ocorre basicamente o mesmo comportamento. Até $50 \mu\text{M}$ de BPG, Tosqui *et al.*, (2000), observaram que 70 moléculas de água se ligam à forma oxigenada durante o processo de oxigenação da hemoglobina humana. Acima de $500 \mu\text{M}$ de BPG, eles passaram a observar que 45 moléculas de água se ligavam à hemoglobina humana, indicando que, nestas condições, o BPG se liga à oxi-hemoglobina, estabilizando esta forma em um estado conformacional similar ao estado desoxigenado.

Tal comportamento de hidratação, na presença de fosfato orgânico (para serpentes ATP) também foi observado para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*. Determinamos que 45 ± 11 molécula de água se ligam a oxi-hemoglobina desta

serpente. Contudo, para o hemolisado de *H. modestus* observamos que apenas 20 ± 2 moléculas de água se ligam à oxi-hemoglobina.

A análise estatística realizada através da comparação das inclinações para a Hb-II de *Crotalus durissus terrificus*, mostra que as diferenças entre as inclinações da forma *stripped* com aquelas na presença de cloreto e ATP não são significativas. Isto se deve pela pouca linearidade dos dados em valores de atividade de água elevados, principalmente para as condições *stripped* e na presença de ATP.

A análise estatística aplicada ao hemolisado de *Helicops modestus*, mostra que não há diferenças significativas de inclinação entre o conjunto *stripped* e aquele na presença de ATP, o que confirma o resultado encontrado por nós através do Δn_w (Tabela 2).

A comparação entre a forma *stripped* e na presença de cloreto, sugere que há diferença significativa entre as inclinações destas duas condições, confirmando a influência do íon cloreto em promover mudanças conformacionais, como encontrado por Colombo & Seixas, (1999).

O comportamento da variação de hidratação do hemolisado de *Liophis miliaris* mostrou diferenças em relação às hemoglobinas de serpentes e hemoglobina humana.

De uma maneira geral, os dados obtidos sugerem que a hemoglobina desta serpente não assume o estado T_0 na ausência de cloreto. Na verdade, o número de 62 ± 4 moléculas de água obtido para o hemolisado de *Liophis miliaris*, na ausência de cloreto, está próximo das 70 moléculas de água obtidas para a hemoglobina humana, na presença de cloreto.

A hemoglobina humana, na presença de cloreto, quando é desoxigenada assume a conformação T_x e, quando novamente oxigenada, assume a conformação R clássica, com uma variação de 70 moléculas de água, como já discutido acima.

Os dados de estresse osmótico também reforçam a idéia de que as hemoglobinas destas serpentes são tetrâmeros estáveis, já que o número de moléculas de água associado às mudanças conformacionais são muito próximos aos da hemoglobina humana e, além de que, a ligação de O₂ sempre foi cooperativa.

Müller *et al.*, (2003) analisaram o comportamento da variação de hidratação das hemoglobinas Hb-II e Hb-III do peixe bruxa (*Myxine glutinosa*) pelo método de estresse osmótico. As hemoglobinas Hb-II e Hb-III são monoméricas quando no estado oxigenado, contudo, ao serem desoxigenadas elas se associam formando uma hemoglobina dimérica (Hb-II+Hb-III).

Os resultados mostraram que nestas hemoglobinas as moléculas de água se ligam majoritariamente à forma desoxigenada e não à forma oxigenada como na hemoglobina humana e de serpentes. O número de moléculas de água que se ligaram ao desoxi-dímero de peixe bruxa (Hb-II+Hb-III) foi de $3,54 \pm 2,7$ moléculas de água (Müller *et al.*, 2003), sendo um número bem inferior ao apresentado pelas hemoglobinas de serpente.

A comparação estatística das inclinações, para o hemolisado de *Liophis miliaris*, corroboram com os dados encontrados para o Δn_w desta hemoglobina.

V.c. Constante de Associação Dímero-Tetrâmero do Estado Ligado

O mecanismo de transporte de O₂ proposto para *Liophis miliaris* e outras serpentes envolve transições entre oxi-dímeros e desoxi-tetrâmeros, como discutido anteriormente.

Os pesquisadores que propuseram tal mecanismo sustentam seus argumentos a partir de dados funcionais de ligação de O₂ e determinações de massa molecular por cromatografia de filtração em gel, utilizando pequenos volumes de amostra

(Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Focesi *et al.*, 1990 A,B; Oyama *et al.*, 1993; Bonilla *et al.*, 1994 A,B; Bonafé *et al.*, 1999).

A metodologia antes citada promove a diluição progressiva da amostra conforme ela migra ao longo da coluna, não permitindo controlar a concentração da amostra. Em particular a Sephadex G-100, resina usada naquelas medidas, promove significativamente a diluição da Hb.

Contudo, apesar de considerarem o mecanismo uma propriedade operacional em condições fisiológicas, nunca houve uma abordagem, por parte de tais pesquisadores, de se tentar quantificar a presença de dímeros e/ou tetrâmeros em solução, através da determinação da constante de associação dímero-tetrâmero do estado ligado (4K_2).

Neste trabalho, obtivemos a constante de associação do estado ligado para as hemoglobinas de quatro espécies de serpentes : 1- *Crotalus durissus terrificus*, 2- *Helicops modestus*, 3- *Boa constrictor* e 4- *Liophis miliaris*. Não é possível, por este método, fazer a estimativa da constante de associação para o estado desoxigenado (0K_2), por este ser significativamente maior e fora da resolução que poderia ser atingida. Para a determinação de 0K_2 deveria ser usada a haptoglobina (referencia metodos enzimology vol 76)

A cromatografia analítica de filtração em gel conhecida em inglês como “large zone gel filtration” e idealizada pelo Dr. Gary Ackers, baseia-se na aplicação de volumes saturantes de amostra de forma a estabilizar o equilíbrio dímero/tetrâmero. Na medida em que várias concentrações são aplicadas, o volume de eluição de cada amostra reflete o equilíbrio entre as formas dimérica e tetramérica, dado pela equação 29, na qual fica claro que a fração de dímeros aumenta proporcionalmente à diluição da amostra.

Ou seja, esta metodologia permite controlar a diluição da amostra ao induzir um “steady-state” e determinar a fração de dímeros e tetrâmeros derivada da concentração da proteína.

Nossos resultados indicam que as constantes de associação obtidas para as quatro espécies de serpentes possuem valores superiores aos encontrados para a hemoglobina humana, a qual é uma proteína comprovadamente tetramérica.

Estimativas da constante de associação para a hemoglobina humana, realizada por nós, resultou num valor de $2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$, corroborando com valores reportados na literatura por Nenortas & Beckett (1994), os quais obtiveram um valor de 4K_2 de $1,2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$.

Nossos resultados indicam que tais hemoglobinas são formas tetraméricas mais estáveis, em solução, do que a própria hemoglobina humana.

Yamaguchi & Adachi (2002), estudaram o comportamento de dissociação das hemoglobinas humana normal (Hb A₀) e fetal (Hb F), através de um sistema de espalhamento de luz. Eles encontraram que a hemoglobina fetal dissocia-se bem menos em dímeros do que a hemoglobina humana normal. O valor da constante de dissociação (K_D) da Hb F foi de $0,66 \times 10^{-6} \text{M}$ e para a Hb A₀ foi de $2,58 \times 10^{-6} \text{M}$, reforçando nossos resultados.

Imamura & Yanase (1978) estudaram o comportamento de eluição da hemoglobina Hirose, a qual possui uma substituição Trp 37(β) \Rightarrow Ser e apresenta um altíssimo grau de dimerização no estado oxigenado. Eles estimaram que a constante de dissociação da oxi-hemoglobina Hirose situa-se por volta de 1,0M, tamanho é o grau de dissociação desta proteína.

Sabe-se que a desoxi-hemoglobina humana dissocia-se muito pouco, principalmente na presença de fosfatos orgânicos (Chu & Ackers, 1981). Imamura & Yanase, (1978) mostraram que a Hb Hirose possui grande propensão em dissociar-se medindo a constante de dissociação para a forma desoxigenada.

O valor da constante de dissociação obtido, por eles, para a forma desoxigenada, foi de $1,2 \times 10^{-6} \text{M}$, o qual está próximo do valor da constante de dissociação da oxi-hemoglobina humana (Manning *et al.*, 1996) e não da desoxi-hemoglobina ($K_D = 5 \times 10^{-10} \text{M}$) (Chu & Ackers, 1981; Turner *et al.*, 1981).

Assim como a Hb Hirose, a hemoglobina Rothschild (Trp 37(β) \Rightarrow Arg) também apresenta-se totalmente na forma dimérica quando oxigenada, como já exposto na Introdução. Isto sugere um papel importante do resíduo Trp 37(β) na manutenção do tetrâmero de hemoglobina.

Através de estudos de mutação sítio-dirigida, Yanase *et al.*, (1994) expressaram uma hemoglobina mutante Asp 99(β) \Rightarrow Lys, a qual apresentou grande susceptibilidade para a dissociação em dímeros. Enquanto a desoxi-hemoglobina humana apresentava 19% de dímeros em uma solução de concentração $2 \mu\text{M}$, a Hb mutante possuía 71% de dímeros, na mesma concentração. Este resultado reflete a importância do resíduo Asp 99 na manutenção do tetrâmero de hemoglobina, como proposto para o resíduo de Trp 37(β).

De posse das constantes de associação dímero-tetrâmero foi possível estimarmos a porcentagem de tetrâmeros e dímeros *in vitro* e *in vivo*. Nas condições experimentais utilizadas para os experimentos funcionais (*in vitro*, $60 \mu\text{M}$), a espécie que apresentou menor porcentagem de dímeros em solução foi a serpente semi-aquática *Liophis miliaris* (2,5%), seguida da serpente *Helicops modestus* (3,2%), Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* (3,3%) e, por último, *Boa constrictor* (4%). *In vivo*, ou seja, no interior das hemáceas em uma concentração aproximada de 5mM (Sode, 1991), todas as espécies apresentariam porcentagem de dímeros por volta de 0,5%.

Supondo que a constante de associação dímero-tetrâmero do estado ligado fosse muito menor (10^3M^{-1}) da encontrada para as hemoglobinas de serpentes e humana, a porcentagem de dímeros *in vivo* seria de 33%.

Dumoulin *et al.*, (1997) estudaram o comportamento de dissociação das hemoglobinas humana (Hb A₀) e fetal (Hb F). Eles encontraram que a Hb A₀ possui 40% e Hb F 80% de tetrâmeros em solução com concentração de 1 μM. Nesta concentração, as hemoglobinas de serpente apresentariam: 1- Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* 77%, *Helicops modestus* 73%, *Boa constrictor* 78% e *Liophis miliaris* 83% de tetrâmeros em solução.

As hemoglobinas de serpente são também formas tetraméricas mais estáveis do que a hemoglobina S, a qual apresentou em torno de 65% de tetrâmeros na concentração de 1 μM (Manning *et al.*, 1996).

Os experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo foram realizados com o intuito de confirmarmos, através de uma outra técnica, os dados encontrados por cromatografia analítica de filtração em gel, já que a técnica de SAXS nos permitiria constatar, com confiabilidade, a presença de tetrâmeros ou dímeros em solução numa concentração maior e mais próxima às condições encontradas *in vivo*, pois as propostas formuladas para a Hb de *Liophis miliaris* e outras espécies sempre postularam a existência de dímeros oxigenados e tetrâmeros desoxigenados, em um mecanismo operacional *in vivo* de “tudo ou nada”.

A Hb Kansas, que apresenta a substituição, na interface $\alpha_1\beta_2$, $\beta 102$ Asn \Rightarrow Thr, na concentração de 1 mM apresenta em torno de 25% de dímeros, e em 0,1 mM, aproximadamente 50% dessa forma (Atha *et al.*, 1979).

Devemos ressaltar que a vantagem principal desta técnica é a possibilidade de analisar macromoléculas biológicas em condições próximas às fisiológicas ou mesmo em uma condição desejada de pH, concentração salina, presença ou não de cofatores, efetores alostéricos, etc (Svergun *et al.*, 2000).

As curvas de SAXS mostram que as hemoglobinas humana e de serpentes possuem raios de giro e dimensão máxima muito próximos, o que caracteriza, portanto, a presença de tetrâmeros de hemoglobina.

Sendo assim, os resultados obtidos a partir das propriedades funcionais, por cromatografia analítica de filtração em gel e SAXS, mostram um quadro que sustenta que o equilíbrio dímero-tetrâmero nas hemoglobinas de serpentes está deslocado para a forma tetramérica.

Faltava, contudo, elucidar qual a base estrutural da manutenção do tetrâmero, uma vez que o modelo estrutural de dissociação proposto para a hemoglobina de *Liophis miliaris* não mais se sustenta, com base nos resultados obtidos. Sugerimos, a seguir, uma explicação estrutural para tal questão.

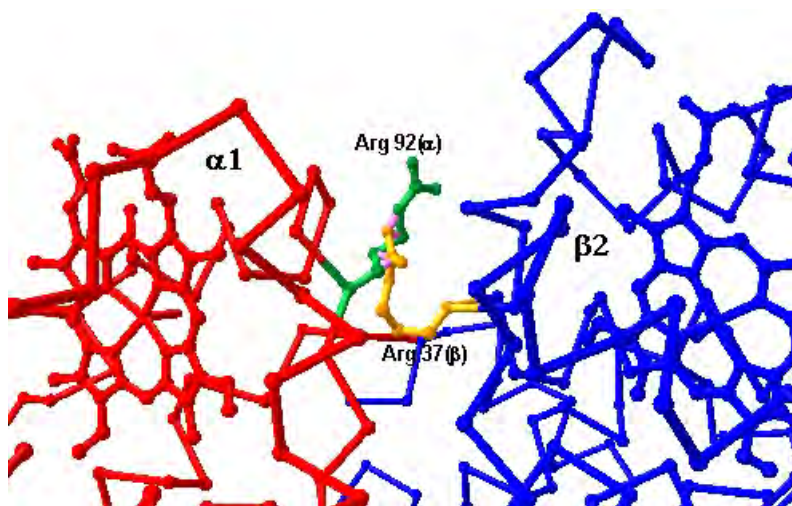


Figura 46. Figura ilustrativa da interface dimérica da hemoglobina Rothschild. Observamos os choques estéricos (linhas lilás) que ocorreriam entre a Arg 37(β) (alaranjado) e Arg 92(α) (verde) na oxi-hemoglobina Rothschild. A figura foi gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público, como forma de ilustrar o motivo sugerido por Kavanaugh *et al.*, (1992), para a desestabilização do tetrâmero de hemoglobina Rothschild, na forma oxigenada.

V.d. A Hemoglobina Oxigenada de Liophis miliaris é Dimérica ou Tetramérica?

Antes de entrarmos na questão das hemoglobinas de serpentes propriamente dita, gostaríamos de comentar alguns pontos sobre hemoglobinas humana comprovadamente diméricas, tais como,

hemoglobina Rothschild, Kansas e Hirose.

A hemoglobina Rothschild é uma Hb variante Trp 37(β) \rightarrow Arg (figura 46). Como conseqüência desta alteração na interface $\alpha_1\beta_2$, Kavanaugh *et al.*, (1992)

propôs que o resíduo de Arg não pode ser acomodado na região da interface dimérica a fim de permitir que a Arg tenha ângulos conformacionais aceitáveis.

Outro fato importante para a desestabilização do tetrâmero na forma oxigenada é a falta de espaço para a ligação do contra-íon cloreto, como ocorre na desoxi-hemoglobina Rothschild (Kavanaugh *et al.*, 1992).

Na desoxi-hemoglobina Rothschild a Arg 37 (β) está acomodada na interface dimérica de modo a interagir com os resíduos Asp 94 (α) e Pro 95 (α). Em adição, a substituição do aminoácido Trp por Arg cria um vazio na interface dimérica, devido à falta da volumosa cadeia lateral do Triptofano. Isto resulta no surgimento de um sítio de cloreto, o qual faz uma ligação iônica com a cadeia lateral da Arg 37 (β), contribuindo para a estabilização do tetrâmero na forma desoxigenada (Kavanaugh *et al.*, 1992).

A hemoglobina Hirose é uma hemoglobina variante que também possui uma alteração no resíduo Trp 37(β), contudo, nesta hemoglobina, o resíduo de triptofano é substituído para uma serina (Sasaki *et al.*, 1978). Estes pesquisadores mostraram que a hemoglobina Hirose se encontra totalmente dissociada em dímeros quando oxigenada.

Uma explicação plausível para a dissociação da hemoglobina Hirose é devido à substituição Trp 37(β) \rightarrow Ser. Os autores propõem que o resíduo de triptofano 37 exerce uma função crucial na interface dimérica para manter a estabilidade do tetrâmero (Sasaki *et al.*, 1978).

Vallone *et al.*, (1996) estudaram a interface dimérica da hemoglobina através de mutagênese sítio dirigida. Os resultados mostraram que a hemoglobina mutante Trp 37 (β) \rightarrow Thr dissocia mais do que a hemoglobina humana; isto sugere que a substituição do resíduo de Trp 37(β) leva à instabilidade do tetrâmero na forma oxigenada, como observado também para as hemoglobinas Rothschild e Hirose (figura 47).

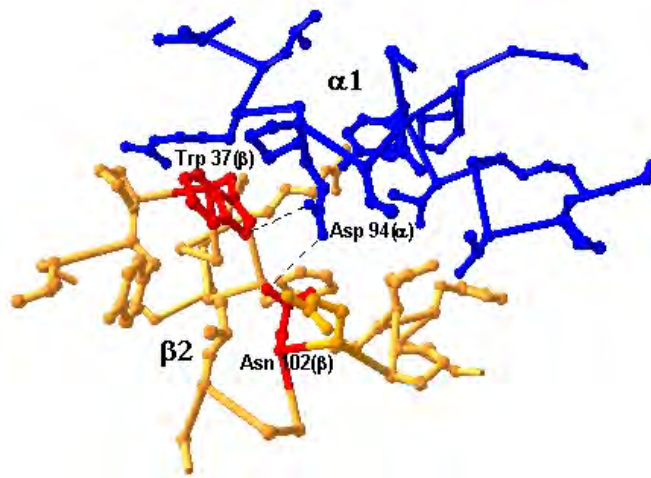


Figura 47. Ilustração dos resíduos de aminoácidos que compõem a interface dimérica da hemoglobina humana (1HHO). Em vermelho, estão os resíduos de Trp 37(β) e Asn 102(β) realizando ponte de hidrogênio com Asp 94(α) (azul). A substituição desses resíduos de aminoácidos, nas hemoglobinas Rothschild, Kansas e Hirose, resulta em maior grau de dissociação dessas proteínas. A figura foi gerada com o programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

A hemoglobina Kansas (Asn 102(β) \rightarrow Thr) também é uma hemoglobina variante que apresenta alto grau de dissociação em dímeros quando oxigenada. No estado oxigenado a constante de dissociação da hemoglobina Kansas é de 2×10^{-4} M, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 a 20°C, enquanto que a constante de dissociação para a hemoglobina humana é de $1,2 \times 10^{-6}$ M, nas mesmas condições (figura

Uma explicação para esta dissociação foi dada por Perutz & Lehmann, (1968). Os autores propuseram que o resíduo de Asn 102(β) estabelece uma ponte de hidrogênio com o resíduo Asp 94(α). A substituição da Asn 102(β) por Thr extingue esta ponte de hidrogênio, o que levaria à maior susceptibilidade desta hemoglobina a formar dímeros.

Sendo assim, diante de dados fidedignos encontrados na literatura para hemoglobinas humana variantes, entre eles uma estrutura terciária resolvida em alta resolução (Hemoglobina Rothschild resolução de 2,0Å), sugere-se que os resíduos de Trp 37(β) e Asn 102(β) contribuem de forma significativa na manutenção do tetrâmero de hemoglobina, no estado oxigenado. Podemos observar na figura 48 (letras verdes), que estes resíduos são conservados em todas as hemoglobinas comparadas.

Com exceção dos trabalhos antes citados, relativos às hemoglobinas de serpentes, não encontramos nenhum trabalho que relacione a falta dos resíduos Glu

43(β) e Glu 101(β) com o aumento de dissociação de tetrâmeros a dímeros. Pela análise da figura 48, também observamos, pelas letras azuis, que estes resíduos de aminoácidos não são conservados nas quatro seqüências analisadas.

Observamos também que os resíduos constituintes da interface dimérica são idênticos, principalmente, quando comparamos as seqüências primárias da hemoglobina de *Liophis miliaris*, humana e ave. A hemoglobina de truta possui cinco resíduos diferentes nesta região em relação as demais hemoglobinas, sendo que duas destas substituições são conservativas, ou seja, na posição 97 da cadeia α de truta ocorre um resíduo de glicina (nas demais ocorre um resíduo de valina) e na posição 105 ocorre um resíduo de valina (nas demais ocorre um resíduo de leucina), como pode ser visto na figura 48, letras vermelhas.

Diante da falta de evidências da participação destes resíduos de aminoácidos na estabilização do tetrâmero, passamos a analisar a interface dimérica da hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada e das hemoglobinas escolhidas através da análise de seqüência primária.

Inicialmente, verificamos os contatos da interface dimérica, na forma oxigenada, para todas as hemoglobinas analisadas (humana, peixe, ave e serpente), como ilustrado no anexo 4.

Observamos que o tetrâmero (na interface $\alpha_1\beta_2$ e sua recíproca), na forma oxigenada, é mantido em média por 3-5 pontes de hidrogênio e 3-5 contatos de van der Waals, dependendo da estrutura analisada, em concordância com os dados encontrados por Abraham *et al.*, (1997).

Em todas as hemoglobinas analisadas os resíduos de Trp 37(β) e Asn 102(β) estabelecem contato com outros resíduos e, portanto, contribuem para a estabilização do tetrâmero na sua forma oxigenada.

Para a hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada encontramos 4 pontes de hidrogênio e 5 contatos de van der Waals, ou seja, esta hemoglobina tem mais

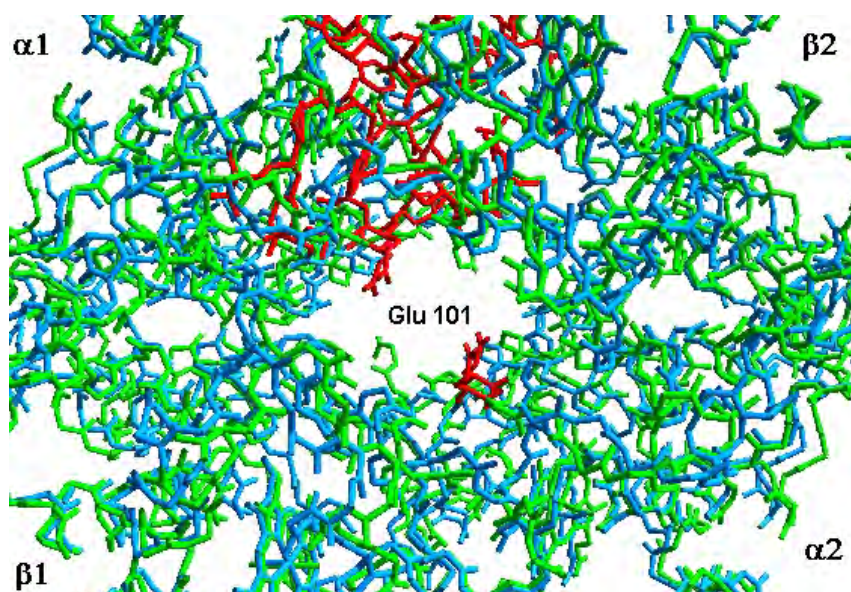


Figura 49. Figura ilustrando a sobreposição de duas hemoglobinas humana (1BBB em verde e 1HHO em azul). Estão representados na figura somente os carbonos alfa das duas moléculas, além dos resíduos de aminoácidos constituintes da interface dimérica (em vermelho). Observamos que o resíduo Glu 101 está voltado para a cavidade central da Hb, e não para a interface dimérica. Figura gerada com o programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

contatos na interface dimérica, no estado oxigenado, do que a hemoglobina humana (1BBB), a qual faz 3 pontes de hidrogênio e 4 contatos de van der Waals, e também estabelece mais contatos que a hemoglobina de truta, que faz 4 pontes de hidrogênio e 3 contatos de van der

Waals.

Feita esta primeira análise, iniciamos o estudo da interface dimérica das estruturas terciárias propriamente dito. A figura 49 mostra a sobreposição das hemoglobinas humana (1BBB e 1HHO) ressaltando, em vermelho, a região da interface dimérica. Analisando a figura 49, verificamos que os resíduos de Glu 101(β) estão voltados para a cavidade central da molécula e não para a interface dimérica, como os outros resíduos de aminoácidos (vermelho) que compõem esta região.

Em seguida, analisamos a situação do resíduo Glu 43 (β) através da figura 50, que ilustra a sobreposição das hemoglobinas humana. A figura mostra que o OE2 do Glu 43 da hemoglobina humana (1BBB) faz uma ponte de hidrogênio com o NH2 da Arg 92 (α), a distância desta ligação é de 3,09Å. Contudo, na hemoglobina

humana (1HHO) esta ligação não ocorre, pois a distância entre seus átomos de O e N é de 5,38Å.

Sendo assim, vimos que nas duas hemoglobinas humana analisadas, os resíduos Glu 101(β) não

contribuem para a manutenção do tetrâmero na forma oxigenada, pois estão voltados para a cavidade central da

molécula e, com respeito ao resíduo Glu 43(β), embora exista uma ligação deste resíduo na hemoglobina humana (1BBB), na hemoglobina humana (1HHO) esta interação não existe, sugerindo que a falta desta ligação não é suficiente para promover a dissociação do tetrâmero de hemoglobina, uma vez que a hemoglobina humana é tetramérica.

Outra molécula analisada foi a hemoglobina D de *Gallus gallus*. As propriedades funcionais dessa hemoglobina têm sido muito estudadas e mostrou-se que tal hemoglobina é tetramérica em solução (Knapp *et al.*, 1999)

A única diferença desta hemoglobina em relação as demais é que ela apresenta uma cooperatividade muito alta, ou seja, uma supercooperatividade ($n_H=4,2$)(Knapp *et al.*, 1999; Riggs, 1998), devido à agregação de tetrâmeros na desoxi-hemoglobina. Dados cristalográficos sugerem que há um sítio hidrofóbico que envolve parte da hélice D e E da subunidade β (Knapp *et al.*, 1999).

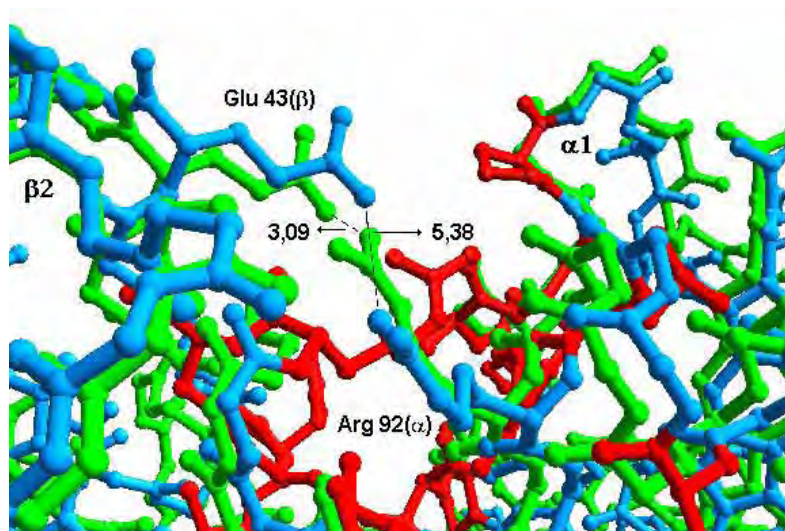


Figura 50. Figura ilustrando a sobreposição das duas hemoglobinas humana (1BBB em verde e 1HHO em azul). Podemos notar que a ligação entre Glu 43(β) e Arg 92(α) ocorre na Hb humana (1 BBB), mas não na Hb humana 1HHO. As distâncias são dadas em Angström (Å). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

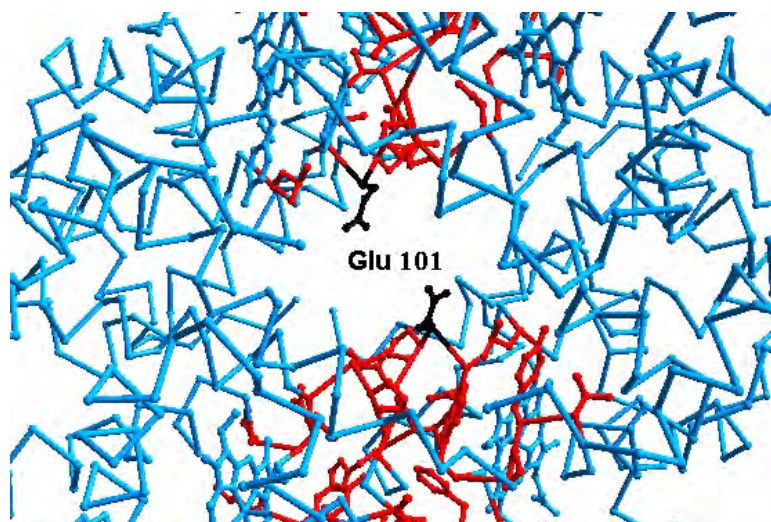


Figura 51. Figura ilustrativa da Hb D de *Gallus gallus*, mostrando a posição do resíduo Glu 101 (em preto), que está voltado para a cavidade central da Hb D, e dos resíduos da interface dimérica (em vermelho). Figura gerada com o programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

Observando a molécula de hemoglobina D de *Gallus gallus* também visualizamos os resíduos Glu 101(β) na cavidade central da molécula, tal como na hemoglobina humana, como ilustra a

figura 51.

Posteriormente, passamos à análise do resíduo Glu 43(β); para

nossa surpresa, este resíduo havia sofrido uma substituição de Glu 43(β) \rightarrow Ala. Verificando a estrutura terciária desta hemoglobina, podemos notar que a Ala 43, da hemoglobina D de *Gallus gallus*, não faz nenhum tipo de interação, já que o resíduo localiza-se à distância de 9,4Å do NE da Arg 92(α) e 10,69Å do O da Arg 92(α)(figura 52).

Conseqüentemente, este resíduo de aminoácido também não contribui para a estabilização do tetrâmero, na conformação oxigenada, na interface $\alpha_1\beta_2$. Além disso, constatamos também

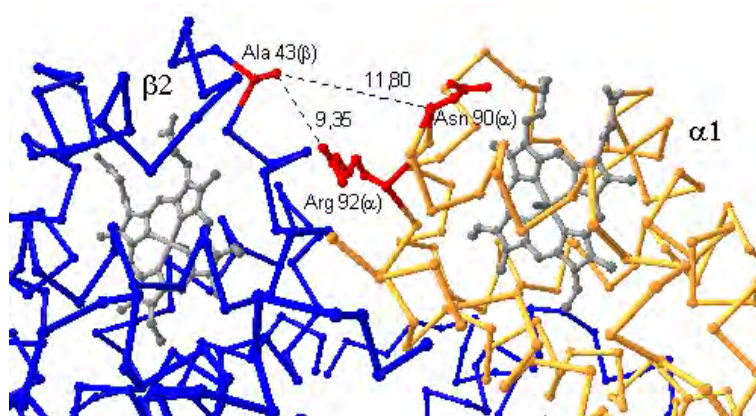


Figura 52. Ilustração da Hb D de *Gallus gallus*. Observamos que o Glu 43(β) foi substituído para uma Ala, a qual não realiza nenhum contato com a Arg 92(α). As distâncias são dadas em Angström (Å). Figura gerada com o programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

que o resíduo Glu 101(β) também não realiza nenhum contato nesta região (figura

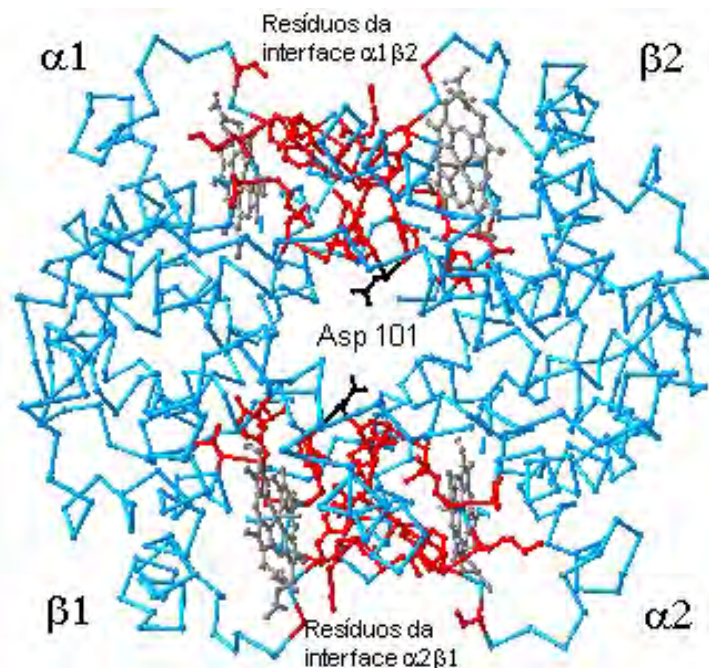


Figura 53. Figura da hemoglobina I de Truta (100U). Ilustrando a mutação Glu 101(β) para Asp (preto). Este resíduo de aminoácido também está voltado para a cavidade central da molécula, não realizando nenhum tipo de interação na interface dimérica (resíduos representados pela cor vermelha). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

51). Então, caberia nos perguntarmos, por que a hemoglobina D de *Gallus gallus* não dimeriza, pois há, também, na interface dimérica desta hemoglobina, a falta de duas cargas negativas?

A hemoglobina de truta apresentou alterações nos dois resíduos de aminoácidos Glu 101(β) → Asp (figura 53) e Glu 43(β) → Gly (figura 54). A substituição de Glu 101(β) para Asp não causaria grandes alterações tanto na

estrutura terciária como na quaternária pois, seria uma alteração conservativa.

Todavia, o resíduo substituído na Hb de truta também encontra-se voltado para a cavidade central da molécula (figura 54).

Entretanto, a substituição de Glu 43(β) para Gly teria implicações importantes para a estrutura da

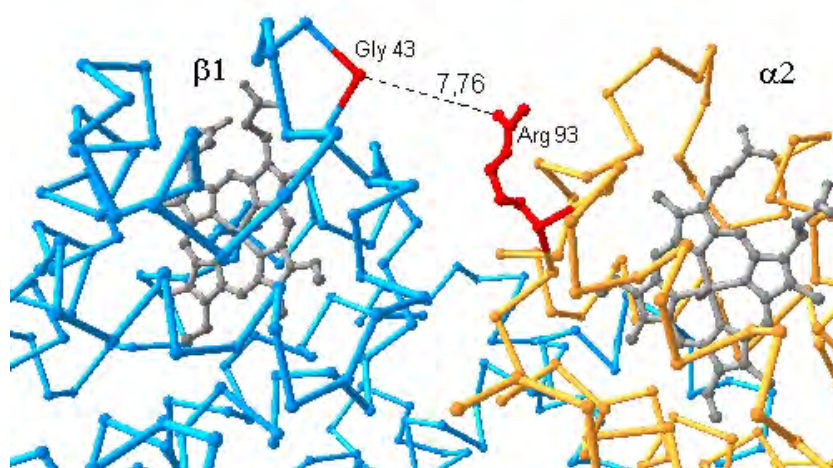


Figura 54. Ilustração da hemoglobina I de truta (100U), mostrando a ausência de contato, entre Gly 43(β) e Arg 93(α), na interface dimérica. As distâncias são dadas em Angström (Å) Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

molécula, pois onde existia uma cadeia lateral relativamente longa e carregada, passou a existir uma cadeia lateral curta e sem carga, além de que, por ser um hidrogênio, a cadeia lateral da glicina, possui uma liberdade de rotação deste átomo muito grande, podendo este assumir vários ângulos ϕ e Ψ (phi e psi), sendo estericamente desfavorável a interação dele com outros átomos, na região da interface dimérica (figura 53).

Por fim, passamos a analisar a hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada. O resíduo de Glu 43(β) substituído para Thr não realiza nenhum tipo de contato na

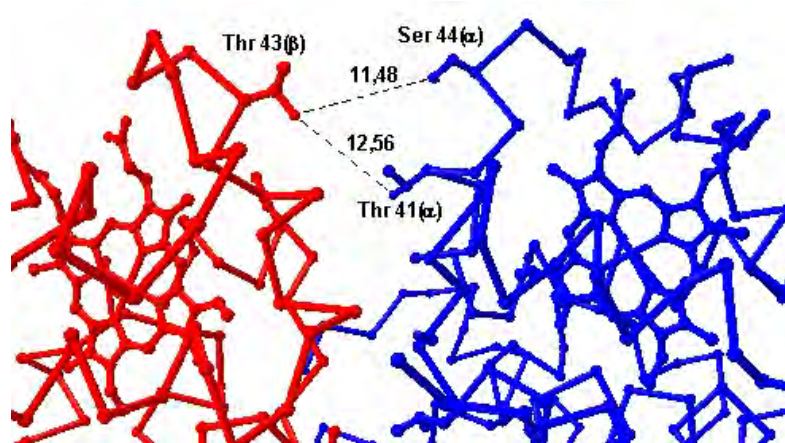


Figura 55. Figura ilustrando o resíduo Thr 43(β) da hemoglobina de *Liophis miliaris*. Este resíduo de aminoácido encontra-se distante dos demais resíduos da cadeia α , sendo improvável qualquer tipo de interação entre eles. As distâncias são dadas em Angström (\AA). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

interface dimérica, uma vez que se distancia dos demais resíduos de aminoácidos da cadeia alfa por volta de 8,39 a 11 \AA , como pode ser visto na figura 55.

O resíduo Glu 101(β) substituído para Val foi a nossa grande surpresa. Como visto nas outras hemoglobinas analisadas, o Glu 101(β) de ave e humana e o Asp 101(β) de truta, estavam voltados para a cavidade central da molécula, não estabelecendo contatos na interface dimérica.

Quando analisamos o CG2 da Val 101(β) da hemoglobina de *Liophis miliaris*, observamos que este realiza contato de van der Waals com o CG2 Val 96(α) na interface dimérica, cuja distância é de 3,29 \AA (figura 56).

Portanto, onde não havia nenhuma interação (hemoglobinas de truta, humana e ave), na hemoglobina de *Liophis miliaris* ocorre um contato de van der Waals, que

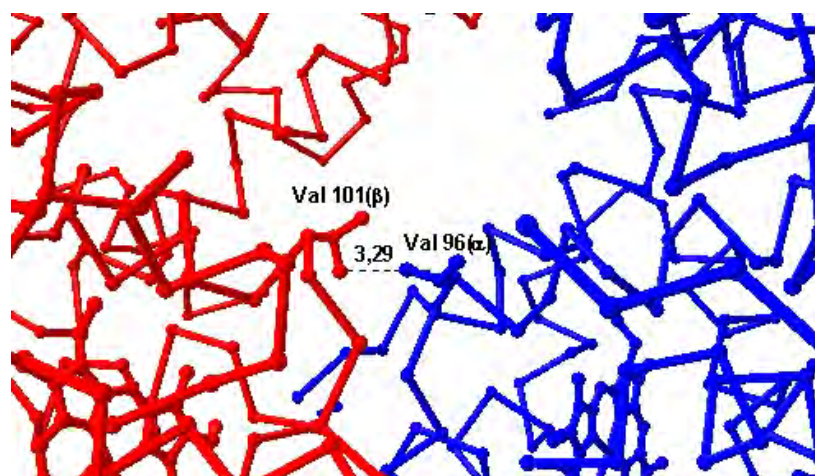


Figura 56. Figura ilustrando o contato de van der Waals que ocorre entre Val 101(β) e Val 96(α) na oxi-hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada. A distância é dada em Angström (Å). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

juntamente com as outras interações presentes nesta interface dimérica, contribui para a manutenção do tetrâmero. Ou seja, a substituição Glu 101(β) \rightarrow Val na verdade reforçaria, e não desestabilizaria o tetrâmero.

Realizamos também a comparação das estruturas cristalográficas entre as hemoglobinas citadas. Nesta comparação o programa (Swiss-Pdb Viewer versão 3.7) utiliza os elementos de estrutura secundária (α -hélices e β -folhas) para realizar a sobreposição.

A tabela 7 mostra os valores dos desvios de r.m.s. e o número de aminoácidos sobrepostos, usando apenas os carbonos alfa das moléculas. Nas sobreposições, foram utilizados somente os resíduos de aminoácidos das hélices B, G e H, uma vez que estas hélices são menos afetadas pelas mudanças terciárias (Baldwin & Chothia, 1979).

Tabela 7. Valores de desvios de r.m.s. (root-mean square deviation) obtidos nas sobreposições da hemoglobina de *Liophis miliaris* com outras hemoglobinas.

Moléculas comparadas	Desvios de r.m.s (Å)	Número de aminoácidos comparados
<i>Liophis miliaris</i> /Humana (1BBB)	1,28	104
<i>Liophis miliaris</i> /Humana (1HHO)	0,82	104
<i>Liophis miliaris</i> / <i>Gallus gallus</i>	0,25	104
<i>Liophis miliaris</i> /Truta	2,34	104

O resultado desta comparação de estruturas terciárias confirmou os dados de seqüência primária, ou seja, quando comparamos as estruturas de *Liophis miliaris* e *Gallus gallus* obtivemos um desvio de r.m.s. de 0,25Å, indicando que estas estruturas se assemelham mais do que as outras comparações, já que foi o menor r.m.s. obtido. Isso era de se esperar uma vez que a hemoglobina de *Gallus gallus* foi utilizada como modelo (*template*).

As outras hemoglobinas que mais se assemelham à hemoglobina de *Liophis miliaris*, depois da hemoglobina de ave, foram as duas hemoglobinas humana, cujos r.m.s. foram de 0,82Å para 1HHO e 1,28Å para 1BBB.

O maior r.m.s foi o de truta: 2,34Å, o que confirma o resultado da análise de seqüência primária, o qual mostra que dentre as hemoglobinas comparadas a hemoglobina de truta é a que possui menor identidade com a hemoglobina de *Liophis miliaris*.

As figuras 57 e 58 mostram a sobreposição de todas as hemoglobinas analisadas. Fica evidente que o único resíduo de aminoácido que está voltado para a interface dimérica é a Val 101(β) da hemoglobina de *Liophis miliaris*. Os demais resíduos estão voltados para a cavidade central da proteína, não contribuindo com interações na interface dimérica na forma oxigenada (figura 57).

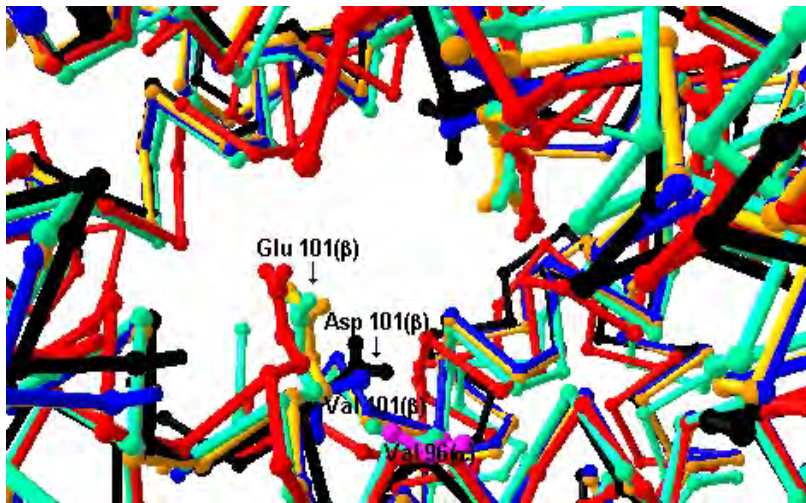


Figura 57. Sobreposição das hemoglobinas de Truta (preto; 1OOU), humana (vermelha; 1BBB), humana (verde; 1HHO), *Gallus gallus* (alaranjado; 1HBR) e *Liophis miliaris* (azul). A figura mostra que o único resíduo de aminoácido voltado para a interface dimérica é Val 101(β) (em azul), os demais resíduos estão voltados para a cavidade central da molécula. Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

voltado para a cavidade central da molécula, poderia ter impedimento estérico com a cadeia lateral de algum resíduo de aminoácido presente também nesta região, resultando assim em uma desestabilização do tetrâmero?

A resposta é não. Visualizando a posição da cadeia lateral do Glu 101(β) e de possíveis cadeias laterais de outros resíduos de aminoácidos, podemos ver que a cadeia lateral que mais se aproxima da cadeia lateral

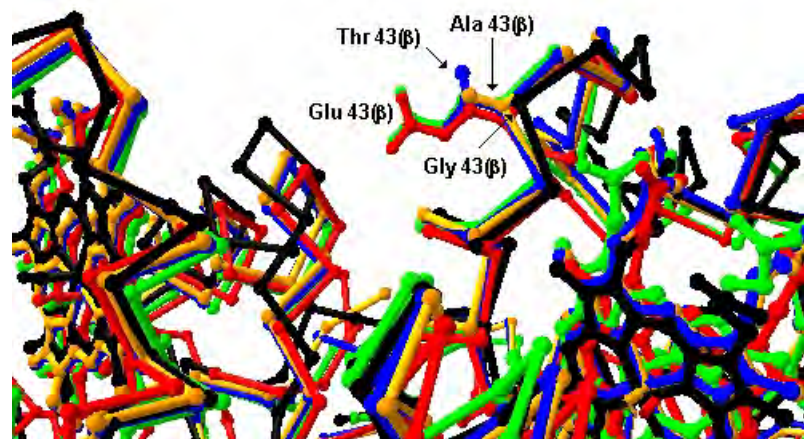


Figura 58. Figura ilustrando a sobreposição das hemoglobinas de Truta (preto; 1OOU), humana (vermelho; 1BBB), humana (verde; 1HHO), *Gallus gallus* (alaranjado; 1HBR) e *Liophis miliaris* (azul). A figura mostra a posição do resíduo Glu 43(β) nas várias hemoglobinas analisadas. Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

Com respeito ao resíduo de Glu 43(β), observamos pela figura 58, que a sua substituição não resulta em dissociação da hemoglobina, já que as hemoglobinas de ave (*Gallus gallus*) e peixe (truta) não são diméricas.

Após todas essas análises, fizemos uma pergunta: Será que o resíduo Glu 101(β),

do Glu 101(β) é uma cadeia lateral de um resíduo de Lys99(α_1), que se distancia deste 4,1Å, sendo impossível se estabelecer qualquer tipo de interação a esta distância (figura 59).

As outras distâncias analisadas mostraram que a cadeia lateral da Pro 95 (cadeia α_2) está a 9,96Å da cadeia lateral do Glu 101(β). A cadeia lateral da His 146 (cadeia β_2) dista 13,1Å da cadeia lateral do Glu 101(β), como pode ser observado na figura 59.

Padovan (1996) sugere que a hemoglobina de *Liophis miliaris* é composta por quatro cadeias de globinas distintas: A($\beta^{2,Lm}$), B($\alpha^{2,Lm}$), C($\alpha^{1,m,Lm}$) e D($\beta^{1,Lm}$). As duas cadeias β possuem na posição Glu 101 uma substituição para Val. No entanto, no resíduo Glu 43 na

cadeia A($\beta^{2,Lm}$) a substituição é para Ser e, na cadeia D($\beta^{1,Lm}$) a substituição é para Thr.

A presença de uma serina na cadeia A e uma Thr na cadeia D, não justificaria a

dissociação de um possível tetrâmero com quatro cadeias distintas,

uma vez que constatamos, pela análise das hemoglobinas de ave e peixe, que esta posição (Glu 43) não contribui para a manutenção do tetrâmero na forma oxigenada, além de que, os resíduos da interface dimérica são bem conservados, como ilustra a figura 48.

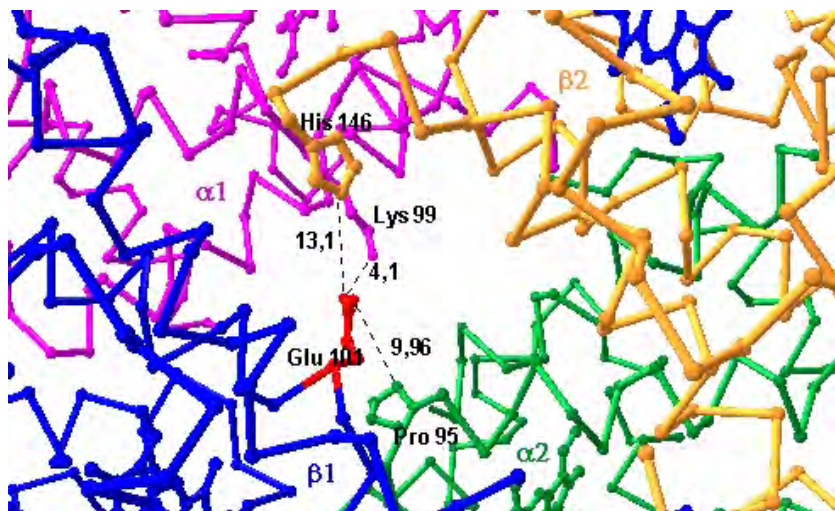


Figura 59. Figura ilustrando a cavidade central da hemoglobina humana (1HHO). Podemos constatar que não há interações entre a cadeia lateral do Glu 101(β) e as demais cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das outras globinas. As distâncias são dadas em Angström (Å). Figura gerada no programa computacional Swiss-Pdb Viewer versão 3.7 de domínio público.

A proposta mais recente envolvendo a Hb de *Liophis miliaris*, feita por Bonafé *et al.* (1999), supõe que a ligação de ATP à forma desoxigenada mantém o tetrâmero unido, ou seja, assume que a forma *stripped* não teria a conformação T_x .

Através da diferença de absorbância (em 290nm) entre as formas oxi e desoxigenada (figura 45), observamos que a hemoglobina de *Liophis miliaris*, na forma *stripped*, sofre mudanças conformacionais durante o processo de oxigenação, entre os estados T_x e R, e estas mudanças conformacionais só poderiam ser evidenciadas com a forma tetramérica.

VI. CONCLUSÕES

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

1. O efeito Bohr alcalino observado na forma *stripped*, tanto da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* como no hemolisado de *Helicops modestus*, não é decorrente da associação em tetrâmeros da forma desoxigenada, como proposto por Focesi *et al.*, (1987), e sim um efeito alostérico que auxilia na liberação de O₂, assim como na hemoglobina humana.

2. De acordo com os dados coletados das propriedades funcionais de ligação de O₂ da Hb-II de *Crotalus durissus terrificus* e do hemolisado de *Helicops modestus*, observamos que tanto na ausência (forma *stripped*) como na presença de fosfatos orgânicos, estas hemoglobinas apresentam ligação cooperativa de O₂, em toda a faixa de pH estudada. Este resultado contraria os relatados na literatura, a qual sustenta que hemoglobinas de serpentes, na ausência de fosfatos orgânicos ou quando na presença destes, mas acima de pH 7,5, ligam O₂ de forma não cooperativa.

3. Os dados relativos aos experimentos de atividade de água sugerem que a desoxi-hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* e *Helicops modestus*, quando na presença de cloreto, assumem um novo estado conformacional, denominado estado T₀, como proposto por Colombo e Seixas, (1999), para as hemoglobinas tetraméricas humana e bovina.

4. Os dados de atividade de água sugerem que a hemoglobina de *Liophis miliaris*, tanto na ausência como na presença de cloreto, comporta-se diferente da hemoglobina humana. Os dados mostram que, na ausência de ânions, a hemoglobina de *Liophis miliaris* não assume o estado T_0 , mas sim o estado T_x .

5. Os resultados obtidos por cromatografia de filtração em gel e SAXS, através da determinação da constante de associação dímero-tetrâmero, raio de giro e dimensão máxima, indicam que as hemoglobinas das quatro serpentes analisadas são estruturas tetraméricas mais estáveis do que a hemoglobina humana, tanto *in vitro* como *in vivo*.

6. A análise estrutural comparativa realizada entre a hemoglobina de *Liophis miliaris* modelada e as hemoglobinas de peixe, ave e humana, mostrou que os resíduos de aminoácidos Glu 43(β) e Glu 101(β) não são resíduos importantes na manutenção da forma tetramérica, uma vez que as hemoglobinas de ave e peixe também possuem substituições de aminoácidos nas referidas posições e nem por isso são hemoglobinas diméricas. Sendo assim, refutamos o mecanismo estrutural de dissociação, proposto na literatura, para a hemoglobina de *Liophis miliaris*, e posteriormente estendido para outras espécies.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, D. J.; KELLOGG, G. E.; HOLT, J. M.; ACKERS, G. K. Hydrophobic Analysis of the Non-covalent Interactions Between Molecular Subunits of Structurally Characterized Hemoglobins. *J. Mol. Biol.* v. 272, p. 613-632, 1997.

ACKERS, G. K. **The Proteins**, 1. ed. New York: Academic Press, p. 1-94, 1975.

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

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* v. 215, p. 403-410, 1990.

ANTONINI, E; BRUNORI, M. **Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. In: Frontiers of Biology.** North-Holland Publishing Company Amsterdam - London, v. 21, p. 99-134, 1971.

ARNONE, A. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. *Nature.* v. 237, p. 146-148, 1972.

ATHA, D.; RIGGS, A. Tetramer-Dimer Dissociation in Hemoglobin and the Bohr Effect. *J. Biol. Chem.* v. 251, p. 5537-5543, 1976.

ATHA, D; The Linkage Between Oxygenation and Subunit Association in Human Hemoglobin Kansas: Concentration Dependence of the Oxygen Binding Equilibria. *J. Biol. Chem.* v. 259, p. 12390-12398, 1979.

BALDWIN, J.; CHOTIA, C. Haemoglobin: the Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism. *J. Mol. Biol.* v. 129, p. 175-220, 1979.

BENESCH, R.; MACDUFF, G.; BENESCH, R. E. Determination of Oxygen Equilibria with a Versatile New Tonometer. *Analytical Biochemistry.* v. 11, p. 81-87, 1965.

BENESCH, R.; BENESCH, R. E. The Effect of Organic Phosphates from the Allosteric Properties of Hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 26, p.162-165, 1967.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; YOUNG, S. *Analytical Biochemistry*, v. 55, p. 246-248, 1973.

BENESCH, R. E.; KWONG, S. Coupled reactions in Hemoglobin. Heme-globin and Dimer-Dimer Association. *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 13.785-13.786, 1995.

BONAFÉ, C. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MATSUURA, M. S. A. ATP-induced Tetramerization and Cooperativity in Hemoglobin of Lower Vertebrates. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 1196-1198. 1999.

BONAVENTURA, J.; RIGGS, A. Hemoglobin Kansas, a Human Hemoglobin with a Neutral Amino Acid Substitution and an Abnormal Oxygen Equilibrium. *J. Biol. Chem.* v. 243, p. 980-991, 1968.

BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J. In: Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities (Caughey, W. S., Ed.), New York: Academic Press, p. 641-661. 1978.

BONAVENTURA, C.; ARUMUGAN, M.; CASHON, R.; BONAVENTURA, J.; MOO-PENN, W. F. Chloride Masks Effects of Opposing Positive Charges in Hb A and Hb Hinsdale (β 139 Asn \rightarrow Lys) That Can Modulate Cooperativity as Well as Oxygen Affinity. *J. Mol. Biol.* v. 239, p. 561-568. 1994.

BONDI, A. Van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* v. **68**, p. 441-451. 1964.

BONILLA, G. O.; FOCESI Jr., A.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; CASHON, R. E. Functional Properties of the Hemoglobin from the South American *Mastigodryas bifossatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 109A, p. 1085-1095. 1994.

BONILLA, G. O.; OYAMA JR., S.; NAGATOMO, C. L. MATSUURA, M. S. A.; FOCESI JR., A. Interactions of Adenosine Triphosphate with Snake Hemoglobins. Studies in *Liophis miliaris*, *Boa constrictor* and *Bothrops alternatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 109B, p. 701-707, 1994.

BRIEHL, R. W.; HOBBS, J. F. Ultraviolet Difference Spectra in Human Hemoglobin. I. Difference Spectra in Hemoglobin A and their Relation to the Function of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 245, p. 544-554, 1970.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CCP4. The SERC(UK) Collaborative Computing Project No. 4: A Suite of Programmes for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* D50, p. 760-763, 1994.

CHIANCONE, E. Dissociation of Hemoglobin into Subunits. *J. Biol. Chem.* v. 243, p. 1212-1219, 1968.

CHIANCONE, E.; VECCHINI, P.; VERZILI, D.; ASCOLI, S.; ANTONINI, E. Dimeric and Tetrameric Hemoglobin from the Mollusc *Scapharca inaequalvis*. *J. Mol. Biol.* v. 152, p. 577-592, 1981.

CHU, A. H.; ACKERS, G. K. Mutual Effects of Protons, NaCl, and Oxygen on the Dimer-Tetramer Assembly of Human Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 256, p. 1199-1204, 1981.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSESIAN, V. A. Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin. *Science.* v. 256, p. 655-659. 1992.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The role of Solvation in Protein assembly: The Effect of Sucrose on Dimer-Tetramer Hb Equilibrium. *Biophysical Journal.* v. 68A, p. 338. 1995.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Protein Assembly Studied by Large Zone chromatography: Effect of Neutral Solutes on Hemoglobin Dimer-Tetramer Equilibrium. In: XXIV Reunião Anual da SBBq, 1995, Caxambu, M.G.

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

COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V. Novel Allosteric Conformation of Human Hb Revealed by the Hydration and Anion Effects on O₂ Binding. *Biochemistry.* v. 38, p. 11741-11748, 1999.

CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucl. Acids Res.* v. 16, p. 10881-10890, 1988.

CREIGHTON, T. **Proteins: Structures and Molecular Properties.** 2. ed. W. H. Freeman and Company. p. 372-374. 1993.

DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S.-H. Inhibition of Cyclin-dependent Kinases by Purine Analogues: Crystal Structure of Human CDK2 Complexed with Roscovitine. *Eur. J. Biochemistry.* v.243, p. 518-526, 1997.

DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F.; MUELLER-DICKEMANN, H.-J.; SCHULZE-GAHMEN, U.; WORLAND, P. J.; SAUSVILLE, E.; KIM, S.-H. Structural Basis for Specificity and Potency of a Flavonoid Inhibitor of Human CDK2, a Cell Cycle Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 93, 2735-2740, 1996.

DE ROSA, M. C.; SANNA, M. T.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; GALTIERI, A.; TELLONE, E.; SCATENA, R.; BOTTA, B.; BOTTA, M.; GIARDINA, B. Glycated Human Hemoglobin (HbA_{1c}): Function Characteristics and Molecular Modeling Studies. *Biophys. Chem.* v. 72, p. 323-335, 1998.

DOHI, Y.; SUGITA, Y.; YONEYAMA, Y. The Self-association and Oxygen Equilibrium of Hemoglobin from the Lamprey. *J. Biol. Chem.* v. 248, p. 2354-2363, 1973.

DUGUET, M.; ACHER, R. The Oxygen Dissociation Curve of Viper (*Vipera aspis*) Hemoglobin: Functional Similarity with Human Hemoglobin Portland. *FEBS LETTERS.* v. 60, p. 267-268, 1975.

DUMOULIN, A.; MANNING, L. R.; JENKINS, W. T.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. Exchange of Subunit Interface Between Recombinant Adult and Fetal Hemoglobins. Evidence for a Functional Inter-Relationship Among Regions of the Tetramer. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 31326-31332, 1997.

EDELSTEIN, S. J.; REHMAR, M. J.; OLSON, J. S.; GIBSON, Q. H. Functional Aspects of the Subunit Association-Dissociation Equilibria of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 245, p. 4372-4381, 1970.

EDELSTEIN, S. J.; McEWEN, B.; GIBSON, Q. H. Subunit Dissociation in Fish Hemoglobins. *J. Biol. Chem.* v. 251, p. 7632-7637, 1976.

EGUCHI, Y.; EGUCHI, T. Amino Acid Sequence of the α - and β -Globin Chains of the Hiroo Sea Snake (*Laticauda laticaudata*). *J. Prot. Chem.* v. 21, p. 215-221, 2002.

ENOKI, Y.; TYUNA, I. Further Studies on Hemoglobin-Oxygen Equilibrium. *JPN. J. Physiol.* v. 14, p. 280, 1964.

FAGO, A.; CARRATORE, V.; di PRISCO, G.; FEURLEIN, R. N.; SOTTRUP-JENSEN, I.; WEBER, R. E. The Cathodic Hemoglobin of *Anguilla anguilla*: Amino Acid Sequence and Oxygen Equilibria of a Reverse Bohr Effect Hemoglobin with High Oxygen Affinity and High Phosphate Sensitivity. *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 18897-18902, 1995.

FAGO, A.; GIANGIACOMO, L.; D'AVINO, R.; CARRATORE, V.; ROMANO, M.; BOFFI, A.; CHIANCONE, E. Hagfish Hemoglobins. Structure, Function and Oxygen-Linked Association. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 27415-27423, 2001.

FOCESI Jr., A.; OGO, S. H.; MATSUURA, M. S. A.; SAY, J. C. Further evidence of Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobin from *Liophis miliaris*. *J. Med. Biol. Res.* v. 20, p. 861-864. 1987.

FOCESI Jr, A.; SATIE, H.; MATSUURA, M. S. A. Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobins from *Liophis miliaris*. II. Evidence with the Stripped Proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 96B, p. 119-122, 1990.

FOCESI Jr, A.; BONILLA, G. O.; NAGATOMO, C. L.; MATSUURA, M. S. A. Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobin from *Liophis miliaris*. III. The Phenomenon in Snake Species of Different Evolutionary Levels. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 103, p. 985-989, 1992.

GACON, G.; BELKHODJA, O.; WAJCMAN, H.; LABIE, D. Structure and Functional Studies of Hb Rothschild $\beta 37(\text{C3})\text{Trp} \rightarrow \text{Arg}$. A New Variant of the $\alpha_1\beta_2$ Contact. *FEBS Lett.* v. 82, p. 243-246, 1977.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 1. ed. Saunders College Publishing. p. 396-399. 1995.

GERSHEY, E. L.; VIDALI, G.; ALLFREY, V. G. Chemical Studies of Histone Acetylation. *J. Biol. Chem.* v. 243, p. 5018-5022, 1968.

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

HO, C.; RUSSU, I. How Much do Know about the Bohr Effect of Hemoglobin? *Biochemistry.* v. 26, p. 6299-6305, 1987.

HUNDAHL, C.; FAGO, A.; MALTE, H.; WEBER, R. E. Allosteric Effect of Water in Fish and Human Hemoglobins. *J. Biol. Chem.* v. 278, p. 42769-42773, 2003.

IMAMURA, J. S.; YANASE, T.; ATHA, D.; RIGGS, A.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. Hemoglobin Hirose, a Human Hemoglobin Variant with a Substitution at the $\alpha_1\beta_2$ Interface. *J. Biol. Chem.* v. 253, p. 87-94, 1978.

ITO, N.; KOMIYAMA, N. H.; FERMI, G. Structure of Deoxyhaemoglobin of the Antarctic Fish *Pagothemia bernacchii* with an Analysis of the Structural Basis of the Root Effect by Comparison of the Liganded and Unliganded Haemoglobin Structures. *J. Mol. Biol.* v. 250, p. 648-658, 1995.

JANCARIC, J.; KIM, S. Sparse Matrix Sampling: A Screening Method for Crystallization of Proteins. *J. Appl. Cryst.* v. 24, p. 409-411, 1991.

KAVANAUGH, J. S.; ROGERS, P. H.; CASE, D. A.; ARNONE, A. High-Resolution X-ray Study of Deoxyhemoglobin Rothschild 37 β Trp \rightarrow Arg: A Mutation that Creates an Intersubunit Chloride-Binding Site. *Biochemistry.* v. 31, p. 4111B4121, 1992.

KILMARTIN, J. V.; IMAI, K.; JONES, R. T.; FARUQUI, A. R.; BALDWIN, J. M. Role of Bohr Group Salt Bridges in Cooperativity in Hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 534, p. 15-25, 1978.

KILMARTIN, J. V.; FOGG, J. H.; PERUTZ, M. F. Role of C-Terminal Histidine in the Alkaline Bohr Effect of Human Hemoglobin. *Biochemistry.* v. 19, p. 3189-3193, 1980.

KIMURA, M. The Neutral Theory of Molecular Evolution and the World View of the Neutralist. *Genome*. v. 24, 24-31, 1989.

KNAPP, J. E.; OLIVEIRA, M. A.; XIE, Q.; ERNST, S. R.; RIGGS, A. F.; HACKERT, M. L. The structural and functional analysis of the hemoglobin D component from chicken. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 6411-6420, 1999.

KOSHLAND, D. E.; NEMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Protein Containing Subunits. *Biochemistry*. v. 5, p. 365-386, 1966.

LASKOWSKI, R. A.; MacARTHUR, D. K.; SMITH, D. T.; JONES, E. G.; HUTCHINSON, A. L.; MORRIS, A. L.; NAYLOR, D.; MOSS, D. S. E THORTON, J. M. PROCHECK v.3.0 - Programam to Check Stereochemistry Quality of Protein structures Operating Instructions, 1994.

LESK, A. M.; CHOTIA, C. How Different Amino Acid Sequences Determine Similar Protein Structures: The Structure and Evolutionary Dynamics of the Globins. *J. Mol. Biol.* v. 136, p. 225-270, 1980.

LESK, A. M.; JANIN, J.; WODAK, S.; CHOTIA, 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, p. 267-270, 1985.

MANNING, L. R.; JENKINS, W. T.; HESS, J. R.; VANDEGRIFF, K.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. Subunit Dissociations in Natural and Recombinant Hemoglobins. v. 5, p. 775-781, 1996.

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

MATHEWS, B. W. Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* v. 33, p. 491-497, 1968.

MATSUURA, M.S.A., OGO, S.H.; FOCESI Jr., A. Dimer-tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*-I. Effect of organic polyphosphate. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 86, p. 683-687. 1987.

MATSUURA, M. S.; FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The Amino Acid Sequence of the Alpha and Beta Chains of Hemoglobin from the Snake, *Liophis miliaris*. *J. Biol. Chem.* v. 264, p. 5515-5521, 1989.

MITCHELL, D. T.; KRRRO, G. B.; HACKERT, M. L. Structural Analysis of Monomeric Hemichrome and Dimeric Cyanomet Hemoglobins from *Caudina arenicola*. *J. Biol. Chem.* v. 251, p. 421-431, 1995.

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

MÜLLER, G.; FAGO, A.; WEBER, R. E. Water Regulates Oxygen Binding in Hagfish (*Myxine glutinosa*) Hemoglobin. *J. Exp. Biol.* v. 206, p. 1389-1395, 2003.

MYLVAGANAM, S. E.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; GETZOFF, E. D. Structural Basis for the Root Effect in Haemoglobin. *Nat. Struct. Biol.* v. 3, p. 275-283, 1996.

NAVAZA, J. AmoRe. An Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Cryst.* v. A50, p. 157-163, 1994.

NENORTAS, E.; BECKETT, D. Reduced-Scale Large-Zone Analytical Gel Filtration Chromatography for Measurement of Protein Association Equilibrium. *Analytical Biochemistry*. v. 222, p. 366-373, 1994.

OTWINOWSKI, Z. In: *Proceedings of the CCP4 study weekend*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey,. Warrington: Daresbury Laboratory. p. 56-62 1993.

OYAMA JÚNIOR., S.; NAGATOMO, C. L.; BONILLA, G. O.; MATSUURA, M. S. A.; FOCESI JÚNIOR., A. *Bothrops alternatus* Hemoglobin Components. Oxygen Binding Properties and Globin Chain Hydrophobic Analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 105B: p. 271-275. 1993.

PADOVAN, J. C. Determinação da Estrutura Primária da Cadeia B(β) da Hemoglobina do Réptil Semi-Aquático Brasileiro, *Liophis miliaris*. São Paulo, 1996. p. 220-222. Tese (doutorado)-Escola Paulista de Medicina- Universidade Federal de São Paulo.

PARDANANI, A.; GIBSON, Q. H.; COLOTTI, G.; ROYER, W. E. Jr. Mutations of Residue Phe⁹⁷ to Leu Disrupts the Central Allosteric Pathway in *Scapharca* Dimeric Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 13171-13179, 1997.

PELSTER, B; DECKER, H. The Root Effect – a Physiological Perspective. *Micron*. v. 35, p. 73-74, 2004.

PÉREZ, J.; RYLANDER, K.; NIRCHIO, M. The Evolution of Multiple Haemoglobins in Fishes. *Reviews in fish Biology and Fisheries*. v. 5, p. 304-319, 1995.

PERUTZ, M. F.; LEHMANN, H. Molecular Pathology of Human Haemoglobin. *Nature*. v. 219, p. 902-909. 1968.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin. *Nature*. v. 228, p. 726-739, 1970.

PERUTZ, M. F.; KILMARTIN, J. V.; NISHIKURA, K.; FOGG, J. H.; BUTLER, P. J. G.; ROLLEMA, H. S. Identification of Residues Contributing to the Bohr Effect of Human Haemoglobin. *J. Mol. Biol.* v. 138, p. 649-670, 1980.

PERUTZ, M. F. Species Adaptation in a Protein Molecule. *Molec. Biol. Evol.* v. 1, p. 1-28, 1983.

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

POLIKARPOV, I.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R.; ARRUDA, P.; LEITE, A.; CRAIEVICH, A. Protein Crystallography Station at LNLS, The Brazilian National Synchrotron Light Source. *Nucl. Instrum. Methods A*. v. 405, p. 159-164, 1998.

POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; de OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R.; CRAIEVICH, A. Set-up and Experimental Parameters of the Protein Crystallography Beam Line at Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J. Synchrotron Rad.* v. 5, p. 72-76, 1998.

PONDER, J. W.; RICHARDS, F. M. Tertiary Templates for Proteins. Use of Packing Criteria in the Enumeration of Allowed Sequences for Different Structural Classes. *J. Mol. Biol.* v. 193, p. 775-791, 1987.

POWERS, D. Molecular Ecology of Teleost Fish Hemoglobin: Strategies for Adapting to Changing Environment. *Am. Zool.* v. 20, p. 139-162, 1980.

QIU, Y.; MAILLETT, D. H.; KNAPP, J.; OLSON, J. S.; RIGGS, A. F. Lamprey Hemoglobin. Structural Basis of the Bohr Effect. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 13517-13528, 2000.

RAGSDALE, F. R.; HERMAN, J. K.; INGERMANN, R. L. Nucleoside Triphosphate Levels Versus Oxygen Affinity of Rattlesnake red Cells. *Respiration Physiology.* v. 102, v. 63-69. 1995.

RIGGS, A. F. Self-Association, Cooperativity and Supercooperativity of Oxygen Binding by Hemoglobins. *J. Exp Biol.* v. 201, p. 1073B1084, 1998.

ROYER, W. E.; HENDRICKSON, W. A.; CHIANCONE, E. Structural Transitions upon Ligand Binding in a Cooperative Dimeric Hemoglobin. *Science.* v. 249, p. 518-521, 1990.

ROYER, W. E.; HEARD, K. S.; HARRINGTON, D. J.; CHIANCONE, E. The 2.0D Crystal Structure of *Scapharca* Tetrameric Hemoglobin: Cooperative Dimers Within an Allosteric Tetramer. *J. Mol. Biol.* v. 253, p. 168-186, 1995.

ROYER, W. E.; PARDANANI, A.; GIBSON, Q. H.; PETERSON, E. S.; FRIEDMAN, J. M. Ordered Water Molecules as Key Allosteric Mediators in a Cooperative Dimeric Hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 93, p. 14526-14531, 1996.

ROYER, W. E.; FOX, R. A.; SMITH, F. R.; ZHU, D.; BRASWELL, E. H. Ligand-linked assembly of *Scapharca* Dimeric Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 5689-5694, 1997.

SALVAY, A. G.; GRIGERA, J. R.; COLOMBO, M. F. Hydration Effects on the Structural Properties and haem-haem Interaction in Hemoglobin. *Phys. Chem.* v. 5, p. 192-197, 2003.

SANCHEZ, R.; SALI, A. Advances in Comparative Protein-Structure Modeling *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 6, p. 206-214, 1997.

SASAKI, J.; IMAMURA, T.; YANASE, T. Hemoglobin Hirose, a human hemoglobin variant with a substitution at the $\alpha_1\beta_2$ interface. *J. Biol. Chem.* v. 253, p. 87-94, 1978.

SEYMOUR, R. S.; DONSON, C. B.; BALDWIN, J. Respiratory and Cardiovascular Physiology of the Aquatic Snake. *Acrochordus arafurae*. *J. Comp. Physiol.* v. 144, p. 215-227, 1981.

SHAANAN, B. Structure of human oxyhemoglobin at 2.1D resolution. *J. Mol. Biol.* v. 171, p. 31-59, 1983.

SHARMA, V.S.; NEWTON, G. L.; RANNEY, H. M.; AHMED, F.; HARRIS, J. W.; DANISH, E. H. Hemoglobin Rothschild ($\beta 37(C3)Trp \rightarrow Arg$): A High/Low Affinity Hemoglobin Mutant. *J. Mol. Biol.* v. 144, p. 267-280, 1980.

SHIH, D. T.-B.; JONES, R. T.; IMAI, K.; TYUMA, I. Involvement of Glu G3 (101) β in the Function of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* v. 260, p. 5919-5924, 1985.

SILVA, M. M.; ROGERS, P. H.; ARNONE, A. A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7D resolution. *J. Biol. Chem.* v. 267, p. 17248-17256. 1992.

SMARRA, A. L. S. Caracterização Parcial das Propriedades Funcionais e Estruturais das Hemoglobinas de *Lipossarcus anisitsi* (Pisces). 1997. 72 f Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - São José do Rio Preto.

SODE, F. Oxygen Binding Characteristics of Whole-Blood and Hemoglobin from the Snake *Thamnophis sirtalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 100B, p. 697-703, 1991.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 118-133. 1988.

SULLIVAN, B. Oxygenation Properties of Snake Hemoglobin. *Science*. v. 157, p. 1308-1310, 1967.

SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J.; KÖNIG, S. Crystal versus Solution Structures of Thiamine Diphosphate - dependent Enzymes. *J. Biol. Chem.*v. 275, p. 297-302, 2000.

TAME, J. R.; WILSON, J. C. e WEBER, R. E. The crystal structure of trout Hb-I in the deoxy and carbonmonoxy forms. *J. Mol. Biol.* v.259, pp. 749, 1996.

TOSQUI, P.; SEIXAS, F. A. V.; COLOMBO, M. F. On the stabilization of intermediate allosteric states of human and bovine hemoglobin by DPG revealed by the osmotic stress method. In: XXIX Annual Meeting of Biochemistry and Molecular Biology Brazilian Society. M-46, p. 130, 2000 Caxambu - Brazil.

TURNER, B. W.; PETTIGREW, D. W.; ACKERS, G. K. Measurement and Analysis of Ligand-Linked Subunit Dissociation Equilibria in Human Hemoglobins. *Methods Enzymol*, v. 76, p. 596-628, 1981.

TURNER, G. J.; GALACTEROS, F.; DOYLE, M. L.; HEDLUND, B.; PETTIGREW, D. W.; TURNER, B. W.; SMITH, F. R.; MOO-PENN, W.; RUCKNAGEL, D. L.; ACKERS, G. K. Mutagenic Dissection of Hemoglobin Cooperativity: Effects of Amino Acid Alteration on Subunit Assembly of Oxy and Deoxy Tetramers. *Proteins Struct. Funct. Genet.* v. 14, p. 333-350, 1992.

VALDES, R.; VICKERS, L. P.; HALVORSON, H. R.; ACKERS, G. K. Reciprocal Effects in Human Hemoglobin: Direct Measurement of the Dimer-Tetramer Association Constant at partial Oxygen Saturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, p. 5493-5496, 1978.

VALLONE, B.; BELLELLI, A.; MIELE, A. E.; BRUNORI, M.; FERMI, G. Probing the $\alpha_1\beta_2$ interface of human hemoglobin by mutagenesis. *J. Biol. Chem.* v. 271, p. 12472-12480, 1996.

VOET, D.; VOET, J. G. E PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 166-167.

WEBER, R. E. **Functional Significance and Structural Basis of Multiple Hemoglobins with special Reference to Ectothermic Vertebrate. In: Animal Nutrition and Transport Processes. 2. Transport, Respiration and Excretion: Comparative and Environmental Aspects.** Ed. Truchot, J-P. And Lahlou, B., v. 6, p. 58-75, 1990.

WIND, M.; STERN, A.; LAW, L. E SIMON, S. Relative Stabilities of the Two Quaternary Conformation of Human Fetal Hemoglobin. *Biochemistry.* v. 15, p. 5161-5167, 1976.

WOOD, S. C. Adaptation of Red Blood Cell Function to Hypoxia and Temperature in Ectothermic Vertebrate. *Am. Zool.* v. 20, p. 163-172, 1980.

YAMAGUCHI, T.; ADACHI, K. Hemoglobin Equilibrium Analysis by the Multiangle Laser Light-Scattering Method. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 290, p. 1382-1387, 2002.

YANASE, H.; CAHILL, S.; MARTIN de LLANO, J. J.; MANNING, L. R.; SCHNEIDER, K.; CHAIT, B. T.; VANDEGRIFF, K. D.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. Properties of a Recombinant Human Hemoglobin with Aspartic Acid 99(β), an Important Intersubunit Contact Site, Substituted by Lysine. *Protein Sci.* v. 3, p. 1213-1223, 1994.

YANASE, H.; MANNING, L. R.; VANDEGRIFF, K.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. A Recombinant Human Hemoglobin with Asparagine 102(β) Substituted by Alanine has a Limiting Low Oxygen Affinity, Reduced marginally by Chloride. *Protein Sci.* v. 4, p. 21-28, 1995.

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

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

1000mBar (hPa) — 750,062 mmHg

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

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

2. Determinar o fator de correção da P.B. interpolando o valor baseado na tabela de correção (anexo 5).

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

Exemplo: P.B.=757,5 mmHg e T=23,8°C

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

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

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

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

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

$$Y = [(Z - X) * (t_c - t_o)] + X = [(2,96 - 2,8325) * (23,8 - 23)] + 2,8325 = 2,9345.$$

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

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

Temp. °C	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	Temp. °C	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
-10	1.436	1.414	1.390	1.368	1.345	42	61.50	62.14	62.80	63.46	64.12
-14	1.560	1.534	1.511	1.485	1.460	43	64.80	65.48	66.16	66.86	67.56
-13	1.691	1.665	1.637	1.611	1.585	44	68.26	68.97	69.69	70.41	71.14
-12	1.834	1.804	1.776	1.748	1.720	45	71.88	72.62	73.36	74.12	74.88
-11	1.987	1.955	1.924	1.893	1.863	46	75.65	76.43	77.21	78.00	78.80
-10	2.149	2.116	2.084	2.050	2.018	47	79.60	80.41	81.23	82.05	82.87
-9	2.326	2.289	2.254	2.219	2.184	48	83.71	84.56	85.42	86.28	87.14
-8	2.514	2.475	2.437	2.399	2.362	49	88.02	88.90	89.79	90.69	91.59
-7	2.715	2.674	2.633	2.593	2.553	50	92.51	93.5	94.4	95.3	96.3
-6	2.931	2.887	2.843	2.800	2.757	51	97.20	98.2	99.1	100.1	101.1
-5	3.163	3.115	3.069	3.022	2.976	52	102.09	103.1	104.1	105.1	106.2
-4	3.410	3.359	3.309	3.259	3.211	53	107.20	108.2	109.3	110.4	111.4
-3	3.673	3.620	3.567	3.514	3.461	54	112.51	113.6	114.7	115.8	116.9
-2	3.956	3.898	3.841	3.785	3.730	55	118.04	119.1	120.3	121.5	122.6
-1	4.258	4.196	4.135	4.075	4.016	56	123.80	125.0	126.2	127.4	128.6
0	4.579	4.513	4.448	4.385	4.320	57	129.82	131.0	132.3	133.5	134.7
1	4.926	4.858	4.791	4.725	4.658	58	136.08	137.3	138.5	139.9	141.2
2	5.294	5.224	5.154	5.085	5.015	59	142.60	143.9	145.2	146.6	148.0
3	5.685	5.612	5.538	5.463	5.387	60	149.38	150.7	152.1	153.5	155.0
4	6.101	6.025	5.948	5.869	5.788	61	156.43	157.8	159.3	160.8	162.3
5	6.543	6.465	6.385	6.302	6.217	62	163.77	165.2	166.8	168.3	169.8
6	7.013	6.933	6.851	6.766	6.678	63	171.38	172.9	174.5	176.1	177.7
7	7.513	7.430	7.345	7.258	7.168	64	179.31	180.9	182.5	184.2	185.8
8	8.045	7.959	7.871	7.781	7.688	65	187.54	189.2	190.9	192.6	194.3
9	8.609	8.520	8.428	8.333	8.235	66	196.09	197.8	199.5	201.3	203.1
10	9.209	9.117	9.022	8.924	8.823	67	204.96	206.8	208.6	210.5	212.3
11	9.844	9.749	9.651	9.550	9.446	68	214.17	216.0	218.0	219.9	221.8
12	10.518	10.419	10.317	10.212	10.104	69	223.73	225.7	227.7	229.7	231.7
13	11.231	11.129	11.024	10.916	10.804	70	233.7	235.7	237.7	239.7	241.8
14	11.987	11.882	11.774	11.662	11.546	71	243.9	246.0	248.2	250.3	252.4
15	12.788	12.680	12.569	12.454	12.335	72	254.6	256.8	259.0	261.2	263.4
16	13.634	13.523	13.408	13.289	13.166	73	265.7	268.0	270.2	272.6	274.8
17	14.530	14.417	14.299	14.176	14.049	74	277.2	279.4	281.8	284.2	286.6
18	15.477	15.362	15.242	15.116	14.984	75	289.1	291.5	294.0	296.4	298.8
19	16.477	16.359	16.236	16.108	15.974	76	301.4	303.8	306.4	308.9	311.4
20	17.535	17.414	17.288	17.157	17.021	77	314.1	316.6	319.2	322.0	324.6
21	18.650	18.526	18.398	18.264	18.124	78	327.3	330.0	332.8	335.6	338.2
22	19.827	19.699	19.567	19.429	19.285	79	341.0	343.8	346.6	349.4	352.2
23	21.068	20.936	20.799	20.656	20.508	80	355.1	358.0	361.0	363.8	366.8
24	22.377	22.241	22.099	21.951	21.797	81	369.7	372.6	375.6	378.8	381.8
25	23.756	23.616	23.469	23.316	23.157	82	384.9	388.0	391.2	394.4	397.4
26	25.209	25.065	24.914	24.756	24.591	83	400.6	403.8	407.0	410.2	413.6
27	26.739	26.591	26.435	26.272	26.103	84	416.8	420.2	423.6	426.8	430.2
28	28.349	28.197	28.038	27.872	27.699	85	433.6	437.0	440.4	444.0	447.5
29	30.043	29.887	29.724	29.554	29.377	86	450.9	454.4	458.0	461.6	465.2
30	31.824	31.664	31.497	31.322	31.139	87	468.7	472.4	476.0	479.8	483.4
31	33.695	33.531	33.359	33.178	32.988	88	487.1	491.0	494.7	498.5	502.2
32	35.663	35.495	35.319	35.134	34.940	89	506.1	510.0	513.9	517.8	521.8
33	37.729	37.557	37.377	37.188	36.989	90	525.76	529.77	533.80	537.86	541.95
34	39.898	39.721	39.537	39.343	39.139	91	546.05	550.18	554.35	558.53	562.75
35	42.175	42.000	41.812	41.614	41.406	92	566.99	571.26	575.55	579.87	584.22
36	44.563	44.383	44.191	43.988	43.774	93	588.60	593.00	597.43	601.89	606.38
37	47.067	46.882	46.685	46.478	46.260	94	610.90	615.44	620.01	624.61	629.24
38	49.692	49.502	49.301	49.090	48.868	95	633.90	638.59	643.30	648.05	652.82
39	52.442	52.247	52.041	51.824	51.596	96	657.62	662.45	667.31	672.20	677.12
40	55.324	55.123	54.913	54.692	54.459	97	682.07	687.04	692.05	697.10	702.17
41	58.34	58.134	57.918	57.691	57.452	98	707.27	712.40	717.56	722.75	727.98
						99	733.24	738.53	743.85	749.20	754.58
						100	760.00	765.45	770.93	776.44	782.00
						101	787.57	793.18	798.82	804.50	810.21

Coefficiente de extinção molar (ϵ) para a oxi-hemoglobina ($\times 10^{-4}\text{M}$).

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

Coefficiente de extinção molar (ϵ) da meta-hemoglobina em função do pH ($\times 10^{-4}\text{M}$)

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

ANEXO 4

Tabela ilustrando os resíduos de aminoácidos que participam da manutenção do tetrâmero de hemoglobina na forma oxigenada e suas interações. * d_{12} refere-se a distância da ligação (em angströms) entre os dois átomos analisados.

Molécula Analisada	Resíduos de Aminoácidos Envolvidos na Interação	Tipo de Interação	$d_{12}(\text{Å})^*$
Hemoglobina Humana (1HHO)	Thr 38 (α) OG1 e His 97 (β) O	Ponte de Hidrogênio	3,22
	Thr 41 (α) O e Arg 40 (β) NH2	Ponte de Hidrogênio	3,41
	Arg 92 (α) NH1 e Gln 39 (β) OE1	Ponte de Hidrogênio	3,48
	Arg 92 (α) NH2 e Gln 39 (β) OE1	Ponte de Hidrogênio	3,18
	Asp 94 (α) OD1 e Trp 37 (β) NE1	Ponte de Hidrogênio	3,57
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CD2	Força de van der Waals	3,43
	Val 96 (α) CG1 e Asp 99 (β) OD1	Força de van der Waals	3,49
	Val 96 (α) CG1 e Asp 99 (β) OD2	Força de van der Waals	3,35
Hemoglobina Humana (1BBB)	Thr 41 (α) O e Arg 40 (β) NH2	Ponte de Hidrogênio	3,52
	Arg 92 (α) NH2 e Glu 43 (β) OE2	Ponte de Hidrogênio	3,09
	Asp 94 (α) OD2 e Asn 102 (β) ND2	Ponte de Hidrogênio	2,75
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CD2	Força de van der Waals	3,36
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CG	Força de van der Waals	3,62
	Val 96 (α) CG1 e Asp 99 (β) OD1	Força de van der Waals	3,73
	Val 96 (α) CG2 e Asp 99 (β) OD1	Força de van der Waals	3,62
Hemoglobina de <i>Gallus gallus</i>	Arg 92 (α) NH2 e Gln 39 (β) OE1	Ponte de Hidrogênio	3,38
	Asp 94 (α) OD2 e Asn 102 (β) ND2	Ponte de Hidrogênio	3,44
	Asp 94 (α) OD1 e Trp 37 (β) NE1	Ponte de Hidrogênio	3,66
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CD2	Força de van der Waals	3,40
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CE3	Força de van der Waals	3,66
	Val 96 (α) CG1 e Asp 99 (β) OD2	Força de van der Waals	3,38
	Val 96 (α) CG2 e Asp 99 (β) OD1	Força de van der Waals	3,74

Molécula Analisada	Resíduos de Aminoácidos Envolvidos na Interação	Tipo de Interação	d₁₂(Å)
Hemoglobina de <i>Liophis miliaris</i>	Arg 92 (α) NE e Pro 36 (β) O	Ponte de Hidrogênio	3,17
	Arg 92 (α) NH1 e Pro 36 (β) O	Ponte de Hidrogênio	2,36
	Arg 92 (α) NH1 e Trp 37 (β) O	Ponte de Hidrogênio	3,34
	Asp 94 (α) OD2 e Asn 102 (β) ND2	Ponte de Hidrogênio	3,38
	Val 96 (α) CG1 e Asp 99 (β) OD2	Força de van der Waals	3,25
	Val 96 (α) CG2 e Val 101 (β) CG1	Força de van der Waals	3,67
	Val 96 (α) CG2 e Val 101 (β) CG2	Força de van der Waals	3,24
	Tyr 140 (α) CD2 e Trp 37 (β) CE3	Força de van der Waals	3,10
Tyr 140 (α) CD2 e Trp 37 (β) CZ3	Força de van der Waals	3,63	
Hemoglobina de <i>Truta</i>	Thr 41 (α) CG2 e Phe 97 (β) CD2	Força de van der Waals	3,56
	Tyr 42 (α) OH e Arg 40 (β) NH1	Ponte de Hidrogênio	3,58
	Asp 94 (α) OD2 e Asn 102 (β) ND2	Ponte de Hidrogênio	2,96
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CD1	Força de van der Waals	3,75
	Pro 95 (α) CD e Trp 37 (β) CG	Força de van der Waals	3,49
	Asp 99 (α) OD2 e Gln 38 (β) NE2	Ponte de Hidrogênio	3,12

CORRECTION FOR BAROMETER (Continued)

BAROM SCALE—METRIC UNITS (Continued)

Temp. °C	Observed height in millimeters																	
	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790
15	1.52	1.54	1.56	1.59	1.61	1.64	1.66	1.69	1.71	1.74	1.76	1.78	1.81	1.83	1.86	1.88	1.91	1.93
16	1.62	1.64	1.67	1.69	1.72	1.75	1.77	1.80	1.83	1.85	1.88	1.90	1.93	1.96	1.98	2.01	2.03	2.06
17	1.72	1.74	1.77	1.80	1.83	1.86	1.88	1.91	1.94	1.97	1.99	2.02	2.05	2.08	2.10	2.13	2.16	2.19
18	1.82	1.85	1.88	1.91	1.93	1.96	1.99	2.02	2.05	2.08	2.11	2.14	2.17	2.20	2.23	2.26	2.29	2.32
19	1.92	1.95	1.98	2.01	2.04	2.07	2.10	2.13	2.17	2.20	2.23	2.26	2.29	2.32	2.35	2.38	2.41	2.44
20	2.02	2.05	2.08	2.12	2.15	2.18	2.21	2.25	2.28	2.31	2.34	2.38	2.41	2.44	2.47	2.51	2.54	2.57
21	2.12	2.15	2.19	2.22	2.26	2.29	2.32	2.36	2.39	2.43	2.46	2.50	2.53	2.56	2.60	2.63	2.67	2.70
22	2.22	2.26	2.29	2.33	2.36	2.40	2.43	2.47	2.51	2.54	2.58	2.61	2.65	2.69	2.72	2.76	2.79	2.83
23	2.32	2.36	2.40	2.43	2.47	2.51	2.54	2.58	2.62	2.66	2.69	2.73	2.77	2.81	2.84	2.88	2.92	2.96
24	2.42	2.46	2.50	2.54	2.58	2.62	2.66	2.69	2.73	2.77	2.81	2.85	2.89	2.93	2.97	3.01	3.05	3.08
25	2.52	2.56	2.60	2.64	2.68	2.72	2.77	2.81	2.85	2.89	2.93	2.97	3.01	3.05	3.09	3.13	3.17	3.21
26	2.62	2.66	2.71	2.75	2.79	2.83	2.88	2.92	2.96	3.00	3.04	3.09	3.13	3.17	3.21	3.26	3.30	3.34
27	2.72	2.77	2.81	2.85	2.90	2.94	2.99	3.03	3.07	3.12	3.16	3.20	3.25	3.29	3.34	3.38	3.42	3.47
28	2.82	2.87	2.91	2.96	3.00	3.05	3.10	3.14	3.19	3.23	3.28	3.32	3.37	3.41	3.46	3.51	3.55	3.60
29	2.92	2.97	3.02	3.06	3.11	3.16	3.21	3.25	3.30	3.35	3.39	3.44	3.49	3.54	3.58	3.63	3.68	3.72
30	3.02	3.07	3.12	3.17	3.22	3.27	3.32	3.36	3.41	3.46	3.51	3.56	3.61	3.66	3.71	3.75	3.80	3.85
31	3.12	3.17	3.22	3.27	3.32	3.37	3.43	3.48	3.53	3.58	3.63	3.68	3.73	3.78	3.83	3.88	3.93	3.98
32	3.22	3.28	3.33	3.38	3.43	3.48	3.54	3.59	3.64	3.69	3.74	3.79	3.85	3.90	3.95	4.00	4.05	4.11
33	3.32	3.38	3.43	3.48	3.54	3.59	3.64	3.70	3.75	3.81	3.86	3.91	3.97	4.02	4.07	4.13	4.18	4.23
34	3.42	3.48	3.53	3.59	3.64	3.70	3.75	3.81	3.87	3.92	3.98	4.03	4.09	4.14	4.20	4.25	4.31	4.36
35	3.52	3.58	3.64	3.69	3.75	3.81	3.86	3.92	3.98	4.03	4.09	4.15	4.21	4.26	4.32	4.38	4.43	4.49

BAROM SCALE—ENGLISH UNITS