UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**AUTO-OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA DE *Glossoscolex paulistus*:
EFEITO DO pH, DO CIANETO E DO SURFACTANTE ANIÔNICO SDS**

ALESSANDRA LIMA POLI LEVES

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Química Analítica

ORIENTADOR: PROF. Dr. HIDETAKE IMASATO

São Carlos

2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio (*in memoriam*) e Margarida, à
minha irmã Daniela, ao Pedro Luís e ao meu filho Lucas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hidetake Imasato pela orientação, convivência amiga e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcel Tabak pela infra-estrutura disponibilizada e pelas significativas contribuições, principalmente no capítulo relacionado ao estudo da influência do surfactante.

Ao Prof. Dr. Fergus Gessner pelas importantes sugestões no exame de qualificação e pelo apoio em todos os momentos deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Miguel G. Neumann pelo apoio e convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Angel A. Hidalgo, um verdadeiro amigo, que me ajudou na análise dos dados cinéticos e nas discussões.

À Prof. Dra. Janice R. Perussi pela convivência amiga.

À Dra. Carla C. S. Cavaleiro pela amizade e pelo incentivo constante.

Em especial, ao Dr. Leonardo M. Moreira pelas discussões científicas, parceria nos artigos e pela valiosa amizade.

Ao meu grande amigo Julio C. Ribelatto pela separação do monômero *d* e excelente convivência.

À Dra. Shirley C. M. Gandini e à Sandra P. Fernandez, grandes amigas que eu tive a felicidade de conhecer no grupo de Biofísica Molecular.

À Andressa Patrícia pelas medidas de CD e ao amigo Ézer pelo auxílio em vários experimentos.

Aos amigos do grupo de Biofísica Molecular pela excelente convivência e pelos vários momentos muito agradáveis.

Aos amigos do grupo de Fotoquímica pela prazerosa convivência diária, que é sempre um estímulo ao trabalho.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.

E a Deus, nosso Pai, pela saúde que me proporcionou nestes anos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hemoglobinas.....	2
1.2 Auto-oxidação de hemoglobinas	9
1.3 Hemoglobinas Extracelulares Gigantes	16
1.4 Hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i>	21
1.4 Interação detergente-proteína	30
1.5 Técnicas espectroscópicas	40
1.5.1 O Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível das porfirinas.....	40
1.5.2. Dicroísmo Circular em hemoproteínas.....	41
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Materiais.....	44
3.1.1 Amostra estudada	44
3.1.2 Equipamentos	44
3.1.3 Reagentes	45
3.2 Métodos.....	45
3.2.1 Obtenção e purificação - oxihemoglobina íntegra e monômero	45
3.2.2 Medidas da velocidade de auto-oxidação.....	46
3.2.2.1 Estudo da auto-oxidação em função do pH	46
3.2.2.2 Estudo da auto-oxidação em função da concentração do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)	47

3.2.2.3 Estudo da auto-oxidação na presença de cianeto de potássio	48
3.2.3 Medidas de Dicroísmo Circular.....	49
3.2.4 Espalhamento de luz ressonante.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 Cinética de auto-oxidação da HbGp em função do pH	51
4.2 Formulação cinética para a reação de auto-oxidação da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i>	59
4.3 Reação de auto-oxidação do monômero <i>d</i> da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i>	76
4.4 Efeito do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) na auto-oxidação da hemoglobina de <i>Glossoscolex paulistus</i>	84
4.4.1 Estudo da auto-oxidação em função da concentração de SDS em pH 7,0	84
4.4.2 Estudo da auto-oxidação em função da concentração de SDS em pH 9,0.	92
4.5 Estudo da auto-oxidação da HbGp na presença do ligante cianeto	107
5. CONCLUSÕES.....	116
6. BIBLIOGRAFIA.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Arranjo tetramérico da hemoglobina humana.	2
Figura 1.2 Grupo heme	4
Figura 1.3 Grupo heme, sua proximidade com as histidinas F8 e E7	5
Figura 1.4 Histidina E7, distal, dando estabilidade à ligação Fe-O ₂	8
Figura 1.5 Representação do contato $\alpha_1\beta_1$ na hemoglobina humana.....	16
Figura 1.6 Representação da hemoglobina de <i>Lumbricus terrestris</i>	17
Figura 1.7 Modelos dos arranjos espaciais da HbLt	18
Figura 1.8 Espécies em meio alcalino e meio ácido	25
Figura 1.9 Posições dos triptofanos no modelo do monômero da HbGp.....	30
Figura 1.10 Estrutura química do surfactante aniônico SDS.	32
Figura 1.11 Representação da ligação do surfactante à proteína.....	35
Figura 1. 12 Estruturas propostas para os complexos proteína-surfactante.....	36
Figura 1.13 Estruturas possíveis para os complexos proteína-surfactante no modelo do colar de pérolas.....	37
Figura 4.1 Espectros de UV-Vis obtidos no início (oxi-HbGp) e no final da reação de auto-oxidação da HbGp em função do pH.....	51
Figura 4.2 Gráficos da cinética de primeira ordem para auto-oxidação da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i>	53
Figura 4.3 Gráficos da cinética de primeira ordem para auto-oxidação da hemoglobina extracelular de <i>Glossoscolex paulistus</i>	55
Figura 4.4 Gráfico de k_{obs1} (□) e k_{obs2} (○) em função do pH para a reação de auto-oxidação da hemoglobina de <i>Glossoscolex paulistus</i>	56
Figura 4.5 Espectros de dicroísmo circular da HbGp no início da reação de auto-oxidação e após 4 horas de cinética	58
Figura 4.6 Gráfico da k_{obs1} em função do pH para a auto-oxidação da componente rápida da HbGp	66

Figura 4.7 Obtenção da constante de dissociação do grupo ácido. Gráfico do χ^2 obtido em função do valor de pK. k_{obs1} da Hb íntegra de <i>G. paulistus</i>	69
Figura 4.8 Gráfico do k_{obs2} em função do pH para a auto-oxidação da componente rápida da HbGp.....	70
Figura 4.9 Obtenção da constante de dissociação do grupo ácido. Gráfico do χ^2 obtido em função do valor de pK. k_{obs2} da Hb íntegra de <i>G. paulistus</i>	71
Figura 4.10 Gráficos da cinética de primeira ordem para auto-oxidação do monômero <i>d</i> da HbGp	77
Figura 4.11 Gráfico da k_{obs} em função do pH para a auto-oxidação do monômero <i>d</i> isolado da HbGp	79
Figura 4.12 Gráfico do k_{obs1} e k_{obs2} da HbGp íntegra e do monômero <i>d</i> em função do pH	82
Figura 4.13 Espectros de UV-Vis da oxi-HbGp nas concentrações de SDS indicadas.	85
Figura 4.14 Curvas cinéticas da auto-oxidação da oxi-HbGp, pH 7.0 nas concentrações de SDS indicadas.....	87
Figura 4.15 Constantes de velocidade k_{obs} , em função da concentração de SDS	88
Figura 4.16 Gráficos das constantes de velocidade k_{obs1} e k_{obs2} em função da concentração de SDS.....	91
Figura 4.17 Espectros da HbGp gerados durante o processo de auto-oxidação induzido pela adição de SDS.....	93
Figura 4.18 Gráficos da cinética de auto-oxidação referente à HbGp, pH 9.0 em função da concentração de SDS	97
Figura 4.19 Gráficos das constantes de velocidade, k_{obs1} e k_{obs2} , em função da concentração de SDS em pH 9,0.	100
Figura 4.20 Gráfico da razão dos fatores pré-exponenciais $\Delta A_{máx1}$ em função da concentração de SDS.....	101
Figura 4.21 Gráficos das constantes de velocidade k_{obs1} e k_{obs2} nos valores de pH 7,0 e 9,0 em função da concentração de SDS.....	106

Figura 4.22 Mudanças espectrais ocorridas no processo de auto-oxidação da HbGp, na presença de 0.023 mol L^{-1} de cianeto.	107
Figura 4.23 Constantes de velocidade observadas, k_{obs1} e k_{obs2} , em função da concentração de cianeto.....	109
Figura 4.24 Gráfico da razão dos fatores pré-exponenciais $\Delta A_{\text{máx1}}$ e $\Delta A_{\text{máx2}}$ em função da concentração de cianeto.	110
Figura 4.25 Espalhamento de luz da hemoglobina íntegra de <i>G. paulistus</i> medido a 90° de luz incidente ($\approx 310 \text{ nm}$) durante o processo de auto-oxidação na presença de $0,006 \text{ M}$ e $0,016 \text{ M}$ de cianeto	112
Figura 4.26 Gráfico das constantes de velocidade observadas, k_{obs2} da hemoglobina íntegra de <i>Glossoscolex paulistus</i> e do monômero <i>d</i> em função da concentração de cianeto.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Constantes de velocidade e constante de dissociação ácida obtidas a partir das curvas de dependência do pH para a auto-oxidação da hemoglobina íntegra de <i>Glossoscolex paulistus</i> em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM a 42°C.....	68
Tabela 4.2 Constantes de velocidade observadas obtidas para a HbGp íntegra e para a subunidade monomérica <i>d</i> , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.....	78
Tabela 4.3 Constantes de velocidade e constante de dissociação ácida obtidas a partir das curvas de dependência do pH para a auto-oxidação do monômero <i>d</i> da HbGp em tampão 30 mM a 42°C.....	80
Tabela 4.4 Constantes de velocidade observadas obtidas para a HbGp íntegra e para a subunidade monomérica <i>d</i> , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.....	81
Tabela 4.5 Constantes de velocidade para a auto-oxidação da HbGp em função da concentração de SDS em pH 7,0.	90
Tabela 4.6 Constantes de velocidade referentes à auto-oxidação da HbGp em função da concentração de SDS em pH 9,0.....	98
Tabela 4.7 Constantes de velocidade para a oxidação da HbGp induzida pelo cianeto. k'_{CN1} é obtida utilizando os dados para as concentrações de cianeto abaixo de 0,010 M e k''_{CN1} para as concentrações maiores que 0,010 M.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

HbGp – Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

HbLt – Hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

Tris-HCl - Cloridrato de hidroximetil aminometano

OxiHb - Oxi-hemoglobina

SDS – Dodecil sulfato de sódio

k_{obs} – Constante de velocidade observada

SAXS – Espalhamento de raios X a baixo ângulo

RESUMO

O arranjo oligomérico e as mudanças na estrutura polipeptídica podem influenciar fortemente na velocidade de auto-oxidação das hemoproteínas, assim como os diferentes nucleófilos que atuam neste processo em função do pH. No presente trabalho, a velocidade de auto-oxidação da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) em seu estado íntegro e do monômero *d* isolado é estudada em função do pH e na presença do ligante cianeto. O comportamento da curva cinética é dependente do pH, apresentando-se monofásico ou bifásico dependendo do estado de oligomerização da proteína. Assim, nos valores de pH que geram a dissociação oligomérica, a curva cinética foi bifásica. Na faixa de pH 5,9-7,3, que apresenta a proteína íntegra, foi verificado um comportamento cinético mono-exponencial. Em meio alcalino, a auto-oxidação da hemoglobina íntegra na presença dos ligantes hidroxila e/ou cianeto apresenta comportamento complexo, descrito pela combinação de duas cinéticas de primeira-ordem. O processo lento ocorre devido à auto-oxidação do monômero *d* e o processo rápido é atribuído ao trímero *abc*. Em pH 7,0, a cinética é mono-exponencial, indicando uma estrutura oligomérica altamente preservada. Em meio ácido, tanto a hemoglobina íntegra como o monômero *d* apresentam a auto-oxidação catalisada por próton. É observada, através das constantes de velocidade de auto-oxidação da hemoglobina íntegra na presença de cianeto, uma cooperatividade no processo rápido devido ao trímero da HbGp. Além disso, a influência do surfactante dodecil sulfato de sódio na auto-oxidação da HbGp é avaliada. Uma influência mais efetiva do SDS é constatada em pH 7,0, enquanto que, em pH 9,0, a dissociação oligomérica é a influência predominante. Provavelmente, esta diferença está relacionada ao ponto isoelétrico ácido da HbGp, que favorece a interação entre SDS e HbGp em pH 7,0, quando comparado ao pH 9,0. O mecanismo de auto-oxidação e as correlações entre a cinética e o arranjo oligomérico são discutidos em detalhes no presente trabalho.

ABSTRACT

The oligomeric assembly and the changes in the polypeptidic structure can influence the autoxidation rate of the heme proteins, as well as the different nucleophiles, which act in this process as a function of pH. In the present work, the autoxidation rate of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) in integral state and of the isolated *d* monomer is studied as a function of pH and in the presence of the cyanide ligand. The kinetic decay behavior is dependent of pH, presenting mono-exponential or bi-exponential character, depending of the oligomeric state of the protein. Thus, in the pH values that originated the oligomeric dissociation, the kinetic decay was bi-exponential. In the pH range 5.9 - 7.3, which show the whole protein, a mono-exponential kinetic behavior was verified. In alkaline medium, the whole hemoglobin autoxidation in the presence of the hydroxyl and/or cyanide presents complex behavior described by the combination of two first order kinetics. The slow process occurs due to the *d* monomer autoxidation and the fast process is attributed to *abc* trimer. At pH 7.0, the kinetic is mono-exponential, indicating a highly conserved oligomeric structure. In acid medium, both, the whole hemoglobin and the *d* monomer presented the proton-catalyzed autoxidation. A cooperativity in the fast process due to trimer of the HbGp can be observed, through the autoxidation rate constants of the whole hemoglobin in the presence of cyanide. Furthermore, the influence of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) in the HbGp autoxidation was evaluated. At pH 7.0, it was verified a more effective influence for SDS, while at pH 9.0, the oligomeric dissociation was the main influence. Probably, this difference is related to the acid isoelectric point of the HbGp, which favors the interaction between SDS and HbGp at pH 7.0, as compared with the pH 9.0. The autoxidation mechanism and the correlation between the kinetic and the oligomeric arrangement are discussed in details in the present work.

1. INTRODUÇÃO

A química de proteínas é uma área que vem recebendo grande atenção por parte de pesquisadores com diferentes formações. Realmente, em função da extraordinária relevância biológica dessas estruturas macromoleculares, diversos grupos de pesquisa vêm estudando esse tema com diferentes abordagens. Apesar disso, muitas questões envolvendo proteínas ainda permanecem insolúveis. Neste contexto, destacam-se os sistemas hemoprotéicos, que são diretamente responsáveis pela vida, devido ao desempenho de várias funções fundamentais ao desenvolvimento de atividades fisiológicas em diversos seres vivos.

Um dos aspectos altamente relevantes das hemoproteínas em geral, e das hemoglobinas em especial, se refere ao fenômeno chamado auto-oxidação, que torna o centro de coordenação do heme incapaz de se ligar à molécula de oxigênio, ou seja, faz com que a hemoglobina perca a sua função. De fato, os detalhes do mecanismo de reação envolvido no processo de auto-oxidação permanecem controversos na literatura e são de interesse tanto físico-químico como clínico. Os estudos cinéticos envolvendo auto-oxidação de hemoproteínas têm sido considerados uma relevante ferramenta para avaliar a estabilidade da ligação ferro-oxigênio. Isto ocorre em função desta abordagem permitir a análise das mudanças do meio protéico em questão, haja vista o fato de ser um método extremamente sensível às alterações conformacionais da organização oligomérica e do próprio bolsão hidrofóbico do heme.

1.1 Hemoglobinas

A hemoglobina humana foi a primeira proteína cujas estruturas terciária e quaternária foram determinadas. Esta caracterização foi feita por Max Perutz e colaboradores da Universidade de Cambridge, em 1959, através de um emprego pioneiro de raios X na caracterização de proteínas [Dickerson, 1983].

A hemoglobina humana é uma hemoproteína intracelular, isto é, se localiza nas hemácias e possui um arranjo tetraédrico e é constituída de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α e duas cadeias β unidas por interações fracas, não covalentes, como pontes salinas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (figura 1.1).

Figura 1.1 Arranjo tetramérico da hemoglobina humana.

A hemoglobina tem por função transportar oxigênio do pulmão para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão. Nos tecidos ocorre a

liberação do oxigênio, devido às baixas pressões de O_2 ($pO_2 \approx 20$ torrs), que diminuem a afinidade da hemoglobina pelo gás, em função do deslocamento do equilíbrio químico. Nos pulmões, as altas pressões de O_2 ($pO_2 \approx 100$ torrs) saturam a hemoglobina rapidamente. O dióxido de carbono, por sua vez, é transportado pela desoxihemoglobina de dois modos:

Pela ligação direta do CO_2 ao terminal amínico;

E como íon bicarbonato (HCO_3^-) em solução, a partir da hidratação do CO_2 do plasma.

Ao atingir o pulmão, a desoxihemoglobina libera os prótons, deslocando o equilíbrio para a liberação do CO_2 , que é eliminado na expiração [Dickerson, 1983].

A liberação dos gases transportados é também controlada pelo pH, que consiste em um fenômeno conhecido como efeito Bohr. A ligação do oxigênio na hemoglobina é cooperativa, ou seja, a coordenação do O_2 a um heme facilita a coordenação de outra molécula de O_2 com outro heme do mesmo tetrâmero. A recíproca é verdadeira, ou seja, a saída desta molécula de O_2 de um

determinado grupo heme facilita a saída das moléculas de O_2 dos outros hemes [Dickerson, 1983] [Stryer, 1988].

O armazenamento do oxigênio é realizado pela mioglobina que está distribuída nos músculos. A mioglobina é um monômero, isto é, constitui-se de uma única subunidade, não apresentando o fenômeno da cooperatividade.

Figura 1.2 Representação do grupo heme, que é um componente essencial em hemoglobinas, citocromos e enzimas como catalases e peroxidases.

O heme (figura 1.2) é um grupo prostético que se encontra no interior do enovelamento de cada cadeia polipeptídica da hemoglobina. Sua estrutura consiste de quatro anéis pirrólicos coplanares, ligados entre si através de uma ponte de metina. A cada um dos anéis C e D está ligado um grupo propionato, uma metila em cada anel, e em cada um dos anéis A e B está ligado um grupo eteno. Os átomos de nitrogênios dos anéis pirrólicos estão orientados para o centro da estrutura, sendo responsáveis pela quelação de um íon de ferro

central. Esse íon se encontra na forma ferrosa e é coordenado pelo oxigênio para o transporte deste ligante fundamental à vida [Stryer, 1988].

A vizinhança do grupo heme é constituída de resíduos apolares com exceção de duas histidinas, a distal (E7, sétimo resíduo da hélice E) e a proximal (F8, oitavo resíduo da hélice F) (figura 1.3).

Figura 1.3 Representação do grupo heme com destaque para sua proximidade com as histidinas F8 e E7 e para o local de ligação da molécula de O₂: (A) espacial; (B) Vista lateral.

Desta forma, tanto a hemoglobina como a mioglobina desempenham suas respectivas funções fisiológicas com o centro metálico no estado ferroso, isto é, no estado de oxidação 2⁺. Há seis sítios de coordenação ao redor do íon ferroso, em função do centro de coordenação Fe(II) apresentar uma

configuração eletrônica d^6 . Destes seis sítios de coordenação, quatro sítios estão coordenados a átomos de nitrogênio pirrólicos do anel porfírinico.

A porfirina é um ligante macrocíclico tetradentado, pois coordena o metal através de quatro sítios de ligação. O fato de ser tetradentado está relacionado com representativa estabilidade termodinâmica dos compostos de coordenação porfírinicos, tanto do ponto de vista entrópico como do ponto de vista entálpico. Esta estabilidade peculiar a ligantes volumosos vem sendo chamada de “efeito macrocíclico” e é bastante comum aos ligantes tetraazamacrocíclicos [Moreira, 2004].

A quinta posição de coordenação do heme é ocupada pelo átomo de nitrogênio de um imidazol, oriundo do grupo lateral da histidina proximal, sobre o qual o heme se apóia na proteína. Portanto, o imidazol da histidina proximal é o ligante endógeno responsável pela ligação entre o grupamento prostético e a cadeia polipeptídica. O sexto sítio de coordenação está disponível para ligar-se a um ligante exógeno, podendo alterar o estado de spin do centro de coordenação, e até mesmo favorecer a modificação do estado de oxidação do metal.

O íon ferroso, que se encontra fora do plano do heme na desoxi-hemoglobina, move-se durante o processo de oxigenação em direção ao plano da porfirina para formar uma ligação forte com o oxigênio, restabelecendo a planaridade do heme (figura 1.3). Realmente, este fenômeno, que é fundamental para a cooperatividade das hemoglobinas, está relacionado a várias propriedades do heme.

Realmente, é bem conhecido na literatura que as várias mudanças conformacionais possíveis do anel porfirínico e suas conseqüentes alterações na combinação de orbitais moleculares, são responsáveis por propriedades redox e alterações em afinidades por ligantes em complexos ferro-porfirínicos modelos e hemoproteínas [Moreira, 2004.].

Medidas de infravermelho e espectroscopia Mössbauer, claramente indicam que a conversão tanto da mioglobina como da hemoglobina para suas formas oxigenadas está associada a um rearranjo eletrônico. Isto pode ser descrito por uma representativa doação π (transferência de carga) do Fe(II) para o O₂ e uma doação σ (coordenação) do O₂ para o Fe(II), resultando na forte ligação covalente entre o ferro e o oxigênio [Shikama, 1998].

No caso fisiológico, a histidina E7, denominada distal, está voltada à sexta coordenação do ferro, estabilizando a ligação Fe-O₂ (figura1.4) pela formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo NH do imidazol e o oxigênio molecular.

Realmente, o próton proveniente da histidina distal, efetivando uma ligação de hidrogênio com o oxigênio molecular coordenado ao centro ferroso, deve gerar um efeito indutivo sobre o ligante oxigênio, acentuando as

propriedades eletrofílicas deste ligante. Esta influência torna o oxigênio mais apto para “retirar” densidade eletrônica do centro de coordenação do heme.

É conhecido na literatura que a ligação de hidrogênio entre a histidina distal e o oxigênio molecular coordenado como sexto ligante do centro ferroso seria um fator decisivo para a ligação de oxigênio nas hemoproteínas. Isto ocorre porque a ligação de hidrogênio em questão estabilizaria significativamente os orbitais π^* do oxigênio molecular, acentuando seu caráter ácido π e a conseqüente retrodoação dos orbitais de simetria π do ferro, d_{xz} e d_{yz} , para estes orbitais semi-preenchidos do oxigênio.

Portanto, a estabilização dos orbitais π^* torna o oxigênio um ligante viável para as hemoglobinas, ou seja, um ligante com afinidade pelo centro ferroso suficiente para competir por essa coordenação.

Figura 1.4 Representação da histidina E7, distal, proporcionando estabilidade à ligação Fe-O₂ através da formação de uma ligação de hidrogênio entre o NH do imidazol e o oxigênio molecular.

1.2 Auto-oxidação de hemoglobinas

A oxidação do centro ferroso do grupo heme para o estado trivalente leva à formação da espécie denominada meta-hemoglobina. Após esta oxidação, o íon de ferro não pode mais formar complexo com o oxigênio, pois o ligante oxigênio não tem afinidade pelo íon férrico. A meta-hemoglobina pode ser obtida pela exposição de alguns derivados ferrosos a um oxidante como ferricianeto ou pode ser formada espontaneamente, a partir da proteína oxigenada nativa. Este fenômeno ocorre também “*in vivo*” e é responsável pela presença de aproximadamente 0,5% de meta-hemoglobina nas células vermelhas do sangue [Antonini, 1981].

O ramo superior da equação 1.4 esquematiza a ligação reversível da molécula de oxigênio ao íon ferroso. Entretanto, pode ocorrer também a dissociação espontânea do oxigênio na forma do ânion superóxido, descrito pelo outro ramo da equação. Esta dissociação implica na redução do oxigênio às custas da oxidação do ferro. Esta transformação das hemoglobinas e das mioglobinas é denominada de auto-oxidação.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para se obter hemoproteínas recombinantes que apresentem uma boa estabilidade contra a auto-oxidação, mantendo uma baixa afinidade pelo oxigênio e alta cooperatividade [Carver, 1992] [Brantley, 1993] [Jeong, 1999] [Tada, 1998]. Estes fatores são importantes para carregadores eficientes.

Importante registrar que a oxidação *in vivo* atinge percentual superior a 0,5%, somente sendo mantida em valores menores ou iguais a 0,5% em função da atuação de mecanismos de redução enzimática. De fato, nas células vermelhas e nos tecidos musculares estão presentes o NADH-citocromo b_5 oxidoreductase, que reduz a meta-hemoglobina ou a meta-mioglobina para a sua forma deoxi ferrosa novamente.

Esta redução previne a acumulação da forma meta *in situ*. As enzimas em questão são denominadas meta-hemoglobina redutase e meta-mioglobina redutase, respectivamente. Estas enzimas apresentam o grupo FAD que recebe elétrons do NADH. De fato, a forte redução cíclica das espécies férricas (Fe(III)) por estas enzimas é a base para o desempenho das funções tanto da hemoglobina como da mioglobina *in vivo*, sendo que a reação de auto-oxidação é inevitável na natureza para todas as hemoproteínas que ligam oxigênio, assim como para os carregadores sintéticos [Shikama, 2003].

O nível da meta-hemoglobina em algumas condições patológicas pode aumentar consideravelmente. Esta situação pode ser atribuída a um defeito congênito da redutase cistólica ou às anormalidades na estrutura da hemoglobina [Antonini, 1981].

A hemoglobina humana exibe velocidades de auto-oxidação não equivalentes para as cadeias α e β como função do pH. A não equivalência na velocidade de auto-oxidação destas cadeias ocorre em meio ácido, enquanto que em valores de pH maiores que 8,5 a auto-oxidação é equivalente. A velocidade de auto-oxidação das cadeias α é maior que a velocidade das cadeias β . Isto ocorre porque as cadeias α são mais sensíveis ao processo de auto-oxidação, devido à separação rápida das mesmas em relação ao restante da hemoglobina parcialmente oxidada [Tsuruga, 1997][Tsuruga, 1998]. Constata-se um aumento de 17 vezes na velocidade de auto-oxidação quando a hemoglobina se dissocia em dímeros $\alpha\beta$, em concentrações baixas de hemoglobina, pois estes dímeros são mais sensíveis à auto-oxidação quando comparados à forma tetramérica.[Zhang, 1991].

Detalhes do mecanismo desta reação de auto-oxidação são de interesse químico e clínico e têm sido estudados por muitos autores. A facilidade para a auto-oxidação ocorrer varia substancialmente de proteína para proteína e alguns fatores como pH, pressão de oxigênio, presença de ligantes e dissociação da proteína podem influenciar na velocidade desse processo [Shikama, 1998] [Zhang, 1991]. Gonzalez e colaboradores [Gonzalez, 1998] apresentaram três possíveis mecanismos para a reação de auto-oxidação de proteínas:

1) Dissociação do superóxido protonado a partir do oxi-heme

Este mecanismo de auto-oxidação prevalece em condições saturadas de oxigênio, sendo dependente do pH. O oxigênio ligado ao heme é dissociado como ânion superóxido a partir do oxi-heme protonado e a velocidade da auto-oxidação, por sua vez, aumenta com a diminuição do pH.

2) Transferência de elétron por esfera externa do intermediário pentacoordenado desoxi-heme

O mecanismo de esfera externa não requer a dissociação do ânion superóxido a partir do complexo oxi-heme, sendo que a transferência do elétron do ferro para o oxigênio ocorre a partir do complexo deoxi-heme, isto é, do complexo pentacoordenado ferroso. Este mecanismo de transferência de elétron por esfera externa não depende do pH.

3) Transferência de elétron por esfera externa do intermediário desoxi-heme hexacoordenado

A reação de transferência de elétrons por ligantes é mediada por duas etapas. Primeiramente, um nucleófilo N, por exemplo a água, se liga à mioglobina ferrosa e, em seguida, o heme ferroso hexacoordenado transfere um elétron para o oxigênio, via mecanismo de esfera externa.

Alguns trabalhos com mioglobina e hemoglobina [Sato, 1981] [Wallace, 1974] descrevem uma proposta para o mecanismo de auto-oxidação na presença de ligantes. Nestes trabalhos, é observado um aumento na velocidade de auto-oxidação na presença de quantidades excessivas de ânions, tais como N_3^- , SCN^- , OCN^- , F^- . Sugere-se que a reação se processe por um caminho de deslocamento redutivo do oxigênio como O_2^- da hemoglobina pelos ânions, ocorrendo a oxidação do centro ferroso concomitantemente, através de um ataque nucleofílico dos ânions ao metal.

Em condições fisiológicas, o processo elementar envolvido na reação de auto-oxidação pode ser observado como um mecanismo de substituição

nucleofílica S_N2 , onde X^- pode ser N_3^- , SCN^- , OCN^- , OH^- , F^- ou CN^- , além de H_2O “*in vivo*” [Sato, 1981] [Shikama, 1998].

Os ligantes que atuam como nucleófilos na reação acima apresentam elevada afinidade pelo centro de coordenação no estado férrico e baixa afinidade por este centro metálico no estado ferroso [Wallace, 1982] [Springer, 1989] [Ikeda-Saito, 1992]. Isto ocorre em função da alta densidade de carga eletrônica destes ligantes, que, à exceção do ligante água, são ligantes aniônicos. Considerando que o centro ferroso apresenta uma configuração eletrônica d^6 e o centro férrico d^5 , é compreensível a maior estabilidade dos complexos formados entre estes ligantes e o centro férrico, que é um ácido mais poderoso que o centro ferroso. Realmente, a repulsão eletrônica deve ser bem mais intensa na interação entre estes ligantes e o íon ferroso [Sigman, 1999].

A reação de auto-oxidação da espécie oxi-mioglobina para a espécie meta-mioglobina pode ser explicada por três diferentes processos de deslocamento dependentes do pH.

O esquema 1.9 representa a auto-oxidação espontânea através da substituição redutiva do oxigênio pela água. O esquema 1.11 apresenta a

substituição do oxigênio pela hidroxila. Na catálise por próton, representada pelo esquema 1.10, a histidina forma ligação de hidrogênio com o oxigênio, facilitando o movimento do catalisador do solvente para o oxigênio, através do imidazol, por um mecanismo de substituição de prótons, sendo que o nucleófilo é a própria água.

A auto-oxidação da cadeia β , em especial no dímero $\alpha\beta$, é mais resistente à catálise por próton, devido a um afastamento da histidina do oxigênio, impedindo a formação da ligação de hidrogênio e prevenindo a transferência do próton. Este processo é diferente daquele relacionado à cadeia α , onde a catálise por próton, envolvendo o resíduo de histidina distal, é muito evidente (figura 1.5) [Tsuruga, 1998].

Figura 1.5 Representação esquemática do contato $\alpha_1\beta_1$ produzindo inclinação na histidina distal da cadeia β da hemoglobina humana [Tsuruga, 1998].

1.3 Hemoglobinas Extracelulares Gigantes

As hemoglobinas extracelulares gigantes, também chamadas eritrocruorinas, são hemoproteínas interessantes devido à massa molecular elevada e à estrutura oligomérica, que envolve um grande número de subunidades. O filo anelídeo compreende mais de oito mil espécies, subdivididas em aquáticas, terrestres e marinhas. A maioria dos anelídeos possui hemoglobinas extracelulares e intracelulares [Lamy, 1996].

A hemoglobina do anelídeo *Lumbricus terrestris* (HBLt) tem sido muito estudada, sendo que a disposição de suas subunidades no arranjo oligomérico ainda permanece controversa [Daniel, 2004]. Segundo os dados mais aceitos, esta hemoglobina é formada por 144 globinas e 36 cadeias estabilizadoras

chamadas “*linkers*”, que são cruciais para a sua integridade estrutural [Royer, 2000] [Zal, 2000].

Figura 1.6 Representação esquemática da hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

As cadeias da HbLt estão dispostas como dois discos hexagonais sobrepostos, apresentando as subunidades *a*, *b*, *c* e *d*, que contém grupos heme, nos vértices dos hexágonos e as subunidades “*linkers*” ou cadeias “*L*”, que não apresentam grupamentos heme, na parte central do arranjo supramolecular [Royer, 2001]. As subunidades estão arranjadas como doze dodecâmeros, sendo que cada um deles é constituído por três tetrâmeros. Portanto, o dodecâmero consiste de três trímeros (figura 1.6), que são cadeias monoméricas *a*, *b*, *c* ligadas por ligações de dissulfeto, e três cadeias monoméricas *d* [Haas, 1997] [Royer, 2001].

Em suma, a HbLt se apresenta como uma bicamada hexagonal, sendo que sua estrutura quaternária é chamada de “modelo do bracelete” (figura 1.7).

Esta arquitetura oligomérica é suportada por microscopia crioeletrônica [Krebs, 1996] [Green, 2004] [Yamaki, 1998].

Figura 1.7 Modelos dos arranjos espaciais da hemoglobina íntegra, do dodecâmero e do tetrâmero de *Lumbricus terrestris* [Royer, 2001].

As hemoglobinas gigantes extracelulares possuem alta cooperatividade na ligação com o oxigênio molecular [Madura, 2002][Krebs, 1996] e apresentam um ponto isoelétrico abaixo de 7. Suas cadeias *linkers*, que são subunidades com função estrutural e sem grupamento prostético, possuem um ponto isoelétrico entre pH 4,7 e 5,6 [Kuchumov, 1998]. Além disso, constituem sistemas significativamente auto-organizáveis, como demonstram estudos envolvendo reassociação das cadeias [Zhu, 1996][Kuchumov, 1998].

Segundo Vinogradov [Vinogradov, 2004], as hemoglobinas extracelulares gigantes representam o ápice de complexidade das hemoproteínas que ligam oxigênio. Estas hemoglobinas são sistemas supramoleculares muito intrigantes,

inclusive, sob o aspecto da seleção natural, uma vez que demonstram propriedades de adaptação não triviais em meios ricos em sulfetos [Bailly, 2005][Zal, 2000].

A título de ilustração das potencialidades deste sistema protéico é interessante mencionar que a hemoglobina de *Lumbricus terrestris* vem sendo aplicada em pesquisas de sangue artificial [Dorman, 2004][Hirsch, 1997]. Strand e colaboradores [Strand, 2004] afirmam que as eritrocruorinas têm sido sugeridas como sistemas modelos de substitutos terapêuticos do sangue devido à sua natureza extracelular, grande tamanho e resistência à oxidação. Realmente, essa hemoglobina extracelular, quando em seu estado íntegro, apresenta estabilidades estrutural e redox [Dorman, 2004][Madura, 2002] significativamente maiores do que as hemoglobinas intracelulares, como por exemplo, a hemoglobina humana, o que não deixa de tornar a avaliação dos fatores que controlam esse comportamento altamente relevante não só para o estudo desta hemoglobina gigante, como igualmente, para proporcionar um melhor entendimento das hemoglobinas em geral.

Para um estudo detalhado das partes constituintes da hemoglobina, duas condições diferentes de dissociação têm sido empregadas: o meio alcalino e a incubação em uréia a 4 M em pH 7. A dissociação em pH 9.3 da HbLt permite isolar o trímero *abc* e o monômero *d*. A dissociação da HbLt com uréia 4M pH 7, seguida por cromatografia de filtração em gel, produz uma fração de massa molecular 200 KDa que tem sido associada à espécie $(abcd)_3$ [Lamy, 1996].

No trabalho sobre auto-oxidação da hemoglobina de *Perinereis brevicirris*, realizado por Suzuki [Suzuki, 1983], observa-se que a velocidade de auto-oxidação da hemoglobina de invertebrados é mais de dez vezes menor que a velocidade de auto-oxidação da hemoglobina de vertebrados. Isto ocorre em função da estrutura altamente organizada das hemoglobinas de invertebrados proteger a molécula contra a auto-oxidação. O valor da energia de ativação para a reação de auto-oxidação da hemoglobina de *Perinereis brevicirris* é próximo ao valor para a mioglobina bovina, sugerindo que o mecanismo de auto-oxidação é semelhante àquele mecanismo pertinente às mioglobinas de vertebrados.

Também é constatado que a presença de cátions divalentes como Ba (II), Ca (II), Sr (II) e Mg (II) inibem o processo de auto-oxidação na hemoglobina de *Lumbricus terrestris*, diminuindo a velocidade da reação. Isto ocorre porque esses cátions divalentes produzem um grande efeito na ligação do oxigênio. A função destes cátions na estabilização da forma oxi-hemoglobina de *Lumbricus terrestris* consiste em evitar a dissociação do oxigênio, que é geralmente a primeira etapa para a formação da meta-hemoglobina. Além disso, estes cátions também evitam a dissociação da proteína em subunidades [Harrington, 1994].

1.4 Hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

O anelídeo *Glossoscolex paulistus* pertence ao filo Anelidae, à classe Oligochaeta e à família Glossoscolecidae [Tinto, 1994][Fernandez, 2001]. Este animal apresenta um comprimento que varia de 280 a 305 milímetros e o seu maior diâmetro, na região mediana do corpo, alcança de 10 a 11 milímetros [Righi, 1972].

Esta minhoca de tamanho expressivo, conhecida popularmente como minhocoçu, é encontrada em determinados sítios das cidades de Piracicaba, Araras e Rio Claro, no estado de São Paulo, Brasil [Righi, 1972]. Tais localidades apresentam solos superficiais calcários que favorecem o desenvolvimento deste anelídeo [Tinto, 1994]. Animais da mesma classe da espécie *Glossoscolex paulistus*, como, por exemplo, a espécie *Lumbricus terrestris*, vêm sendo empregados em vários estudos ecológicos de solos em função de suas ações de reciclagem de nutrientes e de dinâmica de solos [Rossi, 2004], que são ações extremamente úteis à fertilidade do solo.

A hemoglobina extracelular gigante do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) faz parte da classe das hemoglobinas conhecidas como HBL (que são as iniciais de “Hexagonal Bilayer Hemoglobins”, ou seja, Hemoglobinas de Bicamada Hexagonal), que possui propriedades muito semelhantes às hemoglobinas de outros invertebrados.

A massa molecular da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) foi determinada pela medida do coeficiente de sedimentação

[Costa, 1988]. Além disso, dentre os estudos realizados com hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* destacam-se a caracterização de ligações dissulfeto [Meireles, 1985], a dissociação por pressão hidrostática [Silva, 1989], a reassociação por fatores não protéicos como cálcio e glicerol [Bonafe, 1991], a caracterização das subunidades e a determinação da massa molecular por eletroforese e filtração em gel, além de estudos de dissociação através da variação do pH, acompanhados por fluorescência tanto para a hemoglobina ferrosa íntegra [Tinto, 1994] como para a hemoglobina férrica íntegra [Agustinho, 1995]. Vale destacar os estudos espectroscópicos das interações da hemoglobina com detergentes iônicos [Gelamo, 1999], assim como estudos envolvendo a cadeia monomérica *d* da HbGp, que teve a sua estrutura primária determinada, sendo realizada, inclusive, a modelagem molecular da mesma [Cabral, 2002].

Portanto, a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* é uma hemoproteína gigante que contém um número elevado de grupos heme, que representam as unidades não polipeptídicas denominadas grupamentos prostéticos. A unidade protéica denominada globina (GB) ou apo-hemoglobina apresenta cadeias polipeptídicas tanto na forma de trímero, estabilizadas por ligações dissulfeto, como na forma de monômero *d*, na hemoglobina.

A estrutura oligomérica da oxi-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em pH alcalino foi estudada por Imasato e colaboradores [Imasato, 1995]. Os resultados experimentais mostram que, em pH 9, ocorre dissociação da espécie oxi-hemoglobina em dímeros de tetrâmeros $(abcd)_2$, trímeros *abc*, monômeros *d*

e cadeias *linkers* [Imasato, 1995]. Estudos da hemoglobina na forma oxidada (Fe^{+3}) [Agustinho, 1997] demonstraram que esta espécie, em meio alcalino, sofre completa dissociação em trímeros e monômeros, sugerindo que a hemoglobina na forma oxidada é mais instável em relação ao arranjo oligomérico quando comparada com a espécie oxi-hemoglobina, isto é, que a oxidação da proteína favorece a sua dissociação protéica.

Zhu e colaboradores [Zhu, 1996] estudaram a estrutura oligomérica da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* e também observaram que a associação e a dissociação das subunidades dependem do estado de oxidação. Particularmente, a oxidação do complexo $(abcd)_4$ com ferricianeto causa completa dissociação em monômeros *d* e trímeros *abc*, mas a adição de CN^- mantém o complexo $(abcd)_4$ ou reassocia as subunidades oxidadas. Esta constatação ressalta a ação efetiva do cianeto nas hemoglobinas gigantes, além de evidenciar a correlação entre as modificações do heme com as alterações das cadeias polipeptídicas propriamente consideradas.

Recentemente, Gelamo e colaboradores [Gelamo, 2004] mostraram claramente por SAXS (Espalhamento de raios-x a baixo ângulo), que os raios de giro tanto da oxi-hemoglobina como da meta-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* diminuem de 110 Å, em pH 7,0, para 31 Å, em pH 9,0, indicando a dissociação do complexo mesmo em concentrações mais altas, 3mg. ml^{-1} ($\sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). O arranjo das subunidades tem uma importante função na ligação de oxigênio para a hemoglobina humana [Ackers, 1992], pois estudos

do efeito alostérico da hemoglobina humana indicam que a cooperatividade é mediada através da interação entre as subunidades.

Em resumo, os estados de organização da hemoglobina íntegra são dependentes tanto do estado de oxidação do centro de coordenação da porfirina como dos ligantes axiais [Riggs, 1998], o que está de acordo, inclusive, com trabalhos anteriores de nosso grupo envolvendo a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* [Gelamo, 2003][Gelamo, 2004][Agustinho, 1997]. Riggs e colaboradores [Riggs, 1998] propuseram que, em geral, hemoglobinas de invertebrados apresentam mudanças conformacionais dependentes dos ligantes, com mecanismos de cooperatividade diferentes daqueles encontrados nas hemoglobinas de vertebrados.

Através da dissociação em meio alcalino, empregando-se filtração em gel, foi possível a separação e a caracterização de suas partes constituintes por eletroforese. Foram estudadas as espécies coexistentes no equilíbrio da meta-hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* e do monômero *d* separadamente, em função do pH. Notou-se que existe um equilíbrio em que predominam três espécies distintas em função do pH para a hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus*.

Na faixa de pH entre 6,5 e 7,5, a espécie spin alto (aquomet-Hb) é favorecida, mas em valores de pH acima de 7,5 ocorre a formação do hemicromo, que consiste na coordenação da histidina distal ao centro metálico, gerando um complexo bis-histidina baixo spin [Moreira, 2005]. Para valores de pH superiores a 10,5 uma nova espécie spin alto prevalece no equilíbrio, sendo

que esta espécie perdeu um dos ligantes axiais, constituindo-se em uma espécie pentacoordenada [Moreira, 2005].

Em meio ácido, a sequência de formação de espécies é semelhante ao meio alcalino, envolvendo a mesma transição entre as espécies aquometa-hemicromo-pentacoordenado, conforme o valor de pH é afastado da neutralidade. De fato, neste meio, a transição entre as espécies aquometa e hemicromo é mais gradual, ocorrendo esta transição em torno do pH 5,0, ao passo que a transição entre hemicromo e a espécie pentacoordenada ocorreria abaixo do pH 4,0 [Moreira, 2005].

Portanto, a proteína íntegra, tanto em meio ácido como em meio alcalino, na forma meta, apresenta um equilíbrio simplificado semelhante ao esquema a seguir:

Figura 1.8 Representação das três principais espécies presentes tanto em meio alcalino como em meio ácido [Moreira, 2005].

O comportamento de hemoproteínas submetidas à variação de pH não é considerado trivial justamente em função da complexidade do equilíbrio

formado [Morikis, 1989][Dasgupta, 1989]. Realmente, há na literatura artigos que enfatizam que as hemoglobinas especificamente, além das hemoproteínas em geral, apresentam um equilíbrio químico complexo [Levy, 1990][Wajnberg, 1996][Trent III, 2001][Dasgupta, 1989], com concentrações diferentes de cada espécie, dependendo de cada pH, inclusive, com a coexistência de espécies pentacoordenadas e hexacoordenadas [Trent III, 2001][Dasgupta, 1989].

Com relação especificamente ao fenômeno da auto-oxidação, a hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* apresenta um comportamento realmente interessante do ponto de vista de sua relação estrutura-atividade. Em estudo anterior [Leves, 2001][Poli, 2005], o processo de auto-oxidação é estudado em pH 9,0, onde a hemoglobina já se encontra dissociada em tetrâmeros, trímeros e monômeros [Imasato, 1995], permitindo a avaliação, em experimentos independentes, da auto-oxidação da proteína íntegra e da subunidade monomérica *d* isolada. A cinética de auto-oxidação observada neste trabalho resulta em curvas bi-exponenciais para a hemoglobina íntegra, indicando a ocorrência de um processo rápido e de outro processo lento. Já para o monômero *d*, a cinética de auto-oxidação se apresenta mono-exponencial de primeira ordem. Comparando os resultados do processo lento da hemoglobina íntegra com os resultados da auto-oxidação do monômero *d*, infere-se que a auto-oxidação monomérica corresponde à etapa lenta da auto-oxidação da hemoglobina íntegra.

Além disso, os componentes da HbGp apresentam constantes de auto-oxidação maiores que as constantes referentes às cadeias isoladas da

hemoglobina humana [Tsuruga, 1998] e da oxi-mioglobina bovina (tabela 1.2). Suzuki e colaboradores [Suzuki, 1983] estabelecem que duas subunidades isoladas da hemoglobina extracelular de *Perinereis brevicirris* possuem constantes de auto-oxidação muito superiores à constante observada para a oxi-mioglobina bovina [Satoh, 1981] em meio alcalino. Portanto, neste trabalho de Suzuki e colaboradores [Suzuki, 1983] é constatado um comportamento semelhante àquele detectado para a HbGp. Por conseguinte, infere-se que os componentes da HbGp em meio alcalino evidenciam bolsões hidrofóbicos do heme mais acessíveis ao solvente do que os bolsões de hemoproteínas de mamíferos.

Tabela 1.2. Constantes de velocidade de auto-oxidação em meio alcalino para hemoglobinas e mioglobinas

Globinas		$k_{obs} (h^{-1})$
<i>Glossoscolex paulistus</i>	Íntegra	2.4
	Processo rápido	
	Processo lento	0.36
	Monômero d	0.36
Hemoglobina humana	cadeias α	0.052
	cadeias β	0.089
Oxi-mioglobina Bovina		0.011
<i>Perinereis brevicirris</i>	Subunidade 1	1.32
	Subunidade 2	0.17

A partir da obtenção, através de cálculos de homologia, do modelo do monômero *d* [Cabral, 2002] (Figura 1.9), que apresentou 55% de identidade estrutural em relação à cadeia monomérica *d* de *Lumbricus terrestris*, estudou-

se o equilíbrio do monômero *d* nativo e reconstituído em função do pH, objetivando-se a compreensão mais ampla das propriedades dos mesmos [Ribelatto, 2005].

Para a fração monomérica *d* nativa em valores de pH entre 7,0 e 10,0 predomina a espécie hemicromo baixo spin e em valores de pH acima de 10,0 a espécie alto spin pentacoordenada é favorecida [Ribelatto, 2006]. Além disso, um comportamento semelhante foi observado para o monômero *d* reconstituído, ou seja, as mesmas espécies são formadas em valores de pH similares. Isto sugere que a subunidade protéica *d* teria significativa capacidade de auto-organização.

A seqüência de aminoácidos do monômero *d* da HbGp foi determinada pela combinação de duas hidrólises enzimáticas nos grupos carbóxi de resíduos de lisina (endo-Lys-C) e de ácidos glutâmicos (endo-Glu-C). A seguir, foi efetuada a análise do terminal amínico da hemoglobina, assim como a separação e a purificação de peptídeos por RP-HPLC. Posteriormente, foi realizado o seqüenciamento de aminoácidos por degradação de Edman automatizada. A seqüência do monômero *d* contém 142 resíduos e uma massa molecular calculada de 16212,37 Da.

O modelo proposto para a estrutura terciária apresentou 75,9% dos resíduos envolvidos em hélices α , de acordo com a média esperada para hemoglobinas. Importante acrescentar que as hélices E e F apresentaram como resíduos distal e proximal o aminoácido histidina.

O modelo apresentou uma ponte dissulfeto entre as hélices A e H, entre as cisteínas Cys 3 e Cys 132, como nas globinas constituintes de hemoglobinas extracelulares como *Lumbricus terrestris*, que também apresentam ligações dissulfeto.

O grupo heme encontra-se numa cavidade hidrofóbica, com os grupos propionatos orientados para o exterior da molécula, sendo estabilizados por pontes salinas entre os resíduos Arginina E9, Glutamina F7 e Arginina FG2.

O modelo (Figura 1.9) permitiu apreciação do ambiente hidrofóbico característico de hemoglobinas. A partir do cálculo de acessibilidade do solvente aos triptofanos, que se encontram no interior da molécula, foi encontrado um valor médio de 6,13 %, que é considerado baixo, consistente com o espectro de emissão do monômero *d* cujo máximo de emissão ocorre em 320 nm. Infere-se que os triptofanos se encontram em um meio de constante dielétrica baixa, o qual não é favorável para estabilizar o estado excitado que é polarizado. A posição de máximo da emissão do triptofano em meio aquoso é geralmente deslocada para 350 nm. Até mesmo o apo-monômero apresenta o máximo de emissão em 320 nm, o que estaria relacionado ao fato da ligação – SS- entre as cisteínas, localizadas nas hélices A e H, ser um importante fator para a manutenção do ambiente apolar que envolve os triptofanos [Cabral, 1999].

Figura 1.9 Posições dos triptofanos no interior do modelo do monômero *d* da hemoglobina de *G. paulistus*.

1.4 Interação detergente-proteína

Os detergentes, que são compostos anfifílicos solúveis, contêm um grupo apolar de natureza alifática ou aromática, e também possuem um grupo polar. A parte alifática é hidrofóbica, pouco solúvel em água e solúvel em muitos solventes apolares. Os grupos polares podem ser carregados, tais como os grupos fosfato, amino, sulfato e carboxil, ou neutros como os grupos hidroxila, carbonila e éster. Os grupos hidrofílicos são denominados de “cabeça” polar enquanto os hidrofóbicos são chamados de “cauda”. As moléculas que possuem estes dois grupos são denominadas de anfifílicas [Helenius, 1975]. Moléculas anfifílicas incluem sabões, detergentes e os próprios fosfolipídios que

proporcionam a estrutura básica para as membranas biológicas [Helenius, 1975].

Os compostos anfifílicos agregam-se espontaneamente em presença de água. O tamanho e a forma do agregado dependem de vários fatores, entre eles, a natureza e o comprimento da cadeia apolar, a natureza do grupo polar, a concentração, a temperatura, a natureza do solvente e o método de preparação [Kalyanasundaram, 1987].

No interior da fase líquida, para baixas concentrações de surfactante em água, estes encontram-se na forma monomérica. Já em concentrações maiores que a concentração micelar crítica (cmc), os surfactantes formam agregados (micelas), onde a parte hidrofóbica destes monômeros geram contatos entre si, formando um agregado micelar, e a parte hidrofílica forma uma estrutura como uma concha em contato com o ambiente aquoso [Szabo, 1989]. Em ambientes não aquosos podem ser formadas micelas reversas, ou seja, as cabeças polares conectam entre si no centro da micela e a cauda hidrofóbica forma a concha em contato com o solvente. Estas micelas podem ser pequenas esferas, elipsóides, cilindros longos, ou ainda, podem formar bicamadas, que são duas camadas paralelas de moléculas formando uma vesícula com a cavidade interna que pode estar preenchida ou não com solvente, dependendo da sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica [Tanford, 1973].

Pode-se determinar a cmc através de vários métodos, sendo todos eles baseados nas mudanças das propriedades observadas na micelização, como tensão superficial, espalhamento clássico de luz, etc. Para alguns surfactantes,

a cmc observada depende muito fortemente das condições experimentais como temperatura, pH, força iônica, presença de impurezas etc. [Tanford, 1973].

Figura 1.10 Estrutura química do surfactante aniônico SDS.

Os surfactantes podem ser classificados segundo a carga da parte hidrofílica e tamanho ou natureza da cauda hidrofóbica. Com relação às cargas, os detergentes podem ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos ou neutros. Na figura 1.10 está representada a estrutura do dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um surfactante aniônico.

O uso de detergentes em pesquisas nas áreas de biofísica e bioquímica é uma prática freqüente. Dentre as aplicações de detergentes, pode-se destacar o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para se determinar a composição polipeptídica e estimar a massa molecular de proteínas. Por ser um desnaturante poderoso, desenovela muitas proteínas em concentrações acima de sua cmc (8mM em água). A estrutura terciária pode, eventualmente, ser perdida em função da interação com este surfactante aniônico e a amostra consistiria de polipeptídeos

saturados de SDS, que se ligam à proteína na razão de 1,4-2,5g de SDS por grama de proteína [Jones, 1995].

A interação entre surfactantes e proteínas globulares tem sido estudada através de várias técnicas visando à obtenção de informações relevantes do ponto de vista da relação estrutura-atividade das proteínas. Dentre estes métodos, pode-se citar:

1. Eletroforese em gel de poliacrilamida objetivando-se detecção de complexos específicos;
2. Espalhamento de luz estático e dinâmico visando à obtenção de massas moleculares, coeficientes de difusão e dimensões dos complexos;
3. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível para obtenção de dados sobre as modificações induzidas por surfactantes que ocorrem em toda a proteína, especialmente no heme;
4. Espectroscopia de emissão de fluorescência visando à obtenção parâmetros termodinâmicos dos complexos proteína-surfactante;
5. Espectroscopia de dicroísmo circular que proporciona a detecção de mudanças conformacionais produzidas na proteína, especialmente mudanças na estrutura secundária induzidas pela associação do surfactante;
6. Calorimetria (microcalorimetria e titulação calorimétrica) que fornece dados da entalpia da ligação de surfactantes na desnaturação da proteína;

7. Ultracentrifugação (razão de sedimentação e equilíbrio) que fornece coeficientes de sedimentação dos complexos de proteína-surfactante, dissociação de subunidades e massas moleculares.

Os surfactantes, em baixas concentrações, podem se ligar à proteína mantendo sua estrutura terciária intacta ou podem causar dissociação e/ou desnaturação. Comumente, os surfactantes aniônicos como SDS desnaturam proteínas, embora existam proteínas como glicose oxidase, papaína e pepsina que resistem à desnaturação por SDS sob determinadas condições.

Para surfactantes aniônicos, a ligação inicial ocorre nos sítios catiônicos da superfície da proteína, especificamente aos resíduos lisil, histidil e arginil, enquanto que para os surfactantes não iônicos, os sítios de ligação ocorrem nas partes hidrofóbicas da proteína. No caso dos surfactantes catiônicos, esta ligação acontece nos resíduos glutamil e aspartil [Szabo, 1989].

Os surfactantes aniônicos podem, entretanto, induzir a desnaturação da proteína e, assim, expor mais os sítios hidrofóbicos localizados no interior da mesma. O modelo mais geral da interação entre o surfactante e a proteína está apresentado na figura 1.11.

Figura 1.11 Representação esquemática da ligação do surfactante à proteína nativa (P) e o subsequente processo de desnaturação.

É interessante destacar que a desnaturação acontece para uma concentração muito menor de surfactante do que a concentração necessária de desnaturantes comumente utilizados tais como uréia (6-8 M) e guanidina (4-6 M).

Embora não se conheça completamente a estrutura dos complexos proteína-detergente, têm-se utilizado algumas técnicas espectroscópicas e eletroforéticas para uma possível previsão desta estrutura. Basicamente, quatro modelos têm sido propostos e são apresentados na figura 1.12.

Figura 1.12 Modelos para a interação proteína-surfactante.

No modelo conhecido como “colar de pérolas” (fig. 1.12 A), cachos de micela ligam-se à cadeia polipeptídica. Neste modelo, são possíveis duas estruturas. Na primeira delas (fig. 1.13 A), a cadeia polipeptídica enrola-se em torno da micela, diminuindo a mobilidade da cabeça polar do surfactante. Na segunda (fig. 1.13 B), as micelas encontram-se nucleadas nos sítios hidrofóbicos da proteína e a mobilidade das cabeças polares não é afetada [Turro, 1995].

No segundo modelo, as moléculas de surfactante agregam-se formando um elipsóide prolato cujo semi-eixo menor mede aproximadamente $18\text{\AA}$, que corresponde ao comprimento da cadeia do surfactante (fig. 1.12 B). Neste modelo, a cadeia polipeptídica encontra-se enrolada em torno do agregado.

No terceiro modelo, as moléculas de surfactante agregam-se formando um bastão micelar cilíndrico flexível no qual a cadeia polipeptídica da proteína enrola-se de forma helicoidal sobre o bastão (fig. 1.12 C).

No quarto modelo, propõe-se que a proteína organiza o surfactante dentro de uma micela complexa (fig.1.12 D).

A determinação da estrutura dos complexos proteína-surfactante não é trivial, particularmente no que se refere às proteínas globulares que possuem ligações dissulfeto internas intactas. O sucesso da técnica SDS-PAGE, que depende da existência de uma carga uniforme por comprimento da cadeia polipeptídica, sugere que os complexos têm uma conformação estendida, com as moléculas de surfactantes ligadas uniformemente ao longo da cadeia [Jones, 1995].

Figura 1.13 Estruturas possíveis para os complexos proteína-surfactante no modelo “colar de pérolas”. (A) A cadeia polipeptídica se enrola ao redor da micela; (B) As micelas encontram-se nucleadas nos sítios hidrofóbicos da proteína.

Em trabalhos anteriores do grupo, Gelamo e colaboradores [Gelamo, 2004] verificaram por SAXS que na interação da HbGp íntegra em pH 7,0 com o surfactante SDS ocorre a dissociação da sua estrutura oligomérica, sendo que a intensidade dessa dissociação depende da concentração do surfactante. Com uma relação de SDS/proteína de 20, inicialmente a proteína íntegra se dissociaria em duas camadas hexagonais. Entretanto, uma mudança mais drástica na estrutura oligomérica somente aconteceria com uma relação de surfactante/proteína de 200. Desta forma, o raio de giro diminui para aproximadamente 30 Å, sugerindo a dissociação da proteína íntegra em subunidades menores.

Uma vez que o surfactante provoca alterações na estrutura oligomérica da proteína, gerando tanto a dissociação das subunidades como eventuais modificações nas estruturas secundárias e terciárias de cada cadeia polipeptídica, essas alterações poderiam se propagar em maior ou menor grau para a primeira esfera de coordenação do ferro. Desta maneira, o estudo da auto-oxidação da HbGp com o surfactante SDS seria uma abordagem interessante para se obter informações sobre a estabilidade da estrutura oligomérica da hemoglobina, o ambiente hidrofóbico do heme e seu enovelamento polipeptídico.

É descrito na literatura que o surfactante SDS poderia aumentar ou diminuir a velocidade de auto-oxidação dependendo de sua concentração. Para a hemoglobina humana, é proposto que a formação da espécie meta-hemoglobina através da auto-oxidação é inibida pelo SDS quando o mesmo

tem uma concentração até 10 vezes maior que a concentração da hemoglobina. No entanto, para concentrações maiores de SDS, a formação da espécie meta-hemoglobina é favorecida [Reza, 2002]. O SDS em baixas concentrações mudaria a conformação da proteína para um estado mais enovelado. Este estado mais compacto poderia prevenir a entrada da molécula de água na cavidade hidrofóbica do heme, que é necessária para promover o processo de oxidação através do ataque nucleofílico [Reza, 2002].

Portanto, o presente trabalho apresenta resultados e discussões relevantes para a compreensão da relação estrutura-função da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* no que se refere ao processo de auto-oxidação induzida ou não pela presença de surfactante, em diferentes valores de pH e suas eventuais correlações com o mesmo fenômeno em outras hemoproteínas estudadas na literatura.

1.5 Técnicas espectroscópicas

1.5.1 O Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível das porfirinas

A atribuição do espectro na região do ultravioleta-visível das porfirinas, apesar de muito estudado, não é algo trivial e ainda se encontra em evolução os modelos químico-quânticos que explicam suas bandas, frequências e intensidades. Um dos tópicos pesquisados em trabalhos teóricos diz respeito à grande diferença de intensidade entre as bandas B e Q, que são as principais bandas π - π^* intraligantes da porfirina.

O espectro eletrônico das porfirinas apresenta duas regiões bastante características referentes às bandas B e Q, que são transições predominantemente intraligantes, ou seja, transições que envolvem orbitais moleculares do macrociclo porfirínico. Entre as bandas que apresentam contribuição do metal, destacam-se as bandas de transferência de carga, que apesar da menor absortividade molar em relação às bandas B e Q, fornecem informações valiosas sobre o desdobramento dos orbitais *d* e a superposição de orbitais entre metal e porfirina. A banda B também chamada banda de Soret, é a mais intensa, apresentando uma absortividade molar altíssima, superior a $100.000 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o que explica a aplicação das porfirinas como protótipo de corantes [Antonini, 1981].

Para a banda Q, ressalta-se que são quatro picos na base livre e somente dois na metaloporfirina, α e β , o que é indicativo do aumento de

simetria pela adição do centro metálico. Igualmente é interessante o fato da banda Q apresentar uma intensidade bem inferior à banda de Soret, situando-se sua absorvidade molar na faixa entre 10.000 e 15.000 L.mol⁻¹cm⁻¹. As bandas Q em metaloporfirinas são denominadas α e β , e têm sido consideradas variações vibracionais de uma mesma transição eletrônica sendo que a banda α é atribuída a uma transição Q(0,0) ao passo que a banda β é atribuída a uma transição Q(0,1).

Segundo Antonini e colaboradores [Antonini, 1981], pode-se eliminar a possibilidade de transição *d-d* em configurações alto spin, pois como existem cinco elétrons paralelos, as transições *d-d* devem resultar em emparelhamento de spin e são, portanto, proibidas pela regra de seleção que requisita que não ocorra mudança na multiplicidade de spin. Os coeficientes de absorvidade molar para transições proibidas por spin em complexos de metais da primeira série de transição são de 0,01 a 10 L.mol⁻¹cm⁻¹, muito menores do que os valores observados em hemoproteínas em torno de 10³ L.mol⁻¹cm⁻¹. Importante acrescentar que, mesmo para sistemas baixo-spin, tal transição não é freqüentemente observada, uma vez que na maioria dos casos se encontram superpostas por bandas de maior absorvidade molar.

1.5.2. Dicroísmo Circular em hemoproteínas

Dicroísmo circular (DC) é uma poderosa ferramenta para se estudar a estrutura de biomoléculas [Zhu, 2002]. De fato, dicroísmo circular constitui-se

em uma técnica sensível às mudanças conformacionais das proteínas, pois permite avaliar alterações na estrutura secundária das mesmas [Nagatomo, 2002]. Vale lembrar que a técnica dicróica também apresenta uma variedade magnética, que consiste no dicroísmo circular magnético (DCM), igualmente com ampla aplicação em estudos biofísicos.

Quando somente uma parte da conformação α -hélice modifica-se para uma disposição aleatória ou para um outro tipo de conformação helicoidal, o espectro de dicroísmo circular resultante pode reter a forma original, mas a sua intensidade será reduzida. Uma pequena mudança na intensidade do espectro de dicroísmo circular deve representar uma leve influência sobre a estrutura secundária [Zhu, 2002].

2. OBJETIVOS

Este trabalho enfoca o estudo do fenômeno da auto-oxidação da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* na sua forma íntegra e da sua fração monomérica *d*, tendo por objetivo os seguintes tópicos:

Avaliar a estabilidade da hemoglobina em função do pH, analisando a influência dos nucleófilos água e hidroxila.

Propor o mecanismo da reação de auto-oxidação da hemoglobina, a partir da determinação das constantes de velocidade obtidas em função do pH.

Verificar o processo de auto-oxidação induzido pelo ligante cianeto, que é considerado um ligante de campo forte.

Analisar a influência do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) sobre o processo de auto-oxidação da hemoglobina íntegra nos valores de pH 7,0 e 9,0.

Avaliar por meio dos parâmetros cinéticos obtidos as propriedades estruturais da hemoglobina envolvendo tanto o arranjo oligomérico como o ambiente hidrofóbico do heme.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Amostra estudada

A hemoglobina utilizada neste trabalho foi extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus*. Os espécimes foram coletados na cidade de Rio Claro, estado de São Paulo, e mantidos à temperatura ambiente até o momento da coleta do sangue.

3.1.2 Equipamentos

- pH-metro CORNING-130 ou DIGIMED DM20;
- Centrífuga refrigerada Himac CR 20B2 Hitachi para a primeira centrifugação da hemolinfa na extração da hemoglobina;
- Ultracentrífuga refrigerada SORVAL ULTRA PRO 80
- Colunas de filtração em gel (*Sephadex G 200*) e Bio-Gel A-0.5 M;
- Coletor de frações ISCO Retriever III mod. 328, para a coleta das frações das cromatografias;
- Espectrofotômetro Hitachi mod. U-2000;
- Espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500.

3.1.3 Reagentes

Aldrich chemical Co. - cloridrato de hidroximetil aminometano (TRIS - HCl)

Sigma chemical Co. - EDTA, sephadex G-200

Merck chemicals - ferricianeto de potássio, cianeto de potássio, hidróxido de sódio

Arthur H. Thomas CO - membrana de diálise

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção e purificação - oxihemoglobina íntegra e monômero

Os animais foram lavados em água corrente, anestesiados com éter e foi realizado um corte no dorso de cada espécime. A hemolinfa foi extraída com pipetas de *Pasteur* em presença de anti-coagulante (citrato de sódio 0,1 mM) e armazenada em tubos de *Eppendorf*. A primeira etapa da purificação foi realizada através de centrifugação da hemolinfa a 5000 rpm por 10 minutos para precipitação das impurezas, o sobrenadante foi retirado para diálise contra tampão tris-HCl, pH 7,0 por uma noite a 4°C. Após a diálise foi realizada a ultracentrifugação da proteína em uma ultracentrífuga SORVAL ULTRA PRO 80 por 4 horas a 35000 rpm e o precipitado foi ressuspenso em tampão tris-HCl, pH 7,0 e filtrado em coluna de gel Sephadex G-200 de 100cm de comprimento por 0,9 cm de diâmetro equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 com 0,1 mM de EDTA. O eluato foi coletado por meio de um coletor regulado para

um volume de 0,9 mL/tubo e a oxihemoglobina íntegra foi estocada a 4°C.

A fração monomérica foi separada aplicando-se a hemoglobina íntegra estabilizada em pH 9,0 numa coluna de gel Sephadex G-200 de 100 x 0,9 cm equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 com 0,1 mM de EDTA.

3.2.2 Medidas da velocidade de auto-oxidação

3.2.2.1 Estudo da auto-oxidação em função do pH

Para acompanhar a cinética de auto-oxidação foi medido o decaimento da absorbância da hemoglobina em 576 nm no decorrer do tempo (aproximadamente 3 horas de duração para cada experimento).

As medidas foram realizadas utilizando-se uma concentração inicial aproximada de oxi-hemoglobina íntegra de 2×10^{-5} M em base ao conteúdo de heme, em tampão acetato-fosfato-borato 30mM, a 42°C e variando o pH na faixa de 4,5-9,5. A concentração de heme foi determinada espectrofotometricamente considerando uma absortividade de $129 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. As medidas também foram realizadas para a fração monomérica, após a separação na coluna de Sephadex G-200, nas mesmas condições descritas acima.

Os dados de auto-oxidação da hemoglobina íntegra foram analisados como sendo compostos por um único decaimento exponencial, uma cinética de primeira ordem simples, ou por dois decaimentos exponenciais (denominados curvas bifásicas), que correspondem a uma combinação de duas cinéticas de

primeira ordem, resultando em duas constantes de velocidade (k_{obs1} e k_{obs2}) e dois fatores pré-exponenciais ($\Delta A_{máx_1}$ e $\Delta A_{máx_2}$). Os valores destes parâmetros foram obtidos através do ajuste dos dados coletados à equação (3.1):

$$A_t = \Delta A_{máx_1} \exp(-k_1 t) + \Delta A_{máx_2} \exp(-k_2 t) + A_\infty \quad (3.1)$$

Nesta equação, k_{obs1} e k_{obs2} representam as constantes de velocidade do processo rápido e lento, respectivamente. $\Delta A_{máx_1}$ e $\Delta A_{máx_2}$ representam a variação da absorbância ($A_0 - A_\infty$), que corresponde a oxidação total dos hemes que reagem rapidamente e lentamente, respectivamente. A_t é a absorbância no tempo t e A_∞ corresponde a absorbância no tempo infinito. Os valores de A_∞ foram estimados, mediante experimentos realizados por um longo tempo e fixados no ajuste.

A auto-oxidação do monômero foi analisada como constituída por um único decaimento exponencial, ou seja por uma única cinética de primeira ordem, com constante de velocidade (k_{obs}) em toda faixa de pH.

3.2.2.2 Estudo da auto-oxidação em função da concentração do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS)

As cinéticas de auto-oxidação na presença do SDS foram acompanhadas medindo-se o decaimento da absorbância da oxi-hemoglobina

em 415 nm no decorrer do tempo.

As medidas foram realizadas com a oxi-hemoglobina íntegra numa concentração de 3 μM , em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 e 9,0 a 38,5 $^{\circ}\text{C}$ na presença de diferentes concentrações do surfactante.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem observadas (k_{obs1} e k_{obs2}) para a hemoglobina íntegra em pH 7,0 foram obtidas pelos ajustes das curvas pela equação 3.1, para as cinéticas bifásicas ou foi obtido uma cinética mono-exponencial, um único decaimento exponencial; sendo que o caráter bifásico ou monofásico foi dependente da concentração do SDS em pH 7,0.

Para a auto-oxidação em pH 9,0, as curvas obtidas foram bifásicas para toda a faixa de concentração de SDS, e o ajuste foi feito pela equação 3.1.

3.2.2.3 Estudo da auto-oxidação na presença de cianeto de potássio

As cinéticas de auto-oxidação na presença do ligante cianeto foram acompanhadas medindo-se o decaimento da absorbância da oxi-hemoglobina em 415 nm no decorrer do tempo.

As medidas foram realizadas com a hemoglobina íntegra e com a fração monomérica numa concentração entre 2,5 a 3 μM , em tampão tris-HCl 20 mM, pH 9,0 a 38 $^{\circ}\text{C}$ na presença de diferentes concentrações dos ligantes.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem observadas (k_{obs1} e k_{obs2}) para a hemoglobina íntegra foram obtidas pelos ajustes das

curvas pela equação 3.1, através destes valores foram calculadas as constantes de velocidade de segunda ordem (k'_{CN1} , k''_{CN2} e k_{CN2}).

Para a fração monomérica as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem observadas (k_{obs}) nas diferentes concentrações do ligante foram obtidas pelo ajuste dos dados de auto-oxidação como um único decaimento exponencial e a partir destes valores também foi calculada a constante de velocidade de segunda ordem.

3.2.3 Medidas de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no aparelho Jasco J 715 nos valores de pH 4,7, 7,0 e 9,0, no início e ao final da reação de auto-oxidação. Foi utilizada cela cilíndrica de caminho ótico 0,2 cm, a concentração de hemoglobina foi 0,22 mg/ml baseada na absorvidade molar em 415 nm de 3,13 ml mg⁻¹ cm⁻¹.

A transformação dos dados de elipticidade, θ , para elipticidade média por resíduo (por dmol de ligação peptídica) $[\theta]$ é efetuada da seguinte maneira:

$$[\theta] = \frac{\theta}{[aa]\ell}$$

Concentração de resíduos (dmol por centímetro cúbico):

$$[aa] = \frac{[\text{Proteína}]}{\overline{M}_{aa}}$$

onde, [proteína] é a concentração de proteína por decigrama por centímetro cúbico e $\overline{M}_{aa}$ é massa molar média dos resíduos de aminoácidos (117 g mol^{-1}).

* massa molar dos resíduos de aminoácidos = massa molar dos aminoácidos menos a massa molar da molécula de água que foi eliminada na formação da ligação peptídica.

* ℓ é o caminho ótico em centímetros da cubeta empregada na medida do dicroísmo - 0,2 cm.

3.2.4 Espalhamento de luz ressonante

O espalhamento ressonante foi usado para se verificar a possível reassociação das subunidades durante o estudo da auto-oxidação da proteína íntegra na presença de cianeto. O espalhamento de luz em 310 nm foi medido a 90° no espectrofluorímetro, selecionando o mesmo comprimento de onda de excitação e emissão para ambos monocromadores. As medidas foram corrigidas pelo espalhamento de luz do tampão. O espalhamento de luz para a amostra de concentração $2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ foi aproximadamente 10 vezes maior que o espalhamento do tampão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cinética de auto-oxidação da HbGp em função do pH

Figura 4.1 Espectros de absorção eletrônica no UV-Vis obtidos no início (oxi-HbGp) e no final da reação de auto-oxidação da HbGp ($1,4 \times 10^{-5}$ M) em função do pH, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.

A figura 4.1 mostra os espectros no início e no final da reação de auto-oxidação da HbGp. O espectro inicial corresponde à oxi-hemoglobina apresentando as bandas α e β em seus comprimentos de onda característicos, 575 e 540 nm, respectivamente. Nos valores de pH 4,5 e 5,0 é possível observar a coexistência de espécies, já descritas em trabalhos anteriores [Moreira, 2005] [Ribellatto, 2005] [Ribellatto, 2006]. Moreira [Moreira, 2005],

estudando a influência do pH sobre as espécies formadas pela meta-hemoglobina íntegra, constata a mesma coexistência de espécies nesta faixa de pH ácido, o que demonstra que a auto-oxidação proporciona as mesmas espécies finais do que o procedimento de oxidação via ferricianeto, que é utilizado neste referido trabalho [Moreira, 2005]. Desta forma, a banda observada em 535 nm corresponde ao hemicromo [Tsuruga, 1998], ou seja, um complexo bis-histidiníco baixo spin; e as bandas em 500 nm e 630 nm correspondem à espécie aquometa-hemoglobina [Vitagliano, 2004], que é uma espécie alto spin. Assim, as espécies predominantes ao final da auto-oxidação da HbGp em meio ácido são as espécies hemicromo e aquometa-hemoglobina.

Em pH 7,0 predomina a espécie aquometa-hemoglobina, com sua banda característica em 500 nm e sua banda de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM) em 630 nm.

Em meio alcalino, pH 8,0, é possível notar a ocorrência das bandas em 535 e 565 nm, características do hemicromo, que deve ser a espécie predominante neste pH. A banda de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM) em 630 nm, apresenta uma intensidade muito baixa, evidenciando a presença da espécie aquometa-hemoglobina em baixa concentração.

A figura 4.2 apresenta os gráficos de primeira ordem para a auto-oxidação da HbGp em diferentes valores de pH. Uma relação linear é facilmente verificada em pH 7,0, indicando que auto-oxidação ocorre por meio de um único processo. A partir da inclinação da reta são obtidas as constantes

de velocidade de primeira ordem observadas. Neste valor de pH, a proteína se encontra em sua forma íntegra e realmente deve apresentar uma única constante de velocidade lenta, sugerindo que a estrutura oligomérica compacta da hemoglobina íntegra é fortemente relacionada ao processo redox do centro metálico.

Com a alcalinização, em valores de pH acima de 7,5, já existem duas componentes se oxidando (fig. 4.2). A curva de auto-oxidação é composta por duas cinéticas de primeira ordem, com constantes de velocidade observadas k_{obs1} e k_{obs2} , respectivamente, de acordo com a equação 3.1, seção 3.2.2.1.

Figura 4.2 Gráficos da cinética de primeira ordem para auto-oxidação da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*. Condições: $1,4 \times 10^{-5}$ M de hemoglobina, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C, variando o pH.

O comportamento multi-exponencial é verificado pela análise do gráfico do logaritmo da diferença entre as absorbâncias, $A_t - A_\infty$, em função do tempo, não sendo obtidas dependências lineares (fig.4.2). É possível também verificar a natureza bifásica da auto-oxidação a partir da razão das constantes de velocidade (k_{obs1}/k_{obs2}). Para o pH 7,0 (cinética mono-exponencial), a razão k_{obs1}/k_{obs2} é igual a 1,0 e no valor de pH que corresponde ao início do comportamento bifásico, pH 7,5, esta razão é igual a 7,3. Esta análise da razão é utilizada por Yasuda e colaboradores [Yasuda, 2002] para comprovar o comportamento bifásico da auto-oxidação da hemoglobina humana em valores ácidos de pH.

Provavelmente, no valor de pH 7,5 se inicia o processo de dissociação da hemoglobina, que ocorre efetivamente em pH 9,0. Nestas circunstâncias, nota-se que a cinética de auto-oxidação é muito sensível às mudanças conformacionais que ocorrem com a dissociação.

A dissociação alcalina desta hemoglobina é comprovada em trabalhos anteriores que envolvem estudos cromatográficos e de espectroscopia de emissão de fluorescência [Imasato, 1995] [Agustinho, 1997] [Perussi, 1990]. Estudo anterior que envolve a auto-oxidação da HbGp em pH 9,0 em função da temperatura [Poli, 2005], estabelece um processo de auto-oxidação bifásico. Esta natureza bifásica das cinéticas é caracterizada por um processo rápido, k_{obs1} , e um processo lento, k_{obs2} , que ocorrem em função da oxidação dos trímeros e monômeros, respectivamente. Assim, a intensa dissociação

oligomérica em pH 9,0 é considerada o principal fator responsável pela natureza bifásica na cinética de auto-oxidação.

Figura 4.3 Gráficos da cinética de primeira ordem para auto-oxidação da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*. Condições: $1,4 \times 10^{-5}$ M de hemoglobina, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C, em função do pH.

Na faixa ácida de pH, a cinética é mono-exponencial entre os valores de pH 7,0 e 6,0, sendo que para os valores de pH abaixo de 5,7, a curva cinética passa a ser bi-exponencial (fig. 4.3). Isto indica a ocorrência de dissociação da proteína, estando de acordo com estudos de espalhamento de luz, onde o espalhamento diminui aproximadamente a partir de pH 5,0 [Imasato, 1995].

Portanto, nos valores de pH onde a proteína estava parcialmente ou totalmente dissociada, duas constantes de velocidade de primeira ordem observadas envolvidas na equação 3.1 da seção 3.2.2.1 são determinadas para cada curva de reação obtida para vários valores de pH.

Figura 4.4 Gráfico de k_{obs1} (□) e k_{obs2} (○) em função do pH para a reação de auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

A estabilidade da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em função do pH pode ser constatada no gráfico dos valores das constantes de velocidade k_{obs1} e k_{obs2} versus o pH da solução. A figura 4.4 apresenta a variação das constantes para as cadeias que se oxidam mais rapidamente (etapa rápida,

k_{obs1}) e para as cadeias mais lentas (etapa lenta, k_{obs2}) em toda faixa de pH, isto é, entre os valores de pH 4,4 e 9,4. Estas medidas são efetuadas em condições saturadas de ar em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.

É possível observar a natureza bifásica na auto-oxidação da hemoglobina na faixa ácida, 4,4-5,7. Os valores do logaritmo de ambas as constantes (k_{obs1} e k_{obs2}) aumentam rapidamente com o aumento da concentração hidrogeniônica. Na faixa mais alta de pH, 7,5-9,4, a reação também é bifásica, sendo que há um aumento no logaritmo das constantes (k_{obs1} e k_{obs2}) com o aumento do pH. Entretanto, para as cadeias que reagem mais rapidamente (k_{obs1}), o aumento é maior (inclinação da reta igual a 0,98) do que para as cadeias mais lentas (k_{obs2}) (inclinação da reta igual a 0,73).

No intervalo entre os valores de pH 5,9 e 7,3, a reação é monofásica com k_{obs1} igual a k_{obs2} . Então, os gráficos referentes aos dois processos auto-oxidativos dependem fortemente do pH da solução.

No intuito de se monitorar a integridade da estrutura secundária da proteína, foi empregada a espectroscopia de dicroísmo circular. A figura 4.5 apresenta os espectros de dicroísmo circular da hemoglobina íntegra de *G. paulistus* durante a reação de auto-oxidação. É possível observar, analisando a banda em 222 nm após 4 horas de reação a 42°C, que ocorre uma perda de estrutura α -globular nos valores de pH 9,0 e 4,7. Entretanto, é relevante acrescentar que, em pH 7,0, não existe alteração no espectro. Em pH 4,7 ocorre uma perda de α -hélice de 23% durante o processo auto-oxidativo e para o pH 9,0 a perda é de 28%. Essas perdas iniciais de estrutura secundária

devem acontecer em decorrência da eliminação de interações intra e entre cadeias, favorecendo o acesso do solvente à cavidade hidrofóbica do heme.

Figura 4.5 Espectros de dicroísmo circular da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* no início da reação de auto-oxidação e após 4 horas de cinética. Condições: $[\text{HbGp}] = 5\mu\text{M}$, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C .

Estes resultados estão de acordo com o comportamento cinético observado, onde a velocidade de auto-oxidação é maior nos valores de pH 4,7 e 9,0 do que em pH 7,0. Nestas condições, as curvas são bifásicas em pH 4,7 e 9,0 devido à dissociação da hemoglobina.

Em pH 7,0, a velocidade de reação é lenta devido à estabilidade oligomérica da hemoglobina de *G. paulistus*, pois a mesma se encontra em sua forma íntegra, com o enovelamento polipeptídico altamente compacto. Portanto, conclui-se que esta estrutura organizada dificulta a acessibilidade do solvente ao bolsão hidrofóbico resultando na diminuição da velocidade de auto-oxidação. Assim, a perda do enovelamento polipeptídico nativo favoreceria o aumento da permeabilidade dos nucleófilos presentes no solvente (em pH 4,7 seria o nucleófilo água e em pH 9,0 seria o nucleófilo hidroxila) que, em contato com o centro metálico, acentuam a competição com oxigênio molecular pelo sítio de coordenação.

4.2 Formulação cinética para a reação de auto-oxidação da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

Estudos cinéticos recentes abordando a estabilidade de oxi-mioglobinas de mamíferos propõem que o pH pode afetar a velocidade da reação de auto-oxidação de várias maneiras. Além disso, estes trabalhos estabelecem que a reação não se constitui em simples perda dissociativa de O_2^- da mioglobina, mas ocorre devido a um deslocamento nucleofílico do O_2^- da mioglobina pela molécula de água ou pelo íon hidroxila, que poderiam entrar na cavidade do heme. O centro ferroso seria, então, convertido à forma férrica e a molécula de água ou o íon hidroxila se ligaria a este centro metálico na sexta posição de

coordenação. Este deslocamento nucleofílico geraria a formação da espécie aquometa mioglobina ou hidroximeta mioglobina.

Deste modo, o comportamento complexo do gráfico das constantes de velocidade de auto-oxidação em função do pH, pode ser explicado primeiramente por três tipos de processos de deslocamento do ligante oxigênio (Reações 4.1, 4.2 e 4.3). Este ligante pode deixar o centro férrico em formas diferentes, dependendo do pH do meio [Sato, 1981] [Tsuruga, 1998], conforme as reações a seguir:

Nestas reações acima, k_0 é a constante de velocidade para o deslocamento do oxigênio pela água, k_H é a constante de velocidade para o deslocamento do oxigênio pela água catalisado pelo próton, e k_{OH} é a constante de velocidade para este mesmo deslocamento efetuado pela hidroxila. A extensão da contribuição destes processos elementares na velocidade de auto-oxidação observada, k_{obs} , pode variar com as concentrações dos íons H^+ ou OH^- . Conseqüentemente, a estabilidade da oxi-hemoglobina de *Glossoscolex*

paulistus apresenta uma forte dependência do pH, sendo máxima em pH 7,0. O deslocamento redutivo do oxigênio coordenado, que deixa o heme como O_2^- , quando efetuado pela água poderia acontecer com ou sem protonação do ligante oxigênio. No entanto, tem sido claramente demonstrado que a velocidade aumenta significativamente com a assistência do próton, por um fator de mais de 10^6 /mol para a oxi-hemoglobina humana [Tsuruga, 1998], de acordo com a reação 4.2.

Neste processo catalisado pelo próton, a histidina distal, que forma ligação de hidrogênio com o oxigênio, facilita o movimento do próton catalítico do solvente para o oxigênio. Este processo acontece através do anel imidazólico, por um mecanismo de substituição de prótons. Por essa razão, esta catálise por próton não é observada na reação de auto-oxidação de mioglobinas que não apresentam a histidina distal, como, por exemplo, a mioglobina *Aplysia*, que apresenta na sua posição distal uma valina [Shikama, 1994].

Desta forma, a molécula de oxigênio, que é estabilizada no sexto sítio de coordenação do heme por duas ligações, que são a coordenação ao centro ferroso e a ligação de hidrogênio com a histidina distal, apresentaria uma maior tendência para deixar o heme. Esta saída do oxigênio da primeira esfera de coordenação como radical hidroperoxil aconteceria após uma interação entre a histidina distal e os prótons provenientes do solvente em meio ácido. Esta perda de contato entre o ligante oxigênio e a histidina distal, eliminaria uma interação efetiva que estabiliza este ligante no sexto sítio de coordenação do centro

metálico, facilitando a saída do oxigênio reduzido na sua forma protonada, ou seja, como hidroperoxil.

Realmente, na literatura é sugerida a tríade catalítica ou *charge relay* (Esquema 4.1) [Bachovchin, 1986], envolvendo os dois nitrogênios imidazólicos da histidina distal. Um desses nitrogênios atuaria como ácido e o outro apresentaria um comportamento básico. O modelo proposto poderia ser interpretado como uma modificação da acidez do hidrogênio ionizável ligado ao oxigênio devido à interação do par de elétrons livre do outro nitrogênio imidazólico com os prótons presentes no ambiente. Desta forma, pode-se propor que o imidazol apresenta uma diversidade de atuação por apresentar dois tautômeros, quando na forma neutra, podendo compor a tríade catalítica (Esquema 4.1).

Esquema 4.1. Tautomeria do grupo imidazol.

Um processo semelhante poderia estar ocorrendo com a HbGp. Assim, a substituição de prótons aconteceria a partir da protonação do imidazol da histidina distal, através do contato do par de elétrons livres do nitrogênio do imidazol que está mais distante do oxigênio com um próton oriundo do solvente em meio ácido. Em outras palavras, pode-se afirmar que a saída do oxigênio ocorre por meio da protonação do nitrogênio imidazólico que não está comprometido na ligação de hidrogênio com o oxigênio.

Desta forma, a protonação deste nitrogênio do imidazol mais “externo” ao sexto sítio de coordenação, causaria a saída do hidrogênio ionizável comprometido na ligação de hidrogênio com o oxigênio. Isto ocorre porque a protonação de um dos nitrogênios imidazólicos proporcionaria uma diminuição acentuada da basicidade do outro nitrogênio. Este fato acontece porque o imidazol é um anel insaturado e essa protonação afetaria as propriedades de todo o anel, inclusive do nitrogênio diretamente ligado ao oxigênio.

Em consequência dessa protonação, a saída do próton, anteriormente comprometido na ligação de hidrogênio, favoreceria a saída do ligante oxigênio na sua forma protonada. Portanto, o ligante oxigênio deixaria o heme na forma de radical hidroperóxil, acentuando a velocidade de auto-oxidação.

A protonação do oxigênio deve diminuir a capacidade deste ligante competir com a água pelo centro ferroso, devido à significativa diminuição de sua basicidade, diminuindo, portanto, sua constante de ligação com o metal. Além disso, o ligante oxigênio protonado deve ser mais facilmente solvatado

pela água, em função de sua maior polaridade em relação à molécula de oxigênio, o que pode facilitar, ainda mais, a sua saída do heme.

Para determinar os parâmetros cinéticos que contribuem para cada k_{obs} versus pH, são propostos na literatura alguns modelos para cada caso [Tsuruga, 1998]. Tsuruga e colaboradores [Tsuruga, 1998] consideram para as cadeias α da hemoglobina humana uma curva dependente do pH em termos de um “modelo catalisado por ácido de dois estados”. Neste modelo, é assumido que um único grupo dissociável, AH com pK_1 , está envolvido na reação. Portanto, há duas formas para as cadeias α oxigenadas, representadas por A e B, com frações molares de ϕ e ψ , respectivamente. Vale lembrar que A e B estão em equilíbrio, mas diferem pelo estado de dissociação do grupo AH.

As formas A e B podem ser oxidadas pelo deslocamento do O_2^- do FeO_2 em decorrência da entrada da molécula de água ou do íon hidroxila no bolsão do heme. Neste trabalho, para as cadeias da HbGp, é considerado o mesmo modelo proposto para as cadeias α da hemoglobina humana, onde o esquema reacional pode ser descrito conforme apresentado abaixo (Esquema 4.2), utilizando as constantes definidas nas reações 4.1, 4.2 e 4.3.

Esquema 4.2

Para o mecanismo do esquema 4.2, a constante de velocidade observada, k_{obs} em s^{-1} , referente à auto-oxidação das cadeias, pode ser deduzida pela combinação das reações 4.1, 4.2, 4.3 (Equação 4.1) apresentada a seguir:

$$k_{obs} = \{k_0^A[H_2O] + k_H^A[H_2O][H^+]\}(\Phi) + \{k_0^B[H_2O] + k_H^B[H_2O][H^+] + k_{OH}^B[OH^-]\}(\Psi)$$

(Equação 4.1)

Na equação 4.1, as frações molares da espécie protonada, Φ , e desprotonada, Ψ , são obtidas pelas seguintes equações:

$$\Phi = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_1}$$

$$\Psi = (1 - \Phi) = \frac{K_1}{[H^+] + K_1}$$

As constantes de velocidade k_0^A , k_H^A , k_0^B , k_H^B , k_{OH}^B envolvidas na reação de auto-oxidação das cadeias de HbGp que reagem mais rapidamente (k_{obs1}) foram determinadas pelo ajuste do gráfico das constantes de velocidade observadas em função do pH (fig. 4.6). Este ajuste é efetuado empregando-se a equação 4.1, onde vários valores para K_1 são testados, permitindo-se a determinação dos respectivos valores de qui-quadrado.

A figura 4.7 exemplifica a determinação do pK, empregando-se os valores da constante k_{obs1} . O gráfico descreve o comportamento dos valores de χ^2 obtidos para o ajuste em cada valor de pK empregado. O melhor valor de pK é escolhido a partir do valor mínimo de χ^2 . Este procedimento é utilizado devido às características multi-variáveis do ajuste, visando à minimização dos efeitos das dependências entre as variáveis a serem obtidas.

Figura 4.6 Gráfico da k_{obs1} em função do pH para a auto-oxidação da componente rápida da HbGp em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C. A linha pontilhada representa o ajuste para determinação dos parâmetros cinéticos empregando-se a equação 4.1.

Uma vez determinado o valor mais apropriado para o pK, este é empregado para se ajustar de forma global os parâmetros cinéticos

apresentados na figura 4.6. A tabela 4.1 apresenta tanto os valores das constantes de velocidade como os valores da constante de dissociação do grupo ácido.

Deste modo, fica evidente que o processo é catalisado por próton com constantes de velocidade k_H^A e k_H^B . A auto-oxidação é mais favorecida do que os processos que ocorrem somente com a água, caracterizados pelas constantes de velocidade k_O^A e k_O^B . De fato, a catálise por próton contribui substancialmente no aumento da velocidade. A constante de velocidade devido à catálise ácida, k_H^B , para a hemoglobina no estado B (Hb A⁻) é 2×10^6 maior do que a constante de velocidade da auto-oxidação devido à água, k_O^B . Para a hemoglobina no estado A (Hb AH) nas cadeias mais sensíveis (processo rápido), a constante de auto-oxidação catalisada, k_H^A , é $4,3 \times 10^4$ vezes superior à auto-oxidação devido à água, k_O^A .

Analisando a faixa alcalina de pH para as cadeias rápidas no estado B (HbA⁻), também é verificado um aumento na constante de velocidade devido à hidroxila, k_{OH}^B , quando comparada à constante referente à água, k_O^B .

Vale lembrar que a hidroxila é um ligante aniônico enquanto que a água é um ligante neutro, o que implica que, para o centro férrico d^5 , que representa um alto estado de oxidação, o ligante aniônico proporciona maior densidade de carga eletrônica. Logo, a hidroxila apresenta maior afinidade com o centro férrico do que o ligante aquoso. De fato, muitos textos na literatura estabelecem a proximidade de comportamento básico entre a hidroxila e os haletos, o que

ilustra a atuação da hidroxila como doador σ e doador π , já que os haletos são referenciais de ligantes π -doadores.

Tabela 4.1 Constantes de velocidade e constante de dissociação ácida obtidas a partir das curvas de dependência do pH para a auto-oxidação da hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM a 42°C.

HbGp	Estado da hemoglobina	K_o ($s^{-1}M^{-1}$)	k_H ($s^{-1}M^{-2}$)	k_{OH} ($s^{-1}M^{-1}$)	pK_1
Processo rápido	A (AH)	0,00002	0,87		5,2
	B (A⁻)	$1,9 \times 10^{-7}$	0,37	553,9	
Processo Lento	A (AH)	$3,3 \times 10^{-6}$	0,008		4,5
	B (A⁻)	$2,6 \times 10^{-7}$	0,44	56,6	

Logo, a presença do ligante hidroxila acentua o processo de auto-oxidação do heme devido a um aumento da densidade de carga eletrônica sobre o centro ferroso d^6 . Isto diminuiria a capacidade desse centro metálico manter seu estado de oxidação 2^+ , facilitando a redução do oxigênio e sua conseqüente saída da esfera de coordenação do centro ferroso, como ânion superóxido. Importante acrescentar que o ligante hidroxila, em função dessa alta densidade de carga, que proporciona um comportamento σ e π doador, tem uma afinidade significativamente maior pelo centro férrico do que pelo centro ferroso, o que deve favorecer, ainda mais, o processo de auto-oxidação.

De forma análoga à análise efetuada para o processo rápido, são avaliadas as constantes k_{obs2} referentes às cadeias da HbGp que se oxidam mais lentamente em função do pH (fig. 4.8). As constantes de velocidade e a constante de dissociação do grupo ácido, envolvidas na reação de auto-oxidação, são determinadas e estão apresentadas na tabela 4.1 para toda a faixa de pH estudada. Assim, inicialmente é obtido o pK do grupo dissociável, considerando o critério do menor valor de χ^2 (fig. 4.9). A partir do valor do pK mais adequado, efetua-se o ajuste global do gráfico 4.8 para identificar os valores dos parâmetros cinéticos (Tabela 4.1).

Figura 4.7 Obtenção da constante de dissociação do grupo ácido. Gráfico do χ^2 obtido em função do valor de pK fixado no ajuste do gráfico 4.6 empregando-se a equação 4.1. Análise de k_{obs1} da hemoglobina íntegra de *G. paulistus*.

Da mesma forma que no processo de auto-oxidação das cadeias rápidas é identificado o mecanismo de catálise por próton, as cadeias resistentes à auto-oxidação, isto é, as cadeias de auto-oxidação lenta, apresentam k_H^A e k_H^B , indicando a ocorrência de catálise ácida. A catálise por próton, neste caso específico do processo lento, aumenta a velocidade por um fator de 2×10^3 para o estado A e $1,7 \times 10^6$ vezes para o estado B.

Figura 4.8 Gráfico do k_{obs2} em função do pH para a auto-oxidação da componente lenta da HbGp em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C. A linha pontilhada representa o ajuste para determinação dos parâmetros cinéticos empregando-se a equação 4.1.

Portanto, a auto-oxidação da hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* apresenta dois processos cinéticos distintos atribuídos ao conjunto de

cadeias que se oxidam de forma rápida e lenta, respectivamente. Pela análise dos valores das constantes de velocidade, ambos os processos foram catalisados por próton.

Algumas oxi-mioglobinas de mamíferos assim como as cadeias α da hemoglobina humana apresentam a histidina distal envolvida no mecanismo da catálise por próton. Na literatura, sugere-se, através dos valores de pK referentes ao grupo dissociável, que o resíduo distal responsável por essa catálise por próton seria a histidina.

Figura 4.9 Obtenção da constante de dissociação do grupo ácido. Gráfico do χ^2 obtido em função do valor de pK fixado no ajuste do gráfico 4.8 empregando-se a equação 4.1. Análise de k_{obs2} da Hb íntegra de *G. paulistus*.

Para a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, apenas é conhecido o seqüenciamento e a modelagem da sua cadeia monomérica *d*. Esta subunidade protéica apresenta na posição distal o resíduo de aminoácido histidina. Considerando que a histidina distal é um resíduo muito conservado nesta classe de hemoglobinas, provavelmente, o resíduo envolvido no mecanismo da catálise por próton para as cadeias da HbGp também poderia ser a própria histidina. Portanto, é sugerido que os grupos dissociáveis AH com $pK=5,2$ no processo rápido, e $pK=4,5$ no processo lento, seriam os resíduos de histidina e estariam envolvidos no esquema 4.2, sendo os sítios responsáveis pela catálise por próton.

Comparando os valores de pK obtidos nos dois processos, é importante destacar que nas cadeias lentas da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (k_{obs2}), $pK=4,5$, o resíduo distal está menos acessível aos prótons do solvente em relação às cadeias rápidas (k_{obs2}), $pK=5,2$, por um fator de quase uma unidade de pH.

A própria hemoglobina humana apresenta dois valores de pK , sendo que o pK do grupo dissociável AH é 6,2 para as cadeias α e 5,1 para as cadeias β , significando que as cadeias α são mais acessíveis aos prótons do solvente. Apesar do pK_a do anel da histidina livre ser em torno de sete, trabalhos na literatura têm mostrado que, dentro do bolsão hidrofóbico, esse pK pode cair significativamente, atingindo valores como 4,0 [Kadir, 1991]. Isto ocorre porque em diferentes micro-ambientes no interior da proteína, a atividade dos prótons não deverá corresponder àquela apresentada nas condições de pH externos às

cadeias polipeptídicas. Isto se deve ao isolamento hidrofóbico do grupamento prostético heme em relação ao solvente, que torna as concentrações dos prótons e dos ligantes dentro do bolsão do heme diferenciadas em relação às suas respectivas concentrações no solvente propriamente considerado, ou seja, fora do ambiente protéico [Moreira, 2005] [Poulsen, 2005].

Yasuda e colaboradores [Yasuda, 2002] propõem que a histidina distal apresenta uma dupla função no deslocamento nucleofílico do O_2^- nas mioglobinas e hemoglobinas. Uma delas é o mecanismo de substituição de prótons via anel imidazólico, que acontece pelo acesso indireto do próton ao oxigênio ligado, gerando o efeito catalítico na velocidade de auto-oxidação de oxi-mioglobinas e oxi-hemoglobinas. A segunda função consiste em proteger o centro ferroso do ataque nucleofílico efetuado pela molécula de água ou pelo íon hidroxila, provenientes do solvente.

Portanto, a histidina distal promove um delicado balanço de fatores estéricos e catalíticos necessários para controlar a ligação reversível do oxigênio nas mioglobinas e hemoglobinas em solução aquosa [Shikama, 2003].

A relevância da histidina distal para a catálise por próton em meio ácido tem sido muito bem caracterizada por estudos cinéticos envolvendo mais de doze mioglobinas [Yasuda, 2002]. Por outro lado, o processo catalisado pelo próton não é observado em mioglobinas que não apresentem a histidina como o resíduo distal da hélice E. Entretanto, é importante salientar que nem toda proteína que contenha a histidina nesta referida posição apresentará, necessariamente, a catálise por próton. Deste modo, mesmo se o resíduo distal

for uma histidina, a proteína pode não apresentar qualquer catálise por próton se o resíduo em questão não estiver com geometria e distância favoráveis para a formação da ligação de hidrogênio com o oxigênio coordenado ao centro ferroso. Estes fatores estéricos são fundamentais para que a ligação de hidrogênio seja efetiva, pois, caso essa interação não se estabeleça, não haverá catálise.

Como exemplo da discussão acima, vale citar as cadeias β da hemoglobina tetramérica humana, que não apresentam a catálise por próton na auto-oxidação do seu tetrâmero, devido a uma restrição conformacional, que impede a formação da ligação de hidrogênio entre a histidina e o oxigênio [Tsuruga, 1998].

Pode-se acrescentar que na literatura está bem estabelecido que a histidina distal poderá agir como um “portão” (do inglês “gate”) ou uma “porta giratória” (do inglês “swinging door”) [Shikama, 2003], que proporciona ao bolsão do heme uma espécie de controle seletivo em relação à entrada de ligantes no bolsão.

O aumento da acessibilidade do solvente no bolsão hidrofóbico do heme é reconhecidamente um dos principais fatores que aumentam a velocidade de auto-oxidação em hemoproteínas. Isto ocorre em função do maior contato entre os nucleófilos e o centro ferroso gerar um deslocamento nucleofílico que favorece a saída do ligante oxigênio como ânion superóxido. Desta forma, essa ação “portão” (gate) ou “porta giratória” (“swinging door”), que proporciona uma

seletividade na entrada de ligantes no bolsão do heme, afetaria decisivamente a velocidade de auto-oxidação.

Logo, a influência marcante da histidina distal na auto-oxidação se deve não somente à ligação de hidrogênio que proporciona a catálise pelos prótons como também a essa espécie de “efeito portão”, que controla o acesso dos nucleófilos ao heme.

Realmente, esse “efeito portão” é tão efetivo que Tada e colaboradores [Tada, 1998] descrevem que, para a oxi-mioglobina de *Aplysia*, que contém valina ao invés de histidina na posição distal da hélice E, a velocidade de auto-oxidação é quase cem vezes maior do que a auto-oxidação da oxi-mioglobina de esperma de baleia em pH neutro. Estes autores concluem que a histidina distal inibe a auto-oxidação pelo bloqueio da entrada de moléculas de água no bolsão.

Assim sendo, a mioglobina de elefante e uma mutante H64Q de esperma de baleia, que apresentam glutamina no sítio distal, também evidenciam certo bloqueio à entrada de ligantes ao bolsão do heme. Isto ocorre porque a glutamina é um resíduo de aminoácido que possui cadeia lateral semelhante ao anel imidazólico da histidina, tanto em comprimento como em volume. No entanto, estas mioglobinas não apresentam catálise por próton, pois a glutamina não consegue mimetizar a ação da histidina nesta função catalítica, uma vez que não possui a mesma tendência para a formação de ligação de hidrogênio com o oxigênio molecular coordenado ao ferro [Tada, 1998].

As diferenças em termos de estrutura polipeptídica e constituição do bolsão hidrofóbico do heme entre as várias hemoproteínas alteram a intensidade da ligação de hidrogênio entre a histidina distal e o oxigênio. Admitindo-se que tal ligação de hidrogênio ocorra em uma determinada hemoproteína, perturbações ambientes geradas por diferentes condições como, por exemplo, o pH, devem afetar o processo de auto-oxidação. As perturbações em questão modificariam tanto a estrutura polipeptídica da proteína como a disponibilidade de íons no bolsão do heme. Portanto, as várias alterações de disposição espacial da hemoglobina podem tanto eliminar a ligação de hidrogênio em questão, evitando a catálise por próton, como alterar a intensidade dessa ligação de hidrogênio, modificando a velocidade de auto-oxidação observada.

4.3 Reação de auto-oxidação do monômero *d* da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*

A figura 4.10 apresenta curvas cinéticas de auto-oxidação obtidas para a cadeia monomérica *d* da HbGp. O gráfico do logaritmo da variação da absorbância ($\ln \{(A_t - A_\infty)/\Delta A_{\text{máx}}\}$ em função do tempo), claramente mostra uma relação linear, indicando a presença de apenas um processo cinético de primeira ordem.

Comparando as constantes de velocidade obtidas para o monômero *d* com aquelas referentes à hemoglobina íntegra, em valores de pH onde nenhum

processo de dissociação ocorre (tabela 4.2), é possível notar a maior estabilidade da espécie oxi-hemoglobina íntegra em relação à cadeia monomérica *d* separada.

Esta maior estabilidade da hemoglobina íntegra em pH 7,0 é consequência da estrutura altamente organizada e do enovelamento polipeptídico das cadeias, que dificultam o acesso do solvente à cavidade hidrofóbica, diminuindo significativamente a constante de velocidade de auto-oxidação.

Figura 4.10 Gráficos da cinética de primeira ordem referentes à auto-oxidação do monômero *d* da HbGp. Condições: 6×10^{-6} M de hemoglobina, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C, em função do pH.

O monômero *d* se oxida mais rapidamente que a hemoglobina íntegra entre os valores de pH 5,9 e 7,3 (Tabela 4.2), já que, acima de 7,3 e abaixo de 5,9, a hemoglobina inicia o processo de dissociação expondo as cadeias à oxidação. O monômero *d*, quando separado da hemoglobina íntegra, apresenta as cavidades do heme suficientemente expostas para permitir o ataque da molécula de água ao centro ferroso, com a conseqüente formação de espécies férricas. Para a hemoglobina humana, também é descrito na literatura que as cadeias α e β se oxidam mais rapidamente quando se encontram isoladas, em toda a faixa do pH [Tsuruga, 1998].

Tabela 4.2 Constantes de velocidade observadas obtidas para a HbGp íntegra e para a subunidade monomérica *d*, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.

pH	$k_{obs} (s^{-1})$	
	Monômero <i>d</i> de HbGp	HbGp íntegra
6,0	$3,2 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-5}$
7,0	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-5}$
7,30	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-5}$

A figura 4.11 mostra a influência do pH nas constantes de velocidade observadas para a reação de auto-oxidação da cadeia monomérica *d*. Nota-se que a velocidade da reação de auto-oxidação é mais rápida com o aumento da concentração hidrogeniônica.

Para o ajuste da curva, é considerado o mesmo modelo proposto para a hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus*, o “modelo catalisado por ácido de dois estados”, já discutido anteriormente. É considerado o mesmo esquema (esquema 4.2) utilizado para a HbGp íntegra, sendo que, para o mecanismo do esquema 4.2, a constante de velocidade observada, k_{obs} em s^{-1} , para a auto-oxidação do monômero d pode ser analisada empregando-se a equação 4.1.

Figura 4.11 Gráfico da k_{obs} em função do pH referentes à auto-oxidação do monômero d isolado da HbGp em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C. A linha pontilhada representa o ajuste para determinação dos parâmetros cinéticos empregando-se a equação 4.1.

A tabela 4.3 apresenta os parâmetros cinéticos envolvidos na reação de auto-oxidação do monômero d da HbGp. Este monômero também manifesta a

catálise por próton, com constantes de velocidade k_H^A e k_H^B promovendo a auto-oxidação acima do processo que ocorre em água com as constantes de velocidade k_o^A e k_o^B . Observa-se um aumento na velocidade, por um fator de 1×10^5 para o estado A e 2×10^4 para o estado B.

Tabela 4.3 Constantes de velocidade e constante de dissociação ácida obtidas a partir das curvas de dependência do pH para a auto-oxidação do monômero *d* da HbGp em tampão 30 mM a 42°C.

Monômero	Estado do monômero	k_o (s ⁻¹ M ⁻¹)	k_H (s ⁻¹ M ⁻²)	k_{OH} (s ⁻¹ M ⁻¹)	pK ₁
HbGp	A (AH)	0,00003	3,3		4,2
	B (A ⁻)	$4,3 \times 10^{-6}$	0,085	10,4	

O monômero *d* da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* já foi seqüenciado e modelado [Cabral, 2002], apresentando no sítio distal uma histidina, que deve ser responsável pela intensa catálise observada em meio ácido. O valor de pK encontrado para a histidina distal, pertencente à cadeia monomérica *d*, é 4,2. Este valor é muito próximo do valor de pK referente às cadeias que se oxidam mais lentamente na HbGp íntegra. Isto indica que o monômero *d* teria uma representativa contribuição na etapa lenta da auto-oxidação da hemoglobina íntegra quando a mesma se dissocia.

Tabela 4.4 Constantes de velocidade observadas obtidas para a HbGp íntegra e para a subunidade monomérica *d*, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.

pH	HbGp íntegra		Monômero <i>d</i> de HbGp
	$k_{obs1} (s^{-1})$	$k_{obs2} (s^{-1})$	$k_{obs} (s^{-1})$
5,0	$9,3 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-4}$
5,4	$6,0 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-4}$
7,8	$4,2 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$
8,2	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$
9,0	$2,5 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$
9,5	$3,1 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$

Na tabela 4.4 estão agrupados os valores das constantes de velocidade obtidas tanto para a auto-oxidação da HbGp íntegra como para o monômero *d*. É possível observar que na faixa alcalina, nos valores de pH 9,0 e 9,5, as constantes de velocidade referentes ao processo lento da hemoglobina íntegra são muito próximas aos valores obtidos para o monômero *d*.

Estes resultados estão de acordo com o trabalho anterior que afirma que as constantes obtidas com a auto-oxidação da hemoglobina íntegra (HbGp) em pH 9,0 deveriam ser referentes ao trímero *abc* (k_{obs1}) e ao monômero *d* (k_{obs2}), sendo o trímero responsável pelo processo rápido e o monômero pelo processo lento. Logo, é possível inferir que o trímero apresenta uma menor afinidade do que o monômero *d* pelo ligante oxigênio [Poli, 2005].

Figura 4.12 Gráfico do k_{obs1} (componente rápida), k_{obs2} (componente lenta) referentes à HbGp íntegra e ao monômero d em função do pH em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM, 42°C.

Na literatura, é descrito que hemoglobinas com baixa afinidade pelo oxigênio exibem uma maior velocidade de auto-oxidação, mostrando que a velocidade de auto-oxidação seria inversamente proporcional a esta afinidade [Di Iorio, 1984]. O aumento na velocidade de auto-oxidação observado parece ser devido a uma diminuição da afinidade pelo oxigênio e a um aumento da acessibilidade do solvente à cavidade distal [Springer, 1989]. Fushitani e colaboradores [Fushitani, 1991] descrevem que o trímero da hemoglobina de *L. terrestris* apresenta uma menor afinidade pelo oxigênio ($\log P_{50} \sim 0,7$) que o monômero ($\log P_{50} \sim 0,2$). Este comportamento está relacionado com os efeitos da presença da histidina distal, ou seja, o impedimento estérico à acessibilidade

de ligantes, a ligação de hidrogênio e a polaridade local, que possuem funções relevantes na regulação da velocidade de auto-oxidação do heme [Brantley, 1993] [Tada, 1998] [Springer, 1989] [Wallace, 1982] [Kamimura, 2003] [Shikama, 1986] [Suzuki, 2000] [Zhao, 1995].

O monômero *d* da HbGp apresenta na posição B10 um resíduo de triptofano e na posição distal (E7) um resíduo de histidina [Cabral, 2002]. Dentre os resíduos da cavidade distal, o B10 é um resíduo importante para a ligação do oxigênio, em conjunto com o resíduo E7. Kamimura e colaboradores [Kamimura, 2003] reportam que a fenilalanina –B10 na posição 32 estabiliza a ligação do O₂ na hemoglobina de *Tokunagayusurika akamusi* V. Carver e colaboradores [Carver, 1992], Brantley e colaboradores [Brantley, 1993] e Jeong e colaboradores [Jeong, 1999] mostram que a mutação na posição B10, trocando leucina por outros resíduos em globinas, aumenta a estabilidade contra a auto-oxidação ou suprime completamente a mesma, mostrando a estreita correlação entre a auto-oxidação e a afinidade pela molécula do oxigênio.

É importante mencionar que o monômero de *G. paulistus* apresenta 55% de identidade seqüencial com a cadeia *d* de *L. terrestris*. Considerando que a estrutura do trímero *abc* da HbGp ainda não é conhecida, a seqüência do trímero de *L. terrestris* poderia ser utilizada para uma análise inicial, haja vista a semelhança entre as duas hemoglobinas. Isto auxiliaria na compreensão da menor estabilidade do trímero de HbGp no processo de auto-oxidação em relação ao monômero.

Vale mencionar que a cadeia *c* do trímero é a única que apresenta um resíduo do aminoácido leucina na posição B10, semelhantemente à hemoglobina humana. Assim, a leucina poderia ser o pivô da menor estabilidade do trímero devido às propriedades apolares da sua cadeia lateral. Por outro lado, o monômero *d* da HbGp apresenta um triptofano na posição B10, que é mais polar, além de possuir um grupo lateral mais volumoso. Deste modo, o triptofano poderia estabilizar o O₂ como sexto ligante do heme do monômero *d* de modo semelhante ao que ocorre com a fenilalanina na hemoglobina de *Tokunagayusurika akamusi* V [Kamimura, 2003]. Isto explicaria a maior estabilidade contra a auto-oxidação do monômero *d* de HbGp em relação ao trímero *abc* desta mesma hemoglobina.

4.4 Efeito do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) na auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

4.4.1 Estudo da auto-oxidação em função da concentração de SDS em pH 7,0

O efeito da adição de SDS nas soluções de hemoglobina em pH 7,0 foi monitorado por espectroscopia de absorção eletrônica para avaliar o ambiente do heme e a coordenação do ferro.

Figura 4.13 Espectros de absorção eletrônica UV-Vis da oxi-HbGp em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, T=38.5°C (3 μ M de heme) nas concentrações de SDS indicadas.

A figura 4.13 demonstra que, para toda a faixa de concentração de SDS utilizada, o espectro obtido ao final da reação de auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em pH 7,0 corresponde ao hemicromo, ou seja, foi formado um complexo baixo spin bis-histidina devido ao movimento da histidina distal em direção ao centro metálico. As bandas α e β características das espécies hemicromo foram identificadas em 575 e 565 nm, respectivamente, evidenciando o final do processo de auto-oxidação e a mudança no sexto sítio de coordenação.

Em pH 7,0, o nucleófilo que atua no processo de auto-oxidação é a molécula de água, que seria então deslocada pelo imidazol da histidina distal

para a formação do hemicromo, que é uma espécie final comum à auto-oxidação de várias hemoproteínas [Tsai, 2000][Jeong, 1999].

Estudos da interação entre o SDS e o citocromo *c* em meio neutro demonstraram que um estado intermediário no processo de desenovelamento polipeptídico é estabilizado pelo complexo bis-histidiníco, e que modificações subseqüentes da estrutura secundária teriam suas respectivas velocidades limitadas pela dissociação da histidina [Das, 1998]. A formação do hemicromo fixaria as hélices E e F ao centro férrico, estabilizando parcialmente o novo arranjo polipeptídico, em função de uma definição da posição espacial relativa das hélices E e F, que restringiria a mobilidade da cadeia polipeptídica como um todo.

A cinética de auto-oxidação em pH 7,0 foi acompanhada na faixa de concentração de SDS até 1 mM. Em todas as concentrações de SDS, a adição de surfactante aumentou a velocidade da reação de auto-oxidação.

Para concentrações de surfactante até 0,5 mM (fig. 4.14) é observado um comportamento mono-exponencial para as curvas de auto-oxidação, sendo que este comportamento é uma conseqüência do fato de que a hemoglobina se encontra em sua forma íntegra, apresentado a sua estrutura oligomérica mais compacta neste valor de pH, o que dificulta a acessibilidade da água ao bolsão hidrofóbico.

Figura 4.14 Curvas cinéticas da auto-oxidação da oxi-HbGp em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, T=38,5°C (3 μM de heme) nas concentrações de SDS indicadas.

Em pH 7,0, a forma nativa apresenta o bolsão do heme com elevada hidrofobicidade, além de um estado oligomérico altamente preservado. De acordo com Strand e colaboradores [Strand, 2004], o empacotamento dos resíduos da vizinhança do ligante coordenado ao sexto sítio do centro metálico sugere um bolsão distal compacto na hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris*, causando um significativo impacto na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Isto acontece em função da estabilização da coordenação deste ligante e pela restrição do acesso dos ligantes provenientes do solvente ao centro ferroso. Este arranjo polipeptídico característico da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* deve ser comum para a hemoglobina de *Glossoscolex*

paulistus, justificando a alta estabilidade contra a auto-oxidação encontrada para esta hemoglobina no presente trabalho.

Otzen e colaboradores [Otzen, 2002], estudando uma proteína pequena S6 na presença de SDS, afirmam que monômeros de SDS se ligam ao estado nativo, mas o desenovelamento global da proteína somente ocorreria acima da concentração micelar crítica (cmc). Desta forma, no presente trabalho, o comportamento mono-exponencial observado em concentrações de SDS abaixo de 0,75 mM em pH 7,0 poderia indicar uma interação menos drástica do SDS com a HbGp, proporcionando uma curva cinética monofásica. Isto sugere um arranjo oligomérico que manteria um ambiente similar ao redor dos bolsões do heme.

Figura 4.15 Constantes de velocidade k_{obs} , em função da concentração de SDS. As barras de erro representam o desvio padrão de três determinações independentes.

Oellerich e colaboradores [Oellerich, 2003], estudando a interação do SDS com o citocromo *c*, explicam que diferenças acima e abaixo da cmc seriam causadas pelos diferentes modos de ligação do SDS, ou seja, monômeros e micelas, sendo que as alterações da estrutura do heme seriam comuns em ambos os modos de interação, implicando que os sítios de interações eletrostáticas e hidrofóbicas deveriam estar na vizinhança da cavidade do heme no citocromo *c*. Neste contexto, apesar da vizinhança do bolsão da HbGp não ser conhecida completamente, seria possível sugerir uma interação similar para esta hemoglobina extracelular gigante.

A figura 4.15 apresenta o gráfico das constantes de velocidade em função da concentração de SDS, para os menores valores de concentração de surfactante (Tabela 4.5). Na figura 4.15 observa-se que as constantes de velocidade não variam em concentrações menores ou iguais a 0,3 mM, ao passo que, acima desta concentração de SDS, ocorre um aumento significativo no valor das mesmas.

Acima de 0,75 mM de SDS é obtido um comportamento bi-exponencial, apresentado na tabela 4.5, indicando a dissociação da hemoglobina. A figura 4.16 mostra os gráficos das constantes de velocidade na faixa de SDS de 0,75-1 mM, onde se observa um aumento das constantes de velocidade em função da concentração de SDS.

A partir de uma razão SDS/HbGp de aproximadamente 150 (concentração de SDS de 0,75 mM) é possível constatar a dissociação da hemoglobina íntegra através da cinética de auto-oxidação. Estes resultados

estão de acordo com trabalhos anteriores do grupo, onde Gelamo e colaboradores [Gelamo, 2004] verificam por SAXS que a HbGp íntegra em pH 7,0 evidencia um processo de dissociação intenso para uma razão surfactante/HbGp de 200.

Nesta relação surfactante/HbGp de 200, a dissociação proporcionaria subunidades menores, o que representaria uma mudança mais drástica no estado de oligomerização da hemoglobina. Nestas condições, o raio de giro diminui para aproximadamente 30 Å, o que realmente indica a separação das subunidades [Gelamo, 2004].

Tabela 4.5 Constantes de velocidade para a auto-oxidação da HbGp em função da concentração de SDS em pH 7,0.

[SDS] (mM)	$k_{obs} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_1 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Delta A_1 \times 10^2$	$\Delta A_2 \times 10^2$
0	0.27±0.01				
0.25	0.38±0.02				
0.3	0.45±0.04				
0.45	4.0±0.8				
0.5	11±2				
0.75		48±7	1.7±0.1	17.5±0.6	2.0±0.2
0.85		71±6	2.70±0.07	16.6±0.6	2.0±0.3
1.0		99±10	3.7±0.3	20±2	3.0±0.4

Figura 4.16 Gráficos das constantes de velocidade k_{obs1} e k_{obs2} , obtidas a partir dos ajustes das cinéticas bifásicas em função da concentração de SDS. As barras de erro representam os desvios-padrão de três determinações independentes.

4.4.2 Estudo da auto-oxidação em função da concentração de SDS em pH 9,0.

A Figura 4.17 mostra as mudanças ocorridas no espectro com a auto-oxidação da espécie oxi-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, pH 9,0 a 38,5°C na presença do dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS promove uma diminuição na intensidade da banda de Soret que ocorre simultaneamente com o deslocamento do seu máximo para 412 nm. As bandas Q também têm seus máximos de absorção alterados, sendo que a banda α é deslocada para 565 nm e a banda β para 535 nm, caracterizando a formação do hemicromo. Estas mudanças ocorrem em concentrações de SDS menores ou iguais a 1 mM. Estes resultados corroboram trabalhos anteriores [Agustinho, 1996] em que os autores verificaram que a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* forma a espécie hemicromo em pH 9,0 na ausência de detergente.

O aumento da concentração de SDS (concentrações acima de 1mM), correspondendo a uma razão surfactante/proteína maior que 330, induz uma diminuição ainda maior da intensidade da banda de Soret. Esta diminuição da banda B ocorre concomitantemente a um aumento na absorção em 370 nm, indicando que uma outra espécie está resultando do processo de auto-oxidação. É possível observar, portanto, a coexistência de duas espécies no equilíbrio, sendo que esta coexistência de diferentes espécies parece ser uma característica inerente à hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, o que é constatado, inclusive, em trabalhos anteriores [Moreira, 2005].

Figura 4.17 Espectros da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em tampão Tris-HCl 20mM, pH 9.0 a 38,5°C, 3 μ M de heme gerados durante o processo de auto-oxidação induzido pela adição de SDS.

Deste modo, o comportamento espectral observado na figura 4.17 representa a formação de uma nova espécie, que é constatada para concentrações de SDS acima de 1mM, além da espécie hemicromo. O aumento de intensidade da banda em 370 nm é acompanhado pela diminuição da intensidade da banda de Soret, o que indica a formação de uma espécie pentacoordenada. Esta transição hemicromo-pentacoordenado está relacionada a uma maior acessibilidade do solvente ao grupo heme, que acontece em função da perda parcial do enovelamento da cadeia polipeptídica [Palaniappan, 1994] [Sage, 1991].

É importante mencionar que a banda de Soret em 370 nm sugere a presença de água ou hidroxila como quinto ligante do heme pentacoordenado, pois espécies pentacoordenadas com a histidina proximal como quinto ligante, apresentam, na maioria dos casos, uma banda de Soret na faixa de comprimento de onda entre 395 e 405 nm.

Importante acrescentar que a interação da mioglobina de cavalo com SDS (dodecil sulfato de sódio) e CTAC (cloreto de cetil trimetil amônio), também promove a formação do hemicromo (0,2 mM de SDS) com relações de SDS/proteína de 25 a 400 [Tofani, 2004]. Entretanto, para concentrações maiores de SDS (acima de 3 mM) uma espécie pentacoordenada é observada, o que sugere que um maior desenovelamento polipeptídico, em função de uma maior concentração de surfactante, proporciona uma maior acessibilidade do solvente ao bolsão do heme promovendo a transição entre as espécies hemicromo e pentacoordenado. Esta discussão está de acordo com a análise do presente trabalho e também de trabalhos anteriores que enfatizam a correlação entre a acessibilidade do solvente e a formação da espécie pentacoordenada [Moreira, 2005].

Ajlou e colaboradores [Ajlou 2002] também constataram a presença do hemicromo como espécie final da auto-oxidação da hemoglobina de ganso com brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB), que é um surfactante catiônico. Esta espécie também é formada na presença de desnaturantes, como uréia [Sugawara, 1995].

Na ausência de desnaturantes, as oxi-mioglobinas de mamíferos são usualmente oxidadas para suas formas férricas pelo deslocamento do ânion superóxido de sua primeira esfera de coordenação pela molécula de água ou pela hidroxila do solvente, dependendo do pH. O ferro é então convertido para a sua forma férrica e a molécula de água ou a hidroxila se mantém ligada ao Fe(III) na sexta posição de coordenação formando a aquometa ou hidroximeta hemoglobina. Portanto, a formação da espécie aquometa ou da espécie hidroximeta seria a etapa determinante da velocidade de reação, e, em seqüência, ocorreria a conversão da espécie meta para a espécie hemicromo muito rapidamente ($k_{His} \gg k_0$) [Tsuruga, 1998], como demonstrado no esquema abaixo:

A oxi-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em pH 9,0 na presença de SDS apresenta um comportamento cinético complexo, como observado anteriormente na presença de alguns nucleófilos como hidroxila e cianeto para a HbGp [Poli, 2005] e, em meio ácido, para a hemoglobina humana [Tsuruga, 1997]. A curva de auto-oxidação é composta por duas cinéticas de primeira ordem, com constantes de velocidade observadas k_{obs1} e k_{obs2} , respectivamente, de acordo com a equação 3.1, na seção 3.2.2.1 dos materiais e métodos.

Estudos anteriores de fluorescência e cromatografia indicam que a hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* está dissociada em pH 9,0 [Imasato, 1995]. Assim, os dois processos cinéticos devem estar relacionados às subunidades dissociadas.

Conforme discutido anteriormente, foi concluído por SAXS (“Small Angle X-ray Scattering” ou espalhamento de raios-x a baixo ângulo) [Gelamo, 2004], que a adição de SDS, mesmo em pH 7,0, provocaria a dissociação da hemoglobina. Nestas condições de dissociação, devido ao pH e à presença de SDS, um comportamento cinético bi-exponencial é observado. O surfactante aumentaria a acessibilidade do solvente, que já ocorre em pH 9,0 na ausência do mesmo, devido à dissociação das subunidades com a alcalinização.

A auto-oxidação é acompanhada em diferentes concentrações de SDS a 38,5°C. A figura 4.18 mostra a influência da concentração de detergente nas cinéticas e evidencia um aumento na velocidade de auto-oxidação em função da concentração de SDS. Os parâmetros extraídos dos ajustes dos decaimentos da absorbância, que são obtidos empregando-se a equação 3.1, estão representados na Tabela 4.6.

Figura 4.18 Gráficos da cinética de auto-oxidação referente à oxi-hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em tampão Tris-HCl 20mM, pH 9.0, 38,5°C, 3 μM de heme.

A figura 4.19 representa as constantes de velocidades em função da concentração de SDS. É evidente que tanto a constante de velocidade k_1 quanto a constante de velocidade k_2 aumentam com a concentração de SDS. Além disso, a constante de velocidade da primeira componente (k_{obs1}) aumenta acentuadamente a partir de 1 mM de SDS (razão de $[\text{SDS}]/[\text{Hb}] = 300$), enquanto a constante de velocidade da segunda componente (k_{obs2}) permanece inalterada a partir desta mesma concentração de SDS.

Tabela 4.6 Constantes de velocidade referentes à auto-oxidação da HbGp em função da concentração de SDS em pH 9,0.

[SDS] (mM)	$k_{obs1} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{obs2} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\Delta A_1 \times 10^2$	$\Delta A_2 \times 10^2$
0	7 $\pm$ 0	1.0 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.8	5.0 $\pm$ 0.4
0.25	11.0 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.7
0.5	13 $\pm$ 6	3.0 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.1
0.74	27 $\pm$ 3	6.0 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3
1	30 $\pm$ 9	7.0 $\pm$ 0.9	10 $\pm$ 2	5.00 $\pm$ 0.05
2	179 $\pm$ 50	8 $\pm$ 1	16.0 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.3

Este aumento significativo da constante de velocidade da primeira componente (k_{obs1} , Tabela 4.6), acima de 1mM de SDS, deve estar relacionado à perda da estrutura secundária, em concordância com estudos anteriores sobre a interação da HbGp com surfactantes [Gelamo, 1999].

Neste trabalho de Gelamo e colaboradores [Gelamo, 1999], é concluído, através de dicroísmo circular, que na interação da oxi-hemoglobina com SDS a proteína perde parte de sua estrutura α -hélice com uma relação de SDS/proteína de aproximadamente 185. A elipticidade em 222 nm diminuiu 30% e em 198 nm a diminuição foi de 60% [Gelamo, 1999].

Para a hemoglobina humana, é proposto na literatura que a formação da meta-hemoglobina através da auto-oxidação é inibida pelo SDS, quando este surfactante apresenta uma concentração de, no máximo, 10 vezes a concentração da hemoglobina (concentrações baixas de SDS). Por outro lado,

para concentrações maiores de SDS, a formação da meta seria favorecida [Reza, 2002].

Assim sendo, o SDS em baixas concentrações mudaria a conformação da proteína para um estado mais enovelado. Este estado conformacional mais compacto poderia prevenir a entrada da molécula de água na cavidade hidrofóbica do heme, que é um fenômeno necessário para promover o processo de oxidação através do ataque nucleofílico [Reza, 2002].

Tofani e colaboradores verificam que, para mioglobina de cavalo, somente uma relação SDS/Hemoglobina superior a 400 poderia induzir um maior desenovelamento da proteína e, conseqüentemente, uma maior exposição da cavidade do heme [Tofani, 2004].

A figura 4.20 representa a razão dos hemes que se oxidam nas etapas rápida e lenta. A proporção de hemes que se oxida rapidamente aumenta com a concentração de SDS, caracterizando um comportamento peculiar a sistemas cooperativos. Essa cooperatividade também é observada na auto-oxidação desta hemoglobina em presença de cianeto [Poli, 2005]. Estes resultados estão consistentes com trabalhos que caracterizam estas hemoglobinas como sistemas altamente cooperativos.

Figura 4.19 Gráficos das constantes de velocidade, k_{obs1} e k_{obs2} , obtidas a partir dos ajustes das cinéticas bifásicas, em função da concentração de SDS em pH 9,0. As barras de erro representam os desvios-padrão de três determinações independentes.

Figura 4.20 Gráfico da razão dos fatores pré-exponenciais $\Delta A_{\max 1}$ (processo rápido) e $\Delta A_{\max 2}$ (processo lento) em função da concentração de SDS. As barras de erro representam os desvios-padrão de três determinações independentes.

Vale lembrar que estudos com as albuminas BSA (iniciais de “Bovine Serum Albumin”, isto é, albumina de soro bovino) e HSA (iniciais de “Human Serum Albumin”, isto é, albumina de soro humano) mostraram, através dos valores das constantes de ligação, que a interação do surfactante com estas proteínas seria por contatos hidrofóbicos, enquanto que as cargas do surfactante modulariam as interações somente parcialmente. Desta maneira, as interações hidrofóbicas seriam as principais responsáveis pela ligação [Gelamo, 2000] [Gelamo, 2001].

Considerando que normalmente os sítios hidrofóbicos presentes nas hemoglobinas apresentam baixa acessibilidade aos ligantes devido à sua proximidade com o grupo heme, seria necessário um excesso do surfactante aniônico para promover um aumento na velocidade de auto-oxidação. Além disso, o ponto isoelétrico (pI) nas hemoglobinas extracelulares gigantes é significativamente ácido [Vinogradov, 2004], o que deve influenciar decisivamente na modulação da interação de surfactantes iônicos com estas hemoglobinas.

Mainwaring e colaboradores [Mainwaring, 1986] determinam o ponto isoelétrico (pI) da hemoglobina *Lumbricus terrestris* como 5,5. Isto significa que nos valores de pH utilizados neste trabalho, 7,0 e 9,0, o número de sítios aniônicos seria bastante representativo e, conseqüentemente, a repulsão eletrostática entre as cargas (resíduos aniônicos da proteína e SDS) poderia gerar certo desenovelamento da estrutura polipeptídica. Deste modo, devido tanto à repulsão eletrostática entre os sítios aniônicos das cadeias polipeptídicas como à dissociação da proteína em pH 9,0, a cavidade do heme deveria estar mais exposta ao solvente, favorecendo a auto-oxidação.

Portanto, os valores de pH utilizados neste trabalho são mais altos que o pI da HbGp, o que provavelmente reduz as interações iônicas entre o surfactante aniônico e a hemoglobina. Este meio alcalino deveria favorecer as interações hidrofóbicas entre o SDS e a HbGp, desde que sítios hidrofóbicos estariam mais expostos em função do natural desenovelamento que ocorre em pH 9,0.

Comparando as constantes de velocidade nos valores de pH 7,0 e 9,0 (Tabelas 4.5 e 4.6), é possível sugerir que, em pH 7,0, o fator determinante na velocidade de auto-oxidação é a influência do surfactante, enquanto que, em pH 9,0, a dissociação alcalina da hemoglobina nativa é o fenômeno responsável pelo processo de auto-oxidação.

No trabalho anterior [Poli, 2005], desenvolvido na ausência de surfactante, é estabelecido que na auto-oxidação da HbGp em pH 9,0, a natureza bifásica do processo, que é caracterizado por uma etapa rápida, k_{obs1} , e uma etapa lenta, k_{obs2} , ocorre em função da auto-oxidação dos trímeros e monômeros, respectivamente. Realmente, a intensa dissociação oligomérica que ocorre em pH 9,0, separando as frações de proteína em trímeros e monômeros, é considerada o principal fator responsável pela natureza bifásica da cinética de auto-oxidação.

Por outro lado, no presente trabalho foi identificado uma cinética mono-exponencial em pH 7,0 para as concentrações de SDS até 0,5 mM, sugerindo que, neste pH, a estrutura oligomérica da proteína íntegra está fortemente relacionada ao processo redox da esfera de coordenação do ferro, evidenciando um comportamento cinético uniforme para todos os grupos heme da proteína. Em pH 9,0, a HbGp já se encontra dissociada, independentemente da interação com o surfactante. Isto pode ser constatado comparando-se as constantes de velocidade na ausência de surfactante, que são apresentadas nas tabelas 4.5 e 4.6: Em pH 7,0, a constante de velocidade é $0.27 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,

enquanto que, em pH 9,0, são encontradas duas constantes, $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para o processo rápido e $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para o processo lento.

Analisando as constantes de velocidade do processo rápido (k_{obs1}) nos valores de pH 7,0 e 9,0, para 0,74 mM de SDS (Tabelas 4.5 e 4.6 e figura 4.19), é possível verificar que a constante em pH 7,0 é maior que em pH 9,0. Considerando que em pH 7,0 o nucleófilo é a molécula de água e que em pH 9,0, o ataque nucleofílico é efetuado pela hidroxila, que é um ligante mais efetivo na auto-oxidação do que a água, a constante em pH 9,0 deveria ser maior que em pH 7,0. Entretanto, o efeito oposto é observado, ou seja, a constante de velocidade em pH 7,0 é maior.

De acordo com a literatura, a hidroxila pode aumentar significativamente a auto-oxidação em hemoglobinas [Tsuruga, 1998]. Deste modo, a maior constante observada em pH 7,0, apesar do nucleófilo água ser menos efetivo do que a hidroxila, indicaria fortemente a importante contribuição do SDS no processo de auto-oxidação em meio neutro.

É importante destacar que a área superficial total da hemoglobina nativa em pH 7,0 é menor do que a área superficial total das subunidades oligoméricas dissociadas obtidas em pH 9,0, em função da dissociação alcalina da HbGp íntegra. Assim sendo, é possível inferir que em pH 7,0, em consequência de uma interação eletrostática mais intensa entre o SDS e as cadeias polipeptídicas, devido ao pI ácido da HbGp, a velocidade de auto-oxidação é acentuada nas cadeias mais externas e acessíveis (k_{obs1}).

Entretanto, nas cadeias mais blindadas (k_{obs2}), devido à estrutura oligomérica altamente conservada da HbGp em pH 7,0, o efeito oposto é observado, ou seja, a constante de velocidade em pH 7,0 é menor que em pH 9,0 (figura 4.21) para estas cadeias mais protegidas (k_{obs2}). Este comportamento é justificado pelo fato destas cadeias mais blindadas não apresentarem um significativo contato com o surfactante aniônico, implicando que a dissociação oligomérica em pH 9,0 é o fator decisivo para a auto-oxidação. Portanto, em pH 9,0 o processo lento é mais afetado, principalmente em função da dissociação alcalina e o processo rápido é mais influenciado em pH 7,0, em função do efeito do surfactante aniônico.

Considerando que o surfactante utilizado é aniônico, o número de sítios apropriados à interação do SDS deveria ser reduzido com o aumento do pH acima do valor do pl. Deste modo, a interação eletrostática entre o SDS e a HbGp seria menor em pH 9,0 do que em pH 7,0, o que corrobora a discussão anterior, enfatizando a importância do pl na modulação da interação do surfactante com a hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*.

Figura 4.21 Gráficos das constantes de velocidade k_{obs1} e k_{obs2} nos valores de pH 7,0 e 9,0, obtidas a partir dos ajustes das cinéticas bifásicas em função da concentração de SDS.

4.5 Estudo da auto-oxidação da HbGp na presença do ligante cianeto

Figura 4.22 Mudanças espectrais ocorridas no processo de auto-oxidação da HbGp, $2,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de heme, na presença de 0.023 mol L^{-1} de cianeto em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 9,0, 38°C .

A figura 4.22 mostra as mudanças espectrais devido à auto-oxidação da HbGp na presença de cianeto de potássio. Este processo é caracterizado pelo deslocamento da banda de Soret de 415 nm para 420 nm, e pela mudança das bandas α e β de 575 nm e 540 nm para uma única banda larga em 540 nm. O espectro final corresponde ao complexo cianometa-hemoglobina [Agustinho, 1997].

Para cada concentração de cianeto, a auto-oxidação do grupo heme é acompanhada através da variação da absorbância na banda de Soret, 415 nm,

em função do tempo. Na presença de cianeto, a espécie oxi-hemoglobina em pH 9,0 mostra uma curva de auto-oxidação como uma composição de duas cinéticas de primeira ordem, da mesma forma que na ausência deste ânion, apresentando constantes de velocidade observadas k_{obs1} e k_{obs2} , de acordo com a equação 3.1 (seção 3.2.2.1).

Tabela 4.7 Constantes de velocidade para a oxidação da HbGp induzida pelo cianeto. k'_{CN1} é obtida utilizando os dados para as concentrações de cianeto abaixo de 0,010 M e k''_{CN1} para as concentrações maiores que 0,010 M.

Hemoglobina <i>Glossoscolex paulistus</i>		k_{CN} ($s^{-1}mol^{-1}.L$)
Íntegra	Processo rápido	k'_{CN1} 0.11 $\pm$ 0.02
		k''_{CN1} 0.76 $\pm$ 0.04
	Processo Lento	k_{CN2} 0.033 $\pm$ 0.002
	Monômero <i>d</i>	0.041 $\pm$ 0.002

As constantes de velocidade observadas, obtidas em função da concentração de cianeto, permitem a determinação da constante de velocidade de segunda ordem k_{CN} , conforme está indicado na figura 4.23 (tabela 4.7).

De acordo com a Figura 4.23, nota-se claramente que o processo rápido k_{obs1} mostra duas constantes de velocidade diferentes. Para concentrações abaixo de 0,010 mol L⁻¹ a constante é $k'_{CN1}=0,11 \pm 0,02$ s⁻¹M⁻¹ e para concentrações acima de 0,12 mol L⁻¹ a constante aumenta para $k''_{CN1}=0,76 \pm 0,04$ s⁻¹M⁻¹. Importante acrescentar que k_{CN2} se mantém inalterada para todas

as concentrações, sendo igual a $0,033 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (tabela 4.7). Estes resultados estão relacionados com a análise da razão dos fatores pré-exponenciais $\Delta A_{\text{máx1}}/\Delta A_{\text{máx2}}$ (equação 3.1). Esta razão é constante e próxima de 1, até 0,008 M de cianeto, e aumenta para 3 com uma concentração de 0,023 M de cianeto (figura 4.24).

Figura 4.23 Constantes de velocidade observadas, k_{obs1} e k_{obs2} , em função da concentração de cianeto. A inclinação do gráfico corresponde a k'_{CN1} , k''_{CN1} e k_{CN2} , que são as constantes de velocidade de oxidação induzida pelo cianeto. Condições: $2,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ de HbGp, tampão Tris-HCl 20 mM, pH 9,0 a 38°C .

Figura 4.24 Gráfico da razão dos fatores pré-exponenciais $\Delta A_{\max 1}$ (processo rápido) e $\Delta A_{\max 2}$ (processo lento) em função da concentração de cianeto. As barras de erro são determinadas a partir de três experimentos independentes.

Zhu e colaboradores [Zhu, 1996] observam que a presença do ligante cianeto causa reassociação das subunidades da hemoglobina de *Lumbricus terrestris*. Neste contexto, visando a uma maior compreensão do arranjo oligomérico da HbGp durante a cinética de auto-oxidação na presença de cianeto realizou-se medidas de espalhamento de luz a 90°. De fato, esta técnica instrumental vem sendo amplamente empregada em estudos enfocando o estado de agregação e os fenômenos de dissociação protéica. Esta abordagem vem fornecendo muitas informações relevantes a respeito das propriedades oligoméricas da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*. Realmente, Silva e colaboradores [Silva, 1989] utilizam esta técnica para monitorar a associação das subunidades da HbGp sob pressão hidrostática

assim como Imasato e colaboradores [Imasato, 1995], empregam este recurso para verificar a dissociação de HbGp em função do pH.

A figura 4.25 apresenta a intensidade obtida à 90° para ambos os monocromadores em 310 nm. Duas concentrações de cianeto são selecionadas para testar o espalhamento de luz ressonante, 0,006 M e 0,016 M. A escolha destas concentrações se deve ao fato de que ambas estão relacionadas com a mudança na inclinação observada para k_{obs1} , que é referente ao processo rápido. Os dados experimentais para as duas concentrações apresentam comportamentos similares (figura 4.25), sendo que após a adição de cianeto, a intensidade diminui para um valor que se mantém constante até o final.

Desta forma, a diminuição da intensidade de espalhamento poderia estar relacionada a um aumento na dissociação da proteína promovido pelo ligante cianeto. Portanto, a constatação de que após aproximadamente cinco minutos a intensidade de espalhamento se mantém constante, indica fortemente que a partícula que produz o espalhamento permanece com o mesmo tamanho. Este resultado experimental é uma evidência de que as subunidades da hemoglobina não estão se reassociando durante a auto-oxidação na presença de cianeto (figura 4.25).

Figura 4.25 Espalhamento de luz da hemoglobina íntegra de *G. paulistus* medido a 90° de luz incidente ($\lambda = 310$ nm) durante o processo de auto-oxidação ($2,6 \times 10^{-6}$ M baseado em heme) na presença de 0,006 M e 0,016 M de cianeto, tampão Tris-HCl 20 mM, pH 9,0.

A auto-oxidação do monômero *d* na presença de cianeto é analisada (figura 4.26) em função da concentração deste ligante. Para cada concentração de cianeto, a auto-oxidação do grupo heme é acompanhada através da variação da absorbância em 415 nm em função do tempo. O ajuste da cinética é mono-exponencial e, a partir do gráfico da figura 4.26, a constante de velocidade de segunda ordem é determinada ($0,041 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$).

Figura 4.26 Gráfico das constantes de velocidade observadas, k_{obs2} da hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* e do monômero d em função da concentração de cianeto. As barras de erro são determinadas a partir de três experimentos independentes.

De acordo com a figura 4.26, é possível verificar que as constantes de velocidade observadas referentes tanto ao processo lento da hemoglobina íntegra como em relação ao monômero d estão significativamente correlacionadas. Esta constatação indica que na auto-oxidação da hemoglobina íntegra induzida pelo cianeto, o monômero d é o responsável pelo processo lento assim como o trímero abc é responsável pelo processo rápido. Portanto, na figura 4.23, a mudança na inclinação observada para a etapa rápida ocorreria em função de um processo cooperativo apresentado pelo trímero abc .

Da mesma maneira, o aumento na razão dos fatores pré-exponenciais (figura 4.24) também seria causado pela cooperatividade atribuída ao trímero *abc*.

No presente trabalho, discussão anterior descreve o fato de que a cadeia *c* do trímero *abc* de *Lumbricus terrestris* apresenta uma leucina na posição B10 semelhantemente à hemoglobina humana. Utilizando, mais uma vez, o trímero da *Lumbricus terrestris* como modelo para o trímero da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, é possível atribuir à cadeia *c*, a baixa estabilidade do trímero da HbGp no processo de auto-oxidação. Portanto, considerando que o trímero apresenta ligações covalentes e um resíduo de leucina na posição B10 de sua cadeia *c*, esta cadeia poderia ser a primeira a se oxidar. Desta forma, a efeito das mudanças causadas pela oxidação da cadeia *c* se propagaria para as demais cadeias do trímero, facilitando a auto-oxidação pelo efeito cooperativo.

O efeito cooperativo, usualmente observado em hemoglobinas tetraméricas que ligam oxigênio, é também detectado no trímero de *Lumbricus terrestris* [Fushitani, 1991]. A ligação do primeiro íon cianeto ao primeiro heme do trímero *abc*, facilitaria a ligação do cianeto aos outros hemes localizados nas outras cadeias, ou seja, a ligação do primeiro cianeto se propagaria para as outras cadeias através de mudanças conformacionais na cadeia primeiramente oxidada, deixando as demais cadeias mais susceptíveis à auto-oxidação. Esta cooperatividade pode estar justificada pelo fato de que as cadeias *a*, *b* e *c* são unidas por ligações dissulfeto, que permitiriam a propagação das alterações conformacionais de uma para outra cadeia. Realmente, segundo Ackers e

colaboradores [Ackers, 1992], a interação entre as subunidades seria fundamental para a ocorrência do fenômeno cooperativo.

5. CONCLUSÕES

A velocidade de auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* apresenta uma forte dependência do pH. Essa dependência do pH da solução ocorre devido a fatores diferenciados como o estado de oligomerização da hemoglobina e os diferentes ligantes presentes no solvente aquoso, que são os nucleófilos água e hidroxila.

Portanto, o presente trabalho demonstra que o comportamento da curva cinética é dependente do pH, apresentando-se monofásico ou bifásico dependendo do estado de oligomerização da proteína. Assim sendo, nos valores de pH que geram a dissociação da proteína íntegra em frações protéicas menores, constituídas por oligômeros e subunidades monoméricas isoladas, a curva cinética se apresenta bifásica e nos valores de pH que evidenciam a proteína em seu estado íntegro é constatado um comportamento cinético mono-exponencial. Desta maneira, a organização oligomérica das subunidades pode ser considerada uma influência significativa no processo de auto-oxidação.

Em meio alcalino, a auto-oxidação da hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* na presença do ligante hidroxila apresenta um comportamento complexo, descrito pela combinação de duas cinéticas de primeira-ordem. O processo mais lento ocorre devido à auto-oxidação do monômero *d* e o processo mais rápido pode ser atribuído ao trímero *abc*, ou

seja, o monômero *d* apresenta uma maior estabilidade contra a auto-oxidação em relação ao trímero *abc*.

Em pH 7,0, o comportamento cinético se apresenta mono-exponencial, indicando uma certa semelhança entre os ambientes relativos aos bolsões hidrofóbicos dos respectivos hemes, além de uma estrutura oligomérica altamente conservada, ou seja, a hemoglobina se apresenta em seu estado nativo. Logo, a alta estabilidade contra a auto-oxidação observada em pH 7,0 ocorre em função de sua estrutura oligomérica compacta proteger o centro metálico do ataque nucleofílico da água.

Neste contexto, é importante registrar que o processo de auto-oxidação da HbGp é controlado pelo nível de exposição da ligação entre o centro ferroso e o ligante oxigênio aos nucleófilos do solvente. Esta correlação explica a expressiva dependência entre o pH e os valores das constantes de auto-oxidação constatados no presente trabalho.

Em meio ácido, a hemoglobina apresenta a auto-oxidação catalisada por próton, processo em que a histidina distal desempenha uma função relevante, sendo responsável pelo mecanismo de substituição de prótons, e, por consequência, aumentando a velocidade do processo de auto-oxidação.

A formulação cinética para a reação de auto-oxidação da HbGp é baseada no mecanismo S_N2 , ou seja, um mecanismo associativo, que produz um intermediário heptacoordenado através do deslocamento nucleofílico do ânion superóxido O_2^- do centro ferroso (FeO_2). Esse deslocamento nucleofílico

é efetuado pelo ligante proveniente do solvente, que pode ser a água ou a hidroxila dependendo das condições do meio.

A auto-oxidação do monômero *d* isolado da HbGp também apresenta uma forte dependência com o pH da solução, aumentando a velocidade em meio ácido devido à catálise por próton.

A hemoglobina íntegra apresenta uma maior estabilidade frente à cadeia monomérica *d* separada. De qualquer maneira, é importante registrar que o contato entre as moléculas do solvente e o centro de coordenação é crucial para a velocidade de auto-oxidação, indicando que o caráter hidrofóbico do bolsão do heme nativo é um importante fator para a estabilidade redox da hemoglobina íntegra. Assim, o monômero *d* quando isolado da hemoglobina íntegra, apresenta as cavidades hidrofóbicas do heme suficientemente expostas para permitir o ataque da molécula de água ao centro ferroso, favorecendo a auto-oxidação.

Por outro lado, um aspecto relevante do presente trabalho aborda a interação entre o surfactante SDS e a hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*. A interação entre o surfactante SDS e HbGp fornece resultados que confirmam a importância da oligomerização da proteína no processo de auto-oxidação. Realmente, a auto-oxidação da HbGp na presença de SDS permite a constatação de que dois fatores distintos determinam de forma decisiva a reação. Estes fatores são a organização oligomérica da hemoglobina íntegra propriamente dita e a força da interação entre o SDS e a cadeia polipeptídica desta proteína, que depende do número de sítios

disponíveis. Vale lembrar que os sítios disponíveis na hemoglobina, especialmente os sítios iônicos, são modulados pelo pH da solução, o que explica a representativa influência da modificação no valor de pH nos tipos de interação observados entre a hemoglobina e o surfactante em questão.

Comparando-se a interação do SDS com a HbGp nos valores de pH 7,0 e 9,0, é possível afirmar que, em pH 7,0, apesar da proteína estar mais compacta, apresentando o centro metálico mais protegido, o número de sítios catiônicos presentes na hemoglobina para a interação com o surfactante aniônico SDS é maior do que em pH 9,0 devido ao fato de que o ponto isoelétrico desta classe de hemoglobina é ácido.

Assim sendo, em pH 9,0, a dissociação da hemoglobina deveria favorecer significativamente a auto-oxidação. Por outro lado, em pH 9,0, a proteína apresenta menos sítios para a interação com o SDS do que em pH 7,0. Desta maneira, a interação com o SDS é menos efetiva em pH 9,0 e a velocidade de auto-oxidação neste pH deve ser mais influenciada pela dissociação alcalina.

Portanto, em pH 7,0 o surfactante efetivamente influencia a velocidade de auto-oxidação, enquanto que em pH 9,0 a dissociação, que ocorre independentemente do surfactante, constitui-se no fator determinante do processo oxidativo.

A cinética de auto-oxidação da hemoglobina íntegra de *Glossoscolex paulistus* na presença do cianeto apresenta um comportamento bifásico devido à auto-oxidação de trímeros e monômeros gerados no processo de dissociação

desta proteína. Neste processo, é possível inferir que o ligante cianeto intensifica significativamente a velocidade de reação. A etapa rápida pode ser atribuída ao trímero *abc* e a etapa lenta é um processo de oxidação do monômero *d*. Para o monômero *d*, observa-se que a cinética se apresenta mono-exponencial, além de constatar-se uma influência efetiva do ligante cianeto no aumento da velocidade de auto-oxidação em questão. É possível observar que a ligação do cianeto ao centro férrico da hemoglobina ocorre de maneira cooperativa. De fato, através das constantes de velocidade obtidas para a auto-oxidação da hemoglobina íntegra com o cianeto observa-se uma cooperatividade no processo rápido da hemoglobina de *G. paulistus*, ou seja, uma cooperatividade na auto-oxidação dos trímeros *abc*.

6. BIBLIOGRAFIA

- ACKERS, G. K.; DOYLE, M. L.; MYERS, D.; DAUGHERTY, M. A. Molecular Code for Cooperativity in Hemoglobin. **Science**, v. 255, p. 54-63, 1992.
- AJLOO, D.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAKIMELAHI, G. H.; SABOURY, A.A.; GHARIBI, H. The effect of dodecyl trimethylammonium bromide on the formation of methemoglobins and hemichrome. **Colloids Surf., B**, v. 26, p. 185-196, 2002.
- ANTONINI, E.; ROSSI-BERNARD, L.; CHIANCONE, E. Methods in enzymology. **Academic Press**, 1981.
- AGUSTINHO, S.C.M. Estudos espectroscópicos da meta-hemoglobina e globina de *Glossoscolex paulistus*. São Carlos, 1995. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo.
- AGUSTINHO, S.C.M.; TINTO, M.H.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T.T.; PERUSSI, J.R.; TABAK, M. Spectroscopy studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1298, 148-158, 1996.
- AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. IMASATO, H. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in met form obtained by Sephadex gel filtration, **Comp. Biochem. Physiol.** 118A, 171-181, 1997.
- BACHOVCHIN, W. W. ¹⁵N NMR Spectroscopy of Hydrogen-Bonding Interactions in the Active Site of Serine Proteases: Evidence for a Moving Histidine Mechanism. **Biochemistry** 25, 7751-7759, 1986.
- BAILLY, X.; VINOGRADOV, S. The sulfide binding function of annelid hemoglobins: relic of na old biosystem? **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 142-150, 2005.
- BONAFE, CFS; VILLASBOAS, M.; SUAREZ, M.C.; SILVA, J.L.; Reassembly of a Large Multisubunit protein promoted by nonprotein factors – Effects of calcium and glycerol on the association of the extracellular hemoglobin, **J. Biol. Chem.**, 266, 13210-13216, 1991.
- BRANTLEY JR., R. E.; SMERDON, S. J.; WILKISON, A. J.; SINGLETON, E. W.; OLSON, J. S. The mechanism of autoxidation of myoglobin, **J. Biol. Chem.**, 268,6995-7010, 1993.
- CABRAL, C. B. Determinação da estrutura primária e modelagem molecular por homologia estrutural da estrutura terciária da cadeia *d* da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*. São Carlos, 1999. 100p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- CABRAL, C. B.; IMSATO, H.; ROSA, J.C.; LAURE, H. J.; SILVA, C. H. T. P; TABAK, M.; GARRATT, R. C.; GREENE, L. J. Fluorescence properties of tryptophan residues in the monomeric d-chain of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin: an interpretation based on a comparative molecular model, **Biophys. Chem.**, 97, 139-157, 2002.
- CARVER, T. E.; BRANTLEY, R.E.; SINGLETON, E. W.; ARDUINI, R. M; QUILLIN, M. L; PHILLIPS, G. N.; OLSON, J. S. A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O₂ affinity and low autoxidation rate, **J. Biol. Chem.** 267, 14443-14450, 1992.
- COSTA, M. C. P.; BONAFÉ, C. F. S; MEIRELES, N. C.; GALEMBECK, F. Sedimentation Coefficient and Minimum Molecula-Weight of Extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* *Oligochaeta*. **Braz. J. Med. Res.** V.21, 115-118, 1988.
- DANIEL, E.; LUSTIG, A.; DAVID, M.M.; TSFADIA Y. On the molecular mass of *Lumbricus erythrocrurin*, **Micron**, 35, 131-132, 2004.

- DAS, T.K.; MAZUMDAR, S.; MITRA, S. Characterization of a partially unfolded structure of cytochrome *c* induced by sodium dodecyl sulphate and the kinetics of its refolding. **Eur. J. Biochem.**, 254, 662-670, 1998.
- DASGUPTA, S. ; ROUSSEAU, D. L. ; ANNI, H. ; YONETANI, T. Structural Characterization of Cytochrome *c* Peroxidase by Resonance Raman Scattering. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 1, p. 654-662, 1989.
- DICKERSON, R.E. AND GEYS, I. Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. **The Benjamin Cumings Publishing Co.**, 1983.
- DI IORIO, E. E.; WINTERHALTER, K. H.; MANSOURI, A.; BLUMBERG, W. E.; PEISACH, J. Studies on the autoxidation of hemoglobin Zurich (beta-63 E7 Arg), **Eur. J. Biochem.**, 145, 549-554, 1984.
- DORMAN, S. C. ; HARRINGTON, J. P.; MARTIN, M. S.; JOHNSON, T. V. Determination of the formal reduction potential of *Lumbricus terrestris* hemoglobin using thin layer spectroelectrochemistry. **J. Inorg. Biochem.**, v. 98, p. 185-188, 2004.
- FERNANDEZ, S. P. Isolamento do trímero e suas subunidades *a*, *b*, *c* da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* e caracterização por análise de aminoácidos. São Carlos, 2001 77p. Dissertação de mestrado Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*, oxygenation properties of isolated chains, trimer and reassociated product, **J. Biol. Chem.**, 266, 10275-10281, 1991.
- GELAMO, E.L. Estudos espectroscópicos das interações da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* com detergentes iônicos. São Carlos, 1999. 118p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- GELAMO, E. L.; TABAK, M. Spectroscopy studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. **Spectrochim. Acta, part A**, v. 56, p.2255-2271, 2000.
- GELAMO, E. L.; SILVA, C.H.T.P.; IMASATO, H.; TABAK, M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 36515, p.1-16, 2001.
- GELAMO, E. L. Estudos espectroscópicos das interações da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* e albuminas humana (HSA) e bovina (BSA) com surfactantes iônicos. São Carlos, 2003 144p Tese de Doutorado Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- GELAMO, E.; ITRI, R.; TABAK, M. Small Angle X-ray Scattering (SAXS) Study of the Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, **J. Biol. Chem.**, 279, 33298-33305, 2004.
- GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALES, M.A.; RYBAK-AKIMOVA, E. V.; BUCHALOVA, M.; BUSCH, D. H. Mechanisms of autoxidation of the oxygen sensor F1SL and *Aplysia* Myoglobin: Implications for oxygen-binding heme proteins. **Biochemistry**, 37, 10188-10194, 1998.
- GREEN, B.N.; VINOGRADOV, S.N. An Electrospray Ionization Mass Spectrometric Study of the Subunit Structure of the Giant Hemoglobin from the Leech *Nephelopsis obscura*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.15, p.22-27, 2004.
- HAAS, F.; KUCHUMOV, A.; TAVEAU, J.C.; BOISSET, N.; VINOGRADOV, S.N.; LAMY, J.N. Three-dimensional reconstruction of native and reassembled *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains, **Biochemistry**, 36, 7330-7338, 1997.
- HARRINGTON, J. P. Multimeric *Lumbricus* hemoglobin stabilization by alkali and alkaline earth cations. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109A, 799-803, 1994.

- HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 415, 29-79, 1975.
- HIRSH, R. E.; JELICKS, L. A.; WITTENBERG, B.; KAUL, D. K.; SHEAR, H. L.; HARRINGTON, J. P. A first evaluation of the natural high molecular weight polymeric *Lumbricus terrestris* hemoglobin as an oxygen carrier. **Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 429-444, 1997.
- IKEDA-SAITO, M. ; HORI, H. ; ANDERSSON, L. A. , PRINCE, R. C. ; PICKERING, I. J. ; GEORGE, G. N. ; SANDERS II, C. R. ; LUTZ, R. S. ; McKELVEY, E. J. , MATTERA, R. Coordination Structure of the Ferric Heme Iron in Engineered Distal Histidine: Myoglobin Mutants. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 32, p. 22843-22852, 1992.
- IMASATO, H.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration, **Comp. Biochem. Physiol.** 112B, 217-226, 1995.
- JEONG, S. T.; HO, N. T.; HENDRICH, M. P.; HO, C. Recombinant hemoglobin(alpha 29 leucine → phenylalanine, alpha 96valine → tryptophan, beta 108asparagine → lysine) exhibits low oxygen affinity and high cooperativity combined with resistance to autoxidation, **Biochemistry**, 38, 13433-13442, 1999.
- JONES, M.N.; CHAPMAN, D. Micelles, monolayers and biomembranes. New York, **John Wiley & Sons**, 1995.
- KADIR, F.H.A., WILSON, M.T.; AL-BASSEET, J.; THOMSON, A.J. Studies of the pH Induced Transitions in *Arenicola marina* Deoxyerythrocrucorin Derivatives. **J. Inorg. Biochem.**, v.42, p.247-255, 1991.
- KALYANASUNDARAM, K. Photochemistry in Microheterogeneous Systems. **Academic Press**, New York, 1987.
- KAMIMURA, S.; MATSUOKA, A.; IMAI, K.; SHIKAMA, K. The swinging movement of the distal histidine residue and autoxidation reaction for midge larval hemoglobins, **Eur. J. Biochem.**, 270, 1424-1433, 2003.
- KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S.N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin? **Biochim. Biophys. Acta**, v.1297, p.115-118, 1996.
- KUCHUMOV, A. R.; TAVEAU, J. C.; LAMY, J. N.; WALL, J. S.; WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. The role of Linkers in the reassembly of the 3. 6 MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. **J. Mol. Biol.**, v. 289, p. 1361-1374, 1998.
- LAMY, J. N.; GREEN, B.; TOULMOND, A.; WALLS, J.; WEBER, R ; VINOGRADOV, S. Giant hexagonal bilayer hemoglobins. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 3113-3124, 1996.
- LEVY, A. ; KUPPUSAMY, P. ; RIFKIND, J. M. Multiple Heme Pocket Subconformations of Methemoglobin Associated with Distal Histidine Interactions. **Biochemistry**, v. 29, p. 9311-9316, 1990.
- LEVES, A.L.P. Estudo da auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*: Efeito do cianeto, azida e imidazol em pH 9,0. São Carlos, 2001. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MADURA, J. D.; SALTER, E. A.; WIERZBICKI, A.; DALAL, P.; HARRINGTON, J. P. Homology models for the tetrameric and dodecameric complexes of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **J. Mol. Struc. (Theochem)**, v. 592, p. 173-181, 2002.
- MAINWARING, M.G.; LUGO, S.D.; FINGAL, R.A.; KAPP, O.H.; VINOGRADOV, S.N. The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris* at acid pH and its

reassociation at neutral pH- A new model of its quaternary structure, **J. Biol. Chem.**, 261, 10899-10908, 1986.

MEIRELES, N. C.; DEOLIVEIRA, B.; DEPAULA, E.; MARANGONI, S.; MARQUES, M.R.F. Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (*oligochaeta, glossoscolecidade*): presence of disulfide bonds and their relation to ligand properties. **Comp. Biochem. Physiol.** 82B, (1), 203-205, 1985.

MOREIRA, L. M.; RIBELATTO, J. C.; IMASATO, H. Conformações distorcida e planar do anel porfirínico em complexos e hemoproteínas: propriedades físico-químicas e implicações espectroscópicas. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 958-963, 2004.

MOREIRA, L. M. Espécies formadas no centro férrico da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em função do pH: troca de ligantes e desenovelamento polipeptídico. São Carlos, 2005 191p. Tese de doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

MORIKIS, D. ; CHAMPION, P. M. ; SPRINGER, B. A. ; SLIGAR, S. G. Resonance Raman Investigations of Site-Directed Mutants of Myoglobin: Effects of Distal Histidine Replacement. **Biochemistry**, v. 28, n. 11, p. 4791-4800, 1989.

NAGATOMO, S.; JIN, Y.; NAGAI, M.; HORI, H.; KITAGAWA, T. Changes in the abnormal α -subunit of Hb M Boston: resonance Raman, EPR and CD study. **Biophys. Chem.** v. 98, p. 217-232, 2002.

OELLERICH, S.; WACKERBARTH, H.; HILDEBRANT, P. Conformational equilibria and dynamics of cytochrome c induced by binding of sodium dodecyl sulfate monomers and micelles. **Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.**, 32, 599-613, 2003.

OTZEN, D.E.; OLIVEBERG, M.; BURST-PHASE Expansion of Native Protein Prior to Global Unfolding in SDS. **J. Mol. Biol.**, 315, 1231-1240, 2002.

PALANIAPPAN, V.; BOCIAN, D. F. Acid-Induced Transformations of Myoglobin. Characterization of a New Equilibrium Heme-Pocket Intermediate, **Biochemistry**, 33, 14264-14274, 1994.

PERUSSI, J. R. ; IMASATO, H. ; TABAK, M. ; MEIRELLES, N. C. Fluorescence Study of the Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Physiol. Chem. Phys. Med. NMR**, v. 22, n. 3, p. 159-168, 1990.

POLI, A.L.; MOREIRA, L. M.; HIDALGO, A. A.; IMASATO, H. Autoxidation studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* at pH 9: cyanide and hydroxyl effect, **Biophys. Chem.** 114, 253-260, 2005.

POULSEN, K. R. , SNABE, T., PETERSEN, E. I., FOJAN, P., NEVES-PETERSEN, WIMMER, M. T., R., PETERSEN, S. B. Quantization of pH: Evidence for Acidic Activity of Triglyceride Lipases. **Biochemistry**, 44, 11574-11580, 2005.

REZA, D. M.; AKBAR, M. A.; PARVIZ, G.; OLAH, H.; SHAHROKH, S. Inhibition of human hemoglobin autoxidation by sodium n-dodecyl sulphate. **Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 364-370, 2002.

RIBELATTO, J. C.; POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; IMASATO, H. Hemes férricos pentacoordenados e hexacoordenados dos monômeros *d* nativo e reconstituído da hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus*: estudos espectroscópicos em meio ácido. **Quím. Nova**, v. 28, n. 5, p. 829-833, 2005.

RIBELATTO, J. C.; POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; IMASATO, H. Estudo espectroscópico do equilíbrio entre espécies hexacoordenada e pentacoordenada dos monômero *d* nativo e reconstituído da hemoglobina extracelular gigante de *glossoscolex paulistus* em meio alcalino. **Quím. Nova**, no prelo.

- RIGGS, A. F. Self-Association, Cooperativity and Supercooperativity of Oxygen Binding by Hemoglobins. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1073-1084, 1998.
- RIGHI, G. Topography of Circulatory System of *Glossoscolex paulistus* Michaelsen 1926 (Oligochaeta Glossoscolecidae). **Monitore Zoology Italian**, v. 6, p. 19-36, 1972.
- ROSSI, J.-P.; NUUTINEM, V. The effect of sampling unit size on the perception of the spatial pattern of earthworm (*Lumbricus terrestris*) middens. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 189-196, 2004.
- ROYER, W. E.; STRAND, K.; VAN HELL, M.; HENDRICKSON, W.A. Structural Hierarchy in Erythrocrurin, the Giant Respiratory Assemblage of Annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97, 7107-7111, 2000.
- ROYER, W. E.; KNAPP, J.E.; STRAND, K.; HEASLET, H.A. Cooperative hemoglobins : conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends in Biochem. Sci.**, 26, 5, 297-304, 2001.
- SAGE, J.T.; MORIKIS, D.; CHAMPION, P.M. Spectroscopic Studies of Myoglobin at Low pH: Heme Structure and Ligation, **Biochemistry**, 30, 1227-1237, 1991.
- SATOH, Y. AND SHIKAMA, K. Autoxidation of oxymyoglobin: A nucleophilic displacement mechanism. **J. Biol. Chem.**, 256, 10272-10275, 1981.
- SHIKAMA, K.; MATSUOKA, A. *Aplysia* Oxymyoglobin with an Unusual Stability Property: Kinetic Analysis of the pH Dependence, **Biochemistry**, 25, 3898-3903, 1986.
- SHIKAMA, K. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Myoglobin and Hemoglobin: A Venerable Puzzle. **Chem. Rev.**, v.98, p.1357-1373, 1998.
- SHIKAMA, K.; MATSUOKA, A. Human haemoglobin A new paradigm for oxygen binding involving two types of $\alpha\beta$ contacts. **Eur. J. Biochem.**, 270, 4041-4051, 2003.
- SIGMAN, J. A. ; POND, A. E. ; DAWSON, J. H. ; LU, Y. Engineering Cytochrome c Peroxidase into Cytochrome P450: A Proximal Effect on Heme-Thiolate Ligation. **Biochemistry**, v. 38, p. 11122-11129, 1999.
- SILVA, J. L.; VILLAS-BOAS, M.; BONAFE, C. F. S.; MEIRELLES, N. C. Anomalous Pressure Dissociation of Large Protein Aggregates. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 27, p. 15863-15868, 1989.
- SPRINGER, B. A.; EGEGERG, K. D.; SLIGAR, S. G.; ROHLFS, R. J.; MATHEWS, A. J.; OLSON, J. S. Discrimination between Oxygen and Carbon Monoxide and Inhibition of Autoxidation by Myoglobin. **J. Biol. Chem.**, 264, 3057-3060, 1989.
- STRAND, K.; KNAPP, J.E.; BHAYRBHATIA, B.; ROYER JR., W.E. Crystal Structure of the Hemoglobin Dodecamer from *Lumbricus* Erythrocrurin: Allosteric Core of Giant Annelid Respiratory Complexes, **J. Mol. Biol.** 344, 119-134, 2004.
- STRYER, LUBERT. Biochemistry. **W.H. Freeman and Company**, 1988.
- SUZUKI, T.; KOBOYASHI, M.; FURUKOHRI, T.; GOTOH, T. Autoxidation of extracellular oxyhaemoglobin from the *Polychaete Perinereis Brevicirris* (Grube), **Comp. Biochem. Physiol.** 75B, 17-21, 1983.
- SUZUKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, M.; MATSUOKA, A.; SHIKAMA, K. Dual Nature of the Distal Histidine Residue in the Autoxidation Reaction of Myoglobin and Hemoglobin- Comparison of the H64 Mutants. **Eur. J. Biochem**, 267, 6166-6174, 2000.
- SZABO, A. The enzyme catalysis process. **Plenum Public Corp.**, 1989
- TADA, T.; WATANABE, Y.; MATSUOKA, A.; IKEDA-SAITO, M.; IMAI, K.; NI-HEI, Y.; SHIKAMA, K. African elephant myoglobin with an unusual autoxidation behavior: comparison with the H64Q mutant of sperm whale myoglobin, **Biochim. Biophys. Acta**, 1387, 165-176, 1998.

TANFORD, C. The Hidrofobic Effect – Formation of Micelles and Biological Membranes. **John Wiley & Sons**, New York, 1973.

TINTO, M. H. Caracterização das subunidades da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*. São Carlos, 1994 82p Dissertação de mestrado Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

TOFANI, L.; FEIS, A.; SNOKE, R.E.; BERTI, D.; BAGLIONI, P. SMULEVICH, G. Spectroscopic and Interfacial Properties of Myoglobin/Surfactant, **Biophys. J.**, 87, 1186-1195, 2004.

TSAL, C.; FANG, T.; HO, N. T.; HO, C. Novel Recombinant Hemoglobin, rHb (β N108Q), with Low Oxygen Affinity, High Cooperativity, and Stability against Autoxidation, **Biochemistry** 39 (2000) 13719-13729.

TRENT III, J. T. ; HVITVED, A. N. ; HARGROVE, M. S. A Model for Ligand Binding to Hexacoordinate Hemoglobins. **Biochemistry**, v. 40, n. 20, p. 6155-6163, p. 2001.

TSURUGA, M.; SHIKAMA, K. Biphasic nature in the autoxidation reaction of human oxyhemoglobin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1337, 96-104, 1997.

TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; HACHIMORI, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin: Tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the β chain. **J. Biol. Chem.**, 273, 8607-8615, 1998.

TURRO, N.J.; LEI, X. G.; ANANTHAPADMANABHAN, K.P; ARONSON, M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactants interactions – The BSA/SDS system. **Langmuir**, v.11, p.2525-2533, 1995

VINOGRADOV, S.N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution, **Micron**, 35, 127-129, 2004.

VITAGLIANO, L.; BONOMI, G.; RICCIO, A.; PRISCO, G. D.; SMULEVICH, G.; MAZZARELLA, L. The Oxidation Process of Antarctic Fish Hemoglobins. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 1651-1659, 2004.

WALLACE, W. J.; MAXWELL, J. C.; CAUGHEY, W. S. The mechanisms of hemoglobin autoxidation Evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 57, 1104-1110, 1974.

WALLACE, W. J.; HOUTCHENS, R. A.; MAXWELL, J. C.; CAUGHEY, W. S. Mechanism of autoxidation for hemoglobin and myoglobins – promotion of superoxide production by protons and anions, **J. Biol. Chem.**, 257, 4966-4977, 1982.

Yamaki, M.; Kubota, K.; Matsubara, K.; Ebina, S.; Gotoh, T. Carbohydrate Gluing Is a Strategy for Supramolecular Clamping of Submultiples in Annelid Extracellular Multi-subunit Hemoglobin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.355, n.1, p.119-123, 1998.

YASUDA, J.; ICHIKAWA, T.; TSURUGA, M.; MATSUOKA, A.; SUGAWARA, Y.; SHIKAMA, K. The $\alpha 1\beta 1$ contact of human hemoglobin plays a key role in stabilizing the bound dioxygen. Further evidence from the iron valency hybrids. **Eur. J. Biochem.**, 269, 202-211, 2002.

ZAL, F.; GREEN, B.N.; MARTINEAU, P.; LALLIER, F.H.; TOULMOND, A.; VINOGRADOV, S.N.; CHILDRESS, J.J. Polypeptide chain composition diversity of hexagonal-bilayer haemoglobins within a single family of annelids, the Alvinellidae, **Eur. J. Biochem.**, 267, 5227-5236, 2000.

ZHANG, L.; LEVY, A.; RIFKIND, J. M. Autoxidation of hemoglobin enhanced by dissociation into dimers. **J. Biol. Chem.**, 266, 24698-24701, 1991.

ZHAO, X.; VYAS, K.; NGUYEN, B. D.; RAJARATHNAM, K.; LA MAR, G. N.; LI, T.; PHILLIPS JR., G. N.; EICH, R. F.; OLSON, J. S.; LING, J.; BOCIAN, D. F. A double mutant of sperm whale myoglobin mimics the structure and function of elephant myoglobin, **J. Biol. Chem.** 270, 20763-20774, 1995.

ZHU, H.; OWNBY, D. W.; RIGGS, C. K.; NOLASCO, N. J.; STOOPS, J. K.; RIGGS, A. F. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron, **J. Biol. Chem.** 271, 30007-30021, 1996.

ZHU, Y.; CHENG, G.; DONG, S. Structural electrochemical study of hemoglobin by in situ circular dichroism thin layer spectroelectrochemistry. **Biophys. Chem.** v. 97, p. 129-138, 2002.