

^{3X}
MARIA ISABEL GALDAMES PORTUS

**ANÁLISES MOLECULAR E TERMODINÂMICA
DAS HEMOGLOBINAS DE *Clarias sp.* e *Liophis
miliaris*.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Maria Isabel Galdames Portus
e aprovada pela Comissão Julgadora.

24/05/96 X galdames

^X
TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ORIENTADOR: Dr. ALDO FOCESI Jr.
^X

CAMPINAS 1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

916.09866

✓

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	UNICAMP		
V.	G-131a		
T. D. C.	27976		
PRDC.	667/96		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	05/07/96		
N.º CPD			

CM-00090620-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G131a Galdames Portus, Maria Isabel
Análises molecular e termodinâmica das hemoglobinas
de *Clarias sp.* e *Liophis miliaris* / Maria Isabel Galdames
Portus. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Aldo Focesi Junior
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.


1. Hemoglobina. 2. Termodinâmica. 3. Oxigênio -
Transporte fisiológico. I. Focesi Júnior, Aldo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III Título.

LOCAL E DATA: CAMPINAS, 24 de MAIO 1996.

BANCA EXAMINADORA :

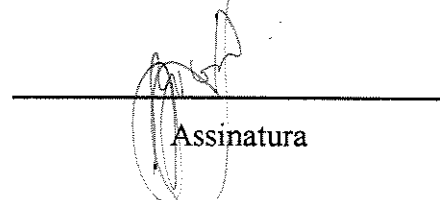
TITULARES:

Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR



Assinatura

Prof. Dr. MARCIO F. COLOMBO

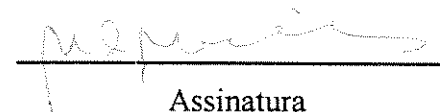


Assinatura

Profa. Dra. MARIA S. A. MATSUURA

Assinatura

Dra. NILCE C. MEIRELLES



Assinatura

Prof. Prof. Dr. PEDRO L. O. VOLPE


Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. GUSTAVO O. BONILLA

Assinatura

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA



Assinatura

APROVADA

*A minha família
amigos e
colegas*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior, professor e amigo, por sua orientação e por ter tornado possível a realização do doutorado no Departamento de Bioquímica.

À Profa. Dra. Maria S. A. Matsuura, professora, colega e amiga, a qual em todo momento esteve incentivando, orientando, apoiando e discutindo a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Nilce C. Meirelles, professora, colega e amiga, pelo seu apoio incondicional, incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, pelo seu apoio profissional e humano, sua colaboração nas correções e sugestões na redação final da tese.

Aos membros da Banca examinadora Prof. Dr. Márcio F. Colombo, Dr. Pedro L. O. Volpe e Dr. Gustavo Bonilla pela colaboração profissional.

Aos Profs. Dr. Carlos Bonafé e Dr. Aníbal Vercesi pelo seu apoio profissional e humano, sua colaboração incondicional e incentivo.

A todos os docentes e coordenadores do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica, em especial à Dra. Maria S. A. Matsuura, Dra. Lúcia Pereira da Silva, Dra. Satie H. Ogo, Dra. Ione S. Martins, Dr. Hiroshi Aoyama e Dra. Nilce C. Meirelles.

A todos alunos do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica pelo seu apoio, em especial ao Mauro, Márcio, Jaime, Carmen, Patrícia, Angela , Marilena. e Sônia

Aos funcionários técnicos do Departamento de Bioquímica pela colaboração, em especial a Ester da Rocha pelo apoio incondicional e humano.

Às Secretarias do Departamento de Bioquímica, Andreia, Marina e Míriam, pelo apoio incondicional, técnico e humano.

A meus pais pelo exemplo de luta, superação e firmeza. Seu incentivo, confiança, e apoio incondicional e carinhoso. A meus filhos, Maria Carolina, Sófia Elisa e Jorge Pablo, pela sua compreensão e amor. E a todos os amigos pela sua compressão, incentivo e apoio outorgado para levar até o fim a realização deste trabalho, em especial a Patrícia, Maria, Nilce, Mirtha, Neidi, Ester, Gustavo, e Sônia.

Às Instituições de Pesquisa do Brasil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CAPES, e Ministério de Educação, MEC, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina-5'-trifosfato
DPG	Difosfoglicerato
E_h	Potencial em referencia ao eletrodo normal de hidrogênio
E'_o	Potencial de eletrodo
FEM	Força eletromotriz
GTP	Guanosina -5'-trifosfato
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina humana
HbO ₂	Oxihemoglobina
HbCO	Carbomonóxiemoglobina
HEPES	Ácido(n-2-hidrodietilpiperazine-N-2-etano) sulfônico
IHP	Inositol hexafosfato
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TRIS	Tris hidroximetilaminometano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.	1
1.1.2 MODELOS BÁSICOS DA HEMOGLOBINA	5
1.1.3 MECANISMO MOLECULAR DA OXIGENAÇÃO NA HEMOGLOBINA HUMANA	9
1.1.4 ASPECTOS TERMODINÂMICOS	15
1.1.5 ANTECEDENTES GERAIS	20
1.1.6 OBJETIVOS	23
 2. MATERIAIS E MÉTODOS	 24
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	24
2.1.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA	24
2.1.2 PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA "STRIPPED".	24
2.2 MÉTODOS	27
2.2.1 ANÁLISES ELETROFÓRETICAS E TIPOS DE CADEIAS.	27
2.2.2 CURVAS DE EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO	28
2.2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE AFINIDADE DO ATP	29
2.2.4 CURVAS DE EQUILÍBRIO DE ÓXIDO-REDUÇÃO	29
2.2.5 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE E_h E DE ENERGIA LIVRE DE ÓXIDO-REDUÇÃO.	31
 3. RESULTADOS	 32
3.1 HEMOGLOBINA DE <i>Clarias sp.</i>	32
3.1.1 ELETROFORESES DAS HEMOGLOBINAS E TIPOS DE CADEIAS.	32
3.1.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE OXIGENAÇÃO.	32
3.1.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP NA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO EM <i>Clarias sp.</i>	36
3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE OXIDAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS DE <i>Clarias sp.</i> E DE <i>Liophis miliaris.</i>	38

3.2.1 CURVAS DE TITULAÇÃO DE ÓXIDO-REDUÇÃO.	38
3.2.2 POTENCIAIS DE ÓXIDO-REDUÇÃO	39
3.2.3 EFEITO DO TIPO DE ELETROMEDIADOR NO POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO.	50
3.2.4 EFEITO BOHR DE OXIDAÇÃO.	50
3.2.5 TRANSIÇÃO T→R NA ÓXIDO-REDUÇÃO.	52
3.2.6 VALORES DE ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA.	53
3.2.7 VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA ASSOCIADA À LIBERAÇÃO DE PRÓTONS.	55
4. DISCUSSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
6. APÊNDICE	101

RESUMO

Neste trabalho analisou-se e as propriedades funcionais intrínsecas de oxigenação e de oxidação das hemoglobinas, tetramérica de *Clarias sp.* peixe de respiração aérea, e dimérica de *Liophis miliaris*, serpente aquática, considerando-se a base molecular e termodinâmica de união com o ligante, efeito Bohr e cooperatividade, e a relação estrutura-função-evolução

As propriedades funcionais de oxigenação da hemoglobina de *Clarias sp.*, de um componente eletroforético de migração anódica, mostraram alta afinidade pelo oxigênio (P_{50} de 4,5 torr), sem efeito Bohr e cooperativa. Com valores de $n = 1,5$ na forma "stripped" e efeito alostérico heterotrópico do ATP, com $K_d 3 \times 10^4 M^{-1}$ em pH 7,6. O potencial redox revelou uma baixa energia livre intrínseca, ΔG° de 2,0 Kcal mol⁻¹, menor do que a da hemoglobina humana e Hb I de truta, compatível com a alta afinidade pelo oxigênio e com instabilidade da estrutura quaternária, provavelmente devido a substituições do contato $\alpha_1\beta_2$. Os valores de ΔG° , em função do pH, com uma transição T→R com pK próximo a pH 7,5, independente ao efeito Bohr e de fosfatos orgânicos, sugerem a ionização de uma histidina associada ao processo alostérico.

Os valores de ΔG° do potencial redox da hemoglobina de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris* na presença de ATP em função do pH não foram modificados, não devendo contribuir energeticamente na transição quaternária. O efeito Bohr aparente ou de ânion observado deve-se à

mudanças de interações eletrostáticas da união do ligante induzidas pelo pH e não ao efeito Bohr intrínseco.

Os estudos de óxido-redução da hemoglobina de *Liophis miliaris*, dimérica na forma "stripped", mostraram mudanças conformacionais da estrutura terciária e ausência da transição quaternária T→R. Observou-se a tetramerização, cooperatividade e transição com pK próximo a 7,5 na presença de ATP, com ΔG° próximo a 0,4 Kcal mol⁻¹, envolvem a ionização de uma ou mais histidinas da cadeia beta e a estabilização do tetrâmero por interações eletrostáticas e/ou pontes salinas do contato $\alpha_1\beta_2$ originadas por este efector alostérico.

O modelo dímero-tetrâmero proposto para *Liophis miliaris* não inclui as formas quaternárias intermediárias da forma T ou R, devido à ausência do contato $\alpha_1\beta_2$ na forma desoxigenada, seguindo o comportamento do modelo de MWC que envolve só um ajuste da estrutura terciária em ambos dímeros associados à cooperatividade.

Estas propriedades funcionais, estruturais e termodinâmicas das hemoglobinas de vertebrados não mamíferos, de respiração aérea, refletiriam as características moleculares dos ancestrais dos primeiros vertebrados, hemoglobinas de alta afinidade pelo oxigênio, de baixa energia livre intrínseca, provavelmente devido a substituições específicas do contato $\alpha_1\beta_2$.

SUMMARY

The functional oxygenation and oxidation properties of tetrameric hemoglobin were analyzed for *Clarias sp.*, an air breathing fish, and dimeric hemoglobin *Liophis miliaris*, a water snake, relating to the molecular and thermodynamic of the ligand binding, the Bohr effect and cooperativity. The structure-function-evolution were considered in this hemoglobin.

The oxygenation properties of *Clarias sp.* hemoglobin with one anodic electrophoretic component and two globin chains, showed high oxygen affinity, P_{50} of 4.5 torr, absence of Bohr effect, cooperativity $n = 1,5$, in the stripped form, and an evident heterotropic allosteric effect for ATP, with $K_d 3 \times 10^4 M^{-1}$, at pH 7.6. The redox potentials showed a low intrinsic free energy ΔG° of $2.0 Kcal mol^{-1}$, lower in relation to trout I and human hemoglobin. Consistent with the high oxygen affinity and instability of the quaternary structure, probably due to the substitutions at $\alpha_1\beta_2$ interface. The free Gibbs energy value and the T→R transition with pK close to pH 7.5, independent of the Bohr and organic phosphate effects, suggest a histidine ionization associated with this allosteric process.

The invariability of ΔG° redox potential values with pH in the presence of ATP, observed for *Clarias sp.* and *Liophis miliaris* hemoglobins, seems not to energetically contribute on the quaternary

transition. The apparent Bohr effect or the anion effect could be attributed to the alteration in the electrostatic association of the ligand, induced by the pH, and not to the intrinsic Bohr effect.

The oxidation-reduction studies of hemoglobins of *Liophis miliaris* dimeric in the stripped form showed conformational change in the tertiary structure and absence of the quaternary transition T→R. The tetramerization, cooperativity and transition with pK close, to 7.5, in the presence of ATP, with ΔG° 0.4 Kcal mol⁻¹, suggest the ionization of histidine of the beta chain and stability of the tetramer by electrostatic interaction or salt bond contact $\alpha_1\beta_2$, originated by this allosteric effect.

The dimer-tetramer model proposed for *Liophis miliaris* does not include the quaternary intermediates forms of T or R, due to the absence of the contact $\alpha_1\beta_2$ in the deoxygenated form, according to the model of MWC, which would be involve one fitting of the tertiary structure in both dimers, associated at the cooperativity.

These functional, structural and thermodynamic properties of hemoglobins of air breathing non-mammals, could reflect the molecular characteristics of the ancestral primitive vertebrates hemoglobins which high oxygen affinity, low intrinsic free energy an the specific substitutions at the $\alpha_1\beta_2$ contact.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma das proteínas mais amplamente pesquisadas nas últimas décadas. Constitui até hoje um ótimo modelo para esclarecer o processo alostérico, os mecanismos operacionais de oxigenação frente aos requerimentos fisiológicos, e o estudo da relação estrutura-função-evolução. Tópicos básicos no desenvolvimento da química de proteínas e enzimas, intensamente estudados através de análises funcionais, termodinâmicas e estruturais.

1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.

A estequiometria e reversibilidade da ligação da hemoglobina com o oxigênio foi determinada inicialmente por Hufner (1903), aplicando a Lei de massas formulou uma equação simples para descrever a curva de dissociação. Porém, a forma sigmóide da curva de equilíbrio da hemoglobina pelo oxigênio, foi interpretada por Hill (1910) ao observar que a hemoglobina em solução fisiológica apresentava-se como polímeros com valores de "n" (coeficiente de Hill), correspondentes a mais de um sítio de combinação de oxigênio, enquanto que a forma hiperbólica da curva foi obtida com hemoglobina em água destilada, com um sítio de ligação e massa molecular de 16000 Dalton.

Em 1912 Douglas et al. mostraram que a hemoglobina constituía um sistema reversível de associação-dissociação, no qual o monômero estaria em equilíbrio com espécies de alta massa molecular; e que a curva sigmoideal resultaria da diferença do grau de polimerização das formas oxigenada e desoxigenada, onde esta última teria o maior estado de agregação.

Entretanto, a teoria de Adair (1925) associou o comportamento da hemoglobina à estrutura de subunidades e à existência de interações funcionais entre os grupos heme, razão pela qual a equação de Hill começou a ser utilizada para descrever a natureza da curva de equilíbrio com o ligante oxigênio, tornando o valor de "n" um índice empírico da interação heme-heme. As determinações de massa molecular por medidas de pressão osmótica, indicaram que tanto a oxi como a desoxi hemoglobina são tetraméricas, postulando-se que a ligação com o oxigênio ocorreria em quatro passos sucessivos, e que a forma sigmoide implicaria a presença de mais de uma constante, que representaria o produto de dois fatores: a constante de associação intrínseca para união do oxigênio e o fator estatístico que consideraria o modo de distribuição do ligante nas subunidades, possibilitando o ajuste cinético para quatro constantes de associação e dissociação.

Não obstante, o modelo proposto por Pauling (1935) ajustou a curva de equilíbrio à duas constantes de associação, baseando-se nos conhecimentos estruturais e na interação entre os dois pares do heme, equivalentes entre si. Neste modelo, localizou-se esquematicamente os grupos hemes nos vértices de um quadrado, com seis prováveis arranjos

moleculares para união do ligante. A determinação experimental da interação entre os hemes adjacentes, revelou um valor aproximado de $1,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$, demonstrando que a mudança de ionização dos grupos ácidos na união com oxigênio era influenciada pelo pH. Pauling foi, portanto, o primeiro pesquisador a relacionar a interação estrutural à situação energética.

A seguir, Coryell (1939) estendeu o tratamento de Pauling ao potencial de óxido-redução da hemoglobina, e mostrou que os valores de "n" da equação de Hill, se relacionam com a energia de interação entre os hemes, reforçando o significado descritivo da curva de equilíbrio com oxigênio.

Durante os anos 1935-1948, Wyman analisou intensamente o sistema de hemoglobina em termos funcionais, principalmente o efeito Bohr e o efeito de dióxido de carbono, propondo o "modelo retangular" para a interação heme-heme, onde eram localizadas as interações fracas e fortes esquematicamente nos vértices de um retângulo. Postulando que a simetria ou assimetria da curva de equilíbrio relacionava-se com a equivalência ou não dos quatro grupos heme, e que na união do ligante ocorriam mudanças conformacionais que forneceriam a base molecular do processo de regulação de proteínas (Wyman, 1948).

No período de 1950-1960 foram realizados estudos precisos para se obter medidas das constantes de equilíbrio e das cinéticas das reações com oxigênio. Os resultados foram analisados pelo esquema proposto por Adair, com o objetivo de encontrar o significado estatístico dos valores das quatro constantes de equilíbrio e das oito constantes cinéticas,

sugerindo que a mudança de afinidade e velocidade de reação da hemoglobina ocorriam antes da terceira união do ligante.

Após 1960 os modelos que explicavam o comportamento do sistema da hemoglobina foram discutidos sob duas categorias, como subunidades estruturais ou em termos das mudanças conformacionais, embora estas estejam intimamente relacionadas. Perutz (1969) realizou estudos das propriedades funcionais correlacionando quantitativamente o equilíbrio da união do ligante à associação-dissociação e à transição conformacional.

No grupo liderado pelo Dr. Jeffries Wyman, enfatizou as pesquisas das subunidades estruturais em relação à união do ligante, foram determinadas experimentalmente as curvas de equilíbrio e de cinética, usando vários tipos de ligantes e subunidades que mostraram que o primeiro produto da dissociação da hemoglobina é o dímero $\alpha\beta$. Definindo portanto, o comportamento cinético por duas constantes "on" e "off", e estabelecendo a relação entre o processo de associação-dissociação e a união do ligante. Foi então proposta, a existência da relação termodinâmica entre os diferentes graus de dissociação, das formas oxigenada e desoxigenada da hemoglobina, e da união do ligante ao tetrâmero e ao dímero. Assim, através das reações de cinética e de equilíbrio das cadeias isoladas com o ligante, foi possível estabelecer as modificações das reatividades intrínsecas das cadeias α e β devido a interações específicas dentro do tetrâmero (Wyman, 1964; 1967; Rossi-Fanelli et al., 1964; Antonini 1965; Noble 1969; Antonini & Brunori 1970).

Nos trabalhos de Briehl (1963) realizados com hemoglobina de lampreia *Petromizon marinus*, essencialmente monomérica na forma ligada e polimérica na forma desoxigenada, apresentou-se a importância da união do ligante no equilíbrio de associação-dissociação, observando-se que a associação é dependente do pH e da concentração de proteínas. Enfatizou-se o papel da dissociação das subunidades como fator primordial no comportamento da união do ligante, embora o modelo não tenha sido consistente para mamíferos (Antonini et al., 1964).

1.1.2 MODELOS BÁSICOS DA HEMOGLOBINA

Os principais modelos propostos explicam o equilíbrio com oxigênio através de constantes microscópicas nos sítios específicos de interação ou de transição associada à união do ligante, a qual inclui a conformação intramolecular e o fenômeno de associação-dissociação (Antonini & Brunori, 1971).

1.1.2.1 Modelo Alostérico

O mecanismo conhecido como "Modelo Alostérico" proposto por Monod et al., (1965) destaca o papel da transição conformacional para explicar os efeitos homotrópicos e heterotrópicos das hemoglobinas, relacionando as mudanças estruturais às interações conformacionais. Aplicáveis, também à transição conformacional de outras proteínas ou enzimas e considerado o fenômeno regulatório nos sistemas biológicos. Wyman (1967) sugeriu o modelo retangular para explicar o fenômeno

alostérico, assumindo a existência do par $\alpha\beta$ em duas formas conformacionais A e B, definia duas constantes de equilíbrio para a união do ligante nos dois estados conformacionais como K_A e K_B . O modelo original mostrou a diferente afinidade dos dois dímeros que constituem o tetrâmero e propôs que a mudança conformacional ocorria de forma "tudo ou nada". Mas através deste não foi possível explicar o efeito Bohr.

1.1.2.2 Modelo seqüencial

O modelo seqüencial proposto por Koshland et al. (1966) propõe que o efeito alostérico resultaria da indução seqüencial de mudanças conformacionais durante a união do ligante, o qual podia ser visto como uma extensão do modelo de Adair, por considerar os valores de constantes microscópicas de dissociação durante a oxigenação.

1.1.2.3 Modelo estereoquímico

O modelo estereoquímico das interações homotrópicas e heterotrópicas das hemoglobinas, proposto por Perutz (1970), baseou-se na informação estrutural obtida por análises de cristalografia de raios X, indicando que a oxigenação promoveria alterações do átomo de ferro, assim como da distância existente entre a histidina proximal e o anel de porfirina, causando uma modificação estrutural local que promoveria reações sucessivas de mudanças conformacionais intercadeias. Assim, durante a oxigenação, a hélice F movimentava-se em direção à hélice H, expulsando os resíduos de tirosina, Tyr₁₄₅H23 β e a Tyr₁₄₀H23 α , da cavidade do heme, fazendo desaparecer o impedimento estérico entre o grupo γ metila da Val E₆₇E11 da cadeia β na desoxihemoglobina. Esse

movimento leva a quebra das pontes de hidrogênio dos resíduos C-terminais, favorecendo a conformação quaternária da forma oxigenada e alterando os valores de pK dos grupos Bohr.

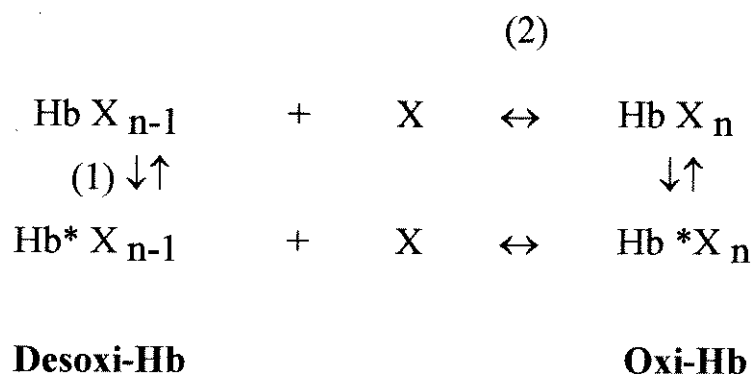
A mudança na estrutura quaternária originada pela ruptura destas pontes salinas, poderia ocorrer em qualquer estágio da oxigenação. A variação de energia livre é associada à ruptura de seis pontes salinas por tetrâmero, e expressava a energia total de interação. Adicionalmente, sugeriu-se que a união do ligante oxigênio ocorreria de maneira seqüencial na seguinte ordem $\alpha_1\alpha_2 \beta_1\beta_2$, mas isto exigiria que o tetrâmero fosse a unidade funcional. A conformação desoxi de baixa afinidade pelo oxigênio, é alcançada pelo tetrâmero, mas a sua dissociação em dímeros está associada à ruptura das pontes salinas que originam a forma desoxi de alta afinidade. Portanto, no modelo proposto por Perutz, para o comportamento do sistema de hemoglobina, incluem aspectos dos modelos de MWC, Monod, Wyman e Changeaux, (1965) e de KNF, Koshland, Nemethy e Filmer, (1966).

1.1.2.4 Representação esquemática dos modelos

No sistema de hemoglobina, a união do ligante é geralmente descrita através de esquemas simplificados, embora o comportamento cinético seja de grande complexidade, devido ao grande número de possíveis intermediários na reação de saturação. Contudo estes esquemas são válidos, considerando o acesso do ligante, à desoxi-hemoglobina, e a interação da proteína com prótons ou outras moléculas, sendo pois aplicáveis em qualquer estágio da reação, e nos diferentes estados de agregação. A alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio,

comparada à liberação do ligante, e baixas velocidades de associação-dissociação, aplicáveis só em concentrações da ordem de micromolares, reforçam a validade das descrições através de constantes simples.

A seqüência de união do ligante à hemoglobina considerando o tetrâmero como unidade funcional, pode ser expresso pelo seguinte esquema:

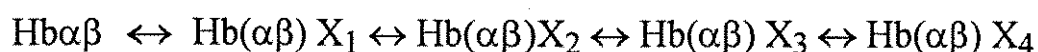


(1) Constante cinética do processo alostérico

(2) Constante cinética de associação-dissociação do ligante

Hb e Hb* representam diferentes estruturas terciárias ou quaternárias, estados de agregação, tetrâmero, dímero ou monômero, ou de formas que diferem na interação com prótons ou outra molécula. A linha vertical indica a cinética de união ao ligante e o efeito de várias microconstantes.

Porém, este esquema omite a equivalência funcional entre as cadeias α e β , a transição conformacional e a interconversão entre tetrâmero, dímeros ou monômeros, na união com o ligante. Considerando o esquema de Adair, no qual todas as formas contém igual número de moléculas ligadas onde o dímero $\alpha\beta$ é a unidade funcional, o esquema proposto para a oxigenação, seria:



Onde X_1 , X_2 , X_3 , e X_4 , representam a união seqüencial de oxigênio.

A seqüência de união do ligante é representada por uma constante simples de velocidade, de combinação e de dissociação. Este esquema de equilíbrio não admite valores de "n" maiores que dois, dado que considera o efeito intradímeros dominantes sobre os interdímeros.

Os modelos simplificados propostos são importantes, pois permitem avaliar as tendências e fazer predições sobre o comportamento geral do sistema.

1.1.3 MECANISMO MOLECULAR DA OXIGENAÇÃO NA HEMOGLOBINA HUMANA

Como salientamos acima, a oxigenação e a desoxigenação da hemoglobina promovem mudanças estereoquímicas e conformacionais que provocam um rearranjo global das pontes de hidrogênio intra e

intersubunidades, que ocasionam rotação e deslizamento das subunidades (Baldwin & Chothia 1979; Perutz, 1987).

Abordaremos a seguir, alguns detalhes destas mudanças que ocorrem no equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio, $Hb \leftrightarrow HbO_2$. O ferro do grupo heme, na forma oxigenada, apresenta um estado de baixo spin com raio atômico de 0,75 Å com todos os elétrons compartilhados e seis ligações de coordenação, que se torna de alto spin e com cinco enlaces de coordenação na desoxigenação. Na oxigenação o ferro desloca-se no plano em relação á protoporfirina e diminui a distância entre a histidina proximal em 0,5 - 0,6 Å. Esta mudança de raios e distâncias de enlace altera o equilíbrio conformacional da estrutura terciária dos segmentos da globina próximo ao heme. As que são transmitidas à subunidade seguinte, modificam o equilíbrio heme-heme e desencadeia a mudança da estrutura quaternária, denominada transição $T \leftrightarrow R$ (tensa e relaxada) de baixa e alta afinidade pelo oxigênio respectivamente, que consiste numa rotação do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao outro dímero $\alpha_2\beta_2$ por 12° ou 15° sem alterar estes contatos, e a translação de um dímero em relação ao outro em 0.8 Å, movimentando-se os contatos $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ (Perutz, 1970).

1.1.3.1 Regulação alostérica homotrópica

A reação reversível da hemoglobina com oxigênio nos quatro grupos heme pode ser tratada como equilíbrio químico, nestes a fração ligada é independente da pressão parcial de oxigênio, a forma da curva de equilíbrio de tipo sigmóide, indica que a união do ligante facilita-se a

medida que procede a oxigenação. Os diferentes valores de energia livre de interação entre as subunidades alteram a afinidade do próximo oxigênio.

A interação heme-heme ou cooperatividade é alcançada pela ação direta de reatividade entre os sítios, e indiretamente pelas mudanças conformacionais induzidas pela união de oxigênio nas subunidades, modificando o equilíbrio entre as duas formas conformacionais da estrutura quaternária. A transdução de energia entre os sítios de união e a mudança de estados conformacionais é recíproca, restaurando-se a forma original após a dissociação do ligante. A cooperatividade garante a oxigenação e a desoxigenação total da molécula (Perella, 1986) e é uma característica vinculada à molécula tetramérica e não ao dímero $\alpha\beta$, onde a interação desaparece (Kellet & Gutfreund, 1970; Anderson et al., 1971; Hewitt et al., 1972), devido à rigidez dos contatos entre as subunidades $\alpha_1\beta_1$.

A hemoglobina humana é considerada o protótipo de proteína alostérica e cooperativa; a regulação é realizada através das interações homotrópicas e heterotrópicas, que modelam a reatividade do sítio de união de oxigênio, mudando o equilíbrio conformacional da estrutura quaternária $T \leftrightarrow R$, descrita pelo modelo MWC, (1965), ou pelo modelo seqüencial KNF, (1966) que considera as seqüências conformacionais intermediárias entre T e R.

O mecanismo alostérico, parece ser controlado por uma característica simétrica desconhecida, onde a configuração isomérica se

transfere ao heme seguinte, envolvendo ao menos seis pontos chaves da estrutura quaternária (Ackers et al., 1992). Segundo Gelin et al. (1983), a perda da molécula de água unida ao ferro do núcleo alostérico e a redução do ferro na estrutura R, também poderiam desencadear o deslocamento do ferro do plano dos nitrogênios porfirínicos em cerca de 0.2 Å, transmitindo os movimentos à histidina proximal e aos contatos $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$. Sugerem-se também que os enlaces de hidrogênio entre N da His₈₇F8 e o grupo carboxílico da Leu₈₈βF4 poderiam estar envolvidos no mecanismo alostérico, através da alteração da distância do enlace, mas que persistem tanto na forma oxigenada quanto na forma desoxigenada.

1.1.3.2 Regulação alostérica heterotrópica

A regulação alostérica através das interações heterotrópicas, modificam a afinidade do sítio de união pelo oxigênio por efeito de outros ligantes como prótons, Cl⁻, dióxido de carbono e 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG) (Benesch & Benesch, 1981; Antonini & Brunori 1971; Perutz, 1990). Esses efetores alostéricos diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, facilitando sua liberação, estabilizam a estrutura T pela formação de enlaces de hidrogênio entre as subunidades, modificando a constante de equilíbrio $T \leftrightarrow R$.

1.1.3.2.1 Efeito de fosfatos orgânicos

O modulador natural da hemoglobina humana, o 2-3 DPG tem a função de adaptar a molécula de hemoglobina às necessidades metabólicas dos tecidos, diminuindo a afinidade pelo oxigênio (Benesch

metahemoglobina através de modificações químicas que aceleram a oxidação reversível do ferro do grupo heme (Snyder et al., 1987). Através dos estudos de cristalografia de raios X, Arnone (1972) e Arnone & Perutz (1974) mostraram que o DPG e o Inositol hexafosfato (IHP) ligam-se na desoxihemoglobina humana entre as duas cadeias β por interações eletrostáticas, unindo-se à Val₁(NA) β , His₂(NA2) β e His₁₄₃(H21) β de ambas cadeias e Lys₈₂(EF6) β de uma cadeia β .

1.1.3.2.2 Efeito de prótons

O efeito de prótons foi descrito por Bohr et al. (1904) como o aumento da afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio em função do aumento de pH. A liberação de prótons desta molécula conhecido como efeito Bohr alcalino, é fundamental para o transporte de CO₂ dos tecidos aos pulmões, pela formação de HCO₃⁻ e CO₂ e água. Fisiologicamente importante numa atividade muscular intensa, visto que uma baixa porcentagem de CO₂ é transportada na forma de carbamino hemoglobina.

A teoria de Wyman (1964) mostrou que existe uma relação exata entre a mudança de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e o número de prótons liberados em função do pH. Para cada mol de oxigênio liberado, a pH 7,4 e à temperatura de 25 °C, a hemoglobina capta 0,2 moles de prótons da solução desionizada, 0,5 moles de H⁺ em 0,1 M Cl⁻ e 0,7 moles de H⁺ em excesso de 2 -3 DPG (Kilmartin, 1974; Perutz et al., 1980). Através de cristalografia de raios X, foi demonstrado que os prótons são captados pela His₁₄₆(HC3) β e utilizados para a formação de

pontes de hidrogênio com Asp₉₄(FG1) β na estrutura T. O grupo imidazol da His₁₄₆ aceita enlaces de hidrogênio do NH do peptídeo da mesma cadeia na estrutura R, mudando o pK de 6,8, na oxihemoglobina, para 7,8 na desoxihemoglobina (Rossi-Bernardi & Rougton, 1967; Kilmartin et al., 1973; Fermi et al., 1984).

O mecanismo molecular do efeito Bohr proposto por Perutz (1970) considera a formação de pontes salinas do grupo α amino da Val₁ α e do grupo imidazol da His₁₄₆(HC3) β . Na oxigenação, as pontes salinas são rompidas e os valores dos pKs dos grupos Bohrs são revertidos ao valor normal e os prótons liberados. A maior contribuição do efeito Bohr parece ser dada pela His₁₄₆ β , devido à diminuição drástica deste efeito após a remoção específica do resíduo com carboxipeptidase (Rossi-Fanelli et al., 1964) ou pela sua substituição, nos casos de mutantes naturais, tais como a hemoglobina de Hiroshima His₁₄₆ β \rightarrow Asp. (Perutz et al., 1971) e Cochim-Royal His₁₄₆ \rightarrow Arg (Wajeman et al., 1975).

Mas existe uma série de controvérsias sobre os grupos que seriam responsáveis pelo efeito Bohr. Van Beek et al. (1979; 1980), propuseram que qualquer resíduo de aminoácido com afinidade diferente por ânion na desoxi ou oxihemoglobina contribuiria para este efeito. Por outro lado, Perutz et al. (1980) indicam o envolvimento de apenas três ou quatro resíduos de aminoácidos. No entanto, o modelo eletrostático sugere a mudança de pK de uma série de aminoácidos ionizáveis, tanto na forma oxi quanto na desoxi devido à interação do solvente com as cargas da proteína (Russu et al., 1980; 1982).

Considerando a teoria alostérica, o equilíbrio conformacional da estrutura quaternária entre os estados T e R, alteram as propriedades de ionização de vários resíduos de aminoácidos. Os prótons Bohr unidos à grupos catiónicos de valores de pK elevados no estado T, são liberados na forma R após a oxigenação. Mas apenas 25% dos prótons Bohr seriam liberados antes da mudança $T \leftrightarrow R$, a maior parte ocorreria no segundo e terceiro passo da oxigenação e apenas 5% no quarto passo (Imai et al., 1975).

No efeito Bohr alcalino, a conservação dos resíduos N e C terminais são relevantes, e qualquer substituição ou deleção da His₁₄₆ β mostra um efeito significativo, mas não se pode excluir a participação de outros grupos (Riggs, 1988), não obstante a termodinâmica mostre que este seria consequência de uma única distribuição de cargas nas duas estruturas quaternárias (Ho & Russu, 1987).

1.1.4 ASPECTOS TERMODINÂMICOS

A análise termodinâmica pode fornecer informações sobre as variações energéticas iniciais e finais associadas às reações químicas; e permite prever a factibilidade dos sistemas propostos assim como a sua extensão, embora não indique a velocidade das reações e a seqüência dos mecanismos.

1.1.4.1 Antecedentes históricos

As bases da termodinâmica moderna iniciaram em meados do século XIX pelas contribuições de Carnott (1824), Mayer (1842), Joule (1840-1849) e Classius (1850-1855). Aplicando os conceitos da célula eletrolítica mostraram a reversibilidade do processo pelo tratamento de Gibbs. Logo após Nernst (1891) introduziu a relação entre a força eletromotriz (FEM), diferença de potencial entre dois eletrodos com resistência zero, e os potenciais químicos. As medidas das FEM no equilíbrio, permitiram calcular o trabalho elétrico da reação química. A equação de Nernst relacionou a FEM às atividades das substâncias nas reações químicas da célula e ao potencial padrão da reação, considerando os dados quantitativos da energia livre.

Os estudos de potencial de óxido-redução na hemoglobina, iniciaram-se com Conant & Pappenhainer (1932), os quais utilizando métodos espectrofotométrico e potenciométrico mostraram que o sistema era termodinamicamente reversível obtendo-se valores de potencial de E_h de 0,15 V a pH 7,0. Verificou-se mais tarde valores similares para hemoglobina de boi e o valor de ΔE_h por unidade de pH próximo a 0,05V (Havenam & Wolff, 1937).

Taylor e Hasting (1939) introduziram nas determinações de potencial redox no sistema das hemoglobinas, de eletromobilidade muito lenta, o uso de eletromediador, de modo a acelerar o equilíbrio no eletrodo de platina, obtendo a curva de oxidação de hemoglobina de cavalo nos diferentes pHs com valores similares à humana com pK de 6,65 e uma variação de potencial por unidade de pH de 60 mV, que inclui

a liberação de um próton por sítio entre a forma oxidada e reduzida (Antonini et al., 1964b).

1.1.4.2 Propriedades do equilíbrio da óxido-redução.

1.1.4.2.1 Analogia do equilíbrio de oxigenação e de oxidação

A analogia do equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina e da mioglobina, com o equilíbrio do ligante gasoso foram mostradas por Wyman (1948) e Gibson (1959), e posteriormente em diferentes hemoproteínas (Brunori et al., 1966; 1967) e avaliadas nas reações de cinética de oxidação (Antonini et al., 1965). Tais reações seguem o comportamento paralelo à oxigenação, aceitando-se a similaridade do mecanismo básico do equilíbrio de oxigênio e redox, e das mudanças conformacionais induzidas pelas interações homotrópicas e heterotrópicas (Antonini & Brunori, 1975).

1.1.4.2.2 Potencial de óxido-redução e pH

A dependência do pH no potencial de óxido-redução, envolve a ionização de vários aminoácidos nos diferentes valores de pH e permite avaliar os valores de pK (Santucci et al., 1984; Antonini et al., 1982), verificando-se também que os grupos envolvidos no efeito Bohr alcalino são os mesmos que no equilíbrio de oxigenação. A única diferença observada entre a transferência de elétrons e a união de oxigênio com ligante gasoso, refere-se à forma da curva de equilíbrio que se mostra dependente do pH, com valor de $n=1,29$ a pH 6,0 e de 2,5 a pH 9,0,

sendo que no equilíbrio de oxigênio o valor de "n" é independente do pH (Antonini et al., 1964b).

Isto pode ser explicado pela diferença intrínseca de potencial entre as cadeias α e β no tetrâmero, dadas as diferenças de potencial redox obtidos nas cadeias isoladas (Banerjee & Cassoly, 1969) ou entre os dois dímeros (Brunori et al., 1965), unidade funcional da hemoglobina no equilíbrio e cinética de união com o ligante na forma ferrosa (Antonini, 1967; Guidotti, 1967; Wyman, 1967). Baseando-se na teoria de MWC (1965) o equilíbrio $T \leftrightarrow R$ na metahemoglobina seria dependente do pH, alterando-se estas proporções (Kilmartin, 1973) e indicaria que a energia livre de interação no processo de oxidação é dependente do pH (Brunori et al., 1967). Na adição de inositol hexafosfatos na reação de óxido-redução da hemoglobina, observa-se aumento do valor de E_h , causado pela forte estabilização do estado T (Perutz et al., 1974) e uma baixa tendência da forma desoxi ferrosa ser oxidada no estado T (Coletta et al., 1987).

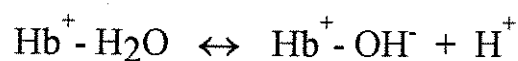
1.1.4.2.3 Efeito Bohr residual

Na curva de equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina e mioglobina, à baixa ou alta força iônica, observa-se o efeito Bohr residual, com uma magnitude de 20 a 30 mV, o qual não sofre alterações com carboxipeptidase, A ou B, excluindo-se a participação da região terminal, His₁₄₆ β e Tyr₁₄₅ β e Arg₁₄₁ α , portanto, independente do efeito Bohr alcalino. Sugere-se que este seja originado pela mudança de conformação local do heme (Brunori et al., 1969). Através de raios X,

Kendrew et al., (1961) mostraram que o anel imidazólico da His₉₇ da região FG3 com pK 6 a 8, estava próximo e paralelo ao heme, porém seria o responsável por este efeito.

1.1.4.2.4 Transição ácida-alkalina

A transição ácida-alkalina presente na oxido-redução de hemoproteínas, ocorre pela ionização da molécula de água, segundo o seguinte esquema:



Na oxidação a pH alto há perda de um próton e um elétron do sítio heme, com o pK acima de 8,0 na ferrihemoglobina (Brunori et al., 1965). Este processo envolve a transição do complexo de alto spin (forma hidratada a pH baixo) para baixo spin (forma hidroxílica a pH alto). Segundo Caughey (1967) a transição ácida-alkalina do derivado férrico envolve a perda de próton do nitrogênio imidazólico da histidina distal, movimentando-se o ferro no plano do heme, mas o papel direto desta não pode ser generalizado, dado que na hemoglobina *Chinomus thumin* e mioglobina de *Aplysia* apresentam substituições neste sítio.

O equilíbrio redox facilita a correlação entre as diferenças estruturais e funcionais, a identificação dos grupos específicos envolvidos

no efeito Bohr de oxidação e permite estimar a energia livre intrínseca da molécula.

1.1.5 ANTECEDENTES GERAIS

As propriedades bioquímicas da hemoglobina humana têm sido o modelo básico dos estudos do mecanismo molecular da oxigenação e das teorias alostéricas de regulação.

Estas são codificadas em três exons e expressas em regiões diferentes do enovelamento da globina por domínios (Eaton, 1980; Blacke, 1983), sendo estes o "pocket" hidrofóbico do heme altamente conservado durante a evolução, constituídos pela histidina proximal His₈₇F8, a histidina distal HisE7, a PheCD1 e a ValE11, responsável pela união reversível do oxigênio ao íon ferroso, o contato $\alpha_1\beta_2$, responsável pela estabilidade T e R da estrutura quaternária do tetrâmero, e a região de união de fosfatos das cadeias β .

Existem fortes evidências que os diferentes mecanismos moleculares responsáveis pelas propriedades funcionais do transporte e liberação de oxigênio nas hemoglobinas, originam-se por modificações em posições chaves de apenas alguns resíduos de aminoácidos da seqüência das globinas (Poyart et al., 1992), principalmente daqueles localizados na interface $\alpha_1\beta_2$, ligações responsáveis pela maior diferença de energia livre entre a estrutura R e T (Petigrew et al., 1982). As interações entre as subunidades são altamente específicas e dependentes do tipo de

aminoácido participante (Hashimoto et al., 1993). Substituições nesta interface promovem a dissociação do tetrâmero em dímeros pela clivagem das pontes de hidrogênio (Edelstein et al., 1970), ou em casos extremos a estabilização dos estados T ou R, e conseqüentemente originando hemoglobinas intrinsecamente de alta afinidade, não cooperativas e sem efeito Bohr (Perutz et al., 1984).

Ao analisar as hemoglobinas de vertebrados não-mamíferos observamos que apesar de poucas espécies terem sido analisadas em detalhes, são geralmente tetraméricas e exibem uma extensa variabilidade no número de componentes e diferentes propriedades funcionais, sendo o mais comum a presença de efeito Bohr normal ou efeito Root. O efetor alostérico presente em maior concentração é o ATP ou GTP, porém, em algumas espécies observa-se a presença de lactato, inositol pentafosfato ou 2-3 DPG, que apresentam diferentes sensibilidades à temperatura ambiente.

Por outro lado, considerando-se o aspecto evolutivo existem evidências obtidas de fósseis e de vertebrados primitivos, que no período Devoniano, 350 milhões de anos atrás, ocorreram mudanças críticas de oxigênio no ambiente aquático, ocasionado pela diminuição do nível de água e aumento de matéria orgânica, que parece ter sido a pressão de seleção para que os vertebrados existentes desenvolvessem a respiração aérea. As propriedades respiratórias no processo evolutivo das moléculas, originaram-se a partir de um ancestral monomérico, mas devido à sua incapacidade de suprir as crescentes demandas metabólicas dos organismos existentes, surgiu a estrutura quaternária da hemoglobina que

a tornaria mais versátil, de menor afinidade pelo oxigênio possibilitando a regulação alostérica homotrópica e heterotrópica (Poyart et al., 1992).

Os peixes pulmonados da classe primitiva Chondrichthyes são considerados descendentes dos primeiros vertebrados e próximos aos tetrápodes. Entre eles observam-se similaridades nas propriedades funcionais tais como, alta afinidade pelo oxigênio, ausência de efeito Bohr e de cooperatividade, dissociação em dímeros, a qual está associada às substituições nos resíduos de aminoácidos localizados no contato $\alpha_1\beta_2$.

Dentro desse contexto, as hemoglobinas de *Sphenodon punctatus* da ordem Rynchocephalian, representantes dos pré-dinossaurus, (Tetens et al., 1984; Wells et al., 1983) e serpentes *Liophis miliaris* (Matsuura et al., 1987; 1989) apresentam características funcionais e estruturais similares àquelas apresentadas pelos vertebrados primitivos.

Os estudos das propriedades funcionais e estruturais da hemoglobina de *Liophis miliaris* forneceram subsídios para propor um novo mecanismo de transporte de oxigênio, que ocorreria entre duas formas moleculares da hemoglobina desta serpente, o mecanismo de transição dímero \rightarrow tetrâmero que parece ser geral a todos ofídios (Matsuura et al., 1987, Focesi Jr. et al., 1990; 1992). Duas formas alternativas possíveis podem ser sugeridas, i.- o dímero desoxigenado de alta afinidade na presença de ATP, tornaria-se um tetrâmero desoxigenado, no estado T, que em presença de oxigênio formaria o tetrâmero no estado R, e após a liberação do ATP, em dímero; ii.- a forma dimérica quando desoxigenada associaria para formar o tetrâmero em presença de ATP e não inclui a

forma intermediária de tetrâmero oxigenado. Dando proceguimento a estes estudos propusemos estudar as propriedades termodinâmicas das hemoglobinas.

1.1.6 OBJETIVOS

Atualmente é de fundamental importância a compreensão das propriedades funcionais das hemoglobinas em nível molecular. Assim, o estudo da relação entre mecanismos de oxigenação e estrutura primária com dados termodinâmicos podem fornecer subsídios para o esclarecimento dos efeitos homotrópicos e heterotrópicos intrínsecos à molécula, a natureza da transição $T \leftrightarrow R$ e a energia livre de união do ligante.

No presente trabalho, serão analisadas as propriedades funcionais de oxigenação, bem como oxidação de hemoglobinas de *Clarias sp.*, de *Liophis miliaris*, e humana, vertebrados de respiração aérea evolutivamente distantes, de modo a entender melhor a base molecular da oxigenação, efeito Bohr e cooperatividade nas moléculas de hemoglobinas diméricas e tetraméricas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No estudo das propriedades funcionais de oxigenação e de oxidação foram analisadas as hemoglobinas de *Clarias sp.*, bagre da ordem Siluridea, de respiração aérea pela utilização de alvéolos branquiais (FIGURA 1), obtido comercialmente no centro de criação e reprodução "Recanto dos peixes" de Monte Mor, Campinas e da serpente *Liophis miliaris* da ordem Squamata, fornecida pelo Instituto Butantã de São Paulo.

2.1.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA

Os animais foram, anestesiados por imersão em banho de gelo, e sangrados por punção cardíaca utilizando seringas contendo 0,1 ml de heparina 5000U/ml. As hemácias foram imediatamente lavadas 4 a 5 vezes com uma solução NaCl 1,7 %, à 4 °C, na proporção de um volume de amostra para 10 volumes de tampão. Os hemolisados foram obtidos utilizando tampão Tris-HCl 1mM pH 8,5, e removendo totalmente o estroma por uma ou mais centrifugações a 16000 rpm usando microcentrí fuga modelo Eppendorf.

2.1.2 PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA "STRIPPED".

O hemolisado isento de ânions foi obtido ajustando o valor de pH acima do ponto isoelétrico pela adição de Tris sólido e a posterior

passagens através da coluna de Sephadex G-25 (80 cm x 2,0 cm) equilibrada com Tris 1 mM pH 9,0, mantendo um fluxo de eluição de 1ml por minuto, de modo de garantir a total eficiência da coluna. Todas as soluções e tampões foram preparadas utilizando água miliQ.

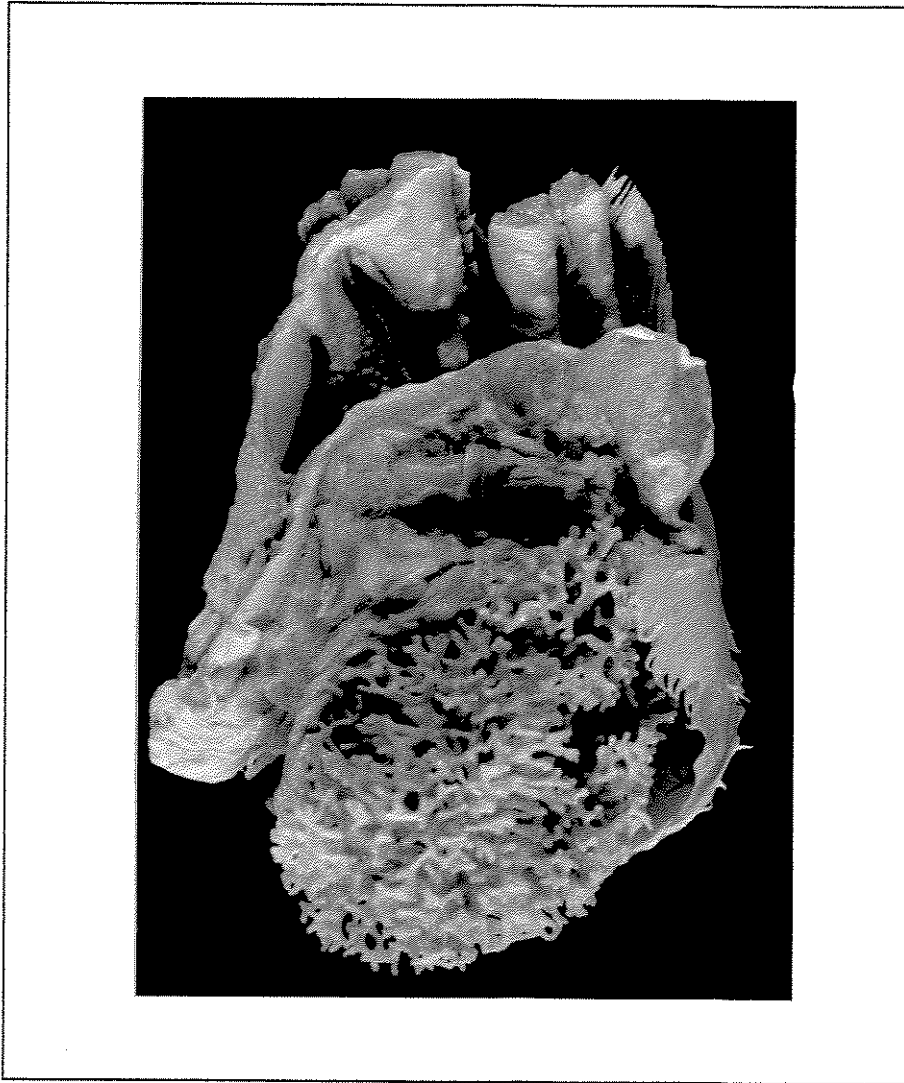


FIGURA 1 Modificações branquiais alveolares do bague Siluliforme *Clarias sp.* de respiração aérea.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 ANÁLISES ELETROFÓRETICAS E TIPOS DE CADEIAS.

2.2.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% pH 8,9.

As análises eletrofóreticas para determinar o número de isohemoglobinas presentes no hemolisado total, foram realizadas por eletroforese em placa de gel de poliacrilamida (PAGE) 7,5% pH 8,9, segundo o método descrito por Fynn et al. (1979). Foram utilizados de 10 a 20 μ l de hemolisado, com uma concentração de hemoglobina de 30 mg/ml diluído em tampão Tris-glicina pH 8,9 contendo 100 μ l/ml glicerol e β mercaptoetanol 0,01 M, equilibrada na forma carbomonóxido com CO gasoso. A eletroforese foi desenvolvida utilizando 10 mA por amostra com voltagem total de 150V durante 4 a 5 horas, à temperatura ambiente. As bandas eletrofóreticas do gel foram coradas com 0,25% "Comassie blue" R em metanol 50% e ácido acético 10% por 12 horas e descoradas por difusão numa solução de metanol 14% e ácido acético 7%.

2.2.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uréia

O número de cadeias de globina foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de uréia 6M e triton X-100 2%, segundo o descrito no método de Alter et al. (1980). Foram realizadas duas pré-eletroforeses, a primeira utilizando como solução de corrida ácido acético 5% e desenvolvida com a voltagem de 120V e 26mA,

durante uma hora e a segunda ácido acético 5% e β mercaptoetanol 1,3M com 110V e 16mA, , durante 45 minutos. A seguir a eletroforese foi realizada, utilizando como solução de corrida ácido acético 5%, aplicando no gel amostras de 15 μ l de hemolisado (10 a 15 μ g de hemoglobina) contendo uréia 6M, ácido acético e β mercaptoetanol 1,3 M, a qual foi desenvolvida usando 105 V e 12 mA por 4 horas a 25°C. Na coloração e fixação do gel foi usado "Comassie blue" R em metanol, ácido acético e água, como descrito para eletroforese convencional.

2.2.2 CURVAS DE EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO

Os equilíbrios de oxigenação das hemoglobinas foram analisados usando o método espectro-tonométrico, descrito por Riggs & Wolbach (1956), utilizando 4,0 ml de amostra 60 μ M heme, na forma "stripped" em tampão Tris-HCl 50mM, força iônica de Cl⁻ de I = 0,05, preparados em água miliQ, a pH de 7,0 a 8,7 na ausência ou presença de ATP 1mM, a 25 °C. As porcentagens de metahemoglobinas, foram controladas nas amostras em pH menor que 7,0, usando o método de cianometahemoglobina (Tomita et al., 1968), excluindo-se as análises com valores maiores que 4%. As curvas de equilíbrio de oxigênio foram obtidas pelas diferenças de absorbância entre a forma desoxigenada, parcialmente e 100% oxigenada nos comprimentos de onda de 541, 560, 569 e 576 nm, usando-se o espectrofotômetro Varian modelo 634. A afinidade pelo oxigênio, log P₅₀, o efeito Bohr e o coeficiente de Hill, valor de "n", foram determinados usando o gráfico de Hill, definido como log Y/1-Y vs pO₂.

2.2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE AFINIDADE DO ATP

As constantes de afinidade do ATP para hemoglobina de *Clarias sp.* foram determinadas espectrofotometricamente através dos valores de $\log P_{50}$, obtidos da curva de equilíbrio da hemoglobina "stripped" em tampão Hepes 50mM, a diferentes pHs, a 25 °C e concentrações de ATP de 0,05 a 10mM.

As constantes de afinidade K_D e K_O para a desoxihemoglobina e oxihemoglobina, respectivamente, foram definidas através dos gráficos de $\log P_{50}$ vs concentração de ATP. A constante de associação do ATP para a hemoglobina foi calculada pela regressão linear dos mínimos quadrados, usando programa FORTRAN, baseado no método de Levenberg-Marquard (Press et al., 1986).

2.2.4 CURVAS DE EQUILÍBRIO DE ÓXIDO-REDUÇÃO

As curvas de equilíbrio de oxidação foram determinadas usando a metodologia descrita por Taylor & Hasting (1939) e Santucci, et al. (1984), registrando-se medidas de potencial redox da desoxihemoglobina em uma concentração de 70 μ M em tetrâmero, em tampão Tris-HCl 0.1M nos pH de 6,5 a 8,5, na ausência e presença de ATP 1mM.

Utilizou-se uma câmara de vidro hermeticamente fechada, desoxigenada com nitrogênio livre de CO₂, pré-lavado com NaOH 0,2 M, com uma jaqueta de refrigeração, termorregulada a 25°C com o circulador Savant modelo RW050A. A câmara é equipada com eletrodo

de platina e de calomelano como referência, conectados através de uma ponte de ágar 2% em KCl saturado. As variações de FEM eram registradas em diferentes concentrações estequiométricas de oxidante no potenciômetro tipo TOA HM-7A.

As oxidações estequiométricas foram realizadas utilizando-se 5,0 ml de hemoglobina, em diferentes valores de pH, contendo no máximo 5% de metahemoglobina, na forma "stripped" ou na presença de ATP 1mM. Em cada análise, as amostras foram colocadas num tonômetro e cuidadosamente desoxigenadas por fluxo de nitrogênio e após transferidas anaerobicamente à câmara de vidro saturada com nitrogênio. Usando-se como eletromediador das determinações potenciométricas o azul de metileno ou tionina 3% a 4% em relação à concentração molar de hemoglobina, preparado no momento do uso.

As titulações potenciométricas foram obtidas adicionando-se progressivamente 40 μ l de ferricianeto de potássio 5mM à solução de desoxihemoglobina, em agitação contínua, e registrando-se em cada uma das adições os potenciais redox, até obter valores constantes, isto é o equilíbrio ser estabelecido, alcançado aproximadamente em 30 a 60 minutos ou mais, caso fosse necessário, e o 100% de oxidação após sete a oito adições. Os valores de potenciais de 50% para Fe^{+2}/Fe^{+3} , E'_o foram expressos tomando como referência o eletrodo padrão de hidrogênio E_h , descontando para cada medida o valor de potencial do eletrodo de calomelano de 0,246 V.

2.2.5 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE E_h E DE ENERGIA LIVRE DE ÓXIDO-REDUÇÃO.

A expressão utilizada para a determinação do potencial redox pelo método potenciométrico foi a equação convencional dada por Clark (1960).

$$E_h = E_o' + 2,303 RT/nF \log [\text{oxidado}] / [\text{reduzido}] \text{ onde :}$$

E_h = potencial em referência ao eletrodo normal de hidrogênio

E_o' = potencial de eletrodo quando a relação $Fe^{+3} / Fe^{+2} = 1$

F = constante de Faraday, 23.062 cal/ volt equiv.

n = número de elétrons transferidos

R (Constante real dos gases) = 1,987 cal/mol

T = temperatura em °K

A diferença de potencial detectada na mudança química de oxidação da hemoglobina pelo ferricianeto de potássio relacionou-se com a energia livre mediante a seguinte equação: $\Delta G^{\circ} = - nFE_h$

3. RESULTADOS

3.1 HEMOGLOBINA DE *Clarias sp.*

3.1.1 ELETROFORESES DAS HEMOGLOBINAS E TIPOS DE CADEIAS.

As eletroforeses realizadas em gel de poliacrilamida 7,5% a pH 8,9 dos hemolisados "stripped" de hemoglobina de *Clarias sp.*, equilibrados na forma de carbomonóxido, HbCO, usando concentrações de 10 a 30 µg de Hb, mostraram um único componente de migração anódica similar à humana (*FIGURA 2A*).

Na identificação de cadeias de globinas por eletroforese em poliacrilamida 12%, uréia 6% e Triton X-100 2%, usando-se uma concentração de hemoglobina de 5 a 10 µg, obteve-se duas bandas na hemoglobina de *Clarias sp.*, relativas às cadeias de globinas do tipo α e outra do tipo β (*FIGURA 2B*).

3.1.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE OXIGENAÇÃO.

As propriedades funcionais de oxigenação da hemoglobina do bagre africano, *Clarias sp.* na forma "stripped" em tampão Tris-HCl 50mM em diferentes valores de pH, mostraram alta afinidade pelo oxigênio, com valores máximos de P_{50} de 4,5 torr, a pH 7,0, com uma ligação cooperativa com $n= 1,5$, independente do pH. Em presença de ATP

1mM, a afinidade pelo oxigênio diminui em função do pH, obtendo-se valores de aproximadamente 7,5 torr, a pH 7,5. Em valores de pH abaixo de 7,0 foram obtidos valores de afinidade ainda menores e $P_{50}=12,5$ torr, devido à formação de metahemoglobina. A curva de equilíbrio na forma "stripped" entre pH 7,0 a 8,5 não mostrou efeito Bohr, mas na presença de ATP 1mM observou-se uma variação de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = - 0,40$, que foi denominado efeito Bohr aparente ou de ânion (*FIGURA 3*).

Os equilíbrios de oxigenação da hemoglobina de *Clarias sp.* na forma "stripped" em tampão Hepes 50 mM, na ausência de cloreto, mostraram a pH 7,4 o valor de $P_{50} = 4,5$ torr e de cooperatividade $n = 1,7$. Na presença de ATP 1 mM, a pH 7,0, os valores de P_{50} passaram a ser de 7,2 torr e $n = 1,8$ com um valor de efeito Bohr aparente de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,70$ tornando-se mais evidente a variação de afinidade pelo oxigênio com o pH na presença de ATP (*FIGURA 4*).

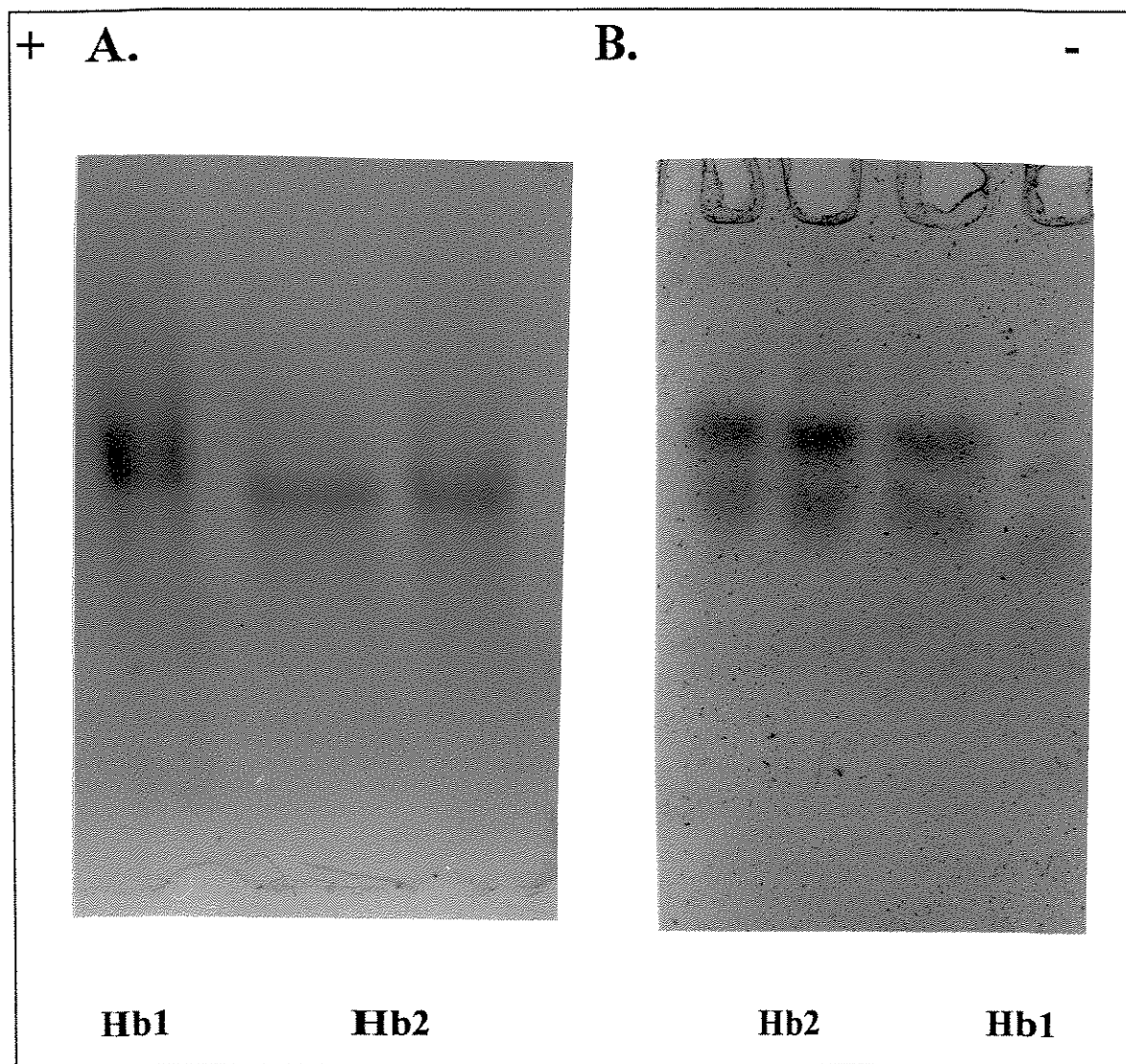


FIGURA 2 Padrões eletroforeticos das hemoglobinas: **A.**- Hb₁ humana e Hb₂ *Clarias sp.* em gel de poliacrilamida 7,5% pH 8,9. **B.**- Cadeias de globina, Hb₁ humana e Hb₂ *Clarias sp.* em gel de poliacrilamida 12%, uréia 6M, Triton X-100 e 2% ácido acético.

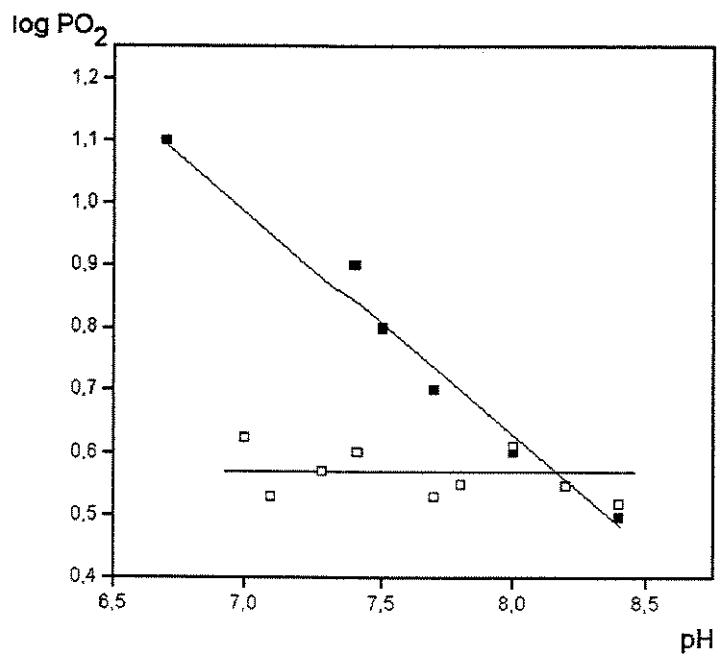


FIGURA 3. Efeito Bohr de oxigenação da hemoglobina de *Clarias sp.* "stripped" (□) e na presença de ATP 1mM (■), em tampão Tris-HCl 50mM e 25°C.

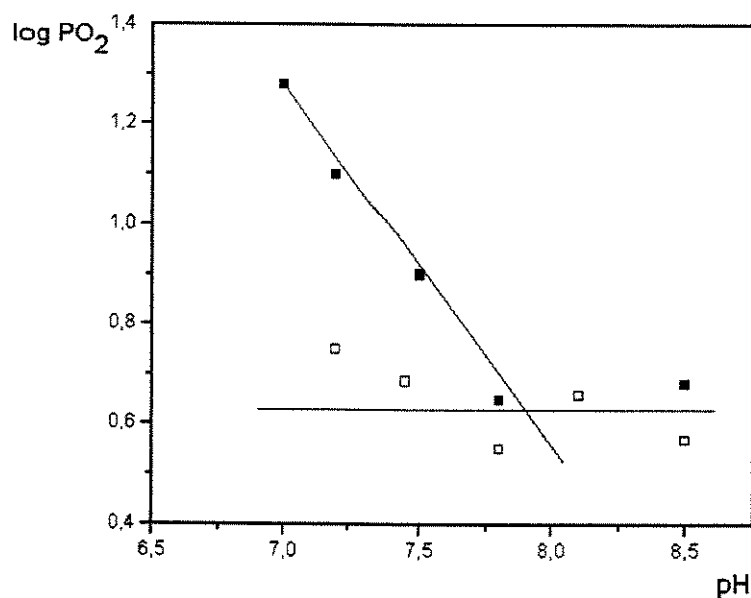


FIGURA 4. Efeito Bohr de oxigenação da hemoglobina de *Clarias sp.* "stripped" (□) e na presença de ATP 1mM (■), em tampão Hepes 50mM e 25°C

Os resultados semelhantes encontrados em experimentos de afinidade pelo oxigênio, e a independência de pH da curva de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina "stripped" de *Clarias sp.*, usando tampão Tris-HCl ou HEPES, mostraram que não há nenhum efeito significativo dos íons Cl^- nas propriedades funcionais intrínsecas desta hemoglobina. Entretanto, na presença de ATP, os íons Cl^- diminuíram o efeito Bohr aparente, aproximadamente em 40 %.

3.1.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP NA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO EM *Clarias sp.*

A dependência do pH observado na curva de equilíbrio de oxigênio da hemoglobina de *Clarias sp.* na presença de ATP 1mM em tampão Tris-HCl 50mM ou HEPES 50mM, deve-se provavelmente à mudança eletrostática do sítio de ligação do ATP associada ao pH e a qual altera-se na presença de íons cloreto. Visando obter um melhor esclarecimento, determinou-se o efeito da concentração de ATP na afinidade da hemoglobina "stripped" de *Clarias sp.* pelo oxigênio, usando tampão HEPES 50 mM, a 25 °C, e concentrações de ATP de 0,05 mM a 10mM, nos valores de pH 7,2, 7,6 e 8,0.

De fato, foi observada diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio inversamente proporcional ao pH, indicando a desprotonação do sítio de ligação do fosfato em pH acima de 8,0 e uma significativa regulação da afinidade pelo ligante entre os valores de pH 7,2 e 7,6 (FIGURA 5).

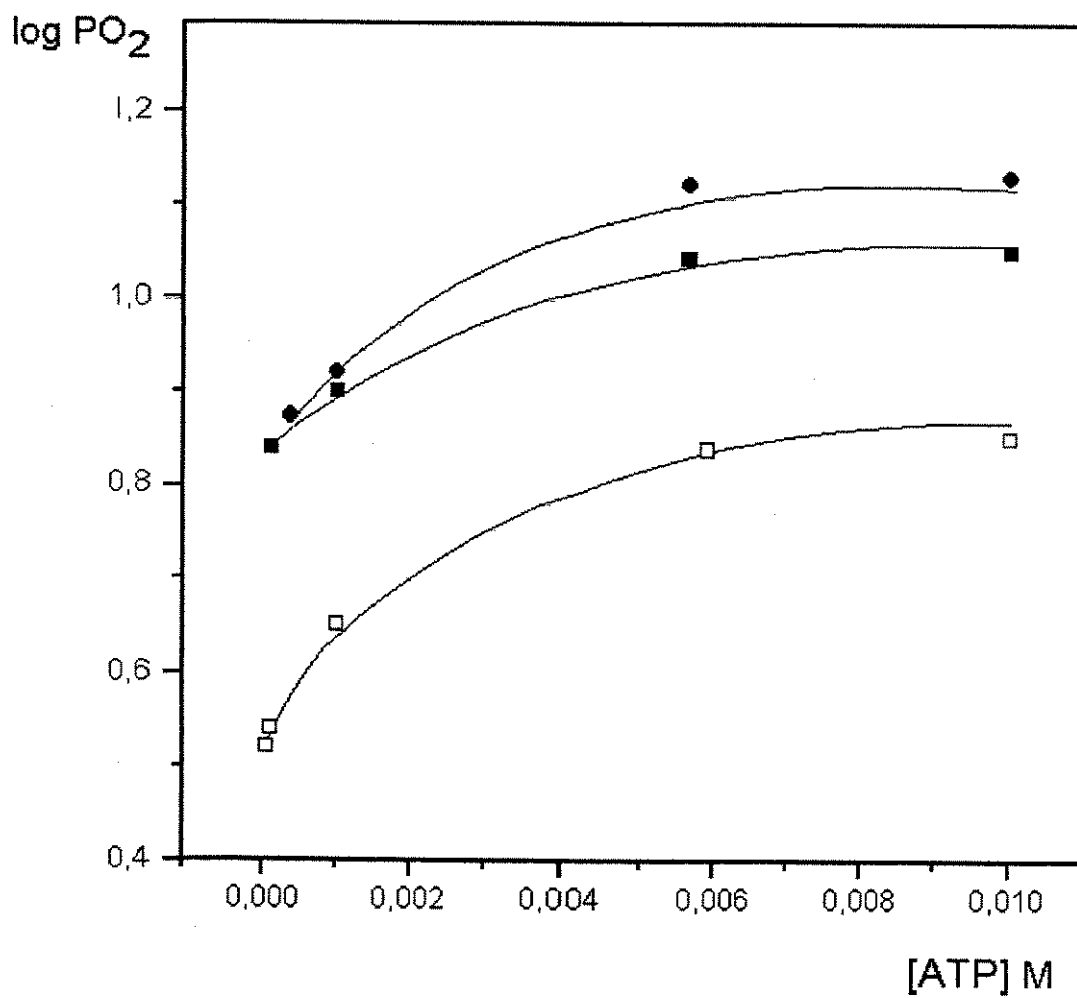


FIGURA 5. Efeito da concentração de ATP na afinidade pelo oxigênio da hemoglobina de *Clarias sp.* em valores de pHs 7,2 (◆), 7,6 (■), 8,0 (□), em tampão HEPES 50 mM e 25°C.

3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE OXIDAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS DE *Clarias sp.* E DE *Liophis miliaris*.

3.2.1 CURVAS DE TITULAÇÃO DE ÓXIDO-REDUÇÃO.

Os resultados obtidos do equilíbrio de oxigenação de hemoglobina de *Clarias sp.* foram correlacionados com os de óxido-redução. As titulações redox das hemoglobinas com ferricianeto de potássio, determinadas potenciométricamente, em tampão Tris-HCl 100 mM, em diferentes valores de pH, mostraram curvas de equilíbrio redox do tipo sigmoidal, tanto na forma "stripped" quanto na presença de ATP 1 mM (FIGURA 6) similar à hemoglobina humana. No entanto, para *Liophis miliaris* as curvas obtidas foram quase hiperbólicas na forma "stripped" e levemente sigmóides na presença de ATP 1mM (FIGURA 8).

O gráfico de Hill, do equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina de *Clarias sp.*, mostrou valores de "n" próximos a 2 na forma "stripped" assim, como na presença de ATP, independentes de pH (FIGURA 7). Para *Liophis miliaris* foram encontrados valores de "n" de 2 na forma "stripped" dimérica ou tetramérica na presença de ATP, também independentes do pH, diferentes da hemoglobina humana, para a qual variam com o pH, mostrando um valor de "n" próximo a 1,0 em pH 6,5 e 2,0 em pH 8,0 tanto na forma "stripped" quanto em presença de ATP (FIGURAS 9 e 10).

3.2.2 POTENCIAIS DE ÓXIDO-REDUÇÃO

As curvas de óxido-redução da hemoglobina humana "stripped" em tampão Tris-HCl 100 mM à 25°C, mostraram uma diferença de potencial com o pH, com um valor de 0,160 V em pH 7,0 o qual diminuía com o aumento de pH, alcançando um E_h de 0,076 V em pH 8,9. Em condições saturantes de ATP, o potencial aumentou para 0,190 V em pH 6,8 mostrando uma diferença constante de $\Delta = 0,030$ V (FIGURA 11), similares aos indicados por Santucci et al. (1984), usando esta metodologia.

Na hemoglobina de *Clarias sp.* os potenciais foram menores em todos os valores de pH quando comparados com hemoglobina humana, observando-se um $E_h = 0,096$ V em pH 7,0 que se manteve constante até pH 7,6, diminuindo em valores de pH mais altos, apresentando $E_h = 0,051$ V em pH 8,3. Na presença de ATP 1mM os potenciais foram maiores, com o aumento constante de 0,020 a 0,025 V, variações similares à hemoglobina humana na presença de fosfatos orgânicos (FIGURA 12).

Os potenciais de óxido-redução para a hemoglobina "stripped" de *Liophis miliaris* mostraram valores máximos com $E_h = 0,071$ V em pH 7,2 e mínimo $E_h = 0,041$ V em pH 8,7. Na presença de ATP 1mM, os potenciais de óxido-redução aumentaram em aproximadamente 0,015 V nos intervalos de pH de 7,1 a 7,6, retornando à valores similares ao encontrado na hemoglobina "stripped" em pH acima de 7,8, confirmando a desprotonação dos sítios de ligação do ATP em valores de pH acima do

ponto isoelétrico desta hemoglobina (*FIGURA 13*). Estes valores de potencial mostraram ser menores com relação à hemoglobina humana e de *Clarias sp.*

As propriedades intrínsecas de oxidação mostraram ser significativamente diferentes para hemoglobina humana, de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris*. Os resultados encontram-se comparados na *FIGURA 14*.

Os valores experimentais de voltagem inicial $E'_o(i)$, E'_o no ponto equivalente à 50% Fe^{+2}/Fe^{+3} e E_h em referência ao eletrodo de hidrogênio, para cada condição de pH da hemoglobina humana, *Clarias sp.* e *Liophis miliaris* na forma "stripped" e na presença de ATP 1mM são mostradas nas *TABELAS I, II e III* (Apêndice).

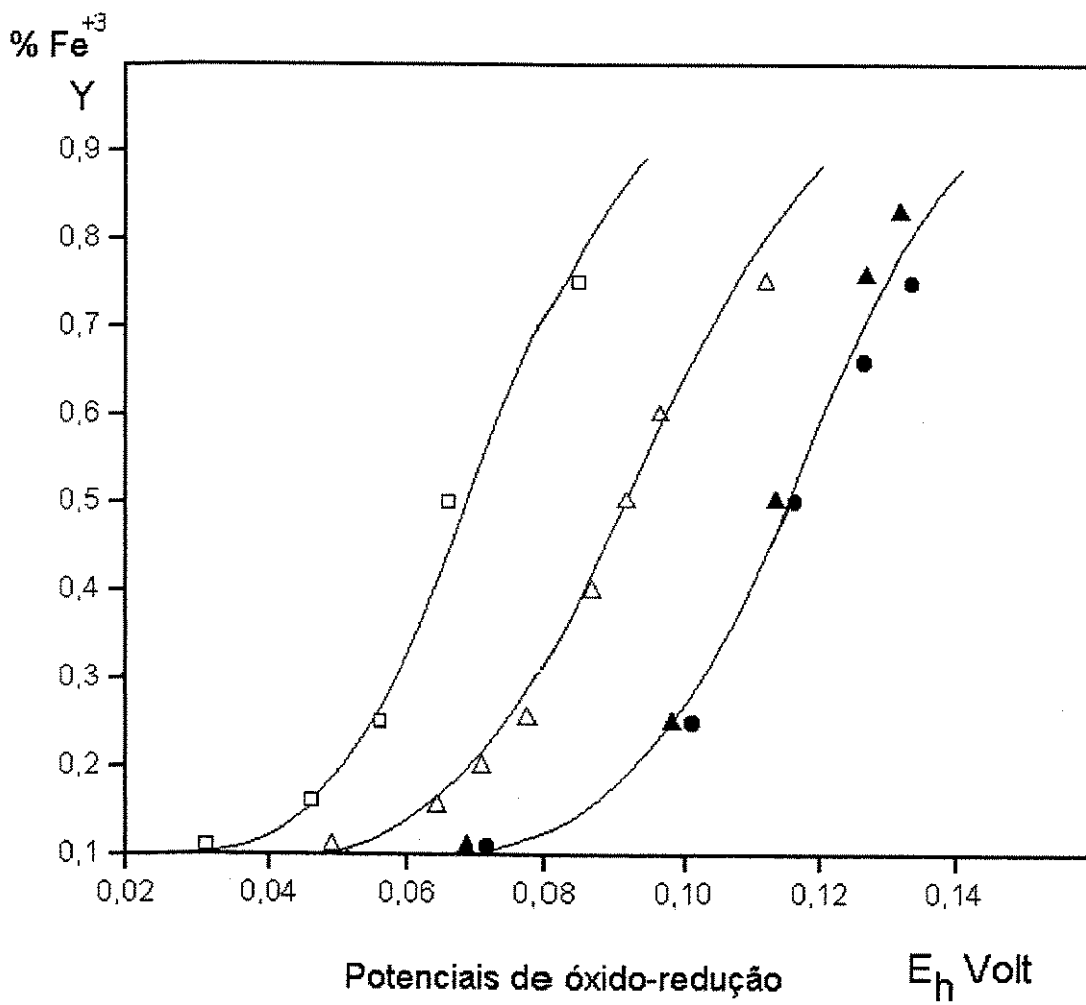


FIGURA 6. Curvas de equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina de *Clarias sp.* na forma "stripped", pH 8,0 (□) e pH 7,6 (Δ) e na presença de ATP 1mM pH 7,2 (●) e pH 7,6 (▲), em tampão Tris-HCl 100mM e 25°C.

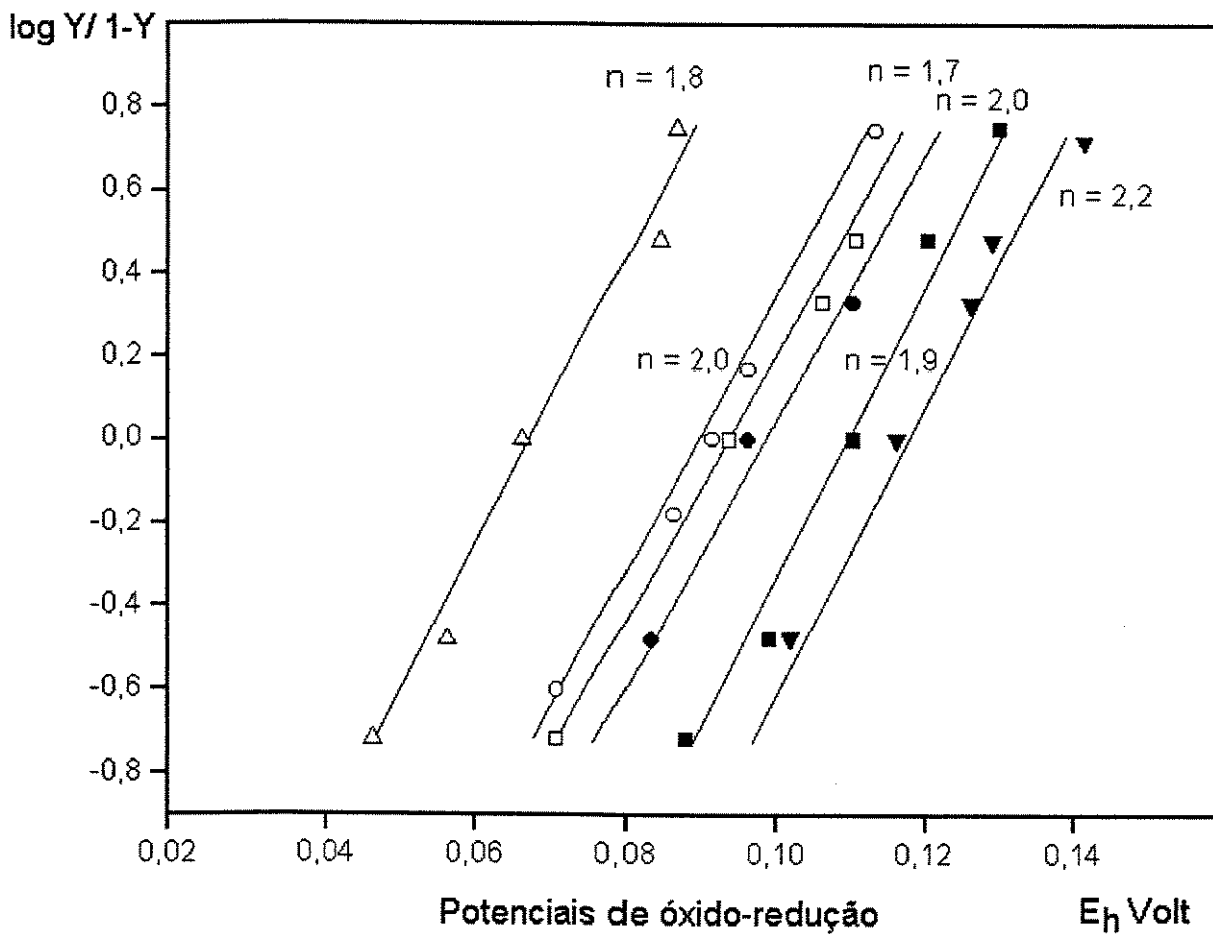


FIGURA 7. Gráfico de Hill do equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina de *Clarias sp.* na forma "stripped" pH 8,0 (Δ), pH 7,6 (o) e pH 7,4 (\square). Na presença de ATP 1mM pH 7,9(\bullet), pH 7,6 (\blacksquare) e pH 7,2 (\blacktriangledown), em tampão Tris-HCl 100mM e 25°C.

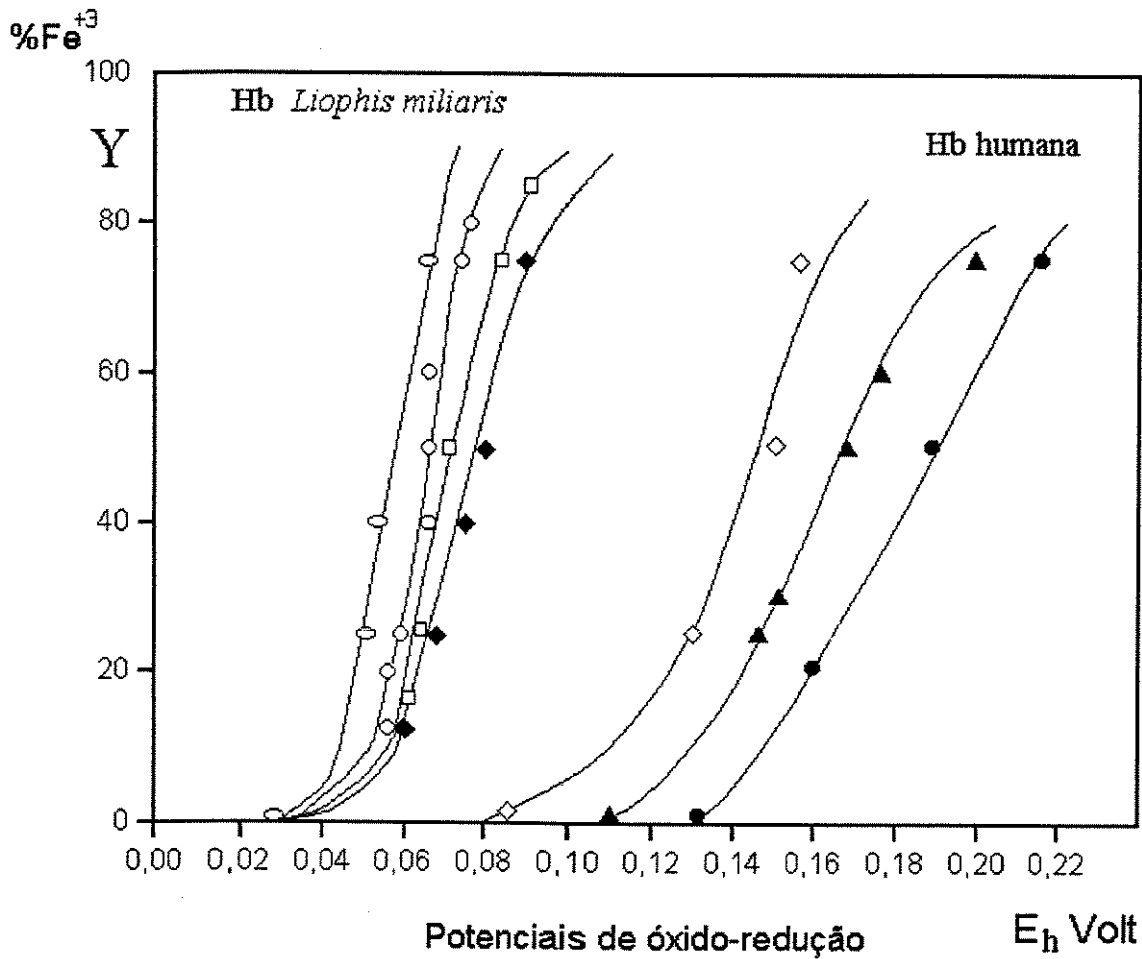


FIGURA 8. Curvas de equilíbrio de óxido-redução das hemoglobinas, de *Liophis miliaris* na forma "stripped", pH 8,3 (o), pH 7,6 (0), pH 7,3 (□) e na presença de ATP 1mM pH 7,4 (◆), e de hemoglobina humana na forma "stripped" pH 7,1 (◇) e na presença de ATP 1mM pH 7,3 (▲) e pH 6,9 (●), em tampão Tris-HCl 100mM e 25°C.

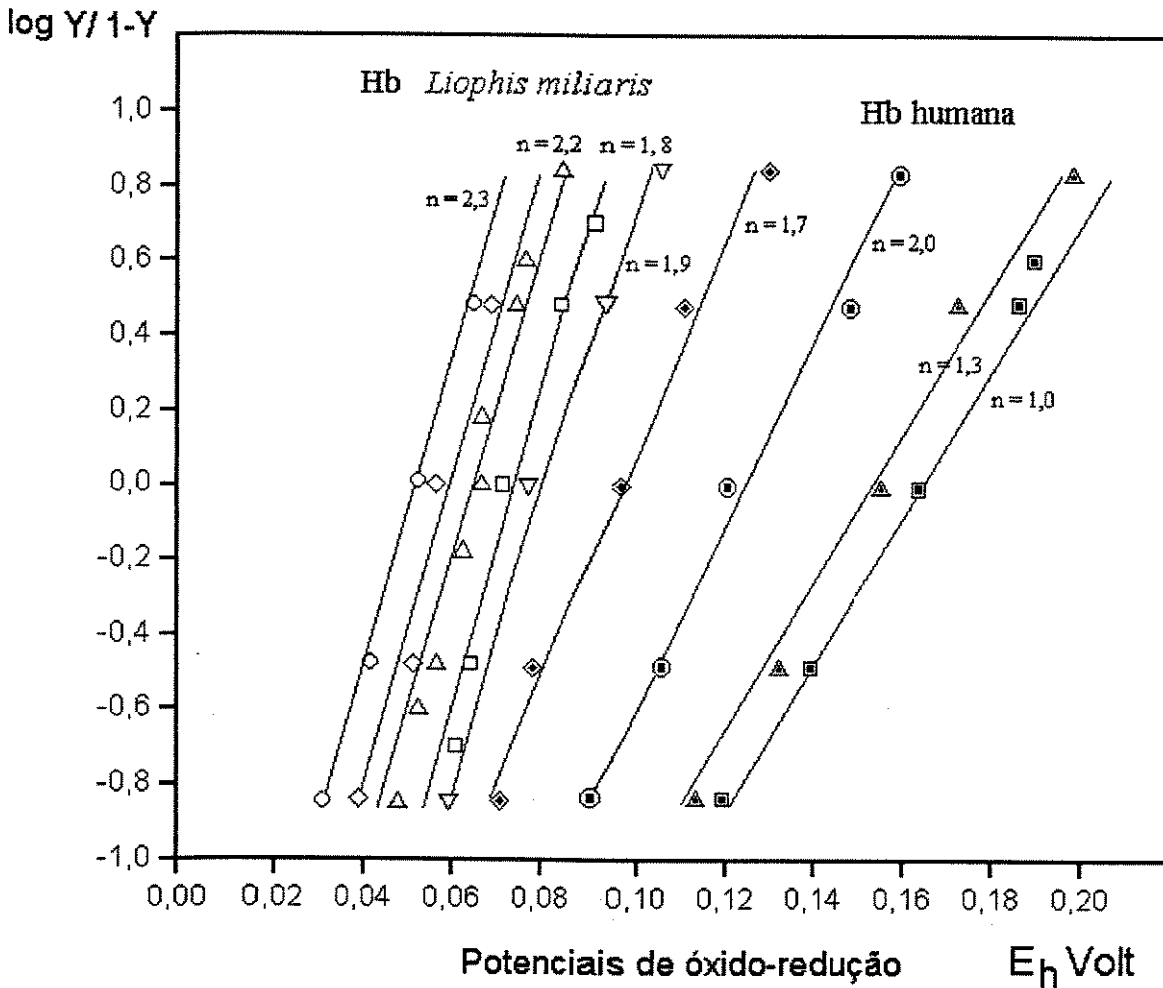


FIGURA 9. Gráfico de Hill do equilíbrio de óxido-redução das hemoglobinas na forma "stripped", *Liophis miliaris* pH 8,5 (o), pH 8,3 (◊), pH 8,0 (Δ), pH 7,6 (□) e pH 7,3 (▽) e humana pH 8,6 (◊), pH 7,7 (⊙), pH 7,1 (Δ) e pH 6,9 (◻) em tampão Tris-HCl 100mM a 25°C.

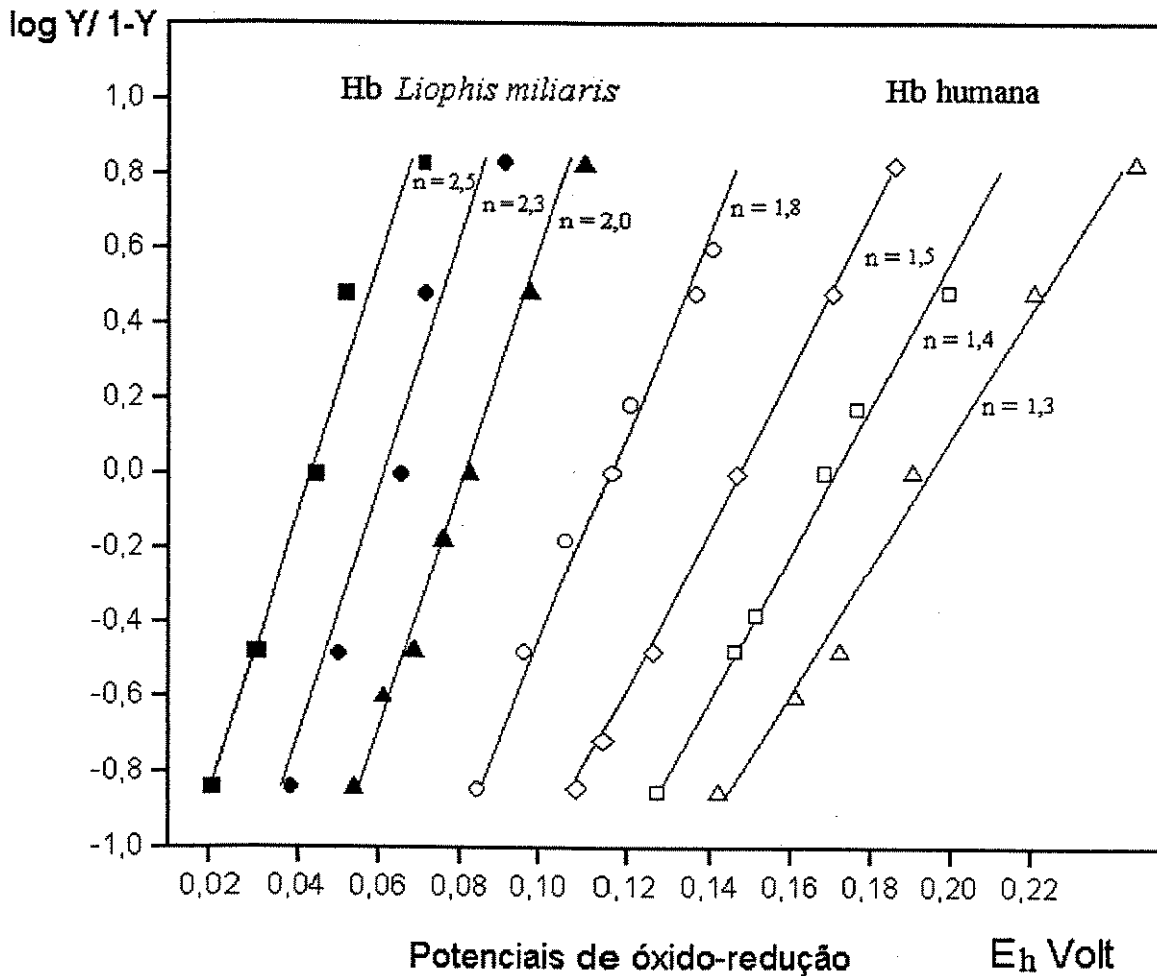


FIGURA 10. Gráfico de Hill do equilíbrio de óxido-redução das hemoglobinas na presença de ATP 1mM, *Liophis miliaris* pH 8,7 (■), pH 7,7 (●) e pH 7,4(▲), humana pH 8,3 (○), pH 7,8 (◇), pH 7,3 (□) e pH 6, 5 (△), em tampão Tris-HCl 100mM a 25°C.

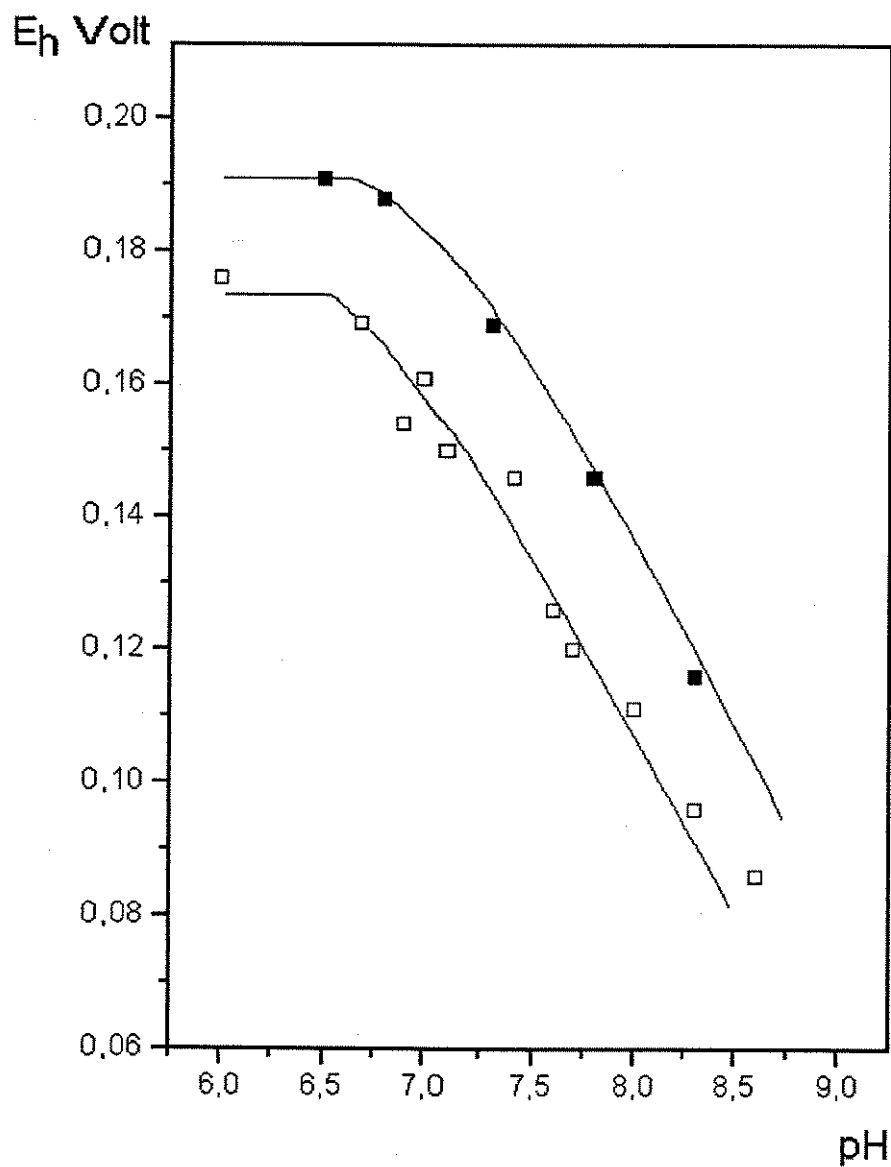


FIGURA 11. Potenciais redox da hemoglobina humana em função do pH na forma "stripped" (□) e na presença de ATP 1mM (■), em tampão Tris-HCl 100mM a 25°C.

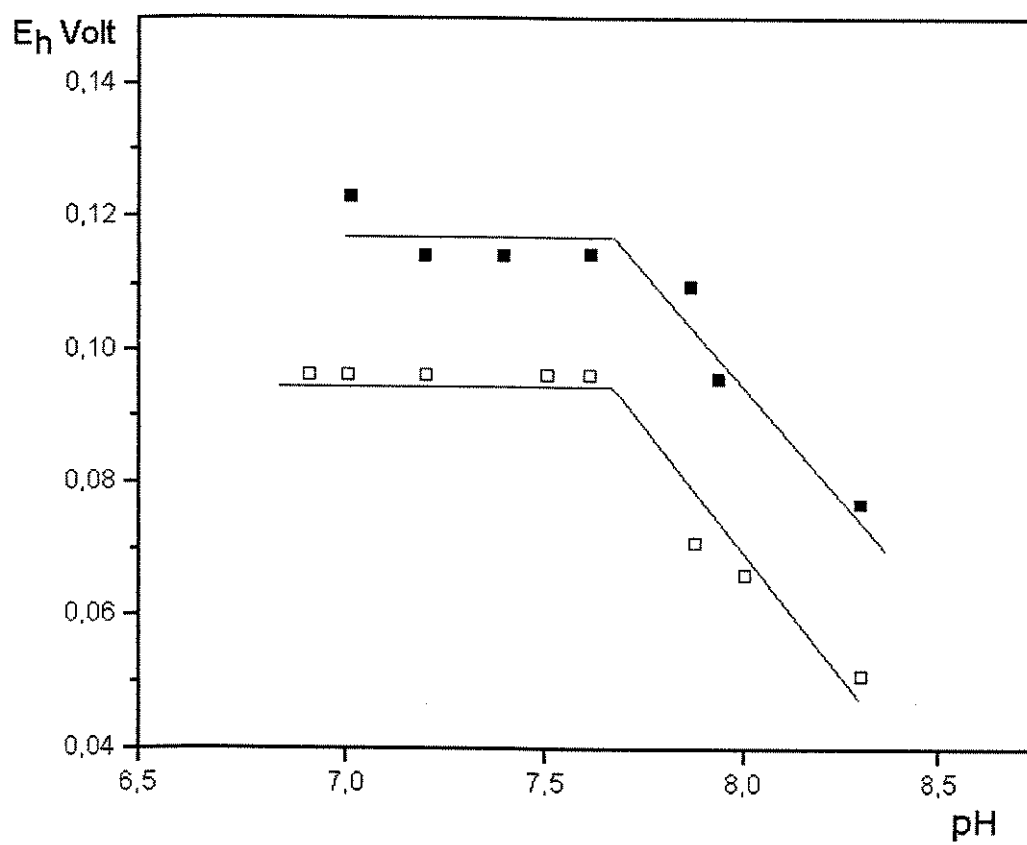


FIGURA 12. Potenciais redox da hemoglobina de *Clarias sp.* em função do pH na forma "stripped" (□) e na presença de ATP 1mM (■), em tampão Tris-HCl 100mM a 25°C.

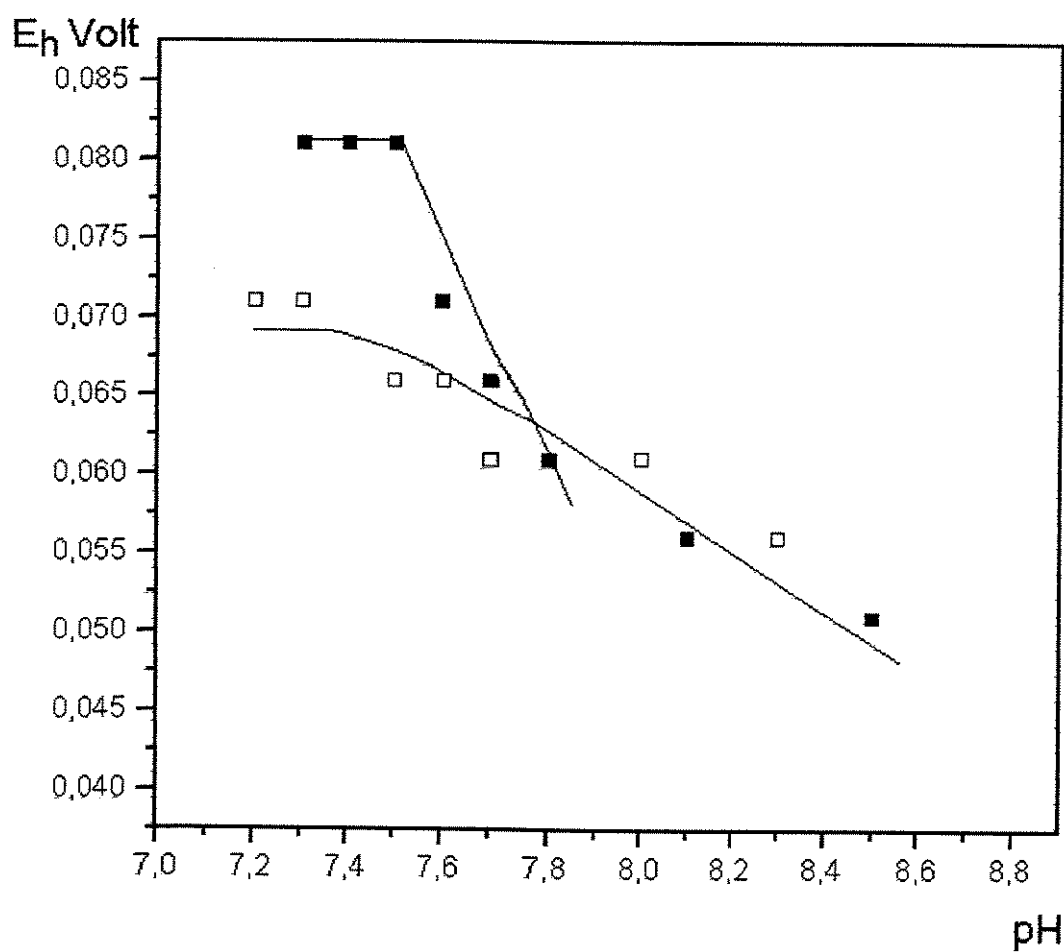


FIGURA 13. Potenciais de óxido-redução da hemoglobina de *Liophis miliaris* em função do pH na forma "stripped" (□) e na presença de ATP 1mM (■), em tampão Tris-HCl 100mM a 25°C.

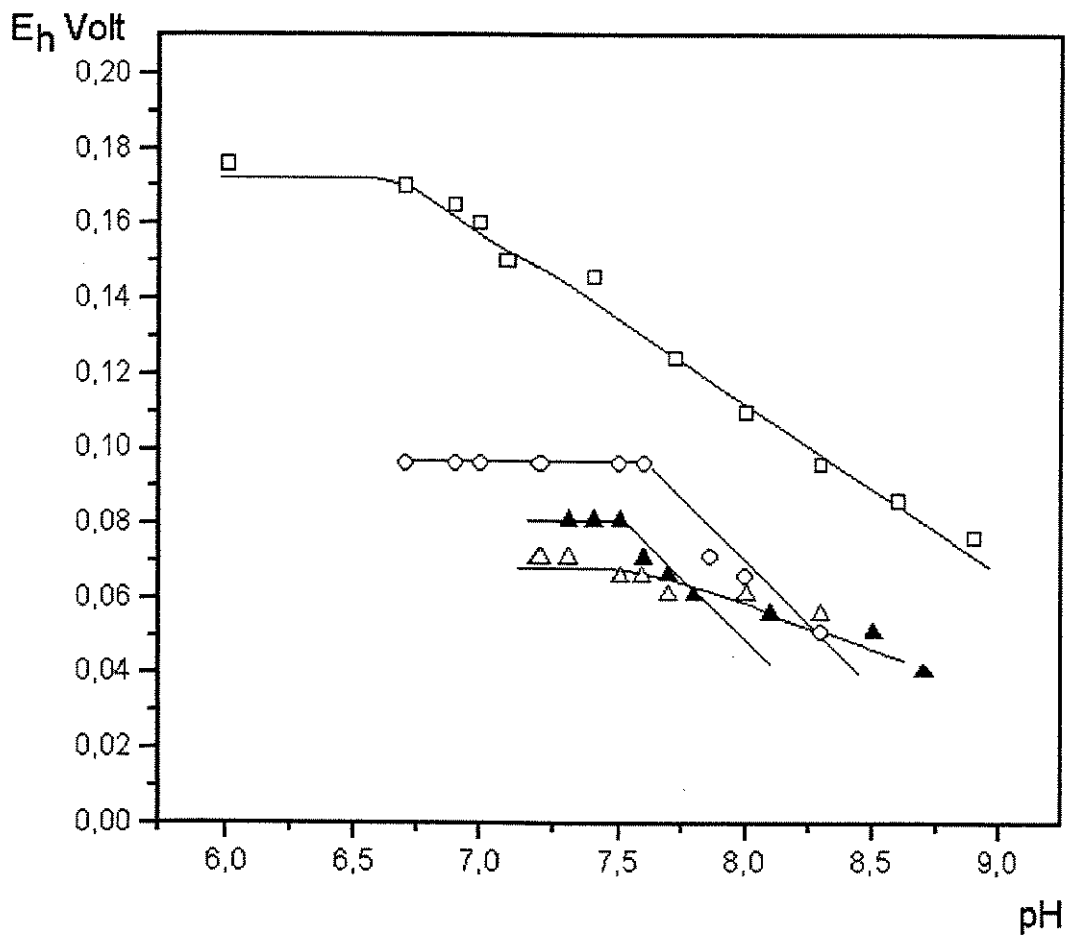


FIGURA 14. Valores comparativos do efeito do pH no potencial redox das hemoglobinas na forma "stripped" humana (□) e *Clarias sp.* (○). *Liophis miliaris* na forma "stripped" (Δ) e na presença de ATP 1mM (▲), em tampão Tris-HCl 100 mM a 25°C.

3.2.3 EFEITO DO TIPO DE ELETROMEDIADOR NO POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO.

As análises de potencial de óxido-redução nas hemoglobinas "stripped" humana, de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris*, não mostraram diferenças significativas de afinidade pelo eletromediador, (azul de toluidina, azul de metileno ou tionina), obtendo-se variações de 0,005 V, nos diferentes valores de pH em presença ou ausência de ATP 1mM. Usando-se concentrações de 3 a 6% de eletromediador observou-se uma diminuição do tempo de equilíbrio no eletrodo de platina.

3.2.4 EFEITO BOHR DE OXIDAÇÃO.

O efeito Bohr de oxidação da hemoglobina humana "stripped" apresentou valores compatíveis com a liberação de prótons associados ao efeito Bohr alcalino de oxigenação. Em valores de pH menores que 6,7, não houve variação de potencial, mas observou-se o valor de $\Delta E_h / \Delta pH = -0,06$ V no intervalo de pH 6,9 a 8,5, similar ao obtido por Antonini et al. (1964). Em presença de ATP 1mM, as variações de E_h em função do pH não foram alteradas, mantendo-se o valor de efeito Bohr constante.

Na hemoglobina "stripped" de *Clarias sp.*, o potencial de óxido-redução mostrou variações mínimas por unidade de pH, sendo $\Delta E_h / \Delta pH = -0,030$, entre pH 7,0 a 8,0, incompatível com a liberação de prótons associados ao efeito Bohr alcalino que não foi modificado pela presença de ATP 1mM.

O efeito do pH no potencial de óxido-redução na hemoglobina "stripped" de *Liophis miliaris* foi mínimo de $\Delta E_h / \text{pH} = - 0.015 \text{ V}$, entre pH de 7,5 a 8,5, semelhante ao encontrado para mioglobina de $\Delta E_h / \Delta \text{pH} = - 0.010$ (Antonini & Brunori, 1971). Na presença de ATP 1mM observou-se uma variação de $\Delta E_h / \Delta \text{pH} = - 0,030$, em pH 7,5 a 8,5, menor que a hemoglobina humana e similar à hemoglobina de *Clarias sp.*

O efeito Bohr de oxidação da hemoglobina humana relaciona-se com o efeito Bohr de oxigenação através da relação $\Delta E_h F/2,303 RT$ (Kilmartin, 1973). A variação de potencial de oxidação de 0,06 V corresponde à liberação de um próton, mas subtraindo o valor do efeito Bohr residual observado na oxidação igual à 0,17 V $[\text{H}^+]$ e os prótons envolvidos na reação com ferricianeto igual à 0,25 V $[\text{H}^+]$, obtém-se o efeito Bohr alcalino em unidades comparáveis, ao valor de $\Delta \text{H}^+ = 0,6$. Ao aplicar estes cálculos nas hemoglobinas de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris* obteve-se valores iguais a zero, o que tornou evidente a ausência de efeito Bohr alcalino.

Os valores de potencial de oxido-redução da hemoglobina de *Liophis miliaris* mostraram ser compatíveis com as propriedades funcionais de oxigenação da forma "stripped", ou seja alta afinidade pelo oxigênio e ausência de efeito Bohr alcalino, e tetramérica e alostérica na presença de ATP.

3.2.5 TRANSIÇÃO T→R NA ÓXIDO-REDUÇÃO.

Nas reações de óxido-redução a transferência de elétrons está associada à de prótons, podendo-se estimar a constante de ionização dos grupos envolvidos no processo oxidativo da forma ferrosa a férrica. Assim a transição T → R no potencial redox indica a ionização de amino ácidos e a variação de energia livre devida ao rompimento de pontes salinas. Na hemoglobina humana o valor de E_h em função de pH, com ponto de inflexão em pH 6,7, indica o pK de ionização da histidina, devido ao rompimento da ponte salina existentes entre His₁₄₆ e Asp₉₄, indicados como principais responsáveis pelo efeito Bohr alcalino (Santucci et al., 1984).

A hemoglobina de *Liophis miliaris* na forma "stripped" não apresentou transição T→R, indicando que durante a oxidação só ocorrem mudanças conformacionais na estrutura terciária e que a forma desoxigenada seria dimérica na ausência de ATP. Na hemoglobina de *Clarias sp.* "stripped" e de *Liophis miliaris* na presença de ATP, a transição T → R ocorre em valor de pH próximo de 7,5, independente da ionização de água da transição ferrosa-férrica que ocorre a pH acima de 8,0, indicando que a transição da estrutura quaternária na união do ligante ocorre independente do aminoácido envolvido no efeito Bohr alcalino.

3.2.6 VALORES DE ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA.

Os valores de energia livre intrínseca para as hemoglobinas humana, de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris* tanto "stripped" quanto na presença de ATP 1mM, foram inversamente proporcionais ao aumento da afinidade pelo oxigênio. As hemoglobinas de alta afinidade como a de bagre e a de serpente, têm uma menor energia livre, aproximadamente 50% da energia requerida na oxigenação da hemoglobina humana. O ATP como modulador alostérico aumenta a energia livre intrínseca do tetrâmero em aproximadamente 0,7 a 0,5 Kcal mol⁻¹ na hemoglobina humana e de *Clarias sp.*, sendo menor na hemoglobina de *Liophis miliaris*, 0,4 Kcal mol⁻¹ (TABELA IV).

TABELA IV.

ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA DO SISTEMA DA HEMOGLOBINA HUMANA, *Clarias sp.* E *Liophis miliaris* NA FORMA "STRIPPED" E NA PRESENÇA DE ATP 1mM.

HEMOGLOBINA	pH	E _h (Volt)	ΔG°' (Kcal mol ⁻¹)
Humana			
"stripped"	7,0	0,160	-3,69
ATP 1mM	6,8	0,190	-4,38
<i>Clarias sp.</i>			
"stripped"	7,2	0,096	-2,21
ATP 1mM	7,2	0,116	-2,68
<i>Liophis miliaris</i>			
"stripped"	7,3	0,066	-1,52
ATP 1mM	7,3	0,081	-1,87

3.2.7 VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA ASSOCIADA À LIBERAÇÃO DE PRÓTONS.

A energia livre intrínseca do sistema associada à liberação de prótons durante a oxigenação, calculada através da relação de $\Delta E_h / \Delta pH$ foi significativa para a hemoglobina humana, aproximadamente de 1,0 Kcal mol⁻¹, após descontar o valor do efeito Bohr residual e da ionização da água de oxidação próximo de 0,2 Kcal mol⁻¹. Esta variação de energia livre do tetrâmero representa a variação de energia livre do sistema vinculada à efeito Bohr alcalino e à transição quaternária.

Nas hemoglobinas de *Clarias sp.* e de *Liophis miliaris* na presença de ATP a variação de energia livre de 0,5 Kcal mol⁻¹, está associada à transição T → R. Na hemoglobina de *Liophis miliaris* que é dimérica quando "stripped" e tetramérica em presença de ATP, este valor representa a variação de energia livre do sistema envolvida na tetramerização (TABELA V).

TABELA V.

VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE INTRÍNSECA DO SISTEMA
DE HEMOGLOBINAS EM FUNÇÃO DO pH.

HEMOGLOBINA	$\Delta E_h/pH$	ΔG° (Kcal mol ⁻¹)
Humana		
"stripped"	- 0,050	1,15
ATP 1mM	- 0,049	1,13
 <i>Clarias sp.</i>		
"stripped"	- 0,030	0,69
ATP 1mM	- 0,030	0,69
 <i>Liophis miliaris</i>		
"stripped"	- 0,015	0,35
ATP 1mM	- 0,030	0,69

4. DISCUSSÃO

A base molecular da relação estrutura-função e os mecanismos de oxigenação que operam nas hemoglobinas de animais de respiração aérea são abordadas na presente tese. No contexto, avaliam-se as propriedades funcionais de oxigenação e oxidação, efeito Bohr e de ATP, intrínsecos à molécula. Foram estudadas a natureza da transição T \rightarrow R, e a energia livre intrínseca no sistema de união do oxigênio, das hemoglobinas tetraméricas, humana e de bagre e dimérica, de *Liophis miliaris*, considerando-se o aspecto evolutivo.

O bagre africano *Clarias sp.* de respiração aérea obrigatória, que apresenta modificações branquiais alveolares (Lewis, 1979) e respiração aquática ausente em águas oxigenadas (Maina & Maloiy, 1986), o transporte de oxigênio opera através de só um tipo de hemoglobina, de migração anódica próxima à humana, e similar ao apresentado pela espécie de Nigeria *Clarias lazera*, (Taiwo, 1995).

Hemolisados com um único componente de hemoglobina tem sido observados nos peixes primitivos *Amia calva* (Weber et al., 1976) de respiração aérea, em coelecanto *Latimeria chalumnae* (Weber et al., 1973; Bonaventura et al., 1974; Gorr et al., 1991), peixes pulmonados *Lepidosirem paradoxa* (Phelps et al., 1979) e em peixes filogeneticamente próximos *Arapaima gigas* de respiração aérea e *Osteoglossum bicirrhossum* de respiração aquática (Fhyn et al., 1979), além de ser comuns nos peixes da Antártica, onde as variações de

oxigênio e temperatura são mínimas (Di Prisco & Tamburrini, 1992). A presença de uma única hemoglobina poderia se relacionar com a origem evolutiva ou à expressão gênica nas espécies restritas a meios ambientes constantes, como seria o meio aéreo ou aquáticos específicos.

Traçar a história da duplicação gênica fica difícil devido à convergência na árvore filogenética e à homologia entre as hemoglobinas. Mas, os dados moleculares funcionais e estruturais tornam-se básicos e de grande importância na pesquisa da natureza evolutiva das globinas. A expressão gênica da hemoglobina de *Clarias sp.* de respiração aérea, com só uma cadeia de globina α e β , é de interesse para o esclarecimento da relação estrutura-função nos peixes de respiração aérea obrigatória e aérea facultativa e sua origem evolutiva.

No nosso caso, as propriedades funcionais de oxigenação e de oxidação da hemoglobina de *Clarias sp.*, mostraram alta afinidade, cooperatividade, efeito de ATP e ausência de efeito Bohr, compatíveis à forma tetramérica. Os estudos de potencial redox detectaram valores baixos de energia livre intrínseca de ligação com oxigênio, ΔG° de 2,2 Kcal mol⁻¹ na forma "stripped", menores que o da hemoglobina HbI de truta com ΔG° 3,2 Kcal mol⁻¹ (Coletta et al., 1987) e da humana 3,7 Kcal mol⁻¹. A baixa energia livre intrínseca provavelmente devida à instabilidade do estado T, pode ser consequência das ligações específicas do contato $\alpha_1\beta_2$, determinadas pela natureza dos aminoácido que participam desta região. Este fato pode estar associado à alta afinidade intrínseca da forma "stripped" com P_{50} de 4,0 torr a pH 7,0 e consequentemente à menor realização de trabalho na ligação de oxigênio.

Merece nossa atenção a ausência de efeito Bohr de oxigenação e de oxidação na hemoglobina de *Clarias sp.*, com variações de diferença de potencial por unidade de pH de 0,030 V e energia livre de 0,47 Kcal mol⁻¹, incompatíveis com a liberação de prótons associada ao efeito Bohr alcalino intrínseco. Como a hemoglobina humana tem um valor de $\Delta E_h / \text{pH}$ de 0,050 V e uma energia livre de 0,90 Kcal mol⁻¹, sugere que na hemoglobina de *Clarias sp.* a transição T→R possa ocorrer por rompimento de pontes salinas ou variações electrostáticas sem liberação de prótons Bohr.

Nos peixes, a oxigenação da hemoglobina pode ocorrer independente da liberação de prótons, devido a baixa capacidade tamponante e o reduzido número de grupos protonáveis como His, Asp, Glu, Lys ou ao grupo guanidil da Arg. No *Pterygoplichthys pardalis*, bagre Siluliforme, a ausência do efeito Bohr alcalino da HbI deve-se ao menor número de His, Glu e o aumento de Ala e Met (Bossa et al., 1982). Nestas espécies a remoção dos prótons e o transporte de CO₂ está associada ao alto efeito Haldane (Jensen, 1988; 1989), favorecida pela alta solubilidade deste gás no meio aquático.

A liberação de prótons durante a oxigenação é modificada pela presença de ânion (Fronticelli et al., 1988), que pode alterar a interação eletrostática diminuindo o pK das histidinas localizadas na superfície da molécula, conhecido como efeito Bohr de ânion (Russu et al., 1989). A regulação alostérica é mais um fenômeno de transferência energética, do que mudanças de pK (Forlani & Marini, 1993). A diminuição de 40% do efeito Bohr aparente da hemoglobina de

Clarias sp., em presença de cloreto, e ATP 1mM, pode ser devida à modificação da interação eletrostática, que resulta das neutralizações das cargas positivas da cadeia β , sem contudo ocupar um sítio específico de ligação (Perutz et al., 1993). Na presença de ATP, os valores de potencial alteram-se devido à estabilização do estado T, mas os valores energia livre associada ao efeito de prótons não são modificados. Termodinamicamente, a liberação de prótons pode ou não relacionar-se à transição T \rightarrow R, como pode ser observada neste sistema de hemoglobina.

O valor de pKa observado no equilíbrio de óxido-redução indica a ionização dos resíduos do contato $\alpha_1\beta_2$ que participam na transição T \rightarrow R. Para hemoglobina de *Clarias sp.*, com valor de pK próximo a 7,6 apesar de não apresentar efeito de prótons, difere de outros peixes que também não apresentam efeito Bohr alcalino, como a Hb I de truta (Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1973) que tem pK de transição de 9,0 devido à substituição da His₁₄₆ β \rightarrow Phe e da His₉₇ β \rightarrow Phe (Coletta et al., 1987). Na hemoglobina de *Clarias sp.* o pK de ionização sugere a participação da histidina na transição T \rightarrow R. Na presença de ATP, o pK manteve-se inalterado, de forma similar ao observado na hemoglobina humana, onde o pK dos grupos Bohr na desoxihemoglobina e oxihemoglobina não é afetado pela presença de 2,3-DPG (Antonini et al., 1982).

Nesta espécie de bagre africano, a propriedade funcional a ser destacada é a ausência de efeito Bohr alcalino entre o pH 7,0 e 8,5, existe uma rápida autooxidação em valores de pH menores que 7,0. Este também pode estar ausente em outros peixes de respiração aérea como

Arapaima gigas (Galdames-Portus et al., 1979), *Lepidosirem paradoxa* (Phelps et al., 1979) e *Clarias lazera* (Taiwo, 1995). A ausência de efeito Bohr, também se observa nos bagres de respiração aérea facultativa, no hemolisado total ou em um dos componentes, *Pterygoplichthys pardalis* (Brunori et al., 1979) *Hoplosternum littorale* (Garlick et al., 1979), *Callichthys callichthys* (Wilhelm & Weber, 1983) *Pseudodoras sp.* (Martins et al., 1979) e *Hypostomus sp.* (Weber & Wood 1979).

As hemoglobinas purificadas mostram uma grande variabilidade de propriedades funcionais, afinidade pelo oxigênio e susceptibilidade no controle metabólico, mas a modulação dos efetores ocorre por um ajuste fino baseado principalmente na afinidade do ligante heterotrópico à desoxihemoglobina ou à conformação T. Os estudos de cristalografia de raios X realizados por Arnone & Perutz (1974) mostraram que o 2-3 DPG e IHP unem-se à desoxihemoglobina entre as duas cadeias beta, nos resíduos de aminoácidos carregados positivamente em pH neutro, Val₁NA β , His₂NA β , His₁₄₃H21 β e Lys₈₂EF6 β , por interações eletrostáticas às cargas negativas dos quatro grupos fosfatos. As cadeias polipeptídicas que delimitam esta cavidade central hidrofílica, contém água unida aos resíduos polares. Na presença de oxigênio a cavidade se torna estreita e é considerada a base física da menor afinidade da oxihemoglobina pelo fosfatos orgânicos. Os valores de pK destes resíduos foram observados experimentalmente a pH fisiológico (Benesch et al., 1969) e explicam a dependência do pH na constante de ligação deste ligante.

O efeito Bohr aparente observado na presença de fosfato relaciona-se quantitativamente com a dependência do pH na constante de ligação do ligante na oxí e desoxihemoglobina (Szabo & Karplus, 1975). No modelo alostérico a união de fosfatos orgânicos depende da estrutura quaternária do tetrâmero e da estrutura terciária das cadeias beta, pelo qual o congelamento da proteína e outros fatores podem alterar a conformação entre as cadeias α e β , e impedir a união reversível de oxigênio na presença de fosfatos (Johnson & Ho, 1974).

Baldwin (1975) formulou um modelo simples no qual a união do fosfato na estrutura quaternária desoxi depende só do estado de ligação da cadeia beta. A constante de união do DPG para a hemoglobina humana em 0,1M de NaCl para a forma desoxi foi de $6,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Benesch et al., 1971). A constante de afinidade pelo ajuste dos mínimos quadrados, tem o valor de $P_{\text{desoxi}} = 8,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e de $P_{\text{oxi}} = 330 \text{ M}^{-1}$, a qual indica a união do DPG à oxihemoglobina com uma afinidade 200 vezes menor (Szabo & Karplus, 1972). A constante de união do ATP à hemoglobina de *Clarias sp.* determinada pelo ajuste dos mínimos quadrados com valor de K_d para a desoxihemoglobina foi de $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e para a oxihemoglobina de $43,8 \text{ M}^{-1}$ pH 7,6, menor que da hemoglobina humana. Sugerindo uma substituição que favorece a união deste ligante, por interações eletrostáticas ou forças de van der Waals, no sítio de ligação de fosfatos orgânicos.

A ausência de efeito Bohr alcalino e a alta afinidade intrínseca da hemoglobina de *Clarias sp.*, favorecem a rápida oxigenação do sangue. Por outro lado, a alta afinidade pelo ATP facilitaria a liberação de

oxigênio em acidoses e promoveriam vantagens para resistir a longos períodos de anoxia.

Os estudos das propriedades estruturais da seqüência de aminoácidos da hemoglobina de *Clarias sp.*, permitiriam esclarecer as bases moleculares das propriedades funcionais, alta afinidade pelo oxigênio, baixa energia livre de estabilização do tetrâmero, ausência de efeito Bohr alcalino, e transição T→R, com pK próximo a 7,5.

As teorias clássicas da regulação alostérica descritas pelos modelos de MWC (1965) e KNF (1965), incluem o conceito de estrutura ajustada ou predefinida, nas quais a mudança conformacional após a união do ligante se faz por um processo de "tudo ou nada" ou seqüencial. Os trabalhos de Perutz (1970) de cristalografia de Raios X, mostraram que a forma conformacional desoxi de baixa afinidade pelo oxigênio é alcançada pelo tetrâmero, mas a dissociação relaciona-se com a ruptura das pontes salinas existentes entre os dois dímeros originando a forma desoxi de alta afinidade.

Através das determinações do equilíbrio de óxido-redução de *Liophis miliaris* na forma "stripped" nos intervalos de pH entre 7,2 a 8,5 não foi observada a transição T → R, mostrando a natureza dimérica tanto na forma desoxigenada como na oxigenada, compatível com as substituições do contato $\alpha_1\beta_2$, Glu₁₀₁ β → Val e Glu₄₃ β → Thr que promovem a dissociação da molécula (Matsuura et al., 1989). Na presença de ATP, esta tornou-se alostérica e tetramérica, com uma energia livre de tetramerização próxima a 0,4 Kcal mol⁻¹.

Na hemoglobina humana a curva potenciométrica de pH das subunidades isoladas são diferentes, isto é o sistema de óxido-redução da cadeia α tem um valor de $E_h = 0,052$ V invariável entre pH 6,0 e 8,0, similar à da mioglobina. No entanto, a cadeia β tem valores de $E_h = 0,113$ V que permanecem invariáveis entre pH 6,0 e 6,6. Em valores acima de pH 6,6 os valores diminuem em função do pH, observando-se o ponto de inflexão com pK de ionização próximo a 7,0 (Perutz, 1974).

O potencial redox da hemoglobina de *Liophis miliaris* na forma "stripped" apresentou valores de ΔE_h 0,066 V e variações de 0,020 V em função do pH. A ausência de transição T→R, demonstrou comportamento semelhante à mioglobina, no qual a mudança conformacional é originada da estrutura terciária da cadeia beta da globina próxima ao grupo heme, que é geralmente referido como efeito Bohr residual (Brunori et al., 1967). Presente em diferentes hemoglobinas e mioglobinas, com uma magnitude de 0,020 a 0,030 V, independente do efeito Bohr alcalino e da transição ácida-alcalina. O resíduo responsável por este efeito localiza-se na cadeia beta, com pK de 7,0 a 8,0 e tem-se sugerido que seja a His₉₇ da região FG3 próxima e paralela ao heme (Brunori et al., 1969). Na hemoglobina de *Liophis miliaris* a mudança conformacional que acompanha à transição dímero-tetrâmero com baixos valores de energia livre intrínseca, observa-se que a forma R descrita para a estrutura quaternária na hemoglobina humana seria equivalente à conformação terciária dimérica desta molécula, devido à total dissociação em dímeros no estado oxigenado.

O pK de transição da reação de óxido-redução da hemoglobina de *Liophis miliaris* na presença de ATP é próximo de 7,5, valor diferente do efeito Bohr alcalino, (pKa de 6,8) e da transição ácida-alcalina ligada à ionização da água na ferrihemoglobina (pKa > 8,0). Sugere-se que na transição tetrâmero-dímero haja uma mudança de ionização de uma histidina, devido ao valor de pK deste aminoácido em pH fisiológico. O resíduo poderia ser a His₉₇ dado que participa diretamente da região considerada como “switch” entre os dois dímeros (Arata, 1995) e que apresenta-se na hemoglobina humana com pK 7,8, diferente das histidinas de superfície, com pK 6,6 (Perutz et al., 1985), ou outra histidina que modifique seu valor de pK devido às modificações das interações eletrostáticas responsáveis pela transição quaternária.

Na forma desoxigenada da hemoglobina humana, a His₉₇β forma ponte de hidrogênio com a Thr₄₁α e Pro₄₄α, este último ausente na *Liophis miliaris* devido à substituição de Pro₄₄α → Ser (Matsuura et al., 1989). Mutantes da hemoglobina humana nesta posição Pro₄₄α → Leu (Honig et al., 1980) ou Pro₄₄α → Arg (Harano et al., 1982), caracterizam-se como variantes de alta afinidade pelo oxigênio, devido ao desaparecimento do obstáculo estérico do anel rígido da prolina.

A transição T e R da hemoglobina humana tem sido descrita como uma série de deslocamentos e mudanças de ligações, que ocorrem diferentemente para as cadeias α e β. Nas cadeias beta a Tyr₁₄₅H23β e Tyr₁₄₀H23α saem da cavidade do heme, rompendo os enlaces C-terminais dos grupos Bohr, onde o imidazol da His₁₄₆β forma enlace com

o agrupamento NH da mesma cadeia e o COO-His₁₄₆β com a Lys₁₄₄β, mudando a reatividade da Cys₉₃β, localizado próximo ao heme na estrutura R. Na estrutura T desaparece o impedimento da Val₆₇βE11. Na estrutura R das cadeias α, há um deslocamento da Leu₉₁FG3α e Val₉₃FG5α do contato α₁β₂. Na estrutura T formam-se interações entre o NH⁺ da Val₁α com OH da Ser₁₃₁α₁; Arg₁₄₁α₂ com NH da Lys₁₂₇α₁, e o NH₃⁺ da Arg₁₄₁α₂ com Asp₁₂₆α₁. Porém, devido à forma dimérica da hemoglobina de *Liophis miliaris*, tanto na forma oxigenada quanto na forma desoxigenada, ocorreriam mudanças só da estrutura terciária, sem rompimentos de enlaces intersubunidades.

Os aminoácidos do contato α₁β₂ assinalados como responsáveis pela estabilização do tetrâmero no estado T da hemoglobina humana são Tyr₄₂α₁ com Asp₉₉β₂ e Tyr₁₄₅β com Val₉₈β. A substituição destes aminoácidos originam hemoglobinas de alta afinidade, ausência de cooperatividade e a dissociação em dímeros. Assim, os resíduos Tyr₄₂α e Tyr₁₄₅ podem ser fundamentais na estabilização da estrutura T, transição alostérica e cooperatividade, pela participação direta na dissociação de subunidades e na instabilidade da estrutura T (Ishimori et al., 1994), conforme demonstrados pelos mutantes naturais com alterações nestas posições que exibem estas características; a Hb Kemsey Asp₉₉ (G1)β → Asn, Hb Yakina Asp₉₉ → His, (Reed, et al., 1968; Jones et al., 1967). Na posição 145β a Hb Oslar Tyr₁₄₅β → Asp (Charache et al., 1975), Hb Bethesda Tyr₁₄₅β → His, Hb Ranvier Tyr₁₄₅β → Cys (Hayashim &

Stamatoyannopoulos, 1971) e Des (His₁₄₆ β , Tyr₁₄₅ β) (Bonaventura et al., 1972).

Mutantes preparados por engenharia genética, substituindo a Tyr₄₂ α por Phe₄₂ α ou His₄₂ α , mostram instabilidade do estado T, devida à ausência de enlace hidrogênio entre Tyr₄₂ α e Asp₉₉ β , fundamentais na cooperatividade (Imai et al., 1991; Ishimori et al., 1992). No mutante natural Tyr₁₄₅ β \rightarrow Phe, não há formação do enlace de hidrogênio, entre a Tyr₁₄₅ β e o grupo carbonil da Val₉₈ β , o que reduz a mobilidade do grupo C-terminal da cadeia beta, a presença da fenilalanina, especificamente o anel benzênico, facilita a mobilidade e clivagem deste enlace e a instabilidade da estrutura T (Togi et al., 1993).

A alta afinidade da hemoglobina de *Liophis miliaris* pelo oxigênio e ausência de cooperatividade não seria explicada pela mudança do equilíbrio alostérico entre as duas formas quaternárias T e R, como se observa nos mutantes que alteram o contato $\alpha_1\beta_2$ da hemoglobina humana, que favorecem a dissociação do tetrâmero. Isto pode ser explicado pela completa dissociação devido ao rompimento de todas as interações presentes no contato $\alpha_1\beta_2$, o qual origina dímeros com baixa energia livre intrínseca, na forma "stripped", e na presença de ATP em valores de pH acima de 8,0.

Ao analisar os aminoácidos do contato $\alpha_1\beta_2$ que estabilizam a estrutura T na hemoglobina humana, estes também estão presentes na seqüência de aminoácidos da hemoglobina de *Liophis miliaris* (Matsuura et al., 1989), no entanto devido à completa dissociação da forma dimérica

da oxi e desoxi, não participariam na estabilização do dímero. A estabilidade de T e R associa-se com a área de contato entre $\alpha_1\beta_2$ (Cothia et al., 1976) e à presença de várias pontes salinas (Perutz, 1982).

A baixa energia livre intrínseca da hemoglobina de *Liophis miliaris* no estado T de $1,9 \text{ Kcal mol}^{-1}$ em relação à hemoglobina humana com $4,3 \text{ Kcal mol}^{-1}$, demonstra a instabilidade da forma tetramérica, que poderia ser explicada pela diminuição do número de contatos $\alpha_1\beta_2$ devido à menor polaridade da cadeia beta pela substituições $\text{Glu}_{101} \rightarrow \text{Val}$, $\text{Glu}_{43} \rightarrow \text{Thr}$ ou Ser , $\text{Val}_{34} \rightarrow \text{Ileu}$ e ácido aspártico na posição 47 pela aspargina (Matsuura et al., 1989).

Os resíduos que contribuem principalmente com o efeito Bohr alcalino na hemoglobina humana são: $\text{Asp}\beta_{94}$ e $\text{His}\beta_{146}$, que também estão presentes na *Liophis miliaris*, mas devido à baixa energia livre intrínseca, ausência de liberação de prótons Bohr e à diferença do valor de pK observado, não estariam contribuindo energeticamente na transição $T \leftrightarrow R$, na presença de ATP. O efeito Bohr aparente observado em pH fisiológico nesta hemoglobina (Oyama et al., 1993) e em outras hemoglobinas de serpentes (Pough, 1980), pode ser devido à transição da estrutura quaternária na presença do ATP eritrocitário e dependência do pH na união deste ligante. Nos répteis a sensibilidade da hemoglobina a prótons provocaria uma inadequada oxigenação na circulação pulmonar (Sode, 1991).

Em termos dos modelos clássicos ajustado e seqüencial, a hemoglobina humana tetramérica exhibe ambos os mecanismos na geração

da cooperatividade controlada pelo código de simetria (Ackers & Hazzard, 1993). A configuração isômera da estrutura R transfere-se através de seis ou mais contatos. A afinidade de união da hemoglobina é regulada através de um código hierárquico de acoplamento da estrutura terciária-quaternária que inclui os dois modelos clássicos delimitando o processo (Ackers et al., 1992).

Na introspeção da natureza estrutural da cooperatividade realizada por estudos de ressonância magnética nuclear, encontrou-se que a mudança da estrutura terciária e quaternária se alteram durante o curso da oxigenação o qual seria inconsistente com o mecanismo de dois estados, propondo-se a participação de vários aminoácidos na comunicação seqüencial.

No equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina humana, observa-se que a interação heme-heme é dependente do pH, o valor do coeficiente de interação "n" muda de 1,0 em pH 6,0 a 2,0 em pH 8,0 (Antonini et al., 1964, Brunori et al., 1969), consistentes com o modelo, onde o dímero $\alpha\beta$ seria a unidade funcional (Antonini, 1967). Através das técnicas de "stopped-flow" (Antonini et al., 1965) e de cristalografia da aquometahemoglobina do átomo de ferro, verificou-se que existe uma heterogeneidade funcional entre as cadeias α e β ; a velocidade de oxidação da cadeia β é maior que da cadeia α (Edelstein & Gibson, 1975; Ladner et al., 1977). No modelo de dois estados, a transição T \rightarrow R requer que a estrutura terciária esteja previamente ajustada, mas estudos com intermediários isolados das reações de oxido-redução da desoxihemoglobina humana, mostram que as mudanças da estrutura

terciária nas reações de oxidação da desoxihemoglobina humana contribuiriam na cooperatividade, devido à diferente reatividade relativa das subunidades α e β originada pelos diferentes movimentos do átomo de ferro em relação ao plano do heme (Liddington et al., 1988; Perrella et al., 1993).

A alta afinidade da forma R pelo oxigênio associa-se com mais de uma posição da His₈₇F8 em relação ao plano do heme das cadeias α e β . Há uma mudança de ambiente no sítio de união do heme da cadeia β , da posição relativa da hélice F e da E ao heme da cadeia β e de empacotamento entre os dímeros. Conseqüentemente, a maior contribuição da cooperatividade surge com a mudança quaternária, mas as estrutura terciária e quaternária estão acopladas através das posições relativa das regiões FG.

A ausência da transição T→R observada na oxidação de desoxihemoglobina da *Liophis miliaris* na forma "stripped" e a tetramerização e transição T→R na presença de ATP com pK próximo a 7,5 indicam uma mudança de ionização da histidina no contato $\alpha_1\beta_2$. Isto sugere que no sistema dímero-tetrâmero da hemoglobina de *Liophis miliaris* a cadeia beta dos dímeros poderia contribuir com a ionização que acompanha a cooperatividade na transição da estrutura quaternária da forma tetramérica através da mudança de pK da His₉₇, His₈₇, da His₁₄₃ ou outra histidina diferente destas.

A cooperatividade é um conceito energético identificado pela mudança de energia livre durante a oxigenação. Na hemoglobina humana

observa-se uma diferença de energia de ligação entre o primeiro e o último oxigênio de 3 a 4 Kcal (Chu et al., 1982).

Sabe-se que nas mudanças estruturais que acompanham a união do ligante e dissociação do tetrâmero estão envolvidas vários tipos de interações, que podem simultaneamente estar contribuindo energeticamente neste processo. Entre estas podem-se incluir as alterações produzidas pelos contatos de van der Waals, enlaces de hidrogênio, pontes salinas, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (Mathew et al., 1982), sendo difícil de discernir quais são as que contribuem significativamente com o efeito energético. Através da análise cristalográfica têm sido identificadas numerosas pontes salinas que são abolidas durante a oxigenação, envolvendo aminoácidos do contato $\alpha 1\beta 2$ e intracadeias, mas considerando a relação energética da dissociação dímero-tetrâmero, são quebradas pontes salinas que envolvem grupos com pK próximo de 7,0. Na hemoglobina humana a liberação dos prótons Bohr tem uma importante contribuição energética na energia livre de cooperatividade (Kilmartin et al., 1978; Ackers, 1980).

Comumente usam-se para indicar a cooperatividade a variação da energia de interação de Wyman que indica a diferença de energia livre entre a união do primeiro e último ligante. O ΔG° de interação cooperativa de união do ligante na hemoglobina humana obtida pelo método de óxido-redução de $3,69 \text{ Kcal mol}^{-1}$ descreve a variação total de energia livre intrínseca do sistema na união cooperativa do ligante.

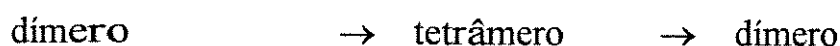
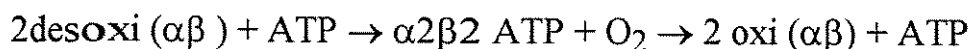
No sistema de hemoglobina de *Clarias sp.* e *Liophis miliaris*, na presença de ATP, o ΔG° próximo de $2,0 \text{ Kcal mol}^{-1}$ não se associaria à liberação de prótons, pelo qual a transição T→R ocorreria por mudanças de interações eletrostáticas, fator considerado importante na união de subunidades e na cooperatividade (Bunn & Mc. Donald, 1983). O valor de energia livre obtido para estas hemoglobinas foi semelhante à contribuição energética de origem electrostática teórica sugerida por Warshel & Weis (1981) para a hemoglobina humana.

Ao analisar a variação de energia livre da interação heme-heme associada à liberação de prótons no equilíbrio de óxido-redução na hemoglobina humana, observa-se um valor próximo a $1,0 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Na hemoglobina de *Clarias sp.* na forma "stripped" e na presença de ATP, o ΔG° de transição quaternária independente do efeito Bohr alcalino tem um valor próximo de $0,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$, descontando o valor de $0,2 \text{ Kcal mol}^{-1}$ devido ao efeito residual de óxido-redução.

Na hemoglobina de *Liophis miliaris* o valor de ΔG° de $0,4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ da transição quaternária é intrínseco à interação cooperativa e semelhante ao valor de energia livre de estabilização do tetrâmero produzido pelo ATP. No mecanismo de transição dímero-tetrâmero de oxigenação em *Liophis miliaris* foram sugeridas duas formas alternativas possíveis (Matsuura et al., 1987; Focesi Jr. et al., 1990), incluindo uma delas estados intermediários R e T na forma oxigenada e desoxigenada. Mas a ausência de transição T ↔ R no equilíbrio de oxidação, e a baixa energia livre intrínseca da molécula dimérica na forma desoxigenada e

oxigenada, e a tetramerização só na presença de ATP, no mecanismo dímero-tetrâmero exclui a forma intermediária no estado T.

Este p pode ser esquematizado da seguinte forma:



A análise termodinâmica relativa à hemoglobina de *Liophis miliaris* na forma "stripped", mostrou valores mínimos de energia livre necessários na união do ligante, compatíveis com a forma dimérica e a alta afinidade intrínseca ao oxigênio, e conseqüentes com o aumento de energia livre na tetramerização pela presença de ATP, que estabiliza o estado T, diminui a entropia da molécula e possibilita a regulação alostérica. Propondo-se que o mecanismo de transição dímero-tetrâmero envolve a ausência da transição $T \leftrightarrow R$ na forma oxigenada da hemoglobina "stripped", na qual só ocorreriam mudanças conformacionais locais no heme após a oxigenação, excluem-se a forma intermediária de tetrâmero desoxigenado no estado T na ausência de ATP. Na presença de fosfatos há mudança significativas de energia livre intrínseca promovida pela ligação de dois dímeros por interações electrostáticas, observando-se uma dependência do pH na união do ligante e uma reversibilidade para a forma dimérica em pH acima de 8,0, pelo qual seriam os principais moduladores da regulação alostérica na união de oxigênio nesta hemoglobina.

A baixa energia livre intrínseca observada na forma tetramérica, em presença de ATP, da hemoglobina de *Liophis miliaris* deve-se, provavelmente, às substituições dos resíduos de aminoácidos considerados como responsáveis pela interação heme-heme localizados no contato $\alpha_1\beta_2$. Este fenômeno sugere que a estabilização do tetrâmero envolve um menor número de contatos, o que promoveria uma total dissociação da proteína tetramérica em dimérica quando oxigenada. Entretanto, na forma "stripped", ou seja na ausência de fosfatos orgânicos, mesmo na forma de desoxihemoglobina, a interface $\alpha_1\beta_2$ está ausente, desde que a proteína se mantém na forma dimérica. Essa interface é restituída só pela adição de ATP, que atua como uma cunha que se encrava no "cluster" interfacial que une os dímeros, através de interações eletrostáticas tornando a molécula alostérica.

Desta forma, no modelo dímero-tetrâmero de *Liophis miliaris* não se incluem as formas tetraméricas intermediárias, devido à ausência da transição alostérica observada no sistema de óxido-redução da desoxihemoglobina na forma "stripped". A transição dímero-tetrâmero, na presença de ATP, com pK próximo de 7,5, sugere a mudança de ionização de resíduos de histidina localizados no contato $\alpha_1\beta_2$ ou próxima a esta. O efeito eletrostático nesta molécula tem uma função relevante no equilíbrio entre estas duas formas alternativas regulando a união cooperativa do oxigênio.

Por outro lado, as propriedades funcionais, estruturais e termodinâmicas dessas hemoglobinas, tais como a alta afinidade pelo O_2 , ausência de efeito Bohr e baixa energia livre intrínsecas, revelam que as

baixas pressões de oxigênio do meio ambiente originaram a expressão destas hemoglobinas, características altamente conservadas nos descendentes dos ancestrais dos primeiros vertebrados de respiração aérea, considerados próximos aos tetrápodos.

Nesta tese procuramos além de explicar termodinamicamente as propriedades funcionais de hemoglobinas de animais de respiração aérea evolutivamente distantes, com diferenças significativas de afinidade pelo oxigênio, efeito Bohr e energia livre de interação, também sugerir suporte termodinâmico ao mecanismo de transição dímero \leftrightarrow tetrâmero, presente nas hemoglobinas de várias serpentes durante o transporte de oxigênio. Embora o mecanismo tenha sido demonstrado por análises funcionais e estruturais, na hemoglobina de *Liophis miliaris*, permanecia a incerteza para alguns pesquisadores ao observar-se o efeito Bohr alcalino aparente nas amostras de hemoglobinas congeladas. Acreditamos que os valores de potencial de óxido-redução e os dados termodinâmicos contribuíram decisivamente na elucidação do modelo de transição dímero-tetrâmero.

CONCLUSÕES

O transporte de oxigênio pela hemoglobina do bagre, de respiração aérea, *Clarias sp.*, opera através de uma molécula tetramérica de alta afinidade e de baixa energia livre intrínseca de ligação com o gás, observando-se também ausência de efeito Bohr intrínseco e modulação alostérica heterotrópica de fosfatos dependente do pH.

A transição T→R do equilíbrio de óxido-redução da hemoglobina de *Clarias sp.* apresenta um valor de pKa de 7,6, provavelmente devido à ionização de uma histidina da cadeia beta, diferente da histidina do grupo Bohr, a His₁₄₆.

A baixa energia intrínseca da hemoglobina desse peixe deve provavelmente, estar associada ao menor número de ligações e /ou à substituições no contato $\alpha_1\beta_2$, responsável pela estabilidade do tetrâmero.

Com relação à hemoglobina de *Liophis miliaris*, observa-se uma completa dissociação da molécula na forma "stripped", com rompimento de todas as interações do contato $\alpha_1\beta_2$, tanto na forma oxigenada quanto desoxigenada.

Por outro lado os experimentos de equilíbrio de óxido-redução em presença de ATP mostraram uma transição T→R com pK de 7,6 compatível com a tetramerização da molécula.

As variações de energia livre de interação heme-heme mantiveram-se constantes com a variação de pH, sugerindo que a transição T→R da hemoglobina de *Liophis miliaris* na presença de ATP, origina-se por mudanças de interações eletrostáticas, independentes do efeito Bohr.

O mecanismo dímero-tetrâmero descrito para hemoglobina de *Liophis miliaris*, ajusta-se ao modelo de 2 estados de MWC apenas na presença de ATP, e envolve a ionização de uma histidina, provavelmente do contato $\alpha_1\beta_2$.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERS G. K. (1980) Energetics of subunit assembly and ligand in human hemoglobin. *Biophys J.* **32**: 331-343.
- ACKERS G. K., DOYLE M., MYERS D. & DAUGHERTY M. (1992) Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* **255**: 54-56.
- ACKERS G. K. & HAZZARD J. H. (1993) Transduction of binding energy in to hemoglobin cooperativity. *TIBS* **18**: 385-390.
- ADAIR G. S. (1925) The hemoglobins system. IV. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **63**: 529-538.
- ALTER B. P., GOFF S. C., EFREMOV G. D., GRAVELY M. E. & HUISMAN T. H. J. (1980) Globin chain electrophoresis a new approach to the determination of the G γ / A γ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Br. J. Haematol.* **44**: 527-534.
- ANDERSON M. E. & GIBSON Q. H. (1971) A kinetics analysis of the binding of oxygen and carbon monoxide to lamprey hemoglobin *Petromyzon marinus* and *Petromyzon fluvitalis*. *J. Biol. Chem.* **246**: 4790-4799.
- ANTONINI E. (1965) Interrelationship between structure and function in human hemoglobin and myoglobin. *Physiol. Rev.* **45**: 123-125.

ANTONINI E. (1967) Hemoglobin and its reaction with ligands. Science 158: 1417-1425.

ANTONINI E. & BRUNORI M. (1970) Hemoglobin. Ann. Rev. Biochem. 39: 977-1042.

ANTONINI E. & BRUNORI M. (1971) Models and theories of ligand binding in hemoglobin pp.381-415 In: Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands. North- Holland, Amsterdam.

ANTONINI E. & BRUNORI M. (1975) Hemoglobin and Methemoglobin. pp. 753-797 In: The Red Blood Cell Vol. II Chapter 17, 2nd. Edition Academic Press, Inc.

ANTONINI E., CONDÓ S. G., GIARDINA B., IOPPOLO C. & BERTOLINI A. (1982) The effect of pH and D-glycerate-2,3-biphosphate on the O₂ equilibrium of normal and SH (β 93) modified human hemoglobin. Eur. J. Biochem. 121: 325-328.

ANTONINI E., WYMAN J. BELLELLI L., RUMEN N. & SINISCALCO (1964a) The oxygen equilibrium of some lampreys hemoglobins. Arch. Biochem. Biophys. 105: 404-407.

ANTONINI E., WYMAN J., BRUNORI M., TAYLOR J. F., ROSSI-FANELLI A. & CAPUTO A. (1964b) Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J. Biol. Chem. 239: 907-912.

- ARATA Y. (1995)* Effect of the tertiary structure alteration by ligation on the interface contacts between subunits of hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**: 24-34.
- ARNONE A. (1972)* X- ray diffraction study of binding sites for heterotropic effectors in fish hemoglobins. *Nature* **293**: 587-588.
- ARNONE A. & PERUTZ M. F. (1974)*. Structure of inositol hexaphosphate human deoxyhaemoglobin complex. *Nature* **249**: 34-36.
- BALDWIN J. (1975)* Structure and function of Hemoglobin. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **29**: 225-320.
- BALDWIN J. (1980)* Structure and cooperativity of haemoglobin. *TIBS* **5(8)**: 224-228.
- BALDWIN J. & CHOTHIA C. (1979)* Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanisms. *J. Mol. Biol.* **129**: 175-220.
- BNERJEE R. & CASSOLY R. J. (1969)* Preparation and properties of the isolated α and β chains of human hemoglobin in the ferric state. Investigation of oxidation reduction equilibria. *J. Mol. Biol.* **42**: 337-349.

BENESCH R. E. & BENESCH R. (1981) Preparation and properties of hemoglobin modified with derivatives of pyridoxal. In *Methods of Enzymology*. Vol. 76 pp. 147-159.

BENESCH R. E., BENESCH R., RENTHAL R. & GRATZER W. B. (1971) Cofactor binding and O₂ equilibria in hemoglobin. *Nature New Biol.* **234**: 174-176.

BENESCH R. E., BENESCH R. & YU C. I. (1969) The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2-3 diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength and hemoglobin concentration. *Biochemistry* **8**: 2567-2571.

BLAKE C. (1983) Exons and the evolution of proteins. *TIBS* **83**: 11-13.

BOHR C., HASSELBALCH K., KROG A. & KAND S. (1904) Veber einen in biologischer beziehung wichtigen einfluss den die Kohlensan respannung dessen satterstott binding iibt. *Skand. Arch. Physiol.* **16**: 402.

BONAVENTURA J., BONAVENTURA C., GIARDINA B., ANTONINI E., BRUNORI M. & WYMAN J. (1972) Partial restoration of normal functional properties in carboxy peptidase A digested hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2174-2178.

BONAVENTURA J., GILLEN R. G. & RIGGS A. (1974) The hemoglobin of the Crossopterygian fish, *Latimeria chalumnae* (Smith). *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 728-734.

BOSSA F., SAVI M. R., BARRA D. & BRUNORI M. (1982) Structural comparison of the hemoglobin components of the armoured catfish *Pterygoplichthys pardalis*. *Biochem J.* **205**: 39-42.

BRIEHL R. (1963) The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **238**: 2361-2666.

BRUNORI M., BONAVENTURAJ., FOCESI Jr. A., GALDAMES PORTUS M. I. & WILSON M. T. (1979) Separation and characterization of the hemoglobin components of *Pterygoplichthys pardalis*, acari bodó. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**: 173-178.

BRUNORI M., NOBLE R. W. ANTONINI E. & WYMAN J. (1966) The reactions of the isolated α and β chains of human hemoglobins with oxygen and carbon monoxide. *J. Biol. Chem.* **241**: 5238-5243.

BRUNORI M., TAYLOR J., ANTONINI E., WYMAN J. & ROSSI-FANELLI A. (1967) Studies on the Oxidation-Reduction Potentials of Heme Proteins Human Hemoglobins treated with various Sulfhydryl Reagents. *J. Biol. Chem.* **242**: 2295-2300.

BRUNORI M., TAYLOR J., ANTONINI E. & WYMAN J. (1969) Oxidation-reduction of human hemoglobin in concentrated sodium chloride solutions consistency with the ($\alpha\beta$) dimer model. *Biochemistry.* **8**: 2880-2883.

- BRUNORI M., WYMAN J., ANTONINI E. & ROSSI-FANELLI A. (1965)* Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. V. The oxidation Bohr effects in normal human hemoglobin digested with carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **240**: 3317-3323.
- BUNN F. & Mc DONALD J. (1983)* Electrostatic interactions in the assembly of haemoglobin. *Nature* **306**: 498-500.
- CAUGHEY W. S. (1967)* Porphyrin Proteins and Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **36**: 621-644.
- CHARACHE S., BRIMHALL B. & JONES R. T. (1975)* Polycythemia produced by hemoglobin Osler (β 145 (HC2) Tyr \rightarrow Asp: high affinity hemoglobin. *Johns Hopkins Med. J.* **136**: 132-136.
- CHOTHIA C., WODEK S. & JANIN J. (1976)* Role of subunit interfaces in the allosteric mechanism of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3793-3797.
- CHU A. H., PETTIGRE D. W., TURNER B. W. & ACKERS G. K. (1982)* Stability of the $\alpha_1\beta_2$ contact in Oxy and Deoxy human hemoglobins. II Origins of Cooperative binding by Hemoglobin. In: *Hemoglobin and Oxygen Binding*. C. Ho (ed.), pp. 243-248 New York: Elsevier.
- CLARK W. M. (1960)* Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems. Williams & Williams Baltimore.

COLLETA M., SANTUCCI R., FOCESI Jr. A., ASCOLI F. & BRUNORI M. (1987) Redox properties of components I and IV of trout hemoglobins: kinetics and potentiometric studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **915**: 415-419.

CONANT J. B. & PAPPENHAINER A. M. (1932) A redetermination of the oxidation potential of the hemoglobin methemoglobin system. *J. Biol. Chem.* **98**: 57-62

CORYELL C. D. J. (1939) The existence of chemical interactions between the hemes in ferrihemoglobin (methemoglobin) and the role of Ferro-ferrihemoglobin electrode potential measurements. *Phys. Chem.* **48**: 841-852.

DI PRISCO G., & TAMBURRINI M. (1992) The hemoglobins of marine and freshwater fish: The search for correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**: 661-671.

DOUGLAS C. G., HALDANE J. S., & HALDANE J. B. S. (1912) Models and Theories of ligand binding in hemoglobin pp. 381-415 In: "Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands". North-Holland, Amsterdam.

EATON W. A. (1980) The relationship between coding sequences and function in haemoglobin. *Nature.* **284**: 183-185.

- ELDESTSTEIN S. J. & GIBSON Q. H. (1975)* The effect of functional differences in the α and β chains on the cooperativity of the oxidation-reduction reaction of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **250**: 961-965.
- ELDESTSTEIN S. J., REHMAR M. J., OLSON J. S. & GIBSON Q. H. (1970)* Functional aspect of the subunit association-dissociation equilibria of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **245**: 4372-4381.
- FERMI G., PERUTZ M. F. SHAANAN, B. & FOURNE M. (1984)* The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **175**: 159-174.
- FOCESI Jr A., BONILLA G. O., NAGATOMO C. L & MATSUURA M. S. A. (1990)* Dimer-Tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*. II Evidence with the stripped protein. *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**: 119-122.
- FOCESI Jr A., BONILLA G. O., NAGATOMO C. L & MATSUURA M. S. A. (1992)* Dimer-Tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*. III The phenomenon in snake species of different evolutionary levels. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**: 985-989.
- FORLANI L. & MARINI M. A. (1993)* Cooperative hydrogen ligand binding inducing the Bohr effect in human hemoglobin. A general Methodology. *Cell. Molec. Biol.* **39**:21-34.
- FRONTICELLI C., BUCCI E. & RAZYNSKA A. (1988)* Modulation of oxygen affinity in hemoglobin by solvent components. Interaction of

bovine hemoglobin with 2-3 diphosphoglycerate and non atomic anions.. J. Mol. Biol. **202**: 343-348.

FYHN U. E. H., FYHN H. J., DAVIS D. J., FINK W. L. & GARLICK R. L. (1979) Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. Comp. Biochem. Physiol. **62**: 3-66.

GALDAMES PORTUS, M. I., NOBLE R. W., FARMER M., POWERS D. A, RIGGS A., BRUNORI M., FYHN H. J. & FYHN U. E. H. (1979) Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* and *Arapaima gigas*. Comp. Biochem. Physiol. **62A**: 145-154.

GARLICK R. L., BUNN H. F., FYHN H. J. & FYHN U. E. H., MARTIN J. P., NOBLE R. W & POWERS D. A. (1979) Functional studies on the separated hemoglobin components of an air-breathing catfish *Hoplosternum littorale* (Hancock). Comp. Biochem. Physiol. **62A**: 219-226.

GELIN B. R., LEE A. W. M. & KARPLUS M. (1983) Hemoglobin tertiary structural change on ligand binding. Its role in the cooperative mechanism. J. Mol. Biol. **171**: 489-559.

GIBSON Q. H. (1959) The photochemical formation of a quickly reacting form of hemoglobin. Biochem. J. **71**: 293-303.

GORR T., KLEINSCHMIDT T. & SGOUROS J. G. (1991) A "Living Fossil" sequence: Primary structure of the Coelacanth (*Latimeria-*

chalumnae) hemoglobin evolutionary and functional aspects. Biol. Chem. Hopper-Seyler. **372**: 599-612.

GUIDOTTI G. (1967) Studies on the chemistry of hemoglobin. J. Biol. Chem. **242**: 3704-3712.

HARANO T., HARANO K., UEDA S., SHIBATA S., IMAI K., OHBA Y., SHINOBARA T., HORIO S., NISHIOKA K. & SHIROTANI H. (1982) Hemoglobin Kawachi [α_{44} (CE2)Pro \rightarrow Arg]: A new hemoglobin variant of high oxygen affinity with amino acid substitution at $\alpha_1\beta_2$ contact. Hemoglobin. **6**: 43-49.

HASHIMOTO M., ISHIMORI K., IMAI K., MIYASAKI G., MORIMOTO H., WADA Y. & MORISHIMA I. (1993) Site-directed mutagenesis in hemoglobin: Functional and structural study of the intersubunit hydrogen bond of threonine 38(C3) α at the $\alpha_1\beta_2$ interface in human hemoglobin. Biochemistry. **32**: 13688-13695.

HAVEMANN R. & Wolff K. (1937) Redox system methaemoglobin-hemoglobin. Biochem. J. **293**: 399-404.

HAYASHIM A., STAMATOYANNOPOULUS G., YOSHIDA A. & ADAMSON J. (1972) Hemoglobin Rainier: β_{145} (HC2)Tyr \rightarrow Cys and hemoglobin Bethesda: β_{145} (HC2)Tyr \rightarrow His. Nature New Biol. **230**: 264-267.

- HEWITT J. A., KILMARTIN J. V., TENEYCK L. F. & PERUTZ M. F. (1972) Noncooperativity of the alpha-beta dimer in the reaction of hemoglobin with oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**:203-207.
- HILL A. V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**: 49.
- HO C. & RUSSU I. (1987) How much do we know about the Bohr effect of hemoglobin. *Biochemistry.* **26**: 6299-6304.
- HONING G. R., VIDA L. N., SHAMSUDDIN M., MASON R. G., SCHLUMPF H. W. & LUKE R. A. (1980) Hemoglobin Milledgeville (α 44CD2) Pro Leu a new variant with increased oxygen affinity. *Biochim. Biophys. Acta.* **626**: 424-431.
- HUFNER G. (1903) Models and Theories of ligand binding in hemoglobin pp 381. In: "Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands". North- Holland, Amsterdam.
- IMAI K., FUSHITANNI K., MIKASAKI G., ISHIMORIK., KITAGAWA T., MORIMOTO Y., MORISHIMA H., SHID D. & TAME J. (1991) Site directed mutagenesis in haemoglobin functional role of Tyr42 (C7) α at the $\alpha_1\beta_2$ interface. *J. Mol. Biol.* **218**: 769-778.
- IMAI K., & YONETANI T. (1975) Thermodynamical studies of oxygen equilibrium of hemoglobin. Nonuniform heats and entropy change for

the individual oxygenation steps and enthalpy-entropy compensation. *J. Biol. Chem.* **250**: 7093-7098.

ISHIMORI K., IMAI K., MIYASAKI G., KITAGAWA T., WADA Y., MORIMOTO H., & MORISHIMA I. (1992) Site-directed mutagenesis in hemoglobin: functional and structural role of inter and intrasubunit hydrogen bonds as studied with 37 β and 145 β mutations. Biochemistry **31**: 3256-3264.

ISHIMORI K., HASHIMOTO, H. IMAI K., FUSHITANI K., MIYASAKI G., MORIMOTO H., WADA Y., & MORISHIMA I. (1994) Site-directed mutagenesis in hemoglobin: functional and structural role of the penultimate Tyrosine in the α subunit. Biochemistry. **33**: 2546-2533.

JENSEN F. B. (1988) Red-cell pH in tench. Interacting effects of cellular nucleoside triphosphates, Hb-oxygenation and extracellular pH. Acta Physiol. Scand. **132**: 431-437.

JENSEN F. B. (1989) Hydrogen ion-equilibria in fish hemoglobins. J. Exp. Biol. **143**: 235-243.

JOHNSON M. E. & HO C. (1974) Effects of ligands and organic phosphates on functional properties of human adult hemoglobin. Biochemistry **13**: 3653-3661.

JONES R. T., OSGOOD E., BRIMHALL B. & KOLER R. D. (1967) Hemoglobin Yakima I. Clinical and Biochemical studies. J. Clin. Invest. **46**: 1840-1847.

KELLET G. L. & GUTFREUND H. (1970) Reactions of haemoglobin dimers after ligand dissociation. *Nature* **227**: 921-926.

KENDREW J. C., WATSON H. C., STRANDBERG B. E., DICKERSON R. E., PHYLIPS D. C. & SHORE V. C. (1961) A partial determination by X-ray methods and its correlation with chemical data. *Nature* **190**: 666-670.

KILMARTIN J. (1973) The interaction of inositol hexaphosphate with methaemoglobin. *Biochem. J.* **133**: 725-723.

KILMARTIN J. (1974) Influence of DPG on the Bohr Effect of human hemoglobin. *FEBS Lett.* **38**: 147-148.

KILMARTIN J. V., IMAI K., JONES R. T., FARUQUI A. R., FOGG J. & KILMARTIN J. M. (1978) Role of Bohr groups salt bridges in cooperativity in hemoglobin. *Biochim. Biophys Acta* **534**: 15-25.

KILMARTIN J. & ROSSI BERNARDI L. (1973) Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide and organic phosphates. *Physiol. Rev.* **53**: 836-890.

KOSLAND D. E., NEMETHY G., & FILMER D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* **5**: 365-386.

LADNER R. C., HEINER E. J., PERUTZ M. F. (1977) The structure of horse methaemoglobin at 20 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **114**: 385-414.

Hemoglobin and Oxygen Binding. C. Ho (ed.), pp. 231-241 New York: Elsevier.

MONOD J., WYMAN J., & CHANGEAUX J. P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible Models. *J. Mol. Biol.* **12**: 88- 118.

NOBLE R. W. (1969) Relation between allosteric effects and changes in the energy of bonding between molecular subunits. *J. Mol. Biol.* **39**: 479-491.

OYAMA Jr. S., NAGATOMO C. L., BONILLA G. O., MATSUURA M. S. A. & FOCESI Jr.. A. (1993) *Bothrops alternatus* hemoglobin components. Oxygen binding properties and globin chain hydrophobic analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 271-275.

PAULING L. (1935) The oxygen equilibrium of hemoglobin and its structural interpretations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **21**: 186-191.

PHELPS C., FARMER M., FYHNH. J., FYHN U. E. H., GARLICK R. W., NOBLE R. W. & POWERS, D. A. (1979) Equilibria and kinetics of oxygen and carbon monoxide ligand binding to the hemoglobin of the South American lungfish *Lepidosirem paradoxa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**: 139-143.

PERELLA M., SABIONEDA L., LAMAJA M. & ROSSI- BERNARDI L. (1986) The intermediate compounds between human hemoglobin and carbon monoxide at equilibrium and during approach to equilibrium. *J. Biol. Chem.* **261**: 8391-8396.

PERELLA M., SHRAGER R. I., RIPAMONTI M., MANFREDI G., BERGER R. L. & ROSSI-BERNARDI L. (1993) Mechanism of the oxidation reaction of deoxyhemoglobin as studied by isolation of the intermediates suggest tertiary structure dependent cooperativity. *Biochemistry* **32**: 5233-5238.

PERUTZ M. F. (1970). Stereochemical mechanism of cooperative effects in hemoglobin. Haem-haem interaction and the problem of allostery. *Nature (London)* **228**: 726-734.

PERUTZ M. F. (1982) Control of oxygen affinity of the heme by the structure of the globin in hemoglobin In: *Hemoglobin and Oxygen Binding*. C. Ho (ed.), pp. 113-118 New York: Elsevier.

PERUTZ M. F. (1984) Species Adaptation in a protein molecule. *Adv. in Prot. Chem.* **36**: 213-214.

PERUTZ M. F. (1990) Mechanism regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Ann. Rev Physiol.* **52**: 1-25.

PERUTZ M. F. & BRUNORI M. (1982) Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian hemoglobin. *Nature Lond.* **299**: 421-426.

PERUTZ M. F., DEL PUSSINELLI P., TEN EYCK L., KILMARTIN J. V. & SHIBATA S. (1971) Haemoglobin Hiroshima and the

mechanism of the alkaline Bohr effect. *Nature New Biol.* **232**: 147-149.

PERUTZ M. F., FERMI G., LUISI G., SHAANAN B., & LIDDINGTON R. (1987) Stereochemistry of cooperative mechanism in hemoglobin. Acc. Chem. Res. **20**: 309-321.

PERUTZ M. F., FERMI G., POYART C., PAGNIER J. & KISTER J. (1993) A novel allosteric mechanism in haemoglobin, structure of bovine deoxyhaemoglobin absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect. J. Mol. Biol. **233**: 536-545.

PERUTZ M. F., FERMI G. & B. SHIM T. (1984) Structure of deoxyhemoglobin Cowtown (His HC3146 β →Leu): Origin of the alkaline Bohr effect and electrostatic interactions in hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**: 4781-4784.

PERUTZ M. F., GRONENBORN A. M., CLORE G. M., FOGG H. J., & T-B SHIH D. (1985) The pKa values of two histidine residues in human haemoglobin, the Bohr effect, and the dipole moments of α -helices. J. Mol. Biol. **183**: 491-498.

PERUTZ M. F. & IMAI K. (1980) Regulations of oxygen affinity of mammalian hemoglobin. J. Mol Biol. **136**: 183-191.

PERUTZ M. F., KILMARTIN, J. V., NISHIKURA, K., FROOG, J. H., BUTTER, D. J. G. & ROLLEMA, H. S. (1980) Identifications of

residues contributing to the Bohr effect of human hemoglobin. *J. Mol. Biol.* **138**: 649-670.

PERUTZ M. F., LADNER J. N., SIMON S. F. & HO C. (1974) Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin. *Biochemistry* **13**: 2163-2173.

PERUTZ M. F., MUIRHEAD M., MAZZARELLA L., CROWTHER R., GREER J. & KILMARTIN J. (1969) Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in hemoglobin. *Nature* **222**: 1240-1243.

PETIGREW D. W., ROMEO P. H., TSAPIS A., THILLET J., SMITH M. L., TURNER B. W. & ACKERS G. K. (1982) Probing the energetics of proteins through structural perturbation sites of regulatory energy in human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1849-1853.

POUGH F. H. (1980) Blood oxygen transport and delivery in reptils. *Am. Zool.* **20**: 173-185.

POYART C., HAJEMAN H. & KISTER J. (1992) Molecular adaptation of hemoglobin function in mammals. *Resp. Physiol.* **90**: 3-17.

PRESS W. H., FLANNERY B. P., TEUKOLSKY S. A. & VETTERLING W. T. (1986) *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press Cambridge, U.K.

REED C. S., HAMPSON R., GORDON S., JONES R. T., NOVY M. J., BRIMHALL B., EDWARDS M. J. & KOLER R. D. (1968)

Erythrocytosis secondary to increased oxygen affinity of a mutant hemoglobin, Hemoglobin Kempsey. *Blood* **31**: 623-632.

RIGGS A. (1971) Mechanism of the enhancement of the Bohr effect in mammalian hemoglobins. J. Gen. Physiol. 43: 737-752.

RIGGS A. (1988) The Bohr effect. Ann. Rev Physiol. 50: 181-204.

RIGGS A. F., & WOLBACH R. A. (1956) Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. Gen. Physiol. 39: 585- 609.

ROSSI-BERNARDI L. & ROUGHTON F. J. W. (1967) The effect of temperature on the oxygen-linked ionizations of hemoglobin. J. Biol. Chem. 242: 784-792.

ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., & CAPUTO A. (1964) Hemoglobin and Myoglobin. Adv. Protein Chem. 19: 209- 212.

RUSSU I., HO N. & HO C. (1980) Role of the β 146 Hystidyl residue in the alkaline Bohr effect of hemoglobins. Biochemistry. 19: 1043-1052.

RUSSU I. M., HO N. & HO C. (1982) A protons nuclear magnetics resonance investigation of Hystidyl residues in human normal hemoglobins. Biochemistry. 21: 5031-5043.

RUSSU I. M., SHING-SHING WU, HO N. T., KELLOGG G. W. & HO C. (1989) A proton nuclear magnetic resonance investigation of the

anion Bohr effect of human normal adult hemoglobin. *Biochemistry* **28**: 5298-5306.

SANTUCCI R., ASCOLI, F. & ANTONINI E. (1984) Redox potentials of normal and SH (β 93) modified human hemoglobin. Effect of pH and D-glycerate 2,3 Biphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **789**: 20-25.

SODE F. (1991) Oxygen binding characteristics of whole-blood and hemoglobin from the snake *Thamnophis sirtalis*. *Comp. Biochem. Pysiol.* **100B**: 697-703.

SNYDER S. E., WELLY E. V., WALDER R. Y., L. & WALDER J. A. (1987) HbXL99 α : a hemoglobin derivative that is cross-linked between the α subunits is useful as a blood substitute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7280-7284.

SZABO A. & KARPLUS M. (1972) A mathematical model for the structure-function relations in hemoglobins. *J. Mol. Biol.* **72**: 163-197.

SZABO A. & KARPLUS M. (1975) Analysis of the Interaction of Organic Phosphates with hemoglobin. *Biochemistry* **15**:2869-2877.

TAIWO F. A. (1995) Hemoglobin of the lung fish *Clarias lazera*: isolation and oxygen equilibrium studies. *Comp. Biochem. Physiol.* **110A**: 147-150.

- TAYLOR J. F. & HASTING A. B. (1939)* Oxidation-reduction potentials of the methe miooglobin-hemoglobin system. *J. Biol. Chem.* **131**: 649-662.
- TETENS V., BRITAIN T., CHRISTIE D. L., ROBB J. & WELLS R. M. (1984)* Characterization and function of isolated haemoglobins from Tatuara, *Sphenodon punctatus* (Reptilian; O.Rhynchocephalia). *Comp. Biochem. Physiol.* **79**: 119-123.
- TOGI A., ISHIMORI K., UNNO M., KONNO T. & MORISHIMA I. (1993)* Effects of intra and intersubunit hydrogen bonds on the R→T transition in human hemoglobin as studies with $\alpha 42(\text{C}7)$ and $\beta 145(\text{HC}2)$ mutations. *Biochemistry* **32**: 10165-10169.
- TOMITA S., ENOKI Y., SANTA M., YOSHIDA H. & YASUMITSU J. (1968)* Preparation of Blood hemoglobins of vertebrates *Method Enzimology* Vol. 76 pp. 23-24.
- VAN BEECK G. G. M., ZUIDERWEG E. R. P. & DE BRUIN S. H. (1979)* The binding of chloride ions to ligated and unligated human hemoglobin and its influence on the Bohr effect. *Eur. J. Biochem.* **99**: 379-383.
- WARSHEL A. & WEIS R. (1981)* Energetics of heme-protein interactions in hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 446-451.
- WAWEMAN H., KILMARTIN J. V., NAJMAN A. & LABIE D. (1975)* Hemoglobin Cochim-Port Royal: Consequences of the replacements of

the β -chains C-terminal by arginine. *Biochim Biophys. Acta* **400**: 354-364.

WEBER R. E., BOL J. F., JOHANSEN K., & WOOD S. C. (1973) Physicochemical properties of the hemoglobin of the Coelacanth *Latimeria chalumnae*. *Arch. Biochim. Biophys.* **154**: 96-105.

WEBER R. E., SULLIVAN B., BONAVENTURA J. & BONAVENTURA C. (1976) The hemoglobin system of the primitive fish *Amia calva*: isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. *Biochem. Biophys. Acta* **434**: 18-31.

WEBER R. E. & WOOD S. C. (1979) Effects of erythrocyte nucleoside triphosphates on oxygen equilibria of composite and fractionated hemoglobins from the facultative air-breathing Amazonian catfish *Hypostomus* and *Pterygoplichthys*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**: 179-183.

WELLS R. M. G., TETENS V. & BRITAIN T. (1983) Absence of cooperative haemoglobin oxygen binding in *Sphenodon* of reptilian relict from Triassic. *Nature, Lond.* **306**: 500-506.

WILHELM D. & WEBER R. E. (1983) Functional characterization of hemoglobins from south Brazilian freshwater teleosts. 1.- Multiple hemoglobins from the gut/gill breather, *Callichthys callichthys*. *Comp. Biochem. Physiol.* **75**: 475-482.

WYMAN J. (1948) Heme Proteins. *Advan. Protein Chem.* **4**: 407-531.

WYMAN J. (1964) Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: a second look. *Advan. Protein. Chem.* **19**: 223-286.

WYMAN J. (1967) Allosteric linkage. *J. Amer. Chem. Soc.* **89**: 2202-2218.

6. APÊNDICE

TABELA I. Valores de Potencial de óxido-redução da hemoglobina humana na forma “stripped” e na presença de ATP 1mM. Em tampão Tris-HCl 100 mM e 25 °C. Voltagens: iniciais $E'_o(i)$, no 50% Fe^{+2}/Fe^{+3} E'_o e em referencia ao eletrodo de hidrogênio E_h .

“Stripped”

pH	$E'_o(i)$ Volt	E'_o Volt	E_h Volt
6,0	- 0,130	- 0,070	0,176
6,7	- 0,160	- 0,076	0,170
6,9	- 0,160	- 0,092	0,154
7,0	- 0,160	- 0,085	0,161
7,1	- 0,170	- 0,096	0,150
7,4	- 0,170	- 0,100	0,146
7,6	- 0,190	- 0,120	0,126
7,7	- 0,180	- 0,126	0,120
8,0	- 0,190	- 0,135	0,111
8,3	- 0, 215	- 0,150	0,096
8,6	- 0,230	- 0,160	0,086
8,9	- 0,230	- 0,170	0,076

ATP 1mM

pH	$E'_o(i)$ Volt	E'_o Volt	E_h Volt
6,5	- 0,140	- 0,055	0,191
6,8	- 0,160	- 0,058	0,188
7,3	- 0,165	- 0,077	0,169
7,8	- 0,180	- 0,100	0,146
8,3	- 0,195	- 0,130	0,116

TABELA II Valores de Potencial de óxido-redução da hemoglobina de *Clarias sp.* na forma “stripped” e na presença de ATP 1mM. Em tampão Tris-HCl 100 mM e 25°C. Voltagens iniciais E'_o (i), no 50% Fe^{+2}/Fe^{+3} E'_o e em referencia ao eletrodo de hidrogênio E_h .

“Stripped”				ATP 1mM			
pH	E'_o (i)Volt	E'_o Volt	E_h Volt	pH	E'_o (i)Volt	E'_o Volt	E_h Volt
6,9	- 0,185	- 0,150	0,096	7,0	-0,185	-0,116	0,130
7,0	- 0,185	- 0,150	0,096	7,2	- 0,180	- 0,130	0,116
7,2	- 0,185	- 0,150	0,096	7,4	- 0,190	- 0,130	0,116
7,5	- 0,190	- 0,165	0,096	7,6	- 0,200	- 0,130	0,116
7,6	- 0,200	- 0,176	0,096	7,8	- 0,210	- 0,135	0,111
7,8	- 0,210	- 0,175	0,071	7,9	- 0,215	- 0,150	0,096
8,0	- 0,210	- 0,180	0,066	8,3	- 0,210	- 0,170	0,076
8,3	- 0,210	- 0,195	0,051				

TABELA III. Valores de Potencial de óxido-redução de hemoglobina de *Liophis miliaris*, na forma “stripped” e na presença de ATP 1 mM. Em tampão Tris-HCl 100 mM a 25°C. Voltagens: iniciais $E'_o(i)$ no 50% Fe^{+2}/Fe^{+3} E'_o e em referencia ao eletrodo de hidrogênio E_h .

“Stripped”				ATP			
pH	$E'_o(i)$ Volt	E'_o Volt	E_h Volt	pH	$E'_o(i)$ Volt	E'_o Volt	E_h Volt
7,2	-0,210	-0,175	0,071	7,3	-0,210	-0,165	0,081
7,3	-0,210	-0,175	0,071	7,4	-0,210	-0,165	0,081
7,5	-0,210	-0,175	0,066	7,5	-0,220	-0,165	0,081
7,6	-0,210	-0,180	0,066	7,6	-0,210	-0,165	0,071
7,7	-0,210	-0,185	0,061	7,7	-0,220	-0,180	0,066
8,0	-0,220	-0,185	0,061	7,8	-0,220	-0,185	0,061
8,3	-0,220	-0,190	0,056	8,1	-0,220	-0,190	0,056
8,5	-0,235	-0,195	0,051	8,5	-0,235	-0,195	0,051
8,7	-0,240	-0,205	0,041	8,7	-0,240	-0,205	0,041