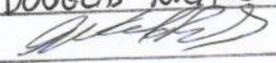


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

DOUGLAS RICARDO NORBERTO

EFEITO DA TEMPERATURA E ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA
TERMODINÂMICA DA DISSOCIAÇÃO DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR

Este exemplar corresponde à redação
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
DOUGLAS RICARDO NORBERTO

e aprovada pela Comissão Julgadora

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

N75e Norberto, Douglas Ricardo
Efeito da temperatura e alta pressão na termodinâmica da dissociação da hemoglobina extracelular / Douglas Ricardo Norberto. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafe.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hemoglobina extracelular. 2. Dissociação.
3. Pressão hidrostática. I. Bonafe, Carlos Francisco Sampaio.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Temperature and high pressure effect on thermodynamic of the extracellular hemoglobin dissociation.

Palavras-chave em inglês: Extracellular hemoglobin; Dissociation; Hydrostatic pressure.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Ricardo Aparício, Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Data da defesa: 12/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

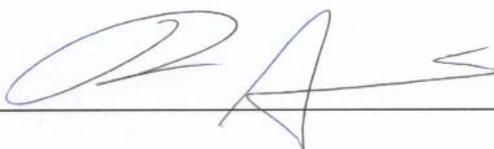
Campinas, 12 de março de 2007

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé
(Orientador)



Prof. Dr. Ricardo Aparício



Profa. Dra. Maria Goreti de Almeida Oliveira



Prof. Dr. Eduardo Galembeck

Prof. Dr. Jerson Lima da Silva

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Bonafé, pelas discussões e por todo incentivo dado nesses importantes anos.

Ao José Ailton Bispo, pela amizade de longa data, pela cooperação enriquecedora e por todo apoio.

Ao José Luis dos Santos, pelo especial auxílio e pelas sugestões em inúmeras ocasiões do trabalho.

Ao Gustavo Landini, pelo companheirismo e pelas importantes discussões.

Ao Prof. Carlos Ramos, por ter cedido o laboratório de espectroscopia no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para as análises de dicroísmo circular, e ao Fábio, pelo auxílio e, por várias vezes, pelos ensinamentos nesta área.

Ao Prof. Tomomasa Yano, por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos com cromatografia e, em especial, ao seu corpo técnico que por várias vezes nos ajudou.

Aos docentes, funcionários e alunos da Pós Graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

À técnica do nosso laboratório, Juliana Mattoso, por sempre colaborar com a realização dos experimentos. À Andréia e Marina, por toda especial atenção junto à secretaria de Pós Graduação.

Aos meus pais, Mário e Ana Norberto, por simplesmente existirem maravilhosamente tais como são e sempre foram.

Meus agradecimentos especialmente a CNPq, FAPESP, CAPES e FAEP-UNICAMP pelo suporte financeiro.

A Natasha e Teresa eu dedico este trabalho

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	13
HEMOGLOBINAS EXTRACELULARES: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	15
ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR	15
OBJETIVO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	18
REAGENTES	18
PURIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR	19
EQUIPAMENTO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	21
MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E ESPALHAMENTO DE LUZ SOB PRESSÃO	21
MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	22
GEL FILTRAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE	23
CONSIDERAÇÕES TERMODINÂMICAS.....	24
RESULTADOS	27
EFEITO DA TEMPERATURA E PRESSÃO SOBRE O	
ESTADO DE AGREGAÇÃO DA HEMOGLOBINA G. PAULISTUS	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	61
ARTIGO DO SOBRE A HEMOGLOBINA G. PAULISTUS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de Hb extracelular de anelídeo.....	16
Figura 2.A. Foto ilustrando o gerador de pressão.....	20
Figura 2.B. Foto ilustrando a câmara de pressão.....	20
Figura 3. Efeito da temperatura sobre a intensidade de espalhamento de luz na hemoglobina extracelular <i>G. paulistus</i>	28
Figura 4. Efeito da pressão e da temperatura sobre a hemoglobina extracelular <i>G. Paulistus</i>	30
Figura 5. Grau de dissociação α em função da pressão e temperatura.....	31
Figura 6. Efeito da temperatura na intensidade de espalhamento de luz a pressão de 50 e 150 MPa.....	32
Figura 7. Microscopia eletrônica da Hb extracelular de <i>G. Paulistus</i>	34
Figura 8. Cromatografia de alta performance em gel filtração da Hb.....	35
Figura 9. Gráfico de $\ln(K_p)$ em função da pressão.....	37
Figura 10. Efeito da temperatura sobre a energia livre de Gibbs na dissociação da Hb.....	38
Figura 11. Gráfico que relaciona $\ln(K_{atm})$ com $1/T$	40
Figura 12. Esquema mostrando as mudanças de ligações de subunidades hidratadas nas interfaces em processo de associação.....	41
Figura 13. Distribuição populacional do número de ligações intersubunidade de proteína.....	46
Figura 14. Dependência da entalpia de acordo com os diferentes valores de energia de ligação.....	48
Figura 15. Dependência da entropia de acordo com os diferentes valores de energia de ligação.....	50

LISTA DE EQUAÇÕES

1. $M = \frac{A}{\varepsilon}$ 19
2. $\alpha_p = (S_i - S_p)/(S_i - S_f)$ 22
3. $P_{108} \xleftarrow{K_{atm}^0} 108 P + \nu_D H^+$ 24
4. $K_{atm}^0 = \frac{[P]^{108} [H^+]^{\nu_D}}{[P_{108}]}$ 24
5. $K_{atm} = \frac{[P]^{108}}{[P_{108}]}$ 24
6. $\Delta G_p = \Delta G_{atm} + p \Delta V$ 25
7. $K_p = K_{atm} \exp\left(\frac{-p \Delta V}{RT}\right) = \frac{[P]_p^{108}}{[P_{108}]_p}$ 25
8. $K_p = K_{atm} \exp\left(\frac{-p \Delta V}{RT}\right) = \frac{108^{108} C^{107} \alpha^{108}}{(1 - \alpha)}$ 25
9. $\ln(K_p) = \ln(K_{atm}) - \left(\frac{\Delta V}{RT}\right)p = 108 \ln 108 + 107 \ln C + 108 \ln \alpha - \ln(1 - \alpha)$ 25
10. $\Delta G_{atm} = -RT \ln(K_{atm}) = \Delta H - T \Delta S$ 26
11. $\ln(K_{atm}) = \frac{\Delta S}{R} - \left(\frac{\Delta H}{R}\right)\frac{1}{T}$ 26
12. $U_i = H_i - pV_i$ e $A_i = U_i - TS_i$ 26
13. $\Delta U = \Delta H - p \Delta V$ e $\Delta A = \Delta U - T \Delta S$ 26
14. $\Delta H = \Delta H_{pp} + \Delta H_{ww} - 2 \Delta H_{pw}$ 44
15. $\Delta S = \Delta S_{pp} + \Delta S_{ww} - 2 \Delta S_{pw}$ 44

16.	$f_j = \binom{M}{j} (1-p)^j p^{M-j}; 0 \leq j \leq M$	45
17.	$p = \exp(-E/RT)$	46
18.	$E_t = E \sum_{j=0}^M j f_j$	47
19.	$S = R \ln N$	47
20.	$S = R \ln \left(\sum_{j=0}^M \binom{M}{j} f_j \right)$	47
21.	$E_{P-W} = 3,5 + E_{P-P}/2$	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Concentração
Da	Dalton
E	Energia
Ec	Eritrocrucorina
E_{P-P}	Energia da ligação proteína-proteína
E_{P-W}	Energia da ligação proteína-solvente
E_t	Energia total
f_j	Distribuição da população heterogênea
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (sigla em inglês)
H^+	Prótons liberados ou absorvidos
H	Entalpia
Hb	Hemoglobina
I_{50}	Espalhamento de luz a 50% de dissociação
j	Número de interface individual na interação proteína-proteína
M	Número de interações intersubunidades

N	Número de “complexions”
P_{108}	Proteína (hemoglobina) associada
108P	Proteína (hemoglobina) dissociada
p	Probabilidade de reações rompidas
S_p	Intensidade de espalhamento de luz a pressão p
S_f	Intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada
S_i	Intensidade de espalhamento de luz da forma associada
TMV	Vírus do mosaico do tabaco
α	Grau de dissociação
U_D	Número de prótons no processo de dissociação
K_{atm}^0	Constante de equilíbrio de dissociação em P_{atm} e $pH = 0$
K_{atm}	Constante de equilíbrio de dissociação em P_{atm}
K_p	Constante de equilíbrio de dissociação a pressão p
ΔA	Varição de energia livre de Helmholtz
ΔG	Varição de energia livre de Gibbs
ΔG_{atm}	Varição de energia livre de Gibbs de dissociação em P_{atm}
ΔH	Varição de entalpia
ΔS	Varição de entropia
ΔU	Varição de energia interna
ΔV	Varição de volume de dissociação

RESUMO

A hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (eritrocruorina) foi investigada com respeito ao efeito da temperatura na dissociação induzida por alta pressão hidrostática. O aumento de temperatura e pressão induziu o processo de dissociação, como observado pela significativa diminuição da intensidade de espalhamento de luz. Tais informações foram confirmadas através de HPLC em gel filtração e microscopia eletrônica. Ocorreu uma redução dos valores de energia livre de Gibbs de dissociação indicando um processo predominantemente endotérmico. A variação de entalpia (ΔH) observada no processo foi de 27,82 MJ/mol de hemoglobina (Hb) e a de entropia ($T\Delta S$), à temperatura de 293 K, de 23,91 MJ/mol de Hb. Foi encontrada uma redução da mudança de volume de dissociação (ΔV) de $-78,20$ para $-10,44$ mL/mol de subunidade de Hb. Em condições atmosféricas e temperatura de 293 K, a variação da energia interna de dissociação (ΔU) foi de 27,82 MJ/mol de Hb e da energia livre de Helmholtz, (ΔA), de 3,92 MJ/mol de Hb. Os resultados da dissociação oligomérica em alta pressão no intervalo de temperatura investigado mostraram a ocorrência de etapas distintas de mudança de estabilidade conformacional. Complementarmente, foi realizado um estudo das interações intersubunidades e da área de exposição da proteína ao solvente no processo de dissociação, permitindo a obtenção de importantes dados quantitativos no processo..

ABSTRACT

Glossoscolex paulistus extracellular hemoglobin (erithrocrucorin) was studied with respect of thermal effect on the dissociation induced by high hydrostatic pressure. The increase of temperature and pressure led to dissociation process, as observed by the significant decrease in the intensity of light scattering values. Such information was confirmed by HPLC gel filtration and electron microscopy. A predominantly endothermic process was observed with the reduction in the Gibbs free energy of dissociation. The enthalpy change (ΔH) obtained was of 27,82 MJ/mol of hemoglobin (Hb) and the entropy change ($T\Delta S$), at a temperature of 273 K, 23,91 MJ/mol of Hb. The estimated volume change of dissociation (ΔV) decreased from $-78,20$ to $-10,44$ mL/mol of subunit of Hb. The change of internal energy of dissociation (ΔU), at atmospheric conditions and temperature of 293K, was of 27,82 MJ/ mol of Hb and the change of free energy of Helmholtz (ΔA) was of 3,92 MJ/mol of Hb. The results also indicated that the dissociation of oligomeric Hb at high pressure and at investigated temperature range occurs in distinct steps of conformational stability and allowed to obtain significant quantitative data in the process. In addition, it was studied the subunity interactions and related exposed area of the protein solvent dissociation, attempting to obtain an quantitative description of the process.

INTRODUÇÃO

As proteínas, notavelmente, oferecem os melhores e os mais interessantes exemplos de complexos moleculares multiméricos. Esses complexos podem ser constituídos de várias cadeias polipeptídicas que se associam em múltiplos de composição definida, idênticos ou diferentes quanto à seqüência de aminoácidos. São exemplos de oligômeros protéicos, enzimas alostéricas, complexos multienzimáticos, ribossomos e capsídeos virais. Uma vez que a função biológica destas biomoléculas está intimamente relacionada com as respectivas estruturas, ganham importância a compreensão das interações entre subunidades e os fatores que interferem na estabilidade das proteínas.

A dissociação de proteínas geralmente ocorre com contração de volume do sistema. Assim, a pressão hidrostática (até 250 MPa) aparece como uma forma de se induzir dissociação de proteínas oligoméricas. Isso ocorre sem alterar diretamente a estrutura terciária das subunidades. No caso de proteínas monoméricas, as alterações nas estruturas terciárias são significativas apenas em incubação a pressões bem superiores, acima de 600 MPa, quando a pressão é o fator de desnaturação isoladamente utilizado (Weber and Drickamer, 1983; Silva *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 1989; Bonafe *et al.*, 1991). A alta pressão tende a dissociar proteínas multiméricas porque o sistema proteína-solvente de um estado dissociado ocupa um menor volume que o mesmo sistema no estado nativo da proteína na sua forma íntegra. A presença de cavidades, ou “imperfeições”, na interface proteína-proteína, que corresponde ao contato entre as subunidades, favorece o processo de desagregação induzido por pressão (Weber and Drickamer, 1983; Zhou and Perrett, 2001). A liberação de espaços não preenchidos na interface e a interação do solvente com resíduos polares expostos na dissociação correspondem a fatores que contribuem para a contração de volume (Silva *et al.*, 2001).

Pode-se acompanhar o processo de dissociação através de técnicas espectroscópicas, como fluorescência intrínseca e, para grandes agregados protéicos, espalhamento de luz. No caso de fluorescência, resíduos de triptofano expostos em processo dissociativo podem induzir desvio para o vermelho da emissão. No caso da hemoglobina (Hb), a dissociação pode também promover o aumento do rendimento quântico se o triptofano estiver perto de grupo supressor, como o heme (Lakowicz, 1999). Os produtos da dissociação podem ser

analisados por gel filtração em HPLC. Para grandes agregados protéicos e partículas virais, pode-se analisar a dissociação através de microscopia eletrônica.

Investigações da dissociação de diversos oligômeros protéicos levaram à descrição de uma nova propriedade sobre a associação das subunidades, denominada "deriva conformacional". Esta consiste na diminuição da afinidade observada entre as subunidades de uma proteína quando as mesmas estão separadas por diferentes mecanismos, seja por pressão, por diluição ou por variação de temperatura. Observa-se assim uma histerese na curva de dissociação por pressão, com o aumento do grau de dissociação no retorno à pressão atmosférica (Xu & Weber, 1982; Silva *et al.*, 1986; Weber, 1986). As subunidades, portanto, sofrem uma progressiva mudança conformacional com implicações na perda parcial de afinidade entre si que, na reassociação, conduz a um processo de ajuste com o objetivo de restaurar as propriedades originais do agregado. A recuperação das diferentes propriedades neste ajuste se realiza segundo cinética característica, com a ocorrência de grandes variedades de conformações possíveis.

Um outro fenômeno observado em experimentos de dissociação por pressão é a heterogeneidade quanto à energia livre de associação em proteínas com muitas subunidades. Essa propriedade explica a falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão (Silva and Weber, 1988; Ruan and Weber, 1989; Silva *et al.*, 1989). Assim, proteínas com mais de duas subunidades exibem comportamento cada vez mais determinístico, ou seja, se desestabilizam como partículas individuais ou corpos macroscópicos, ao contrário de proteínas diméricas, que possuem comportamento predominantemente estocástico (Erijman and Weber, 1991).

Nesse contexto apresentado, o estudo da termodinâmica de interação proteína-proteína é de fundamental importância na compreensão dos mecanismos e forças envolvidos nas interações que estabilizam conformacionalmente grandes agregados e coordenam transições estruturais (Weber and Dicramer, 1983; Weber, 1986; Ruan and Weber, 1989; Silva and Weber, 1993; Cioni and Strabini, 1996; Bonafe *et al.*, 1998; Pontes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Da Poian *et al.*, 2002; Foguel and Silva, 2004). Mais recentemente, a utilização de alta pressão hidrostática para dissociação de grandes agregados protéicos vem se expandindo, fornecendo achados que apontam para a sua utilização na indústria biotecnológica com o desenvolvimento de estratégias de renaturação

de corpos de inclusão dissociados e desnaturados e, ainda, para inativação de vírus tais como poliovírus, vírus relacionados com doenças da boca e do pé, rotavírus e outros, representando alternativa importante para a produção de vacinas (Foguel, 2005).

Hemoglobinas extracelulares: Características gerais

A Hb é uma proteína com função de transporte de oxigênio que se encontra ao longo de todo filo dos vertebrados na forma tetramérica intracelular, com raras exceções. Em contraste, não se observam proteínas com essa função em vários grupos de invertebrados, ocorrendo, no entanto, em alguns grupos, um ou mais dos pigmentos respiratórios: Hb intracelular, extracelular, hemocianina intracelular, extracelular e hemeretrina (Vinogradov, 1985). Nas Hbs de invertebrados ocorre uma imensa variação em estrutura e propriedades funcionais, podendo representar adaptações às amplas condições ambientais às quais esses invertebrados são submetidos na natureza, compensando, ao mesmo tempo, a menor organização ao nível de órgãos, com maior atividade regulatória ao nível molecular (Weber, R.E. 1980). Dentre as Hbs de invertebrados, destacam-se as extracelulares que estão presentes entre os Plelmintos, Nematóides, Moluscos, Crustáceos, Anelídeos e Pogonóforos. Essas Hbs também são chamadas de eritrocruorinas, independente do peso molecular ou localização tissular.

Estrutura da Hb extracelular

A Hb extracelular, ou eritrocruorina (Ec), do anelídeo *Glossoscolex paulistus*, é a molécula de estudo deste trabalho. É uma proteína gigante com massa molecular de $3,1 \times 10^6$ Da e coeficiente de sedimentação de 58 S (Costa *et al.*, 1988). Pertence à classe das Hbs multiméricas de simples domínio, sendo composta de dois anéis hexagonais sobrepostos (Vinogradov, 1985), cada um contendo seis subunidades. A molécula é constituída por 144 subunidades carreadoras de heme e 36 não carreadoras de heme, denominadas *linkers*, com um total de 108 subunidades dissociantes. Recentes estudos cristalográficos usando eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* à 5,4 Å de resolução revelaram com detalhes a marcante organização desta molécula, composta por 144

subunidades acopladoras de oxigênio de quatro diferentes tipos e 36 subunidades ligantes, Fig. 1 (Royer WE Jr *et al.*, 2000).

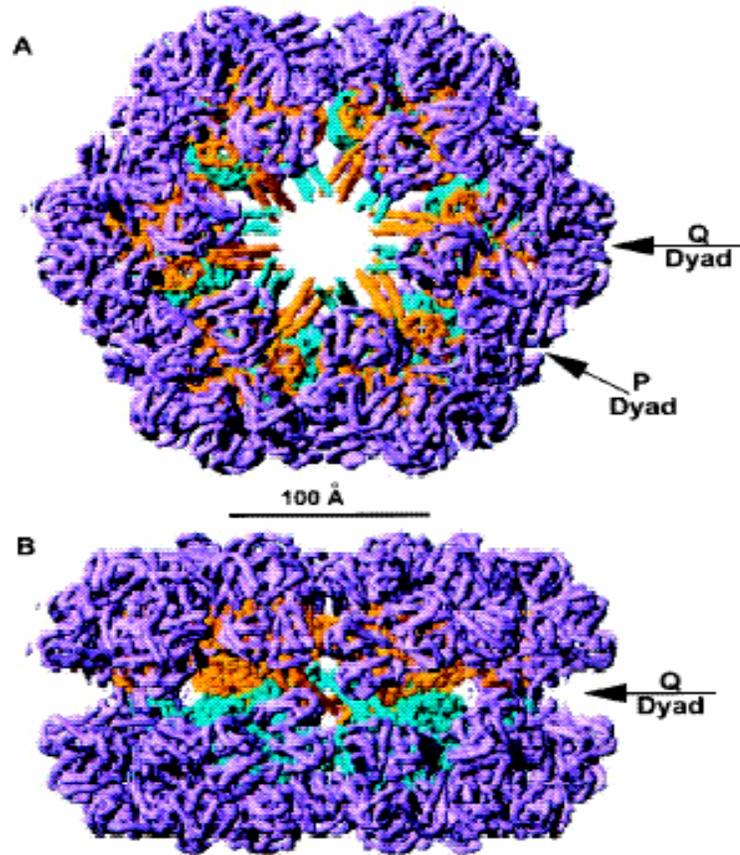


Figura 1. Exemplo de estrutura da Hb extracelular de anelídeo. Molécula ampliada: *Lumbricus terrestris* (Royer et al., 2000). Nota-se a forma hexagonal dos discos que se sobrepõem em (A) vista superior e (B) vista lateral, e a indicação das “díades” Q e P.

Investigações sobre o comportamento termodinâmico utilizando a Hb extracelular do *G. paulistus* mostraram a formação de estruturas de baixa afinidade após incubação sob pressão, com estabilização dos produtos dissociados (Silva *et al.*, 1989). Por outro lado, a presença de cálcio e glicerol aumenta significativamente a recuperação da estrutura compatível com a forma nativa (Bonafe *et al.*, 1991). De um modo geral, o mecanismo estabilizador do cálcio em solução vem da diminuição do ponto isoelétrico dos sítios de ligação da proteína, e no caso do glicerol, vem da sua afinidade na interação com as moléculas de água e posterior restabelecimento do interior hidrofóbico da conformação nativa.

OBJETIVO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar parâmetros termodinâmicos da dissociação da Hb extracelular em diferentes valores de temperatura através de incubação da amostra em alta pressão hidrostática. Estes parâmetros são a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), a variação de entalpia (ΔH), variação de entropia ($T\Delta S$) e do volume de dissociação (ΔV), a variação da energia interna (ΔU) e da energia livre de Helmholtz (ΔA) e trazem importantes informações sobre a estabilidade do oligômero. Para monitorar o processo de dissociação foram utilizadas medidas de intensidade de espalhamento de luz e os produtos resultantes foram analisados por microscopia eletrônica e gel filtração em HPLC. Foi ainda realizado um estudo das interações intersubunidades relacionadas com a área de exposição da proteína ao solvente no processo de dissociação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q. Os experimentos foram realizados com tampão Tris HCl 50 mM de pH 7,4. O ajuste do pH foi feito nas diferentes temperaturas dos experimentos. A escolha do Tris HCl se deu devido à baixa dependência de seus pKas em função da pressão (Neuman *et al.*, 1973). A concentração de Ec utilizada nos experimentos foi de 0,5 mg/mL.

Purificação da Hb extracelular

Espécimes de *G. paulistus* foram obtidos em Rio Claro, estado de São Paulo, e mantidos em solo do local de coleta devidamente umedecido até o momento da extração de seu sangue para a purificação da hemoglobina. Os animais foram anestesiados em álcool 10% e o sangue coletado do vaso dorsal utilizando-se tampão fosfato a pH 7,4, 0,1

M, com EDTA 1 mM e solução de heparina 2000 U/mL, para se evitar degradação por proteases. Centrifugou-se a solução a 16000 rpm (Eppendorf) por 10 min, dialisando por oito horas o sobrenadante contra o mesmo tampão. Em seguida, foi submetido o dialisado à ultracentrifugação a 250000 rpm por 2 h. O precipitado foi cuidadosamente ressuspenso em tampão fosfato, sendo submetido a baixa centrifugação a 11500 rpm por 10 min. Centrifugou-se novamente o sobrenadante a 250000 rpm por 2 h, ressuspendendo-o em tampão Tris HCl 50 mM, a pH 7,4. Este tampão apresenta variação de volume relativamente pequena no processo de ionização, resultando em variação desprezível de pH com a pressão. A Ec foi estocada a 4 °C (Bonaventura and Bonaventura, 1981).

A concentração molar da Ec da solução estoque foi determinada através de medição da absorbância a 540 nm, realizada em espectrofotômetro “Beckman-DU640”, e da utilização da relação:

$$M = \frac{A}{\varepsilon} \quad (1)$$

onde A é a absorbância num dado comprimento de onda considerado, ε é o coeficiente de extinção (para a Ec, $\varepsilon_{M, 540 \text{ nm}, 1\text{cm}} = 13800$) e M é a concentração molar da proteína na amostra analisada. Foram realizadas correções dos possíveis efeitos de interferentes ópticos, trabalhando dentro dos limites de linearidade da variação da absorbância com a concentração a ser determinada e com a utilização de cubeta de quartzo. Foram também consideradas desprezíveis as mudanças com relação as propriedades coligativas do soluto e consequências de eventual ionização da proteína.

Equipamento de alta pressão hidrostática

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão “HIP” que é conectado à câmara de pressão hidrostática modelo “ISS HP”, Figs. 2A e 2B, respectivamente. Essa câmara possui três janelas ópticas de safira, através das quais se realizam medidas espectroscópicas das amostras a pressões até 250 MPa, limite de tolerância destas janelas. No interior da câmara se coloca uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta é selada com um

tubo de polietileno cuja extremidade é fechada previamente por aquecimento. Esse tubo colapsado, como visto na Fig. 2C, permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos.

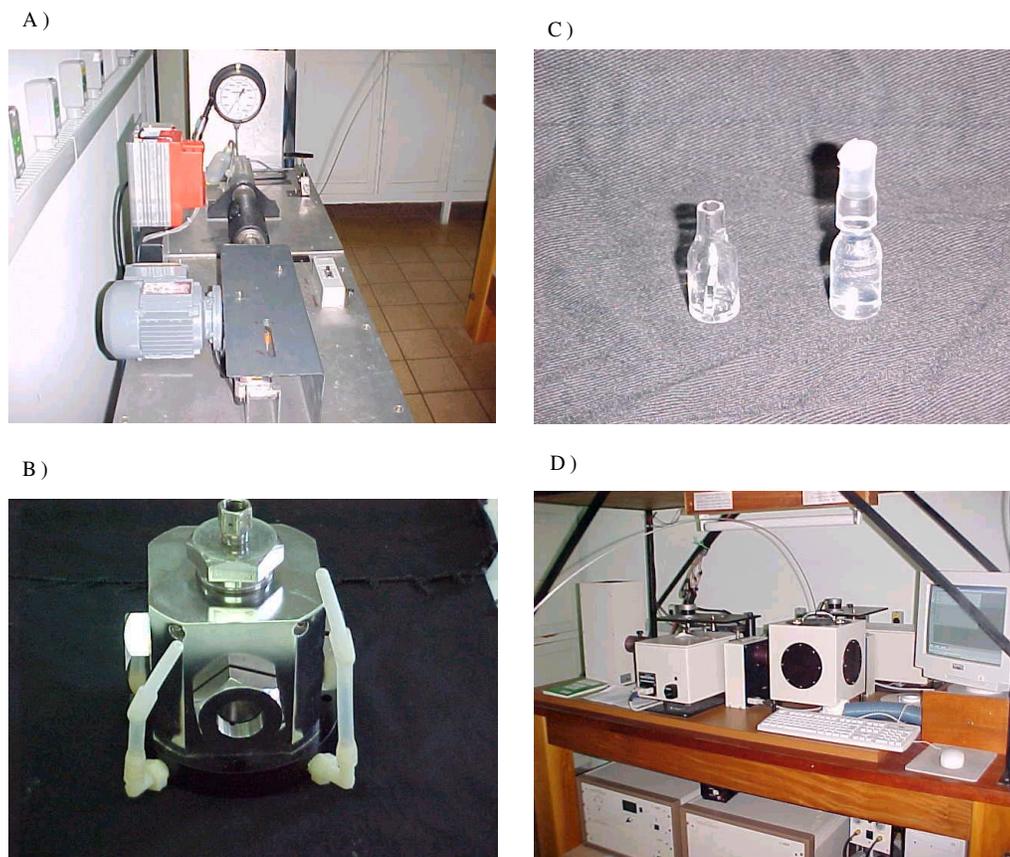


Figura 2. (A) Foto do gerador de pressão. (B) Foto da câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e os tubos onde é conectado o sistema refrigerador. (C) Foto das cubetas de quartzo, uma dividida ao meio utilizada para os experimentos de microscopia sob alta pressão, sem ser selada (lado esquerdo) e a outra selada com tubo plástico de polietileno usada nos demais experimentos (lado direito). (D) Foto do fluorímetro e do computador, responsável por executar uma série de funções automatizadas.

A cubeta é fixada em uma base cilíndrica metálica, que tem por objetivo evitar sua movimentação no interior da bomba. Etanol absoluto é utilizado como meio líquido para a transmissão da pressão devido ao seu índice de refração ser próximo ao do quartzo, minimizando a perda de sinal nas medidas espectroscópicas. Através de um sistema adaptado, a amostra pode permanecer sob diferentes temperaturas, pois esta câmara está conectada a um banho refrigerador. O sistema gerador de pressão é automatizado e controlado por um software denominado “Automa”, escrito na linguagem de programação Delphi 5.0 e compatível com o Windows. Um computador controla a movimentação de um motor acoplado ao gerador de pressão, coleta os valores de comprimento de onda de emissão e excitação do monocromador do fluorímetro e movimenta os motores para ajuste das janelas para leituras de fluorescência e espalhamento de luz, Fig. 2D. O software recebe informações das medidas de pressão através de um sensor analógico-digital, que permite o controle da pressão em tempo real (adaptado de Paladini & Weber, 1981).

Medidas de fluorescência e espalhamento de luz sob pressão

Os espectros de fluorescência e medidas de espalhamento de luz foram registrados em um espectrofluorímetro “Edimburg FL 900”, equipado com uma lâmpada fonte de xenônio. A fluorescência intrínseca é devida a existência de triptofano e pode ser utilizada para acompanhar o estado de agregação da Ec, a exemplo de proteínas em geral. Os fluoróforos são divididos em duas classes gerais, como intrínsecos e extrínsecos. Fluoróforos extrínsecos são aqueles que são adicionados a uma amostra por ela não exibir as propriedades espectrais desejadas e os intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente. Em proteínas, o fluoróforo intrínseco dominante é o resíduo de triptofano, um composto heteroaromático, que absorve o sinal de fluorescência próximo de 280 nm, e o emite próximo de 340 nm. O espectro de emissão destes compostos é altamente sensível à polaridade do solvente presente em solução, onde a emissão pode sofrer um deslocamento para o azul, caso o grupo se encontre no núcleo hidrofóbico da conformação nativa da proteína, ou um deslocamento para comprimentos de onda mais longos (desvio para o vermelho), se a proteína se encontrar na sua conformação desnaturada (Lakowicz JR, 1999). O processo de dissociação leva à exposição de resíduos de triptofano ao solvente,

igualmente ocorrendo desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência (Silva and Weber, 1988). As medidas de emissão acompanharam as leituras de intensidade de espalhamento de luz, e foram utilizadas para o comprimento de onda de excitação de 280 nm e com monitorização da emissão entre 300 e 400 nm.

As medidas de espalhamento de luz a 90° em relação à luz incidente à amostra foram realizadas com o objetivo de monitorização do estado de agregação da Hb extracelular sob pressão. O espalhamento Rayleigh da luz é uma ferramenta eficaz para detectar a dissociação de agregados quando estes são partículas de dimensões menores que o comprimento de onda associado a luz incidente. A intensidade da luz espalhada é proporcional a intensidade da luz incidente, por sua vez proporcional ao seu comprimento de onda, e ao volume da partícula dispersadora. Podemos assumir que a intensidade de luz espalhada é proporcional à massa molecular média (M_a) para soluções diluídas de proteína (Silva et al., 1989). Assim, o grau de dissociação α_p , pode ser relacionado à intensidade de espalhamento de luz à pressão p , S_p , pela seguinte equação:

$$\alpha_p = (S_i - S_p) / (S_i - S_f) \quad (2)$$

onde S_f e S_i correspondem a intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada e associada, respectivamente (Silva et al., 1989). Para as medidas de espalhamento de luz foram utilizados valores de comprimento de onda de excitação de 340 nm e monitorização de emissão no intervalo de 349 a 354 nm.

Microscopia Eletrônica

A microscopia foi realizada em um microscópio eletrônico de transmissão modelo LEO 902. Foram utilizadas grades de cobre revestidas com filme de carbono, nas quais foram colocadas 5 μ L de suspensão por grade, com amostras de soluções de Ec de 0,5 mg/mL. Após 4 minutos as grades foram tratadas com solução contrastante de acetato de uranila 1% (Raghavendra *et al.*, 1986). Para as microscopias foram escolhidas as amostras em tampão 50 mM, utilizando-se o Tris HCl para as amostras em pH 7,4. As amostras foram submetidas à microscopia eletrônica fixadas nas condições pós pressão. A fixação das amostras sob alta pressão foi realizada através de uma cubeta de quartzo com dois

compartimentos separados na parte inferior, onde de um lado foi colocada a solução de Ec e do outro lado uma solução de glutaraldeído 0,5% como fixador. A parte superior da cubeta foi preenchida com duodecano. As amostras foram comprimidas até a pressão de 220 MPa por tempo determinado, e então a câmara de alta pressão era invertida e agitada vigorosamente por cerca de 10 minutos, para que houvesse mistura da amostra de proteína e de fixador. Feito isso, as amostras foram descomprimidas e em seguida retiradas da cubeta para serem analisadas por microscopia eletrônica.

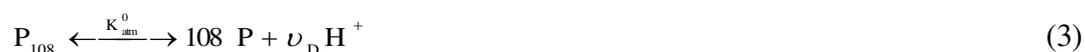
Gel filtração em Cromatografia Líquida de Alta Performance

As modificações estruturais da dissociação da Ec da amostra após incubação sob alta pressão foram monitoradas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foi realizado em um cromatógrafo modelo “Shimadzu HPLC System”, e coluna GPC 300 (250 X 4,6 mm de diâmetro interno) (Synchropack, Inv., Linden, In), com fluxo de 0,3 mL/min e com monitoração da absorvância à 280 nm. Considerou-se o volume de exclusão da coluna (V_o) como o volume de eluição do TMV (40.000 kDa), e o volume total (V_t) foi determinado utilizando-se albumina humana (64 kDa).

Através do dicroísmo circular podemos acompanhar eventuais mudanças drásticas na estrutura secundária da proteína, induzidas pelo efetor uréia (dados não mostrados). O espectropolarímetro utilizado para os experimentos de dicroísmo foi o Jasco J-810 modelo 1505. As amostras de Ec foram diluídas a uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato de sódio, adicionadas a uma cubeta de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico. O intervalo de comprimento de onda de leitura foi de 190 a 260 nm, com uma velocidade de 100 nm/min.

CONSIDERAÇÕES TERMODINÂMICAS

A molécula de Hb extracelular de *G. Paulistus*, foi considerada como a de *Lumbricus terrestris*, que possui 108 subunidades dissociantes, pois ambas apresentam propriedades estruturais muito similares. Cada dodecâmero é formado por três trímeros (abc) unidos por pontes dissulfeto e três cadeias monoméricas designadas cadeias (d). A dissociação desta proteína em suas subunidades e a adicional participação de prótons neste processo pode ser expressa como sugere modelo proposto pelo grupo de nosso laboratório



onde P_n é o agregado protéico composto para $n = 108$ subunidades P , às quais incluem as subunidades dissociantes do tipo *linker*. K_{atm}^0 corresponde à constante de equilíbrio de dissociação, considerando como condições de referência o $pH = 0$ e pressão atmosférica, ν_D é o número total de prótons liberados ou absorvidos durante a dissociação. Para $\nu_D > 0$, há liberação de prótons durante a dissociação, enquanto por outro lado, para $\nu_D < 0$, há uma absorção de prótons pela proteína durante a dissociação.

A relação de equilíbrio em termos apenas das concentrações, considerando caso ideal, que corresponde à Eq. (3) é

$$K_{atm}^0 = \frac{[P]^{108} [H^+]^{\nu_D}}{[P_{108}]} \quad (4)$$

Como a Hb é bastante suscetível à dissociação alcalina, o experimento foi realizado em pH fixo e com rigoroso controle. Considerando $K_{atm} = K_{atm}^0 / [H^+]^{\nu_D}$, temos

$$K_{atm} = \frac{[P]^{108}}{[P_{108}]} \quad (5)$$

Expressando essa constante em termos termodinâmicos, combinando a variação de volume com a pressão (Ruan and Weber, 1989) temos

$$\Delta G_p = \Delta G_{am} + p \Delta V \quad (6)$$

onde ΔG_p e ΔG_{am} correspondem, respectivamente, à energia livre de dissociação a uma dada pressão p específica e à condições atmosféricas.

A constante de equilíbrio de dissociação derivada da Eq.(6) corresponde a

$$K_p = K_{am} \exp \left(\frac{-p \Delta V}{RT} \right) = \frac{[P]_p^{108}}{[P_{108}]_p} \quad (7)$$

onde R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta. O subscrito p indica que os respectivos parâmetros são obtidos à pressão p . A Eq. (7) reescrita em termos de grau de dissociação α , i.e., em termos da razão entre a quantidade de subunidades protéicas que se dissocia e a quantidade total de proteína, fornece uma correlação direta com os dados experimentais, como segue

$$K_p = K_{am} \exp \left(\frac{-p \Delta V}{RT} \right) = \frac{108^{108} C^{107} \alpha^{108}}{(1-\alpha)} \quad (8)$$

onde C é a concentração total de proteína e α , o grau de dissociação observado em cada pressão, dado pela Eq. 2. A forma logarítmica da Eq. (8) conduz à relação linear

$$\ln(K_p) = \ln(K_{am}) - \left(\frac{\Delta V}{RT} \right) p = 108 \ln 108 + 107 \ln C + 108 \ln \alpha - \ln(1-\alpha) \quad (9)$$

Note aqui que consideramos $[P] = 108 \alpha C$ e $[P_{108}] = (1-\alpha) C$

O gráfico de $\ln(K_p)$ versus p fornece uma reta na qual os coeficientes linear e angular são dados pela Eq. (9) fornecendo, respectivamente, os valores para $\ln(K_{am})$ e ΔV .

Dos resultados obtidos para $\ln(K_{atm})$, utilizando os dados experimentais calculados na Eq. (9) para cada temperatura, é obtido o ΔG_p para cada temperatura, que permite calcular a entropia ΔS e entalpia ΔH de dissociação através da relação

$$\Delta G_{atm} = -RT \ln(K_{atm}) = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

e

$$\ln(K_{atm}) = \frac{\Delta S}{R} - \left(\frac{\Delta H}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (11)$$

Deste modo, se pode assim expressar o gráfico $\ln(K_{atm})$ em função de $1/T$, obtendo o assim conhecido gráfico de van't Hoff, que fornece os valores de ΔS e ΔH de dissociação a partir, respectivamente, dos coeficientes linear e angular. Das relações fundamentais da termodinâmica descritas para a energia interna U e para a energia livre de Helmholtz A , novas informações com referência às mudanças de energia envolvidas no processo de dissociação podem ser obtidas (Wyllen, 1985)

$$U_i = H_i - pV_i \quad \text{e} \quad A_i = U_i - TS_i \quad (12)$$

onde o subscrito (i) indica que cada propriedade intensiva está relacionada a uma dada espécie (i) na solução. Para um processo que envolve equilíbrio químico entre produtos e reagentes, uma outra relação pode ser ainda obtida da Eq. (12)

$$\Delta U = \Delta H - p\Delta V \quad \text{e} \quad \Delta A = \Delta U - T\Delta S \quad (13)$$

onde as mudanças de volume e energia calculadas da Eq. (13) são para um processo no qual espécies químicas estão envolvidas. No caso do processo de dissociação analisado aqui, a Eq. (13) pode ser utilizada para calcular a variação de energia interna, ΔU , e de variação de energia de Helmholtz, ΔA , de dissociação a uma dada pressão e temperatura.

RESULTADOS

Efeito da temperatura e pressão sobre o estado de agregação da Hb de *G. paulistus*

O estado de agregação da Hb (0,5 mg/mL, pH 7,4) foi estudado através de medidas de intensidade de espalhamento de luz em diferentes condições de temperatura e pressão. Foram realizadas trélicas para todos os experimentos e o valor com menor nível de incerteza sempre fora o adotado. À pressão atmosférica, Fig. 3, observa-se diminuição do espalhamento de luz com o aumento da temperatura, indicando significativa dissociação. O respectivo grau de dissociação (α) foi calculado através da Eq. 2, Fig. 3 inclusão, onde se considerou a forma 100% associada a Hb a 276 K, e totalmente dissociada a Hb a 343 K. Se observa que há aproximadamente 50% de dissociação para a amostra entre 313 K e 343 K. O aumento de temperatura induz a dissociação de maneira acentuada de 273 K até 280 K e de 303 k até 313 K. Entre estes intervalos se observou também a indução da dissociação com o aumento de temperatura, porém com efeito bem menos acentuado.

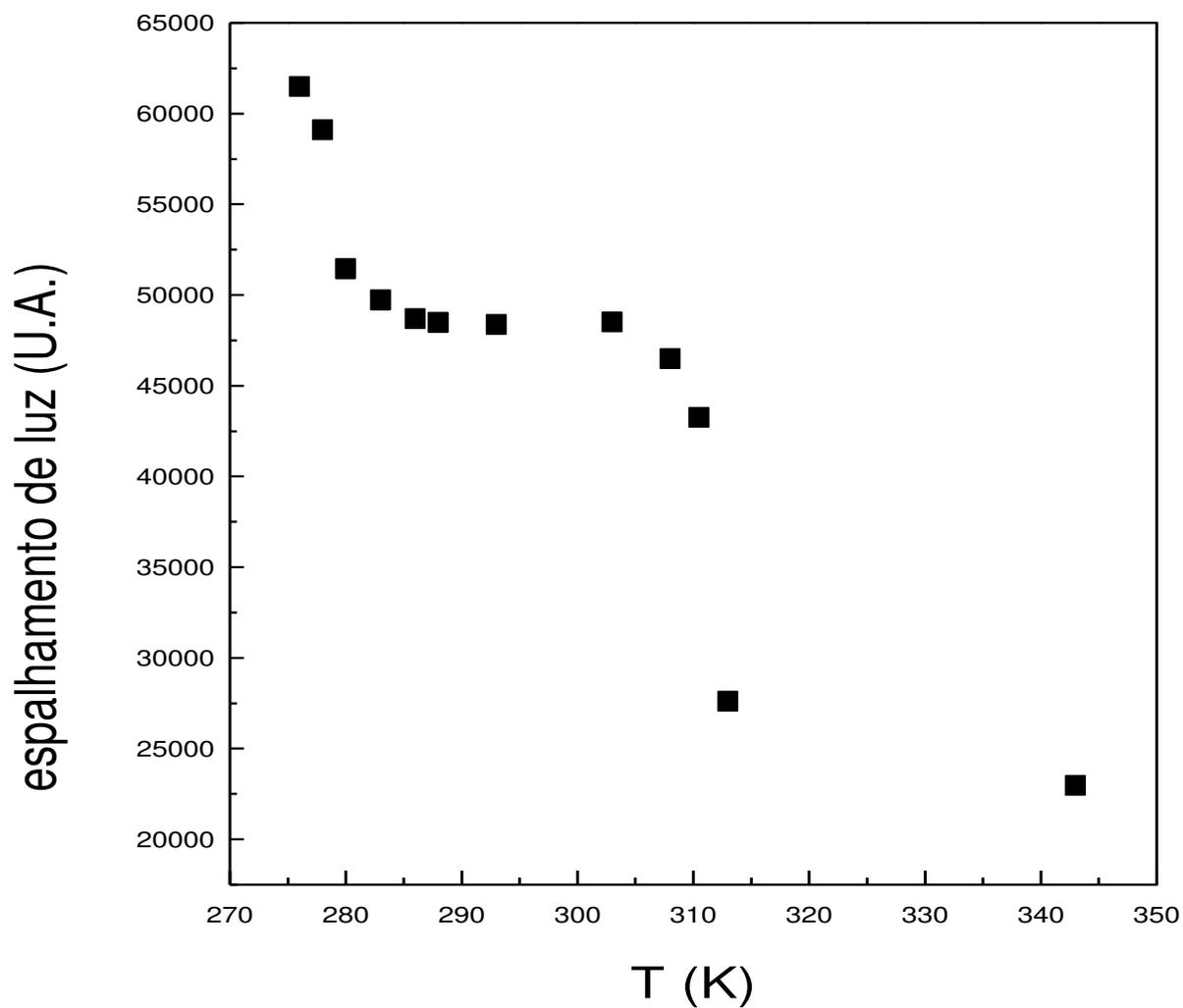


Figura 3. Efeito da temperatura sobre a intensidade de espalhamento de luz na Hb extracelular *G. paulistus* à pressão atmosférica. Solução de 0,5 mg de Hb/mL em tampão de Tris HCl 50 mM de pH 7,4. Incubou-se a solução de Hb por 2h após equilíbrio térmico, fazendo-se em seguida as medidas espectroscópicas. Inclusão: grau de dissociação α em função da temperatura, Eq. 2, $\alpha_p = (S_i - S_p)/(S_i - S_f)$. U.A., unidades arbitrárias.

O efeito de pressão na Hb em diferentes temperaturas é mostrado na Fig. 4, e o respectivo grau de dissociação, calculado através da Eq. 2, na Fig. 5. Observou-se que a pressão induz dissociação em qualquer temperatura das estudadas nesse trabalho. Por outro lado, o efeito da temperatura foi mais complexo em relação à dissociação. A Fig. 6 mostra o efeito da temperatura na variação da intensidade de espalhamento de luz na dissociação da Hb, quando a amostra está a 50 MPa e a 100 MPa, onde se observa significativa dissociação em dois intervalos distintos, de 276 K a 293 K e de 303 K a 343 K. O aumento de temperatura promove processo de dissociação bastante acentuado até 280 K e a partir de então, mesmo o efeito de temperatura facilitando a dissociação, esta ocorre com menor intensidade até 293 K. A partir de 303 K, o processo de dissociação se mostra acentuado até 313 K, com pouca alteração até 343 K. Na Fig. 6 inclusão, comparativamente, tem-se o efeito da temperatura sobre a intensidade de espalhamento de luz na Hb à pressão atmosférica.

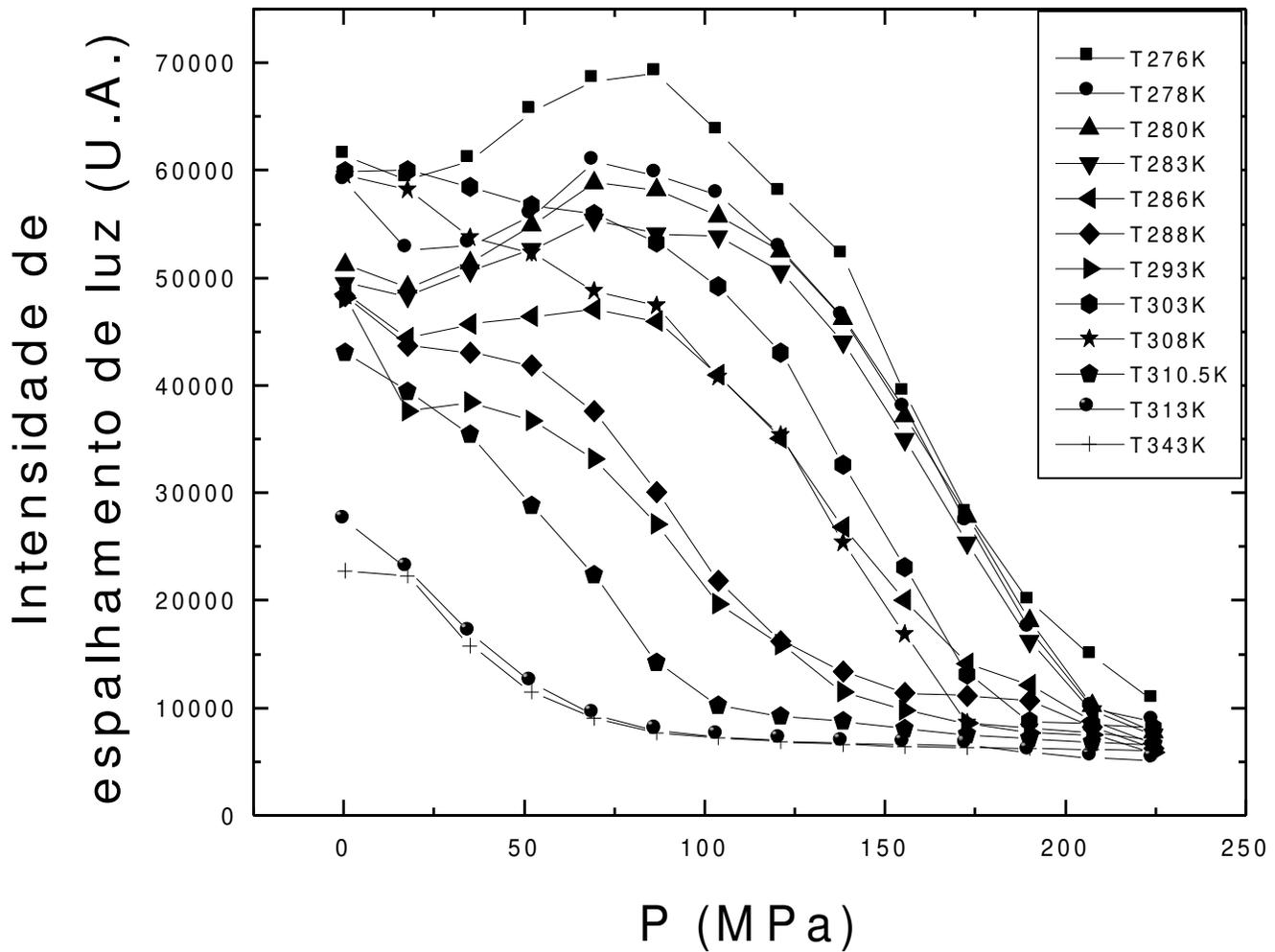


Figura 4. Efeito da pressão e temperatura sobre a Hb extracelular. Após 2h de incubação na temperatura determinada, o experimento foi iniciado, e a cada aumento de pressão foi realizada incubação de 45 min. Demais condições como observado na Fig. 3.

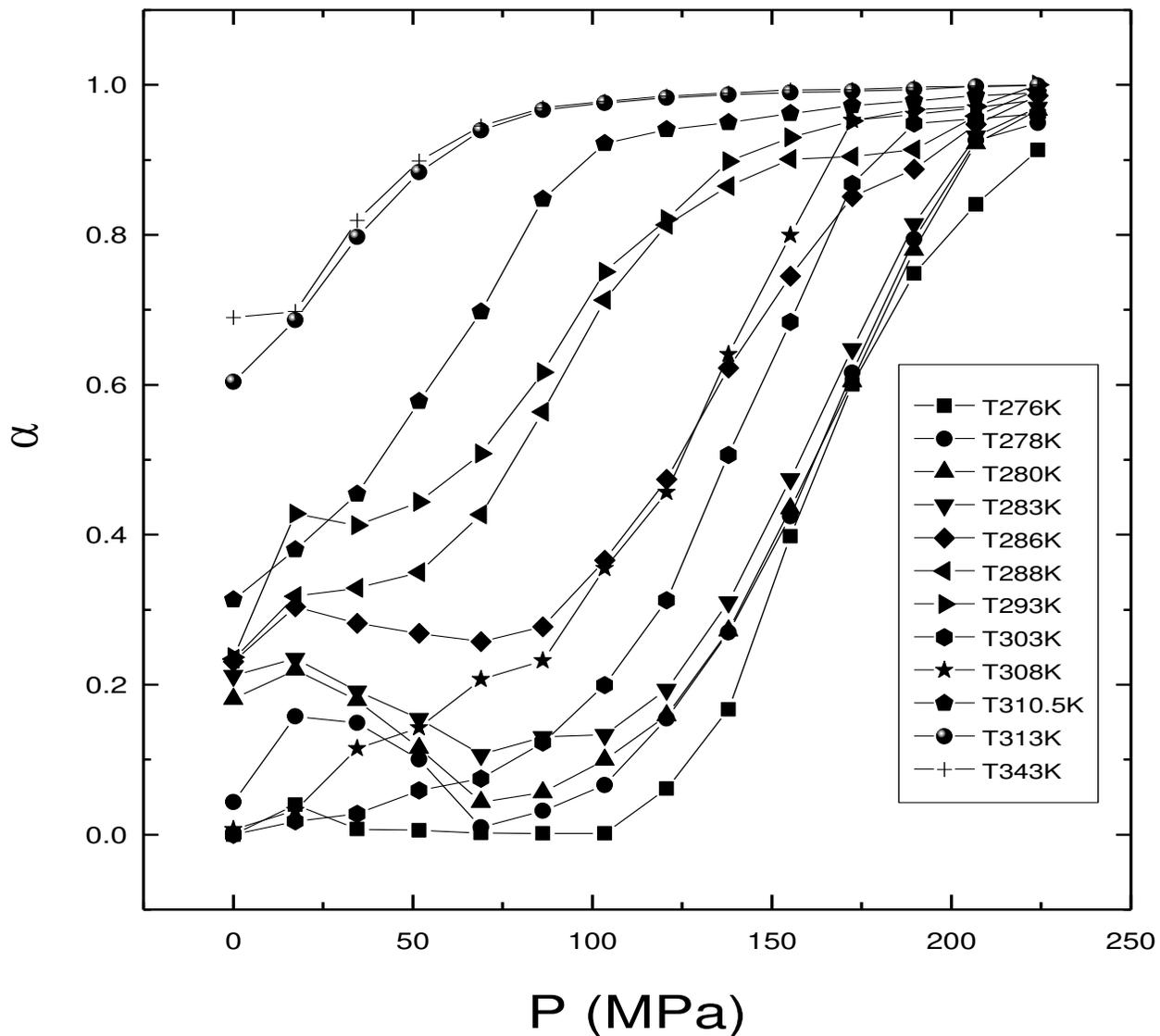


Figura 5. Grau de dissociação α em função da pressão e para cada temperatura calculado através da Eq. 2, $\alpha_p = (S_i - S_p)/(S_i - S_f)$, segundo os resultados da Fig. 4. Foi assumido que o maior valor de intensidade de espalhamento de luz (pressão atmosférica e 276 K) correspondem ao ponto de 100% de associação e o menor valor (220 MPa e 343 K), ao ponto de 100% de dissociação.

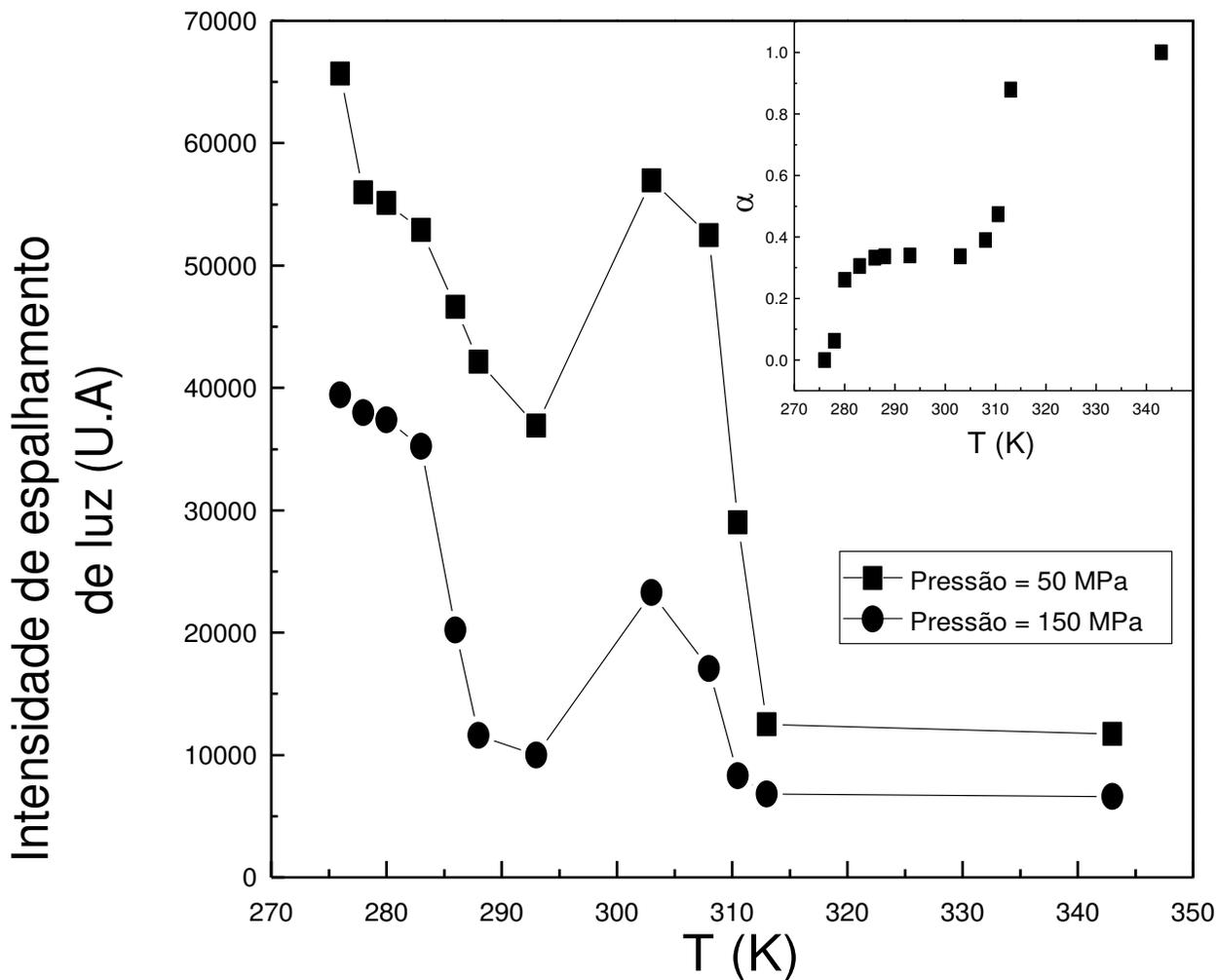
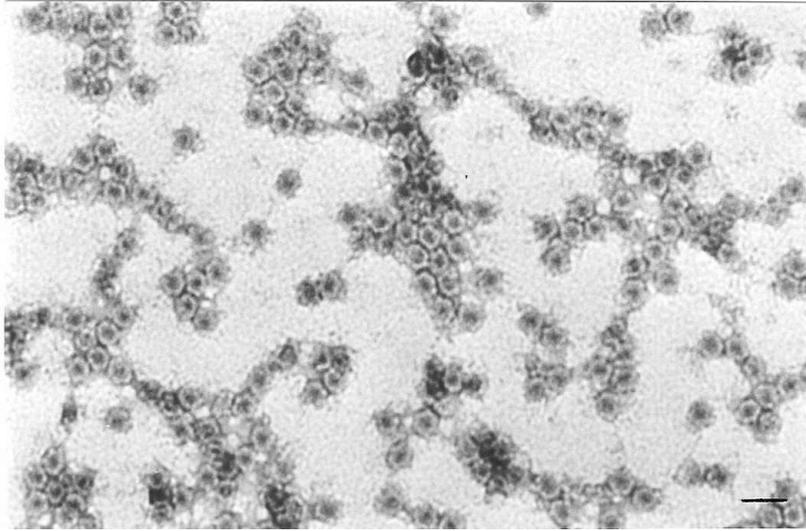


Figura 6. Efeito da temperatura na intensidade de espalhamento da dissociação da Hb à pressão de 50 MPa e 150 MPa. Inclusão: grau de dissociação α em função da temperatura, em unidades arbitrárias (U.A), segundo a Eq. 2, $\alpha_p = (S_i - S_p)/(S_i - S_f)$, associado ao mesmo efeito da temperatura sobre a intensidade de espalhamento de luz na Hb, mas à pressão atmosférica (Figura 3). Solução de 0,5 mg/mL, pH de 7,4.

O efeito da pressão na estrutura da Hb extracelular a 298 K (0,5 mg/mL, pH 7,4) foi investigado através de microscopia eletrônica de transmissão. À pressão atmosférica, Fig. 7A, observam-se inúmeras estruturas hexagonais, compatíveis com a Hb na forma nativa. Após incubação de 220 MPa por 100 min., Fig. 7B, observa-se ausência de imagens correspondentes à forma agregada, sugerindo processo de dissociação importante.

A Fig. 8 mostra o perfil de eluição da amostra através de cromatografia de alta performance em gel filtração (HPLC) à pressão atmosférica (linha tracejada, controle) e após incubação em alta pressão (linha contínua). Notou-se a eluição da amostra controle próximo ao volume de exclusão da coluna (V_0), indicando alto peso molecular. Após incubação a pressão de 220 MPa se observou tempo de eluição mais longo, correspondendo a produtos da dissociação de baixo peso molecular.

(A)



(B)

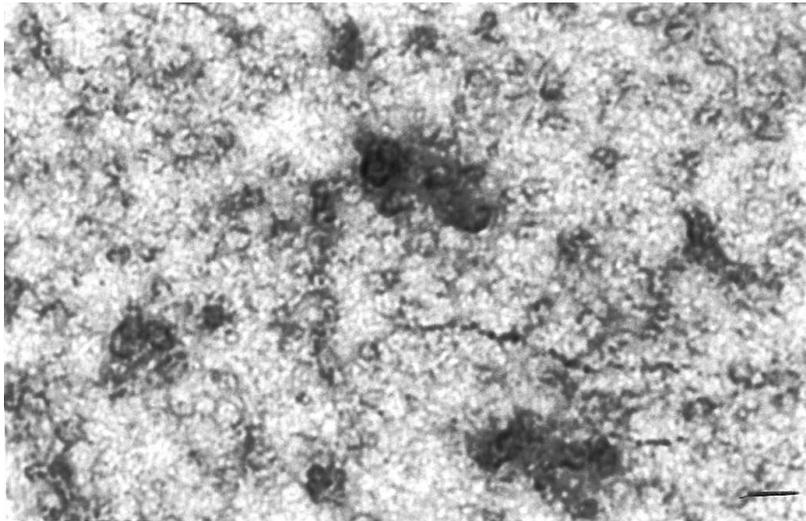


Figura 7. Microscopia eletrônica da Hb extracelular a 298 K (0,5 mg/mL, pH 7,4). (A) pressão atmosférica, (B) após incubação de 100 min. a 220 MPa. Fixação: glutaraldeído 0,5%. Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. A barra de calibração corresponde a 50 nm.

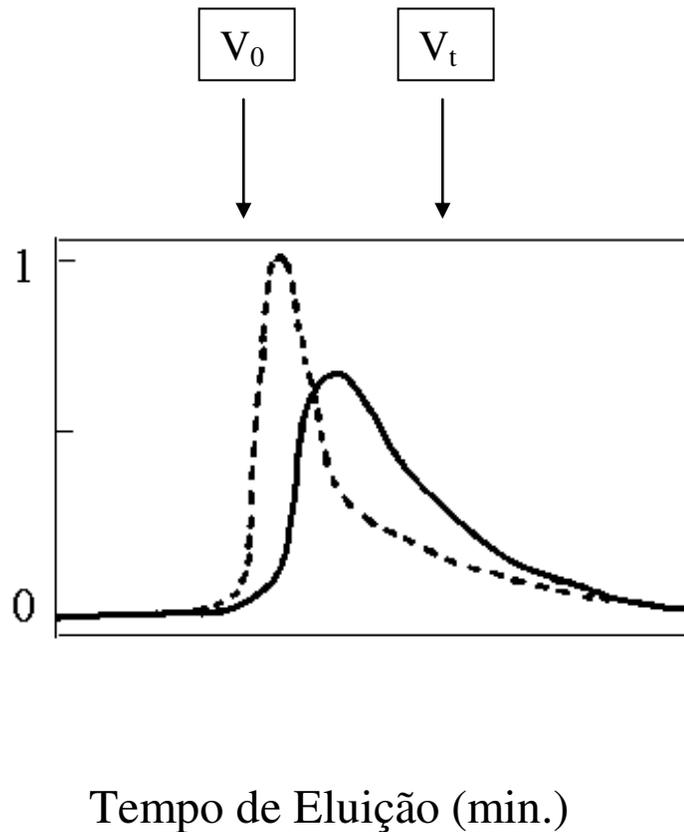


Figura 8. Cromatografia líquida de alta performance em gel filtração da Hb à pressão atmosférica (linha tracejada, controle) e após 100 min. de incubação à pressão de 220 MPa (linha contínua). No eixo vertical, escala de absorbância a 280 nm. Foram aplicados 100 μ L da amostra e o fluxo utilizado foi de 0,3 mL/ min, com monitoração da absorbância a 280 nm. Considerou-se o volume de exclusão da coluna (V_0) como o volume de eluição do TMV (40.000 kDa), e o volume total (V_t) foi determinado utilizando-se albumina humana (64 kDa). Demais condições iguais a da Fig. 7. Dados de absorbância em U.A., unidades arbitrárias.

Na Fig. 9 observam-se os resultados de $\ln(\kappa_p)$ versus p obtidos através da Eq. 9, onde os coeficientes linear e angular correspondem, respectivamente, aos valores de $\ln(\kappa_{atm})$ e de ΔV . A Fig. 10 mostra o cálculo do ΔG_{atm} por mol de subunidade de Hb extracelular em função da temperatura através da Eq 10, onde se observou acentuada diminuição da energia livre de dissociação na elevação da temperatura de 276 K a 343 K. No intervalo de 276 K a 293 K, a variação da energia foi de 39,71 para 28,02 kJ/mol de subunidade de Hb, portanto, com uma energia de estabilização de 11,71 kJ/mol de subunidade de Hb e, no intervalo de 303 K a 313 K, foi de 36,61 a 28,18 kJ/mol de Hb, correspondendo a uma energia de estabilização de 8,43 kJ/mol de subunidade de Hb. O efeito da variação de temperatura no volume de dissociação é mostrado na Fig. 10 inclusão, onde se observou uma diminuição em valores absolutos de -78,20 para -16,60 mL/mol de subunidade de Hb no intervalo de 276 K a 293 K, correspondendo a uma variação de 61,60 mL/mol de subunidade de Hb, e uma diminuição de -66,66 para -10,44 mL/mol de subunidade de Hb, portanto, uma variação de -56,22 mL/mol de subunidade de Hb, no intervalo de 303 K a 313 K.

Tais resultados indicam que as espécies dissociadas presentes na solução apresentaram uma nova conformação após incubação a alta pressão e elevação de temperatura, sugerindo processo ocorrendo em duas etapas distintas, com mudanças conformacionais semelhantes em cada um desses intervalos, levando a drástica diminuição, em valores absolutos, do ΔV .

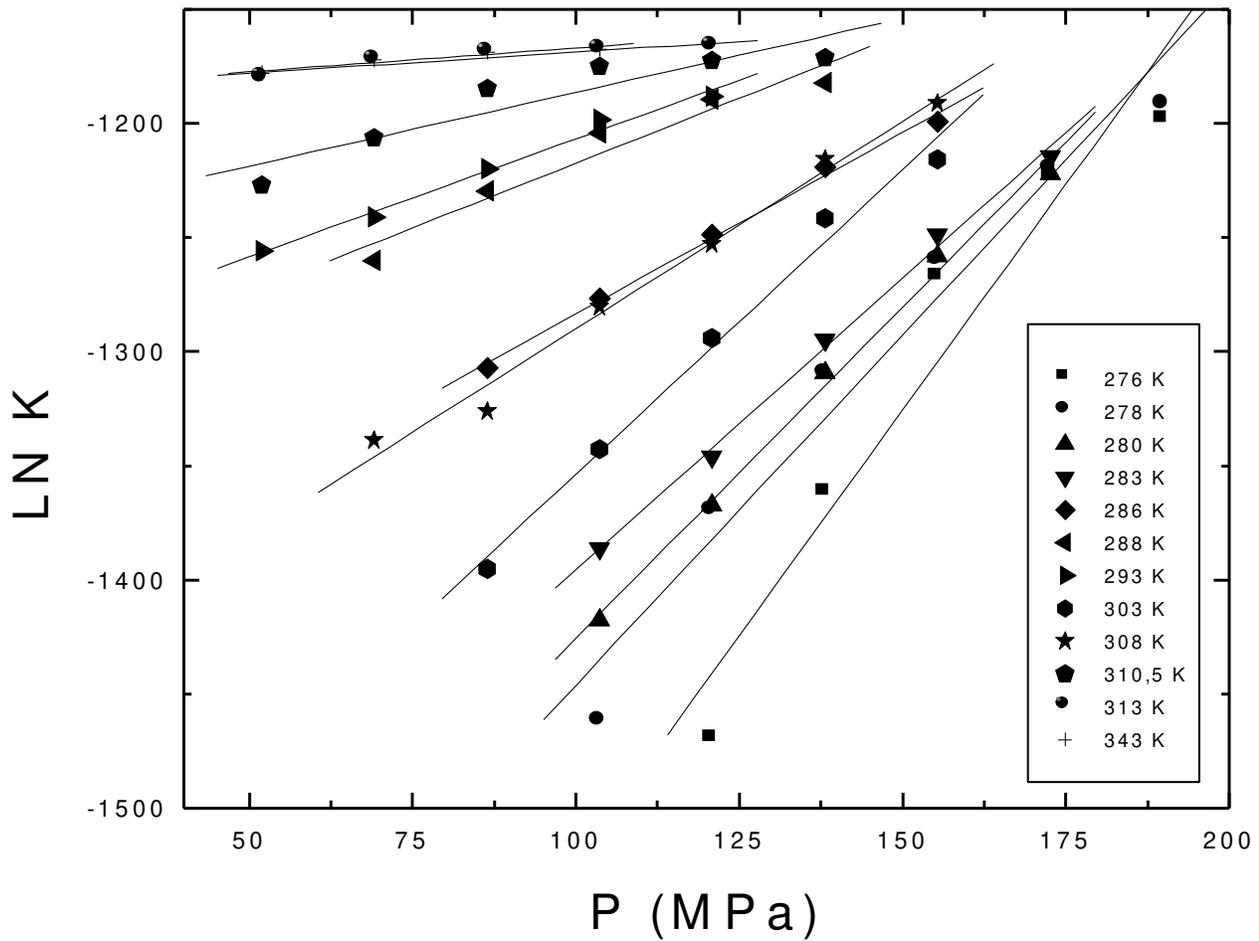


Figura 9. Resultados de $\ln \kappa_p$ em função da pressão, correspondendo aos resultados na Fig. 4, calculados a partir da Eq. (9) descrita na teoria termodinâmica apresentada

$$\ln(K_p) = \ln(K_{atm}) - \left(\frac{\Delta V}{RT}\right)p = 108 \ln 108 + 107 \ln C + 108 \ln \alpha - \ln(1-\alpha).$$

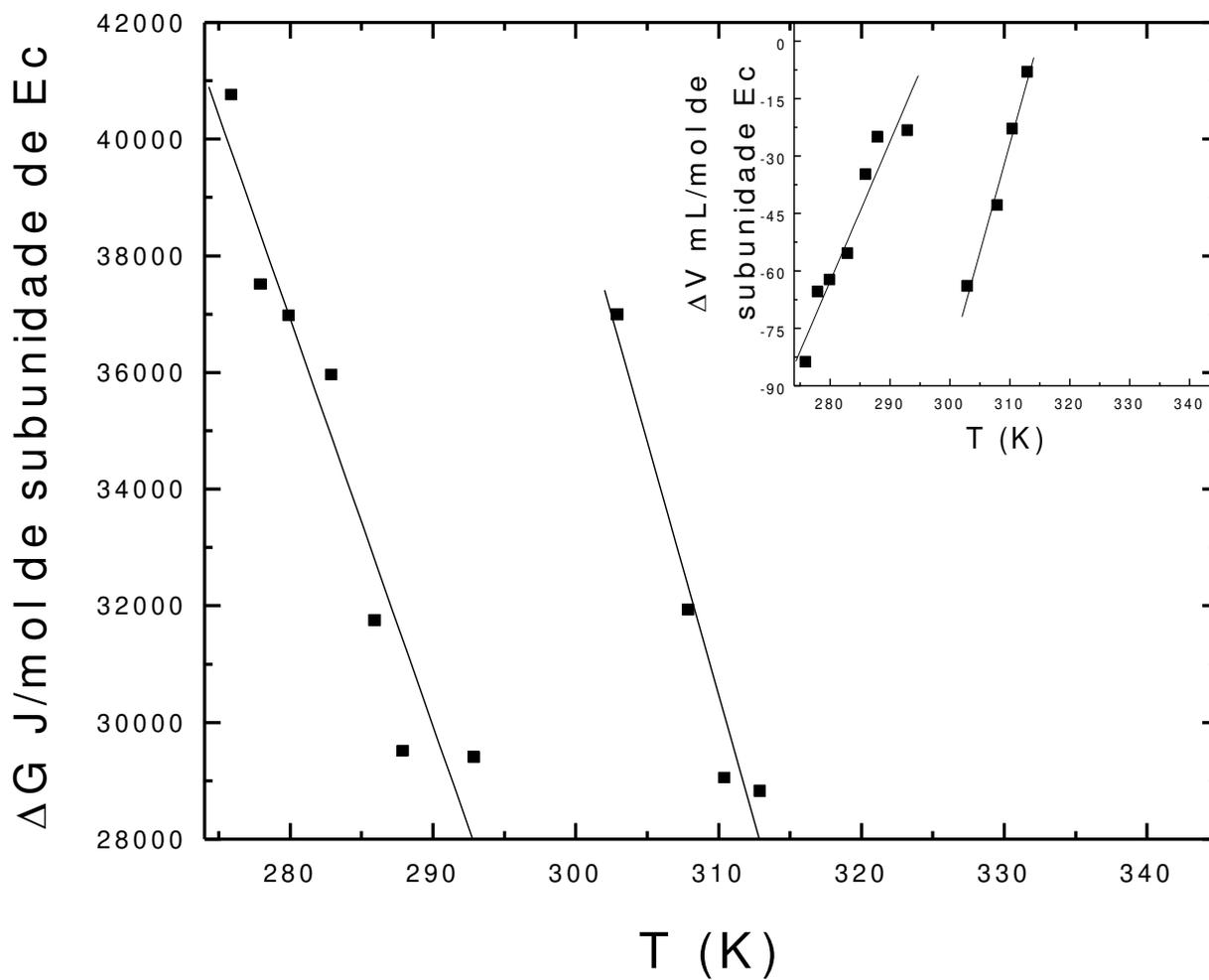


Figura 10. Efeito da temperatura sobre a energia livre de Gibbs de dissociação da Hb, correspondente aos dados da Fig. 4. Resultados obtidos a partir da Eq.10 descrita na teoria $\Delta G_{atm} = -RT \ln (K_{atm}) = \Delta H - T\Delta S$. Na Figura 10, inclusão: efeito de temperatura no volume de dissociação.

É possível obter informações adicionais sobre a termodinâmica do processo de dissociação da Hb extracelular. A Fig. 11 mostra o gráfico de Vant'Hoff que possibilita o cálculo dos valores de variação de entalpia e entropia, ΔH e $T\Delta S$, através da Eq. 11. Entre 276 K e 293 K, tomando-se um valor médio de temperatura de 286 K neste intervalo, foi obtido um valor de $T\Delta S = 21,32$ MJ/mol de Hb e, para o intervalo de 303 K a 313 K, partindo-se de um valor médio de temperatura de 308 K, foi obtido um valor de $T\Delta S = 27,30$ MJ/mol. Para a entalpia, no intervalo de 276 K e 293 K, foi obtido um valor de $\Delta H = 24,87$ MJ/mol de Hb e, para o intervalo de 303 K a 313 K, um valor de $\Delta H = 30,78$ MJ/mol. Estes valores sugerem que a dissociação da Hb ocorre como um processo fortemente endotérmico e coordenado predominantemente pela contribuição entálpica no sistema.

Os resultados então foram utilizados considerando-se desprezível a variação de volume de dissociação à temperatura de 293 K, onde foram obtidos, através da Eq. 13, valor da variação de energia interna e da variação da energia livre de Helmholtz, ΔU e ΔA , respectivamente. No intervalo de 276 K e 293 K, foi obtido um valor de $\Delta U = 24,87$ MJ/mol de Hb e de $\Delta A = 3,54$ MJ/mol. Para o intervalo de 303 K a 313 K, foi obtido um valor de $\Delta U = 30,78$ MJ/mol de Hb, e de $\Delta A = 3,49$ MJ/mol.

Apenas como análise complementar, se estudou o comportamento da Hb através de dicroísmo circular. As amostras foram diluídas a uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, e adicionadas a uma cubeta de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico. O intervalo de comprimento de onda de leitura foi de 190 a 260 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. Os resultados (dados não mostrados na tese) revelaram que a Hb apresentou estrutura secundária compatível com a forma nativa na ausência de uréia e pressão. Em situação extrema de concentração de uréia e pressão, como esperado, tal conformação se mostara seriamente comprometida.

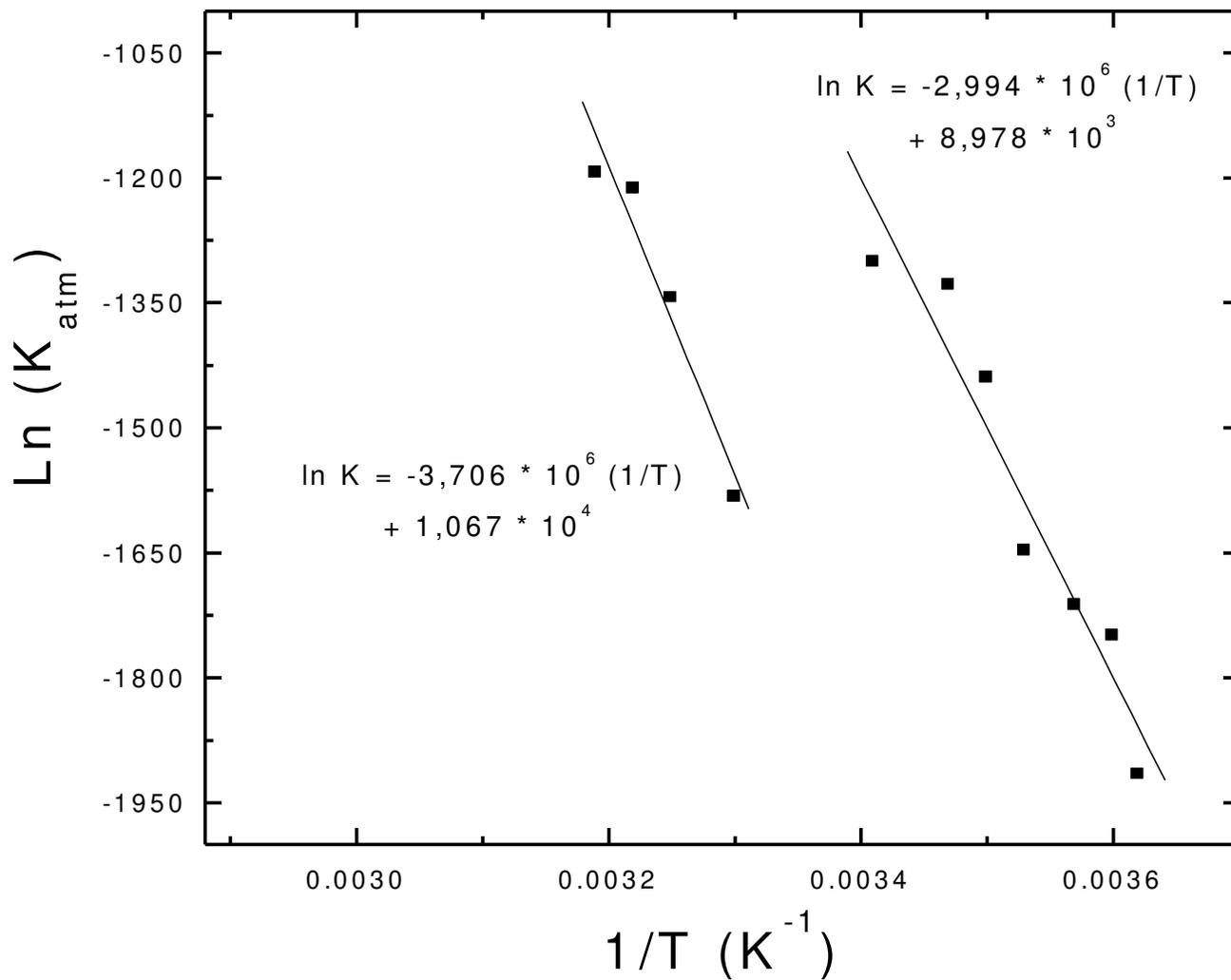


Figura 11. Gráfico que relaciona $\ln(K_{atm})$ com $1/T$, gráfico de van't Hoff. É calculado

através da Eq. 11, $\ln(K_{atm}) = \frac{\Delta S}{R} - \left(\frac{\Delta H}{R}\right)\frac{1}{T}$, e fornece os valores de $T\Delta S$ e ΔH .

DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra quantitativamente o efeito da temperatura na estabilidade da Hb extracelular de *G. Paulistus*, a eritrocruorina. Estudos realizados sobre o processo de dissociação em Hbs extracelulares têm focado o efeito de prótons, especialmente em pH alcalinos, como no caso da *L. terrestris* (Chiancone *et al.*, 1972, David & Daniel, 1974, Vinogradov *et al.*, 1977, Kapp *et al.*, 1984), da *Eisenia foetida* (Frossard, 1982, Ochiai & Enoki, 1981), dos poliquetos tais como *Arenicola* (Vinogradov *et al.*, 1980, Pionetti & Pouyet, 1980) e da *Arenicola affinis affinis* (Chung & Ellerton, 1982). Estes estudos consideram a ocorrência simultânea de diversos equilíbrios e sugerem que as taxas de desorganização e organização de subunidades livres em contato com as moléculas de água venham a ser competitivas. Ou seja, as constantes trocas entre subunidades no processo dissociativo são dependentes do pH e controlam a velocidade de agregação protéica. Recentemente em nosso laboratório foi determinado quantitativamente o efeito do próton na dissociação da Hb de *G. paulistus* (Bispo *et al.*, 2007), onde se observou a liberação de 0,602 mol de prótons por mol de subunidade. Em contraste a estas análises, não existem estudos detalhados sobre o efeito da temperatura na dissociação destas Hbs.

Os resultados obtidos com a Ec neste estudo forneceram informações sobre a dependência da temperatura na dissociação, e conduziram à determinação de parâmetros termodinâmicos relacionados com este processo. Os experimentos de dissociação por pressão em diferentes condições de temperatura indicaram que a temperatura induz mudanças estruturais significativas na Hb. O uso de alta pressão para quantificações termodinâmicas possibilita investigar tais aspectos sem conduzir a proteína a processo de desnaturação.

Diversos fatores contribuem para a variação do volume de dissociação, como a quebra de pontes salinas, o empacotamento imperfeito do polipeptídeo, e o surgimento de um volume de solvatação resultante das interações existentes de grupos químicos com o solvente (Kauzmann, 1987; Akasaka and Li, 2001; Royer, 2002; Hoa *et al.*, 2002). O efeito da elevação da temperatura certamente altera a contribuição dos fatores mencionados, e de maneira complexa, pois induz a uma redução da variação do volume de dissociação (em

valores absolutos) em dois intervalos. Em temperatura intermediária a esses intervalos, cerca de 303 K, observou-se aumento abrupto do ΔV .

A estabilidade dos produtos de dissociação representa outro aspecto relevante nos resultados obtidos, observado tanto para esta Ec (Silva *et al.*, 1989. Bonafe *et al.*, 1991, Bispo *et al.*, 2005, Bispo *et al.*, 2007), para hemocianina de gastrópode (Bonafe *et al.*, 1994), e para estruturas virais, como por exemplo o TMV (Santos *et al.*, 2004). O fenômeno é relacionado com a histerese na curva de dissociação de proteínas oligoméricas e corresponde a uma diminuição da energia livre de dissociação para as subunidades quando as mesmas estão dissociadas. Weber (1986) propôs que moléculas de água em contato com interfaces proteína-proteína de espécies dissociadas induzem mudança conformacional das subunidades pela exposição de regiões hidrofóbicas, explicando a posterior diminuição de afinidade entre subunidades. A formação dessas estruturas seria controlada por um processo que levaria em conta a extensão das exposições das subunidades livres ao solvente. Assim, se poderia explicar o grau de dissociação relativamente baixo observado durante um ciclo rápido de compressão/descompressão de proteína, com o progressivo aumento do grau de dissociação em ciclos compressão/descompressão mais longos (Weber, 1986, Bonafe *et al.*, 1994).

A Tab. 1 mostra os resultados finais obtidos nos diferentes intervalos de temperatura. A dissociação da Hb extracelular *G. paulistus* se mostrou bastante endotérmica com predominância da contribuição entálpica sobre entrópica durante o processo. A energia interna (ΔU) e a energia livre de Helmholtz (ΔA) calculadas indicaram complementarmente significativa variação nos estados energéticos das espécies envolvidas no processo de dissociação.

Parâmetro Termodinâmico	Intervalos de Temperatura		
	de 276 a 293 K	de 303 a 313 K	de 276 a 343 K
ΔG (kJ/mol de sub. de Ec)	11,71	8,43	11,56
$d(\Delta G)/dT$	"0,69 kJ / mol de sub Ec / T"	"0,87kJ / mol de sub Ec / T"	
ΔV (mL/mol de sub. de Ec)	61,64	56,22	67,76
$d(\Delta V)/dT$	"3,66 mL / mol de sub Ec / T"	"5,64 mL / mol de sub Ec / T"	
ΔS (kJ/mol.K de Ec)	74,57	88,62	81,59
ΔH (MJ/mol de Ec)	24,87	30,78	27,82
	T = 286 K	T = 308 K	T = 293 K
$T\Delta S$ (MJ/mol de Ec)	21,32	27,30	23,91
	$\Delta V=0$	$\Delta V=0$	$\Delta V=0$
ΔU (MJ/mol de Ec)	24,87	30,78	27,82
	T = 293 K	T = 293 K	T = 293 K
ΔA (MJ/mol de Ec)	3,54	3,49	3,92

Tabela 1. Resultados obtidos para a Hb extracelular de *G. paulistus* nos diferentes intervalos de temperatura.

Um aspecto que merece destaque nesse contexto é a análise mais detalhada das conseqüências de tais resultados à luz de determinados aspectos microscópicos termodinâmicos. Gregório Weber (1993) desenvolveu tal assunto a partir de experimentos já publicados sobre dissociação de oligômeros protéicos. Baseando-se em tal análise, consideremos inicialmente a molécula de Hb se dissociando nas 108 subunidades (Eq. (3)), e suas interações inter-subunidades e da proteína com o solvente. Assim, conforme pode ser observado na Fig. 13, cada subunidade tem suas interfaces hidratadas, e na associação, as moléculas de água passam a interagir entre si.

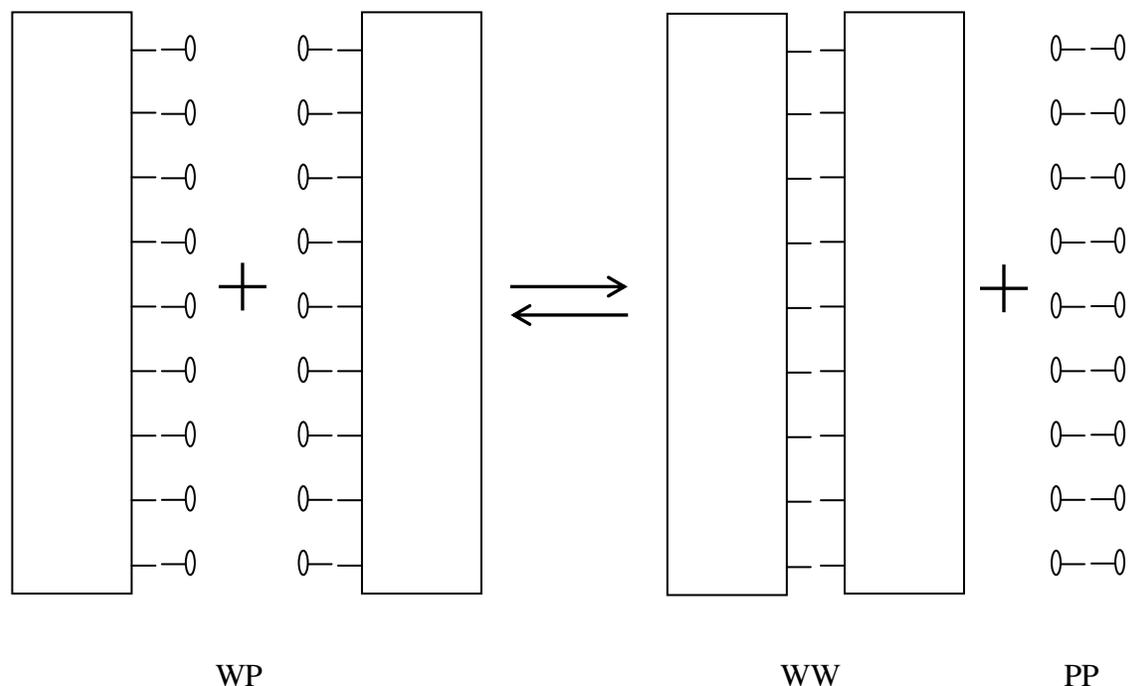


Figura 12. Esquema mostrando as mudanças de ligações de subunidades hidratadas nas interfaces em processo de associação. WP, WW e PP são indicados como as interações proteína-solvente, solvente-solvente e proteína-proteína, respectivamente. A entalpia e a entropia do processo relacionadas à estas interações correspondem a $\Delta H = \Delta H_{PP} + \Delta H_{WW} - 2\Delta H_{PW}$ e $\Delta S = \Delta S_{PP} + \Delta S_{WW} - 2\Delta S_{PW}$, respectivamente.

Para simplificar, duas subunidades apenas são mostradas, porém no caso da Hb obviamente há envolvimento de áreas adicionais da superfície. As respectivas variações de entalpia e entropia da reação, ΔH e ΔS , correspondem a:

$$\Delta H = \Delta H_{PP} + \Delta H_{WW} - 2\Delta H_{PW} \quad (14)$$

e

$$\Delta S = \Delta S_{PP} + \Delta S_{WW} - 2\Delta S_{PW} \quad (15)$$

onde os subscritos PP, WW e PW, como na figura, indicam os diferentes tipos de interação proteína-proteína, solvente-solvente e proteína-solvente. Nesse contexto, a dissociação de diferentes oligômeros corresponde a diferentes áreas de exposição, que devem ser

proporcionais ao número de interações. Uma proteína 1 cuja subunidade tem massa molecular $massa_1$ e área a ser exposta A_1 , comparando a uma outra proteína 2, com massa $massa_2$ e A_2 , a razão das áreas (A_1/A_2) deve ser proporcional a $(massa_1/massa_2)^{2/3}$, pois tem-se que a massa é proporcional ao volume V da proteína, e $(A_1/A_2)^{1/2}$ deve ser proporcional a $(V_1/V_2)^{1/3}$. Assim, considerando massa molecular da Hb 3,10 Mda / 108, ou 28,7 kDa, o número de interações proteína-proteína M é 110, por comparação a outros oligômeros (dímeros, trímeros e tetrâmeros) (Weber, 1993). Pelo fato de se tratar de uma proteína com muitas subunidades, esse número pode estar sendo subestimado, o que pode ser posteriormente discutido.

Assim, considerando que haja um elevado número M de interações idênticas por subunidade, e sendo p a probabilidade de encontrar qualquer das ligações rompidas, ou seja, ausentes, a distribuição de equilíbrio do número de ligações de uma proteína em solução deve obedecer a uma distribuição binomial da seguinte forma:

$$f_j = \binom{M}{j} (1-p)^j p^{M-j}; \quad 0 \leq j \leq M \quad (16)$$

onde $\binom{M}{j}$ é o coeficiente binomial, ou número de combinações de M objetos dados j em determinado instante, incluindo $j=0$. $(1-p)$ corresponde, por outro lado, à probabilidade complementar de se encontrar qualquer das ligações presentes. Para as 110 interações da Hb, considerando por exemplo $p = 0,3679$, a Fig. 13 mostra a distribuição normal do número de interações f_j , calculada pela Eq. 16, que mantém uma interface individual.

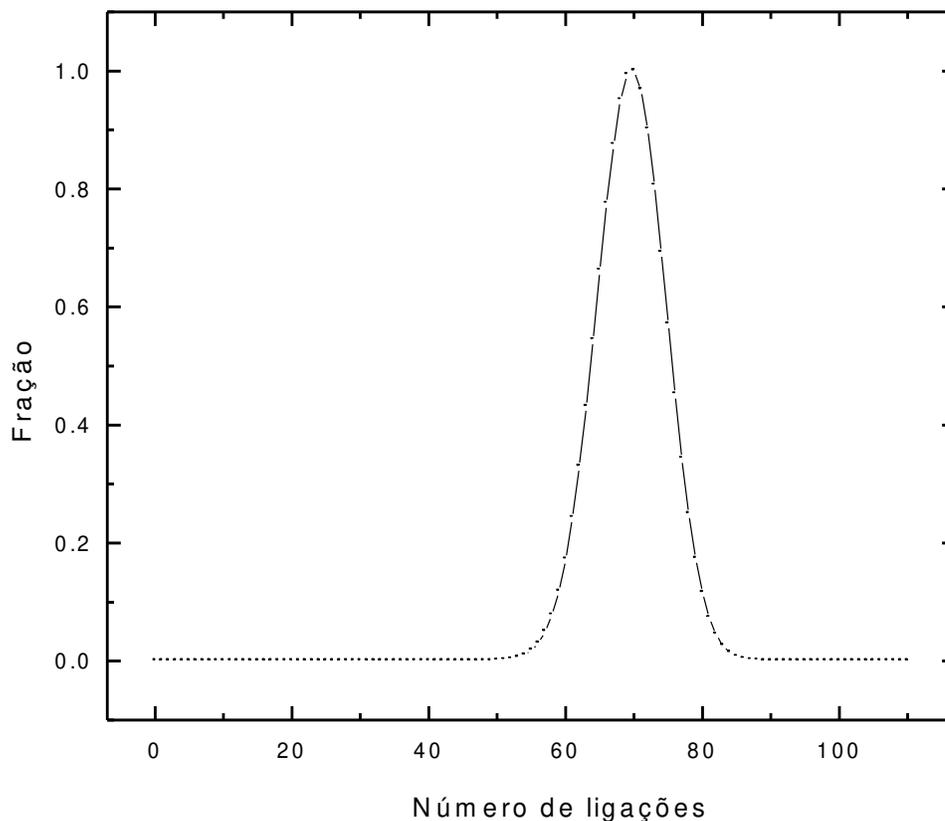


Figura 13. Distribuição populacional do número de ligações intersubunidade de proteína cujo número máximo de interações é $M = 110$, e a probabilidade de ocorrência de ligações rompidas corresponde a $p = 0,3679$.

Na figura se observa a maior probabilidade de presença de ligações rompidas numa região com maior número de ligações. A energia E da molécula pode ser calculada através de p :

$$p = \exp(-E/RT) \quad (17)$$

Analisando o efeito de p através da energia de ligações individuais em unidades de energia termal “ E/RT ”. A energia total E_t é dada através de:

$$E_t = E \sum_{j=0}^M j f_j \quad (18)$$

O cálculo da entropia pode ser feito utilizando a clássica relação de Boltzmann,

$$S = R \ln N \quad (19)$$

onde N é o número de “complexions”. São definidos como microestados energéticos e possui natureza que depende da probabilidade estacionária da existência de interações. Podemos assim considerar na distribuição mencionada que a entropia molar da mesma corresponde a

$$S = R \ln \left(\sum_{j=0}^M \binom{M}{J} f_j \right) \quad (20)$$

Nesse contexto, a energia atinge o valor $E_t = M E (1-p)$, aumentando com o número de ligações e com seus valores individuais, Figura 14, enquanto a entropia diminui rapidamente quando p diminui de 0,5 para qualquer valor, e diminui mais suavemente em valores acima de 0,5, Fig. 16.

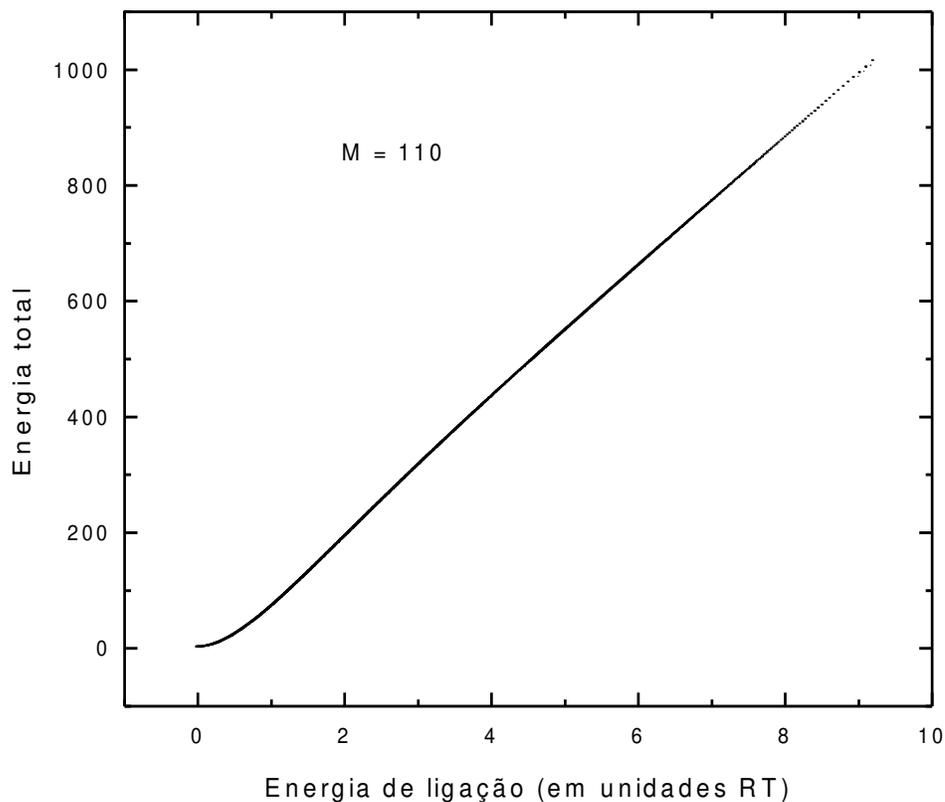


Figura 14. Dependência de entalpia de acordo com os diferentes valores de energia de ligação. Eq. (17), $p = \exp(-E/RT)$ e Eq. (18), $E_t = E \sum_{j=0}^M j f_j$.

A Tabela 2 a seguir mostra comparativamente os estudos envolvendo perturbações do equilíbrio de dissociação de oligômeros protéicos, incluindo a Hb extracelular do presente trabalho, através de alta pressão hidrostática.

Proteína	Subunidade			ΔH	T ΔS	Ref.
	Nº	Massa em kDa	Interações			
Hexoquinase de levedura	2	43	141	17	38	Ruan and Weber, 1988
Triptofano sintase de <i>E. coli</i> ^a	2	43	141	17,7	28,4	Weber, 1991
Rubisco de rodobacter ^b	2	55	166	6,0	18,9	Erijman <i>et. al.</i> , 1993
Dímero fosforilase A	2	95	239	4,0	17	Ruan and Weber, 1993
Aloficocianina	3	33	118	42	65	Foguel <i>et al.</i> , 1992
GAPDH	4	34	120	-14,1	17,8	Ruan and Weber, 1989
Tetrâmero fosforilase A	4	95	239	33	66	Ruan and Weber, 1993
Eritrocrucorina ^c	108	28,7	110	-55,05	-47,24	Este trabalho
Eritrocrucorina ^d	108	28,7	110	-68,18	-60,46	Este trabalho

^a A 4 °C. ^b A 15 °C. ^c A 13 °C. ^d A 35 °C. As energias de associação são obtidas por extrapolação à pressão atmosférica, portanto se minimizando os efeitos de “deriva conformacional” (Silva and Weber, 1986, Ruan & Weber, 1989). São assumidos os mesmos números de interações para os contatos solvente-solvente, proteína-proteína e proteína solvente.

Tabela 2. Contribuições de entalpia (ΔH) e entropia (T ΔS), em kcal mol⁻¹, para a energia livre de associação dos oligômeros a 1 °C.

Exceto para a molécula de Hb, pode ser observado que as contribuições das mudanças de entalpia nas mudanças de energia livre de associação são menores que as mudanças de entropia (T ΔS), e muito mais freqüentemente positivas. Assim, as mudanças de entalpia quase sempre se opõem à associação. Em contraste, também excetuando a Hb, as mudanças de entropia (T ΔS) de associação são elevadas e positivas, e responsáveis pela

grande preponderância de agregados em relação a subunidades isoladas nas concentrações fisiológicas dos oligômeros. Podemos, no entanto, notar que no presente estudo ocorreu um comportamento oposto aos outros citados, pois temos entalpia e entropia de associação negativas no processo de associação, e uma preponderância da entalpia sobre a entropia, quando analisamos os valores absolutos.

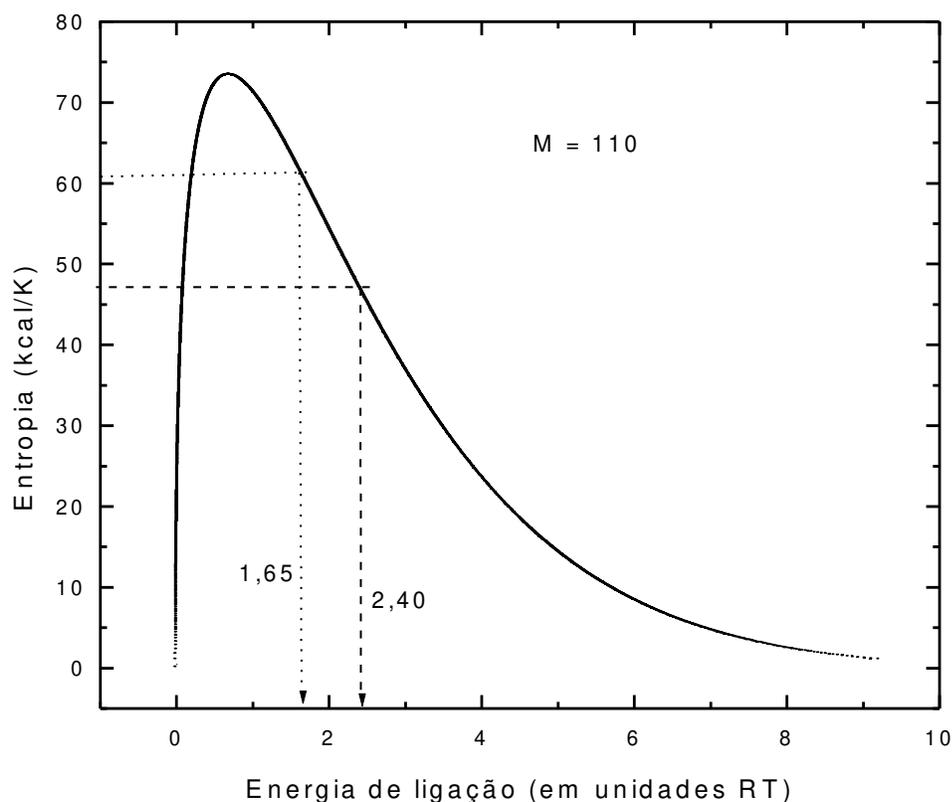


Figura 15. Dependência de entropia de acordo com os diferentes valores de energia de ligação. Eq. (17), $p = \exp(-E/RT)$, e Eq. (20), $S = R \ln \left(\sum_{j=0}^M \binom{M}{j} f_j \right)$. De acordo com as entropias encontradas experimentalmente, os valores podem corresponder a valores de ligação de energia P-P e de energia P-W.

Considerando a Hb com apenas 110 interações intersubunidades, a formação da correspondente interface água-proteína envolve o desaparecimento de 110 pontes de hidrogênio entre moléculas de água, que envolve uma variação de entalpia de cerca de 770 kcal/mol. Como o total de variação de entalpia é de 55,05 kcal/mol, a mudança total de entalpia positiva devido ao desaparecimento das ligações entre moléculas de água é acrescida de cerca de 7% do total da diferença entre a entalpia de ligação entre subunidades e de ligação água-proteína. Assim, a conclusão é que a interação das superfícies intersubunidades “hidrofóbicas” com as moléculas de água envolvem ligações que tem intensidade apenas um pouco menor que a interação água-água.

Da relação entre a força de ligação e a mudança no número de *complexions* (Eq. 18, 20 e Fig. 16), temos que as mudanças de entropia associadas com a mudança de água-proteína para ligações água-água de similar força não podem contribuir significativamente para a existência de um processo de agregação dirigido pela entropia, e que o significativo valor de entropia é apenas encontrada na diferença de entropia entre a conversão de ligações proteína-solvente em ligações proteína-proteína.

A partir da entropia experimental de dissociação encontrada, $T\Delta S = +47,2$ kcal/mol de subunidade, podemos correlacionar os valores da energia média de ligação proteína-proteína, assim como de proteína-água através da relação

$$E_{P-W} = 3,5 + E_{P-P}/2 \quad (21)$$

Assim, na Fig. 15 foram relacionados os valores de entalpia $T\Delta S$ encontrados nas diferentes faixas de temperatura, e as correspondentes energias de ligação proteína-proteína, que são as principais responsáveis pela entropia. A Tabela 3 mostra os valores obtidos para esses casos. Através desses valores, foram também calculados os valores estimados de ligação proteína-água utilizando a Eq. (21). A visão que prevalece é a de que a magnitude da mudança de entropia na reação química é fortemente determinada pela energia relacionada com a ligação mais fraca.

	Energia P-P	Energia P-W
Hexoquinase de levedura	0,76	3,84
Triptofano sintase de <i>E. coli</i> ^a	1,25	4,12
Rubisco de rodobacter ^b	2,39	4,68
Dímero fosforilase A	1,91	4,44
Aloficocianina	1,36	4,18
GAPDH	2,94	4,94
Tetrâmero fosforilase A	2,43	4,71
Eritrocrucorina ^c	1,65	4,32
Eritrocrucorina ^d	2,40	4,70

^{a b c d} Como na Tabela 2.

Tabela 3. Energias calculadas, em kcal, de interações P-P e P-W que satisfazem os dados energéticos da Tab. 2 e a relação dada pela Eq. 21.

O efeito dissociativo da pressão e da temperatura na estabilização de oligômeros protéicos segue as expansividades e compressibilidades diferenciais associadas às diferentes forças de ligação. A energia associada à ligação não pode ser previamente definida, e somente pode ser determinada pela análise das mudanças na entalpia e entropia numa reação química em particular que está sendo modificada, como no processo de dissociação da Hb extracelular experimentalmente estudado.

Detendo-se novamente aos resultados reunidos na Tabela 1, se observa que a variação de energia interna de dissociação, ΔU , à pressão atmosférica, se mostrou próxima à variação de entalpia num valor desprezível de ΔV , assumido a temperatura de 293 K, mas,

por extrapolação, assumiria um valor notavelmente alto com o acréscimo da pressão. Ao contrário, as variações na energia livre de Gibbs de dissociação se mostraram menos dependentes da pressão, mas se mostraram significativamente afetadas pela temperatura. No intervalo de temperatura estudado, os resultados mostram um comportamento bifásico do processo de dissociação da Hb, com transição em torno de 303 K, provavelmente pela formação de uma nova conformação.

A dissociação de proteínas é de fundamental importância na compreensão de sistemas biológicos, e assim a participação de fatores físico-químicos nesses processos é alvo relevante de investigação. Nesse trabalho foram estudadas, através de alta pressão e efeito de temperatura, as propriedades dissociativas da Ec como um modelo de proteína. As milhares de proteínas que participam na construção, sustentação, reconhecimento, transporte e na transformação de componentes biomoleculares atuam com notável eficiência, estando sujeitas, em muitos casos, a inúmeros mecanismos regulatórios. Os estudos conformacionais, assim como funcionais, têm sido fonte de significativos avanços na bioquímica, com crescente potencial de convergência biotecnológica.

CONCLUSÕES

- A temperatura altera de maneira significativa a estabilidade da Hb extracelular de *G. paulistus*, e isso é bem evidenciado utilizando-se alta pressão hidrostática como ferramenta que induz a dissociação.

- O processo de dissociação da Hb é fortemente endotérmico, conduzido principalmente pela entalpia de dissociação e com comportamento bifásico em relação à elevação de temperatura sob incubação a alta pressão.

- O aumento de pressão hidrostática, em qualquer das temperaturas estudadas, promove dissociação da Hb.

- Os diferentes valores da variação de volume de dissociação em diferentes temperaturas sugerem a ocorrência de significativas diferenças estruturais nas interações subunidades.

- A partir do modelo de termodinâmica estatística proposto por G. Weber (1993), é possível se determinar a energia de ligação de um oligômero protéico tal como a Ec pela análise das mudanças na entalpia e entropia na reação de dissociação.

- A energia de ligação constitui uma aproximação válida para valores específicos de temperatura e pressão, isto devido a interdependência existente entre energia de ligação e a mobilidade, ou grau de liberdade, das interfaces que são mantidas por determinado número de interações intersubunidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akasaka, K. & Li, H. (2001). A novel picture of protein from high pressure. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **46(3)**:208-19.

Bispo, J.A., Landini, G.F., Santos, J.L., Gonçalves, J.M. & Bonafe, C.F. (2007). pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure. *Biophys Chem*. **125(2-3)**:341-9.

Bispo, J.A., Landini, G.F., Santos, J.L., Norberto, D.R. & Bonafe, C.F. (2005). Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. *Comp. Biochem. Physiol*. **141**, 498-04.

Bonaventura, C. & Bonaventura, J. (1981). Preparation of high molecular weight invertebrate hemoglobins. *Methods Enzymol*. **76(3)**, 43-54.

Bonafe, C.F., Araújo, J.R. & Silva, J.L. (1994) Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry*. **33(9)**:2651-60.

Bonafe, C.F., Villas-Boas, M., Suarez, M.C. & Silva, J.L. (1991). Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem*. **266(20)**:13210-6.

Chiancone, E., Vecchini, P., Fanelli, M.R. & Antonini, E. (1972). Studies on erythrocrucorin. II. Dissociation of earthworm erythrocrucorin. *J. Mol. Biol*. **70(1)**:73-84.

Chung, M.C., Ellerton & H.D. (1982). The physico-chemical and functional properties of *Abarenicola affinis affinis* (Ashworth) extracellular haemoglobin (erythrocrucorin). *Biochim. Biophys. Acta*. **702(1)**:6-16.

Costa, M.C., Bonafe, C.F., Meirelles, N.C. & Galembeck, F. (1988) Sedimentation coefficient and minimum molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21(1)**:115-8.

Da Poian, A.T., Johnson, J.E. & Silva, J.L. (2002). Protein-RNA interactions and virus stability as probed by the dynamics of tryptophan side chains. *J.Biol.Chem.* **277(49)**:47596-602.

David, M.M. & Daniel, E. (1974). Subunit structure of earthworm erythrocrucorin. *J. Mol. Biol.* **87(1)**:89-101.

Erijman L., Gerge H.L. & Weber, W. (1993). Reversible dissociation and conformational stability of dimeric ribulose biphosphate carboxylase. *Biochemistry.* **32**, 5187-5195.

Erijman, L. & Weber, G. (1991). Oligomeric protein associations: transition from stochastic to deterministic equilibrium. *Biochemistry.* **30(16)**:1595-9.

Foguel D. (2005). High pressure studies on transthyretin. *Protein and Peptide Letters* **12**, 245-249.

Foguel D. & Silva, J.L. (2004). New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochemistry.* **43(36)**:11361-70.

Foguel D., Chaloub, R.M., Silva, J.L., Crofts & A.R., Weber, G. (1992). Pressure and low temperature effects on the fluorescence emission spectra and lifetimes of the photosynthetic components of cyanobacteria. *Biophys J.* December; **63(6)**:1613–1622.

Frossard P. (1982). The erythrocrucorin of *Eisenia fetida*. II. Properties of the principal subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* **704(3)**:535-41.

Ho, G.H.B., McLean, M.A. & Sligar, S.G. (2002). High pressure, a tool for exploring heme protein active sites. *Biochim. Biophys. Acta.* **1595**, 297-308.

Kapp, O.H., Polidori, G., Mainwaring, M.G., Crewe & A.V., Vinogradov, S.N. (1984). The reassociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin dissociated at alkaline pH. *J. Biol. Chem.* **259(1)**:628-39.

Kauzmann, W. (1987). Protein stabilization. Thermodynamics of unfolding. *Nature* **325**, 763-764.

Lakowicz, J.R. (1999). In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

Neuman, R.C.Jr., Kauzmann, W. & Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J.Phys.Chem.* **77**, 2687-91.

Ochiai, T. & Enoki, G. (1981). Dissociation and oxygen equilibrium properties of the extracellular hemoglobin of *Eisenia foetida*. *Arch. Biochem. Biophys.* **231(1)**:136-43.

Paladini, A.A. & Weber, G. (1981). Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 419-427.

Paladini, A.A.Jr. & Weber, G. (1981). Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry.* **20(9)**:2587-93.

Pionetti, J.M. & Pouyet, J. (1980). Molecular architecture of annelid erythrocruorins. Extracellular hemoglobin of *Arenicola marina* (Polychaeta). *Eur. J. Biochem.* **105(1)**:131-8.

Raghavendra, K., Salunke D.M., Caspar, D.L. & Schuster, T.M. (1986). Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron microscopy observations. *Biochemistry.* **25(20)**:6276-9.

Royer, C.A. (2000). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta.* **1595(1-2)**:201-9. Review.

Royer, W.E. Jr., Strand, K., van Heel, M. & Hendrickson, W.A. (2000). Structural hierarchy in erythrocyte spectrin, the giant respiratory assemblage of annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97(13)**:7107–7111.

Ruan, K. & Weber, G. (1988). Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure. *Biochemistry.* **27(9)**:3295-301.

Ruan, K. & Weber, G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* **28(5)**:2144-53.

Ruan, K. & Weber, G. (1993). Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation. *Biochemistry.* **32(24)**:6295-301.

Silva, J.L. & Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol.Biol.* **199(1)**:149-159.

Silva, J.L., Foguel, D. & Royer, C.A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 612-618.

Silva, J.L., Foguel, D., Da Poian, A.T. & Prevelige, P.E. (1996). The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr Opin Struct Biol.* **6(2)**:166-75. Review.

Silva, J.L., Villas-Boas, M., Bonafe, C.F.S. & Meirelles, N.C. (1989). Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **264(27)**:15863-8.

Silva, J.L., Miles, E.W. & Weber, G., (1986). Pressure dissociation and conformational drift of the beta dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry*. **25(19)**:5780-6.

Sharma, P.K., Walz, D.A & Vinogradov, S.N. (1991). Heterogeneity of the subunits of *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin dissociated at alkaline pH. *Comp. Biochem. Physiol. B*. **98(1)**:47-51.

Vinogradov, S.N., Shlom, J.M., Hall, B.C., Kapp, O.H. & Mizukami, H. (1977). The dissociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin: a model of its subunit structure. *Biochim Biophys. Acta*. **492(1)**:136-55.

Vinogradov, S.N., Kosinski & T.F., Kapp, O.H. (1980). Subunits of the extracellular hemoglobin of *Arenicola marina*. *Biochim Biophys. Acta*. **621(2)**:315-23

Vinogradov, S.N. (1985). The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem Physiol. B*. **82(1)**:1-15.

Warshel, A., Russel, S.T. & Churg A.K. (1984). Macroscopic models for studies of electrostatic interactions in proteins: Limitation and applicability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4785-4789.

Weber, G. (1986). Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and of hydrostatic pressure. *Biochemistry* **25**, 3626-3631.

Weber, G. & Drickamer, H.G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q. Rev. Biophys.* **16(1)**:89-112.

Weber, G. (1991). Pressure & low-temperature stability of oligomeric enzymes. *New Trends in Biol. Chem.* pp 235-238.

Weber, G. (1993). Thermodynamics of the association and the pressure dissociation oligomeric proteins. *J. Phys. Chem.* **97**,7108-7115.

Weber, G. & Drickamer, H.G. (1983). The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 89-112.

Weber, R.E. (1980). Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. *Amer. Zool.* **20**, 79-101.

Wylen, G.J.V., Sonntag, R.E. & Borgnakke C. (1985). *Fundamentals of classical thermodynamics*. 3th Edition. Edgard Blucher.

Xu, G.J. & Weber, G. (1982). Dynamics and time-averaged chemical potential of proteins: Importance in oligomer association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5268.

Zhou, J.M. & Perret, S. (2001). Pressure denaturation of the yeast prion protein Ure2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287(1)**, 147-152.

ANEXO

Artigo publicado sobre a Hb extracelular de *G. paulists*

Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration

Jose Ailton Conceicao Bispo, Gustavo Fraga Landini, Jose Luis Rocha Santos, Douglas Ricardo Norberto, Carlos Francisco Sampaio Bonafe*

Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil

Received 4 March 2005; received in revised form 1 June 2005; accepted 2 June 2005
Available online 27 June 2005

Abstract

The redox titration of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Annelidea) was investigated in different pH conditions and after dissociation induced by pressure. Oxidation increased with increasing pH, as shown by the reduced amount of ferricyanide necessary for the oxidation of hemoglobin. This behavior was the opposite of that of vertebrate hemoglobins. The potential of half oxidation ($E_{1/2}$) changed from -65.3 to $+146.8$ mV when the pH increased from 4.50 to 8.75. The functional properties indicated a reduction in the $\log P_{50}$ from 1.28 to 0.28 in this pH range. The dissociation at alkaline pH or induced by high pressure, confirmed by HPLC gel filtration, suggested that disassembly of the hemoglobin could be involved in the increased potential for oxidation. These results suggest that the high stability and prolonged lifetime common to invertebrate hemoglobins is related to their low tendency to oxidize at acidic pH, in contrast to vertebrate hemoglobins.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Annelid hemoglobin; Extracellular hemoglobin; Erythrocytorin; Dissociated hemoglobin; *Glossoscolex paulistus*; Hemoglobin oxidation; Pressure-induced dissociation; Redox potential titration

1. Introduction

The effect of pH on biological systems has been widely investigated using various models to gain insights into the role of protons in modulating biochemical processes. Analysis of the stability of high protein aggregates using hydrostatic pressure (>250 MPa) to promote protein dissociation has shown that protein aggregation is strongly pH-dependent (Santos et al., 2004). The ability of protons to cause protein conformational changes, including allosteric phenomena, means that the study of pH is important for understanding normal protein folding and function.

In hemoglobins (Hbs), the role of protons in oxygen affinity (Bohr effect) has been extensively studied in the physiologic pH range and at extreme conditions (Imai and

Yonetani, 1975; Chu and Ackers, 1981). The cooperativity in ligand binding is also pH-dependent, with a decrease in cooperativity as pH increases. This behavior is responsible for the sigmoidal nature of the plot of Hb saturation versus oxygen pressure, with a tendency to assume a hyperbolic shape at alkaline pH.

In the present work, we examined the effect of protons on the oxidation–reduction potentials of the extracellular Hb of the annelid *Glossoscolex paulistus*. This Hb is a giant, multisubunit protein with a two-tiered hexagonal shape (Bonafe et al., 1991), characteristics shared with other annelid Hbs (Vinogradov, 1985), and a sedimentation coefficient of 58S (Costa et al., 1988). Analysis of the molecular composition of this class of Hbs has shown that in *Lumbricus terrestris* the entire molecule consists of 144 subunits arranged as 12 dodecamers and 36 linker subunits that are required for assembly (Royer et al., 2000). To our knowledge, no report has described the oxidative properties

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 6135; fax: +55 19 3788 6129.
E-mail address: bonafe@unicamp.br (C.F.S. Bonafe).

of invertebrate extracellular Hbs at different pH values. Since alkaline conditions (Chiancone et al., 1972; David and Daniel, 1974; Vinogradov et al., 1977, 1980; Pionetti and Pouyet, 1980; Ochiai and Enoki, 1981, 1982; Chung and Ellerton, 1982; Frossard, 1982; Kapp et al., 1984; Ochiai, 1984; Polidori et al., 1984, 1988; Sharma et al., 1990; Imasato et al., 1995) and incubation at high pressure (Silva et al., 1989; Bonafe et al., 1991) generally induce the disassembly of extracellular Hbs, we investigated the susceptibility of *G. paulistus* Hb to oxidation at different pH values and to dissociation under pressure. The oxygen affinity and Hill coefficients were determined over the same pH range and pressure conditions. Light scattering measurements and electron microscopy images of Hb were also analyzed in the same conditions to assess the state of molecular aggregation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All reagents were of analytical grade. Distilled water was filtered and deionized through a Millipore water purification system (18 M Ω resistance). The experiments were done at a temperature of 293 K with 100 mM acetate buffer for pH 4.5 to 5.5, 100 mM Bis-Tris–propane buffer for pH 6.5 to 7.0 and 100 mM Tris–HCl buffer for pH 7.25 to 8.75.

2.2. Protein preparations

Specimens of *G. paulistus* were collected in Rio Claro, in the state of São Paulo, and maintained in soil from the collection site for less than 1 week before blood extraction. The extracellular Hb was purified as previously described (Silva et al., 1989), except that the buffer for the last resuspension after ultracentrifugation was 50 mM Tris–HCl, pH 7.4. The purified protein was stored at 6 °C. The Hb concentration was determined as previously described (Costa et al., 1988). The experimental conditions for redox potential analysis were tested using human Hb as a control. Human blood was collected and a hemolysate was prepared as described elsewhere (Rossi-Fanelli and Antonini, 1958). The Hb solution was applied to a column (2 × 90 cm) of Sephadex G-25 equilibrated with 1 mM Tris–HCl, pH 9.0, to obtain a solution free of salts and small organic molecules (Riggs, 1981).

2.3. Redox titration using an automated system

Titration of the Hb was based on a previously described method (Antonini et al., 1964). Five milliliters of Hb solution (140 μ M as heme in 100 mM buffer) was deoxygenated in a tonometer and then transferred anaerobically, with continuous flushing of N₂, to the titration

half-cell that contained thionine as a mediator in a molar ratio to heme of 2–4%. Oxidation of deoxyHb was done with continuous mixing by the stepwise addition of 20 μ L of a degassed solution of 5 mM potassium ferricyanide using an automated system controlled by software “Automated Potentiometric Titration” written in Delphi 5.0 language and compatible with Windows. The computer controlled a step motor fitted with a microliter syringe coupled to a three-way solenoid valve to allow refilling of the syringe when necessary, and continuously received redox potential data from a Corning 350 pH/ion analyzer. Each ferricyanide addition was automated and occurred after allowing 30 min for the redox potential to stabilize. The criterion for stability was that the redox potential of the sample did not vary by more than 5 mV. The redox potentials measured were expressed relative to a standard hydrogen electrode (Clark, 1960). The redox potential at 50% oxidation provided the midpoint potential ($E_{1/2}$). Based on the nature of the titration data provided by this system, the degree of oxidation (Y) was obtained using the equation

$$Y = \frac{E_m - E_i}{E_f - E_i} \quad (1)$$

where E_m is the measured potential at a given concentration of ferricyanide added to the solution, E_i is the initial potential and E_f is the final potential.

2.4. Oxygen equilibrium measurements

These measurements were done spectrophotometrically as described elsewhere (Rossi-Fanelli and Antonini, 1958).

2.5. Light scattering under pressure

The high pressure system used has been described elsewhere (Paladini and Weber, 1981). An ISS model HP high pressure cell with sapphire windows connected to a pressure generator (HIP) was used. Light scattering at 340 nm was recorded in an Edinburgh FL 900 spectrofluorometer and was measured at an angle of 90° relative to the incident light using the same wavelength for the excitation and emission monochromators. The pressure system, including the spectrofluorometer, was automated and controlled as previously described (Santos et al., 2004).

2.6. Gel filtration

Size exclusion HPLC was done with a Shimadzu HPLC system. A prepacked SynChroPack GPC300 column (250 × 4.6 mm, i.d.) (SynChrom, Inc.), was used for gel filtration. Elution of the samples was monitored based on the absorption at 280 nm. The void volume (V_0) of the column was measured with TMV before the application of pressure and the total volume (V_t) with a solution of human albumin.

2.7. Electron microscopy

Transmission electron microscopy was done in a Leo-902 microscope. Negative staining was done with 1% uranyl acetate. The samples were fixed with 0.5% glutaraldehyde solution prior to negative staining.

3. Results

The redox potentials of the extracellular Hb at different pH values were investigated by titration with ferricyanide (Fig. 1A). The addition of ferricyanide increased the oxidation potentials. Over the pH range studied, the addition

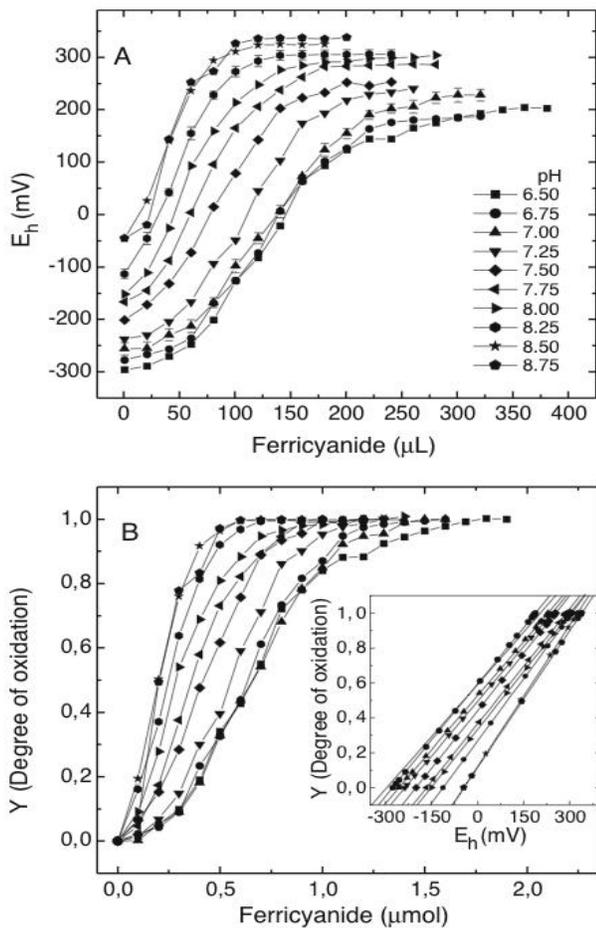


Fig. 1. (A) Effect of pH on the oxidation of *G. paullistus* extracellular Hb by 5 mM ferricyanide. The bars shown for pH 7.00 and 8.25 represent the S.D. of triplicate determinations. The Hb concentration was 3.5 mg/ml and the temperature 293 K. (B) The corresponding degree of oxidation (Y) as a function of the volume of ferricyanide added to the Hb solution at different pH values. For each pH, the maximum potential obtained was considered as $Y=1$ and the minimum as $Y=0$. The intermediate values were obtained by Eq. (1). Inset in (B). Degree of oxidation (Y) as a function of the oxidation potential at different pH values based on the results in Fig. 1. The symbols in (B) and in the inset are the same as those in (A).

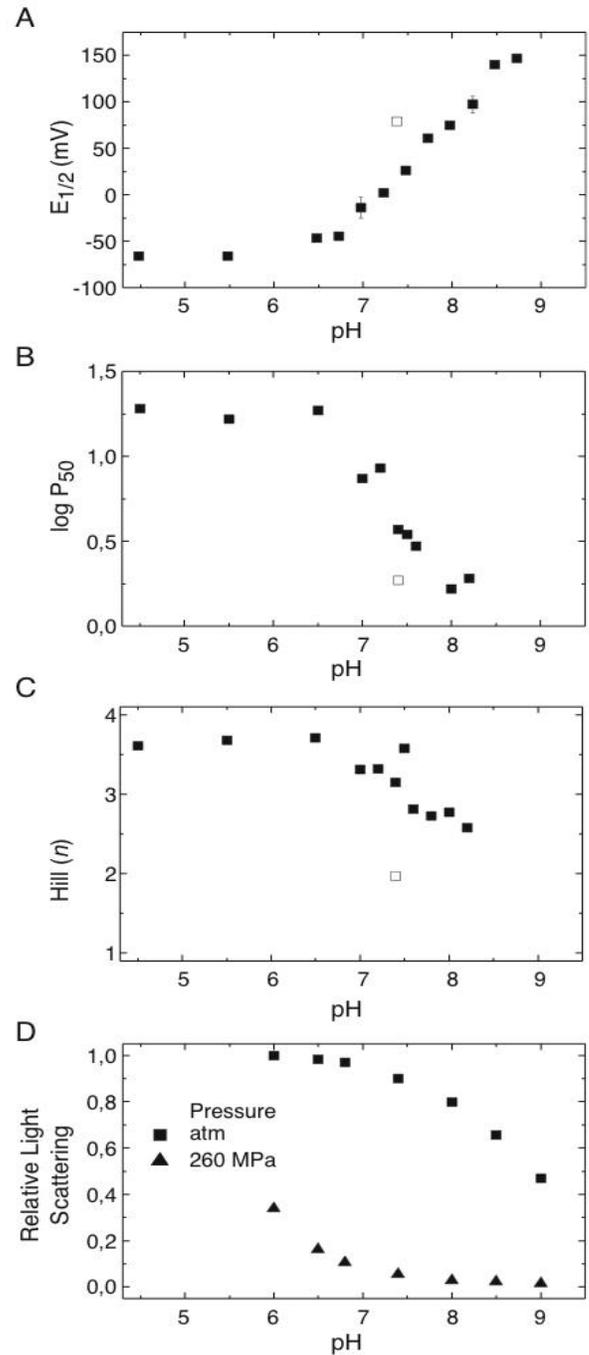


Fig. 2. (A) Potential of half-oxidation ($E_{1/2}$) of extracellular Hb as a function of the pH obtained by a linear fit of the curves in the inset in Fig. 1B, and the corresponding values of E for $Y=0.5$. (B) and (C) Oxygen affinity expressed as $\log P_{50}$ and the cooperativity of Hb (n) at different pH values, respectively. Closed symbols: control without exposure to high pressure; open symbols: Hb after a cycle of pressure and decompression (see experiment in Fig. 4). (D) Effect of pH on the light scattering of Hb at atmospheric and high pressure conditions (270 MPa). The light scattering at high pressure was measured under the experimental conditions described in Fig. 4.

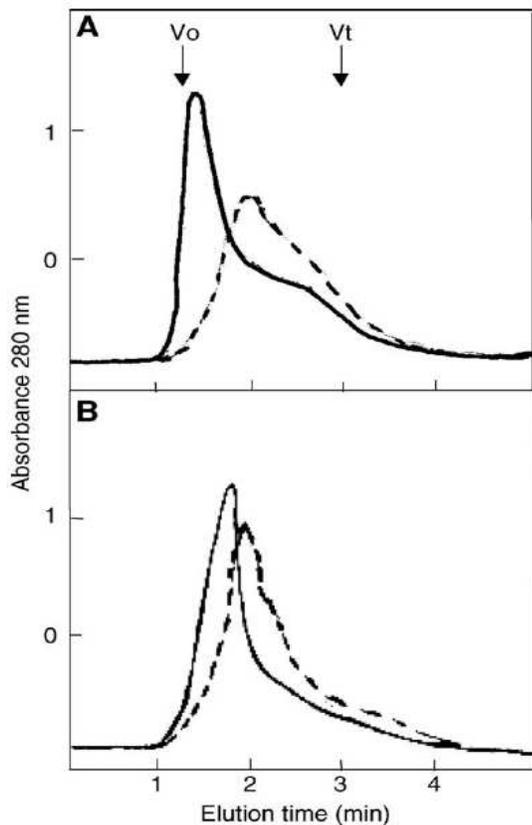


Fig. 3. Gel filtration HPLC analysis (GPC300 column) of Hb (A) incubated at pH 6.5 (continuous line) and pH 8.5 (dashed line), and (B) incubated at pH 7.5 before (continuous line) and after (dashed line) a cycle of pressure and decompression, see experiment in Fig. 4. One hundred microliters of Hb (0.5 mg/mL) was injected and eluted at a flow rate of 0.3 mL/min. V_0 : void volume, elution of tobacco mosaic virus. V_t : final volume, elution of human albumin.

of a large volume of ferricyanide caused the oxidation potential to stabilize at a limit value that corresponded to the endpoint of the oxidation process. Since the titration curves at pH 4.50 and 5.50 were very similar to the curve at pH 6.50, the data are not shown in Fig. 1, but the corresponding half-oxidation potentials ($E_{1/2}$) are included in Fig. 2A. An increase in pH shifted the redox potential to higher values and changed the curve from a sigmoidal to a more hyperbolic shape. This behavior was best seen in a plot of the degree of oxidation (Y) as a function of the amount of ferricyanide added (Fig. 1B). Fig. 1B also shows that the amount of ferricyanide needed to cause 50% of protein oxidation was lower in more alkaline conditions, indicating a higher tendency for oxidation. An increase in pH from 4.50 to 8.75 decreased the titration volume from 0.75 to 0.20 μmol . The redox titrations at pH 7.00 and 8.25 were measured in triplicate and were reproducible (Fig. 1A, titration curves with bars representing the S.D., and 2A). In addition, the redox potential of human Hb at pH 7.00 to 8.50 and at fixed protein concentration was similar to that

previously reported (Antonini et al., 1963, 1964) (results not shown), thus confirming the appropriateness of the experimental conditions used.

The degree of oxidation versus the oxidation potential (E_h) at different pH values is shown in the inset in Fig. 1B. A linear fit of these curves allowed the calculation of the $E_{1/2}$ at each pH (Fig. 2A). The $E_{1/2}$ increased from -65.3 mV at pH 4.50 to $+146.8$ mV at pH 8.75. Overall, these results showed that the potential of half oxidation was not directly related to the oxygen affinity of the Hb, but probably reflected to specific protein adaptations for oxygen transport and electron transfer during normal protein function. Fig. 2B and C shows the functional properties of ligand binding over the pH range studied. As expected, the extracellular Hb had a greater oxygen affinity at higher pH values (Bohr effect) (Fig. 3B). The Hill coefficient n_H decreased from 3.7 to 2.6 over this pH range (Fig. 2C).

To investigate whether the alkaline dissociation of extracellular Hbs was related to an increased susceptibility to oxidation, we studied the effect of pH on the light scattering of a solution of *G. paulistus* Hb (Fig. 2D). At pH 8.50, the light scattering decreased to 47%, indicating a significant dissociation. Incubation at pressures up to 270 MPa induced important additional dissociation that, at pH 9.0, resulted in a decrease in the intensity of light scattering of about 1% compared to the aggregated state. Molecular exclusion chromatography of extracellular Hb by HPLC at different pH values was also investigated (Fig. 3A). Increasing the pH from 6.5 to 8.5 shifted the elution profile to values near V_t , confirming significant dissociation of the Hb.

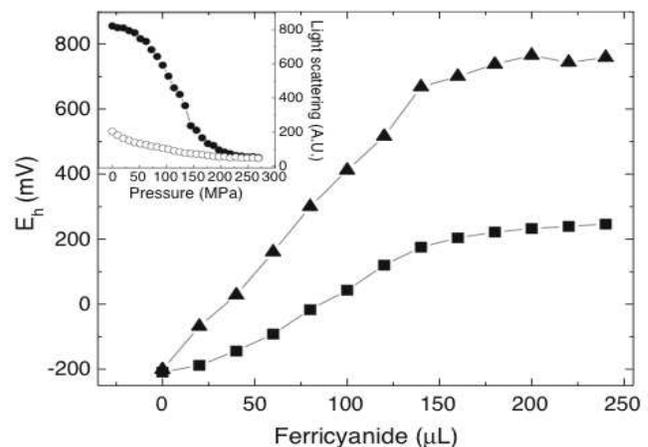


Fig. 4. Effect of preincubation at high pressure on the oxidation potential of extracellular Hb at pH 7.4 and 293 K as a function of the amount of ferricyanide added to the solution. Squares: redox titration of Hb at atmospheric conditions. Triangles: redox titration after a cycle of compression/decompression as in inset. The Hb concentration was 3.5 mg/mL. Inset. Effect of pressure on the light scattering intensities during compression (closed symbols) and decompression (open symbols) at pH 7.4. The Hb was incubated at each pressure for 20 min before measurement of light scattering. The Hb concentration was 0.5 mg/mL. The temperature was 293 K. A.U., arbitrary units.

To better understand how the dissociation of Hb affected the susceptibility of this protein to oxidation, a solution of Hb was incubated at high pressure to promote protein dissociation. The potentiometric titration of pressure-dissociated Hb (Fig. 4) showed that the dissociation process significantly increased the potentials of oxidation and resulted in a loss of cooperativity during oxidation. The increase in the potential of oxidation and the loss of cooperativity seen at alkaline pH in Fig. 1B were partly related to the occurrence of dissociated species in this experimental condition. The $E_{1/2}$ increased from 20.0 mV at atmospheric pressure to 78.9 mV after incubation under pressure (Fig. 2A). The pressure dissociation also increased the O_2 affinity and decreased the n (Fig. 2B and C), in agreement with previous findings (Silva et al., 1989). The inset in Fig. 4 shows the light scattering intensity of the Hb solution at pressures up to 270 MPa in a cycle of compression and decompression. The Hb concentration used was 0.5 mg/mL in order to provide better resolution of the light scattering and to allow the intensity of scattering to be correlated directly with the state of protein aggregation. Returning the protein to atmospheric conditions did not result in significant reassembly of the dissociated species. The gel filtration profile of the Hb after incubation under pressure (Fig. 3B) confirmed the stability

of the dissociated state, in agreement with previous results (Silva et al., 1989; Bonafe et al., 1991).

Electron microscopy of the Hb before and after the cycle of compression/decompression confirmed that significant dissociation had occurred (Fig. 5). Intact Hb structures were seen before the incubation under pressure, whereas dissociated particles, without the occurrence of aggregated states, were seen after the incubation. These results corroborated the dissociation process indicated by the light scattering measurements and gel filtration.

4. Discussion

The results described here show for the first time that the $E_{1/2}$ values of extracellular Hb increased with increasing pH, and that a high proton concentration acted as an allosteric effector that induced protein conformational changes to protect the protein against dissociation and oxidation. This behavior was the opposite of that observed for human Hb (Antonini et al., 1963; Brunori et al., 1964, 1967). Pressure-induced dissociation confirmed the increased tendency of dissociated Hb to oxidize, as shown by the redox and half-oxidation potentials. The higher stability and lower tendency to oxidize at acidic pH were apparently related to the increased lifetime observed for extracellular Hb.

Invertebrate extracellular Hbs have several properties that distinguish them from vertebrate Hbs. Rasmussen and Weber (1979) reported that the specific effect of CO_2 increased rather than decreased the O_2 affinity of Hb from *Arenicola marina*, in contrast to vertebrate Hbs. Divalent cations increase the O_2 affinity of extracellular Hbs, a property not observed in vertebrate Hbs (Everaarts and Weber, 1974; Ochiai, 1984; Igarashi et al., 1985; Fushitani et al., 1986; Tsuneshige et al., 1989; Igarashi et al., 1991; Ilan and Haroun, 1993; Ochiai et al., 1993; Marques and Meirelles, 1995; Weber and Vinogradov, 2001; Ochiai and Weber, 2002). The present analysis confirmed the alkaline dissociation of *G. paulistus* Hb and suggested that the dissociation process may be related to the release of protons from the Hb structure which would increase the susceptibility of the dissociated species to oxidation. The redox titration of pressure-dissociated Hb seen here supports such a relationship. In this case, high pressure proved to be an important tool for investigating macromolecular assemblages because of the much lower perturbation of the Hb tertiary structure compared with that caused by high temperature or the addition of denaturing agents (Silva and Weber, 1993; Silva et al., 1996; Bonafe et al., 1998). Studies using this approach for *G. paulistus* Hb have been done by Silva et al. (1989), who reported an anomalous lack of concentration-dependence in the pressure–dissociation curve that was similar to that of gastropod hemocyanin (Bonafe et al., 1994). Divalent cations and glycerol induce reassociation of pressure-dissociated *G. paulistus* Hb

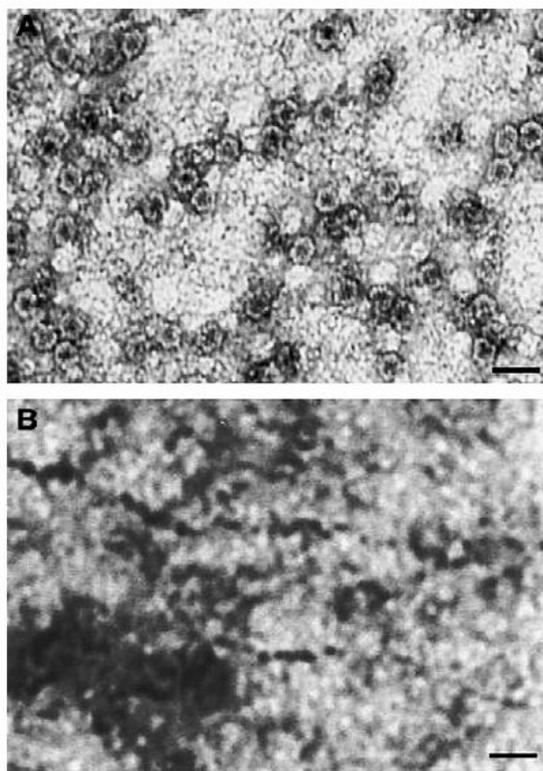


Fig. 5. Transmission electron microscopy of hemoglobin (0.5 mg/mL) at atmospheric pressure (A) and after incubation at elevated pressure as described in Fig. 4 (B). Fixation was done in 0.5% glutaraldehyde solution. Negative staining was with 1% uranyl acetate. Bar=50 nm.

(Bonafe et al., 1991), indicating that the dissociation obtained here at pressures of up to 270 MPa did not cause protein denaturation. Furthermore, as shown here and elsewhere (Silva et al., 1989), incubation at high pressure does not affect the ability of this Hb to reversibly bind oxygen. The species produced by pressure dissociation are comparable to those obtained by alkaline dissociation.

Most of the studies that have examined the oxidation–reduction potentials of heme proteins have dealt with vertebrate Hbs, especially human Hb (Brunori et al., 1968, 1969; Abraham and Taylor, 1975). Other heme proteins that have been studied include sperm-whale myoglobin (Brunori et al., 1971) and, more recently, snake (*Helicops modestus*) Hb (Bonafe et al., 1999). The present work provides a preliminary understanding of the oxidative behavior of extracellular Hb that allows a comparative analysis with vertebrate Hbs. As shown here, the pH effect for the oxidation of *G. paulistus* Hb differed from that of human Hb in that the values for half-oxidation changed in the opposite direction with increasing pH. The low values of half-oxidation obtained at low pH indicated a reduced tendency for the protein to oxidize, a result not observed for vertebrate hemoglobins. This implies an increase in the amount of ferricyanide needed to cause the oxidation of half of the Hb when compared with the results obtained at high pH. Both vertebrate and invertebrate Hbs show the same behavior in the Bohr effect for oxygenation, with an increase in oxygen affinity at alkaline pH (Fushitani and Riggs, 1991).

Physiologically, extracellular Hbs are probably much more exposed to an oxidative environment than are vertebrate intracellular Hbs, which possess efficient intracellular mechanisms for methemoglobin reduction. The much higher molecular mass and complexity of extracellular Hbs should compensate for the lack of cellular mechanisms capable of controlling oxygen binding (such as those occurring in vertebrates) and for the stress to which these molecules are exposed in the absence of known pathways of recovery from oxidation. From a structural point of view, the reduced oxygen affinity of annelid Hb at low pH can be attributed to a low exposure of the heme sites, with the Hb structure having a compact conformation in a tense form, as also described for human Hb (Monod et al., 1965). In contrast to this similarity in oxygen affinity between vertebrate and invertebrate Hbs, the oxidative properties of these proteins showed intriguing differences. In extracellular Hb, the low exposure of heme sites at low pH prevented the oxidation of this protein, as shown by the redox titration results. This finding was the opposite of that observed for vertebrate Hbs, which have a higher tendency to oxidize at low pH despite the low exposure of the heme sites.

Acknowledgments

The authors thank Valdiney A. Pimenta, Jarbas J. R. Rohwedder and Carlos E. S. Luz for automating the redox

titration system, and Stephen Hyslop for helpful discussions. This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAEP-UNICAMP and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Abraham, E.C., Taylor, J.F., 1975. Oxidation–reduction potentials of human fetal hemoglobin and gamma chains. Effects of blocking sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.* 250, 3929–3935.
- Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Bucci, E., Fronticelli, C., Rossi-Fanelli, A., 1963. Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin: IV. The Bohr effect in human hemoglobin measured by proton binding. *J. Biol. Chem.* 238, 2950–2957.
- Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Taylor, J.F., Rossi-Fanelli, A., Caputo, A., 1964. Studies on the oxidation–reduction potentials of heme proteins. *J. Biol. Chem.* 239, 907–912.
- Bonafe, C.F.S., Villas-Boas, M., Suarez, M.C., Silva, J.L., 1991. Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 266, 13210–13216.
- Bonafe, C.F.S., Araujo, J.R., Silva, J.L., 1994. Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry* 33, 2651–2660.
- Bonafe, C.F.S., Vital, C.M.R., Telles, R.C.B., Gonçalves, M.C., Matsuura, M.S.A., Pessine, F.B.T., Freitas, D.R.C., Vega, J., 1998. Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry* 37, 11097–11105.
- Bonafe, C.F.S., Matsukuma, A.Y., Matsuura, M.S., 1999. ATP-induced tetramerization and cooperativity in hemoglobin of lower vertebrates. *J. Biol. Chem.* 274, 1196–1198.
- Brunori, M., Antonini, E., Wyman, J., Zito, R., Taylor, J.F., Rossi-Fanelli, A., 1964. Studies on the oxidation–reduction potentials of heme proteins: II. Carboxypeptidase digests of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 239, 2340–2344.
- Brunori, M., Taylor, J.F., Antonini, E., Wyman, J., Rossi-Fanelli, A., 1967. Studies on the oxidation–reduction potentials of heme proteins: VI. Human hemoglobin treated with various sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* 242, 2295–2300.
- Brunori, M., Alfisen, A., Saggese, U., Antonini, E., Wyman, J., 1968. Studies on the oxidation–reduction potentials of heme proteins: VII. Oxidation–reduction equilibrium of hemoglobin bound to haptoglobin. *J. Biol. Chem.* 243, 2950–2954.
- Brunori, M., Taylor, J.F., Antonini, E., Wyman, J., 1969. Oxidation–reduction equilibrium of human hemoglobin in concentrated sodium chloride solutions. Consistency with the (alpha beta) dimer model. *Biochemistry* 8, 2880–2883.
- Brunori, M., Saggese, U., Rotilio, G.C., Antonini, E., Wyman, J., 1971. Redox equilibrium of sperm-whale myoglobin, *Aplysia* myoglobin, and *Chironomus thummi* hemoglobin. *Biochemistry* 10, 1604–1609.
- Chiancone, E., Antonini, E., Vecchini, P., Fanelli, M.R.R., 1972. Studies on erythrocrucorin: 2. Dissociation of earthworm erythrocrucorin. *J. Mol. Biol.* 70, 73–84.
- Chu, A.H., Ackers, G.K., 1981. Mutual effects of protons, NaCl, and oxygen on the dimer–tetramer assembly of human hemoglobin. The dimer Bohr effect. *J. Biol. Chem.* 256, 1199–1205.
- Chung, M.C., Ellerton, H.D., 1982. The subunits of *Abarenicola affinis affinis* (Ashworth) extracellular haemoglobin (erythrocrucorin). *Biochim. Biophys. Acta* 702, 17–22.
- Clark, W.M., 1960. Oxidation–Reduction Potentials of Organic Systems. Williams and Williams, Baltimore.
- Costa, M.C., Bonafe, C.F., Meirelles, N.C., Galembeck, F., 1988. Sedimentation coefficient and minimum molecular weight of extrac-

- ellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 115–118.
- David, M.M., Daniel, E., 1974. Subunit structure of earthworm erythrocrurin. *J. Mol. Biol.* 87, 89–100.
- Everaarts, J.M., Weber, R.E., 1974. Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol. A* 48, 507–520.
- Frossard, P., 1982. The erythrocrurin of *Eisenia foetida*: 1. Properties and subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta* 704, 524–534.
- Fushitani, K., Riggs, A.F., 1991. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Oxygenation properties of isolated chains, trimer, and a reassociated product. *J. Biol. Chem.* 266, 10275–10281.
- Fushitani, K., Imai, K., Riggs, A.F., 1986. Oxygenation properties of hemoglobin from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Effects of pH, salts, and temperature. *J. Biol. Chem.* 261, 8414–8423.
- Igarashi, Y., Kimura, K., Kajita, A., 1985. Calcium-dependent allosteric modulation of the giant hemoglobin from the terrestrial oligochaete, *Eisenia foetida*. *Biochem. Int.* 10, 611–618.
- Igarashi, Y., Kimura, K., Kajita, A., 1991. Analysis of oxygen equilibria of the giant hemoglobin from the earthworm *Eisenia foetida* using the Adair model. *J. Biochem. (Tokyo)* 109, 256–261.
- Ilan, E., Haroun, J., 1993. Oxygen-binding properties of extracellular hemoglobin from the leech, *Hirudo medicinalis*. Effects of pH, cations and temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 1162, 77–83.
- Imai, K., Yonetani, T., 1975. pH dependence of the Adair constants of human hemoglobin. Nonuniform contribution of successive oxygen bindings to the alkaline Bohr effect. *J. Biol. Chem.* 250, 2227–2231.
- Imasato, H., Tinto, M.H., Perussi, J.R., Tabak, M., 1995. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. *Comp. Biochem. Physiol. B* 112, 217–226.
- Kapp, O.H., Polidori, G., Mainwaring, M.G., Crewe, A.V., Vinogradov, S.N., 1984. The reassociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin dissociated at alkaline pH. *J. Biol. Chem.* 259, 628–639.
- Marques, M.B., Meirelles, N.C., 1995. Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (Righi) (Oligochaeta, Glossoscolecidae). Effects of divalent ions, acid–alkaline transition and alkali and urea denaturation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 111, 311–318.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P., 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88–118.
- Ochiai, T., 1984. Dissociation and oxygen equilibrium properties of the extracellular hemoglobin of *Eisenia foetida*. *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 136–143.
- Ochiai, T., Enoki, Y., 1981. The molecular architecture and the subunits of earthworm (*Eisenia foetida*) hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 68, 275–279.
- Ochiai, T., Enoki, Y., 1982. Reversible dissociations from the 60S whole molecule to 10S subunit in earthworm (*Pheretima communissima* and *Pheretima hilgendorfi*) hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 71, 727–729.
- Ochiai, T., Hoshina, S., Usuki, I., 1993. Zinc as a modulator of oxygenation function and stabilizer of quaternary structure in earthworm hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 310–314.
- Ochiai, T., Weber, R.E., 2002. Effects of magnesium and calcium on the oxygenation reaction of erythrocrurin from the marine polychaete *Arenicola marina* and the terrestrial oligochaete *Lumbricus terrestris*. *Zool. Sci.* 19, 995–1000.
- Paladini, A.A., Weber, G., 1981. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* 20, 2587–2593.
- Pionetti, J.M., Pouyet, J., 1980. Molecular architecture of annelid erythrocrurins. Extracellular hemoglobin of *Arenicola marina* (Polychaeta). *Eur. J. Biochem.* 105, 131–138.
- Polidori, G., Mainwaring, M., Kosinski, T., Schwarz, C., Fingal, R., Vinogradov, S.N., 1984. The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Tubifex tubifex* at extremes of pH and its reassociation upon return to neutrality. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 800–814.
- Polidori, G., Mainwaring, M.G., Vinogradov, S.N., 1988. The effect of alkaline earth cations and of ionic strength on the dissociation of earthworm hemoglobin at alkaline pH. *Comp. Biochem. Physiol. A* 89, 541–545.
- Rasmussen, K.K., Weber, R.E., 1979. Respiratory properties of erythrocrurin (extracellular hemoglobin) in the blood of the annelid *Arenicola marina* with special reference to the influences of salinity and temperature. *Ophelia* 18, 151–170.
- Riggs, A., 1981. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods Enzymol.* 76, 5–29.
- Rossi-Fanelli, A., Antonini, E., 1958. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 478–492.
- Royer Jr., W.E., Strand, K., van Heel, M., Hendrickson, W.A., 2000. Structural hierarchy in erythrocrurin, the giant respiratory assemblage of annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7107–7111.
- Santos, J.L.R., Bispo, J.A.C., Landini, G.F., Bonafe, C.F.S., 2004. Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure. *Biophys. Chem.* 111, 53–61.
- Sharma, P.K., Walz, D.A., Vinogradov, S.N., 1990. Heterogeneity of the subunits of *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin dissociated at alkaline pH. *Comp. Biochem. Physiol. B* 98, 47–51.
- Silva, J.L., Weber, G., 1993. Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44, 89–113.
- Silva, J.L., Villas-Boas, M., Bonafe, C.F.S., Meirelles, N.C., 1989. Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 264, 15863–15868.
- Silva, J.L., Foguel, D., Da Poian, A.T., Prevelige, P.E., 1996. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 166–175.
- Tsuneshige, A., Imai, K., Hori, H., Tyuma, I., Gotoh, T., 1989. Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grube): comparative physiology of hemoglobin. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 406–417.
- Vinogradov, S.N., 1985. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrurins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol. B* 82, 1–15.
- Vinogradov, S.N., Shlom, J.M., Hall, B.C., Kapp, O.H., Mizukami, H., 1977. Dissociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. Model of its subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta* 492, 136–155.
- Vinogradov, S.N., Shlom, J.M., Doyle, M., 1980. Dissociation of the extracellular hemoglobin of *Arenicola cristata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 65, 145–150.
- Weber, R.E., Vinogradov, S.N., 2001. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* 81, 569–628.