FRANCISCO ADRIANO DE OLIVEIRA CARVALHO

**Estudo da estabilidade oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de
Glossoscolex paulistus (HbGp) na presença de agentes caotrópicos e
caracterização das subunidades.**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos 2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Carvalho, Francisco Adriano de Oliveira

Estudo da estabilidade oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) na presença de agentes caotrópicos e caracterização das subunidades. / Francisco Adriano de Oliveira Carvalho. -- São Carlos, 2013.

131 p.

Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2013.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

1. *Glossoscolex paulistus*. 2. Ureia. 3. Ultracentrifugação analítica. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor...
Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se
escolher o amor com ele você conquistará o mundo.”

Albert Einstein

À minha esposa Adriane Damasceno;
À minha Família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as graças recebidas e pela força nos momentos difíceis;

À minha mãe Oneide e ao meu pai Raimundo pelo carinho, amor, dedicação e motivação durante toda a minha jornada científica;

À minha esposa “Adriane Carvalho” pelo carinho, amor, dedicação e por toda a força que sempre foi e sempre será indispensável;

À minha irmã Lourdes pelo carinho, amor e motivação;

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Marcel Tabak por ter me acolhido em São Carlos, e por ter sido fundamental e indispensável em minha formação acadêmica;

Aos amigos Thairo e Elenice, Wilson e Sumária e Orlando e Ana Célia pelos bons momentos de convivência;

Aos Amigos do laboratório de Biofísica molecular Ana Eliza, Ezer Biazin e Fernanda pelas discussões construtivas que contribuíram significativamente com este trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Santiago pelas discussões construtivas e pela boa amizade;

Aos Amigos Adriana, Alexandre, Edvan, Fabiana, Gislei, Jonas, Janete, Karla, Marília, Nayane, Thiago Seraphim, Ulisses, Virgínia e Washington, pela boa convivência;

Aos laboratórios Nacional Luz Síncrotron (LNLS), Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) pelo suporte experimental e técnico;

A central analítica do Instituto de Química de São Paulo/USP pelo suporte experimental e técnico;

À FAPESP pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

RESUMO

A hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) é caracterizada por uma massa molecular de 3,6 MDa, alta estabilidade oligomérica, resistência a auto-oxidação, e alta afinidade em ligar oxigênio. A estrutura quaternária desta macromolécula apresenta 144 cadeias com grupo heme (globinas) e 36 cadeias sem grupo heme (linkers), dispostos em duas camadas hexagonais. No presente trabalho estudos de caracterização das subunidades da HbGp, bem como da estabilidade da HbGp em diferentes formas, em função do pH, e em diferentes concentrações de ureia, por diferentes técnicas biofísicas, foram realizados. Os estudos de caracterização por eletroforese SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS e ultracentrifugação analítica (AUC) das subunidades isoladas mostraram que apenas o monômero *d* obtido da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) tem alto grau de pureza. Para as demais frações mais de uma contribuição foi observada em solução. Assim, para a fração trimérica, duas espécies estão presentes em solução, a espécie predominante (87 %) é atribuída ao trímero *abc* e a outra espécie (13 %) pode ser associada ao complexo (*abc* + *L*). Os dados espectroscópicos e de AUC mostraram que a estabilidade da HbGp depende fortemente do estado de oxidação do heme, do ligante coordenado no centro metálico e da concentração de proteína. Assim, a forma oxidada, a meta-HbGp, mostrou-se menos estável em meio alcalino e na presença de ureia, seguida pelas formas oxi- e cianometa-HbGp. Desta forma, no pH 8,0, a meta-HbGp está totalmente dissociada em trímero *abc* e monômero *d*, enquanto a oxi-HbGp está apenas parcialmente dissociada com uma contribuição de 88 % de proteína íntegra em solução e a cianometa-HbGp não sofre dissociação oligomérica. Os valores de coeficiente de sedimentação $s_{20,w}$ e massa molecular (*MM*) determinados para as espécies em solução são similares aos observados para as correspondentes espécies isoladas por SEC. Na presença de ureia a mesma tendência foi observada para as três formas da HbGp. Porém, para uma caracterização melhor de processo de desnaturação, os dados espectroscópicos foram analisados usando modelos de dois e três estados para obter informações sobre os parâmetros termodinâmicos do sistema. Assim, bons ajustes foram obtidos usando ambos os modelos, no entanto, o modelo de três estados foi mais adequado para descrever o processo. Por este modelo o processo de desnaturação da HbGp pode ser descrito por duas etapas. A primeira etapa, na faixa de 1,0 - 3,0 mol/L de ureia, está associada a transição do estado nativo para o estado intermediário ($N \rightarrow I$), e é caracterizada pela dissociação do oligômero nas diferentes subunidades da HbGp. O estado intermediário apresenta propriedades físico-químicas

similares ao estado nativo, sugerindo que o processo de dissociação oligomérica não induz mudanças significativas na estrutura secundária e na região do grupo heme da proteína. Os parâmetros termodinâmicos associados à primeira transição apresentaram erros consideráveis, que podem ser atribuídos à complexidade do estado intermediário com diferentes espécies em solução bem como à semelhança ao estado nativo. A segunda etapa ($I \rightarrow U$) com transição bem definida entre 4,5 – 5,0 mol/L de desnaturante é caracterizada pela desnaturação das subunidades dissociadas. Os dados de AUC e SAXS são consistentes com os dados obtidos por espectroscopia, onde a primeira etapa do processo foi caracterizada pela dissociação oligomérica do oligômero em dodecâmero $(abcd)_3$, tetrâmero $abcd$, trímero abc e monômero d . Para concentrações acima de 4,0 e 5,0 mol/L de ureia, para oxi-HbGp e cianometa-HbGp, respectivamente, aumentos significativos nos valores de $I(0)$, D_{max} e R_g sugerem que as subunidades da HbGp estão desnaturadas em solução. As massas moleculares (MM) obtidas por espectrometria de massas e AUC, e os coeficientes de sedimentação $s_{20,w}$ são consistentes com outros resultados reportados para hemoglobinas ortólogas. Além disso, os resultados aqui apresentados representam um avanço importante na caracterização do processo de desnaturação de proteínas oligoméricas complexas.

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus hemoglobin (HbGp) is characterized by a molecular mass of 3.6 MDa, a high oligomeric stability, a high resistance to oxidation and a high affinity to oxygen. The quaternary structure of this macromolecule consists of 144 globin chains, and 36 additional chains lacking the heme group, named linkers, organized in a double-layered hexagonal structure. In this current work the characterization of the HbGp subunits and the effect of pH and urea upon the oligomeric stability were studied by several biophysical techniques. Our results obtained by electrophoresis SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS and analytical ultracentrifugation (AUC) showed that only the monomer ***d*** isolated by size exclusion chromatography (SEC) presented high purity. For the other fractions various species were observed in the solution. Thus, for the trimeric fraction, two species are present in the equilibrium, the main species with percentage contribution of 87 % is assigned to the trimer ***abc*** and the species with 13 % in the solution is associated to the complex (***abc*** + ***L***). Additionally, the data obtained by several spectroscopic techniques and AUC show clearly that the oligomeric stability of HbGp depends on the iron oxidation state, the specific ligand coordinated to the iron and the protein concentration. Therefore, our results show that the met-HbGp form is the less stable one in the alkaline medium and in the presence of urea, followed by the oxy- and cyanomet- forms. In this way, at pH 8.0, the met- form is fully dissociated into smaller subunits, such as, trimer ***abc*** and monomer ***d***, while the oxy-HbGp is partially dissociated with a significant percentage contribution (88 %) of undissociated protein, and the cyanomet-HbGp does not undergo oligomeric dissociation. The sedimentation coefficients ($s_{20,w}$) and molecular masses (MM) values for species present in the solution, at different pH, are very close to the values obtained for isolated species. In the presence of urea the same behavior was observed for the three HbGp forms as compared to the alkaline medium. However, for a full characterization of the unfolding process the thermodynamic parameters were obtained by spectroscopic data analysis using models of two and three states. Adequate fits were obtained for both models, but the three states model was very appropriate to describe the HbGp denaturation process. Thus, the denaturation process of HbGp is defined by two phases. The first phase between 1.0 and 3.0 mol/L, of urea is assigned to the transition of native state to an intermediate state ($N \rightarrow I$), and is characterized by dissociation of the oligomer in several subunits. The strong similarity of the intermediate state to the native one suggests that oligomeric dissociation induces little changes in the

secondary structure and the region of heme group of the protein. As a consequence, the thermodynamic parameters associated to the first transition have large errors due to the complexity of the intermediate state with different species in the solution, as well as its great similarity to the native state. The second phase ($I \rightarrow U$), associated with a cooperative transition at 4,5 – 5,0 mol/L of denaturant agent, is attributed to the unfolding of the dissociated subunits. Our AUC and SAXS data are very consistent with spectroscopic data. Thus, in the first phase the oligomeric dissociation of whole protein in dodecamer $(abcd)_3$, tetramer $abcd$, trimer abc and monomer d was observed. For urea concentrations above 4.0 - 5,0 mol/L, for oxy-HbGp and cyanomet-HbGp, respectively, the significant increase in $I(0)$, D_{max} and R_g values suggests that the HbGp subunits are denatured in the solution. The molecular masses values (MM) obtained by mass spectrometry and AUC, and the sedimentation coefficients ($s_{20,w}$) are consistent with others results reported in the literature for orthologous hemoglobins. In addition, the results of this work correspond to an important advance in the characterization of the denaturation process of this complex oligomeric protein.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura cristalográfica da HbGp, e de suas subunidades em ordem hierárquica..</i>	21
<i>Figura 2: Fotografia do anelídeo Glossoscolex paulistus.</i>	27
<i>Figura 3: Diagrama representativo do fenômeno de absorção óptica.....</i>	39
<i>Figura 4: Diagrama de Jablonski.</i>	41
<i>Figura 5: Representação das forças que atuam sobre uma partícula em solução.....</i>	46
<i>Figura 6: Cromatograma da oxi-HbGp exposta no pH 9,0</i>	52
<i>Figura 7: Géis de eletroforese SDS-PAGE</i>	53
<i>Figura 8: Espectros de massas MALDI-TOF-MS da cianometa-HbGp sem 2-mercaptoetanol</i>	55
<i>Figura 9: Espectros de massas MALDI-TOF-MS da cianometa-HbGp com 2-mercaptoetanol</i>	58
<i>Figura 10: Espectros de massas MALDI-TOF-MS do monômero d.....</i>	61
<i>Figura 11: Cromatograma da oxi-HbGp exposta ao pH 9,0 com EDTA</i>	62
<i>Figura 12: Curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, c (S), do trímero abc, dodecâmero (abcd)₃ e monômero d</i>	63
<i>Figura 13: Curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, c (S), para as formas oxi- e cianometa-HbGp em diferentes valores de pH.</i>	67
<i>Figura 14: Dados experimentais de velocidade de sedimentação (SV) para meta-HbGp no pH 8,0 e ajustes obtidos no SEDFIT</i>	71
<i>Figura 15: Dados experimentais de equilíbrio de sedimentação (SE) para oxi-HbGp no pH 10,0 e ajustes obtidos no SEDPHAT</i>	72
<i>Figura 16: Espectros de absorção óptica da cianometa-HbGp em função da concentração de ureia.....</i>	76
<i>Figura 17: Espectros de absorção óptica da meta-HbGp em função da concentração de ureia.</i>	79

Figura 18: Dados de emissão de fluorescência para as três formas HbGp, oxi-, meta- e cianometa-HbGp.....	81
Figura 19: Espalhamento de luz estático para as três formas HbGp, oxi-, meta- e cianometa-HbGp	82
Figura 20: Espectros de dicroísmo circular para a oxi-HbGp nas regiões das ligações peptídicas e do grupo heme	84
Figura 21: Ajustes das frações de desnaturação da HbGp usando o modelo de dois estados ..	85
Figura 22: Ajustes dos dados de dicroísmo circular usando modelos de dois e três estados....	90
Figura 23: Espectros de dicroísmo circular para a meta-HbGp na região do grupo heme	92
Figura 24: Curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, c (S), para oxi-HbGp em função da concentração de ureia	96
Figura 25: Curvas de SAXS da oxi-HbGp	101
Figura 26: Curvas de SAXS da cianometa-HbGp.....	103
Figura 27: Gráficos de Kratky da oxi- e cianometa-HbGp	105
Figura 28: Modelo de dissociação da HbGp na presença de ureia	106

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Preparação dos géis de eletroforese.</i>	30
<i>Tabela 2: Massas das subunidades da HbGp nas formas, oxi-, meta-, e cianometa-, obtidas por MALDI-TOF-MS.</i>	57
<i>Tabela 3: Massas moleculares das subunidades isoladas da HbGp obtidas por MALDI-TOF-MS.</i>	60
<i>Tabela 4: Propriedades hidrodinâmicas das subunidades da HbGp obtidas por AUC</i>	64
<i>Tabela 5: Propriedades hidrodinâmicas das diferentes formas da HbGp em diferentes valores de pH obtidas por AUC.</i>	69
<i>Tabela 6: Dados de equilíbrio de sedimentação da HbGp no pH 10,0.</i>	73
<i>Tabela 7: Propriedades espectroscópicas da HbGp em diferentes formas na presença de ureia</i>	78
<i>Tabela 8: Dados termodinâmicos obtidos pelo modelo de dois estados</i>	87
<i>Tabela 9: Dados termodinâmicos obtidos pelo modelo de três estados.</i>	88
<i>Tabela 10: Propriedades hidrodinâmicas da oxi-HbGp na presença de ureia obtidas por AUC.</i>	97
<i>Tabela 11: Propriedades estruturais da oxi-HbGp e cianometa-HbGp (3,0 mg/mL) na presença de ureia obtidas por SAXS</i>	102
<i>Tabela 12: Propriedades estruturais da oxi-HbGp e cianometa-HbGp (0,5 mg/mL) na presença de ureia obtidas por SAXS</i>	104

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

a – Cadeia polipeptídica globínica (*a*) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

abc – Espécie trimérica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

abcd – Subunidade tetramérica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

(*abcd*)₃ – Dodecâmero da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

AUC – Ultracentrifugação analítica do inglês “Analytical ultracentrifugation”.

b – Cadeia polipeptídica globínica (*b*) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

c – Cadeia polipeptídica globínica (*c*) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

c (M) – Curvas de distribuição de massas moleculares obtidas do modelo de análise de dados pelo SEDFIT, para determinar as massas moleculares das espécies presente em equilíbrio.

c (S) – Curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação obtidas do modelo de análise de dados pelo SEDFIT, para determinar os coeficientes de sedimentação moleculares das espécies presente em equilíbrio.

d – Cadeia polipeptídica globínica (*d*) da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*.

CD – Dicroísmo circular do inglês “Circular dichroism”.

[D] e [D]_{1/2} – concentração de desnaturante (ureia) e concentração crítica de desnaturante, respectivamente.

D – Estado desnaturado.

D – Coeficiente de difusão.

*D*_{max} – Dimensão máxima da partícula espalhadora.

*D*_H – Diâmetro hidrodinâmico.

DLS – Espalhamento dinâmico de luz do inglês “Dynamic light scattering”.

ΔG_U – Energia livre de Gibbs do estado desenovelado.

ΔG_1 e ΔG_2 - Energia livre de Gibbs relacionada com a primeira e segunda transições em um sistema de três estados, respectivamente.

f_U e f_N - Frações dos estados desenovelado e nativo, respectivamente.

f/f_0 - Coeficiente friccional

HbLt - Hemoglobina do anelídeo *Lumbricus terrestris*.

HbAm - Hemoglobina do anelídeo *Arenicola marina*.

HbGp - Hemoglobina do anelídeo *Glossoscolex paulistus*.

$I(0)$ - Intensidade de espalhamento quando $q = 0$.

I - Estado intermediário.

K - Constante de equilíbrio.

m_N ou m_1 e m_U ou m_2 - inclinações dos ajustes relacionadas aos estados nativo e desnaturado.

MM - Massa molecular.

MALDI-TOF-MS - do inglês "Matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry".

η - Viscosidade.

$p(r)$ - curva de distribuição de distância.

ρ - Densidade.

R - Constante universal dos gases.

R_s - Raio de Stokes.

R_g - Raio de Giro.

SDS-PAGE - do inglês "Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel eletrophoresis".

SV - Velocidade de sedimentação do inglês "Sedimentation velocity".

SE - Equilíbrio de sedimentação do inglês "Sedimentation equilibrium".

S - Unidade do coeficiente de sedimentação (1 Svedberg (S) equivale a 10^{-13} s ou 100 fs).

s^* – Coeficiente de sedimentação experimental.

$s_{20,w}$ – Coeficiente de sedimentação em água a 20 °C.

$s_{20,w}^0$ – Coeficiente de sedimentação convertido para condições padrão (água a 20 °C) e extrapolado para concentração infinitamente diluída de proteína (0,0 mg/mL).

SAXS – Espalhamento de raios X a baixo ângulo do inglês “Small-angle X-ray scattering”.

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho do inglês “Size exclusion chromatography”.

y_N , y_I e y_D – Sinais experimentais associados aos estados nativo, intermediário e desnaturado, respectivamente.

T – Temperatura.

U – Estado desnaturado.

V_{bar} – Volume parcial específico.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Hemoproteínas	20
1.2. Estabilidade das proteínas	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	25
CAPÍTULO II.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAIS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	27
3.1.1. Extração e purificação da hemoglobina de <i>Glossoscolex paulistus</i>	27
3.1.2. Preparação das subunidades em meio alcalino por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).....	28
3.1.3. Preparação das formas oxidadas meta-HbGp e cianometa-HbGp	29
3.1.4. Medidas de eletroforese SDS-PAGE	29
3.1.5. Medidas de espectrometria de massas MALDI-TOF-MS.....	30
3.1.6. Medidas espectroscópicas: absorção óptica, emissão de fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular.....	31
3.1.6.1. Análises dos dados espectroscópicos.....	32
3.1.6.2. Convex Constraint Analysis (CCA)	32
3.1.6.3. Modelo de desnaturação de dois estados.....	33
3.1.6.4. Modelo de desnaturação de três estados	34
3.1.6.5. Reversibilidade do processo de desnaturação da HbGp	35
3.1.7. Medidas de ultracentrifugação analítica	36
3.1.7.1. Análises dos dados de AUC.....	37
3.1.8. Medidas de SAXS	38
3.2 – TÉCNICAS.....	38
3.2.1 – Absorção óptica	38
3.2.2 – Espectroscopia de fluorescência	40
3.2.3 – Dicroísmo Circular (CD)	42
3.2.4 – Ultracentrifugação Analítica (AUC)	43

3.2.5 – Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	47
CAPÍTULO III	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
PARTE I	51
CARACTERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO, ELETROFORESE SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS e AUC	51
4.1. Caracterização das subunidades da HbGp	52
4.1.1. Dados da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e de eletroforese SDS-PAGE	52
4.1.2. Dados de MALDI-TOF-MS da HbGp íntegra	55
4.1.3. Dados de MALDI-TOF-MS das subunidades da HbGp obtidas de SEC	59
4.1.4. Dados de AUC das subunidades da HbGp obtidas de SEC	62
PARTE II	66
EFEITO DO pH NA HbGp: ESTUDOS DE AUC	66
4.2. Efeito do pH nas formas oxi-, cianometa- e meta-HbGp	67
PARTE III	74
EFEITO DA UREIA NA HbGp: ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS	74
4.3. Efeito da ureia na estabilidade da HbGp: dados espectroscópicos	75
4.3.1. Absorção óptica	75
4.3.1.1. Cianometa-HbGp	75
4.3.1.2. Oxi-HbGp	77
4.3.1.3. Meta-HbGp	78
4.3.2. Emissão de fluorescência	80
4.3.3. Espalhamento de luz (LSI)	82
4.3.4. Dicroísmo circular (CD)	83
4.3.4.1. Oxi-HbGp	83
4.3.4.1.1. Modelo de dois estados	85
4.3.4.1.2. Modelo de três estados	86
4.3.4.2. Cianometa-HbGp	89
4.3.4.2.1. Modelo de dois estados	89
4.3.4.2.2. Modelo de três estados	90
4.3.4.3. Meta-HbGp	91
4.3.4.3.1. Modelo de três estados	92
PARTE IV	94

EFEITO DA UREIA NA HbGp: ESTUDOS DE AUC E SAXS	94
4.4. Caracterização hidrodinâmica das espécies presentes em equilíbrio.....	95
4.4.1. Dados de ultracentrifugação analítica.....	95
4.4.2. Dados de SAXS.....	100
4.5. Modelo de dissociação na presença de ureia	105
CAPÍTULO V	108
5. CONCLUSÕES.....	109
6. PERSPECTIVAS.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8. APÊNDICE	121
8.1. Publicações relacionadas com a tese	121
8.1.1. Artigo I.....	121
8.1.2. Artigo II	122
8.1.3. Artigo III	123
8.1.4. Artigo IV	124
8.1.5. Capítulo I.....	125
8.2. Outras publicações	126
8.2.1. Artigo I.....	126
8.2.2. Artigo II	127
8.2.3. Capítulo de livro II	128
8.3. Súmula curricular.....	129

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoproteínas

A hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) é extraída de uma minhoca endêmica das cidades de Rio Claro e Piracicaba, no interior de São Paulo ¹. A espécie conhecida cientificamente por *Glossoscolex paulistus* pertence ao filo Anelídea, à classe Oligochaeta e à família *Glossoscolecidae* ^{1,2}.

As hemoglobinas constituem um grupo de proteínas que desempenha um papel vital nos organismos ^{3,4}. Dentro deste grupo a mioglobina, hemoglobina e citocromo *c* foram intensivamente estudados ⁵, enquanto as hemoglobinas extracelulares têm despertado o interesse de vários grupos de pesquisa atualmente ⁶⁻¹⁰. As propriedades intrínsecas das hemoproteínas, assim como a sua relação estrutura-atividade, envolvem fenômenos tais como cooperatividade e afinidade por ligantes específicos, como o oxigênio, que estão associados a uma variedade de processos que viabilizam a vida ¹¹⁻¹³.

Nos últimos anos tem aumentado o interesse em estudar as hemoglobinas extracelulares gigantes, devido a alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação ¹⁴, alta cooperatividade e afinidade para ligar oxigênio, além do potencial em aplicações biomédicas como substituto sanguíneo ^{10,12,15,16}. Tais propriedades tornam as hemoglobinas extracelulares bastante singulares e interessantes para estudos com aplicações biotecnológicas. Grupos de pesquisas no mundo vêm estudando as hemoglobinas de *Lumbricus terrestris* (HbLt) ¹² e *Arenicola marina* (HbAm) ^{10,15} com o foco nas aplicações neste sentido.

Na hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, HbGp, assim como na hemoglobina humana, a ligação com o oxigênio é altamente cooperativa ^{3,4}. Recentemente a massa molecular (*MM*) de 3,600 kDa foi determinada para a HbGp por ultracentrifugação analítica, sendo este valor bastante similar ao encontrado para outras hemoglobinas extracelulares ¹⁷.

Estudos de caracterização das subunidades da HbGp por MALDI-TOF-MS (do inglês “*Matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry*”) e ultracentrifugação analítica (AUC, do inglês “*Analytical ultracentrifugation*”) sugerem que a HbGp, HbLt e HbAm têm cadeias polipeptídicas e estruturas oligoméricas bastante similares ¹⁸⁻²². A estrutura oligomérica é composta de dois discos hexagonais, que formam uma bicamada hexagonal e a dissociação dessa estrutura origina a formação de doze unidades de massa

molecular 1/12 da molécula íntegra ^{11,23}. Supondo uma alta similaridade estrutural entre HbGp e HbLt podemos propor que HbGp apresenta uma disposição altamente organizada envolvendo 144 cadeias polipeptídicas com grupo heme e 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme ⁹.

A hemoglobina extracelular de *Lumbricus terrestris* tem as subunidades e estrutura bem caracterizadas. Vinogradov e colaboradores propuseram um modelo para a proteína íntegra, no qual a estrutura oligomérica é constituída por doze estruturas iguais formadas por um dodecâmero, $(abcd)_3$, e três cadeias linkers, L_3 ⁹. Paralelamente, a estrutura cristalográfica desta macroproteína foi estudada por W. E. Royer Jr e colaboradores ²³⁻²⁵. A estrutura cristalográfica da HbLt foi reportada na literatura inicialmente com baixa resolução de 5,5 Å ²⁴, e mais recentemente esta estrutura foi refinada até 3,5 Å ²³. Estes trabalhos mostram em detalhes a disposição na bicamada hexagonal das várias cadeias polipeptídicas que compõem a proteína, incluindo as cadeias do tipo globinas e os linkers.

Figura 1: Representação esquemática da hierarquia da estrutura oligomérica da HbGp obtida da análise dos dados cristalográficos. A estrutura da HbGp íntegra é composta por doze protômeros, cada um deles contendo uma estrutura de globinas dodecamérica e três subunidades sem grupo heme (linkers), $(abcd)_3L_3$. A estrutura dodecamérica é composta por quatro tipos de cadeias de globina: *a*, *b*, *c* e *d*. As quatro cadeias globinas estão associadas como um hetero-tetrâmero (onde *a*, *b*, e *c* formam um trímero, ligados por ligações dissulfeto, ^{26,27}).

Fonte: Tabak, M. et al. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms, *In Stoichiometry and research – the importance of quantity in Biomedicine*. Rijeka: In Tech, v. 1, p. 337 – 356, 2012.

Adicionalmente, a estrutura cristalográfica preliminar da HbGp com resolução de 3,15 Å foi obtida e reportada em estudos recentes ²⁷, onde foi evidenciado a alta similaridade

estrutural da HbGp e HbLt. A HbGp e HbLt partilham uma identidade entre as subunidades monoméricas *d* de 54 %²⁸, com a estrutura da HbGp mostrando os mesmos níveis hierárquicos, como a HbLt (Figura 1)²⁶, e a mesma associação global, do tipo 1. A HbGp é composta por quatro subunidades, com enovelamento típico para globinas, que contém o grupo heme, denominadas de cadeias *a*, *b*, *c* e *d*, sendo que as subunidades *a*, *b* e *c* estão ligadas por pontes dissulfeto formando o trímero *abc* e a subunidade *d* mantém-se na forma monomérica^{18,20}. Além destas quatro subunidades que contém o grupo heme, a proteína possui três cadeias polipeptídicas *L*₁, *L*₂ e *L*₃ denominadas de linkers^{18,20}. O papel destas subunidades está provavelmente relacionado com a manutenção da estabilidade da estrutura oligomérica.

Estudos de MALDI-TOF-MS sugerem que o monômero *d* apresenta várias isoformas com *MM* entre 16,4 e 16,8 kDa, e o trímero *abc* apresenta pico duplo com *MM* em torno de 51 e 52 kDa^{18,20}. Estas duas espécies de trímero estão associadas às diferentes isoformas da cadeia *c* com *MM* entre 17 - 18 kDa. Além destas subunidades foram observadas contribuições em 26,5 kDa e 34 kDa atribuídas as cadeias linkers e em 68,5 kDa associada ao tetrâmero *abcd*²⁰.

Estudos por ultracentrifugação analítica em pH 7,0, mostraram que as duas formas da HbGp, oxi- e cianometa-, são bastante homogêneas com uma única espécie em solução¹⁷. Por outro lado, em meio alcalino, pH 10,0, a presença de várias espécies em solução foi detectada. Foram observadas quatro espécies em solução para a forma oxi- correspondentes ao monômero *d*, dímeros de monômeros *d*₂, trímeros *abc* e a quarta espécie foi atribuída ao tetrâmero *abcd*¹⁹. O segundo pico correspondente aos dímeros de monômero *d*₂ apresentou grande intensidade em relação à distribuição na amostra de monômero puro. Pode-se inferir que este aumento deve estar associado à contribuição dos linkers, pois as massas de dímeros de monômeros *d*₂, de 32 kDa, e de linkers, de 28 kDa, são muito próximas, o que dificulta a separação destas duas espécies. A terceira espécie, trímeros *abc*, não é observada nas amostras na presença do agente redutor, 2-mercaptoetanol, pois as ligações dissulfetos que mantêm esta subunidade íntegra são quebradas formando espécies monoméricas, monômeros *a*, *b*, *c*, o que está de acordo com o aumento da contribuição da fração monomérica, observado para estas amostras^{19,20}.

1.2. Estabilidade das proteínas

As proteínas apresentam uma estrutura tridimensional correspondente à sua conformação nativa, em consequência de um equilíbrio de forças entre as diversas subunidades da proteína e o solvente ²⁹⁻³². A desnaturação de proteína envolve a perturbação das forças que estabilizam a conformação nativa, quebrando e reorganizando ligações não covalentes, levando à modificação nas estruturas secundária, terciária, e quaternária da proteína ³¹, com uma perda irreversível de atividade produzindo o seu desenovelamento (“unfolding”).

A estabilidade de proteínas resulta das contribuições de entalpia e entropia que favorecem o estado enovelado em comparação com o estado desenovelado. No entanto, mudanças nas interações da proteína com o solvente, por exemplo, a adição de um co-solvente, podem ter uma influência drástica sobre a estabilidade protéica. A natureza e a magnitude das contribuições individuais das interações da proteína com o solvente e as energias livres do estado enovelado (*N*) e estado desenovelado (*D*) são altamente dependentes do ambiente do solvente. Como a água é o ambiente em que as proteínas existem e operam, a estrutura e a dinâmica da água de hidratação está diretamente ligada à flexibilidade e estabilidade da proteína ³³. Por conseguinte, desnaturantes químicos e solventes orgânicos podem alterar as propriedades de hidratação da água, podendo facilmente desfavorecer o estado enovelado da proteína.

Em meio aquoso, as formas nativa e desnaturada estão rodeadas por moléculas de água, organizadas em camadas de hidratação ao redor da proteína. A quantidade de energia livre envolvida na hidratação é proporcional ao tamanho da camada de hidratação formada. Como a forma desnaturada apresenta maior superfície de exposição ao solvente, sua camada de hidratação é mais extensa e, consequentemente, a energia livre necessária para sua hidratação é maior ^{32,33}. Por outro lado, como a forma nativa apresenta menor superfície de exposição ao solvente, a camada de hidratação é menos extensa e, consequentemente, requer menos energia livre para a hidratação. Embora o estado (*D*) apresente uma entropia conformacional mais elevada que o estado (*N*), o estado (*D*) requer uma quantidade de energia livre de hidratação muito mais elevada que o estado (*N*). Em água pura, a elevada energia livre necessária para a hidratação do estado (*D*) não é compensada pela sua entropia conformacional ³³. Os estados da proteína na forma nativa (*N*) e desnaturado (*D*) estão em equilíbrio, e em meio aquoso o estado inicial é favorecido.

Esquema (1)

A energia livre requerida para a formação da camada de hidratação vem das interações hidrofóbicas entre grupamentos apolares de aminoácidos; como no estado desenovelado estes grupamentos estão expostos ao solvente, a interação da proteína com a água não fornece a energia necessária para a formação da camada de hidratação. Embora o estado (*N*) apresente uma entropia conformacional mais baixa que o estado (*D*), a energia livre de hidratação também é mais baixa e facilmente obtida pela força hidrofóbica que compele os grupos apolares da proteína a ficarem juntos, com baixa entropia conformacional, no interior anidro da macromolécula.

Assim, no estado (*N*), a baixa entropia é compensada pela energia livre de enovelamento da proteína, que também atende à demanda energética envolvida na formação de sua camada de hidratação. Isso significa que o equilíbrio entre os estados (*N*) e (*D*) da proteína vai se deslocar no sentido do estado nativo, que é mais estável quando o ambiente é essencialmente aquoso.

Entre os efeitos mais comuns que induzem a desnaturação de proteína temos o aumento da temperatura, variação da constante dielétrica do meio em presença de solventes orgânicos, mudanças drásticas do pH e agentes químicos específicos que levam à ruptura da conformação nativa, como por exemplo, a ureia, o cloreto de guanidina (GuHCl) e surfactantes^{34,35}.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

O presente projeto de doutorado propõe o estudo da estabilidade da proteína nativa frente aos processos de dissociação oligomérica, de oxidação do ferro do heme e desnaturação da HbGp para diferentes agentes caotrópicos. Estes estudos permitirão avaliar os mecanismos de dissociação e re-associação, possibilitando avaliar as subunidades que coexistem nestes processos, bem como a estabilidade da HbGp em diferentes condições.

Considerando que a dissociação alcalina leva à formação de subunidades menores em solução, o presente projeto tem por objetivo avaliar também o efeito desta dissociação na

estrutura secundária e terciária das partículas em solução e esclarecer quais são as subunidades mais estáveis neste processo de dissociação.

A caracterização das cadeias da proteína nos permitirá entender melhor a estrutura e os fatores responsáveis pela alta estabilidade desta macromolécula. Além disso, este estudo contribuirá futuramente para a compreensão mais aprofundada a nível molecular das interações entre as subunidades responsáveis pela manutenção da estrutura oligomérica da hemoglobina gigante da HbGp, o que é relevante para entender como ocorre o processo de oxigenação e os detalhes da cooperatividade entre as subunidades.

2.2. *Objetivos específicos*

- 1) Separar e caracterizar as subunidades da HbGp por cromatografia de gel filtração, eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS).
- 2) Através de ultracentrifugação analítica (AUC), equilíbrio de sedimentação (SE) e velocidade de sedimentação (SV), estudar a estabilidade das formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp em diferentes valores de pH (7,0 a 10,0). Determinar a massa molecular das subunidades da oxi-HbGp em equilíbrio no meio alcalino.
- 3) Estudar o efeito da ureia na estrutura oligomérica da HbGp, nas formas oxi-, meta- e cianometa-, por espectroscopia de fluorescência, absorção óptica, dicroísmo circular e espalhamento de luz, a 25 °C e pH 7,0.
- 4) Caracterizar as espécies presentes em equilíbrio e descrever o processo de dissociação e desnaturação da HbGp na presença de ureia no pH 7,0 por ultracentrifugação analítica (AUC) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1. Extração e purificação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

A HbGp foi preparada utilizando hemolinfa de minhocas da espécie *Glossoscolex paulistus*^{36,37}. A hemoglobina foi extraída anestesiando cada animal com éter dietílico (PA) por um período de 15 a 20 min a 4 °C. A hemolinfa foi extraída a partir de uma incisão de 5 - 10 mm na região da cabeça do animal (círculo mostrado em azul na Figura 2”) para evitar as enzimas digestivas.

Figura 2: Fotografia do espécime *Glossoscolex paulistus*. O círculo mostra a região da cabeça do espécime, onde é feita a incisão para extração da hemolinfa.

A hemolinfa foi coletada com uma pipeta Pasteur até o esgotamento do animal. Foi adicionado à hemolinfa anticoagulante, citrato de sódio 0,1 mol/L, e mantida em gelo até o término da extração.

Em seguida, o estoque de hemolinfa foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 min a 4 °C para eliminar restos de células e resíduos, seguido por uma ultrafiltração por 24 h em uma membrana de corte de 30 kDa contra tampão tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,0. Depois de dialisada a hemolinfa foi centrifugada a 50.000 rpm por 3,5 h a 4 °C para sedimentar a HbGp. A proteína foi obtida na forma de “pellet”, sedimentada no fundo do tubo, sendo ressuspendida em um

volume mínimo, em torno de 8,0 mL de tampão tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0, e armazenada a 4 °C na geladeira. Posteriormente alíquotas de 1,0 mL de hemolinfa foram purificadas numa coluna de Sephadex G-200 equilibrada em tampão tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0. Este procedimento foi realizado até que toda a hemolinfa ressuspensa fosse filtrada. Todas as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente utilizando os coeficientes de extinção molar $\epsilon_{415\text{nm}} = 5,5 \pm 0,8 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para oxi-HbGp^{1,39}.

3.1.2. Preparação das subunidades em meio alcalino por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

As subunidades isoladas das HbGp foram obtidas a partir de 1 mL de oxi-HbGp com concentração entre 15 e 30 mg/mL exposta ao pH 9,6 por 15 h em tris-HCl 100 mmol/L contendo 0,3 mmol/L de EDTA. Transcorrido o tempo de equilíbrio a amostra foi acidulada, com pequenas adições de HCl 1 mol/L, e o pH reajustado para 7,0. Em seguida a amostra foi centrifugada para eliminar os precipitados, e 0,5 mL do sobrenadante previamente filtrado foi aplicado numa coluna Superdex 200 TM acoplada a um cromatógrafo ÄKTA prime plus da GE. O sistema cromatográfico foi equilibrado como o mesmo tampão no qual a amostra foi exposta. As espécies em solução foram monitoradas em 280 nm no instrumento com fluxo de 1,0 mL/min, e adicionalmente em 415 nm em um espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1601 PC. O monitoramento em dois comprimentos de onda é importante para caracterizar algumas cadeias da HbGp que não apresentam grupo heme, e portanto não absorvem na região do visível (415 nm). Depois da análise do perfil cromatográfico, as frações correspondentes a cada pico foram coletadas separadamente e concentradas em uma centrífuga refrigerada modelo 5804R da Eppendorf. Posteriormente as amostras foram armazenadas a 4 °C para serem usadas nos estudos de caracterização das subunidades isoladas através de SEC.

3.1.3. Preparação das formas oxidadas meta-HbGp e cianometa-HbGp

Para preparar a meta-HbGp, a proteína na forma oxi-HbGp com concentração em torno de 15 – 30 mg/mL deve ser oxidada através da adição de ferricianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$, na razão de cinco vezes a concentração de heme. O excesso de ferricianeto de potássio é importante para assegurar que todos os átomos de ferro sejam oxidados. Transcorrido 1,5 h da adição do oxidante a amostra foi dialisada em membrana de diálise por três horas contra tampão tris-HCl 100 mmol/L em pH 7,0. A forma cianometa-HbGp foi obtida a partir de um estoque de meta-HbGp não dialisado, na qual foi adicionado cianeto de potássio KCN, na mesma razão estequiométrica do ferricianeto:heme, ou seja, de 5:1. A amostra foi deixada em repouso por 1,5 h a fim de se obter a cianometa-HbGp e o excesso de reagente foi retirado através de diálise por 3 - 5 h em tris-HCl 100 mmol/L, em pH 7,0 a 4 °C. As concentrações foram determinadas em um espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1601 PC utilizando os coeficientes de extinção molar de $\epsilon_{420nm} = 4,8 \pm 0,6 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{403nm} = 4,1 \pm 0,7 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para as formas cianometa- e meta-HbGp, respectivamente

39.

3.1.4. Medidas de eletroforese SDS-PAGE

A caracterização inicial das frações obtidas da cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada a partir de géis de eletroforese SDS-PAGE. Os géis de SDS-PAGE foram preparados usando as proporções mostradas na Tabela 1, a fim de se obter uma porcentagem de acrilamida de 15 %. Primeiramente, as placas nos quais os géis serão moldados são montadas, e em seguida usando um béquer os reagentes mostrados na Tabela 1 são misturados, na mesma ordem que aparece na tabela, para preparar o gel de resolução. A solução é homogeneizada e com o auxílio de uma pipeta é adicionada nas duas placas. Para uma polimerização uniforme na parte superior dos géis é adicionado um pouco de álcool isopropílico. Transcorrido 30 min, o mesmo procedimento é realizado para preparar o gel de empilhamento usando os volumes mostrados na Tabela 1. Antes da adição do catalisador (TEMED) e do polimerizador (persulfato de amônio) na mistura, todo excesso de álcool das placas deve ser removido, e em seguida a solução com todos os reagentes deve ser adicionada

às placas. As amostras foram analisadas em tampão tris-HCl 25 mmol/L contendo 192 mmol/L de glicina, pH 6,8, e uma tensão constante de 140 V, com duração de corrida de 1,5 h. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 da Bio-Rad. Em cada experimento dois géis foram corridos simultaneamente, sendo uma das placas sem 2-mercaptoetanol, e a outra na presença do agente redutor. Marcadores de massas moleculares conhecidas foram usados para determinar a massa molecular aparente das subunidades, através de uma curva de calibração.

Tabela 1: Materiais e quantidades utilizadas no preparo dos géis de eletroforese SDS-PAGE. Os volumes mostrados na tabela são para dois géis com concentração de acrilamida de 15 %.

Soluções	Gel de resolução	Gel de empilhamento
Tampão tris-HCl 2 mol/L, pH 8,8	2 mL	-
Tampão tris-HCl 2 mol/L, pH 6,8	-	240 µL
SDS 10 % (m/m)	100 µL	40 µL
H ₂ O Milli-Q	100 µL	40 µL
Acrilamida/Bis-acrilamida 30 %	5 mL	600 µL
H ₂ O Milli-Q	2,8 mL	3,0 mL
Temed	12 µL	6 µL
Persulfato de amônio (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (PSA) 10 %	60 µL	30 µL

3.1.5. Medidas de espectrometria de massas MALDI-TOF-MS

As frações de proteínas isoladas na cromatografia de exclusão por tamanho e a HbGp íntegra nas formas oxi-, meta-, e cianometa-HbGp foram caracterizadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS. As soluções de proteínas foram dializadas por 24 h contra tampão tris-HCl 5,0 mmol/L, no pH 7,0 para remover o sal presente das amostras. As concentrações finais das amostras usadas nos experimentos de espectrometria de massas foram de 1,0 e 3,0 mg/mL.

O material da matriz de dessorção, o ácido 3,5-Dimetoxi-4-hidroxi-cinâmico (ácido sinapínico), foi dissolvido em 0,5 % de ácido trifluoracético e uma solução 50 % de acetronitrila:água. As amostras da HbGp íntegra e das frações isoladas, na ausência e presença de 50 mmol/L de 2-mercaptoetanol (Sigma), foram misturadas nas razões de 1:5, 1:10 e 1:20

(v/v) com a solução de ácido sinapínico saturada. Um microlitro destas misturas foi depositado nos “spots” da placa de amostras de MALDI-TOF-MS.

As análises foram realizadas, de forma aleatória, em modo linear de íon positivo num espectrômetro de massas da marca Etthan MALDI-TOF (Amersham Bioscience), utilizando uma voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras foram analisadas em duplicata e os espectros foram acumulados com cerca de 200 disparos de laser, onde posteriormente foram analisados no programa *origin 8.0*. O instrumento foi calibrado utilizando os padrões citocromo *c* de coração bovino e BSA, obtidos da Sigma. As massas moleculares das espécies presentes foram obtidas a partir da média dos valores observados em experimentos independentes, e em alguns casos, como, por exemplo, para o monômero *d* a partir dos valores encontrados para as regiões mono- e duplamente protonadas.

3.1.6. Medidas espectroscópicas: absorção óptica, emissão de fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular

As amostras de proteína na concentração de 0,1 mg/mL, nas formas oxi-, meta- e cianometa-HbGp, foram preparadas a partir de estoques concentrados de 10 mg/mL para as três formas da HbGp, em tampão acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0. Estoque de ureia 10 mol/L foi preparado no mesmo tampão e a concentração foi checada por refratometria. Como a adição de ureia altera o pH, o mesmo foi corrigido para 7,0. Inicialmente foram realizadas as diluições para preparar todas as concentrações de ureia, por meio da adição de volumes adequados de tampão acetato-fosfato 30 mmol/L e do estoque de ureia, e posteriormente foi feita a homogeneização das amostras, e adicionado 10 µL do estoque de proteína. Depois de preparadas, as amostras ficaram em repouso por 2 h, antes das medidas.

As amostras para as medidas de CD foram preparadas da mesma forma descrita acima, exceto o tampão utilizado que foi o fosfato 30 mmol/L, e as concentrações de proteína utilizadas nos experimentos na região das ligações peptídicas e do grupo heme foram, respectivamente, de 0,3 e 3,0 mg/mL. Não foi utilizado o tampão acetato devido ao íon acetato absorver em torno de 195 nm, afetando as medidas na região das ligações peptídicas. Os experimentos de CD foram realizados em um espectropolarímetro modelo J-815 da Jasco. Na região das ligações peptídicas a faixa de varredura escolhida foi de 215 - 250 nm, com tempo de resposta de 4 s, velocidade de varredura de 100 nm/min e resolução de 0,5 nm por

ponto. Os espectros foram obtidos a partir de uma média de quatro espectros no modo contínuo. No entanto, as medidas na região do grupo heme foram realizadas numa faixa de varredura de 500 - 250 nm, com tempo de resposta de 2 s, velocidade de varredura de 200 nm/min e resolução de 0,5 nm. Os espectros foram obtidos a partir de uma média de seis espectros no modo contínuo.

As medidas de espalhamento de luz, emissão de fluorescência e absorção óptica foram realizadas em um fluorímetro modelo F4500 da HITACHI e espectrofotômetro modelo UV-1601 da SHIMADZU em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm, sendo todas as medidas realizadas a 25 °C. Os experimentos de espalhamento de luz no fluorímetro foram feitos com ganhos de 400 e 700 V e fendas de excitação e emissão de 2,5 e 5,0 nm, respectivamente, com excitação e emissão fixas no mesmo comprimento de onda de 350 nm. As medidas de emissão de fluorescência foram obtidas com excitação em 280 e 295 nm, sendo os espectros de emissão monitorados na faixa de 290 - 450 nm e 305 - 450 nm, respectivamente.

3.1.6.1. *Análises dos dados espectroscópicos*

As análises termodinâmicas a partir dos dados espectroscópicos foram feitas usando várias técnicas diferentes, como emissão de fluorescência, absorção óptica, espalhamento de luz estático e dicroísmo circular. Dois modelos diferentes, de dois e três estados, foram usados para obter os parâmetros termodinâmicos da desnaturação induzida pela ureia. A caracterização das espécies foi feita pelo algoritmo de deconvolução de espectros CCA “*Convex Constraint Analysis*”.

3.1.6.2. *Convex Constraint Analysis (CCA)*

O programa CCA “*Convex Constraint Analysis*” foi desenvolvido por Perczel e Fasman^{40,41} e é usado na deconvolução de espectros de dicroísmo circular (CD) para estimar a estrutura secundária de proteínas. Neste trabalho o programa CCA foi utilizado para analisar

os espectros de absorção óptica, a fim de caracterizar as diferentes espécies em equilíbrio em função da concentração de ureia ⁴².

O programa CCA está baseado no método do algoritmo simplex, onde é calculado um número variável p de funções de base f_i (espectros das diferentes espécies em equilíbrio) e os respectivos coeficientes C_{ij} da combinação linear das funções f_i , para recuperar as funções f_j (espectros experimentais), como mostra a equação 1 ^{40,41}:

$$f_j = \sum_{i=1}^p C_{ij} f_i \quad \text{Equação (1)}$$

Para uma deconvolução espectral boa, três restrições sobre estes coeficientes são impostas: (1) a soma dos coeficientes é igual a um para cada valor de j , $\sum_i C_{ij} = 1$, onde j é igual a 1, 2, 3..., N , e N é o número de funções experimentais (espectros experimentais) na análise. (2) Os coeficientes são todos positivos, $C_{ij} > 0$ e (3) Os pontos correspondentes ao C_{ij} devem obedecer a um “simplex” no espaço euclidiano de dimensão p com um volume mínimo. A descrição completa e exemplos deste procedimento são apresentados na literatura ^{40,42}.

3.1.6.3. Modelo de desnaturação de dois estados

As análises usando o modelo de dois estados foram feitas assumindo que em 0,0 mol/L de agente desnaturante a HbGp está totalmente enovelada e em 8,0 mol/L a proteína está completamente desnaturada. A fração de proteína desnaturada (f_U) pode ser expressa pela equação 2, mostrada abaixo ^{43,44}:

$$f_U = \frac{y_N - y_X}{y_N - y_D} \quad \text{Equação (2)}$$

onde, y_X é o valor do parâmetro experimental para cada concentração de ureia, e y_N e y_D são os valores observados deste mesmo parâmetro para HbGp no estado nativo e desnaturado, respectivamente ^{43,44}. Neste caso, y_X pode ser a elipticidade nas análises dos dados de dicroísmo circular, ou o máximo de absorção em 415 nm (banda de Soret) quanto o desenovelamento for monitorado por absorção óptica, etc. A estabilidade do estado nativo em relação ao estado desnaturado está intrinsecamente associada à constante de equilíbrio (K), e, no sistema de dois estados pode ser expressa conforme a equação abaixo:

$$K = \frac{f_U}{f_N} = \frac{f_U}{1-f_U} = \frac{y_N - y_X}{y_X - y_D} \quad \text{Equação (3)}$$

A energia livre de Gibbs está relacionada com a constante de equilíbrio através da equação 4:

$$\Delta G_U = -RT \ln K \quad \text{Equação (4)}$$

onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. Baseado nos resultados para muitas proteínas^{44,45}, a energia livre de Gibbs, ΔG_U , tem uma dependência linear com a concentração de agente desnaturante, neste caso, ureia $[D]$.

$$\Delta G_U = \Delta G_{H_2O} - m[D] \quad \text{Equação (5)}$$

ΔG_{H_2O} e $-m$ são, portanto, o intercepto no eixo y e a inclinação, respectivamente, do gráfico de ΔG_U versus $[D]$. A energia livre em água, ou seja, em 0,0 mol/L de ureia, ΔG_{H_2O} , é uma estimativa da estabilidade conformacional da proteína e m é um parâmetro que mostra a dependência de ΔG_U com a concentração de ureia, e está associado com a cooperatividade do processo de desnaturação⁴⁴.

Além disso, os parâmetros termodinâmicos foram determinados por ajustes não lineares, através da equação abaixo⁴⁵:

$$y = \left(\frac{(y_N + m_N \cdot [D]) + (y_U + m_U \cdot [D]) \cdot \exp\left(\frac{m \cdot ([D] - [D]_{1/2})}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{m \cdot ([D] - [D]_{1/2})}{RT}\right)} \right) \quad \text{Equação (6)}$$

onde y , representa o parâmetro experimental, e y_N e y_U são os interceptos dos estados nativos e desnaturado respectivamente, e m_N e m_U são as inclinações da pre- e pós-transição. $[D]$ é a concentração do agente desnaturante, $[D]_{1/2}$ a concentração no ponto médio da curva de desnaturação e m é o parâmetro mostrado na equação 5.

3.1.6.4. Modelo de desnaturação de três estados

Devido a complexidade do sistema em estudo, as análises dos parâmetros do processo de desnaturação da HbGp na presença de ureia foram realizadas também por um modelo de três estados. Assim, foi possível fazer uma análise comparativa entre os dois modelos. Neste modelo, é assumido, que a proteína no estado nativo (N) está em equilíbrio com um

intermediário (I) e o estado desenovelado (U). O modelo de três estados reconhece a presença de um intermediário estável (I), que é ocupado durante a transição a partir do estado enovelado (N) e a caminho do estado desnaturado (U)⁴⁶.

O esquema 2 mostra uma reação de desnaturação por três estados, onde os estados nativos e desenovelado estão em equilíbrio com um estado intermediário^{46,47}.

A dependência do parâmetro experimental com a concentração de desnaturante, para o modelo de três estados, é dada pela equação 7 [26]:

$$y = \frac{y_N + y_I \exp\left[-\left(\frac{\Delta G_1^0 - m_1[D]}{RT}\right)\right] + y_U \exp\left[-\left(\frac{[\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 - (m_1 + m_2)][D]}{RT}\right)\right]}{1 + \exp\left[-\left(\frac{\Delta G_1^0 - m_1[D]}{RT}\right)\right] + y_U \exp\left[-\left(\frac{[\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 - (m_1 + m_2)][D]}{RT}\right)\right]} \quad \text{Equação (7)}$$

onde, y é o sinal medido, y_N , y_I e y_U são os interceptos associados aos estados nativo, intermediário e desnaturado, respectivamente. m_1 e m_2 são os coeficientes angulares (inclinações) da pré- e pós-transição. As energias livres, ΔG_1 e ΔG_2 são, respectivamente, associadas à transição do estado nativo para o estado intermediário ($N \rightarrow I$), primeira transição, e do estado intermediário para o estado desenovelado ($I \rightarrow U$), segunda transição, $[D]$ é a concentração de ureia. R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta em Kelvin. Os ajustes das curvas de desnaturação foram feitos no *origin 8.0*.

Os valores de $[D]_{1/2}$ podem ser determinados através da razão entre a energia livre de Gibbs e as respectivas inclinações de cada transição, m_1 e m_2 como mostrada na equação 8⁴⁷:

$$([D]_{1/2})_1 = \Delta G_1 / m_1 \quad \text{e} \quad ([D]_{1/2})_2 = \Delta G_2 / m_2 \quad \text{Equação (8)}$$

3.1.6.5. Reversibilidade do processo de desnaturação da HbGp

A reversibilidade da reação de desnaturação da HbGp foi testada através da comparação do sinal observado dos espectros de absorção óptica e emissão de fluorescência. As amostras foram incubadas em diferentes concentrações de ureia (0,0 a 8,0 mol/L) por duas horas a 25 °C. A ureia foi removida por meio de diálise contra tampão fosfato 30 mmol/L por 6 h. Os espectros de absorção óptica e emissão de fluorescência foram medidos antes e depois

da diálise, e os resultados foram comparados com as propriedades observadas para a proteína nativa (0,0 mol/L de ureia).

3.1.7. Medidas de ultracentrifugação analítica

Os experimentos de velocidade de sedimentação (SV) foram realizados a 20 °C, usando um rotor do tipo An60Ti e velocidade de rotação de 20.000 a 40.000 rpm em uma ultracentrífuga analítica da Beckman Optima XL-A instalada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas. As curvas de absorbância em função do raio da cela foram monitoradas em dois comprimentos de onda, 236 e 416 nm, com intervalo radial de 0,003 cm. Nas medidas de equilíbrio de sedimentação (SE) foram realizados experimentos em três velocidades diferentes, 15.000, 20.000 e 30.000 rpm, monitorados apenas em 415 nm.

As amostras de trímero *abc*, monômero *d* e dodecâmero (*abcd*)₃ previamente purificadas e concentradas como descrito na seção 3.1.2, foram diluídas em tampão tris-HCl 100 mmol/L + 50 mmol/L NaCl, pH 7,0, para obter-se um estoque na concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, as amostras foram dialisadas contra o mesmo tampão por 48 h. Neste período o tampão da diálise foi substituído a cada 12 h, e a última fração foi reservada para ser utilizada como referência no experimento de AUC. Posteriormente, a concentração de cada estoque é verificada no espectrofotômetro e duas horas antes das medidas é feita a diluição das amostras, a fim de se obter concentrações na faixa adequada para realizar os experimentos, ou seja, de 100 a 800 µg/mL.

Para preparar as amostras de proteínas nas formas oxi-, meta-, e cianometa-HbGp em diferentes valores de pH (5,0 a 10,0) as amostras de proteína previamente obtidas conforme descrito nas seções 3.1.1. e 3.1.3, foram diluídas em tampão misto acetato-fosfato a fim de se obter estoques com concentração de 1,0 mg/mL. A etapa seguinte é idêntica a descrita na preparação das subunidades da HbGp, trímero, monômero e dodecâmero mostrada acima.

Nos experimentos para avaliar e caracterizar o equilíbrio de dissociação/desnaturação da HbGp na presença de ureia, as amostras da hemoglobina na forma oxi- foram preparadas em tampão tris-HCl 100 mmol/L contendo 50 mmol/L NaCl, pH 7,0, a partir de um estoque concentrado de proteína 25 - 30 mg/mL. Um estoque de proteína foi preparado na concentração de 1,0 mg/mL, e dialisada por 48 h contra tampão tris-HCl 100 mmol/L + 50 mmol/L NaCl, pH 7,0. Neste intervalo o tampão de diálise foi substituído quatro vezes sendo

a última alíquota reservada para ser utilizada como referência no experimento. Após a diálise o espectro de absorção foi medido para checar a concentração final do estoque.

Duas horas antes do experimento foram preparadas três amostras de proteína nas concentrações 100, 200 e 300 µg/mL para uma concentração de ureia específica. Inicialmente foram adicionadas alíquotas de tampão tris-HCl 100 mol/L + 50 mmol/L de NaCl e do estoque de ureia preparado da mesma forma descrita no item 3.1.6.. Posteriormente foi feita a homogeneização das amostras e adicionado volumes adequados do estoque de proteína para obter as três concentrações desejadas.

3.1.7.1. Análises dos dados de AUC

Os dados de AUC de velocidade de sedimentação foram analisados usando os programas SEDFIT ⁴⁸⁻⁵¹ versão 14.1 e SEDPHAT versão 9.40 ⁵²⁻⁵⁴. As funções de distribuição de coeficientes de sedimentação, $c(S)$, foram analisadas no programa SEDFIT através do modelo “*Continuous $c(S)$ Distribution model*” ^{48,50}. As curvas de distribuições $c(S)$ foram obtidas fixando o valor de V_{bar} em 0,733 mL/g, e deixando a razão friccional (f/f_0) livre, ou seja, como o parâmetro de regularização do ajuste. A viscosidade (η) e densidade (ρ) foram determinadas independentemente usando o programa Sednterp ^{51,55}, e fixados como parâmetros de entrada no SEDFIT. O grau de confiança nas análises foi de 0,85.

O coeficiente de sedimentação sofre interferência da viscosidade e densidade do meio, assim o coeficiente de sedimentação experimental s^* deve ser corrigido para a condição padrão, ou seja, transformado em $s_{20,w}$ no qual o solvente é a água. A transformação de s^* em $s_{20,w}$ pode ser feita diretamente no SEDFIT ou no Sednterp. Posteriormente, o $s_{20,w}$ através de uma regressão linear é transformado em $s_{20,w}^0$. O $s_{20,w}^0$ é a expressão do coeficiente de sedimentação em diluição infinita (0 mol/L de proteína), livre de todos os interferentes, viscosidade, densidade do tampão e concentração da amostra ¹⁷.

As análises das massas moleculares (MM) das espécies presentes em equilíbrio a partir dos dados de velocidade de sedimentação (SV) foram obtidas por ajustes globais no programa SEDPHAT. O modelo “*Species analysis*” foi utilizado nas análises do ajuste global. Todos os parâmetros, coeficiente de sedimentação e massa molecular, foram deixados livres durante o ajuste. Em seguida uma análise estatística foi feita usando o método de “*Monte-Carlo non-linear regression*” com 200 iterações e grau de confiança de 0,68 ¹⁹.

Os dados de equilíbrio de sedimentação (SE) foram analisados no programa SEDPHAT. As análises globais foram feitas com dados no meio alcalino (pH 10,0), e em 5,0 mol/L de ureia no pH 7,0 para três concentrações de proteína (100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$), e em três velocidades 15.000, 20.000 e 25.000 rpm. Os parâmetros de entrada, MM e coeficiente de sedimentação, foram estimados a partir de dados de espectrometria de massas e dos dados de SV, respectivamente. Porém, estes parâmetros foram deixados livres durante o processo de ajustes. O método estatístico e o grau de confiança foram os mesmos utilizados para as análises globais dos dados de SV.

3.1.8. Medidas de SAXS

Foram preparadas a partir de estoques concentrados, conforme descrito nas *seções* 3.1.1 e 3.1.3, amostras da HbGp, nas formas oxi- e cianometa-HbGp 0,5 e 3,0 mg/mL, em tampão acetato-fosfato 30 mmol/L, no pH 7,0, na presença de ureia, na faixa de concentrações de 0,0 - 8,0 mol/L. Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil, utilizando uma distância amostra-detector de 731 mm e um comprimento de onda de raios X, λ , de 1,608 Å. As curvas de espalhamento das amostras e dos tampões, na ausência e na presença de ureia, foram medidas no intervalo de q de 0,007 - 0,23 Å⁻¹, por 90 s. As intensidades experimentais das amostras e dos tampões foram corrigidas pela atenuação da amostra, homogeneidade do detector e espalhamento do branco.

3.2 – TÉCNICAS

3.2.1 – Absorção óptica

A espectroscopia de absorção óptica no UV-VIS tem ampla aplicação em laboratórios de análises e pesquisas físicas, químicas, bioquímicas, etc. Inúmeras vantagens contribuem para sua popularidade; a principal é o fato de ser uma técnica espectroscópica quantitativa ⁵⁶.

Aliado a isto, a técnica tem baixo custo operacional, é de fácil utilização e produz resultados de interpretação geralmente bastante simples. Em laboratórios analíticos, esta técnica é muito utilizada na quantificação direta de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, ou na quantificação indireta de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas. A espectroscopia de UV-VIS é utilizada desde a caracterização físico-química de reações químicas e bioquímicas, na descrição de mecanismos e cinéticas de reações biológicas complexas, etc ⁵⁶.

Quando a amostra é irradiada, parte da radiação incidente é absorvida pelas moléculas da matéria pela promoção de elétrons do estado fundamental para níveis de energia mais elevados (estados excitados). O intervalo de tempo característico do processo de absorção por moléculas em solução é de aproximadamente 10^{-15} s, sendo considerado muito curto para que ocorra deslocamento significativo entre os núcleos atômicos das moléculas. A energia absorvida (E) está relacionada com a frequência da radiação pela equação de Planck ($E = h\nu$), onde h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência da radiação ^{56,57}.

A espectroscopia de absorção no UV-VIS apresenta também limitações que são intrínsecas à sua qualidade quantitativa. A Figura 3 esquematiza a determinação quantitativa da absorção de luz por uma amostra, ou melhor, sua densidade óptica, na qual incide um feixe de luz de comprimento de onda λ e intensidade I_0 ; ao ser absorvido, a intensidade do feixe decai exponencialmente com o caminho óptico l percorrido no interior da amostra.

Figura 3: Diagrama representativo do fenômeno de absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrida pela radiação no interior da amostra (caminho óptico)

Sendo I , a intensidade do feixe emergente da amostra, a absorbância (A) ou densidade óptica da amostra é dada pela equação 9, conhecida como Lei de Beer-Lambert (no caso de amostras constituídas por um único cromóforo).

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon cl \quad \text{Equação (9)}$$

onde, ε é o coeficiente de extinção molar da amostra para a radiação de comprimento de onda λ , l o caminho óptico e c a concentração do cromóforo na amostra. No caso de amostras com n cromóforos distintos, a absorção total será a soma das contribuições individuais da absorbância de cada espécie absorvedora, sendo descrita pela equação 10.

$$A = \sum_i \varepsilon_i c_i l \quad \text{Equação (10)}$$

A maioria dos espectrofotômetros de UV-VIS de duplo feixe apresentam boa linearidade na região de absorbância entre 0,01 e 3, enquanto que medidas com boa precisão são obtidas na faixa de absorbância entre 0,1 e 1.

3.2.2 – Espectroscopia de fluorescência

A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singlete, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência (Figura 4). Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto, T_n)^{56,58}.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica bastante útil no estudo de moléculas biológicas. As modificações na estrutura tridimensional de uma proteína, associados, por exemplo, ao processo de desnaturação, supressão e interação com pequenas moléculas e com o meio, podem ser avaliadas através desta técnica.

A emissão de fluorescência ocorre quando uma dada molécula é excitada, por meio da absorção de fótons, seguida por emissão de luz em comprimento de onda maior, ou seja, a energia emitida pelas moléculas na forma de fluorescência é menor que a energia envolvida no processo de absorção. Como o tempo de vida da molécula no estado excitado é relativamente longo, cerca de 10^{-9} s, parte da energia absorvida é transferida para o meio, ou seja a fluorescência é suprimida por vários fenômenos, tais como: movimentos vibracionais, rotacionais, presença de moléculas supressoras específicas, etc⁵⁶.

Figura 4: Diagrama de Jablonski. (1) Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$), (2) Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), (3) Conversão interna e relaxação vibracional ($S_1 \rightarrow S_0$), (4) Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$), (5) Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$)⁵⁷.

Fonte: Bassi, A. B. M. S. Conceitos Fundamentais em Espectroscopia. Chemkeys, p. 1-14, 2001.

Embora muitas moléculas interajam com a radiação eletromagnética absorvendo luz, poucas moléculas na natureza apresentam fluorescência. Quando a diferença de energia entre S_1 (primeiro estado Singlete excitado) e S_0 (estado fundamental) não for muito grande e existir possibilidade de sobreposição de níveis vibracionais, a molécula pode ser levada ao estado fundamental, S_0 , por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética. No entanto, quando a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental ocorrerá com emissão de radiação na forma de fluorescência, Figura 4^{56,58}.

Os processos de desativação radiativos ou não radiativos dependem não somente da sua probabilidade relacionada com o coeficiente de Einstein para emissão espontânea, controlada pelas regras de seleção, mas também das diferenças de energias entre os estados e da cinética dos processos, através dos valores relativos das constantes de velocidade⁵⁸.

Para que ocorra a fluorescência, uma molécula precisa ter a estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa $S_1 \rightarrow S_0$. Esses dois fatores são críticos na determinação da magnitude da eficiência quântica de fluorescência de uma substância. A eficiência quântica de fluorescência (ou rendimento quântico) de uma substância é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos. Uma

molécula será significativamente fluorescente se sua eficiência quântica tiver magnitude considerável entre 0,1 e 1 ⁵⁶.

A espectroscopia de fluorescência é uma excelente técnica para monitorar processos de dissociação e desnaturação de proteínas. A fluorescência das proteínas é do tipo intrínseca, ou seja, é associada aos aminoácidos aromáticos, que fazem parte de sua constituição e são responsáveis pela emissão de fluorescência.

Os três aminoácidos aromáticos presentes são responsáveis pela fluorescência das proteínas: triptofano, tirosina e fenilalanina. O estudo da emissão de fluorescência do triptofano é o mais comum em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados com mudanças conformacionais de proteínas. Isto se deve em parte pelo fato do triptofano ser bastante sensível ao ambiente ao qual ele está exposto, apresentando diferentes características fluorescentes, que são dependentes do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína. Além disso, este aminoácido apresenta um bom rendimento quântico, quando comparado aos outros dois. Embora o rendimento quântico da tirosina seja significativo na forma de aminoácido livre, quando na cadeia polipeptídica o aminoácido é muito suscetível de supressão. No caso da fenilalanina a absorção e o rendimento quântico são desprezíveis comparados com os outros dois. Proteínas na presença de ligantes podem sofrer mudanças na região dos triptofanos que podem ser monitoradas pela técnica de fluorescência, fornecendo informação relevante sobre a estrutura terciária ⁵⁸.

3.2.3 – Dicroísmo Circular (CD)

A espectropolarimetria de CD “*Circular dichroism*” é amplamente utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de uma determinada proteína e avaliar mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes (pH ácido, ureia, cloridrato de guanidina, etc) e temperatura ^{59,60}. A avaliação da estabilidade de uma dada proteína frente à desnaturação utilizando a técnica de CD pode também fornecer informações sobre processos dinâmicos, como interações com ligantes e presença de domínios na proteína com diferentes estabilidades ⁶⁰.

Esta técnica consiste em excitar uma amostra de interesse com um feixe de luz polarizada circularmente à direita e à esquerda. O sinal é dado em termos da diferença ($\theta = Lr - Rr$) em função do comprimento de onda. Essa diferença de absorção à direita e à esquerda e

a distorção do plano de polarização da luz são sensíveis a mudanças na estrutura da biomolécula.

Grande parte das moléculas biológicas são assimétricas e possuem a capacidade de interagir com a luz polarizada, ou seja, absorvem parte da radiação polarizada quando o vetor campo elétrico da radiação se encontra paralelo ao vetor do momento de dipolo da molécula. Com isso, o dicroísmo circular é uma ferramenta poderosa para estudar mudanças na estrutura de biomoléculas ⁵⁹⁻⁶¹. No meio biológico grande número de moléculas possuem atividade óptica, sendo, a grande maioria formada por estruturas complexas, e que facilita a presença de um grande número de centros assimétricos ^{60,61}. As proteínas possuem basicamente quatro tipos de organização estrutural, a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. As estruturas primárias são regulares e planares devido às ligações peptídicas rígidas ($\text{O}=\text{N}-\text{C}-$) tendo o restante da cadeia um alto grau de liberdade. Essas características limitam a orientação dos peptídeos vizinhos, no entanto, essa maior liberdade do restante da cadeia possibilita várias interações intramoleculares de hidrogênios ($-\text{N}---\text{H}-$) e ($-\text{O}---\text{H}-$) e vários arranjos intramoleculares dessas ligações de hidrogênio entre o $\text{C}-\text{O}$ de uma unidade peptídica e o $\text{N}-\text{H}$ de outras unidades da cadeia polipeptídica ⁵⁹⁻⁶¹.

Assim, a técnica de CD permitirá avaliar o aumento de acessibilidade do solvente em função da formação de conformação espacial aleatória para as cadeias polipeptídicas, bem como monitorar as mudanças de estrutura secundária em função do pH, na presença de agentes desnaturantes (ureia) e aumento da temperatura. Assim, torna-se possível estudar os mecanismos de dissociação e desnaturação, avaliando também a influência dos estados de oxidação da HbGp.

3.2.4 – Ultracentrifugação Analítica (AUC)

A técnica de ultracentrifugação analítica (AUC - do inglês *Analytical ultracentrifugation*), é uma ferramenta poderosa para estudar o comportamento de macromoléculas biológicas, sendo atualmente bastante utilizada no estudo de proteínas, carboidratos e polímeros. Através desta técnica é possível determinar a massa molecular (MM) da macromolécula e obter informações sobre a heterogeneidade do sistema em relação à sua MM , ou seja, de quantas subunidades o sistema é formado e qual a proporção entre elas

^{51,62}. Esta técnica pode também ajudar a determinar se a macromolécula forma agregados e se estes são reversíveis ou irreversíveis ⁶².

Esta técnica é uma ferramenta importante em muitas áreas tradicionais da bioquímica, polímeros sintéticos, biologia molecular, interações de proteína, como também tem sido empregada em outras áreas, mais recentemente, como, a química supramolecular, a caracterização de nanopartículas e biomateriais, e no desenvolvimento de condições para aprimoramento da indústria farmacêutica ⁶³.

Embora, a AUC desempenhou um papel notável na história da caracterização de proteínas e complexos, esta metodologia sofreu um declínio por muitos anos, em grande parte devido à falta de novos instrumentos modernos que facilitem a coleta de dados. Felizmente, este problema foi solucionado nas últimas décadas, com o avanço da informática, sendo que esta técnica foi transformada pela combinação de novos e importantes programas computacionais para a análise de dados, permitindo o uso de novas abordagens para a determinação dos coeficientes de sedimentação e deconvolução dos dados experimentais, entre outros ⁶⁴. Esta técnica é considerada uma técnica absoluta por não requerer a calibração no processo de análise, o que elimina erros oriundos deste tipo de procedimento analítico.

A técnica de ultracentrifugação analítica foi proposta e usada pela primeira vez por Svedberg, onde foi aplicada para demonstrar a homogeneidade de sistemas de elevada massa molecular, provando assim a existência das macromoléculas ^{65,66}.

Uma partícula em solução está em constante movimento aleatório que é chamado de movimento Browniano ⁶⁶. A energia cinética associada ao movimento Browniano das partículas está associada a dois tipos de movimentos característicos das moléculas em solução: a difusão translacional e a difusão rotacional que representam o movimento de translação das partículas na solução e a rotação da partícula em torno do seu próprio eixo, respectivamente. A força cinética da partícula em solução encontra uma força de resistência chamada de força friccional (F_f) que depende da sua velocidade e de uma constante relacionada à sua forma e tamanho, denominada de coeficiente friccional (f), sendo que este parâmetro depende da viscosidade da solução ^{51,67}.

Na ausência de uma força externa adicional e se a massa (m) da partícula for desprezível para sedimentar pela ação da gravidade, as duas forças vetoriais, cinéticas e friccional, se anulam resultando num movimento aleatório denominado de difusão. O coeficiente de difusão (D) quantifica a velocidade da partícula no meio, considerando uma área em função do tempo ^{48,51}.

Segundo Einstein, D está relacionado à temperatura absoluta (T), à constante dos gases (R), ao número de Avogrado (N_{AV}), à constante de Boltzmann (k_b) e é inversamente proporcional ao f , pela seguinte equação⁴⁸:

$$D = \frac{RT}{N_{AV}f} = \frac{k_bT}{f} \quad \text{Equação (11)}$$

Desta forma, partículas alongadas ou volumosas apresentam maior resistência à sedimentação devido a que as mesmas apresentam maior fricção ou atrito na solução e por isso caracterizam-se por um valor de D menor do que as partículas compactas ou esféricas^{48,51}. D pode ser facilmente medido experimentalmente a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz, DLS. O coeficiente friccional f de uma partícula está relacionado ao seu raio hidrodinâmico R_H (ou Raio de Stokes) e à viscosidade da solução η por meio da equação de Stokes:

$$f = 6\pi\eta R_H \quad \text{Equação (12)}$$

Partindo da premissa que uma dada partícula seja esférica e compacta, e que esta simetria corresponda a menor fricção de todas as formas possíveis, e, conseqüentemente, tenha um maior coeficiente de difusão, podemos determinar o coeficiente friccional que é representado como f_0 . O f_0 pode ser calculado pela substituição do R_H na equação 12 pelo raio de uma esfera compacta e lisa (R_0) que pode ser estimado pela equação abaixo⁵¹:

$$R_0 = \left(\frac{3MV_{bar}}{4\pi N_{AV}} \right)^{1/3} \quad \text{Equação (13)}$$

onde, V_{bar} é o volume parcial específico da partícula. Entretanto, na prática, as macromoléculas em solução são solvatadas e dinâmicas (tem movimento) e não são esféricas. Assim, a massa M determinada usando as técnicas de cromatografia de exclusão por tamanho e o DLS está relacionado ao R_H da partícula através da equação 14, e fornece apenas uma indicação do tamanho “aparente” dessa proteína dinâmica solvatada. Uma proteína monomérica, porém assimétrica, apresentará um R_H superior ao calculado para a mesma proteína globular e pode erroneamente sugerir, em alguns casos, que ela seria um dímero aparente^{48,51,68}. Conhecendo-se o valor de f experimental de uma partícula, é possível avaliar se ela é uma partícula esférica ou globular através da razão do f pelo f_0 conhecido como razão friccional (f/f_0). O f/f_0 pode ser calculado indiretamente usando o R_H através da equação abaixo⁶⁸:

$$\frac{f}{f_0} = \frac{6\pi\eta R_H}{6\pi\eta R_0} = \left(\frac{4\pi\eta N_{AV}}{3}\right)^{\frac{1}{3}} R_H (MV_{bar})^{-\frac{1}{3}} \quad \text{Equação (14)}$$

Partículas com formatos diferentes ao de uma esfera compacta e lisa (esferóides oblatos, prolatos, etc), considerando a razão do comprimento **a** *versus* a altura **b**, **a/b**, mas de mesma MM, apresentarão um f/f_0 maior do que 1. Por outro lado, uma proteína globular apresentará o valor de f/f_0 próximo a 1. Desta forma, a determinação do valor de f/f_0 é uma ferramenta importante para o estudo da simetria e da estrutura de proteínas por técnicas hidrodinâmicas ^{48,51,66}.

Sendo conhecidos alguns dos parâmetros importantes comuns às partículas em solução podemos avaliar as forças que atuam em uma dada partícula de MM, quando exposta a um campo de força centrífuga alto. A Figura 5 mostra as três forças que atuam em uma partícula de massa M em solução. A força centrípeta, F_c , é uma força que favorece a sedimentação sendo proporcional à velocidade angular (ω). Duas outras forças opostas a esta força atuam no sistema, a força de empuxo F_{Emp} , que depende apenas do volume parcial específico V_{bar} e da densidade da partícula (ρ) e a força friccional F_f que está estritamente relacionada ao formato da partícula ^{62,66}, e depende da velocidade da partícula e do coeficiente friccional.

Figura 5: Forças que atuam em uma partícula em solução. F_f - Força friccional, F_c - Força centrípeta e F_{Emp} - Força de empuxo.

Quando em um sistema a velocidade angular (ω) é constante, as forças que atuam no sistema se anulam ($F_c + F_{Emp} + F_f = 0$) e a velocidade de sedimentação da partícula pode ser definida pela equação abaixo ⁶⁹:

$$v = \frac{[\omega^2 r m (1 - V_{bar} \rho)]}{f} \quad \text{Equação (15)}$$

Como a massa de uma partícula é ($m = M/N_{Av}$), podemos reorganizar a equação acima em função de v , ω e r a fim de chegarmos a equação de Svedberg,^{51,69}.

$$\frac{M(1-V_{bar}\rho)}{N_{Av}f} = \frac{v}{\omega^2 r} = s \quad \text{Equação (16)}$$

A equação $v/\omega^2 r = s$ é comumente conhecido como o coeficiente de sedimentação. Portanto, a partir de experimentos de ultracentrifugação analítica podemos obter parâmetros associados às propriedades hidrodinâmicas das partículas, tais como s , D e f . Os fatores complicadores na análise de dados de AUC são a polidispersão de amostras ou a possível presença de mais de uma espécie em solução nas condições estudadas⁵¹.

A partir das equações 11 e 16 podemos obter uma equação que relaciona os parâmetros s , D e M , conhecida como a equação de Svedberg-Einstein:

$$M = \frac{sRT}{D(1-V_{bar}\rho)} \quad \text{Equação (17)}$$

Como podemos observar na equação 17, por meio da técnica de ultracentrifugação analítica é possível determinar valores precisos de massa de macromoléculas, pois há uma relação direta entre o valor de s (coeficiente de sedimentação) e a massa molecular da partícula^{51,69}. Além disso, é possível obter informações importantes sobre a forma e a simetria das proteínas em solução através da razão friccional (f/f_0), coeficiente de difusão (D) e raio de Stokes R_s .

3.2.5 – Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS – do inglês “*Small-angle X-ray scattering*”) é uma ferramenta importante para o estudo de macromoléculas biológicas, tais como, proteínas e lipídios, entre outras^{70,71}. Nos últimos anos o uso desta técnica tem avançado bastante principalmente devido ao desenvolvimento de programas computacionais robustos para análises e modelagem dos dados experimentais. Além disso, vale destacar que a técnica de SAXS apresenta uma grande vantagem, pois possibilita o estudo de macromoléculas em solução em condições similares ao estado nativo, permitindo assim inferir e caracterizar as mudanças na estrutura terciária e quaternária de proteínas em

soluções, induzidas por agentes externos, tais como, temperatura, variações nos valores de pH, adição de ureia e cloridrato de guanidina.

O espalhamento de raios X a baixo ângulo é um processo de espalhamento elástico que ocorre quando o feixe de raios X atravessa a amostra e interage com os elétrons do material ^{71,72}. A intensidade de espalhamento de uma partícula depende de alguns fatores como o número de partículas espalhadora, a forma da partícula e as posições relativas entre as partículas no meio ^{71,72}. A intensidade do espalhamento de raios X a baixo ângulo para um sistema monodisperso é dada pela equação 18, ^{73,74}:

$$I(q) = n \cdot F^2(q) S(q) \quad \text{Equação (18)}$$

onde n é um fator que depende da densidade de partículas, e $F^2(q) = \langle F^2(\vec{q}) \rangle$ é o fator de forma da partícula espalhadora e $S(q) = \langle S(\vec{q}) \rangle$ é o fator de estrutura do sistema, e está relacionado com as interações das partículas no meio ⁷¹⁻⁷⁵. Para sistemas de partículas espalhadoras, no qual as interações entre partículas são despreciables, ou seja, em soluções bem diluídas, o fator de estrutura do sistema é aproximadamente igual a 1, e a intensidade de espalhamento $I(q)$ é proporcional a forma das partículas em solução. Desta forma, assumindo o caso ideal, onde as partículas são esféricas e não interagem entre si, Guinier mostrou que para $q \rightarrow 0$, a curva de intensidade pode ser descrita como uma função exponencial ⁷²:

$$I(q) \cong I(0) \exp \frac{-q^2 R_g^2}{3} \quad \text{Equação (19)}$$

onde os valores de raio de giro da partícula (R_g) e os de intensidade quando $q \rightarrow 0$ ($I(0)$) podem ser obtidos do intercepto e da inclinação do ajuste linear do gráfico de Guinier ($\ln I(q)$) em função de q^2 . A Lei de Guinier é válida na região de q que satisfaz à condição $q \cdot R_g \leq 1.0$.

O programa GNOM ^{70,73,75} desenvolvido por Svergun calcula os valores de raio de giro (R_g) e as intensidades de espalhamento quando q tende a zero ^{70,75} a partir da função distribuição de distâncias $p(r)$. Além disso, a função de distribuição das distâncias, $p(r)$ pode fornecer informações importante sobre a geometria da partícula em solução ^{71,72}. A função $p(r)$ pode ser obtida a partir da transformada inversa da transformada de Fourier de $I(q)$, a qual possui valor igual a 0 na dimensão máxima da partícula, D_{max} .

Assim, as análises de dados de SAXS permitem uma descrição detalhada da estrutura de proteínas, que podem ter tamanho variável. Em geral, o empacotamento cristalográfico leva à perda da informação exata a respeito da estrutura quaternária de uma proteína. Uma pequena mudança na posição relativa dos domínios, ou subunidades, pode ser visualizada

melhor quando a proteína encontra-se no estado nativo. Desta forma, a técnica de SAXS pode fornecer informações complementares aos dados cristalográficos, em termos de comportamento global da macromolécula^{70,71,74}.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I

**CARACTERIZAÇÃO DAS SUBUNDADES POR
CROMATOGRRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO,
ELETROFORESE SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS e AUC**

4.1. Caracterização das subunidades da HbGp

4.1.1. Dados da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e de eletroforese SDS-PAGE

A Figura 6A mostra o cromatograma da oxi-HbGp 18 mg/mL, exposta ao pH 9,6 durante 15 h, seguido por re-acidulação ao pH 7,0 antes da aplicação na coluna. Várias espécies são observadas em equilíbrio associadas à dissociação oligomérica, sendo que as mesmas foram reunidas em seis frações, indicadas na Figura 6A por I - VI, para caracterização por eletroforese SDS-PAGE e espectrometria de massas. No entanto, com base em estudos anteriores ¹, e na relação entre as absorções em 415 e 280 nm (Figura 6B), é possível fazer algumas associações preliminares destas frações. O primeiro pico corresponde a uma fração de proteína não dissociada. O cromatograma da oxi-HbGp no pH 7,0 é caracterizado por um único pico estreito, eluído no volume de exclusão da coluna em torno de 77 mL (dados não mostrados) ¹. A fração IV é devido à contribuição do trímero *abc*, e a fração VI está associada à subunidade monomérica *d* com elevado grau de pureza, como observado em estudos anteriores de MALDI-TOF-MS ¹⁸ e ultracentrifugação analítica ¹⁹. As frações II e III podem ser atribuídas às subunidades maiores que contém grupo heme, devido à maior absorção em 415 nm quando comparada com a absorção em 280 nm, sendo provavelmente ricas em dodecâmero e tetrâmero, respectivamente.

As demais frações II, III e V, foram submetidas a estudos por outras técnicas para uma melhor caracterização. Vale mencionar que, a fração V é rica em cadeias linkers, pois é observada uma razão entre as absorbâncias 415 e 280 nm próxima de 1 (Figura 6B). Todas as frações foram coletadas e caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, Figura 7), na ausência e na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol.

Figura 6: (A) Cromatogramas da oxi-HbGp 18,0 mg/mL, em tris-HCl 0,1 mol/L incubada no pH 9,6, a 25 °C por 15 h. (B) Gráfico da razão das absorbâncias em 415 e 280 nm. Os algarismos romanos (I-VI) correspondem a diferentes espécies obtidas da dissociação em meio alcalino da HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

A Figura 7 mostra os géis de eletroforese das frações da HbGp obtidas a partir da cromatografia de exclusão por tamanho mostrada na Figura 6A, na ausência (Figura 7A) e na presença do agente redutor (Figura 7B). O primeiro poço identificado pela letra S contém os padrões de proteína com massas moleculares no intervalo de 10 a 200 kDa. Na Figura 7A os poços 2-3 e 6-7 correspondem, respectivamente, as frações I e IV (Figura 6A). Nestas frações (I e IV) é observada uma banda bastante intensa em torno de 48 kDa atribuída ao trímero *abc*. Estudos anteriores de MALDI-TOF-MS mostraram uma massa para a espécie *abc* de 52 kDa [9], sendo o valor estimado por eletroforese SDS-PAGE razoável, considerando a limitação desta técnica. Estudos de caracterização das subunidades reportados para as hemoglobinas de *Lumbricus terrestris*²¹ e *Arenicola marina*²² atribuem, respectivamente, as massas de 51,068 e 49,560 Da ao trímero *abc*. Três bandas adicionais, sendo duas em 32 e 27 kDa associadas as cadeias linkers, e a outra atribuída ao monômero *d*, em torno de 12 kDa são observadas nas frações I e IV. Por outro lado, a partir da comparação entre os poços 2-3 (fração I) com o último poço na qual a HbGp purificada foi aplicada (W, Figura 7A) pode-se concluir que a fração I extraída da cromatografia está associada a HbGp íntegra residual.

Figura 7: Eletroforese em gel de SDS-PAGE das frações obtidas a partir da cromatografia de exclusão por tamanho. As massas moleculares de proteínas padrão foram de 200, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa,

e são indicadas do lado esquerdo da figura. Os poços indicados pelas letras (S) e (W), correspondem as massas dos padrões e da proteína íntegra (HbGp), respectivamente. (A) Eletroforese em gel na ausência de 2-mercaptoetanol e (B) com o agente redutor. Os algarismos romanos correspondem às diferentes espécies obtidas da dissociação alcalina mostrada na Figura 6A.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

Adicionalmente, a fração IV pode ser atribuída ao trímero **abc**, embora uma pequena quantidade de cadeias linkers esteja presente nesta fração. A fração V mostrada no cromatograma da Figura 6A apresenta várias bandas relativamente fracas no intervalo entre 20 e 35 kDa, que são, provavelmente, devido a contribuição das cadeias linkers e pequenas contaminações de monômero **d** e trímero **abc**. As frações II e III mostradas, respectivamente, nos poços 4 e 5, são pouco concentradas em comparação com os outros picos mostrados na Figura 6A, e consequentemente as intensidades das bandas nos géis são menores. A distribuição de bandas das frações II e III no gel (Figura 7A), sugerem que estas estejam associadas ao dodecâmero **(abcd)₃** e ao tetrâmero **abcd**, respectivamente. A fração VI é a mais intensa e pura, sendo observada apenas uma única banda em 12 kDa, atribuída ao monômero **d** (Figura 7A).

Nas frações que foram incubadas com 2-mercaptoetanol não foi observada nenhuma contribuição na faixa de 45 - 50 kDa (Figura 7B), sugerindo que a espécie observada na Figura 7A nesta faixa de massa, atribuída a espécie trimérica, **abc**, sofre dissociação nos monômeros **a**, **b** e **c** em razão da redução das ligações de sulfetos. Além disso, três bandas adicionais acima da banda do monômero **d**, ou seja, de 12 kDa são formadas e são atribuídas aos monômeros **a**, **b** e **c**. As subunidades **a**, **b** e **c** apresentam massas moleculares de 16, 14 e 15 kDa, respectivamente.

4.1.2. Dados de MALDI-TOF-MS da HbGp íntegra

A Figura 8 mostra o espectro de massas da cianometa-HbGp no pH 7,0, na ausência do agente redutor 2-mercaptoetanol. Na Figura 8A dois picos intensos em torno de 8.000 e 16.000 Da, correspondem ao monômero **d**, mono (d^+) e duplamente protonado (d^{2+}), respectivamente. Outros picos de menor intensidade, atribuídos às cadeias linkers, trímero **abc** e tetrâmero **abcd** são observados no espectro. Os valores de *MM* observados para a subunidade d^+ foram de 16.350 ± 15 Da, 16.410 ± 15 Da, 16.615 ± 30 Da e 16.835 ± 35 Da, correspondendo, respectivamente, as isoformas do monômero **d** mono protonada **d₁**, **d₂**, **d₃** e **d₄** (Figura 8B e Tabela 2). Estudos para a HbLt descrevem três isoformas para a cadeia polipeptídica **d** com *MM* de 15.991, 15.988 e 15.958 atribuídas as cadeias **d₁**, **d₂** e **d₃**⁷⁶. Para a hemoglobina de *Arenicola marina* foram observadas duas isoformas **d₁** e **d₂** com *MM* de 16.981 e 17.032 Da respectivamente. Na Figura 8C as isoformas do monômero **d** duplamente protonadas d^{2+} são apresentadas com maior definição dos picos quando comparado com a Figura 8B. As massas das isoformas do monômero **d** mostradas na Tabela 2 são uma média dos valores obtidos a partir dos espectros das Figuras 8B e 8C, ou seja, a partir dos valores observados para o monômero **d**, mono- (d^+) e duplamente protonado (d^{2+}). Para as cadeias linkers mono protonadas **L₁** e **L₂** foram observados valores de *MM* de 25.860 ± 30 e 26.815 ± 20 Da, respectivamente (Tabela 2). As *MM* para as cadeias polipeptídicas da forma cianometa-HbGp são similares aos valores observados anteriormente para outras hemoglobinas análogas^{22,76}.

Figura 8: (A) Espectro de MALDI-TOF-MS da cianometa-HbGp no pH 7,0, sem 2-mercaptoetanol. O inserto mostra a região expandida correspondente as intensidades dos picos associados aos linkers,

trímero e tetrâmero. (B) região expandida entre 15.000 a 19.000 Da, correspondente ao monômero d^+ mono protonado. (C) região expandida entre 8000 a 9000 Da, correspondente ao monômero d^{2+} duplamente protonado. d_1 , d_2 , d_3 e d_4 correspondem as isoformas do monômero d .

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

Para o trímero **abc** são observadas duas contribuições em 51.140 e 51.940 Da, enquanto que o tetrâmero **abcd** apresenta apenas um pico de baixa intensidade com massa molecular de 68,300 Da. A presença de duas isoformas para o trímero **abc** sugere a existência de pelo menos duas isoformas de um dos monômeros que constitui esta espécie. Estudos sobre a HbLt tem mostrado que as cadeias **a** e **d** são constituídas por várias isoformas⁷⁶. Os resultados mostram que, para a HbGp as subunidades que têm isoformas são as cadeias **d** e **c**. A contribuição do dímero de monômero, $(2d_2)^+$, com massa molecular de 32,850 Da observado na Figura 8A está sobreposta com a cadeia linker **L**₃, devido a pequena diferença de massa entre as duas espécies (Tabela 2). A quarta cadeia linker (**L**₄) proposta em outros estudos⁷⁶ da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* não é observada nas análises dos dados de MALDI-TOF-MS, o que sugere que esta subunidade é menos abundante⁷⁷. Além disso, a

cadeia linker de $25,860 \pm 30$ Da, possivelmente, está sobreposta ao trímero duplamente protonado $(abc)^{2+}$ 18,20.

Tabela 2: Massas moleculares (Da) obtidas por MALDI-TOF-MS das subunidades da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp), em diferentes estados de oxidação do ferro.

Espécies	Oxi-HbGp	Oxi-HbGp*	CNmeta-HbGp	CNmeta-HbGp*	Meta-HbGp	Meta-HbGp*
d_1	16.370	16.360	16.350 ± 15	16.345 ± 20	16.335 ± 20	16.360 ± 4
d_2	16.415 ± 10	16.445 ± 20	16.410 ± 15	16.440 ± 30	16.412 ± 20	16.495 ± 20
d_3	16.650 ± 40	16.620	16.615 ± 30	16.620	16.630 ± 10	-
d_4	16.850 ± 40	16.820	16.835 ± 35	16.820	16.795 ± 50	-
b	-	16.480	-	16.500	-	16.460 ± 40
c_1	-	17.330 ± 15	-	17.320 ± 5	-	17.385 ± 10
c_2	-	17.410	-	17.413 ± 20	-	17.410 ± 40
c_3	-	17.546	-	17.548 ± 10	-	17.558 ± 15
c_4	-	17.620	-	17.620 ± 5	-	-
a	-	18.245 ± 20	-	18.245 ± 20	-	18.267 ± 20
L_1	25.780 ± 30	25.870 ± 50	25.860 ± 30	25.870 ± 15	25.817 ± 20	25.940 ± 100
L_2	26.750 ± 80	26.720 ± 80	26.815 ± 20	26.870 ± 60	26.885 ± 40	26.875 ± 100
$2d^{**}$	-	33.870	-	33.710	-	33.985 ± 100
L_4	-	-	-	-	-	-
L_3 or $2d^{***}$	32.870	32.900	32.850	32.910	32.865 ± 80	32.890 ± 80
$2c_2$	-	34.700	-	34.620	-	34.635 ± 20
$T_1(abc)$	51.200	-	51.140	-	51.220 ± 100	-
$T_2(abc)$	51.985	51.630	51.940	51.400	52.025 ± 100	51.915 ± 70
$abcd$	68.400	69.280	68.300	68.270	68.275 ± 60	69.675 ± 35

* Amostras na presença de 2-mercaptoetanol. ** Valores de massas correspondentes a dímero de monômero da isoforma d_4 . *** Valores de massas correspondentes a dímero de monômero da isoforma d_2 .

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

A Figura 9 mostra o espectro de MALDI-TOF-MS para a cianometa-HbGp na presença do agente redutor, 2-mercaptoetanol. O inserto da Figura 9A mostra três picos bem resolvidos no intervalo de 30.000 a 38.000 Da. As massas moleculares de 32.910, 33.710 e 34.620 Da podem ser atribuídas ao dímero do monômero, $2d_2$ ou linker L_3 , dímero de monômero $2d_4$ e dímero do monômero $2c$, respectivamente. A metade dos valores de MM

para as três espécies acima resulta nos valores de 16.405, 16.855 e 17.320 Da, que são próximos dos observados para as cadeias monoméricas, **d**₂, **d**₄ e **c**, respectivamente (Tabela 2).

Figura 9: (A) Espectro de MALDI-TOF-MS da cianometa-HbGp no pH 7,0, com 2-mercaptoetanol. O inserto mostra a região expandida correspondente as intensidades dos picos associados aos linkers, trímero e tetrâmero, e em (B) região expandida entre 15.100 a 19.000 Da correspondente ao monômero **d**⁺ mono protonado, e em (C) região expandida entre 8000 a 9300 Da correspondente ao monômero **d**²⁺ duplamente protonado. **d**₁, **d**₂, **d**₃ e **d**₄ correspondem as isoformas do monômero **d**.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

Nas Figuras 9B e 9C as regiões expandidas para o monômero **d** mono- e duplamente protonado são mostradas, respectivamente. Nestas Figuras vários picos associados às isoformas de cadeias monoméricas **d** e **c** podem ser identificados claramente. Para a cadeia monomérica **c** foram observadas quatro isoformas com valores de *MM* de 17.320 ± 5 , 17.413 ± 20 , 17.548 ± 10 e 17.620 ± 5 Da (Tabela 2), atribuídos às isoformas **c**₁, **c**₂, **c**₃, e **c**₄, nesta ordem²⁰. Os valores de *MM* das subunidades **b** e **a** são, respectivamente, 16.500 e 18.245 ± 20 Da (Tabela 2). Para estas duas subunidades não foi identificada nenhuma isoforma.

4.1.3. Dados de MALDI-TOF -MS das subunidades da HbGp obtidas de SEC

Na Tabela 3 são mostradas as massas das espécies presentes em cada fração de proteína, obtida da cromatografia de exclusão por tamanho mostrada na Figura 6. Como mencionado anteriormente nas *seções 4.1.1 e 4.1.2.*, a fração I tem composição semelhante à observada para a proteína íntegra (primeira coluna da Tabela 2), sugerindo que a alcalinização do meio mantém uma fração de proteína com a estrutura íntegra (Tabela 3). No entanto, não foi observada a contribuição do tetrâmero $(abcd)^+$ nesta fração devido a sua menor concentração, quando comparada com a amostra da HbGp purificada antes da alcalinização. A fração II foi exposta ao agente redutor 2-mercaptoetanol. Para esta fração, a adição do 2-mercaptoetanol induz um alargamento dos picos no espectro, dificultando a resolução das quatro isoformas do monômero d (Tabelas 2 e 3). Apenas a isoforma mais intensa d_2 possibilitou obter um valor de MM preciso de $16,470 \pm 14$ Da. Com base na composição das espécies mostradas na Tabela 3, as frações II e III são semelhantes entre si, e apresentam uma contaminação de cadeias linkers, sugerindo que as mesmas podem ser uma mistura de dodecâmero (fração II) e tetrâmero (fração III) com cadeias não globínicas.

A fração IV apresenta um pico intenso em 52 kDa (dados não mostrados) associado ao trîmero abc e três picos menos intensos atribuídos a contaminações por monômero d e linkers em solução. A primeira espécie nesta fração em 16.430 Da corresponde a isoforma do monômero d_2 , e duas contribuições de 25.820 e 26.620 ± 100 Da são atribuídas às cadeias linkers L_1 e L_2 , respectivamente (Tabela 3). Os resultados observados para a fração IV são consistentes com os dados de eletroforese SDS-PAGE.

Tabela 3: Massas moleculares (em Da) obtidas por MALDI-TOF-MS das subunidades da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp), isoladas a partir da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) mostrada na Figura 6.

Espécies	I	II	II*	III	IV	VI
d_1	16.350	16.332 ± 21	-	16.334 ± 23	-	16,330 ± 10
d_2	16.423 ± 18	16.406 ± 19	16.470 ± 14	16.410 ± 14	16.430	16.405 ± 17
d_3	16.638 ± 25	16.605 ± 37	-	16.627 ± 19	-	16.627 ± 15
d_4	16.860	16.825 ± 20	-	16.832 ± 33	-	16.826 ± 11
b	-	-	-	-	-	-
c_1	-	-	17.365 ± 35	-	-	-
c_2	-	-	-	-	-	-
c_3	-	-	17.556 ± 20	-	-	-
c_4	-	-	17.750 ± 50	-	-	-
a	-	-	18.265 ± 35	-	-	-
L_1	25.970 ± 25	25.897 ± 84	26.115 ± 50	25.940	25.820	-
L_2	26.860 ± 60	26.797 ± 26	27.017 ± 4	26.630 ± 90	26.620 ± 100	-
$2d^{**}$	-	-	34.045	-	-	33.885 ± 200
L_4	-	-	-	-	-	-
L_3 or $2d^{***}$	-	33.270 ± 100	33.190	33.180	-	32.740 ± 200
$2c_2$	-	-	34.820	-	-	-
$3d$						49.700
$T_1(abc)$	51.230 ± 30	51.200 ± 45	-	51.080 ± 45	-	-
$T_2(abc)$	51.940 ± 60	51.950 ± 40	51.590	51.875 ± 100	52.270	-
$abcd$	-	68.280	69.260	68.260	-	-

* Amostras na presença de 2-mercaptoetanol. Os algarismos romanos correspondem aos picos (frações) obtidos a partir da cromatografia de exclusão por tamanho mostrada na Figura 6. ** Valores de massas correspondentes a dímero de monômero da isoforma d_4 . *** Valores de massas correspondentes a dímero de monômero da isoforma d_2 .

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

A Figura 10 mostra o espectro de massas do monômero d (Fração VI mostrada na Figura 6) no pH 7,0. As regiões mono- e duplamente protonadas são mostradas nas Figuras 10B e 10C, respectivamente. As análises do espectro da fração VI mostram que apenas espécies relacionadas ao monômero d , em vários estados de oligomerização, são observadas em solução, sugerindo que o processo de separação por cromatografia de exclusão por

tamanho foi eficiente. As contribuições das várias isoformas mono-protonadas, na faixa de massa de 15 a 19 kDa são mostradas na Figura 10. Adicionalmente, no inserto da Figura 10, três contribuições de espécies oligoméricas do monômero *d* estão em destaque. As espécies com menor intensidade e valores de *MM* entre 30.000 e 35.000 Da, 49.700 Da e 68.000Da são atribuídas, respectivamente, ao dímero, trímero e tetrâmero de monômero *d* (inserto da Figura 10). Estes resultados corroboram os dados de eletroforese SDS-PAGE (Figura 7A), onde não foi observada nenhuma contribuição de outra cadeia polipeptídica para a fração VI.

Figura 10: (A) Espectro de MALDI-TOF-MS do monômero *d* (fração VI) no pH 7,0, obtido a partir da oxi-HbGp, através de cromatografia de exclusão por tamanho mostrada na Figura 6. O inserto mostra a região expandida correspondente as intensidades dos picos associados ao dímero *2d*, trímero *3d* e tetrâmero *4d*. (B) região expandida entre 15.500 a 18.500 Da, correspondente ao monômero *d*⁺ mono-protonado. (C) região expandida entre 8000 a 9000 Da, correspondente ao monômero *d*²⁺ duplamente protonado. *d*₁, *d*₂, *d*₃ e *d*₄ correspondem às isoformas do monômero *d*.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2144–2151, 2011.

4.1.4. Dados de AUC das subunidades da HbGp obtidas de SEC

As subunidades da HbGp utilizadas nos experimentos de AUC foram obtidas a partir da cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). No entanto, para obter o dodecâmero em concentrações adequadas, adicionou-se EDTA na concentração de 0,3 mmol/L às amostras da oxi-HbGp incubadas no pH 9,5. A Figura 11 mostra o cromatograma da oxi-HbGp 25 mg/mL incubada por 15 h. Quatro picos bem resolvidos correspondentes à proteína íntegra (I), dodecâmero (II), trímero (IV) e monômero (VI), e dois ombros associados ao tetrâmero (III) e linkers (V) são observados. Os estudos de AUC foram realizados apenas para as espécies mais concentradas e que apresentaram picos melhor resolvidos, ou seja, para as frações que correspondem ao trímero, dodecâmero e monômero *d*.

Figura 11: Cromatogramas da oxi-HbGp 25,0 mg/mL, em tris-HCl 0,1 mol/L incubada com 0,3 mmol/L de EDTA, no pH 9,5, a 25 °C por 15 h. A eluição foi realizada com o mesmo tampão no pH 7,0. Os algarismos romanos (I-VI) correspondem às diferentes espécies obtidas da dissociação em meio alcalino da HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

A Figura 12 mostra as curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, *c* (S), para o trímero, dodecâmero e monômero *d* em três concentrações de proteína, no pH 7,0. As curvas de distribuição, *c* (S), do trímero *abc* (Figura 12A) são compostas por dois picos com

coeficientes de sedimentação $s_{20,w}$ de $3,6 \pm 0,2$ S (pico mais intenso) e $5,7 \pm 0,2$ S (Tabela 4). O primeiro pico mais intenso (Figura 12A) é devido à contribuição do trímero *abc*, e o segundo corresponde ao complexo (*abc* + *L*) formado pela associação do trímero *abc* com uma cadeia linker *L*. Segundo estudos de caracterização das subunidades da HbLt por velocidade de sedimentação, os valores de $s_{20,w}$ de 3,93, 3,78 e 3,46 S estão associados ao trímero *abc* ⁷.

Figura 12: Distribuições contínuas dos coeficientes de sedimentação das subunidades da HbGp, em 100 mmol/L tris-HCl, pH 7,0, contendo 50 mmol/L NaCl. (A) trímero *abc*, (B) dodecâmero (*abcd*)₃ e (C) monômero *d*. Para o trímero e dodecâmero foram usadas as concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL e para o monômero *d* 200, 400 e 800 µg/mL de proteína. Os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração foram determinados como o valor máximo dos picos das curvas de *c* (S). Experimentos monitorados em 415 nm.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

As contribuições percentuais para as duas espécies foram determinadas através das áreas de cada pico, e os valores são mostrados na Tabela 4. As contribuições observadas para

o trímero **abc** e complexo (**abc** + **L**) são $87 \pm 4 \%$ e $13 \pm 2 \%$, respectivamente. A alta intensidade do primeiro pico nas curvas de distribuição sugere que o trímero **abc** é a espécie majoritária na fração IV obtida por SEC^{18,20}, corroborando os resultados observados por eletroforese SDS-PAGE²⁰. As massas moleculares *MM* foram obtidas de ajustes globais como descrito na seção de métodos, enquanto o raio de Stokes, R_s mostrado na Tabela 4 é um parâmetro de saída obtido no programa SEDFIT. Os valores de *MM* e R_s , são de $51,0 \pm 0,4$ kDa e $3,4 \pm 0,1$ nm para o trímero **abc**, e 80 ± 3 kDa e $4,3 \pm 0,2$ nm para o complexo (**abc** + **L**). O valor de *MM* obtido para o trímero **abc** a partir dos dados SV é consistente, quando comparado com os valores de massa molecular de 51,1 kDa determinado por MALDI-TOF-MS para esta espécie¹⁸ e de 52,8 kDa obtida para o trímero **abc** da HbLt^{21,76}.

Tabela 4: Propriedades hidrodinâmicas das subunidades da HbGp determinadas por velocidade de sedimentação (SV) no pH 7,0, a 20 °C.

Frações ^a	Espécies	Propriedades hidrodinâmicas			
		R_s (nm) ^b	$s_{20,w}(S)$ ^c	<i>MM</i> (kDa) ^d	Área (%)
Monômero d	d	$2,5 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$	$17,0 \pm 0,5$	80 ± 7
	2d	$2,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$32,1 \pm 0,5$	15 ± 3
	4d	$3,7 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,2$	$66,4 \pm 0,7$	5 ± 2
Trímero abc	abc	$3,4 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,2$	$51,0 \pm 0,4$	87 ± 4
	abc + L	$4,3 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$	80 ± 3	13 ± 2
Dodecâmero (abcd) ₃	abcd	$4,1 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,3$	$68,8 \pm 0,7$	22 ± 5
	(abcd) ₃	$4,8 \pm 0,4$	$9,7 \pm 0,2$	$202,4 \pm 0,8$	78 ± 4

As espécies **d**, **2d**, **4d**, **abc**, **abc** + **L**, **abcd** e (**abcd**)₃ correspondem ao monômero puro, dímero de monômero **d**, tetrâmero de monômero **d**, trímero, trímero ligado com uma cadeia linker, tetrâmero e dodecâmero, respectivamente.

^a Espécies obtidas por cromatografia de exclusão por tamanho da oxi-HbGp incubada por 15 h, no pH 9,60. A eluição foi feita no pH 7,0 como descrito em trabalhos anteriores²⁰.

^b Raio de Stokes estimado no programa SEDFIT a partir de dados de velocidade de sedimentação.

^c Dados obtidos por regressão linear.

^d Massas moleculares estimadas por ajustes globais das três concentrações de proteína descritas na seção 3.1.7.1 no programa SEDPHAT.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

A diferença apreciável no valor de R_s obtido para o trímero ($3,4 \pm 0,1$ nm, Tabela 4) dos ajustes no SEDFIT, e o diâmetro hidrodinâmico, D_H , de 12 ± 1 nm obtido por DLS (dados

não mostrados), deve estar associada ao fato dos valores obtidos no DLS serem uma média de todas as espécies presentes na solução, de modo que a espécie (*abc* + *L*) mesmo com apenas 13 % em solução, deve contribuir significativamente para o aumento deste valor.

As curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação para o dodecâmero (Fração II) mostradas na Figura 12B têm duas contribuições bem definidas. O pico de maior intensidade com 78 ± 4 % em solução, tem valores de $s_{20,w}$ de $9,7 \pm 0,2$ S e *MM* de $202,4 \pm 0,8$ kDa, e é atribuído ao dodecâmero (*abcd*)₃. A espécie minoritária, contribuindo com 22 ± 5 % em solução, deve ser o tetrâmero *abcd*, é caracterizado por uma *MM* e $s_{20,w}$ de $68,8 \pm 0,7$ kDa e $5,2 \pm 0,3$ S, respectivamente. Esta espécie, possivelmente, foi formada a partir da dissociação oligomérica parcial do dodecâmero nas condições experimentais utilizadas. Os valores de *MM* e $s_{20,w}$ para o dodecâmero (*abcd*)₃ e tetrâmero *abcd* são consistentes com resultados descritos na literatura para as hemoglobinas HbGp e HbLt^{18-21,76}. Estudos da HbLt, na presença de vários agentes caotrópicos, mostram que o dodecâmero é o principal intermediário do processo de dissociação oligomérica. Além disso, esta espécie apresenta uma alta afinidade na ligação com o oxigênio, semelhante ao observado para a proteína íntegra, sugerindo que a unidade (*abcd*)₃ deve ser a estrutura funcional no processo de ligação do oxigênio na proteína nativa. Outras subunidades menores, tais como, o trímero *abc* e o monômero *d* não têm afinidade pela molécula de O₂ quando estão isolados⁷⁸.

Os experimentos de SV para o monômero *d* puro para avaliar a oligomerização desta subunidade são mostrados na Figura 12C e as propriedades hidrodinâmicas são mostradas na Tabela 4. Os valores de *MM* e $s_{20,w}$ de $17,0 \pm 0,5$ kDa e $1,9 \pm 0,1$ S para o monômero *d*, e $32,1 \pm 0,5$ kDa e $2,8 \pm 0,2$ S para o dímero de monômero *2d*, são semelhantes aos descritos em estudos anteriores¹⁸⁻²⁰. Como descrito em estudo por MALDI-TOF-MS, o monômero *d* tem tendência para oligomerizar. Os dados de AUC mostram duas contribuições de 15 % e 5 %, atribuídas ao dímero do monômero, *2d*, e ao tetrâmero de monômero, *4d* (Figura 12C e Tabela 4). Convém notar, que a partir dos dados de AUC não foi possível identificar uma contribuição de trímero *3d*, como foi observado em estudos anteriores por MALDI-TOF-MS²⁰.

A partir das várias técnicas utilizadas para a caracterização das frações da HbGp obtidas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), pode-se inferir que algumas frações, tais como, o monômero *d*, o trímero *abc* e o dodecâmero (*abcd*)₃, apresentam um grau de pureza acima de 78 %. No entanto, algumas propriedades intrínsecas destas subunidades favorecem a presença de outras espécies nestas frações.

PARTE II

EFEITO DO pH NA HbGp: ESTUDOS DE AUC

4.2. Efeito do pH nas formas oxi-, cianometa- e meta-HbGp

As Figuras 13A e 13B mostram as curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, $c(S)$, para as formas oxi- e cianometa-HbGp no pH 8,0, respectivamente, enquanto que a cianometa-HbGp, no pH 9,0, é mostrada na Figura 13C.

Figura 13: Distribuições contínuas dos coeficientes de sedimentação da HbGp, em três concentrações 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, 100 mmol/L acetato-fosfato em diferentes valores de pH, conteúdo 50 mmol/L NaCl. (A) oxi-HbGp no pH 8,0, (B) cianometa-HbGp no pH 8,0 e (C) cianometa-HbGp no pH 9,0. Os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração foram determinados como o valor máximo dos picos das curvas de $c(S)$. Experimentos monitorados em 415 nm.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

Para a oxi-HbGp no pH 8,0 três espécies estão presentes em equilíbrio na solução: o primeiro pico na curva de distribuição em $5,0 \pm 0,2 S$ é atribuído ao tetrâmero *abcd*, o segundo com $s_{20,w}$ de $9,7 \pm 0,5 S$, ao dodecâmero $(abcd)_3$, e o último pico, centrado em $56,4 \pm 0,8 S$, é devido à contribuição da HbGp íntegra (Figura 13A e Tabela 5). Estudos para HbLt,

na presença de ureia, no pH 7,0, mostram que o dodecâmero tem coeficiente de sedimentação $s_{20,w}$ entre 8,6 e 10,0 S⁷.

Os valores de *MM* determinados para estas espécies são semelhantes aos valores determinados para as frações isoladas. A contribuição percentual para cada espécie, no pH 8,0 foi de 4 ± 2 %, 8 ± 3 % e 88 ± 4 %, para o tetrâmero, o dodecâmero e para a oxi-HbGp não dissociada, respectivamente (Tabela 5). Os resultados sugerem que, no pH 8,0, a oxi-HbGp sofre apenas dissociação oligomérica parcial, devido a alta contribuição de proteína não dissociada em solução (88 %, Figura 13A). Em 300 µg/mL de proteína, no pH 8,0 (Figura 13A), apenas uma contribuição, atribuída a HbGp íntegra está presente no equilíbrio, enquanto que, em 100 µg/mL da oxi-HbGp, a contribuição percentual das espécies menores, tetrâmero *abcd* e dodecâmero (*abcd*)₃, consiste em 14 % (dados não mostrados), sugerindo que o processo de dissociação oligomérica é dependente da concentração de proteína no meio. O efeito da concentração de proteína no processo de dissociação da HbGp foi reportado em um estudo de DLS sobre o desenovelamento térmico, onde o aumento da concentração de proteína promoveu a estabilização da estrutura nativa, inibindo a dissociação oligomérica⁷⁹. Além disso, outros estudos mostram que a oxi-HbGp, no pH 7,0, é muito estável, apresentando um único pico nas curvas de *c* (S) em 58 S.

No pH 9,0, o equilíbrio em solução é constituído pela mesma espécie encontrada no pH 8,0. No entanto, diferenças significativas nas contribuições de cada espécie foram observadas em solução (Tabela 5). Desta forma, aumentos de 4 % para 25 % para o tetrâmero, e de 8 % para 17 % para o dodecâmero (*abcd*)₃ são observados. Por outro lado, um decréscimo na contribuição da proteína íntegra de 88 ± 4 % para 58 ± 5 %, sugere uma perda de estabilidade da oxi-HbGp, quando exposta ao pH 9,0, devido a alcalinização do meio favorecer o processo de dissociação. Estudos anteriores de DLS e técnicas espectroscópicas mostram que o pH alcalino, acima de 9,0 induz a dissociação oligomérica da oxi-HbGp^{1,19}. Porém, não são observadas as contribuições de espécies menores, tais como, o monômero *d* e o trímero *abc*, nos valores de pH de 8,0 e 9,0, sugerindo que, nestas condições de pH, a proteína sofre apenas dissociação parcial (Tabela 5). No entanto, estudos no pH 10,0 mostram que a oxi-HbGp está totalmente dissociada em monômero *d* e trímero *abc*¹⁹.

Tabela 5: Coeficientes de sedimentação, $s_{20,w}$, em (S), massas moleculares, MM , em (kDa), e área relativa, em (%), para as três formas da HbGp, em diferentes valores de pH a 20 °C, obtidos das análises dos dados de velocidade de sedimentação (SV) no programa SEDFIT.

Formas da HbGp	pH	Propriedades hidrodinâmicas	Espécies observadas				
			Monômero <i>d</i>	Trímero <i>abc</i>	Tetrâmero <i>abcd</i>	Dodecâmero <i>(abcd)₃</i>	HbGp <i>íntegra</i>
Oxi-	8,0	$s_{20,w}$	-	-	$5,0 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,5$	$56,4 \pm 0,8$
		MM	-	-	68 ± 2	206 ± 2	3600 ± 100
		Área	-	-	4 ± 2	8 ± 3	88 ± 4
	9,0	$s_{20,w}$	-	-	$5,1 \pm 0,5$	$9,5 \pm 0,6$	$58,5 \pm 0,7$
		MM	-	-	70 ± 4	202 ± 4	3650 ± 100
		Área	-	-	25 ± 2	17 ± 2	58 ± 5
	8,0	$s_{20,w}^0$	-	-	-	-	$59,1 \pm 0,2$
		MM	-	-	-	-	3600 ± 100
		Área	-	-	-	-	100
Cianometa-	9,0	$s_{20,w}$	-	-	$5,4 \pm 0,8$	$10,6 \pm 0,5$	$57,5 \pm 0,6$
		MM	-	-	72 ± 5	205 ± 1	3600 ± 100
		Área	-	-	4 ± 2	9 ± 1	87 ± 2
	5,0	$s_{20,w}^0$	-	-	-	-	$59,5 \pm 0,6$
		MM	-	-	-	-	3650 ± 50
		Área	-	-	-	-	100
	7,0	$s_{20,w}^0$	-	-	-	-	$58,4 \pm 0,6$
		MM	-	-	-	-	3600 ± 100
		Área	-	-	-	-	100
	8,0	$s_{20,w}$	$2,14 \pm 0,05$	$3,61 \pm 0,05$	$5,7 \pm 0,3$	-	-
		MM	18 ± 1	52 ± 1	68 ± 2	-	-
		Área	22 ± 2	71 ± 1	7 ± 1	-	-
	9,0	$s_{20,w}$	$2,0 \pm 0,1$	$3,52 \pm 0,06$	$5,4 \pm 0,4$	-	-
		MM	17 ± 2	52 ± 1	68 ± 1	-	-
		Área	26 ± 4	68 ± 3	6 ± 1	-	-

As massas moleculares MM foram estimadas por ajustes globais no programa SEDPHAT.

Os valores de $s_{20,w}^0$ foram obtidos por regressão linear.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

Para cianometa-HbGp, no pH 8,0, um único pico é observado nas curvas de distribuição, $c(S)$, com $s_{20,w}$ de $59,1 \pm 0,2 S$ e MM de 3600 kDa, que pode ser atribuído a cianometa-HbGp não dissociada (Fig. 13B). Resultados similares foram obtidos no pH 7,0, para cianometa-HbGp¹⁷. No pH 9,0, as curvas de distribuição da cianometa-HbGp são semelhantes às da oxi-HbGp no pH 8,0 (Figs. 13A e 13C) e três espécies estão presentes no equilíbrio em solução. O primeiro pico em $5,4 \pm 0,8 S$, está associado ao tetrâmero **abcd**, o segundo com $s_{20,w}$ de $10,6 \pm 0,5 S$ é devido a contribuição do dodecâmero **(abcd)₃** e o pico em $57,5 \pm 0,6 S$ corresponde à proteína não dissociada. Os dados de AUC mostram que a cianometa-HbGp é mais estável que a oxi-HbGp, tal como sugerido em estudos anteriores^{19,81}. A alta estabilidade da cianometa-HbGp é devida à coordenação do CN⁻ ao ferro, uma vez que este ligante apresenta uma maior tendência de receber elétrons π do grupo heme quando comparado com outros ligantes como a água. Esta interação resulta em uma estabilização do complexo Fe³⁺—His 93⁸⁰.

A Tabela 5 mostra que para meta-HbGp, nos valores de pH 5,0 e 7,0, uma única espécie está presente na solução. Os valores de $s_{20,w}$ e MM são em torno de 59,0 kDa e 3600, respectivamente e, estão associadas à proteína íntegra. Na Fig. 14A os dados experimentais obtidos na ultracentrífuga analítica, são mostrados num gráfico da absorbância em função da distância radial da célula, para a meta-HbGp, 200 $\mu\text{g/mL}$, no pH 8,0 (símbolos). Os ajustes dos dados de velocidade de sedimentação (SV) no programa SEDFIT para esta amostra são mostrados na Fig. 14A, e representados pelas linhas cheias, e o perfil dos resíduos dos ajustes é mostrado na Fig. 14B. A curva $c(S)$ correspondente pode ser visualizada na Figura 14C. O valor do RMSD nas análises das curvas de $c(S)$ para todos os dados descritos nesta seção foi de $0,006 \pm 0,002$, enquanto que o pior valor deste parâmetro foi de 0,012, sugerindo que o modelo usado para a análise dos dados é adequado.

As curvas de distribuição de coeficiente de sedimentação, $c(S)$, para a meta-HbGp, no pH 8,0, indicam que a forma oxidada da HbGp está totalmente dissociada, e apenas três espécies estão presentes na solução. Os valores de MM de 18 ± 1 kDa e $s_{20,w}$ de $2,14 \pm 0,05 S$ são característicos da subunidade monomérica **d**. A segunda espécie com MM de 52 ± 1 kDa e $s_{20,w}$ de $3,61 \pm 0,05 S$ está associada ao trímero **abc**, e a terceira espécie de menor intensidade com MM de 68 ± 2 kDa e $s_{20,w}$ de $5,7 \pm 0,3 S$ corresponde ao tetrâmero **abcd** em solução. Os valores de coeficientes de sedimentação e MM obtidos para as três espécies estão de acordo com os estudos anteriores reportados na literatura para as formas cianometa- e oxi-HbGp no pH 10,0¹⁹.

Figura 14: Dados parciais de velocidade de sedimentação obtidos através do programa SEDFIT. (A) Curvas da Absorbância em 415 nm em função do raio da célula, para meta-HbGp 200 µg/mL em tampão acetato-fostato 100 mmol/L, contendo 50 mmol/L de NaCl, pH 8,0. As linhas cheias representam o ajuste feito no programa SEDFIT e os quadrados representam os dados experimentais. (B) Resíduos fornecidos pelo programa SEDFIT mostrando a boa qualidade dos ajustes. (C) Curva de distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação. Experimentos monitorados em 415 nm.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 333-341, 2013.

As contribuições percentuais relativas para meta-HbGp, no pH 8,0, são, respectivamente, $22 \pm 2 \%$, $71 \pm 1 \%$ e $7 \pm 1 \%$ para o monômero **d**, o trímero **abc** e o tetramero **abcd**. Comparando com as formas, oxi- e cianometa-, a meta-HbGp é muito instável em pH 8,0, apresentando apenas as subunidades dissociadas em solução. No pH 9,0, as espécies presentes em equilíbrio, são semelhantes às encontradas no pH 8,0, com contribuições das espécies dentro do erro experimental (Tabela 5). Estudos da literatura sugerem que a estabilidade das globinas depende do ligante coordenado ao centro metálico⁸⁰. Desta forma, a meta-HbGp que apresenta uma molécula de água, um ligante fraco, coordenada na sexta coordenação do ferro do grupo heme é a forma menos estável, quando

comparada à oxi-HbGp que tem uma molécula de oxigênio, e à cianometa-HbGp que por sua vez tem o CN⁻, um ligante forte, presentes na sexta coordenação do metal.

A Fig. 15 mostra os dados de equilíbrio de sedimentação (SE) da oxi-HbGp 300 µg/mL, no pH 10,0. Os dados foram analisados através de ajustes globais no programa SEDPHAT, e são apresentados na Fig. 15A (linhas cheias) e o perfil dos resíduos é mostrado na Fig. 15B.

Figura 15: Dados de equilíbrio de sedimentação da oxi-HbGp 300 µg/mL em 100 mmol/L de tris-HCl, pH 10,0, contendo 50 mmol/L de NaCl. (A) Gráfico das curvas de absorvância (em 420 nm) em função do raio da célula. O experimento foi realizado a 20 °C, e 15.000, 20.000 e 25.000 rpm. Os ajustes são mostrados pelas linhas cheias e os dados experimentais pelos símbolos. (B) Resíduos fornecidos pelo programa SEDPHAT mostrando a boa qualidade dos ajustes.

Fonte: Carvalho, F. A. O et al. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 183-193, 2011.

Os dados obtidos, a partir dos ajustes globais para cada espécie presente em solução, são mostrados na Tabela 6. Na ausência de 2-mercaptoetanol são observadas quatro espécies em solução. A primeira espécie com *MM* de 17.600 ± 100 Da e $s_{20,w}$ de $1,95 \pm 0,01$ S é devido a contribuição da subunidade **d**; a segunda espécie com valores de *MM* e $s_{20,w}$ de 32.500 ± 300 Da e $2,74 \pm 0,05$ S corresponde ao dímero de monômero (**2d**) e, a contribuição de cadeias

linkers sobrepostas, a terceira espécie com MM de 52.200 ± 300 Da e $s_{20,w}$ de $4,04 \pm 0,06$ S é atribuída ao trímero **abc**, e a última espécie com MM de 68.600 ± 700 Da e $s_{20,w}$ de $5,42 \pm 0,05$ corresponde ao tetrâmero **abcd** (Tabela 6). Os valores de coeficientes sedimentação obtidos para as quatro espécies são consistentes com os resultados mostrados na Tabela 5, obtidos a partir da análise dos dados de SV. Na presença de 2-mercaptoetanol três espécies estão presentes em equilíbrio em solução e a espécie em torno de 52 kDa caracterizada como trímero **abc** não foi observada. A espécie com massa molecular de 17.600 ± 700 Da e $s_{20,w}$ de $1,98 \pm 0,05$ S corresponde a uma mistura composta pelas quatro cadeias monoméricas, **a**, **b**, **c** e **d**, presentes em solução. Para o dímero da subunidade **d**, **2d**, e para o tetrâmero **abcd** foram observados os valores de MM e $s_{20,w}$ de 32.800 ± 400 Da e $2,73 \pm 0,06$ S, e 68.900 ± 400 Da e $5,34 \pm 0,07$ S, respectivamente (Tabela 6). Embora os valores de massas moleculares obtidos para as espécies a partir dos dados de SE estejam em boa concordância com os demais dados obtidos por SV, nas amostras com 2-mercaptoetanol devido à pequena diferença de MM entre as cadeias monoméricas não foi possível caracterizar separadamente.

Tabela 6: Massas moleculares em (Da) e coeficientes de sedimentação em (S) para oxi-HbGp, na presença e ausência do agente redutor 2-mercaptoetanol, no pH 10,0, monitorado em 415 nm. As análises foram obtidas a partir de dados de equilíbrio de sedimentação no programa SEDPHAT.

Oxi-HbGp sem 2-mercaptoetanol				
Espécies	<i>Monômero d</i>	<i>Dímero de monômero 2d^b</i>	<i>Trímero abc</i>	<i>Tetrâmero abcd</i>
<i>M</i> (Da)	17.600 ± 100	32.500 ± 300	52.200 ± 300	68.600 ± 700
$s_{20,w}$ (S)	$1,95 \pm 0,01$	$2,74 \pm 0,04$	$4,04 \pm 0,02$	$5,42 \pm 0,05$
Oxi-HbGp com 2-mercaptoetanol				
<i>M</i> (Da)	$(17.600 \pm 700)^a$	32.800 ± 400	-	68.900 ± 400
$s_{20,w}$ (S)	$(1,98 \pm 0,05)^a$	$2,73 \pm 0,06$	-	$5,34 \pm 0,07$

^a As subunidades monoméricas **a**, **b**, **c** e **d** são ajustadas como um única espécie devido à pequena diferença de massa molecular, dentro do limite de resolução da técnica. ^b O dímero de monômero está sobreposto aos linkers.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 183-193, 2011.

PARTE III

EFEITO DA UREIA NA HbGp: ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

4.3. Efeito da ureia na estabilidade da HbGp: dados espectroscópicos

4.3.1. Absorção óptica

4.3.1.1. Cianometa-HbGp

Na Figura 16A são mostrados os espectros de absorção característicos da cianometa-HbGp em função da concentração de desnaturante. A cianometa-HbGp é uma forma derivada da forma oxi-HbGp, na qual o ferro está oxidado (Fe^{3+}) com o ligante cianeto CN^- na sexta coordenação do grupo heme. Na ausência de ureia, a cianometa-HbGp tem a banda de Soret centrada em 420 nm e bandas Q em 540 nm, que são características desta forma da HbGp. Nenhuma mudança significativa é observada no comprimento de onda de absorção da banda de Soret, λ_{abs} , até 4,0 mol/L do agente desnaturante, sugerindo que, a forma cianometa-HbGp é muito estável em baixas concentrações de ureia (Tabela 7).

No entanto, o aumento na concentração de ureia acima de 4,0 mol/L induz uma perda de intensidade e um deslocamento da banda de Soret para o azul (Tabela 7). O deslocamento hipsocrômico de 420 para 404 nm sugere mudanças significativas no ambiente do grupo heme devido à formação de outras espécies. Em 8,0 mol/L de ureia são observadas várias bandas no espectro de absorção, centradas em 360, 404, 531, 567 e 631 nm, que podem ser atribuídas a uma mistura de espécies em equilíbrio (Fig. 16B e 16C). As bandas centradas em 360, 404 e 631 nm são características das espécies aquometa- e penta-coordenada e as bandas em 531 e 567 nm estão associadas à presença de hemicromo em solução. Além disso, existem vários trabalhos que associam a banda em 631 nm a espécies de spin alto^{82,83}. Segundo trabalhos na literatura, a espécie aquometa- ou meta- é caracterizada pelo ferro no estado oxidado (Fe^{3+}) com uma molécula de água na sexta coordenação do grupo heme, enquanto o hemicromo apresenta o mesmo estado de oxidação do ferro, porém a sexta posição no grupo heme é ocupada pela histidina distal⁵.

Figura 16: (A) Espectros de absorção óptica da cianometa-HbGp 0,1 mg/mL, em tampão misto acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em função da concentração de ureia. (B) Absorbância em 420 e 404 nm. (C) Comprimento de onda do máximo da banda de Soret. (D) Absorbância em 540 e 627 nm.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

Em geral a estabilidade das globinas é atribuída ao ligante coordenado ao metal. Estudos indicam que o CN^- é um ligante forte que induz um aumento na estabilidade das globinas⁸⁰. A perda de estabilidade acima de 4,0 mol/L de ureia está associada a uma desordem estrutural do estado nativo devido ao processo de dissociação oligomérica, desnaturação proteica e alterações na esfera de coordenação do ferro do grupo heme. Estes resultados são similares aos observados por AUC e DLS, onde a alta estabilidade da forma cianometa-HbGp foi observada em meio alcalino^{19,84}.

4.3.1.2. Oxi-HbGp

A oxi-HbGp tem três λ_{abs} característicos, 415, 540 e 576 nm, na ausência de ureia. Assim como a cianometa-HbGp, a forma oxi- é bastante estável, não apresentando mudanças espectrais apreciáveis até 4,0 mol/L de desnaturante (Tabela 7). Porém, um aumento na concentração do agente desnaturante acima deste valor promove mudanças no espectro de absorção. Assim, as bandas de Soret e Q apresentam perda de intensidade e um deslocamento para o azul de 415 para 407 nm (banda de Soret), de 540 para 533 nm (banda alfa) e de 575 para 568 nm (banda beta, Tabela 7).

De forma análoga à cianometa-HbGp, o espectro de absorção da oxi-HbGp em 8,0 mol/L de desnaturante é constituído por uma mistura de espécies, sendo observado o máximo de absorção da banda de Soret em 407 nm, e outras bandas menos intensas na região do visível centradas em 533, 568 e 628 nm ³⁶. Desta forma, em altas concentrações de ureia o processo de desnaturação ocorre com a oxidação do ferro de Fe^{2+} para Fe^{3+} , induzindo a formação de outras espécies em solução ³⁶. A banda de transferência de cargas (CT) fornece informações importantes sobre a força do ligante axial do heme nas proteínas. Esta transição está associada com a promoção de um elétron dos orbitais porfirínicos preenchidos π para um orbital e_g (d_{xz} , d_{yz}) do átomo de ferro. A banda em torno de 628 - 634 nm é atribuída à espécie aquometa- (espécie de spin alto), onde a água encontra-se coordenada na sexta coordenação ⁸⁵. A dissociação oligomérica promove a formação de várias espécies, tais como o hemicromo e a aquometa-, como consequência de um maior acesso do solvente ao interior hidrofóbico do heme. Estudos da literatura mostram que a oxi-mioglobina, em 8,0 mol/L de ureia, sofre rápida oxidação, com a formação de espécie hemicromo em solução ⁸². O decréscimo na intensidade de absorção do heme está associado à perda de estrutura na proteína. Assim, os resultados mostram que a ureia propicia a oxidação do ferro, a dissociação oligomérica e a desnaturação na oxi-HbGp.

Tabela 7: Propriedades espectroscópicas da HbGp na presença de ureia

Formas da HbGp	Propriedades	Concentração de ureia (mol/L)				
		0,0	2,0	4,0	6,0	8,0
Cianometa-	λ_{abs} (nm) ^a	420	420	420	415	404
	Abs ^b	0,43	0,47	0,45	0,33	0,24
	λ_{max} (nm) ^c	333	333	340	348	350
	LSI (u.a.) ^d	3240	3430	2130	780	780
Oxi-	λ_{abs} (nm) ^a	415	415	415	413	407
	Abs ^b	0,54	0,59	0,59	0,45	0,34
	λ_{max} (nm) ^c	333	334	343	348	350
	LSI (u.a.) ^d	4050	2930	2225	975	980
Meta-	λ_{abs} (nm) ^a	402	413	413	412	407
	Abs ^b	0,42	0,34	0,30	0,33	0,39
	λ_{max} (nm) ^c	333	336	338	346	351
	LSI (u.a.) ^d	3150	780	1200	1100	780

^a Comprimento máximo de absorção da banda de Soret.

^b Absorbâncias na banda de Soret.

^c Comprimento máximo de emissão de fluorescência.

^d LSI do inglês “Light scattering Intensity”, Intensidade de espalhamento de luz medida no fluorímetro com $\lambda_{exc} = \lambda_{em} = 350 \text{ nm}$.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

4.3.1.3. Meta-HbGp

Na Fig. 17 em 0,0 mol/L de ureia, é mostrado o espectro característico da espécie aquometa-HbGp, com uma banda de Soret intensa e larga, centrada em 402 nm, banda Q em 500 nm e outra banda de menor intensidade em 627 nm (Figs. 17A e 17B, espécie 1) . A meta-HbGp na presença da ureia apresenta um equilíbrio mais complexo quando comparada com as outras duas formas, oxi- e cianometa-HbGp. O equilíbrio na meta-HbGp é constituído por três espécies, como é mostrado nas Figs. 17C, 17D e no esquema 3.

Esquema (3)

Figura 17: (A) Espectros de absorção óptica para meta-HbGp 0,1 mg/mL em 30 mmol/L de tampão misto acetato-fosfato, pH 7,0. Inseto em (A) mostra a região das bandas Q ampliada; (B) Dados de deconvolução dos espectros da Fig. 17A, realizados por meio do programa CCA mostrando os espectros das espécies presentes em equilíbrio. (C) Deslocamento do máximo de absorção da banda de Soret e (D) Frações das espécies obtidas pelo programa CCA.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

A adição de ureia até 1,5 - 2,5 mol/L induz um deslocamento na banda de Soret de 402 para 413 nm (Fig. 17C), devido à conversão da espécie aquometa- em hemicromo. O hemicromo em solução é caracterizado por uma coloração marrom avermelhada e por um espectro formado por uma banda de Soret bastante intensa e estreita com λ_{abs} em 413 nm e bandas Q em 534 nm e 565 nm ³⁶. As mudanças espectrais são muito significativas e estão associadas a uma diminuição na largura de banda Soret e a um aumento de intensidade. Nesta faixa de concentração de ureia não é observada a banda em 627 nm, característica de espécies de spin alto, sugerindo que o hemicromo é a única espécie em solução. Adicionalmente, o aumento na concentração do agente desnaturante acima de 5,0 - 6,0 mol/L de ureia, é acompanhado por um deslocamento da banda de Soret para o azul de 413 a 407 nm (Tabela 7), e um aumento simultâneo da absorbância em 627 nm, indicando que existe uma mistura de espécies em 8,0 mol/L de ureia ^{82,83}.

As Figs. 17B e 17D mostram os resultados das análises obtidas pelo algoritmo *Convex Constraint Analysis* (CCA) ^{40,41} para meta-HbGp, onde três espécies são observadas no equilíbrio. Inicialmente, apenas a espécie aquometa-HbGp é observada em solução até 1,5 mol/L de ureia. O ponto médio da primeira transição, onde as duas espécies, aquometa- e hemicromo estão em equilíbrio, ocorre em 1,0 mol/L de ureia (Fig. 17D). Na faixa de 2,5 a 3,5 mol/L de desnaturante a solução é constituída por um equilíbrio formado por 100 % de hemicromo (Fig. 17D). O máximo de absorção da banda de Soret não sofre mudanças drásticas na faixa de 2,5 a 5,5 mol/L de ureia, devido a maior estabilidade do hemicromo nestas condições quando comparado com aquometa-HbGp (Fig. 17C). O aumento na concentração de ureia favorece a formação da terceira espécie em solução, que está associada à proteína desnaturada, onde a espécie penta-coordenada é predominante no equilíbrio. O segundo ponto médio da transição associada à conversão do hemicromo à espécie penta-coordenada ocorre em torno de 5,5 mol/L de ureia (Fig. 17D). O alto valor observado para a segunda transição está relacionado com a maior estabilidade da espécie hemicromo.

4.3.2. Emissão de fluorescência

Nas Figs. 18A e 18B são mostrados os espectros de emissão de fluorescência para a HbGp nas formas oxi- e meta-HbGp, respectivamente. As Figs. 18C e 18D mostram a área normalizada dos espectros de fluorescência (relativa a área observada em 0,0 mol/L de ureia) para as formas oxi-, meta-, e cianometa-HbGp e o deslocamento do máximo de emissão de fluorescência λ_{max} , respectivamente. A intensidade de fluorescência tem um aumento em torno de 18 vezes, para a oxi-, cianometa-, e meta-HbGp quando a concentração de desnaturante varia de 0,0 para 8,0 mol/L. As mudanças no λ_{max} são bastantes similares para as três formas (Fig. 18D e Tabela 7).

Figura 18: (A) e (B) Espectros de emissão de fluorescência para as formas oxi- e meta-HbGp, 0,1 mg/mL, em tampão misto acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, com excitação em 295 nm. (C) Fluorescência normalizada pela intensidade na concentração 0,0 mol/L, para as três formas da HbGp. (D) Gráficos do comprimento de onda de emissão máxima para as três formas da HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

As formas oxi- e cianometa-HbGp apresentam processos de dissociação/desnaturação similares, onde a intensidade de fluorescência permanece constante até 3,5 mol/L de ureia, porém a cianometa-HbGp é um pouco mais estável (Fig. 18C). Acima de 4,0 mol/L de desnaturante mudanças significativas são observadas na emissão de fluorescência do triptofano e no deslocamento do λ_{max} de 333 para 350 nm que podem ser associadas aos processos de dissociação e desnaturação da proteína (Tabela 7). Estas mudanças são consistentes com a redução da transferência de energia dos triptofanos para o grupo heme e ao aumento da exposição dos fluoróforos ao solvente^{36,39,42,43}. O pequeno deslocamento na curva da cianometa-HbGp para concentração maior de ureia mostrada na Fig. 18C está associado a maior estabilidade da forma oxidada (cianometa-) comparada à oxi-HbGp.

Para a meta-HbGp ocorre um aumento de 6 vezes na intensidade de fluorescência em 1,5 mol/L de ureia, permanecendo constante entre 1,5 e 5,0 mol/L, e voltando a aumentar em

torno de 3 vezes em 8,0 mol/L de ureia. O aumento inicial na intensidade de fluorescência é atribuído à dissociação oligomérica. A dissociação da meta-HbGp leva a uma redução significativa na supressão da fluorescência dos triptofanos, inter- e intramolecular, devido à transferência de energia para o grupo heme.

4.3.3. Espalhamento de luz (LSI)

A Fig. 19 mostra a intensidade de luz espalhada para as três formas da HbGp, em função da concentração de ureia, no pH 7,0. As formas oxi- e cianometa-HbGp têm curvas similares, enquanto que a meta-HbGp tem um comportamento diferente, onde é observado um decréscimo significativo na intensidade de luz espalhada em baixas concentrações de desnaturante.

Figura 19: Espalhamento de luz medido num fluorímetro para as três formas da HbGp, em tampão misto acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em função da concentração de ureia, na faixa de 0,0 a 8,0 mol/L.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

A cianometa-HbGp apresenta uma intensidade um pouco menor quando comparada com a oxi-HbGp, o que pode estar associado ao fato do ligante CN^- induzir mudanças no volume da proteína devido a rearranjos conformacionais, como foi observado em trabalhos

anteriores por ultracentrifugação analítica ¹⁷. A meta-HbGp é a forma menos estável, assim o decréscimo na LSI é devido ao processo de dissociação oligomérica. Embora a intensidade de luz espalhada seja uma medida indireta da dissociação oligomérica, esta é uma boa ferramenta, pois a intensidade de luz espalhada depende do volume ao quadrado das partículas em solução. Além disso, estudos por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) mostraram que a oxi-HbGp, na presença de 4,0 e 5,0 mol/L de ureia, está parcialmente dissociada em subunidades menores, observando-se o equilíbrio de monômero *d*, trímero *abc*, e uma fração de proteína não dissociada.

4.3.4. Dicroísmo circular (CD)

4.3.4.1. Oxi-HbGp

Os testes de reversibilidade do processo de desnaturação da HbGp, na presença de ureia, sugerem que o processo de desnaturação da HbGp é apenas parcialmente reversível. Assim, foi observado que até 4,0 mol/L de desnaturante, depois da remoção da ureia por diálise, os parâmetros observados a partir dos espectros de fluorescência e absorção óptica são idênticos àqueles observados para a oxi-HbGp, na ausência de ureia (λ_{max} em 333 nm e máximo de absorção da banda de Soret em 415 nm, Tabela 7), sugerindo que o processo é reversível nestas condições. No entanto, a precipitação de proteína acima de 6,0 mol/L de ureia depois da diálise, indica que alguns resíduos hidrofóbicos foram expostos à desnaturação. A remoção do desnaturante da solução de proteína ocasiona mudanças nestes resíduos, levando a uma associação desordenada, seguida de precipitação. Além disso, os máximos de emissão de fluorescência e de absorção na banda de Soret são bastante diferentes quando comparados com 0,0 mol/L de ureia, indicando que em alta concentração de desnaturante o processo é irreversível.

Nas Figs. 20A e 20B são mostrados os espectros de dicroísmo circular (CD) para a oxi-HbGp nas regiões das ligações peptídicas e do grupo heme, respectivamente. Os espectros na região das ligações peptídicas (Fig. 20A) apresentam perfil característico de proteína com alto conteúdo de estruturas em hélices alfa, com elipticidade negativa em 220 - 222 nm. Na Fig. 20B duas bandas em 262 e 414 nm correspondem, respectivamente, às contribuições de

resíduos dos aminoácidos aromáticos e à assimetria do heme (banda de Soret). As Figs. 20A e 20B mostram claramente que até 4,0 mol/L de ureia, apenas pequenas mudanças espectrais são observadas, enquanto que em 8,0 mol/L de desnaturante a elipticidade na região do grupo heme é próxima de zero, mostrando que a proteína está desnaturada.

Figura 20: Espectros de dicroísmo circular (CD) da oxi-HbGp, em 30 mmol/L de tampão fosfato, pH 7,0, na presença de ureia (0,0 a 8,0 mol/L). (A) Região das ligações peptídicas, 0,3 mg/mL de proteína e (B) Região do grupo heme, 3,0 mg/mL de proteína.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

As análises dos parâmetros termodinâmicos do processo de desnaturação da HbGp, concentração crítica de ureia [$D_{1/2}$] e energia livre de Gibbs, foram obtidos usando o modelo de dois estados, descritos pelas Equações 2 a 6, monitorando as elipticidades em 222, 414, 260 e 334 nm.

4.3.4.1.1. Modelo de dois estados

A reação de desenovelamento da HbGp é muito complexa devido a sua estrutura oligomérica ser constituída por 180 cadeias polipeptídicas. Assim, a análise dos parâmetros termodinâmicos, associados ao processo de desnaturação, foi feita baseada em dois modelos diferentes para avaliar o mais adequado na descrição do processo de desnaturação. Nesta seção de resultados, inicialmente os dados obtidos a partir do modelo de dois estados são apresentados e discutidos, e, posteriormente, os parâmetros obtidos pelo modelo de três estados são mostrados.

As Figs. 21A e 21B mostram as frações de desnaturação ($f_{U,app}$), e os ajustes obtidos pelo modelo de dois estados para as formas oxi- e cianometa-HbGp, em função da concentração de ureia, respectivamente.

Figura 21: Curvas das frações de desnaturação da HbGp, obtidas das análises de dados de intensidade de espalhamento de luz (LSI), emissão de fluorescência (FE), e dicroísmo circular (CD). As linhas correspondem aos ajustes pelo modelo de dois estados descritos nas equações 2 – 6 na seção 3.1.6.3. (A) Oxi-HbGp e (B) Cianometa-HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

A Tabela 8 mostra as frações de desnaturação ($f_{U,app}$) e as energias livres aparentes (ΔG_{H20}), associadas com o processo de desnaturação da oxi-HbGp obtidos a partir do modelo de dois estados. Os valores de r^2 ($r^2 > 0,991$) mostrados na Tabela 8 indicam que os ajustes obtidos são razoáveis. Os valores de $D_{1/2}$ de $5,1 \pm 0,2$ mol/L, $\Delta G_{U,app}$ de $14,7 \pm 0,4$ kJ/mol e $-m$ de $2,9 \pm 0,1$ kJ/mol(mol/L)⁻¹ foram obtidos para oxi-HbGp a partir dos valores de elipticidade em 222 nm. A concentração crítica em 222 nm é maior quando comparada com os outros comprimentos de onda (Fig. 21A). Esta diferença sugere que a estabilidade da região do grupo heme é bem menor que na região das ligações peptídicas. Neste sentido, a assimetria do grupo heme é desestabilizada mais facilmente que o desenovelamento da estrutura secundária. Além disso, o pequeno valor de $-m$ em 222 nm mostra que o processo de desnaturação da HbGp é pouco cooperativo^{45,86,87}.

4.3.4.1.2. Modelo de três estados

Os principais resultados obtidos a partir das análises usando o modelo de três estados (Equação 7) são mostrados na Tabela 9. Os valores dos parâmetros $(D_{1/2})_2$, $-m_2$ e ΔG_2 atribuídos a segunda transição ($I \rightarrow U$) são similares aqueles obtidos usando o modelo de dois estados (Tabela 8) para todas as técnicas descritas acima. No entanto, os valores correspondentes à primeira transição ($N \rightarrow I$) apresentam em alguns casos erros muito grandes, comparáveis ou maiores que os valores dos parâmetros (Tabela 9).

A primeira transição é bastante larga, e é atribuída à dissociação oligomérica parcial. Os resultados mostram que as propriedades das subunidades dissociadas (do intermediário) são bastante próximas da proteína íntegra, sendo, portanto difícil de definir com exatidão os parâmetros termodinâmicos associados a esta transição. As análises baseadas no modelo de três estados indicam que a transição entre 4,3 – 5,2 mol/L de ureia está associada à desnaturação das subunidades dissociadas da proteína, e os parâmetros obtidos são consistentes com os dados obtidos pelas análises com o modelo de dois estados.

Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos associados ao processo de desnaturação da HbGp induzido pela ureia, obtidos de dados espectroscópicos no pH 7,0, a 25 °C, usando o modelo de dois estados na análise dos dados. Os ajustes foram feitos usando a equação 6 mostrada na seção 3.1.6.3..

Formas da HbGp	Sondas	$D_{1/2}$ [mol/L] ^a	$-m$ [kJmol ⁻¹ (mol/L) ⁻¹] ^b	$\Delta G_{H_2O, app}$ [kJ/mol] ^c	r^2
Oxi-	FE ^d	$5,2 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,6$	$15,6 \pm 0,6$	0,991
	LSI ^e	$3,8 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,5$	0,996
	[θ] 222 nm	$5,1 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	$14,7 \pm 0,4$	0,992
	[θ] 260 nm	$4,8 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$	24 ± 1	0,993
	[θ] 334 nm	$4,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$23,8 \pm 0,5$	0,992
Cianometa-	[θ] 414 nm	$4,3 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,3$	$17,6 \pm 0,5$	0,990
	FE ^d	$5,6 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$17,2 \pm 0,2$	0,996
	LSI ^e	$4,1 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,4$	$17,7 \pm 0,4$	0,998
	[θ] 220 nm	$6,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$25,5 \pm 0,4$	0,992
	[θ] 262 nm	$5,4 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,3$	24 ± 2	0,992
	[θ] 334 nm	$5,8 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	$24,8 \pm 0,2$	0,995
	[θ] 424 nm	$5,1 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	22 ± 1	0,997
	[θ] 262 nm	$1,93 \pm 0,07$	-	-	-
Meta-	[θ] 374 nm	$1,78 \pm 0,05$	-	-	-
	[θ] 414 nm	$1,95 \pm 0,02$	-	-	-
		$6,4 \pm 0,2$	-	-	-

^a Ponto médio das curvas de desnaturação.

^b Inclinação do gráfico da energia livre de Gibbs, $\Delta G_{U,app}$ em função da concentração de desnaturante.

^c ΔG_{H_2O} é o intercepto do gráfico da energia livre de Gibbs, $\Delta G_{U,app}$ em função da concentração de desnaturante.

^d Parâmetros obtidos a partir da análise dos dados da área do espectro de emissão de fluorescência;

^e Parâmetros obtidos a partir da análise dos dados de espalhamento de luz (LSI);

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

Tabela 9: Parâmetros termodinâmicos associados com o processo de desnaturação da HbGp induzido pela ureia, obtidos de dados espectroscópicos no pH 7,0 a 25 °C, usando o modelo de três estados na análise dos dados. Os ajustes foram feitos usando a equação 7 mostrada na seção 3.1.6.3..

Formas da HbGp	Sondas	$([D]_{1/2})_1$ [mol/L] ^{a,e}	$([D]_{1/2})_2$ [mol/L] ^{a,f}	$-m_1$ [kJmol ⁻¹ (mol/L) ⁻¹] ^{b,e}	$-m_2$ [kJmol ⁻¹ (mol/L) ⁻¹] ^{b,f}	ΔG_1 [kJ/mol] ^e	ΔG_2 [kJ/mol] ^f	ΔG_3 [kJ/mol] ^g
Oxi-	FE ^c	-	5,2 ± 0,2	-	2,7 ± 0,1	-	14 ± 1	-
	LSI ^d	3 ± 1	4,2 ± 0,2	3 ± 1	5 ± 1	9 ± 5	21 ± 1	30 ± 6
	[θ] _{222 nm}	3 ± 2	4,8 ± 0,1	4 ± 2	3,1 ± 0,1	12 ± 8	15 ± 2	27 ± 10
	[θ] _{260 nm}	3 ± 2	4,7 ± 0,1	1,0 ± 0,7	4,7 ± 0,5	3 ± 4	22 ± 2	25 ± 6
	[θ] _{334 nm}	3 ± 12	4,9 ± 0,1	7 ± 13	5,1 ± 0,5	21 ± 45	25 ± 3	-
	[θ] _{414 nm}	1 ± 1	4,3 ± 0,2	10 ± 5	4,8	6 ± 5	21 ± 2	27 ± 7
Cianometa-	FE ^c	-	5,7 ± 0,3	-	3,0 ± 0,2	-	17 ± 2	-
	LSI ^d	1,8 ± 0,7	4,6 ± 0,2	8 ± 3	3,3 ± 0,2	14 ± 3	15 ± 1	29 ± 4
	[θ] _{220 nm}	4 ± 2	6,2 ± 0,2	6 ± 4	4,7 ± 0,4	22 ± 20	29 ± 3	-
	[θ] _{262 nm}	1 ± 5	5,1 ± 0,2	8 ± 14	5,3 ± 0,3	11 ± 20	27 ± 2	-
	[θ] _{334 nm}	3 ± 8	5,8 ± 0,1	6 ± 10	4,3 ± 0,3	18 ± 25	25 ± 2	-
	[θ] _{424 nm}	2 ± 1	5,1 ± 0,1	8 ± 6	5,1 ± 0,2	12 ± 10	26 ± 1	38 ± 11
Meta-	[θ] _{262 nm}	1,85 ± 0,04	6 ± 7	9,1 ± 0,6	6 ± 7	17 ± 2	38 ± 40	-
	[θ] _{374 nm}	1,74 ± 0,05	4 ± 7	8,6 ± 0,8	4 ± 2	15 ± 1	14 ± 20	-
	[θ] _{424 nm}	-	-	-	-	-	-	-

^a Molaridade crítica de ureia;

^b Parâmetro que mostra a dependência da energia livre de Gibbs com a concentração de desnaturante;

^c Parâmetros obtidos a partir da análise dos dados da área do espectro de emissão de fluorescência;

^d Parâmetros obtidos a partir da análise dos dados de espalhamento de luz (LSI);

^e Parâmetros termodinâmicos associados a primeira transição ($N \rightarrow I$);

^f Parâmetros termodinâmicos associados a segunda transição ($I \rightarrow U$);

^g Energia livre de Gibbs total obtida a partir da soma das energias livres associadas a primeira e segunda transições;

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

Os resultados mostram que, embora o processo de desnaturação da oxi-HbGp pode ser descrito com o modelo de dois estados^{87,88}, este é apenas uma aproximação razoável. Os parâmetros obtidos para a segunda transição no modelo de três estados são muito consistentes com os obtidos usando o modelo de dois estados (Tabelas 8 e 9). No entanto, as análises com o modelo de três estados mostram a presença de um intermediário com propriedades similares à do estado nativo, e que está associado à dissociação oligomérica parcial.

4.3.4.2. Cianometa-HbGp

4.3.4.2.1. Modelo de dois estados

As frações de desnaturação ($f_{U,app}$) e as energias livres aparentes (ΔG_{H_2O}) em 220 nm são mostradas na Tabela 8 e Fig. 21B. Os valores de $D_{1/2}$ e $-m$ para a cianometa-HbGp, na região das ligações peptídicas (220 nm), são $6,1 \pm 0,1$ mol/L e $4,2 \pm 0,1$ kJ/mol(mol/L)⁻¹, respectivamente (Tabela 8). Enquanto que o valor da energia associada com a estabilidade da cianometa-HbGp em água (ΔG_{H_2O}) é $25,5 \pm 0,4$ kJ/mol (Tabela 8).

Na região do grupo heme e dos aminoácidos aromáticos, os valores destes parâmetros, monitorados em 420, 262 e 334 nm, são menores que aqueles observados em 220 nm (Tabela 8). Este comportamento foi semelhante ao observado para a oxi-HbGp. No entanto, os valores maiores de $D_{1/2}$ e ΔG_{H_2O} obtidos para a cianometa-HbGp mostram que esta forma da HbGp é mais estável que a forma reduzida (oxi-HbGp). A alta estabilidade da cianometa-HbGp é devido à coordenação do CN⁻ ao ferro, uma vez que este ligante apresenta uma maior tendência de receber elétrons π do grupo heme quando comparado com outros ligantes como a água. Esta interação resulta em uma estabilização do complexo Fe³⁺—His 93⁸⁰.

A cianometa-HbGp apresenta algumas diferenças nos valores dos parâmetros termodinâmicos monitorados em diferentes comprimentos de onda e sondas espectroscópicas (Tabela 8). Assim, o modelo de dois estados é apenas uma boa aproximação para descrever o processo de desnaturação da cianometa-HbGp na presença de ureia.

Os pequenos valores de $D_{1/2}$ obtidos a partir das curvas de LSI (Tabelas 8 e 9 e Fig. 21B) sugerem fortemente que o processo de dissociação oligomérica ocorre em concentrações de ureia menores quando comparado com o processo de desnaturação. Assim, os resultados de LSI corroboram os resultados de ultracentrifugação analítica, onde foi observada a dissociação oligomérica parcial da oxi-HbGp em subunidades menores, em baixas concentrações de desnaturante.

4.3.4.2.2. Modelo de três estados

Os resultados obtidos para a cianometa-HbGp são bastante semelhantes aos descritos acima para a oxi-HbGp (Tabelas 8 e 9). No entanto, a segunda transição, associada ao processo de desnaturação, apresenta valores de $(D_{1/2})_2$, $-m_2$ e ΔG_2 maiores que os obtidos para a oxi-HbGp, devido a maior estabilidade desta forma quando comparada com a forma reduzida.

A Figura 22A mostra os ajustes dos dados de CD em 424 nm para a cianometa-HbGp usando ambos os modelos de dois e três estados, em função da concentração de ureia. Ambos os ajustes são bastante consistentes, e próximos, principalmente na segunda transição (Fig. 22A, Tabelas 8 e 9), onde os dois ajustes coincidem.

Figura 22: (A) Elipticidade em 424 nm para a cianometa-HbGp 3,0 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L, no pH 7,0, na presença de ureia (0,0 – 8,0 mol/L). Os dados experimentais são mostrados pelos símbolos abertos e os ajustes por linhas cheias. (B) Elipticidade em 262 nm para as formas cianometa- e meta-HbGp usando o modelo de três estados para ajustar os dados. Os círculos abertos e triângulos abertos correspondem aos dados experimentais para as formas cianometa- e meta-HbGp, respectivamente.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, n. 1, p. 46-58, 2012.

4.3.4.3. Meta-HbGp

Para a meta-HbGp não foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos associados com o processo de desnaturação, apenas os valores de $D_{1/2}$, devido a que o processo de desenovelamento não é descrito pelo modelo de dois estados. Todos os dados coletados para a meta-HbGp sugerem que o processo de dissociação/desnaturação, quando comparado com as formas oxi- e cianometa-HbGp é mais complexo. Na meta-HbGp a perda de elipticidade, em concentração baixa de ureia, é mais intensa que nas outras duas formas, indicando que na meta-HbGp o processo de desnaturação é diferente e menos cooperativo (Fig. 23, Tabela 8). Estudos anteriores mostram que a meta-HbGp é bastante instável quando exposta a vários tipos de estresse tais como, a adição de surfactantes, o aumento de temperatura, a variação de pH e a adição de ureia^{36,84}. Além disso, um aumento de 13 % nos valores de elipticidade é observado em 0,5 mol/L de ureia, o que pode estar associado com um aumento de estrutura secundária na proteína induzida pelo agente caotrópico. Dados da literatura mostram que a ureia, em baixas concentrações, pode induzir a formação de estruturas secundárias e um aumento na estabilidade da proteína^{89,90}.

A Fig. 23A mostra os espectros de CD na região do heme, para a meta-HbGp, em função da concentração de ureia, no pH 7,0. A intensidade do sinal observada para a banda de Soret (Fig. 23B) é bem menor que o das formas oxi- e cianometa-HbGp na mesma região, sugerindo que a água coordenada no ferro do heme na sexta coordenação induz mudanças apreciáveis na simetria do grupo heme. Em 414 nm duas transições são observadas com o aumento na concentração de ureia: a primeira em $1,95 \pm 0,05$ mol/L e a segunda em $6,4 \pm 0,2$ mol/L (Tabela 8). A primeira transição está associada a mudanças conformacionais na vizinhança do grupo heme devido à formação do hemicromo e a processos de dissociação oligomérica, enquanto que a segunda transição pode ser atribuída à formação de espécies penta-coordenadas e ao processo de desnaturação³⁶. A pequena variação no sinal de elipticidade é devido à alta estabilidade do hemicromo que é a espécie majoritária em solução na faixa de 2,0 a 5,0 mol/L de ureia, como foi descrito na seção de absorção óptica. Em 262 e 374 nm foram obtidos valores de $D_{1/2}$ de $1,93 \pm 0,07$ mol/L e $1,78 \pm 0,05$ mol/L, respectivamente, associados à dissociação oligomérica (Tabela 8).

4.3.4.3.1. Modelo de três estados

A partir do modelo de três estados foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos em alguns comprimentos de onda. As análises dos dados de CD foram feitas em 262 e 374 nm e os resultados são mostrados na Tabela 9. Os valores de $(D_{1/2})_1$ associados a primeira transição para ambos os comprimentos de onda são em torno de $1,8 \pm 0,1$ mol/L de ureia, devido a uma menor estabilidade desta forma da HbGp. Esta transição pode ser atribuída à dissociação oligomérica. Uma diferença significativa é observada em relação ao estado intermediário para as três formas estudadas: no caso das formas oxi- e cianometa-HbGp o estado intermediário é bastante semelhante ao nativo, enquanto que para a meta-HbGp, as propriedades do estado intermediário são mais próximas do estado desnaturado (Fig. 22B).

Figura 23: (A) Espectros de dicroísmo circular (CD) da meta-HbGp 3,0 mg/mL, em tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em função da concentração de ureia na região do heme. (B) Elipticidade em 414 nm (quadrados cheios).

Além disso, na meta-HbGp a segunda transição não é muito cooperativa (Fig. 22B) e, portanto os parâmetros termodinâmicos atribuídos a esta transição apresentam erros muito

grandes (Tabela 9). É evidente que, para todas as formas de proteína, duas transições são observadas, uma primeira envolvendo o processo de dissociação oligomérica e uma segunda devido à desnaturação da proteína.

A estrutura oligomérica da HbGp é constituída por 12 protômeros $(abcd)_3L_3$ envolvendo sete cadeias diferentes, quatro globinas *a*, *b*, *c* e *d*, e três cadeias linkers, sem grupo heme, L_1 , L_2 e L_3 . Assim, a estrutura íntegra do oligômero é formada por 144 globinas e 36 cadeias linkers. Um modelo de desnaturação apropriado para descrever o processo de desenovelamento da HbGp deveria considerar todas as cadeias e subunidades presentes no equilíbrio. Estudos da literatura descrevendo o processo de desnaturação de proteínas por agentes desnaturantes em geral focalizam uma aplicação bem geral onde frequentemente apenas um equilíbrio é considerado, onde a proteína oligomérica, geralmente um dímero, sofre dissociação em monômeros^{91,92}. Estes estudos consideram a formação de um intermediário que está associado ao dímero dissociado ou ao dímero num estado conformacional diferente do nativo, porém não desnaturado^{91,92}. Assim, esses modelos são uma aproximação para descrever o processo de desnaturação da HbGp, devido a que o intermediário na HbGp está associado a várias subunidades diferentes dissociadas e com proporções diferentes em solução.

Em resumo, as análises usando os modelos de dois e três estados, onde no segundo caso o intermediário é arbitrário, ou seja, não é considerada a estequiometria das espécies em solução, forneceram importantes informações sobre o processo de desnaturação para as três formas da HbGp. Os parâmetros obtidos por ambos os modelos foram bastante similares, porém o modelo de três estados permitiu obter informações sobre a primeira transição e do intermediário envolvido no processo de desnaturação. No caso da meta-HbGp o modelo de três estados permitiu estimar os parâmetros termodinâmicos associados ao processo de desnaturação.

PARTE IV

EFEITO DA UREIA NA HbG_p: ESTUDOS DE AUC E SAXS

4.4. Caracterização hidrodinâmica das espécies presentes em equilíbrio

4.4.1. Dados de ultracentrifugação analítica

A Fig. 24A mostra as distribuições, $c(S)$, dos coeficientes de sedimentação para três concentrações de hemoglobina na presença de 1,0 mol/L de ureia no pH 7,0, monitoradas em 415 nm. Elas apresentam um único pico, indicando uma alta homogeneidade do sistema nestas condições. Estes ajustes foram realizados a partir da fixação do V_{bar} igual a 0,733 mL/g determinado pelo programa SEDFIT⁴⁸⁻⁵¹, onde a razão f/f_0 foi o parâmetro de regularização dos ajustes. As viscosidades e densidades das soluções para cada concentração de ureia foram determinadas no programa Sednterp^{51,62}.

Em 1,0 mol/L de ureia a distribuição é composta por um único pico bastante fino com coeficiente de sedimentação em torno de $58,6 \pm 0,6$ S para as três concentrações de proteína. Nesta concentração de ureia a proteína mantém-se na forma íntegra sendo observado o mesmo valor de $s_{20,w}$ da oxi-HbGp no pH 7,0, na ausência de ureia (Fig. 24A)¹⁷. Os coeficientes de sedimentação, $s_{20,w}$, e as massas moleculares das espécies presentes em equilíbrio, em cada concentração do agente desnaturante, são mostrados na Tabela 10. Os valores MM mostrados na Tabela 10 foram obtidos a partir de ajustes globais dos dados de velocidade de sedimentação (SV) utilizando o programa SEDPHAT (versão 9.4)^{51,53}. Na Tabela 10 os valores de MM de 3600 ± 100 kDa, e o raio de Stokes (R_s) de $13,5 \pm 0,2$ nm, sugerem que a espécie presente em 1,0 mol/L de ureia corresponde a da oxi-HbGp não dissociada. O valor de R_s estimado por AUC para a oxi-HbGp é muito consistente com o diâmetro hidrodinâmico (D_H), de 27 ± 1 nm, determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)^{1,84}.

O aumento na concentração de ureia induz a dissociação oligomérica, e novas espécies em solução estão presentes no equilíbrio. Em 2,0 mol/L de ureia uma pequena contribuição (3 %) de uma espécie com $s_{20,w}$, em torno de 9,6 – 10,5 S é observada, e pode ser atribuída à subunidade dodecamérica ($(abcd)_3$, Tabela 10). O valor de R_s estimado para o dodecâmero varia entre 6,2 e 5,1 nm (Tabela 10) e é consistente com o diâmetro hidrodinâmico de 11 - 14 nm obtidos por DLS para o dodecâmero isolado. Os resultados sugerem que, nesta concentração de desnaturante, a maior parte da proteína (97 %) permanece na forma não dissociada devido à alta estabilidade oligomérica da HbGp nestas condições.

Figura 24: Distribuições contínuas dos coeficientes de sedimentação da oxi-HbGp, em três concentrações 100, 200 e 300 µg/mL de proteína, 100 mmol/L tris-HCl pH 7,0, contendo 50 mmol/L NaCl. (A) 1,0 mol/L, (B) 3,0 mol/L e (C) 6,0 mol/L de ureia. Os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração foram determinados como o valor máximo dos picos das curvas de $c(s)$. Experimentos monitorados em 415 nm.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

A massa molecular determinada para a subunidade $(abcd)_3$ de 205 ± 5 kDa é bastante próxima do valor estimado a partir dos dados obtidos por espectrometria de massas das cadeias globínicas isoladas, ou seja, $(abcd)_3$ equivale a $(18,26+16,48+17,33+16,4)*3$, ou seja, 205,4 kDa^{18,20}. É importante mencionar o trabalho de Krebs et al.⁷ sobre as propriedades da subunidade dodecamérica, $(abcd)_3$, da hemoglobina de *Lumbricus terrestris* (HbLt). Os autores observaram que o dodecâmero pode ser obtido a partir da dissociação com ureia da proteína íntegra. Este processo consistiu de um equilíbrio de três espécies com coeficientes de sedimentação para o dodecâmero, trímero e monômero de 8,5 - 9,4 S, 3,6 - 4,4 S e 1,9 S, respectivamente.

Tabela 10: Propriedades hidrodinâmicas, $s_{20,w}$ em (S), MM em (kDa), R_s em (nm) e Área dos picos (%), para a oxi-HbGp, na presença de diferentes concentrações de ureia, no pH 7,0 a 20 °C, obtidas a partir da análise de dados de velocidade de sedimentação nos programas SEDFIT e SEDPHAT.

[Ureia] mol/L	Propriedades	Espécies observadas				
		Monômero, <i>d</i>	Trímero, <i>abc</i>	Tetrâmero, <i>abcd</i>	Dodecâmero, <i>(abcd)₃</i>	HbGp íntegra
0,0	$s_{20,w}$	-	-	-	-	58,6 ± 0,6
	MM	-	-	-	-	3620 ± 80
	R_s	-	-	-	-	13,7 ± 0,1
	Área	-	-	-	-	100
1,0	$s_{20,w}$	-	-	-	-	57,3 ± 0,3
	MM	-	-	-	-	3600 ± 100
	R_s	-	-	-	-	13,5 ± 0,2
	Área	-	-	-	-	100
2,0	$s_{20,w}$	-	-	-	10,3 ± 0,3	57,3 ± 0,3
	MM	-	-	-	205 ± 5	3600 ± 100
	R_s	-	-	-	6,2 ± 0,3	13,3 ± 0,4
	Área	-	-	-	3 ± 1	97 ± 1
3,0	$s_{20,w}$	-	-	6,1 ± 0,8	9,2 ± 0,6	58,5 ± 0,6
	MM	-	-	72 ± 6	203 ± 16	3500 ± 200
	R_s	-	-	4,2 ± 0,3	6,1 ± 0,4	13,9 ± 0,3
	Área	-	-	20 ± 4	15 ± 2	65 ± 7
4,0	$s_{20,w}$	2,0 ± 0,6	3,8 ± 0,4	5,5 ± 0,4	9,4 ± 0,6	57,4 ± 0,6
	MM	17 ± 1	51 ± 1	70 ± 5	204 ± 3	3600 ± 50
	R_s	2,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,9 ± 0,3	5,1 ± 0,4	13,2 ± 0,2
	Área	25 ± 6	24 ± 5	8 ± 2	17 ± 6	26 ± 3
5,0	$s_{20,w}$	2,1 ± 0,6	4,1 ± 0,6	5,8 ± 0,5	9,3 ± 0,7	-
	MM	17 ± 2	53 ± 2	67 ± 4	202 ± 8	-
	MM^a	16,8 ± 0,7 ^a	52 ± 3 ^a	69 ± 2 ^a	206 ± 3 ^a	-
	R_s	2,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3	5,3 ± 0,6	-
	Área	46 ± 2	37 ± 5	6 ± 1	11 ± 4	-
6,0	$s_{20,w}$	2,1 ± 0,6	3,8 ± 0,5	5,3 ± 0,8	9,1 ± 0,8	-
	MM	18 ± 2	51 ± 4	71 ± 5	206 ± 12	-
	R_s	2,7 ± 0,5	3,5 ± 0,4	4,3 ± 0,2	5,5 ± 0,4	-
	Área	40 ± 2	49 ± 4	7 ± 1	4 ± 1	-
HbLt	$s_{20,w}^*$	1,83 ± 0,01	3,85 ± 0,02	4,73 ± 0,02	9,38 ± 0,05	-
	MM^{**}	16,6	53	69,6	208,8	3,600

^a Massas moleculares obtidas a partir de ajustes globais de dados de equilíbrio de sedimentação;

* Dados teóricos estimados para as subunidades da HbLt a partir da sequência de aminoácidos no programa HydroPro⁵⁵.

** Dados teóricos estimados para as subunidades da HbLt a partir da sequência de aminoácidos no programa Sednterp^{51,62}.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Na Fig. 24B as curvas de distribuição de coeficientes de sedimentação, c (S), são mostradas para oxi-HbGp, na presença de 3,0 mol/L de ureia, no pH 7,0. Três espécies aparecem na distribuição, onde a espécie com MM menor não é observada em 1,0 e 2,0 mol/L de ureia. Esta espécie com massa molecular de 72 ± 6 kDa e $s_{20,w}$ de $6,1 \pm 0,8$ S é atribuída ao tetrâmero **abcd** (Tabela 10, Figura 24B). Além disso, devido às limitações da técnica e da complexidade das amostras, o valores de MM para o tetrâmero **abcd**, obtido a partir dos dados de SV, é considerado aceitável, quando comparado com o valor de MM de 68 kDa, determinado por MALDI-TOF-MS^{18,20}. As porcentagens relativas em 3,0 mol/L de ureia para o tetrâmero, dodecâmero e proteína íntegra foram estimadas em 20 ± 4 , 15 ± 2 e $65 \pm 7\%$, respectivamente. Portanto, o aumento na concentração de ureia induz uma redução de 35 % (Tabela 10) na contribuição da proteína oligomérica, e em 4,0 mol/L esta diminuição é de 74 %, sugerindo que o aumento na concentração de desnaturante desfavorece a manutenção da estrutura oligomérica nativa. Os resultados mostram que o processo de dissociação induzida pela ureia é semelhante, em alguns aspectos, à dissociação alcalina¹⁹. Os dados de ultracentrifugação analítica sugerem ainda que o processo de dissociação oligomérica da HbGp apresenta um mecanismo específico de dissociação na presença de ureia. Até 3,0 mol/L de agente desnaturante não é observada a contribuição das subunidades menores, trímeros **abc** e monômeros **d**, indicando que primeiramente o oligômero se dissocia em dodecâmero, e, em seguida, o aumento na concentração de ureia induz a dissociação do $(abcd)_3$ em tetrâmero, trímeros e monômeros.

Em 4,0 mol/L de ureia duas espécies adicionais são observadas em equilíbrio, como mostrado na Tabela 10. De acordo com os valores de coeficientes de sedimentação $s_{20,w}$ e de massas moleculares MM , estas novas espécies estão associadas às contribuições da cadeia monomérica **d** e do trímero **abc**. Os valores de $s_{20,w}$ e MM são de $2,0 \pm 0,6$ S e 17 ± 1 kDa para o monômero **d**, e $3,8 \pm 0,4$ S e 51 ± 1 kDa para o trímero **abc** (Tabela 10). A contribuição de proteína não dissociada diminui significativamente para 26 ± 3 %, em 4,0 mol/L de ureia, sendo compatível com o aumento das contribuições das espécies menores em solução (Tabela 10). Os valores de coeficientes de sedimentação e MM obtidos para o monômero **d** e para o trímero **abc** são semelhantes aos determinados em outros estudos^{19,26}.

Embora, a ureia promova a dissociação oligomérica da HbGp, até 4,0 mol/L de desnaturante este processo é caracterizado apenas por pequenas mudanças na estrutura secundária, e terciária, observadas na região das ligações peptídicas e do grupo heme, como mostrado nos estudos espectroscópicos, especialmente de CD ⁸¹. Porém, em concentrações superiores a 4,0 mol/L de ureia não foi observada a contribuição de nenhuma espécie com $s_{20,w}$ de $58,6 \pm 0,6$ S e mudanças significativas são observadas a partir dos dados espectroscópicos, sugerindo que a HbGp encontra-se totalmente dissociada em 5,0 mol/L do agente desnaturante. As contribuições percentuais das espécies menores em 5,0 mol/L, são 46 ± 2 , 37 ± 5 , 6 ± 1 e 11 ± 4 %, para o monômero **d**, o trímero **abc**, tetrâmero **abcd** e dodecâmero **(abcd)₃**, respectivamente. Os valores de *MM* e $s_{20,w}$ em 5,0 mol/L foram também determinados a partir dos dados de equilíbrio de sedimentação e são mostrados na Tabela 10. Os valores obtidos para cada espécie presente na solução são consistentes com os dados obtidos por MALDI-TOF-MS e AUC em meio alcalino ¹⁸⁻²⁰.

Nas curvas de distribuição de *c* (S) não são observadas as contribuições das cadeias linkers, **L₁**, **L₂** e **L₃**, devido à sobreposição destas cadeias polipeptídicas a outras espécies. Estudos recentes, descrevendo a caracterização das espécies da HbGp por eletroforese SDS-PAGE e MALDI-TOF-MS, mostram que uma cadeia linker liga-se fortemente ao trímero **abc** ²⁰. Por outro lado, baseado nas sequências de aminoácidos das cadeias polipeptídicas da HbLt, as previsões da $s_{20,w}$ para as cadeias linkers mostram que os valores dos coeficientes de sedimentação são muito próximos dos valores obtidos para a subunidade monomérica **d** ²⁰. Deste modo, é possível que as contribuições destas cadeias polipeptídicas se sobreponham às contribuições do monômero **d** e do trímero **abc**, e por este motivo, as mesmas não são observadas de forma isolada.

Na Fig. 24C são mostradas as distribuições de *c* (S) para oxi-HbGp, em pH 7,0, para três concentrações de proteína distintas, 100, 200 e 300 µg/mL, em 6,0 mol/L de ureia. Nas curvas de distribuição observaram-se várias espécies com coeficientes de sedimentação de $2,0 \pm 0,6$ S, $3,8 - 4,2$ S, $5,3 \pm 0,8$ S e $9,1 \pm 0,8$ S atribuídos, respectivamente, ao monômero **d**, trímero **abc**, tetrâmero **abcd**, e dodecâmero **((abcd)₃**, Tabela 10). Na presença de ureia não foi observada a contribuição de dímeros de monômeros **d₂**, sugerindo que, provavelmente, a ureia inibe a associação/agregação da HbGp e das subunidades dissociadas. É importante ressaltar que para a oxi-HbGp, em 6,0 mol/L de ureia, um total de 89 % das espécies presentes em solução corresponde a monômeros **d** e trimeros **abc** (Tabela 10). Isto sugere que a presença de 6,0 mol/L de ureia promove a completa dissociação oligomérica e desnaturação da HbGp em

subunidades de massa molecular menor, como descrito anteriormente nas seções sobre os dados espectroscópicos ^{1,37}. Na Tabela 10 observa-se que, na concentração 6,0 mol/L de ureia, ocorre um aumento considerável no erro do raio de Stokes estimado, especialmente nas frações de monômero e trímero, sugerindo que este aumento pode ser devido à desnaturação das subunidades em solução aumentando a polidispersividade destas frações. Neste caso, a presença de espécies desnaturada e não desnaturada em solução, induzem um aumento do erro deste parâmetro. Os valores de raios de Stokes para o monômero e trímero estão bastante próximos dos observados para outras proteínas de mesma massa molecular, tais como a mioglobina e a hemoglobina humana ³¹.

4.4.2. Dados de SAXS

Estudos anteriores por absorção óptica, emissão de fluorescência, e CD mostraram que ambas as formas, oxi- e cianometa-HbGp tem um processo de desnaturação semelhante. No entanto, a forma oxidada, cianometa-HbGp, é mais estável. Assim, os intermediários oligoméricos são os mesmos para as duas formas, e estudos de SAXS foram realizados para comparar a estabilidade das formas oxi- e cianometa-HbGp, a fim de complementar os dados obtidos por AUC.

A Fig. 25 mostra as curvas experimentais de SAXS para a oxi-HbGp 3,0 mg/mL, no pH 7,0, 20 °C (representadas pelos símbolos, Figs. 25A e 25C), os ajustes obtidos no programa GNOM (linhas cheias, Figs. 25A e 25C) e as correspondentes funções de distribuição de distâncias $p(r)$ (Figs. 25B e 25D) em função da concentração de ureia. As curvas de SAXS, na ausência de ureia, apresentam três ombros característicos, centrados em valores de q igual a 0,04, 0,07 e 0,12 Å⁻¹ (Fig. 25A). Em 0,0 mol/L de ureia, a oxi-HbGp apresenta valores de $I(0)$, R_g e D_{max} , respectivamente, de $0,26 \pm 0,01$, 106 ± 1 Å e 300 ± 10 Å (Tabela 11), os quais são similares a outros resultados independentes obtidos por SAXS ⁷⁹. Na presença do agente desnaturante, entre 1,0 e 4,0 mol/L, não são observadas alterações significativas nos valores de R_g e D_{max} (Tabela 11). No entanto, uma diminuição na intensidade de espalhamento em baixo q é observada, onde os valores de $I(0)$ variam de 0,26 para 0,10 u.a (Figs. 25A e 25C). As curvas de $p(r)$ (Figs. 25B e 25D) apresentam a mesma tendência descrita para os valores de $I(0)$, sugerindo que a oxi-HbGp, assim como foi mostrado por AUC, sofre dissociação parcial nesta faixa de concentração de desnaturante. A

diminuição da intensidade do $I(0)$ está associada com a formação de espécies menores em solução (ver Tabela 10). As alterações nas curvas de $p(r)$ e nos valores de $I(0)$ são relativamente pequenas, devido à contribuição significativa de proteína não dissociada na intensidade de espalhamento, para esta faixa de concentração de ureia. Em concentrações acima de 4,0 mol/L as curvas de SAXS sofrem uma diminuição drástica nos valores de $I(0)$, bem como, a perda de resolução dos ombros, indicando a dissociação total da oxi-HbGp e o início do processo de desnaturação (Figs. 25A e 25C).

Em 5,0 mol/L de ureia, o raio de giro R_g das espécies presentes em solução aumenta de 106 ± 1 para 118 ± 2 Å e a dimensão máxima D_{max} de 300 ± 10 para 500 ± 10 Å (Tabela 11), onde o aumento nos valores destes parâmetros pode ser atribuído ao processo de desnaturação, como sugerido em estudos anteriores de espectroscopia⁸¹. Em concentrações maiores de ureia, 6,0 e 7,0 mol/L, a desnaturação das espécies presentes em equilíbrio é completa, sendo caracterizada por valores de R_g e D_{max} de 169 ± 4 e 620 ± 15 Å em 6,0 mol/L de ureia, e 203 ± 6 e 740 ± 15 Å, em 7,0 mol/L de ureia (Tabela 11).

Figura 25: (A) e (C) Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo da oxi-HbGp 3,0 mg/mL, em tampão misto acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em função da concentração de ureia. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas os ajustes obtidos no programa GNOM. (B) e (D) Funções de distribuição de distâncias $p(r)$ correspondentes, respectivamente, às curvas de espalhamento em (A) e (C), obtidas no programa GNOM. Os símbolos representados em (B) e (D) têm o mesmo significado que para (A) e (C).

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Como mostram as Figs. 25C e 25D os perfis das curvas de espalhamento e $p(r)$, acima de 4,0 mol/L de ureia, mostram duas populações distintas que estão associadas à proteína dissociada e desnaturada. As funções de distribuição de distâncias são caracterizadas por uma população com dimensões menores e R_g em torno de 50 Å e uma segunda contribuição, caracterizada por uma distribuição larga com valores de R_g superiores a 150 Å. A primeira população com R_g menor está associada à subunidades da HbGp, tais como, monômero **d** e trímero **abc**, enquanto que a segunda população caracterizada por valor de R_g maior pode ser atribuída à espécies como o dodecâmero, tetrâmero e em menor proporção à proteína desnaturada, como foi observado em estudos anteriores⁷⁹.

Tabela 11: Parâmetros estruturais para a hemoglobina de *G. paulistus*, nas formas oxi- e cianometa-, 3,0 mg/mL, em diferentes concentrações de ureia, obtidos por SAXS.

Formas da HbGp	Ureia (mol/L)	R_g (Å) ^a	R_g (Å) ^b	D_{max} (Å) ^a	$I(0)$ (u.a) ^a
Oxi-	0,0	106 ± 1	105 ± 10	300 ± 10	0,26 ± 0,01
	2,0	106 ± 1	107 ± 9	300 ± 10	0,19 ± 0,01
	4,0	106 ± 1	108 ± 8	300 ± 10	0,10 ± 0,02
	5,0	118 ± 2	115 ± 12	500 ± 10	0,019 ± 0,005
	6,0	169 ± 4	135 ± 17	620 ± 15	0,012 ± 0,001
	7,0	203 ± 6	201 ± 40	740 ± 15	0,011 ± 0,001
Cianometa-	0,0	107 ± 1	107 ± 8	300 ± 10	0,20 ± 0,01
	2,0	106 ± 1	108 ± 7	300 ± 10	0,16 ± 0,01
	4,0	107 ± 1	107 ± 7	300 ± 10	0,14 ± 0,02
	6,0	106 ± 1	145 ± 20	350 ± 10	0,034 ± 0,002
	7,0	160 ± 2	166 ± 40	550 ± 15	0,011 ± 0,001
	8,0	189 ± 3	170 ± 30	600 ± 20	0,009 ± 0,002

^a Parâmetros R_g (raio de giro) e D_{max} (dimensão máxima) e $I(0)$ (intensidade de espalhamento quando $q=0$) obtidos usando o programa GNOM.

^b Parâmetro R_g obtido a partir da aproximação de Guinier.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet- forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

A cianometa-HbGp, na presença de ureia, apresenta processos de dissociação e desnaturação semelhantes ao comportamento observado para a oxi-HbGp. No entanto, a cianometa-HbGp é mais estável quando comparada com a forma oxi-, uma vez que as curvas de SAXS sofrem apenas pequenas alterações até 5,0 mol/L de ureia (Figs. 26A e 26B). Em 6,0 mol/L de desnaturante, a diminuição nos valores de $I(0)$ bem como, a perda dos ombros nas curvas (Fig. 26C e Tabela 11), evidenciam o processo de dissociação oligomérica⁸¹.

Figura 26: (A) e (C) Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo da cianometa-HbGp 3,0 mg/mL em tampão misto acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0, em função da concentração de ureia. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas os ajustes obtidos no programa GNOM. (B) e (D) Funções de distribuição de distância $p(r)$ correspondentes, respectivamente, às curvas de espalhamento em (A) e (C), obtidas no programa GNOM. Os símbolos representados em (B) e (D) têm o mesmo significado que para (A) e (C).

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Os valores de R_g obtidos a partir dos ajustes no GNOM apresentam aumento de 106 ± 1 para 160 ± 2 Å em 7,0 mol/L de ureia, enquanto que os valores de $I(0)$ têm uma redução de 4 vezes (de 0,14 a 0,034 u.a.). Estas variações estão associadas aos processos de dissociação oligomérica e desnaturação das espécies dissociadas em solução. As curvas de distribuição de distâncias $p(r)$ para a cianometa-HbGp apresenta tendência semelhante à observada para oxi-HbGp, porém com mudanças significativas para concentrações de ureia maiores (6,0 e 7,0 mol/L, Fig. 26D e Tabela 11).

Tabela 12: Parâmetros estruturais para a hemoglobina de *G. paulistus*, nas formas oxi- e cianometa-, 0,5 mg/mL, em diferentes concentrações de ureia, obtidos por SAXS.

Formas da HbGp	Ureia (mol/L)	R_g (Å) ^a	R_g (Å) ^b	D_{max} (Å) ^a	$I(0)$ (u.a) ^a
Oxi-	0,0	107 ± 1	108 ± 10	300 ± 10	$0,047 \pm 0,002$
	2,0	106 ± 1	109 ± 8	300 ± 10	$0,021 \pm 0,001$
	3,0	107 ± 1	109 ± 9	300 ± 10	$0,025 \pm 0,002$
	4,0	120 ± 2	124 ± 14	450 ± 10	$0,006 \pm 0,002$
	5,0	215 ± 5	175 ± 12	680 ± 15	$0,004 \pm 0,001$
	5,5	225 ± 6	175 ± 30	750 ± 20	$0,005 \pm 0,002$
Cianometa-	0,0	108 ± 1	110 ± 6	300 ± 10	$0,041 \pm 0,001$
	2,0	110 ± 1	113 ± 11	300 ± 10	$0,032 \pm 0,001$
	3,0	111 ± 1	117 ± 10	300 ± 10	$0,035 \pm 0,003$
	4,0	111 ± 1	125 ± 15	300 ± 10	$0,023 \pm 0,001$
	5,0	129 ± 2	142 ± 18	450 ± 10	$0,014 \pm 0,001$
	5,5	181 ± 4	170 ± 30	620 ± 20	$0,010 \pm 0,002$

^a Parâmetros R_g (raio de giro) e D_{max} (dimensão máxima) e $I(0)$ (intensidade de espalhamento quando $q=0$) obtidos usando o programa GNOM.

^b Parâmetro R_g obtido a partir da aproximação de Guinier.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Estudos complementares do desenovelamento da HbGp, nas formas oxi- e cianometa-, por SAXS foram realizados com 0,5 mg/mL de proteína. Em 0,5 mg/mL de proteína ambas as formas, oxi- e cianometa-HbGp, são menos estáveis na presença de ureia, sendo observadas mudanças estruturais em 3,0 e 4,0 mol/L de ureia para a oxi- e cianometa-HbGp, respectivamente (Tabela 12). Como descrito anteriormente, em 3,0 mg/mL, as mudanças nos valores de R_g , D_{max} e $I(0)$ ocorrem apenas acima de 4,0 mol/L e 6,0 mol/L, para as formas oxi- e cianometa-HbGp, respectivamente (Tabelas 10 e 11). A diminuição na concentração de proteína de 3,0 a 0,5 mg/mL favorece o processo de dissociação oligomérica, como foi descrito em trabalhos anteriores⁷⁹. O efeito da concentração de proteína no processo de dissociação foi observado anteriormente por DLS e cromatografia por exclusão de tamanho⁷⁹.

A Fig. 27 mostra os gráficos de Kratky para as formas oxi- e cianometa-HbGp, em função da concentração de ureia. Em 0,0 mol/L de ureia, as formas oxi- e cianometa- têm picos bem definidos em valores de q baixos, característicos de proteínas globulares enoveladas, indicando que a HbGp está totalmente enovelada.

Figura 27: Gráficos de Kratky para a HbGp 3,0 mg/mL em tampão acetato-fosfato 30 mmol/L, pH 7,0 em função da concentração de ureia. (A) Oxi-HbGp e (B) cianometa-HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet- forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Um aumento na concentração de ureia induz a perda progressiva na intensidade destes picos devido à dissociação oligomérica e para concentrações acima de 5,0 mol/L de ureia para a oxi-HbGp e 7,0 mol/L para a cianometa-HbGp, ocorre o desaparecimento destes picos sugerindo que a HbGp está totalmente desnaturada.

4.5. Modelo de dissociação na presença de ureia

Os estudos da HbGp por várias técnicas, tais como, CD, absorção óptica, emissão de fluorescência, ultracentrifugação analítica e SAXS sugerem que a estequiometria da estrutura oligomérica da HbGp é semelhante ao proposto por Vinogradov⁹³ para a HbLt. Segundo o modelo de Vinogradov a estrutura da HbLt é composta por 12 protômeros, sendo cada um constituído por um dodecâmero de globinas e um trímero de cadeias linkers **L**, $(abcd)_3L_3$ ⁹³. Um trabalho sobre a estrutura cristalográfica preliminar da HbGp, com resolução de 3,15 $\text{\AA}$ ²⁷, mostra que a estequiometria e os níveis hierárquicos de HbGp são os mesmos descritos para

HbLt. O modelo de dissociação da HbGp na presença de ureia foi proposto assumindo que a estequiometria da HbGp é idêntica a da proteína ortóloga, HbLt, como proposto por Vinogradov e descrito em estudos cristalográficos recentes.

De acordo com os resultados experimentais, o processo de desnaturação da HbGp, na presença de ureia, pode ser descrito por duas fases, conforme o modelo esquemático mostrado na Fig. 28.

Figura 28: Modelo de dissociação oligomérica da HbGp, na presença de ureia, no pH 7,0, baseado em dados de ultracentrifugação analítica e SAXS. As estruturas cristalográficas usadas no esquema abaixo, para as diferentes subunidades, foram adaptadas do PDB (2GTL)²⁴, e correspondem à estrutura da HbLt, que é similar à HbGp.

Fonte: Carvalho, F. A. O. et al. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation model, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 340-348, 2013.

Na primeira etapa do processo ocorre a dissociação oligomérica, produzindo várias espécies em solução, seguida por uma segunda fase, onde as espécies dissociadas se desnaturam. Assim, o processo de dissociação oligomérica da HbGp na presença de ureia, pode ser descrito por um modelo, onde a proteína íntegra, $12x(abcd)_3L_3$, em 2,0 mol/L de desnaturante sofre dissociação parcial produzindo dodecâmero $(abcd)_3$. Em seguida, em 3,0 mol/L, o dodecâmero $(abcd)_3$ sofre dissociação parcial em tetrâmero $abcd$, como é mostrado na Fig. 28. Em concentrações de ureia mais elevadas (4,0 mol/L), o tetrâmero $abcd$ se dissocia em espécies menores, tais como, o trímero abc e o monômero d . Esta primeira etapa está associada com um intermediário do processo de desnaturação da HbGp, onde das diferentes espécies presentes em equilíbrio na solução, poucas mudanças espectrais são observadas para esta faixa de concentração de desnaturante. Este comportamento está associado à contribuição

expressiva de proteína não dissociada em solução, em razão das espécies dissociadas não apresentarem alterações significativas nas estruturas secundária e terciária. A segunda etapa do processo ocorre em concentrações de ureia acima de 5,0 - 6,0 mol/L, onde as espécies dissociadas da HbGp desnaturam. Devido ao grande número de espécies presentes em equilíbrio, e uma significativa contribuição de proteína não dissociada até 4,0 mol/L de ureia, o mecanismo de dissociação da HbGp é complexo. No entanto, o modelo no qual os estados nativo (*N*), intermediário (*I*) e desnaturado (*U*) estão em equilíbrio, embora seja limitado, foi o que melhor representou o processo de desnaturação da HbGp na presença de ureia. Os estudos de SAXS mostraram que as formas oxi- e cianometa-HbGp sofrem desnaturação, em concentrações de ureia acima de 4,0 e 6,0 mol/L, respectivamente, e o processo de desnaturação é caracterizado por um aumento nos valores de D_{max} e R_g (Tabelas 11 e 12). Além disso, estudos de SAXS indicam que a cianometa-HbGp é mais estável na presença de ureia que a oxi-HbGp.

A partir dos dados espectroscópicos e de ultracentrifugação analítica fica evidente que as cadeias globínicas apresentam uma ordem de dissociação específica como mostrado na Fig. 28, ocorrendo a dissociação do oligômero primeiro em dodecâmero, seguida de tetrâmero, trímero e monômero. A contribuição das cadeias linkers não é observada nos estudos de ultracentrifugação analítica e uma importante etapa do mecanismo de dissociação ainda precisa ser identificada. Em qual concentração de ureia os linkers se dissociam/desnaturam? Provavelmente, a contribuição destas cadeias esteja sobreposta com outras subunidades. A forma como as cadeias da HbGp estão organizadas na estrutura oligomérica, com as cadeias linkers voltadas para o interior da estrutura, fortalece o argumento que as cadeias globínicas tendem a se dissociar primeiro. Outro ponto que torna ainda mais difícil a elucidação total do mecanismo de dissociação é a interação de uma destas cadeias linkers com o trímero *abc*, e a presença de isoformas em algumas cadeias polipeptídicas. Estudos de ultracentrifugação com o trímero isolado sugerem que apenas 20 % dos trímeros encontram-se ligados a uma das três cadeias linkers. Além disso, a forma não globular destas cadeias, que leva a uma maior assimetria quando comparada com as cadeias globínicas nativas, associada à possível dissociação/desnaturação em concentrações mais elevadas de ureia, podem contribuir fortemente para que estas cadeias polipeptídicas tenham propriedades hidrodinâmicas similares às das cadeias globínicas desnaturadas, ocorrendo uma sobreposição das contribuições destas subunidades na distribuição, e dificultando a resolução dos picos correspondentes às contribuições individuais das cadeias linkers.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram sintetizadas e estão descritas nos itens mostrados a seguir:

- As frações obtidas por SEC foram caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE, espectrometria de massas e ultracentrifugação analítica, onde os valores de MM e $s_{20,w}$ para as subunidades são consistentes com dados reportados na literatura para a HbGp e para outras hemoglobinas extracelulares. Além disso, os dados mostraram que a fração monomérica **d** é extremamente pura, porém apresenta uma tendência em oligomerizar formando dímero, trímero e monômero, sendo o dímero o estado oligomerizado mais abundante em solução.
- Para a fração IV (trímero) embora a subunidade **abc** seja a espécie majoritária no equilíbrio em solução, outros contaminantes associados às cadeias linkers foram observados. Adicionalmente, duas contribuições de trímero T_1 e T_2 foram identificadas na HbGp e estão relacionadas à presença de isoformas na cadeia polipeptídica **c**. A fração I obtida da cromatografia apresentou a mesma composição da proteína íntegra purificada, sendo portanto, atribuída a HbGp não dissociada.
- A estabilidade oligomérica da HbGp em meio alcalino depende fortemente do estado de oxidação do heme e do ligante coordenado ao centro metálico. Assim, diferenças significativas no processo de dissociação para as três formas da HbGp foram observadas. Os dados de AUC sugerem que a forma cianometa-HbGp é a mais resistente à dissociação em meio alcalino, sendo observada uma contribuição significativa de proteína íntegra em solução no pH 9,0, enquanto que a oxi-HbGp apresenta uma composição semelhante de espécies menores e de proteína não dissociada em torno de 50 %. Para a meta-HbGp no pH 8,0 a dissociação oligomérica é completa. Portanto, a ordem de estabilidade para as três formas da HbGp é dada por: cianometa- > oxi- > meta-HbGp. As espécies presentes em solução apresentam propriedades hidrodinâmicas idênticas às correspondentes subunidades isoladas por SEC.
- Assim como descrito em meio alcalino, na presença de ureia foi observada a mesma tendência de estabilidade para as diferentes formas da HbGp. Além disso, o aumento na concentração do agente desnaturante induz a dissociação e desnaturação da estrutura oligomérica e a oxidação do ferro do grupo heme, do estado Fe^{2+} para Fe^{3+} .

- Os processos de desnaturação descritos por técnicas espectroscópicas para as formas oxi- e cianometa-HbGp são bastante similares, enquanto que para meta-HbGp o processo mostrou-se mais complexo. Os dados de absorção óptica para meta-HbGp mostraram que existem várias espécies presentes em equilíbrio, e duas transições são observadas, a primeira em 1,5 - 2,0 mol/L devido à conversão da espécie aquometa- para hemicromo, e a segunda em 5,0 mol/L, atribuída à desnaturação e conversão do hemicromo em espécies penta-coordenadas.
- O processo de desnaturação para as formas oxi- e cianometa-HbGp foi analisado com modelos de dois e três estados, e para meta-HbGp apenas com o último. No modelo de dois estados, embora bons ajustes tenham sido obtidos, todas as informações sobre o estado intermediário eram desconsideradas. No modelo de três estados duas transições estão presentes no processo de desnaturação: a primeira em baixas concentrações de desnaturante, entre 1,0 e 3,0 mol/L, está associada ao processo de dissociação oligomérica parcial da HbGp em várias subunidades, tais como, dodecâmero $(abcd)_3$, tetrâmero $abcd$, trímero abc , e monômero d . Esta etapa é atribuída ao intermediário arbitrário do processo de desnaturação e apresenta propriedades espectroscópicas similares ao estado nativo. Os parâmetros termodinâmicos associados à primeira transição apresentam erros apreciáveis devido à complexidade do estado intermediário que é formado por uma mistura de várias subunidades com propriedades físico-químicas muito próximas do estado nativo. Na segunda etapa do processo, com transição bem definida entre 4,5 e 6,0 mol/L, ocorre a desnaturação das subunidades dissociadas. É importante enfatizar que todos os parâmetros associados à segunda transição obtidos pelo modelo de três estados são muito próximos dos valores encontrados usando o modelo mais simples de dois estados.
- Os dados de ultracentrifugação analítica sugerem que o processo de dissociação oligomérica da HbGp apresenta um mecanismo específico de dissociação na presença de ureia, onde inicialmente é observada a dissociação do oligômero $12(abcd)_3L_3$ formando o dodecâmero $(abcd)_3$, seguido da dissociação da espécie $(abcd)_3$ em tetrâmero $abcd$, e por último, com o aumento da concentração de ureia, a subunidade tetramérica sofre dissociação em subunidades menores, tais como, trímero abc e monômero d . Além disso, a contribuição das cadeias linkers não é observada por ultracentrifugação analítica e outros estudos serão necessários para descrever completamente o processo de dissociação oligomérica da HbGp. Com base nos dados de AUC pode-se inferir que os processos de

dissociação e desnaturação, induzidos pelo pH e pela ureia são similares e apresentam as mesmas etapas descritas acima.

6. PERSPECTIVAS

Avanços importantes foram obtidos na caracterização das subunidades da HbGp e sobre o equilíbrio de dissociação em diferentes condições experimentais. Desta forma, dados de ultracentrifugação analítica e por várias técnicas espectroscópicas mostraram que a HbGp se dissocia em pH alcalino, na presença de surfactantes e de ureia, originando subunidades menores, tais como o dodecâmero, o tetrâmero, o trímero e o monômero *d*. Estudos recentes mostram que a interação HbGp-surfactante induz vários processos conformacionais, tais como, agregação de proteína, dissociação oligomérica e desnaturação. Por outro lado, a estabilidade oligomérica está fortemente relacionada com o estado de oxidação do ferro e com o ligante coordenado no centro metálico. No entanto, pouco é conhecido sobre as mudanças estruturais a nível molecular das diferentes formas da HbGp, oxi-, meta- e cianometa-, que induzem diferentes estabilidades desta proteína. Assim, estudos biofísicos e estruturais de cristalização do monômero *d* da HbGp serão relevantes tendo em vista, compreender melhor os processos, a nível molecular, que induzem a dissociação, agregação e desnaturação envolvidos em diferentes condições. Abaixo são listados vários pontos nos quais se pretende focar para aprofundar o conhecimento sobre este sistema em estudo.

- 1) Através de ultracentrifugação analítica (AUC), por velocidade de sedimentação (SV) e equilíbrio de sedimentação (SE), pretende-se caracterizar o processo de desnaturação e as espécies presentes no equilíbrio, em diferentes concentrações de cloridrato de guanidina.
- 2) Concluir as análises dos dados de interação da oxi-HbGp com os surfactantes monitorados através de ultracentrifugação analítica. Caracterizar as espécies presentes em equilíbrio devido à presença dos surfactantes, e estudar o efeito do pH na interação proteína-surfactante.
- 3) Estudar os processos de dissociação e desnaturação térmica da HbGp, nas formas oxi-, meta- e cianometa-, na presença de ureia e cloridrato de guanidina por dicroísmo circular (CD), absorção óptica e DLS. Estes estudos permitirão avaliar os parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de desenovelamento da HbGp. Os estudos de desnaturação térmica serão realizados na faixa de temperatura de 20 a 70 °C.

- 4) Serão realizadas tentativas de cristalizar o monômero *d*, na presença de pequenas concentrações de SDS e CTAC. Em caso de sucesso na cristalização, propomos identificar e caracterizar os principais sítios de ligação dos surfactantes na estrutura da cadeia monomérica. Este estudo permitirá um aprofundamento a nível molecular sobre as mudanças induzidas pelos surfactantes na estrutura do monômero *d* e que levam a desnaturação e agregação da proteína.
- 5) Através de modelagem molecular por homologia, propomos identificar e caracterizar os prováveis sítios de interação dos surfactantes CTAC e SDS com o monômero *d*, tetrâmero *abcd* e dodecâmero *(abcd)*₃. Estes estudos serão importantes para compreender como ocorrem as interações proteína-surfactante na estrutura da HbGp íntegra.
- 6) Estudar as cinéticas de dissociação e desnaturação da HbGp íntegra, nas formas oxi-, meta- e cianometa-, e do dodecâmero *(abcd)*₃, no pH 7,0, na presença de diferentes concentrações de ureia e cloridrato de guanidina, por absorção óptica, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e dicroísmo circular (CD). Estes estudos deverão permitir a descrição e avaliação dos parâmetros cinéticos envolvidos nos processos de dissociação e desnaturação da HbGp.
- 7) Através de ressonância paramagnética eletrônica, RPE, caracterizar e quantificar as diferentes espécies formadas a partir da interação dos agentes caotrópicos, ureia e cloridrato de guanidina, com as formas oxi- e meta-HbGp, no pH 7,0.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANTIAGO, P. S.; MOURA, F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228-2240, 2008.
2. RIGHI, G. Sobre a família glossoscolecidae (oligochaeta) no Brasil. **Arquivos de Zoologia São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 1-95, 1971.
3. STRYER, L. **Bioquímica**. New York: W. H. Freeman, 1995. 1000 p.
4. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. New York: W. H. Freeman and Company, 2011. 1304 p.
5. SHIKAMA, K. Nature of the FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: A new molecular paradigm. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 91, n. 1-2, p. 83-162, 2006.
6. VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 127-129, 2004.
7. KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin?. **Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology Biochimica Biophysica Acta**, v. 1297, n. 2, p. 115-118, 1996.
8. ROUSSELOT, M.; GUEN, D. L.; CHABASSE, C.; ZAL, F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular hemoglobin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 7, p.1582-1596, 2006.
9. 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*. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, n. 5, p. 1361-1374, 1999.
10. HARNOIS, T.; ROUSSELOT, M.; ROGNIAUX, H.; ZAL, F. High-level production of recombinant *Arenicola marina* globin chains in *Escherichia Coli*: A new generation of blood substitute. **Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 106-116, 2009.
11. ROYER, W. E.; KNAPP, J. E.; STRAND, K.; HEASLET, H. A. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 297-304, 2001.

12. HIRSCH, R. E.; JELICKS, L. A.; WITTENBERG, B. A.; 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 Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 429-444, 1997.
13. FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* oxygenation properties of chains, trimer and a reassociated product. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 16, pp. 10275-10281, 1991.
14. POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; IMASATO, H. Autoxidation of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Molecular mechanism and oligomeric implications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 306-315, 2011.
15. ROUSSELOT, M.; DELPY, E.; LA-ROCHELLE, C. D.; LAGENTE, V.; PIROW, R.; REES, J.; HAGEGE, A.; LE-GUEN, D.; HOURDEZ, S.; ZAL, F. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 3, p. 333-345, 2006.
16. WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 569-628, 2001.
17. CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 2, p. 257-263, 2008.
18. OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Partial characterization of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: A MALDI-TOF-MS study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 5, p. 429-436, 2007.
19. CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 183-19, 2011.
20. CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry**, v. 46 n. 11, p. 2144-2151, 2011.
21. OWNBY, D. W.; ZHUS, H.; SCHNEIDERS, K.; BEAVISLL, R. C.; CHAITB, B. T.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* determination of subunit stoichiometry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268. n. 18, p.13539-13547,1993.
22. ZAL, F.; GREEN, B. N.; LALLIER, F. H.; VINOGRADOV, S. N.; TOULMOND, A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, n. 1-2, p. 85-92, 1997.

23. ROYER, W. E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J. E. Lumbricus erythrocrucorin at 3.5 angstrom resolution: Architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1167-1177, 2006.
24. ROYER, W. E.; STRAND, K.; VAN HEEL, M.; HENDRICKSON, W. A. Structural hierarchy in erythrocrucorin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7107-7111, 2000.
25. ROYER, W. E.; ZHU, H.; GORR, T. A.; FLORES, J. F.; KNAPP, J. E. Allosteric hemoglobin assembly: Diversity and similarity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27477-27480, 2005.
26. TABAK, M.; CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. P. W.; BACHEGA, J. F. R.; SANTIAGO, P. S. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms. In: INNOCENTIN, A. (Ed.). **In stoichiometry and research: the importance of quantity in Biomedicine**. Rijeka: In Tech, 2012. v. 1, p. 337-356.
27. BACHEGA, J. F. R.; BLEICHER, L.; HORJALES, E. R.; SANTIAGO, P. S.; GARRATT, R. C.; TABAK, M. Crystallization and preliminary structural analysis of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus* at 3.2 angstrom. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 18, p. 24-28, 2011.
28. CABRAL, B. C.; IMASATO, H.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; DA SILVA, C. H.; 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. **Biophysical Chemistry**, v. 97, n. 2-3, p. 139-157, 2002.
29. CHI, E. Y.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1325-1336, 2003.
30. TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 121-282, 1968.
31. VOET, D. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1596 p.
32. WIGGINS, P. M. Hydrophobic hydration, hydrophobic forces and protein folding. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 238, n. 1-4, p. 113-128, 1997.
33. TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 22, p. 4240-4247, 1962.
34. TREFETHEN, J. M.; PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M.; BREMS, D. N. Charge-charge interactions in the denatured state influence the folding kinetics of ribonuclease Sa. **Protein Science**, v. 14, n. 7, p. 1934-1938, 2005.

35. ARAKAWA, T.; PRESTRELSKIA, S. J.; KENNEYA, W. C.; CARPENTER, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 307-326, 2001.
36. AGUSTINHO, S. C. M.; TINTO, M. H.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1298, n. 2, p. 148-158, 1996.
37. 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 from sephadex gel filtration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 1, p. 171-181, 1998.
38. POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M.; IMASATO, H. SDS (sodium dodecyl sulfate) effect on the autoxidation of the *Glossoscolex paulistus* giant extracellular hemoglobin: Kinetic studies at pH 7.0 and 9.0. **Colloid Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 1, p. 96-104, 2006.
39. SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, F. A. O.; DOMINGUES, M. M.; CARVALHO, J. W. P.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Isoelectric point determination for *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: Oligomeric stability in acidic pH and relevance to protein-surfactant interactions. **Langmuir**, v. 26, n. 12, pp 9794-9801, 2010.
40. PERCZEL, A.; FASMAN, G. D. Effect of spectral window size on circular dichroism spectra deconvolution of proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 19-29, 1993.
41. PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. **Analytical Biochemistry**, v. 203, n. 1, p. 83-93, 1992.
42. SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 506-517, 2007.
43. BEENU, M.; SHABIR, H. Q.; FAIZAN, A. Equilibrium studies of the effect of difference in sequence homology on the mechanism of denaturation of bovine and horse cytochromes c. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1646, n. 1-2, p. 49-56, 2003.
44. DEVARAJ, K. B.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 458-464, 2011.
45. PACE, C. N.; HEBERT, E. J.; SHAW, K. L.; SCHELL, D.; BOTH, V.; KRAJCIKOVA, D.; SEVCIK, J.; WILSON, K. S.; DAUTER, Z.; HARTLEY, R. W.; GRIMSLEY, G. R. Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. **Journal of Molecular Biology**, v. 279, n. 1, p. 271-286, 1998.

46. IONESCU, R. M.; SMITH, V. F.; O'NEILL JUNIOR, J. C.; MATTHEWS, C. R. Multistate equilibrium unfolding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: Thermodynamic and spectroscopic description of the native, intermediate, and unfolded ensembles. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9540-9550, 2000.
47. HUNG, H. C.; CHANG, G. Multiple unfolding intermediates of human placental alkaline phosphatase in equilibrium urea denaturation. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3456-3471, 2001.
48. SCHUCK, P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 3, p. 1606-1619, 2000.
49. SCHUCK, P.; PERUGINI, M. S.; GONZALES, N. R.; HOWLETT, G. J.; SCHUBERT, D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 2, p. 1096-1111, 2002.
50. BROWN, P. H.; SCHUCK, P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4651-4661, 2006.
51. LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science - a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067-2079, 2002.
52. DAM, J.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; URBANKE, C.; SCHUCK, P. Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions $c(s)$. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 1, p. 619-634, 2005.
53. VISTICA, J.; DAM, J.; BALBO, A.; YIKILMAZ, E.; MARIUZZA, R. A.; ROUAULT, T. A.; SCHUCK, P. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. **Analytical Biochemistry**, v. 326, n. 2, p. 234-256, 2004.
54. SCHUCK, P. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 320, n. 1, p. 104-124, 2003.
55. DE LA TORRE, J. G.; HUERTAS, M. L.; CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 2, p. 719-730, 2000.
56. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
57. BASSI, A. B. M. S. Conceitos fundamentais em espectroscopia. **Chemkeys**, v. 1, p. 1-14, 2001.
58. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Baltimore: Springer, 2006. 974 p.
59. KELLY, S. M.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1338, n. 2, p. 161-185, 1997.

60. WOODY, R. W. Circular dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 34-71, 1995.
61. VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. Linear Circular Dichroism. In: VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. (Ed.). **Principles of physical biochemistry**. New York: Prentice Hall, 1998. p. 419-448.
62. LAUE, T. Biophysical studies by ultracentrifugation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 5, p. 579-583, 2001.
63. VOGEL, V. K.; LANGER, K.; BALTHASAR, S. P.; SCHUCK, P.; MACHTLE, W.; HAASE, W.; VAN DEN BROEK, J. A.; TZIATZIOS, C.; SCHUBERT, D. Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 119, p. 31-36, 2002.
64. DEMELER, B.; BROOKES, E. Monte Carlo analysis of sedimentation experiments. **Colloid and Polymer Science**, v. 286, n. 2, p. 129-137, 2007.
65. CARRUTHERS, L. M.; SCHIRF, V. R.; DEMELER, B.; HANSEN, J. C. Sedimentation velocity analysis of macromolecular assemblies. **Methods in Enzymology - Numerical Computer Methods, Part C**, v. 321, p. 66-80, 2000.
66. LAUE, T. M.; STAFFORD, W. F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 75-100, 1999.
67. STAFFORD, W. F.; SCHUSTER, T. M. Hydrodynamic methods. In: GLASEL, J. A. (Ed.). **Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research**. Amsterdam: Elsevier, 1995. p.111-145.
68. COLE, J. L.; LARY, J. W.; MOODY, T. P.; LAUE, T. M. Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. **Methods in Cell Biology - Biophysical Tools for Biologists, volume One: In Vitro Techniques**, v. 84, p. 143-179, 2008.
69. RASA, M.; LOHMEIJER, B. G. G.; HOFMEIER, H.; THIJS, H. M. L.; SCHUBERT, D.; SCHUBERT, U. S.; TZIATZIOS, C. Characterization of metallo-supramolecular block copolymers by analytical ultracentrifugation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 207, n. 22, p. 2029-2041, 2006.
70. SVERGUN D. I.; KOCH M. H. J. Advances in structure analysis using small angle scattering in solution. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 5, p. 654-660, 2002.
71. GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small-angle scattering of x-rays**. New York: John Wiley, 1955. 258 p.
72. GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle X-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. 515 p.
73. SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, n. 10, p. 1735-1782, 2003.

74. MERTENS, H. D. T.; SVERGUN, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 128-141, 2010.
75. ITRI, R.; AMARAL, L. Q. Micellar-shape anisometry near isotropic–liquid-crystal phase transitions. **Physical Review E**, v. 47, n. 4, p. 2551-2557, 1993.
76. MARTIN P. D.; KUCHUMOV A.R.; GREEN B.N.; OLIVER R.W.; BRASWELL E.H.; WALL J.S.; VINOGRADOV S. N. Mass spectrometric composition and molecular mass of *Lumbricus terrestris* hemoglobin: a refined model of its quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 255, n. 1, p. 154-169, 1996.
77. FUSHITANI, K.; HIGASHIYAMA, K.; ASAO, M.; HOSOKAWA, K. Characterization of the constituent polypeptides of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*: heterogeneity and discovery of a new linker chain L4. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 273-280, 1996.
78. SHARMA P. K.; KUCHUMOV, A. R.; CHOTTARD, G.; MARTIN, P. D.; WALL, J. S.; VINOGRADOV S. N. The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8754-8762, 1996.
79. CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; BATISTA, T.; SALMON, C. E. G.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R.; TABAK, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies. **Biophysical Chemistry**, v. 163-164, p. 44-55, 2012.
80. HARGROVE, M. S.; ALSON, J. S. The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11310-11318, 1996.
81. CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 519, p. 46-58, 2012.
82. SUGAWARA, Y.; MATSUOKA, A.; KAINO, A.; SHIKAMA, K. Role of globin moiety in the autoxidation reaction of oxymyoglobin: effect of 8 M urea. **Biophysical Journal**, v. 69, n. 2, p. 583-592, 1995.
83. 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. **Biophysical Chemistry**, v. 114, n. 2-3, p. 253-260, 2005.
84. SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, J. W. P.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK M. Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Determination of activation parameters by optical spectroscopic and differential scanning calorimetric studies. **Biophysical Chemistry**, v. 152, n. 1-3, p. 128-138, 2010.
85. DROGHETTI, E.; SUMITHRAN, S.; SONO, M.; ANTALIK, M.; FEDURCO, M.; DAWSON, J.H.; SMULEVICH, G. Effects of urea and acetic acid on the heme axial ligation

structure of ferric myoglobin at very acidic pH. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 489, n. 1-2, p. 68-75, 2009.

86. MYERS J. K.; PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. **Protein Science**, v. 4, n. 10, p. 2138-2148, 1995.

87. NALLAMSETTY, S.; DUBEY, V. K.; PANDE, M.; AMBASHT, P. K.; JAGANNADHAM, M. V. Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of ervatamin A: Spectroscopic description of the native, intermediate, and unfolded states. **Biochimie**, v. 89, n. 11, p. 1416-1424, 2007.

88. COBOS, E. S.; FILIMONOV, V. V.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ, J. C.; MATEO, P. L. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1598, n. 1-2, p. 98-107, 2002.

89. FU, H.; GRIMSLEY, G.; SCHOLTZ, J. M.; PACE, C. N. Increasing protein stability: Importance of ΔC_p and the denatured state. **Protein Science**, v. 19, n. 5, p. 1044-1052, 2010.

90. HOLTHAUZEN, L. M. F.; BOLEN, D. W. Mixed osmolytes: The degree to which one osmolyte affects the protein stabilizing ability of another. **Protein Science**, v. 16, p. 293-298, 2007.

91. RUMFELDT, J. A. O.; GALVAGNION, C.; VASSALL, K. A.; MEIERING, E. M. Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 98, n. 1, p. 61-84, 2008.

92. SÁNCHEZ-MIGUEL D. S.; ROMERO-JIMÉNEZ, J.; REYES-LÓPEZ, C. A.; CABRERA-ÁVILA, A. L.; CARRILLO-IBARRA, N.; BENÍTEZ-CARDOZA, C. G. Chemical unfolding of enolase from *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a three-state model. **Protein Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2010.

93. VINOGRADOV, S. N.; LUGO, S. D.; MAINWARING, M. G.; KAPP, O. H.; CREWE, A. V. Bracelet protein: a quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, n. 21, p. 8034-8038, 1986.

8. APÊNDICE

8.1. Publicações relacionadas com a tese

8.1.1. Artigo I

Process Biochemistry 46 (2011) 2144–2151

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS

Francisco Adriano O. Carvalho^a, José Wilson P. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil
^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus experimental de Registro, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 7 June 2011
 Received in revised form 3 August 2011
 Accepted 24 August 2011
 Available online 31 August 2011

Keywords:
 Extracellular hemoglobin
Glossoscolex paulistus
 MALDI-TOF-MS
 Electrophoresis
 Subunits characterization
 Subunits molecular masses

ABSTRACT

Further characterization of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) subunits was performed based on SDS-PAGE, size exclusion chromatography (SEC) and MALDI-TOF-MS analysis. SDS-PAGE has shown a total of four linker chains, two quite intense and two of lower intensity. HbGp fractions (I–VI), obtained by size exclusion chromatography (SEC), from oligomeric dissociation at alkaline pH 9.6, were monitored. Fraction I is identical to the whole protein. The monomeric chains c, obtained from the trimer *abc* reduction, present four isoforms with MM 17,336 Da, 17,414 Da, 17,546 Da and 17,620 Da. Furthermore, the trimer subunit presents two isoforms, *T*₁ and *T*₂, with MM 51,200 ± 60 and 51,985 ± 50 Da, respectively. Based on SDS-PAGE, the linker chains seem to be distributed along the different fractions of the SEC chromatogram, appearing along the peaks corresponding to fractions I–V. The fraction IV contains, predominantly, trimers with some linkers contamination. The strong interaction of linker chains *L* with the trimers *abc*, makes it difficult to obtain these subunits in pure form. The monomer *d* in fraction VI appears to be quite pure, in agreement with previous studies.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

8.1.2. Artigo II

Archives of Biochemistry and Biophysics 519 (2012) 46–58

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea

Francisco Adriano O. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Registro, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2011

and in revised form 4 January 2012

Available online 24 January 2012

Keywords:

Urea

Optical absorption

Fluorescence emission

Circular dichroism

Glossoscolex paulistus

Three-state model and oligomeric stability

ABSTRACT

The stability of the *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp), in two iron oxidation states (and three forms), as monitored by optical absorption, fluorescence emission and circular dichroism (CD) spectroscopies, in the presence of the chaotropic agent urea, is studied. HbGp oligomeric dissociation, denaturation and iron oxidation are observed. CD data show that the cyanomet-HbGp is more stable than the oxy-form. Oxy- and cyanomet-HbGp show good fits on the basis of a two state model with critical urea concentrations at 220–222 nm of 5.1 ± 0.2 and 6.1 ± 0.1 mol/L, respectively. The three-state model was able to reveal a subtle second transition at lower urea concentration (1.0–2.0 mol/L) associated to partial oligomeric dissociation. The intermediate state for oxy- and cyanomet-HbGp is very similar to the native state. For met-HbGp, a different equilibrium, in the presence of urea, is observed. A sharp transition at 1.95 ± 0.05 mol/L of denaturant is observed, associated to oligomeric dissociation and hemichrome formation. In this case, analysis by a three-state model reveals the great similarity between the intermediate and the unfolded states. Analysis of spectroscopic data, by two-state and three-state models, reveals consistency of obtained thermodynamic parameters for HbGp urea denaturation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

8.1.3. Artigo III

International Journal of Biological Macromolecules 52 (2013) 340–348

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet-forms: A dissociation modelFrancisco A.O. Carvalho^a, José Wilson P. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, Brazil^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2012

Received in revised form

22 September 2012

Accepted 25 September 2012

Available online xxx

Keywords:

Extracellular hemoglobin

HbGp

Urea

Oligomeric dissociation

AUC

SAXS

ABSTRACT

The urea effect on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) stability was studied by analytical ultracentrifugation (AUC) and small angle X-ray scattering (SAXS). AUC data show that the sedimentation coefficient distributions curves $c(S)$, at 1.0 mol/L of urea, display a single peak at 57 S, associated to the undissociated protein. The increase in urea concentration, up to 4.0 mol/L, induces the appearance of smaller species, due to oligomeric dissociation. The sedimentation coefficients and molecular masses are 9.2 S and 204 kDa for the dodecamer $(abcd)_3$, 5.5 S and 69 kDa for the tetramer $(abcd)$, 4.1 S and 52 kDa for the trimer (abc) and 2.0 S and 17 kDa for the monomer d , respectively. SAXS data show initially a decrease in the $I(0)$ values due to the oligomeric dissociation, and then, above 4.0 mol/L of denaturant, for oxy-HbGp, and above 6.0 mol/L for cyanomet-HbGp, an increase in the maximum dimension and gyration radius is observed, due to the unfolding process. According to AUC and SAXS data the HbGp unfolding is described by two phases: the first one, at low urea concentration, below 4.0 mol/L, characterizes the oligomeric dissociation, while the second one, at higher urea concentration, is associated to the unfolding of dissociated species. Our results are complementary to a recent report based on spectroscopic observations.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.1.4. Artigo IV

International Journal of Biological Macromolecules 59 (2013) 333–341

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies

Francisco Adriano O. Carvalho, José Wilson P. Carvalho, Fernanda Rosa Alves, Marcel Tabak*

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2013

Received in revised form 24 April 2013

Accepted 25 April 2013

Available online xxx

Keywords:

Extracellular hemoglobin

HbGp

pH

Oligomeric dissociation

AUC

DLS

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus (HbGp) extracellular hemoglobin is a giant oligomeric protein. It is constituted by 144 heme containing subunits and non-heme structures (linkers), with a total molecular mass of 3.6 MDa. AUC and DLS studies were developed for three HbGp forms, oxy-, met- and cyanomet-, at several pH values, in order to characterize the species in solution upon oligomeric dissociation. Isolated SEC fractions, trimer and dodecamer, are less stable as compared to the whole oxy-HbGp. The monomer **d** displays a large thermal stability up to 59°C. Hydrodynamic properties of the isolated subunits are very similar to those described for them in the whole protein, in the presence of urea or at pH 10.0. The degree of HbGp oligomeric dissociation, in alkaline pH, depends significantly on the iron oxidation state. Also on the ligand coordinated to the heme iron. Thus, at pH 8.0, the oxy-HbGp is partially dissociated, while the met-form is fully dissociated. The cyanomet-HbGp remains undissociated. Our present results show that the effect of pH on the HbGp oligomeric stability is similar to that associated to the urea-induced unfolding. Simultaneous use of AUC and DLS allowed the characterization of the species in the SEC fractions of isolated HbGp subunits.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.1.5. Capítulo I

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Review Article

Recent Res. Devel. Anal. Biochem., 5 (2013): 1-25 ISBN: 978-81-7895-599-5

1. Characterization of the oligomeric extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) and its subunits, in different solution conditions, by analytical ultracentrifugation (AUC)

Francisco A. O. Carvalho, José W. P. Carvalho and Marcel Tabak
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

8.2. Outras publicações

8.2.1. Artigo I

International Journal of Biological Macromolecules 54 (2013) 109–118

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media

José Wilson P. Carvalho^a, Francisco A.O. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sarcariense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 22 October 2012
 Received in revised form 16 November 2012
 Accepted 20 November 2012
 Available online xxx

Keywords:
 Extracellular hemoglobin
Glossoscolex paulistus
 Denaturation and aggregation
 DSC
 AUC
 DLS

ABSTRACT

The thermal denaturation and aggregation of the HbGp, in the oxy- and cyanomet-forms, was investigated by DSC, AUC, DLS, optical absorption and CD, in the pH range from 5.0 to 7.0. Oxy-HbGp has a denaturation process partially reversible and dependent on the temperature. DSC melting curve is characterized by a single peak with T_c value of 333.4 ± 0.2 K for oxy-HbGp, while two peaks with T_c values of 332.2 ± 0.1 and 338.4 ± 0.2 K are observed for cyanomet-HbGp, at pH 7.0. In acidic pH oxy- and cyanomet-HbGp are more stable showing higher T_c values and aggregation. AUC data show that, HbGp, at pH 7.0, upon denaturation, remains undissociated at 323 K, presenting oligomeric dissociation at 333 ($12 \pm 3\%$ of tetramer and $88 \pm 5\%$ of whole HbGp) and 343 K ($70 \pm 5\%$ of monomer and $30 \pm 2\%$ of trimer). DLS data show that the lag period before aggregation is dependent on the temperature and HbGp concentration. Optical absorption and CD results show that the increase of temperature leads to the oxy-HbGp oxidation and aggregation, above 331 K, in acidic pH. CD data, for HbGp, present a greater thermal stability in acid medium than at neutral pH, with similar T_c values for both oxidation forms. Our data are consistent with previous studies and represents an advance in understanding the thermal stability of oligomeric HbGp structure.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.2.2. Artigo II

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 111 (2013) 561–570

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies

José Wilson P. Carvalho^a, Fernanda Rosa Alves^a, Tatiana Batista^{a,c}, Francisco Adriano O. Carvalho^a, Patrícia S. Santiago^{a,b}, Marcel Tabak^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil
^b Campus Experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro, SP, Brazil
^c Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 30 April 2013
 Received in revised form 10 June 2013
 Accepted 28 June 2013
 Available online xxx

Keywords:
Glossoscolex paulistus
 Oligomeric dissociation
 Thermal stability
 DLS
 SAXS
 SDS

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus (HbGp) hemoglobin is an oligomeric protein, presenting a quaternary structure constituted by 144 globin and 36 non-globin chains (named linkers) with a total molecular mass of 3.6 MDa. SDS effects on the oxy-HbGp thermal stability were studied, by DLS and SAXS, at pH 5.0, 7.0 and 9.0. DLS and SAXS data show that the SDS-oxy-HbGp interactions induce a significant decrease of the protein thermal stability, with the formation of larger aggregates, at pH 5.0. At pH 7.0, oxy-HbGp undergoes complete oligomeric dissociation, with increase of temperature, in the presence of SDS. Besides, oxy-HbGp 3.0 mg/mL, pH 7.0, in the presence of SDS, has the oligomeric dissociation process reduced as compared to 0.5 mg/mL of protein. At pH 9.0, oxy-HbGp starts to dissociate at 20 °C, and the protein is totally dissociated at 50 °C. The thermal dissociation kinetic data show that oxy-HbGp oligomeric dissociation at pH 7.0, in the presence of SDS, is strongly dependent on the protein concentration. At 0.5 mg/mL of protein, the oligomeric dissociation is complete and fast at 40 and 42 °C, with kinetic constants of $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ and $(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectively, at 0.6 mmol/L SDS. However, at 3.0 mg/mL, the oligomeric dissociation process starts at 46 °C, and only partial dissociation, accompanied by aggregates formation is observed. Moreover, our data show, for the first time, that, for 3.0 mg/mL of protein, the oligomeric dissociation, denaturation and aggregation phenomena occur simultaneously, in the presence of SDS. Our present results on the surfactant-HbGp interactions and the protein thermal unfolding process correspond to a step forward in the understanding of SDS effects.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Recent New Characterizations
on the Giant Extracellular Hemoglobin
of *Glossoscolex paulistus* and Some Other
Giant Hemoglobins from Different Worms**

Marcel Tabak¹, Francisco A.O. Carvalho¹, José W.P. Carvalho¹,
Jose F.R. Bachega² and Patrícia S. Santiago^{1,3}

¹Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP,

²Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP,

³Campus Experimental de Registro, UNESP, SP,
Brazil

8.3. Súmula curricular

SÚMULA CURRICULAR

Nome: **FRANCISCO ADRIANO DE OLIVEIRA CARVALHO**

1. Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2004 – 2008	Licenciado em Química	Universidade Estadual do Piauí – UESPI
2008 – 2010	Mestre em Físico-química	Instituto de Química de São Carlos – IQSC Universidade de São Paulo
2010 – 2013	Doutorando em Físico-química	Instituto de Química de São Carlos – IQSC Universidade de São Paulo

2. Histórico profissional

Professor substituto classe E (nível médio), da secretaria de educação do estado do Piauí (2005-2007) com carga horária de 20 h. Monitor na disciplina Análise Instrumental I pelo programa de aperfeiçoamento do ensino (PAE). Esta disciplina faz parte do curso de bacharel em química do Instituto de Química de São Carlos, IQSC (2009).

3. Resultados científicos mais relevantes

3.1. Trabalhos originais em periódicos indexados no web of science

1. Carvalho, J.W.P., Alves, F.R., Batista, T., Carvalho, F.A.O., Santiago, P.S., Tabak, M. Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 111, p. 561-570, 2013.
2. Carvalho, F.A.O., Carvalho, J.W.P., Alves, F.R., Tabak, M. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and dynamic light scattering studies. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 59, p. 333-341, 2013.
3. Carvalho, J. W. P., Carvalho, F. A. O., Santiago, P. S., Tabak, M. Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 54, p. 109 - 118, 2013.

4. Carvalho, F. A. O., Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S., Tabak, M. Urea-induced unfolding of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin, in oxy- and cyanomet- forms: A dissociation model. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 52, p. 340 - 348, 2013.
5. Carvalho, F. A. O., Santiago, P. S., Tabak, M. On the stability of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, in two iron oxidation states, in the presence of urea. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 519, p. 46 - 58, 2012.
6. Carvalho, F. A. O., Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S., Tabak, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry** (1991). v. 46, p. 2144 - 2151, 2011.
7. Carvalho, F. A. O., Santiago, P. S., Borges, J. C., Tabak, M. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 48, p. 183 - 193, 2011.
8. Santiago, P. S., Carvalho, F. A. O., Domingues, M. M., Carvalho, J. W. P., Santos, N. C., Tabak, M. Isoelectric Point Determination for *Glossoscolex paulistus* Extracellular Hemoglobin: Oligomeric Stability in Acidic pH and Relevance to Protein–Surfactant Interactions. **Langmuir**. v. 26, p. 9794 - 9801, 2010.
9. Carvalho, F. A. O., Santiago, P. S., Borges, J. C., Tabak, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**. v. 385, p. 257 - 263, 2009.

3.2. Artigos aceitos para publicação

1. Carvalho, F.A.O., Carvalho, J.W.P., Santiago, P.S., Tabak, M. Characterization of *Rhinodrilus alatus* (HbRa) hemoglobin and its subunits: evidence for strong interaction with cationic surfactants DTAB and CTAC. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**. v. xxx, p. xxx-xxx, 2013.

3.3. Capítulos de Livros publicados

1. M. Tabak, Francisco A. O. Carvalho, José W. P. Carvalho, Jose F. R. Bachega, Patrícia P. Santiago. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms. In: Stoichiometry and Research – The Importance of Quantity in Biomedicine.1 ed.Croatia: **InTech** - Open Access Publisher, 2012, v.1, p. 337-356.

3.3.1 Capítulos de livros aceito para publicação

1. Francisco A. O. Carvalho, José W. P. Carvalho, M. Tabak. Characterization of the oligomeric extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) and its subunits, in

different solution conditions, by analytical ultracentrifugation (AUC). *Recent. Res. Devel. Anal.Biochem.* Transworld Kerala, India: **Research Network**. 5 (2013): 00-00, ISBN: 978-81-7895-599-5

4. Indicadores quantitativos.

1. Artigos completos publicados em periódicos indexados na web of science.....	8
2. Artigos completos aceitos para publicação em periódicos indexados na web of science.....	1
2. Capítulos de livros publicados.....	1
4. Outras publicações (Active reports).....	2
5. Resumos em anais de eventos científicos nacionais.....	4
6. Resumos em anais de eventos científicos internacionais.....	4

5. Link para a página MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar)

1. MyResearcherID (ISI) <http://www.researcherid.com/rid/J-2668-2012>
2. MyCitations (Google Scholar) <http://scholar.google.com.br/citations?hl=en&user=hfsPqpQAAAAJ>

6. Outras informações

6.1. Curso de formação complementar

1. FRANCISCO A. DE O. CARVALHO. Theoretical and practical activities in the Workshop Analysis of Macromolecules in Solution – Learning SEDFIT and SEDPHAT (52 h).