

Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Biologia Molecular

***Resolução da estrutura cristalográfica
e análise da estabilidade estrutural da
hemoglobina de *Cerdocyon thous****

Gisele Ferreira Esteves

2007

Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Biologia Molecular

***Resolução da estrutura cristalográfica
e análise da estabilidade estrutural da
hemoglobina de *Cerdocyon thous****

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do grau
de mestre em Biologia Molecular.

Gisele Ferreira Esteves

Orientadora:
Sonia Maria de Freitas

2007

Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Biologia Molecular

***Resolução da estrutura cristalográfica
e análise da estabilidade estrutural da
hemoglobina de *Cerdocyon thous****

Banca examinadora

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva
Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas
Prof^a. Dr^a. Rozeni Chagas Lima Teles (suplente)

2007

Aos meus pais, minha irmã

e meu namorado.

dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a professora Dra. Sonia Maria de Freitas, por ter me acolhido no laboratório desde a iniciação científica, por ter me orientado no mestrado, e pelo exemplo de vida. Sem você, nada disso teria sido possível.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Regina, pela sólida formação, pelo incentivo sempre carinhoso e pelo apoio durante todos os meus estudos.

À minha irmã, Geisa, pelo carinho e amizade, e por ser alguém com quem eu sempre pude contar.

Ao meu namorado, Ademar, por fazer-se presente nas horas mais difíceis, e pela especial ajuda com o computador.

Aos professores Marcelo de Macedo Brígido, Luciano Paulino da Silva e Rozeni Chagas Lima Teles, pela participação na banca de defesa da dissertação.

Às professoras Andréa Queiroz Maranhão e Ildinete Silva Pereira, pela imensa colaboração na banca de qualificação.

Ao professor Jaime Martins de Santana, pela participação na banca de qualificação e no processo de transição para o doutorado.

A todo o pessoal do laboratório, pela convivência, tanto nos momentos duros de trabalho como nos momentos de diversão.

Aos meus amigos, que souberam entender os momentos em que eu tive de estar ausente.

À Sandra e Ana, e ao Chiquinho, pela eficiência com que desempenham seu trabalho e por toda a ajuda.

E a todos os outros que não estão citados mas não esquecidos, e que de alguma forma deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada.

Agradeço também a CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

A hemoglobina de *Cerdocyon thous* (HbCt) foi purificada e cristalizada pelo método de difusão de vapor a 21°C na condição PEG 4000 16%, Hepes-Na 0,1 M pH 7,8. Os dados cristalográficos foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O grupo espacial do cristal é do tipo $P2_12_12_1$, com os eixos da célula unitária de $a=52,73$; $b=84,24$ e $c=130,28$ Å, correspondentes a cristais do sistema ortorrômbico. A estrutura cristalográfica da HbCt foi resolvida até o limite de 2,2 Å de resolução, pelo método de substituição molecular utilizando a estrutura da hemoglobina de *Chrysocyon brachyurus* (PDB ID: 1FHJ) como modelo. O modelo final obtido após o refinamento foi depositado no PDB com o código 2B7H, apresentando boa qualidade conforme indicado por vários parâmetros, dentre eles, o valor baixo dos fatores de temperatura, o R_{factor} de 0,168 e R_{free} de 0,232. A estrutura dessa hemoglobina apresenta uma água como ligante do ferro e sua organização estrutural assemelha-se às hemoglobinas do tipo metahemoglobina. A sua estrutura cristalográfica foi utilizada como um modelo de estudo para análise do comprometimento estrutural tridimensional com substituições de aminoácidos em posições específicas. Para isso, foram utilizadas estruturas cristalográficas de hemoglobinas de humano e de cavalo, disponíveis no PDB. Além dessas substituições uma análise detalhada da relação estrutura vs estabilidade foi feita.

Por ser uma proteína multimérica, a desnaturação da hemoglobina varia de acordo com a condição de pH e o tipo de desnaturante utilizado. Neste trabalho, o processo de desdobramento da HbCt e da hemoglobina de *Pseudalopex vetulus* (HbPv) foi realizado para analisar a estabilidade dessas moléculas. Estes ensaios foram acompanhados por fluorescência e dicroísmo circular utilizando a uréia, a guanidina, diferentes pHs e a temperatura como agentes desnaturantes. Além disso, foi analisado o efeito do surfactante catiônico brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) na estabilidade das hemoglobinas, por dicroísmo circular. A HbCt é mais estável em pH ácido e mais instável do que a HbPv em pH básico. Esses dados foram comparados com a cianometahemoglobina humana. O CTAB na concentração de 0,5 e 1 mM para HbCt e HbPv, respectivamente estabiliza as hemoglobinas principalmente pelo efeito de hidratação preferencial.

Uma análise da relação da estabilidade de hemoglobinas com a estrutura tridimensional foi feita baseando-se nos modelos

tridimensionais da HbCt, humana e de cavalo. Comparando com a hemoglobina humana, as modificações apresentadas na HbCt tendem a ser estabilizadoras. Em contrapartida, comparando com a hemoglobina eqüina, as modificações apresentadas na HbCt tendem a ser desfavoráveis para a estabilidade conformacional. As substituições e o comprometimento com a organização estrutural, causadas no ambiente molecular, foram caracterizadas e podem servir de modelo para o desenho racional de proteínas mais estáveis, com vistas à aplicação biotecnológica, como é o caso do desenvolvimento do sangue artificial recentemente descrito na literatura. Esse tipo de estudo pode ser aplicado como um modelo da relação estrutura vs estabilidade de proteínas em geral, mas principalmente para aquelas com maior número de entradas no PDB e que merecem atenção pela função e aplicação biotecnológica.

SUMMARY

The hemoglobin from *C. thous* (HbCt) was purified and crystallized by hanging drop vapor diffusion method at 21°C in 16% PEG 4000, 0.1 M Hepes-Na pH 7.8. The crystallographic data were collected in the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS). The crystals grew in space group $P2_12_12_1$ (orthorhombic type) with cell dimensions of $a=52.73$, $b=84.24$ and $c=130.28$ Å. The crystallographic structure of the HbCt was solved at 2.2 Å resolution, by molecular replacement using the structure of the hemoglobin from *Chrysocyon brachyurus* (pdb 1FHJ) as a search model. The model was refined and deposited in the PDB under the code 2B7H with structural quality indicated by some parameters, among them, the low value of B -factor, the R_{factor} of 0.168 and the R_{free} of 0.232. The hemoglobin presents one water molecule as ligand of the iron characterizing the methemoglobin form. The structural organization of the subunits of the HbCt is similar to the known hemoglobins. The crystallographic structure of HbCt and hemoglobins from human and horse were used as models to study the structural effects concerning the amino acid substitutions in specific positions and the consequent conformational changes of the respective molecular environment. Indeed, an extensive analysis of the relationship between structure and stability was done. The hemoglobin is a multimeric protein and its unfolding process depends of several conditions such as pH and denaturing agent. In this work, the unfolding process of the HbCt and the hemoglobin from *Pseudalopex vetulus* (HbPv) was performed by fluorescence and circular dichroism using urea, guanidine, different pHs and temperature as denaturing agents. Moreover, the stabilizing effect of the cationic surfactant hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) was analyzed by circular dichroism. HbCt is more stable in acid pH and more instable than HbPv in basic pH. The CTAB, at 0.5 and 1.0 mM for HbCt and HbPv, respectively, stabilizes the hemoglobins mainly by preferential hydration.

An analysis of the relationship between stability and the three-dimensional structure was done based on the three-dimensional models of HbCt, human and horse. The differences in amino acidic content of HbCt comparing with the human hemoglobin tend to stabilize the HbCt. On the other hand, comparing with equine hemoglobin, the modifications presented in HbCt tend to be unfavorable for the conformational stability.

The amino acidic substitutions and the consequent conformational changes in the molecular environment of the HbCt were characterized. Generally, this study is very important for rational design of stable proteins with biotechnological applications. For hemoglobin, in particular, this study is fundamental in order to produce the artificial blood, a new tendency of pharmaceutical companies, as recently described in the literature.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 A HEMOGLOBINA	01
1.1.1 Estrutura tridimensional da hemoglobina	02
1.1.2 Conformações da hemoglobina	04
1.1.3 O transporte de oxigênio	06
1.1.4 O transporte de H ⁺ e CO ₂	07
1.1.5 A interação com fosfatos orgânicos	09
1.1.6 A metahemoglobina	12
1.1.7 Espécies estudadas	14
1.1.8 Justificativa	15
2 OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	20
3 MÉTODOS	21
3.1 Obtenção do sangue	21
3.2 Purificação da hemoglobina	21
3.3 Cristalização da hemoglobina	22
3.4 Coleta e processamento de dados da difração de raios-X	24
3.5 Construção e refinamento do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina	27
3.6 Análise do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina	31

3.7 Espectroscopia de fluorescência	31
3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Purificação e cristalização das hemoglobinas	35
4.2 Coleta e processamento de dados da difração de raiosx	37
4.3 Resolução e refinamento do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina	39
4.4 Análise do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina	43
4.5 Espectroscopia de fluorescência	54
4.6 Espectroscopia de dicroísmo circular	68
4.6.1 Desnaturação química	68
4.6.2 Desnaturação térmica	73
4.6.3 Efeito do CTAB	87
4.7 Análise da estrutura tridimensional vs estabilidade conformacional	96
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
6 CONCLUSÕES	117
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Hemoglobinas (PDB ID 1HGA e 1BBB) nos estados T e R, respectivamente. Subunidades α (cinza) e subunidades β (azul). Percebe-se o estreitamento da região entre as subunidades β na mudança do estado T para o estado R (Lehninger, 2002). 06

Fig. 2 Complexo do 2,3-DPG (em rosa) com a desoxihemoglobina humana. PDB ID 1B86 (Richard e colaboradores, 1993). 12

Fig. 3 Representação simplificada da via da metahemoglobina redutase. 13

Fig. 4 Cromatografia de exclusão molecular das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*. Os dois picos correspondem às frações contendo hemoglobina. 35

Fig. 5 Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida-SDS 13%, da hemoglobina de *C. thous* purificada em cromatografia de exclusão molecular, 1: marcador molecular; 2-4: cadeias α e β da hemoglobina com massa molecular de aproximadamente 15 kDa. 36

Fig. 6. Cristais da hemoglobina de *C. thous*. (A) Cloreto de Magnésio 0,2 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, PEG 4000 30%, (B) Sulfato de amônio 0,2 M, Cacodilato de sódio 0,1 M pH 6,5, PEG 8000 30%. 36

Fig. 7. (a) Padrão de difração de raios-X da hemoglobina de *C. thous*. (b) Detalhe de uma imagem do padrão de difração. (c) Predição dos pontos no padrão de difração de raios-X. Os pontos vermelhos são aqueles que não correspondem a pontos da rede cristalina e devem ser excluídos. Os pontos amarelos representam reflexões parciais e estão incompletos na imagem. Os pontos verdes representam as reflexões totais e completas na imagem. 38

Fig. 8 Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina *Chrysocyon brachyurus* (1FHJ). Os resíduos de aminoácidos idênticos são representadas por "*", as substituições conservativas são representadas por ":" e as substituições semi-conservativas são representadas por ".". 41

Fig. 9 Resíduos de aminoácidos substituídos na *C. thous* em relação ao modelo utilizado. (A) α 130 Thr, (B) β 16 Ala (C) β 53 Ser. Cores: C – cinza, N - azul, O – vermelho. 42

- Fig. 10** Mapa de densidade eletrônica da estrutura da hemoglobina de *C. thous*. Em destaque estão as cadeias laterais de alguns resíduos aromáticos. 44
- Fig. 11** Estrutura da hemoglobina tetramérica de *C. thous* com os quatro grupamentos heme e as moléculas de água (em vermelho), gerada pelo programa Pymol. 44
- Fig. 12** Gráfico de Ramachandran com a posição de cada resíduo de aminoácido para o modelo final da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous*. 45
- Fig. 13** Mapa de densidade 1.0σ na região do grupo heme da cadeia α mostrando a hexacoordenação do ferro com o grupo heme, a água e a histidina. 46
- Fig. 14** Mapa de densidade 1.0σ na região do grupo heme da cadeia β mostrando a hexacoordenação do ferro com o grupo heme, a água e a histidina. 47
- Fig. 15** Sobreposição das estruturas tridimensionais da hemoglobina de *C. thous* (amarelo) e humana (vermelho) gerada pelo programa Pymol. Este alinhamento estrutural foi realizado considerando-se somente a cadeia principal. As cadeias laterais dos aminoácidos não estão representadas. 48
- Fig. 16** Sobreposição das estruturas tridimensionais da hemoglobina de *C. thous* (amarelo) e humana (vermelho) gerada pelo programa Pymol. Este alinhamento estrutural foi realizado considerando-se somente a cadeia principal, mas apenas as cadeias laterais dos aminoácidos estão representadas. As setas indicam algumas regiões com diferenças na orientação das cadeias laterais. 49
- Fig. 17** (A) Representação do contato entre α Gln34 e β Gln125. (B) Contatos realizados pelo oxigênio da carbonila de α Cis111. 51
- Fig. 18** (A) Representação dos contatos de Arg β 30 (B) Contatos e distâncias da α Pro119. 52
- Fig. 19** (A) Representação dos resíduos da região 'dobradiça' responsáveis pela mudança de conformação da estrutura. 53
- Fig. 20** Espectros de fluorescência da hemoglobina de *C. thous* (superior) e *P. vetulus* (inferior) em pH 2 (A,D), pH 6 (B,E) e pH 10 (C,F) em diferentes concentrações de uréia. 55
- Fig. 21** Espectros de fluorescência da hemoglobina de *C. thous* (superior) e *P. vetulus* (inferior) em pH 2 (A,D), pH 6 (B,E) e pH 10 (C,F) em diferentes concentrações de guanidina. 56

- Fig. 22** Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 2,0, 6,0 e 10,0 na presença de uréia. 57
- Fig. 23** Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 2,0, 6,0 e 10,0 na presença de guanidina. 57
- Fig. 24** Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, 6,0 e 10,0. 58
- Fig. 25** Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) no desdobramento da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de guanidina em pH 2,0, 6,0 e 10,0. 58
- Fig. 26** Fração desnaturada da primeira transição da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 2,0 e 10,0, na presença de uréia. 61
- Fig. 27** Fração desnaturada da segunda transição da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 2,0 e 10,0, na presença de uréia. 61
- Fig. 28** Fração desnaturada da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 6,0 na presença de uréia. 62
- Fig. 29** Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *P. vetulus* com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, e 10,0. 64
- Fig. 30** Variação da elipticidade monitorada por dicroísmo circular em 222 nm, em pH 2,0, pH 6,0 e pH 10,0, das hemoglobinas de *C. thous* (CT) e *P. vetulus* (PV), em diferentes concentrações de uréia (A) e guanidina (B). As curvas mostram uma transição rápida para o estado desdobrado, mais evidente nas curvas obtidas com guanidina, em concentrações baixas do desnaturante, com um perfil semelhante para as duas hemoglobinas, porém de menor intensidade para a *P. vetulus*. 70
- Fig. 31** Elipticidade molar da hemoglobina de *C. thous* em pH 6,0 e *P. vetulus* em pH 6,0 na presença de uréia evidenciando a presença de vários microestados. 71
- Fig. 32** Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em 10,0 na presença de uréia. 71
- Fig. 33** Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de uréia para as duas transições em pH 10,0. 72
- Fig. 34** Espectros de dicroísmo circular da hemoglobina de (A) *C. thous* e *P. vetulus* (B) em diferentes pHs. 74
- Fig. 35** Variação da elipticidade em 222 nm para as hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*, sob o efeito do pH. 75

- Fig. 36** Curvas de desnaturação térmica para as hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B) sob o efeito do pH variando de 3-10. 76
- Fig. 37** Fração desnaturada termicamente das hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B), sob o efeito do pH. 77
- Fig. 38** Variação de energia livre de Gibbs (ΔG) com a temperatura em diferentes pHs para as hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B). 78
- Fig. 39** Gráfico de Van't Hoff para a desnaturação térmica sob o efeito do pH das hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B). 79
- Fig. 40** Fração desnaturada termicamente da hemoglobina de *C. thous* em pH 3,0. 80
- Fig. 41** Efeito da adição de hexadecil-trimetil-brometo de amônio (CTAB) na estrutura secundária da hemoglobina de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B) e na desnaturação térmica de *C. thous* (C) e *P. vetulus* (D). 90
- Fig. 42** Fração desnaturada termicamente da hemoglobina de *C. thous*, na presença de CTAB 0,1 mM. 93
- Fig. 43** Variação de energia livre de Gibbs (ΔG) com aumento da temperatura para a hemoglobina de *C. thous* na presença de CTAB 0,1 mM. 93
- Fig. 44** Gráfico de van't Hoff para a desnaturação da hemoglobina de *C. thous* na presença de CTAB 0,1 mM. 94
- Fig. 45** Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina humana (HHO). 98
- Fig. 46** Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina eqüina (NS9). 104
- Figura 47** (A) Hemoglobina humana, cadeia β , leucina 87. (B) Hemoglobina de *C. thous*, cadeia β , lisina 87 interagindo com glutamato 90. 108
- Figura 48** Região hidrofóbica em torno do resíduo 113 da cadeia α . (A) Hemoglobina eqüina cadeia α , leucina 113. (B) Hemoglobina de *C. thous* cadeia α , histidina 113. A substituição favorece a interação entre os resíduos aromáticos. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das estruturas secundárias dentro da seqüência primária das cadeias α e β da hemoglobina humana (Imai, 1982). A indicação de uma letra indica hélices e duas letras indicam *corners*. NA e HC que indicam os resíduos de aminoácidos na porção amino e carboxi terminal, respectivamente.

03

Tabela 2. Coleta de dados da hemoglobina de *C. thous* e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos a última camada de resolução de 2,28 – 2,2° Å.

40

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de transição obtidas pelos espectros de fluorescência para a hemoglobina de *C. thous*.

59

Tabela 4. Parâmetros calculados a partir das curvas de transição parciais (1 e 2) obtidas com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, e 10,0, para a hemoglobina de *P. vetulus*.

64

Tabela 5. Parâmetros calculados a partir das curvas de transição parciais (1 e 2) obtidas com a variação da concentração de uréia em pH 10,0 para a hemoglobina de *C. thous*.

72

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de transição térmicas sob o efeito do pH, obtidas para as hemoglobinas de *C. thous* e *P.vetulus*.

81

Tabela 7. Tm de hemoglobinas de diferentes espécies e calculados a partir das curvas de transição térmicas sob o efeito do pH, para as hemoglobinas de *C. thous* e *P.vetulus*.

85

Tabela 8. Valores da elipticidade a 208 nm e 222 nm sob o efeito de CTAB para as hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.

91

Tabela 9. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação a hemoglobina humana.

99

Tabela 10. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia β da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação a hemoglobina humana.

101

Tabela 11. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação à hemoglobina eqüina. 105

Tabela 12. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação à hemoglobina eqüina. 106

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Θ	Elipticidade molar residual
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs
2,3 DPG	2,3 difosfoglicerato
CD	Dicroísmo circular
CMC	Concentração micelar crítica
CO ₂	Dióxido de carbono
CTAB	Brometo de hexadecitrimetil amônio
D ½	Concentração média de transição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe ²⁺	Ferro no estado reduzido
Fe ³⁺	Ferro no estado oxidado
Fu	Fração desnaturada da proteína
GdnHCl	Cloridrato de guanidina
H ⁺	Íon hidrogênio
HbCt	Hemoglobina de <i>Cerdocyon thous</i>
HbPv	Hemoglobina de <i>Pseudalopex vetulus</i>
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
PDB ID	Código de identificação da molécula no Protein Data Bank
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
RMSD	Root mean square deviation
SDS	Sódio dodecil sulfato
T _m	Temperatura média de transição
UV	Ultra violeta

RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS ABREVIações (3 LETRAS)

Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Ácido aspártico	Asp
Cisteína	Cys
Glutamina	Gln
Ácido glutâmico	Glu
Glicina	Gly
Histidina	His
Isoleucina	Iso
Leucina	Leu
Lisina	Lis
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptofano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val

“Viver não é aprender,

mas aplicar.”

(Legouvé).

1. INTRODUÇÃO

1.1 A HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma proteína que está situada no interior dos eritrócitos da maioria dos vertebrados, cuja função principal é transportar oxigênio para todos os tecidos. Apresenta uma larga distribuição filogenética ocorrendo: como pigmento respiratório extracelular em vários invertebrados (Weber, 1980), em todos os vertebrados (Gratzer e Allison, 1960), exceto em alguns peixes da Antártica (Weber, 1982) e até mesmo nos vegetais (Manwell, 1960).

Nos eritrócitos dos vertebrados a hemoglobina representa aproximadamente 90% das proteínas presentes, que lhe permite realizar de forma eficiente a sua função de transportar oxigênio.

A excepcional adaptação da função fisiológica da hemoglobina, nos mais variados organismos, torna-a um modelo para o estudo das relações entre a estrutura e função entre proteínas. Além disso, considerando-se que a hemoglobina é adaptada às necessidades respiratórias de cada espécie, é possível fazer amplas correlações tanto na estrutura quanto na função para grupos taxonômicos maiores (Sullivan, 1967; Coates, 1975; Gorr, 1998; Ajloo, 2002 A; Vinogradov, 2006).

1.1.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina de vertebrados é uma proteína formada por quatro cadeias polipeptídicas com quatro grupos prostéticos heme, com átomos de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). A porção protéica, denominada globina, consiste de duas cadeias α (141 resíduos cada) e duas cadeias β (146 resíduos cada). As subunidades da hemoglobina estão dispostas em pares simétricos, cada par apresentando uma subunidade α e uma subunidade β . Dessa forma, a hemoglobina pode ser descrita tanto como um tetrâmero quanto como um dímero de protômeros $\alpha\beta$.

As cadeias α contém sete α -hélices, enquanto que as cadeias β contém oito α -hélices. Estas hélices são identificadas por letras do alfabeto (Tabela 1), sendo interrompidas por segmentos sem uma estrutura secundária definida. Portanto, o primeiro segmento em hélice na molécula de hemoglobina é dito hélice A e, o primeiro segmento não helicoidal é dito AB, pois, encontra-se entre as hélices A e B. Um pequeno segmento não helicoidal precede a hélice A (N-terminal) e é denominado NA, o segmento após a última alfa-hélice (C-terminal) é denominado HC.

O grupo heme é constituído por uma estrutura complexa na forma de um anel, a protoporfirina, à qual está ligado um único átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{2+}). O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação, quatro com átomos de nitrogênio, que fazem parte do sistema do anel plano da porfirina, e duas perpendiculares à porfirina. No estado Fe^{2+} , o ferro liga o oxigênio de forma reversível; no estado Fe^{3+} , ele não liga o oxigênio.

Tabela 1 - Identificação das estruturas secundárias dentro da seqüência primária das cadeias α e β da hemoglobina humana (Imai, 1982). A indicação de uma letra indica hélices e duas letras indicam *corners*, exceto NA e HC que indicam os resíduos de aminoácidos na porção amino e carboxi terminal, respectivamente.

CADEIA ALFA			CADEIA BETA		
Hélice/ Corner	Do Resíduo nº	Ao Resíduo nº	Hélice/ Corner	Do Resíduo nº	Ao Resíduo nº
NA	Val1	Leu2	NA	Val1	Leu3
A	Ser3	Gly18	A	Thr4	Val18
AB	Ala19		B	Asn19	Val34
B	His20	Ser35	C	Tyr35	Phe41
C	Phe36	Tyr42	CD	Phe42	Ser49
CD	Phe43	Ser49	D	Thr50	Gly56
D	His50	Gly51	E	Asn57	Ala76
E	Ser52	Ala71	EF	His77	Thr84
EF	His72	Ala79	F	Phe85	Cys93
F	Leu80	Ala88	FG	Asp94	Val98
FG	His89	Val93	G	Asp99	His117
G	Asp94	His112	GH	Phe118	Phe122
GH	Leu113	Phe117	H	Thr123	His143
H	Thr118	Ser138	HC	Lys144	His146
HC	Lys139	Arg141			

Em diversas espécies existe uma grande variedade de estruturas de hemoglobinas no nível terciário e quaternário. A estrutura quaternária da hemoglobina humana apresenta grande número de interações não covalentes entre subunidades diferentes. Segundo Perutz (1978), na hemoglobina de cavalo os pontos de contato entre as cadeias α e β são basicamente hidrofóbicos e podem ser de dois tipos. A interface $\alpha_1\beta_1$ (e sua equivalente $\alpha_2\beta_2$) envolve mais de 30 resíduos de aminoácidos e é suficientemente forte para mantê-las unidas. Essas interações são denominadas de contatos de empacotamento, e passam por pequenas mudanças quando a molécula da hemoglobina muda de

conformação. A interface $\alpha_1\beta_2$ (e a $\alpha_2\beta_1$) envolve 19 resíduos. Esses são chamados contatos de deslizamento, pois apresentam as principais mudanças quando a hemoglobina muda de conformação. Essa interface está conectada indiretamente ao grupo heme, conseqüentemente alterações estruturais nessa região são transmitidas ao grupamento heme e vice-versa. Uma mudança estrutural dentro de uma subunidade é traduzida em alterações estruturais nas interfaces entre as subunidades e, por fim, uma mudança conformacional da molécula inteira. Dessa forma a ligação de oxigênio ao grupo heme de uma das subunidades é transmitida a outras partes distantes da molécula. As interfaces entre as cadeias semelhantes ($\alpha_1\alpha_2$ ou $\beta_1\beta_2$) são menos extensas e mais polares.

1.1.2 CONFORMAÇÕES DA HEMOGLOBINA

A análise de estruturas cristalográficas, obtidas por raios-X, revelou dois estados conformacionais principais da hemoglobina: o estado R e o estado T (Perutz, 1970). Apesar do oxigênio ligar-se à hemoglobina em ambos os estados, no estado R ele apresenta uma afinidade significativamente maior para a hemoglobina e estabiliza esta conformação no estado R. Experimentalmente, quando o oxigênio está ausente, o estado T é mais estável e, portanto, é a conformação predominante da desoxihemoglobina. Historicamente, as denominações T e R referiam-se a "tenso" e "relaxado", respectivamente, porque o estado T é estabilizado por um número maior de pares iônicos, muitos dos quais ficam na interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$). A ligação de oxigênio a uma subunidade de hemoglobina no estado T desencadeia uma mudança da conformação para o estado R. Quando toda a proteína passa por esse

processo de transição, a estrutura das subunidades individuais muda pouco, mas os pares de subunidades $\alpha\beta$ deslizam um pelo outro e fazem uma rotação, o que estreita a fenda entre as subunidades β . Nesse processo, alguns dos pares de íons que estabilizam o estado T são rompidos e alguns novos são formados. A transição $T \rightarrow R$ é desencadeada por mudanças nas posições críticas das cadeias de aminoácidos que envolvem o grupo heme. No estado T, a porfirina está levemente peregueada, levando o grupo heme a fazer uma pequena protrusão sobre o lado da histidina proximal. A ligação de oxigênio leva o grupo heme a assumir uma conformação mais planar, mudando a posição da histidina proximal e a hélice F ligada. Além disso, um resíduo valina da hélice E (Val E11) bloqueia parcialmente o grupo heme no estado T e precisa deslocar-se para que o oxigênio se ligue. Essas mudanças levam a ajustes dos pares de íons na interface $\alpha_1\beta_2$.

Todas as ligações que estabilizam o estado T são rompidas quando a hemoglobina se encontra na forma oxigenada. A desoxihemoglobina é estabilizada por ligações salinas entre cadeias diferentes. Os aminoácidos da região carboxiterminal das quatro cadeias estão ancorados e participam das ligações salinas, por meio da cadeia principal e das cadeias laterais. A forma T apresenta mais contatos na região $\alpha_1\beta_2$ do que a forma R. Essas diferenças surgem devido ao empacotamento dos dímeros.

Durante a oxigenação, as grandes mudanças ocorrem nas áreas de contato entre os dímeros que se deslocam 15° um em relação ao outro. As hélices B, C, G e H, que estão próximas à região central, ficam relativamente fixas nas duas subunidades. A região das hélices C e D também varia pouco. Os grupamentos heme, as hélices F, e as dobras FG de ambas subunidades se movem em direção ao centro da molécula tornando-se mais próximos. O movimento das dobras FG está relacionado com a mudança de estrutura quaternária, uma vez que

estas dobras fazem parte da interface $\alpha_1\beta_2$.

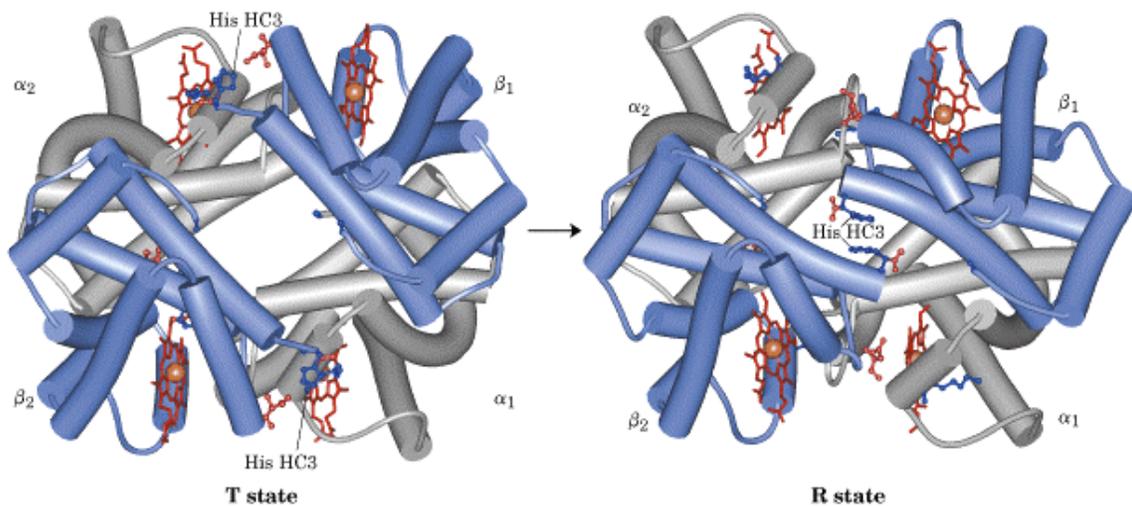


Fig. 1 Hemoglobinas (PDB ID 1HGA e 1BBB) nos estados T e R, respectivamente. Subunidades α (cinza) e subunidades β (azul). Percebe-se o estreitamento da região entre as subunidades β na mudança do estado T para o estado R (Lehninger, 2002).

1.1.3 O TRANSPORTE DE OXIGÊNIO

Nos pulmões, uma molécula de hemoglobina é cercada por uma alta concentração de oxigênio, condição favorável para a ligação deste íon nesta proteína. Em tecidos ativos, a concentração de oxigênio é menor, e neste caso a hemoglobina libera o oxigênio.

A ligação do oxigênio com a hemoglobina é do tipo cooperativa. Segundo Riggs (1972) as modificações que ocorrem na estrutura da molécula de hemoglobina quando ela se liga ao oxigênio induzem pequenas alterações na conformação das subunidades de maneira que quando ocorre a oxigenação de um grupo heme, pode haver aumento da afinidade do oxigênio de outro grupo heme que está desoxigenado. Isto significa que a ligação de uma molécula de oxigênio torna mais fácil

a ligação subsequente de outras moléculas de oxigênio. Essa interação que existe entre as subunidades, chamada de "cooperação positiva", capacita os 4 átomos de ferro, dentro de cada molécula, a interagir de uma maneira fisiologicamente vantajosa, fazendo que cada molécula realize o transporte de maneira eficiente: ou serão transportadas 4 moléculas de oxigênio, ou nenhuma. Dessa forma, a resposta da hemoglobina às necessidades de oxigênio de tecidos ativos é muito mais rápida.

Outros fatores que influenciam na ligação da hemoglobina ao oxigênio incluem o pH do plasma, os níveis de bicarbonato no plasma e a pressão de oxigênio no ar, especialmente em elevadas altitudes. A molécula de 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) desempenha um papel importante, pois se liga a hemoglobina e diminui sua afinidade por oxigênio, promovendo sua liberação e permitindo a distribuição de mais oxigênio aos tecidos em baixas tensões de oxigênio. Este processo de regulação pelo 2,3-DPG é discutido com detalhes no item 1.1.5 a seguir.

1.1.4 O TRANSPORTE DE H⁺ E CO₂

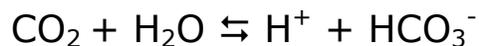
Além de transportar dos pulmões para os tecidos quase todo o oxigênio necessário para as células, a hemoglobina transporta dois produtos finais da respiração celular - H⁺ e CO₂ – dos tecidos para os pulmões e rins, onde eles são excretados.

A hemoglobina transporta o CO₂ por meio de dois mecanismos diferentes. Diretamente por ligação a sítios específicos e indiretamente por alterar a solubilidade do CO₂ por um efeito na concentração do H⁺ sangue. O CO₂ não é muito solúvel em solução aquosa, e haveria a formação de bolhas desse gás nos tecidos e no sangue se ele não

fosse convertido em bicarbonato. Diretamente, apenas 10% do CO₂ é transportado dissolvido no sangue. Ele se liga como um grupo carbamato ao grupo α-amino na extremidade amino-terminal de cada cadeia de globina, formando carbaminohemoglobina. A desoxihemoglobina apresenta uma afinidade maior por CO₂ que a forma oxigenada. Dois sítios são responsáveis por essa afinidade diferencial: os amino-terminais das cadeias α e β, cujos ambientes diferem nas estruturas. Os carbamatos ligados também formam pontes salinas adicionais que ajudam a estabilizar a desoxihemoglobina e promovem a liberação de oxigênio. Uma consequência termodinâmica da alta afinidade da desoxihemoglobina pelo CO₂ é que um aumento na concentração de CO₂ causa uma diminuição na afinidade de oxigênio da hemoglobina. Esses dois efeitos aumentam a eficiência do transporte de oxigênio e de CO₂.

O mecanismo indireto de transporte de CO₂ é uma consequência do efeito Bohr. No efeito Bohr os íons hidrogênio estabilizam a desoxihemoglobina e diminuem sua afinidade pelo oxigênio. A maioria do CO₂ produzido pela oxidação de combustíveis orgânicos nas mitocôndrias é hidratado nos tecidos e no sangue formando bicarbonato. Esta reação é catalisada pela anidrase carbônica, uma enzima particularmente abundante nos eritrócitos.

Essa reação produz H⁺, contribuindo para o efeito Bohr.



A hidratação de CO₂ resulta em um aumento da concentração de H⁺ (uma diminuição do pH) nos tecidos. A concentração de H⁺ presente nos glóbulos vermelhos modula a afinidade da hemoglobina ao oxigênio. Em pH relativamente baixo e alta concentração de CO₂ dos tecidos

periféricos ocorre a diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a liberação do mesmo nos tecidos. De maneira inversa, nos capilares do pulmão, com a excreção de CO_2 e a conseqüente elevação do pH, aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a proteína liga mais oxigênio para poder transportá-lo para os tecidos. Assim, quanto menor o pH da solução onde se encontra a hemoglobina, menor será sua afinidade ao oxigênio, portanto, será necessária uma pressão de oxigênio maior para saturar a hemoglobina.

A hemoglobina transporta para os pulmões e rins cerca de 20% do total de H^+ e CO_2 formados nos tecidos. O oxigênio e o H^+ não se ligam ao mesmo sítio da hemoglobina. O oxigênio liga-se aos átomos de ferro do grupo heme, enquanto o H^+ se liga a qualquer dos resíduos de aminoácidos da proteína que possam ser protonados.

Três grupos contribuem para a maior parte do efeito Bohr: o imidazol da histidina 146 das subunidades β , o amino-terminal da cadeia α e 15% da contribuição é dado pela histidina 122 α . Quando protonada, a histidina 146 forma um dos pares de íons – ao aspártico 94 – que ajuda a estabilizar a desoxihemoglobina no estado T. O par iônico estabiliza a forma protonada da histidina, dando a esse resíduo um pK_a anormalmente alto no estado T.

1.1.5 A INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM FOSFATOS ORGÂNICOS

Os eritrócitos dos vertebrados apresentam um papel importante na regulação do transporte de oxigênio por meio da produção e do controle da concentração de intermediários glicolíticos fosfatados, ou,

fosfatos orgânicos, que atuam como efetores alostéricos da hemoglobina. O 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) tem sido encontrado como efetor alostérico da hemoglobina de mamíferos, anfíbios anuros e alguns ciclostomatas. Em aves e quelônios este efetor é o inositol pentafofato e em serpentes e peixes é a adenosina trifosfato e a guanidina trifosfato .

O 2,3-DPG liga-se a um sítio distante do sítio de ligação com o oxigênio, na cavidade existente entre as subunidades β do estado T, e regula a afinidade de ligação da hemoglobina para o oxigênio em relação à pressão de oxigênio dos pulmões. Essa cavidade é revestida por resíduos de aminoácidos com carga positiva, que interagem com os grupos de carga negativa do 2,3-DPG. Diferentemente do oxigênio, somente uma molécula de 2,3-DPG liga-se a cada tetrâmero da hemoglobina. Ele diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, pois estabiliza o estado T. A transição para o estado R torna mais estreita a fenda de ligação do 2,3-DPG, impedindo a ligação deste. Na sua ausência, a hemoglobina é convertida para o estado R com maior facilidade (Lehninger, 2002).

Tanto a oxihemoglobina e a desoxihemoglobina podem se ligar ao 2,3-DPG, mas a forma desoxigenada apresenta uma afinidade muito maior pelo fosfato (Fermi e Perutz, 1981). Quando ocorre esta ligação, a molécula de desoxihemoglobina é estabilizada e esta interação diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e permite sua liberação para os tecidos. A ausência do co-fator 2-3 DPG aumenta a afinidade da ligação entre a hemoglobina e o oxigênio, dificultando sua liberação para os tecidos.

A regulação da ligação do oxigênio à hemoglobina pelo 2,3-DPG representa um papel importante no desenvolvimento fetal. Como o feto precisa extrair oxigênio do sangue da mãe, a hemoglobina fetal precisa ter maior afinidade com oxigênio do que a hemoglobina materna. Nos

fetos são sintetizadas subunidades γ em vez de subunidades β , formando hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Esse tetrâmero tem uma afinidade muito menor com 2,3-DPG do que a hemoglobina normal do adulto, e assim, uma afinidade maior com oxigênio.

Os eritrócitos de caninos, eqüinos, suínos e humanos apresentam uma afinidade pelo oxigênio naturalmente alta, que é reduzida pela ação do 2,3-DPG (Perutz e Fermi, 1993). Esse grupo normalmente apresenta altas concentrações de 2,3-DPG, no entanto, felinos e ruminantes domésticos apresentam baixas concentrações. Nos eritrócitos da maior parte das espécies de mamíferos, o 2-3-DPG reduz a afinidade do oxigênio pela hemoglobina. Devido ao fato das hemoglobinas das espécies com alta concentração de 2,3-DPG apresentarem alta afinidade pelo oxigênio, o 2,3-DPG é necessário no interior dos eritrócitos destas espécies para diminuir a afinidade de ligação da hemoglobina com o oxigênio e permitir sua liberação para os tecidos efetuando a manutenção da oxigenação dentro de um intervalo fisiológico.

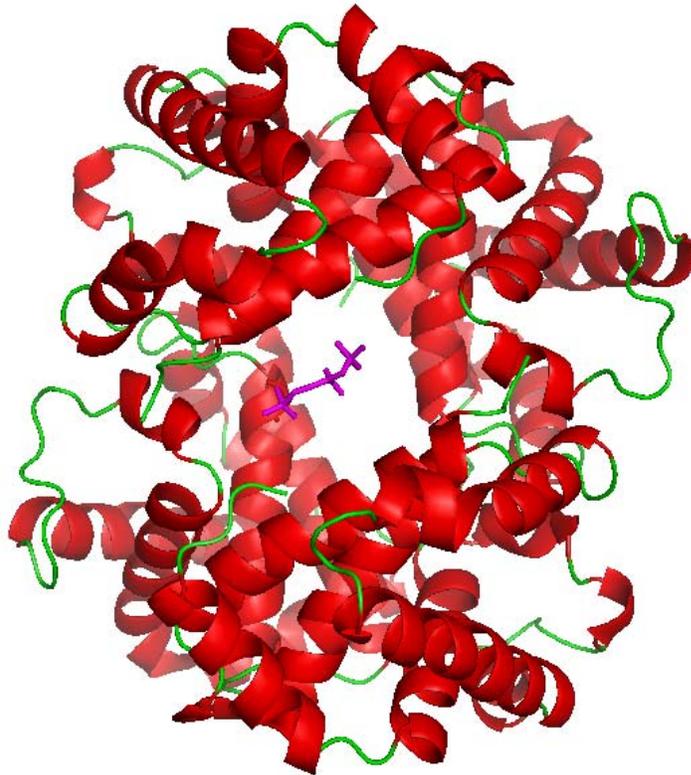


Fig. 2 Complexo do 2,3-DPG (em rosa) com a desoxihemoglobina humana . PDB ID 1B86 (Richard e colaboradores, 1993).

1.1.6 A METAHEMOGLOBINA

A metahemoglobina é formada quando o Ferro da molécula heme é oxidado do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}) normalmente pela dissociação do ânion superóxido da oxihemoglobina (Hernández, 1999). Em geral, na ausência de oxigênio, devido a baixa estabilidade da oxihemoglobina, ocorre a oxidação, que envolve a transferência de ferro para o composto oxidante, ocorrendo rapidamente na ausência de oxigênio (Bradberry, 2003).

O transporte de oxigênio depende da manutenção do estado de

oxidação do ferro. Quando a hemoglobina está oxidada a metahemoglobina o Ferro do grupo heme é incapaz de se ligar de maneira reversível ao oxigênio ou monóxido de carbono, sendo o ligante substituído por uma molécula de água ou por uma ligação covalente com a histidina.

Diariamente, em animais normais, uma pequena parte da hemoglobina contida nos eritrócitos sofre auto-oxidação e é transformada em metahemoglobina. Entretanto, indivíduos normais possuem, geralmente, no máximo 1% de metahemoglobina no eritrócito (Hernández, 1999). Nestes indivíduos a metahemoglobina está constantemente sendo reduzida à hemoglobina (Figura 4) pela reação catalisada pela enzima metahemoglobina redutase dependente de NADH proveniente da glicólise como cofator.

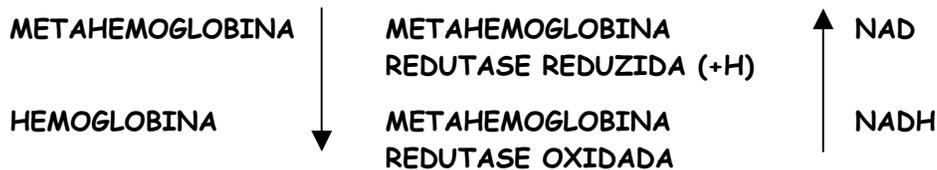


Fig. 3 Representação simplificada da via da metahemoglobina redutase.

Esta transformação pode acontecer também nos cristais de oxihemoglobina, sem mudança na estrutura cristalina, exceto por moléculas de solvente, que presumivelmente se ligam a cada um dos ferros do grupo heme (Antonini, 1971).

Em relação à estrutura quaternária da metahemoglobina foi confirmado por Baldwin e Chothia (1979) que a estrutura é praticamente a mesma da hemoglobina em conformação R, já que a alteração observada é a troca do ligante sem alterar a cadeia polipeptídica.

1.1.7 ESPÉCIES ESTUDADAS

Canidae é uma família de carnívoros semelhantes ao cão doméstico que inclui 16 gêneros e 36 espécies (Nowak, 1999). Apesar de vários estudos de sistemática, inclusive usando seis *loci* nucleares (Bardeleben, 2005) e DNA mitocondrial (Wayne e colaboradores, 1997), a relação entre algumas espécies da família *Canidae* permanece sem resposta. Como exemplo, a relação entre a monofilia de *Cerdocyon thous* e *Atelocynus microtis*, e o posicionamento filogenético de *Pseudalopex vetulus*.

Segundo Dalponte e Courtenay (2004), a *Pseudalopex vetulus* pertencia ao gênero *Lycalopex*, que foi reduzido a um subgênero de *Dusicyon*, e depois agrupada no gênero *Pseudalopex*. Segundo Wayne e colaboradores (1997), a diferença de *Pseudalopex* e *Lycalopex* não reflete muito a diferenciação genética. Na ausência de diferenças morfológicas apreciáveis, os autores sugeriram que as espécies formam um único gênero. Além disso, *Pseudalopex vetulus* e *Cerdocyon thous* apresentam uma distância filogenética de 0,101. Essa é a segunda maior relação genética de proximidade entre os canídeos (Wayne e colaboradores, 1987).

Estudos evolucionários têm comprovado que cães (Tsuda e colaboradores, 1997) e canídeos sul-americanos (Wayne e colaboradores, 1987) são geneticamente próximos e possuem como ancestral comum um tipo de lobo. Esta proximidade genética é reafirmada pela conhecida possibilidade de intercruzamento entre os gêneros de caninos.

A seqüência da hemoglobina de cão (*Canis familiaris*) (Brimhall e colaboradores, 1977) está depositada no banco de seqüências SWISS-PROT (HBA_CANFA, nºP01952 para a cadeia alfa e HBB_CANFA

nºP02056 para a cadeia beta). Esta hemoglobina apresenta uma dupla possibilidade na ocupação da posição 130 da cadeia α : alanina ou treonina ocupam esta posição na proporção de 1:2 (Runkel e colaboradores, 1974). A seqüência da hemoglobina de coiote (*Canis latrans*), assim como o segmento correspondente na hemoglobina de lobo, já foram determinadas (Runkel e colaboradores, 1974). Essas seqüências não apresentam esta variabilidade (somente a Thr130 α foi encontrada), embora não se possa afirmar que esta duplicidade somente é encontrada em cães, uma vez que poucos espécimes dos gêneros citados foram estudados.

1.1.8 JUSTIFICATIVA

A falta de controle da disseminação de doenças infecciosas, como o HIV e a hepatite, que geralmente tem acometido vários indivíduos por meio da transfusão sanguínea tem motivado estudos que visam a busca por um substituto que desempenhe as funções do sangue, especialmente de transporte de oxigênio (Winslow, 1995). Além disso, varias outras doenças que podem ser transmitidas por ingestão de alimentos contaminados ou mesmo por transfusão sanguínea, como exemplo as doenças transmitidas por *prions*, ainda não são controladas e nem existem testes adotados pelos bancos de sangue para o controle da disseminação desta doença.

Os problemas envolvidos no processo de transfusão sanguínea e o alto custo envolvido em coletar e armazenar sangue humano, além do contínuo aumento na demanda e a crescente diminuição do estoque sanguíneo, são outros motivos que contribuem para a busca e

desenvolvimento de sangue artificial, mais precisamente, de carreadores de oxigênio que possam realizar o mesmo papel da hemoglobina.

O sangue artificial ideal deve ser seguro, livre de contaminações e riscos de transmissão de doenças. Deve ser amplamente compatível com o corpo humano (sem incompatibilidade) e incapaz de desencadear alergias, deve ser capaz de transportar oxigênio pelo corpo e liberá-lo onde necessário. Além disso, precisa apresentar um longo tempo de permanência vascular, e ser estável, para ser conservado por um período prolongado, e, principalmente, estável quanto ao efeito da temperatura. Além destas características, a osmolaridade, viscosidade e transporte de oxigênio devem ser preservadas e as amostras obtidas devem apresentar preferencialmente custos reduzidos na produção e capacidade de produção em larga escala (Tanaka e Tanaka, 2003).

Embora vários produtos desenvolvidos tenham sido considerados satisfatórios para o uso, baseando-se em ensaios pré-clínicos e clínicos 1 e 2, a comprovação da sua eficiência tem sido muito difícil (Goorha et al, 2004).

Hemopure[®], um conjugado de hemoglobina bovina com polietilenoglicol 250, está em estudo na fase clínica 3 na África do Sul e foi aprovado para o uso em pacientes anêmicos neste país, onde 40% da população é portadora do HIV. Nos Estados Unidos, foi conseguida autorização do FDA para a comercialização do Hemopure com a finalidade de tratamento de sinais e sintomas de anemia aguda em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas. Esse é o maior estágio alcançado por um carreador baseado em hemoglobina para uso humano.

Uma amostra de hemoglobina pura em solução não é eficiente no transporte de oxigênio, pois fora da hemácia no corpo humano, esta proteína se dissocia em dímeros e monômeros e é rapidamente filtrada pelos rins. Para evitar as inconveniências descritas com a hemoglobina

livre, e com intuito de obter um substituto sangüíneo ideal, a molécula de hemoglobina foi modificada para prolongar seu tempo de meia vida intravascular, diminuir a eliminação renal, e manter a afinidade normal pelo oxigênio. As modificações apresentadas foram: ligação intramolecular, conjugação ou polimerização da molécula de hemoglobina com dados obtidos a partir de estudos existentes de hemoglobinas defeituosas (Tanaka e Tanaka, 2003).

Atualmente não existe um método racional para a seleção de modificações que possibilitem a busca de novos produtos. Também ainda não foram determinadas as condições ideais de armazenamento do material, pois a proteína precisa manter suas características por tempo superior ao prazo de validade do sangue coletado por doadores.

A hemoglobina é uma proteína estudada há muito tempo mas esses estudos têm sido fundamentados na análise da função, por meio de experimentos de medida de saturação de oxigênio. Existem poucas informações na literatura sobre os parâmetros de estabilidade dessa proteína em diferentes condições desnaturantes, como ela se comporta em contato com agentes estabilizantes, e até hoje ainda restam dúvidas sobre o processo de desnaturação. Drzazga e colaboradores (2001) caracterizaram a desnaturação da hemoglobina como sendo um processo de 2 estados em solução aquosa, e 3 estados em solução salina. Michnik e colaboradores (2005) afirmaram ser difícil a escolha de um modelo apropriado para a desnaturação da hemoglobina. Além disso, hemoglobina é uma proteína altamente conservada que apresenta estabilidade estrutural muito variada. Algumas hemoglobinas são mais estáveis em pH ácido, com formação de intermediários na desnaturação (Kristinsson, 2002) e outras são mais estáveis em pH básico (Kristinsson e Hultin, 2004). Portanto, as informações da estabilidade estrutural de hemoglobinas de mamíferos baseado em dados obtidos de hemoglobina humana nem sempre são satisfatórias.

Para uma busca de um substituto eficiente do sangue e de seus derivados, é necessário realizar um estudo minucioso que consiste em determinar a estrutura tridimensional da hemoglobina e analisar a influência de cada resíduo de aminoácido na manutenção da estrutura tridimensional, no transporte de oxigênio e na estabilidade da molécula. Dessa forma, é possível determinar quais os resíduos são melhores candidatos para realizar a modificação necessária que poderá contribuir para melhor estabilização da hemoglobina.

Além do enfoque de estudo básico na área de biofísica molecular estrutural, esse trabalho se encaixa dentro dos objetivos dos estudos associados à elucidação da estrutura tridimensional e análise da estabilidade estrutural das hemoglobinas, na busca de elucidar possíveis candidatos à modificação estrutural para a produção de carreadores artificiais baseados na relação estrutura vs estabilidade estrutural desta proteína, e estudo das condições de conservação e armazenamento.

Esse trabalho é um modelo de estudo da relação estrutura e estabilidade de proteínas, especialmente para as hemoglobinas. Atualmente existem 381 estruturas tridimensionais de hemoglobinas disponíveis no Protein Data Bank (PDB), mas poucos são os dados sobre a estabilidade estrutural dessas proteínas.

Todo esse trabalho teve início com a cooperação do Dr Carlos Bloch Jr. que disponibilizou material e informações pertinentes, a partir de um projeto desenvolvido pelo Ms Vladimir Costa Silva, que visou estabelecer um método de reconhecimento de espécies de flebótomos e relacionar o vetor e o reservatório destes flebótomos de modo a mapear as áreas endêmicas da leishmaniose (dissertação apresentada em 4 de agosto de 2006).

A hemoglobina de *C. thous*, objeto de estudo dessa dissertação, foi a segunda proteína cristalizada pelo nosso grupo de pesquisa em biofísica estrutural, coordenado pela Dra Sonia M. de Freitas, e a

obtenção do seu cristal correspondeu a uma oportunidade única para o desenvolvimento desse trabalho no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas, SP-Brasil). A resolução da estrutura cristalográfica dessa hemoglobina é o primeiro trabalho apresentado na pós-graduação em biologia molecular da UnB na área de cristalografia de proteínas. Esse trabalho representa um marco no desenvolvimento dessa linha de pesquisa no laboratório de biofísica da UnB e na formação de pessoal com treinamento e conhecimento necessário para a coleta de dados e refinamento de estrutura de proteínas determinada por difração de raios-X. Esse trabalho foi realizado devido a associação da Prof Dra Sonia M. de Freitas ao LNLS como usuária e coordenadora de um dos grupos da Rede de Biologia Molecular Estrutural (RENABIME) e da colaboração do Dr João Alexandre G. Barbosa (um dos coordenadores desta rede no LNLS).

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Este trabalho visa a resolução da estrutura tridimensional por difração de raios-X da hemoglobina de *C. thous* e a análise da influência de cada resíduo de aminoácido na manutenção da estrutura tridimensional e na estabilidade da molécula, além da caracterização estrutural comparativa de hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificação das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.
- Cristalização das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.
- Coleta de dados dos cristais de hemoglobina na linha de raios-X MX1-D03B do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).
- Processamento dos dados cristalográficos e determinação dos parâmetros da rede cristalina.
- Refinamento e análise comparativa do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous*.
- Caracterização físico-química em meio desnaturante por técnicas de dicroísmo circular e fluorescência.
- Determinação dos parâmetros termodinâmicos por ensaios de desnaturação por dicroísmo circular e fluorescência.
- Determinar a termoestabilidade das proteínas.
- Estudar o efeito do pH na estrutura das proteínas.
- Estudar a dependência do pH na desnaturação térmica.
- Análise comparativa da estabilidade das hemoglobinas estudadas.
- Análise comparativa das diferenças da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* e outros vertebrados.
- Análise da influência de cada resíduo de aminoácido na manutenção da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous*.
- Análise da influência de cada resíduo de aminoácido na estabilidade da molécula de hemoglobina de *C. thous*
- Análise do efeito do CTAB nas hemoglobinas.

3 MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO SANGUE

O sangue de *C. thous* e *P. vetulus* foi coletado segundo o comitê de ética da Universidade Federal do Piauí em pequenos frascos contendo EDTA, mantendo-o refrigerado. Este material foi cedido pelo Ms Vladimir C. Silva e seu orientador de mestrado na época, Dr Carlos Bloch Jr. A seguir o sangue foi lavado 3 (três) vezes com solução salina 150 mM. Os eritrócitos foram coletados por meio de centrifugação (5000g 15 min 4°C) e os hemolisados foram preparados por lise dos eritrócitos com 4 volumes de água, seguido por uma segunda centrifugação (12000g 30min 4°C). A seguir, o material foi fracionado com sulfato de amônio 80% para precipitar a hemoglobina e o material foi dialisado por 24 horas a 4°C para remover os sais. Este extrato foi liofilizado para as etapas de purificação.

3.2 PURIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna com Sephadex G-100 (2.5 x 90 cm), eluindo em 50 mM Tris-HCl pH 8.0 com um fluxo de 40ml/hr. A presença da hemoglobina foi acompanhada espectrofotometricamente em 280 nm e 410 nm. O material correspondente à hemoglobina foi dialisado e liofilizado.

O grau de pureza da proteína foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 13%, em condições desnaturantes (SDS) corado com *comassie blue*.

A purificação é um ponto importante para a qualidade dos experimentos de cristalização. Para este procedimento, a proteína deve estar pelo menos 97% pura.

3.3 CRISTALIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A elucidação da estrutura tridimensional de proteínas pelo método cristalográfico está condicionada à obtenção de cristais de tamanho e qualidade que possibilitem a coleta de dados em difratômetros apropriados. Os principais fatores que podem influenciar e promover a cristalização de proteínas são: pH, força iônica, concentração dos precipitantes (sal, polímero, reagente orgânico volátil e não volátil), aditivos (cátions, ânions, detergentes, agentes caotrópicos, e outros), temperatura e flutuações de temperatura, vibrações, volume da amostra, contaminação por microorganismos, presença de material amorfo, proteólise, pressão, viscosidade da solução estoque de proteína, detergentes, concentração da macromolécula, metais e outros íons específicos, pureza da amostra, e outros. A procura da melhor condição experimental para a obtenção de cristais envolve tempo e depende de todas as variáveis acima citadas.

Dentro desse raciocínio, foi proposto o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991) onde diversas condições diferentes são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica. O método da matriz esparsa possui três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais, são estes: pH e tampões, aditivos

e agentes precipitantes, e foram escolhidos os componentes que tinham sido provados como os mais adequados para a cristalização de macromoléculas em experiências passadas. Por tentativa e erro a matriz foi simplificada eliminando-se as condições que podem ser parcialmente representadas por resultados de outras condições (Azevedo, 2004).

A empresa Hampton Research, (USA) simplificou o método original, e disponibiliza kits específicos de condições de cristalização, que foram utilizados para a realização deste trabalho.

Assim, um número limitado de condições de cristalização foi tentado, usando-se pequenas quantidades de proteína. Para um primeiro ensaio são necessários aproximadamente 5-10 mg de proteína.

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas têm como objetivo trazer a solução da macromolécula biológica a um estado de supersaturação.

O método utilizado neste trabalho, e também o mais comum, foi o método de difusão de vapor. Neste método uma gota (sentada, pendurada ou sanduíche) contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota, na fase de vapor, à temperatura controlada, num meio completamente fechado e sem vibrações externas. O equilíbrio prossegue lentamente por meio da difusão até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente a um aumento na concentração da proteína. Durante esse período de equilíbrio da concentração de precipitante nas duas fases, a proteína é trazida a um estado de supersaturação, um estado que é termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver uma organização cristalina.

Neste trabalho esse processo foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 21°C. Uma gota contendo 1 μL de proteína em solução aquosa na concentração de 20 mg/mL foi misturada a 1 μL de solução do reservatório e foi equilibrada contra 300 μL dessa mesma solução do reservatório. O acompanhamento do experimento foi realizado por meio da observação das gotas em lupa, nas placas de cristalização lacradas, com a menor perturbação possível. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, foi possível determinar que tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis. A partir daí, as condições que apresentaram cristais foram submetidas a sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais de tamanho maior que 0,2 mm x 0,2 mm

3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO POR RAIOS-X

A coleta de dados foi realizada na linha MX1-D03B do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron a $\lambda = 1.427 \text{ \AA}$. Os cristais foram banhados em uma solução crioprotetora formulada baseado nas condições de obtenção de cada cristal, composta por 0.1 M HEPES Na pH 7.5, 25% de PEG 4000 e 5% de glicerol e só então montados em *loops* de nylon. A coleta foi feita com o cristal resfriado instantaneamente num fluxo de nitrogênio gasoso a $\sim 100 \text{ K}$. Isto permitiu a redução dos efeitos danosos da radiação direta e aumentou o tempo de vida do cristal. Dessa forma há um melhor aproveitamento do material, pois apenas um único cristal pode fornecer dados suficientes para a resolução da estrutura e não é preciso realizar a integração com dados de cristais diferentes. Assim, cada conjunto de imagens geradas de um cristal forma um conjunto de

dados a ser analisado. É possível realizar várias coletas e escolher o melhor conjunto de dados. Além disso, os dados coletados a frio apresentam melhor qualidade, pois o resfriamento mantém o nível de organização interna do cristal, necessária para uma boa coleta de dados, preservação da rede cristalina, informação expressa nos resultados pela mosaicidade.

Para a coleta foi utilizado um detector MarCCD 165 mm. A distância do detector ao cristal foi regulada de forma a chegar o mais próximo possível da melhor resolução, limitada pela qualidade do cristal.

De posse das primeiras imagens foi possível realizar a indexação com o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) e determinar o grupo espacial, as dimensões e orientação da célula unitária, e estimar a mosaicidade. A partir da medida da distância e dos eixos da rede recíproca do padrão de difração é possível determinar o tamanho e os eixos do cristal no espaço real. Esse passo é necessário para planejar uma estratégia de coleta de dados eficiente, minimizando o tempo e maximizando os resultados. Na indexação ocorre a identificação dos pontos e a determinação do índice de Miller de cada ponto.

O método de oscilação foi utilizado para a coleta, sendo o cristal rotacionado a cada 1° com o objetivo de coletar o máximo de reflexões possíveis, visando propiciar uma maior completeza de dados. A completeza, expressa nos dados após a indexação e integração dos dados, representa a porcentagem do número de reflexões observadas em relação ao número de reflexões possíveis para uma determinada resolução, que está limitada pela qualidade do cristal. Uma completeza de 100% é o resultado desejável, com a maioria das reflexões medidas várias vezes.

No processo de integração é quantificada a intensidade do ponto, retirando-se a contribuição proveniente da difração do solvente. Cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem intensidades gravadas

em uma escala diferente umas das outras, por diversos motivos como a variação na radiação incidente, absorção dos raios difratados ou destruição do cristal. Portanto, é necessário colocar todos os pontos em uma mesma escala. Após esse passo pode ser realizada a fusão dos dados: os pontos com o mesmo índice de Miller são somados. Os pontos que foram agrupados como reflexões equivalentes simétricas de diferentes imagens terão suas intensidades somadas. Após esse processo, foram obtidos parâmetros para determinar a qualidade do cristal, representado pelos parâmetros da rede cristalina.

Todas as medidas de um mesmo ponto deveriam ter a mesma intensidade, mas na prática isso não acontece. O R_{merge} é um parâmetro de concordância entre as várias medidas de intensidade de uma mesma reflexão de imagens ou conjunto de dados diferentes, que indica o quanto elas concordam ou discordam. R_{sym} por sua vez, é um parâmetro que relaciona, da mesma forma, as medidas de intensidade de reflexões simetricamente relacionadas de imagens ou conjunto de dados diferentes (McRee, 1993).

A difração de raios X por um cristal é o resultado da interação entre a radiação eletromagnética e os elétrons dos átomos. Os elétrons oscilam devido à atuação do campo elétrico, na mesma frequência deste campo, tornando-se fontes de ondas secundárias que sofrem interferência.

A expressão que descreve a onda espalhada pela célula unitária do cristal é denominada fator de estrutura, mostrada a seguir.

$$F = A_0 \exp(2i\pi \frac{d}{\lambda}) \left[1 + \exp(\frac{2i\pi}{\lambda} (p + q)) \right] \quad (1)$$

Para determinar a estrutura atômica de uma molécula é necessário descobrir como está distribuída a densidade eletrônica de

todos os átomos e heteroátomos na molécula e no solvente. Conhecendo completamente o fator de estrutura $F(\mathbf{h})$ podemos calcular a função de densidade eletrônica, $\rho(\mathbf{r})$:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \sum_k \sum_l F(\mathbf{h}) \exp(-2i\pi\mathbf{r}\cdot\mathbf{h}) \quad (2)$$

Entretanto, escrevendo (1) de outra forma:

$$F(\mathbf{h}) = |F(\mathbf{h})| e^{i\varphi} \quad (3)$$

Em um experimento de difração medimos apenas intensidades $I(\mathbf{h}) = |F(\mathbf{h})|^2$, enquanto que as fases do Fator de Estrutura são perdidas, o que nos impede de calcular diretamente $\rho(\mathbf{r})$ a partir do padrão de difração do cristal. Este é o problema central da cristalografia, o chamado problema das fases. São necessários artifícios para se conseguir obter a densidade eletrônica. Um destes procedimentos, descrito a seguir, é o método de substituição molecular.

3.5 CONSTRUÇÃO E REFINAMENTO DO MODELO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HEMOGLOBINA

Partindo da observação de que moléculas com seqüências primárias homólogas apresentam enovelamentos similares, o conhecimento destas moléculas estruturalmente conhecidas, permite

simular um experimento com um modelo inicial do cristal a ser resolvido, e deste modelo obter as informações necessárias sobre a fase da radiação difratada pelo cristal real. Este método de resolução do problema da fase é o chamado Método da Substituição Molecular, que foi utilizado neste trabalho com a estrutura da hemoglobina do lobo-guará (PDB ID: 1FHJ - Fadel, 2003) como modelo inicial, utilizando o programa MOLREP do pacote CCP4 (Vagin, 1997).

O primeiro passo a ser resolvido deve ser a colocação do modelo na mesma posição que a molécula real ocupa na sua rede cristalina. Este procedimento implica em movimentos de rotação e de translação do modelo, cujas coordenadas espaciais de seus átomos referem-se ao seu posicionamento no próprio cristal. Este procedimento deve ser realizado utilizando a intensidade da radiação difratada como direcionador. O posicionamento da molécula modelo na nova célula unitária é feito em duas etapas: a primeira de rotação, quando a orientação da molécula modelo em relação à molécula desconhecida é determinada e a segunda de translação, quando as moléculas já estão corretamente orientadas são sobrepostas. O princípio da Substituição Molecular é a sobreposição das funções de Patterson (“conjunto de vetores interatômicos”) do modelo e da estrutura de interesse a fim de orientar o modelo na nova rede. A expressão que relaciona a função de Patterson esta descrita a seguir.

$$P(\mathbf{u}) = \int_{\text{vol.cel.}} \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r} + \mathbf{u})d\mathbf{v} \quad (4)$$

Como $\rho(\mathbf{r})$ é uma função atômica, ou seja, com picos bem definidos centrados nas posições de cada átomo, $P(\mathbf{u})$ somente assumirá valores diferentes de zero quando os vetores \mathbf{u} (u,v,w) forem iguais a

vetores interatômicos. De posse das distâncias interatômicas é possível calcular as funções de rotação e translação.

Na busca dos valores máximos das funções de rotação e translação, são calculados fatores de correlação para as diferentes posições da molécula modelo ao longo da nova célula unitária. O método de Substituição Molecular terá encontrado uma solução para o problema quando um conjunto de ângulos de rotação e vetor translação fornecer um fator de correlação que contraste significativamente com os demais (McRee, 1993).

Após a resolução do problema de fase e construção do primeiro mapa de densidade eletrônica, os resíduos de aminoácidos diferentes do modelo foram substituídos pelos resíduos da hemoglobina de *C. thous* usando o programa "O" (Jones *et al.*, 1991). O método de *Simulated annealing* (aquecimento do sistema molecular seguido de resfriamento lento) foi realizado com o programa CNS (Brünger, 1998) apenas no primeiro ciclo de refinamento, visando à acomodação inicial e energética dos átomos a densidade eletrônica.

O método de *Simulated annealing* simula a dinâmica molecular de um sistema, elevando-o até altas temperaturas e resfriando o sistema gradualmente até a temperatura ambiente. A idéia principal do método é aquecer a molécula para que os átomos adquirirão altas velocidades e energias cinéticas suficientes para vencerem as barreiras de potencial energético e, quando a temperatura chegar à temperatura ambiente, a estrutura tenha alcançado o seu mínimo energético, com convergência máxima (McRee, 1993).

Cada refinamento realizado com o programa CCP4 foi seguido por uma intervenção manual, utilizando o programa gráfico "O" (Jones *et al.*, 1991) para ajustes da geometria da molécula, otimização dos ângulos das cadeias laterais, otimização das dimensões das ligações covalentes, enquadramento da cadeia principal e cadeias laterais no

mapa de densidade eletrônica seguindo o padrão das dimensões das ligações, ajustes do mapa de densidade eletrônica para as densidades negativas e positivas. Após vários ciclos de refinamento, as moléculas de água foram adicionadas com o programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1999) do pacote CCP4. Todas as interações das águas com a interface molecular e o solvente foram otimizadas considerando-se as dimensões das ligações de hidrogênio. Os heteroátomos de sulfato (Kleywegt and Jones, 1998 - <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>), provenientes da solução de cristalização, foram inseridos em seus mapas de densidade eletrônica correspondentes, seguidos de vários ciclos de refinamento usando o programa REFMAC.

Refinamento é o processo de encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e a sua estrutura real. Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

O acompanhamento da qualidade deste processo é feito por meio do cálculo do fator R (R_{factor}) durante o processo. Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X, uma pequena porcentagem das reflexões são excluídas do refinamento e utilizados como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado R_{free} , que é isento de minimização artificial. Todas as etapas do refinamento foram monitoradas nos arquivos *.log* do CCP4, com ênfase para os valores da convergência dos fatores de estrutura para valores compatíveis para estruturas de qualidade estrutural ($R_{\text{factor}} < 20\%$ e R_{free} o mais próximo do valor do R_{factor}).

3.6 ANÁLISE DO MODELO OBTIDO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HEMOGLOBINA

O arquivo pdb gerado no último ciclo do refinamento, com os valores de R_{factor} e R_{free} convergidos para os valores padronizados para estruturas de alta resolução, foi avaliado quanto aos vários parâmetros de qualidade estereoquímica, utilizando o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e o site do PDB (www.rcsb.org/pdb) com os programas de validação da estrutura tridimensional. Várias informações estruturais e as condições de cristalização, coleta e refinamento foram fornecidas ao PDB. De acordo com a avaliação dos consultores do PDB as coordenadas atômicas da hemoglobina foram depositadas.

A estrutura tridimensional foi comparada a outras hemoglobinas por meio do alinhamento estrutural realizado com o programa LSQKAB, do pacote CCP4. Para decidir qual estrutura utilizar-se nas comparações tomou-se como parâmetro o valor das posições relativas dos átomos da cadeia principal, a partir do cálculo do r.m.s.d. (*root mean square deviation*). A partir desses dados, a análise estrutural foi realizada utilizando o programa de visualização molecular PYMOL (DeLano, 2002) com o foco nos resíduos presentes nas regiões de contato e os resíduos que eram diferentes, independentemente da sua posição na molécula.

3.7 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O estudo de estabilidade estrutural monitorado por fluorescência foi realizado pelas análises estruturais dos processos de desnaturação sob o efeito dos agentes desnaturantes cloridrato de guanidina e uréia.

O acompanhamento dos espectros de emissão fluorescente foi feito em um intervalo de 300 a 400nm, usando um comprimento de onda de excitação de 288 nm e com abertura adequada do "slit" para otimização da intensidade do sinal e da relação sinal/ruído.

Os experimentos de fluorescência foram realizados no fluorímetro ISS K2 do LNLS equipado com sistema de controle de temperatura com circulação de água. Os experimentos de estabilidade foram realizados com a proteína na concentração de 0,1 mg/mL com adição de cloridrato de guanidina (GdnHCl) em concentrações crescentes de 0 a 6 M e uréia em concentrações de 0 a 8 M, com medidas realizadas a cada 0,2 M, considerando-se os valores para as frações de moléculas que atingem os estados de transição e pós-transição conformacional. As soluções de proteína nestes desnaturantes foram deixadas por 24 horas para equilibrar as formas nativas e desnaturadas.

As medidas foram realizadas em soluções de pH 2.0 (cloreto de potássio 10 mM), pH 6.0 (acetato de sódio 10 mM) e pH 10.0 (ácido 3-ciclohexilamino-2-hidroxi-1-propano-sulfônico, CAPSO 10 mM).

As curvas de transição foram ajustadas de acordo com o modelo de dois estados e normalizadas de acordo com a calibração do aparelho realizada por uma solução livre de proteína nas mesmas condições.

A fração de proteína presente no estado desdobrado (f_U), a constante de equilíbrio (K) para estas transições e os valores dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$f_U = (y_F - y) / (y_F - y_U) \quad (5)$$

$$K = [U] / [N] = f_U / (1 - f_U) = (y_F - y) / (y - y_U) \quad (6)$$

$$\Delta G = - RT \ln K = - RT \ln [(y_F - y) / (y - y_U)] \quad (7)$$

onde y_F e y_U representam as frações de proteína que estão no estado nativo e desnaturado, respectivamente. A estabilidade da proteína na ausência de desnaturante (ΔG_{H_2O}) foi calculada a partir do gráfico ΔG_U vs $[D]$, ajustada de acordo com a equação (8):

$$\Delta G_U = \Delta G_{H_2O} - m[D] \quad (8)$$

3.8 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-810 cuja temperatura da câmara da cubeta é controlada por sistema tipo *Peltier* PFD 425S. Os dados foram coletados utilizando-se varredura de 50 nm/min e intervalo de dados de 0,5 nm. O programa utilizado para registro e tratamento dos dados foi o Spectra Manager (JASCO), com o auxílio do programa Origin Pro 7.0 (OriginLab Corporation).

As elipticidades a 222 nm, das soluções de proteína em guanidina e uréia descritas acima, foram medidas em cubetas de quartzo de 0,1 cm. Cinco medidas consecutivas foram acumuladas e foi utilizada a média dentre estes cinco espectros.

A dependência do pH foi analisada em diferentes condições. Para obtenção destas curvas foram consideradas condições diferentes de pH no comprimento de onda UV distante (190 a 260 nm). Este efeito do pH foi observado em 15 diferentes condições em um intervalo variando de pH 3.0 a pH 10.0, com medidas realizadas a cada 0.5. As soluções utilizadas foram: 2 mM de citrato de sódio, pH 3.0; 2 mM de acetato de

sódio, pH 3.5 a pH 5.5; 2 mM de cacodilato de sódio, pH 6.0 e pH 7.5; 2 mM bis-tris-propano, pH 8.0 a pH 9.0 e 2 mM CAPSO, pH 9.5 a pH 10.0.

Ensaio de desnaturação térmica foram realizados elevando-se a temperatura de 20 a 95°C, permitindo o equilíbrio por 5 minutos antes de realizar as medidas. A dependência do pH na desnaturação térmica foi analisada em diferentes condições em um intervalo variando de pH 3 a pH 10, realizando-se medidas a cada pH, utilizando as soluções acima descritas e fixando o comprimento de onda em 222 nm.

Ensaio com o surfactante brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) foram realizados em concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM em uma solução 10 mM Tris-HCl pH7.2 no comprimento de onda UV distante (190 a 260 nm).

As elipticidades observadas em miligraus foram convertidas em elipticidade residual molar $[\theta]$ baseando-se no valor da massa molecular média de 112 por resíduo. Os dados foram corrigidos com a linha de base para retirar a contribuição do tampão. Esses dados foram ajustados de acordo com as equações 5, 6 e 7 descritas acima.

A temperatura de transição T_m correspondente ao ponto central da curva de desnaturação térmica foi calculada a partir do gráfico ΔG vs T , para $\Delta G = 0$ ($\Delta G = 0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$). A inclinação desse gráfico em T_m corresponde a ΔS_m e a entalpia em T_m é $\Delta H_m = T_m \Delta S_m$.

A energia entálpica de van't Hoff foi calculada a partir da equação de van't Hoff (9):

$$d(\ln K_D) / d(1/T) = - \Delta H/R \quad (9)$$

A estabilidade correspondente a 25°C (ΔG^{25}) foi estimada a partir da equação de Gibbs (10), considerando o intervalo de temperatura de desnaturação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Purificação e cristalização das hemoglobinas

As hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus* foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. O perfil cromatográfico das duas hemoglobinas está apresentado na figura 4. A confirmação da pureza foi verificada com a eletroforese apresentada na figura 5.

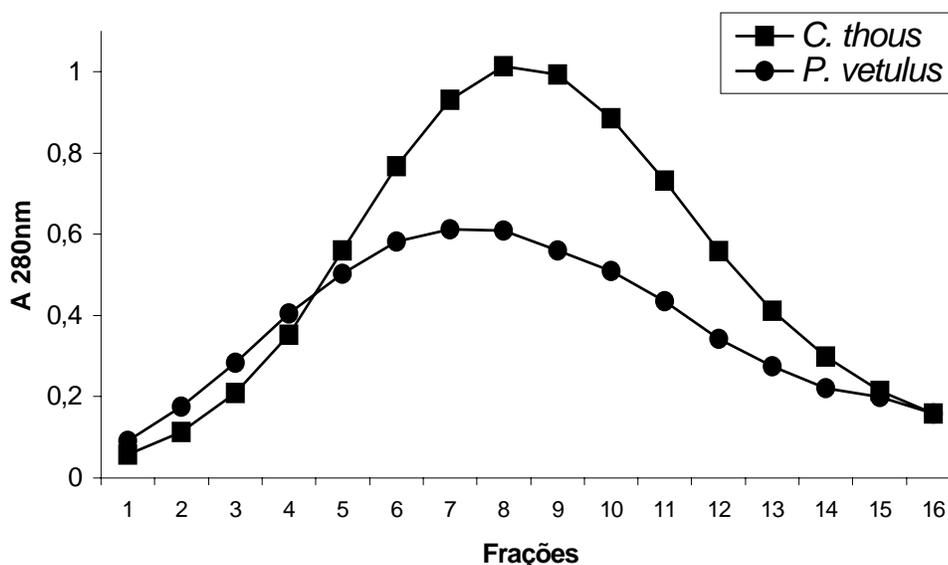


Fig. 4 Cromatografia de exclusão molecular das hemoglobinas de *C.thous* e *P. vetulus*. Os dois picos correspondem às frações contendo hemoglobina.

A hemoglobina purificada foi utilizada para a realização dos ensaios de cristalização. Apenas a hemoglobina de *C. thous* foi cristalizada. Os cristais obtidos foram de tamanho maior que o mínimo de 0,2 mm x 0,2 mm, com qualidade de agregação específica compatível com os dados de difração de raios-X obtidos para esse tipo de cristal na linha de cristalografia de proteínas do LNLS, apresentados na secção a seguir.

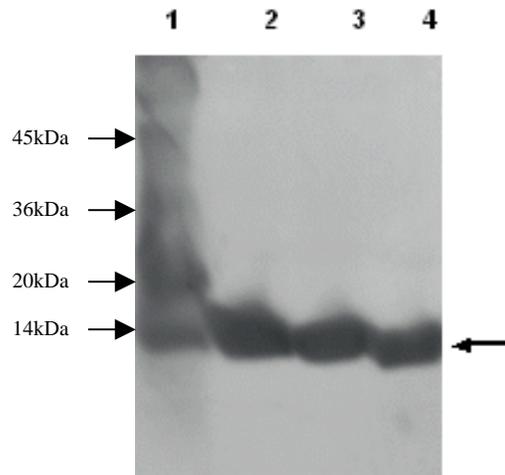


Fig. 5 Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida-SDS 13%, da hemoglobina de *C. thous* purificada em cromatografia de exclusão molecular, 1: marcador molecular; 2-4: cadeias α e β da hemoglobina com massa molecular de aproximadamente 15 kDa.

Vários cristais foram obtidos, em várias condições dos kits de cristalização da Hampton Research, sendo as melhores condições aquelas com a presença de polietilenoglicol (PEG) 4000 e PEG 8000 como precipitante, num intervalo de pH que variou de 6,5 a 8,5. Dois desses resultados estão mostrados na figura 6. A condição de cristalização utilizada para a coleta dos dados da hemoglobina foi obtida por meio de refinamentos realizados variando o pH e a concentração do sal das soluções precipitantes a partir das condições iniciais dos kits de cristalização comerciais.

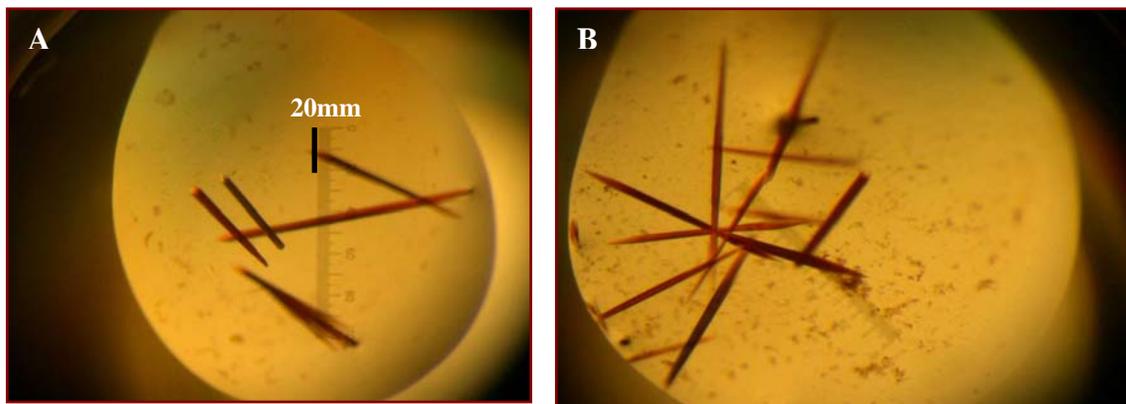


Fig. 6. Cristais da hemoglobina de *C. thous*. (A) Cloreto de Magnésio 0,2 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, PEG 4000 30%, (B) Sulfato de amônio 0,2 M, Cacodilato de sódio 0,1 M pH 6,5, PEG 8000 30%.

4.2. Coleta e processamento de dados da difração de raios-X

A condição utilizada para a coleta dos dados da hemoglobina foi a de 16% de PEG 4000, 0,1 M de Hepes de sódio pH 7,8.

Os dados cristalográficos foram obtidos a partir da coleta de dados dos cristais (imagens de difração de raios-X) na linha de cristalografia de proteínas do LNLS MX1. A indexação e o refinamento desses dados forneceu valores compatíveis com as coordenadas do espaço recíproco pertencentes ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com as medidas de célula unitária com os eixos $a = 52,73 \text{ \AA}$, $b = 84,24 \text{ \AA}$ e $c = 130,28 \text{ \AA}$, correspondentes a cristais do tipo ortorrômbico. Após a indexação, há um passo de predição, que localiza nas imagens coletadas os pontos de difração de acordo com o grupo espacial escolhido. Neste passo podemos avaliar se o grupo espacial foi escolhido de forma errônea ou não. Quando isso acontece, a quantidade de pontos vermelhos presentes nas imagens indexadas é muito grande e o próprio programa indica que deve ser feita uma correção. Este processo corresponde ao refinamento que é realizado até que os pontos de difração correspondam às dimensões dos planos na rede cristalina para cristais do grupo espacial analisado.

A figura 7 apresenta uma imagem do padrão de difração de raios-X (a,b) obtido para a hemoglobina de *C. thous* e uma predição dos pontos no padrão de difração (c), respectivamente, durante o processo de refinamento dos dados.

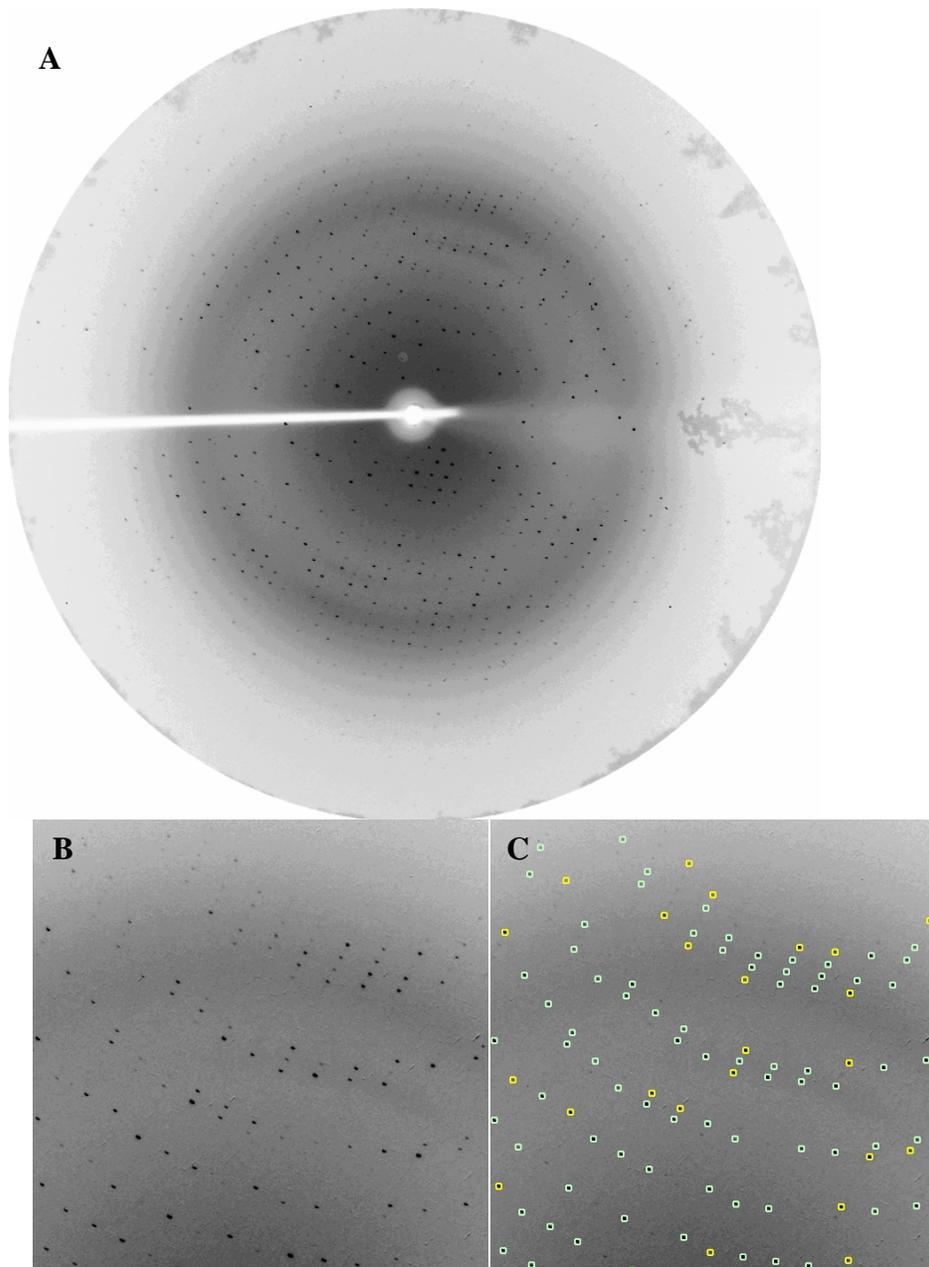


Fig. 7. (a) Padrão de difração de raios-X da hemoglobina de *C. thous*. (b) Detalhe de uma imagem do padrão de difração. (c) Predição dos pontos no padrão de difração de raios-X. Os pontos vermelhos são aqueles que não correspondem a pontos da rede cristalina e devem ser excluídos. Os pontos amarelos representam reflexões parciais e estão incompletos na imagem. Os pontos verdes representam as reflexões totais e completas na imagem.

4.3. Resolução e refinamento do modelo da estrutura tridimensional da hemoglobina

Os dados das 200 imagens geradas a partir da rotação do cristal em 1,0 Å foram integrados e indexados e resultaram em completeza de 99,9%, baixa mosaicidade e resolução máxima de 2,2 Å, esta resolução encontra-se dentro do intervalo de 1,5 Å a 3,0 Å para a resolução de estruturas tridimensionais. O valor obtido do R_{sym} foi de 7,2, que está abaixo do limite de 20, indicando que é um conjunto de dados que pode ser utilizado para a resolução do modelo tridimensional.

Os resultados detalhados sobre a coleta de dados e o refinamento do modelo são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Coleta de dados da hemoglobina de *C. thous* e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos a última camada de resolução de 2,28 – 2,2° Å.

A. Coleta de dados	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros da célula (a, b, c) (Å)	a=52,73 ; b=84,24 ; c=130,28
Intervalo de resolução (Å)	30,00 – 2,2 (2,28 2,20)
Mosaicidade	0,2
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,427
Oscilação (°)	1,0
Distância do detector (mm)	100
Número de imagens	200
I/σ(I) depois da fusão	29,2 (7,0)
Completeza (%)	99,9 (100,0)
Multiplicidade	8,0 (7,8)
R _{sym} ^a	7,2 (30,6)
Número de reflexões	240711
Número de reflexões únicas	30219 (2948)
B. Estatísticas de refinamento	
Intervalo de resolução (Å)	30,00 – 2,2
Número de reflexões	28633
R _{free}	1530
Número de átomos (sem hidrogênio)	5037
Proteína	4412
Água	443
Heteroátomos (grupo heme)	182
C. Parâmetros de qualidade do modelo	
Fator R (%) ^b	16,8
R _{free} (%)	23,2
Desvios rms da idealidade	
Comprimento das ligações (Å)	0,015
Ângulo das ligações (Å)	1,399
Média do fator de temperatura (Å ²)	27,67
Proteína	27,35
Solvente	30,78
Heteroátomos	27,77
Plot de Ramachandran	
Regiões mais favorecidas (%)	92,8
Regiões permitidas adicionais (%)	7,2
Regiões geralmente permitidas (%)	0,0
Fator G	0,2

^a $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum |I|$, onde $\langle I \rangle$ é a intensidade média das reflexões equivalentes.

^b Fator R = $\sum ||I_o| - |F_c|| / |F_o|$.

A figura 8 mostra o alinhamento da seqüência das hemoglobinas de *C. thous* e de *Chrysocyon brachyurus* (PDB ID: 1FHJ) realizado com o programa ClustalW (Thompson, 1994). Esta hemoglobina foi usada como modelo para o método de substituição molecular para resolução do problema de fase. Nesta técnica é preciso um modelo tridimensional já existente no banco de dados (PDB) semelhante a proteína que se deseja determinar.

```

1           10           20           30           40           50
CTHOUS_A   VLSPADKTNIKSTWDKIGGHAGDYGGEALDRTFQSFPTTKTYFPHFDLSP
1FHJ_A     VLSPADKTNIKSTWDKIGGHAGDYGGEALDRTFQSFPTTKTYFPHFDLSP
*****

51           60           70           80           90           100
CTHOUS_A   GSAQVKAHGKKVADALTTAVAHLLDDLPGALSALSSDLHAYKLRVDPVNFKL
1FHJ_A     GSAQVKAHGKKVADALTTAVAHLLDDLPGALSALSSDLHAYKLRVDPVNFKL
*****

101          110          120          130          140
CTHOUS_A   LSHCLLVTLACHHPTEFTPAVHASLDKFFTAVSTVLTSKYR
1FHJ_A     LSHCLLVTLACHHPTEFTPAVHASLDKFFAAVSTVLTSKYR
*****

1           10           20           30           40           50
CTHOUS_B   VHLTAEKSLVSGLWAKVNVDEVGGEALGRLLIVYPWTQRFFDSFGDLST
1FHJ_B     VHLTAEKSLVSGLWGKVNVDVGVGGEALGRLLIVYPWTQRFFDSFGDLST
*****

51           60           70           80           90           100
CTHOUS_B   PDSVMSNAKVKAHGKKVLNSFSDGLKNLDNLKGTFAKLSELHCDKLHVDP
1FHJ_B     PDAVMSNAKVKAHGKKVLNSFSDGLKNLDNLKGTFAKLSELHCDKLHVDP
** : *****

101          110          120          130          140
CTHOUS_B   ENFKLLGNVLCVLAHFFGKEFTPQVQAAYQKVVAGVANALAHKYH
1FHJ_B     ENFKLLGNVLCVLAHFFGKEFTPQVQAAYQKVVAGVANALAHKYH
*****

```

Fig. 8 Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina *Chrysocyon brachyurus* (1FHJ). Os resíduos de aminoácidos idênticos são representadas por "*", as substituições conservativas são representadas por ":" e as substituições semi-conservativas são representadas por ".".

Comparando as duas hemoglobinas é possível observar 3 diferenças nos resíduos de aminoácidos encontrados da hemoglobina de *C. brachyurus* com a hemoglobina de *C. thous*: α 130 Ala \rightarrow Thr, β 16 Gly \rightarrow Ala, β 53 Ala \rightarrow Ser. Estas regiões estão bem definidas no mapa de densidade para a estrutura da hemoglobina de *C. thous*, como se pode observar na figura 9, confirmando a diferença na seqüência da hemoglobina dos dois canídeos.

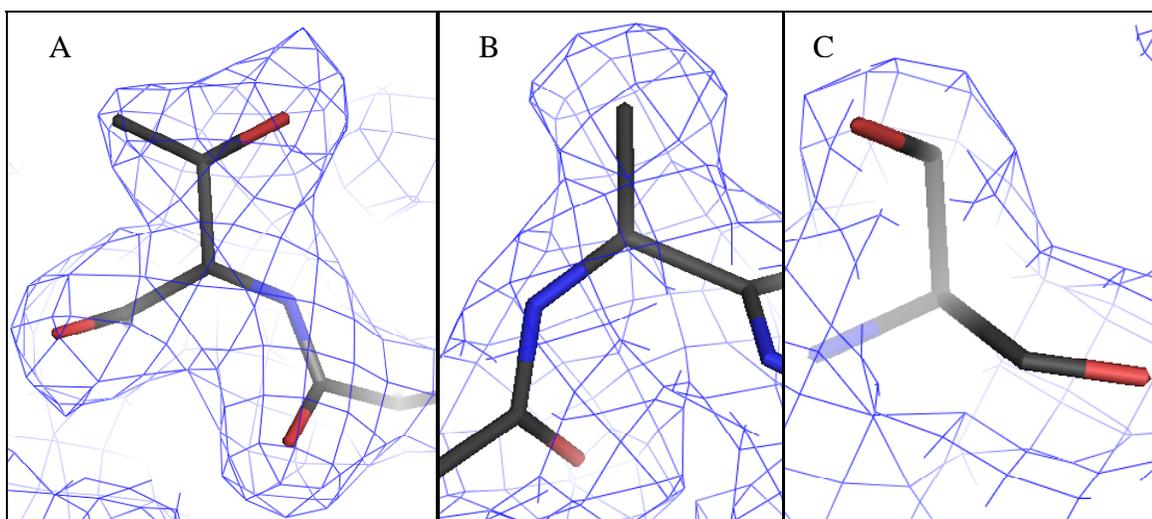


Fig. 9 Resíduos de aminoácidos substituídos na *C. thous* em relação ao modelo utilizado. (A) α 130 Thr, (B) β 16 Ala (C) β 53 Ser. Cores: C - cinza, N - azul, O - vermelho.

4.4. Análise do modelo da estrutura tridimensional

O modelo final da estrutura tetramérica de *C. thous*, com os heteroátomos e as moléculas de solvente pode ser observado na figura 10 gerada pelo programa Pymol (DeLano, 2002). O melhor modelo estrutural para a hemoglobina foi obtido após 19 ciclos de refinamento, seguido de análise da estrutura tridimensional associada ao mapa de densidade eletrônica (figura 11). O mapa de densidade mostra que a resolução foi suficiente para identificação precisa dos átomos.

Todas as águas foram observadas e analisadas quanto à estabilização da estrutura tridimensional por ligações de hidrogênio e as distâncias pertinentes entre essas moléculas e as cadeias laterais dos aminoácidos. Este modelo refinado apresentou um Fator R de 16,8% (abaixo do esperado de 20% para estruturas com alta qualidade e resolução) e um R_{free} de 23,2%. As coordenadas atômicas foram salvas em um arquivo formato pdb.

O gráfico de Ramachandran, calculado para o modelo final com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) (figura 12), mostra que 92,8% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis e os outros 7,2% restantes estão em regiões adicionalmente permitidas.

A qualidade estereoquímica do modelo também foi analisada durante a deposição dos dados no PDB (www.rcsb.org/pdb). Após a avaliação e aprovação dos consultores deste banco de dados, as coordenadas atômicas foram depositadas, com o código de acesso 2B7H.

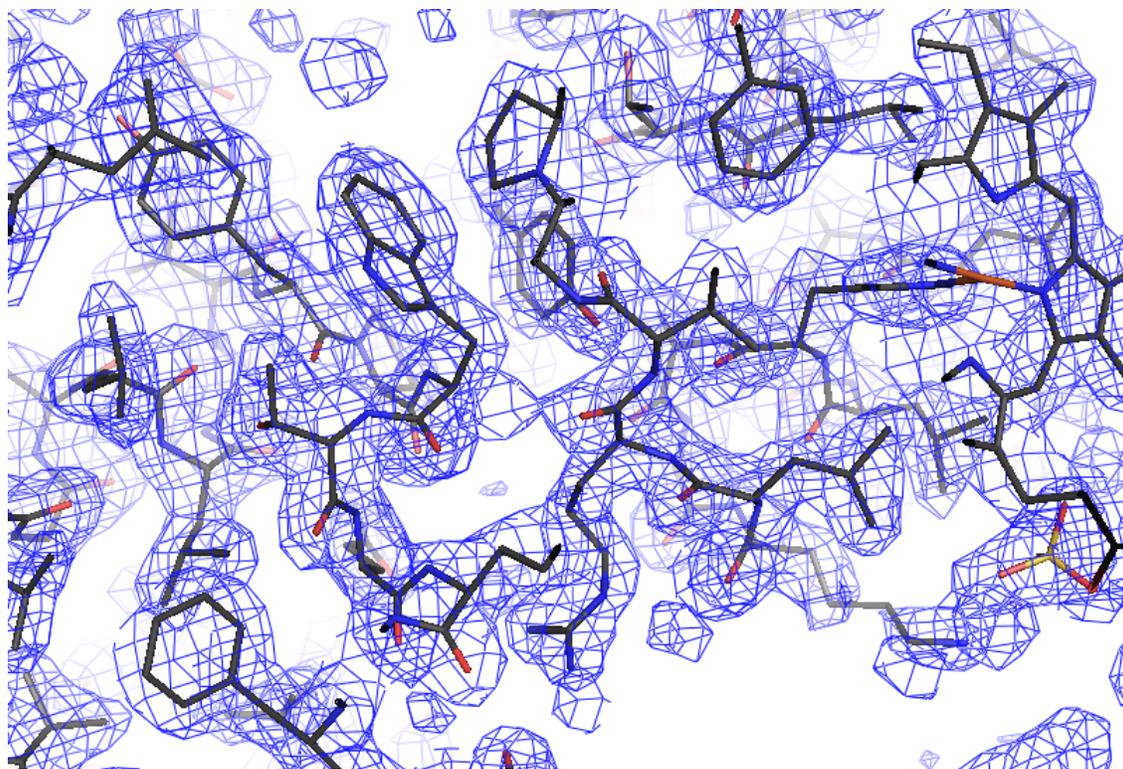


Fig. 10 Mapa de densidade eletrônica da estrutura da hemoglobina de *C. thous*. Em destaque estão as cadeias laterais de alguns resíduos aromáticos.

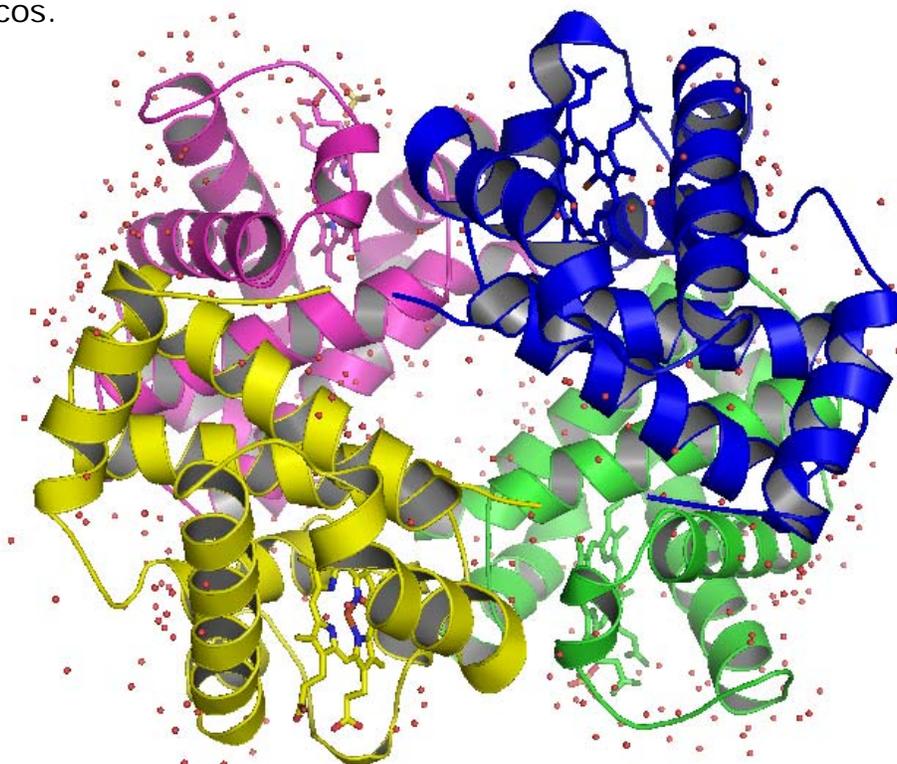


Fig. 11 Estrutura da hemoglobina tetramérica de *C. thous* com os quatro grupamentos heme e as moléculas de água (em vermelho), gerada pelo programa Pymol.

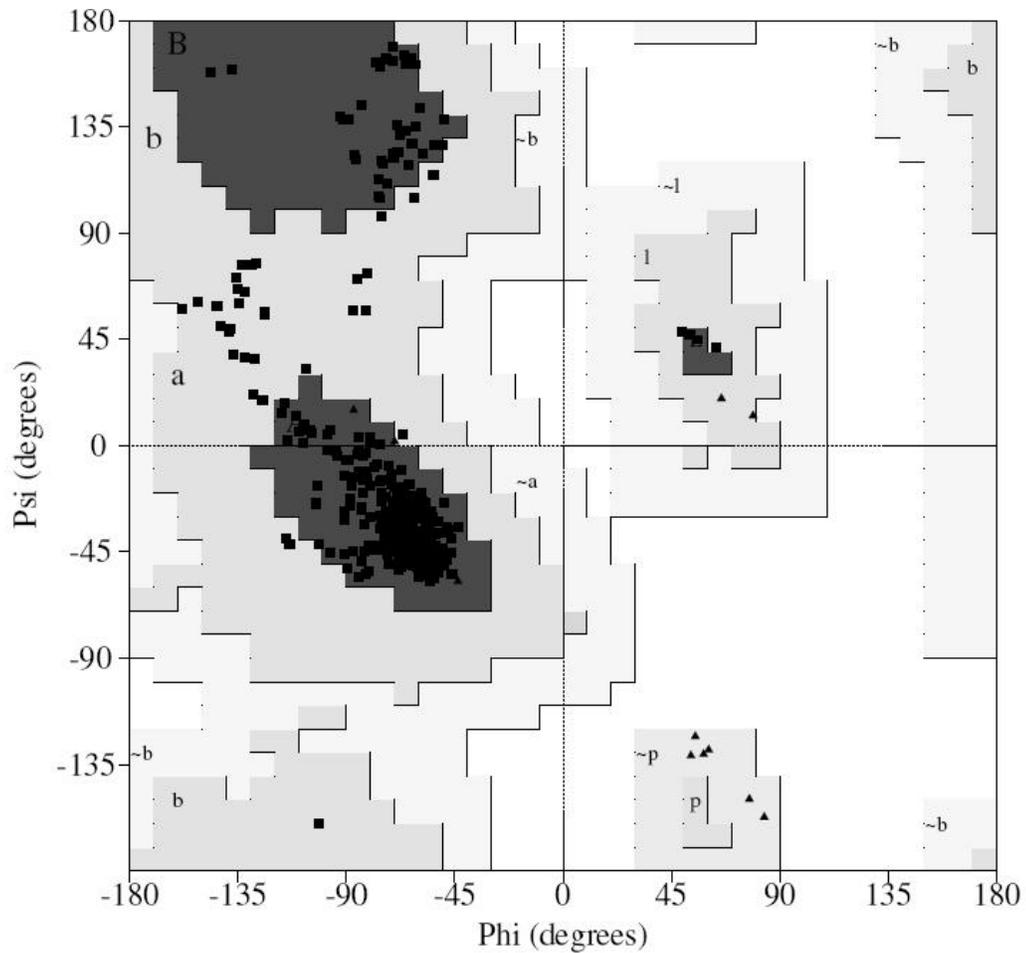


Fig. 12 Gráfico de Ramachandran com a posição de cada resíduo de aminoácido para o modelo final da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous*.

O modelo final da hemoglobina é um tetrâmero composto de duas subunidades α , compostas de 141 resíduos de aminoácidos e duas subunidades β compostas por 146 resíduos e os grupamentos heme. Como a unidade assimétrica da hemoglobina é um tetrâmero completo, cada cadeia foi refinada individualmente.

A cadeia α é composta por sete α -hélices e sete segmentos de estrutura não ordenada, enquanto que a cadeia β é composta por oito α -hélices e sete segmentos de estrutura não ordenada. A estrutura secundária das subunidades é estabilizada pelas ligações de hidrogênio formadas pelo grupamento NH e CO da cadeia principal ou cadeias laterais próximas.

A conformação dessa hemoglobina é do tipo R, caracterizada pela presença de um ligante no grupo heme. Quando este ligante do ferro no estado oxidado é uma molécula de água, a hemoglobina é denominada de metahemoglobina (figura 13 e figura 14). A principal característica da metahemoglobina é a hexacoordenação do ferro que inclui a molécula de água, além dos 4 carbonos do grupamento heme e a ligação com a histidina proximal.

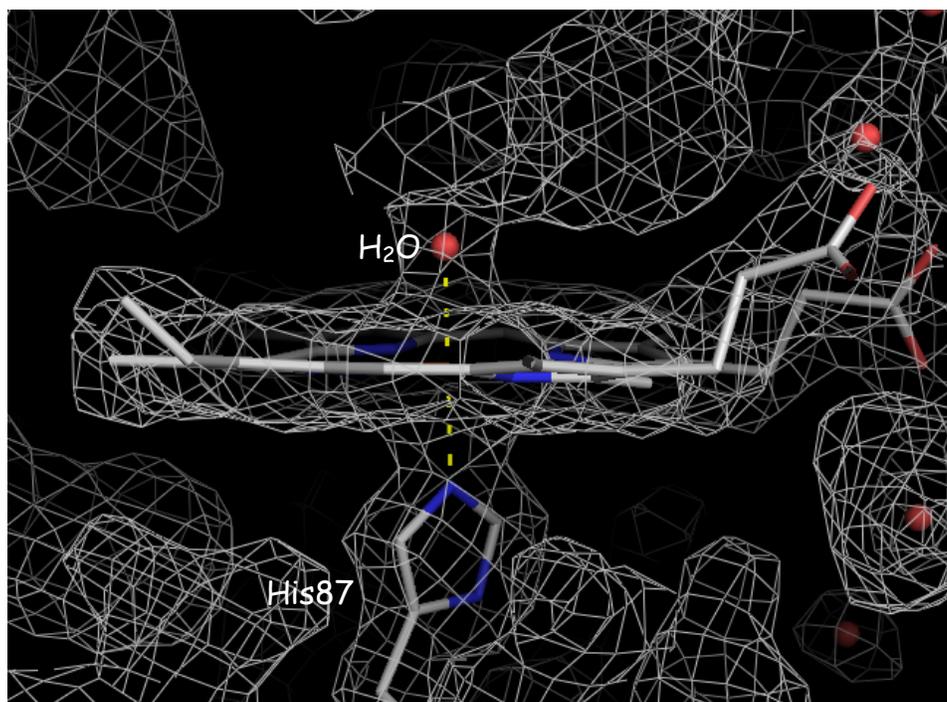


Fig. 13 Mapa de densidade 1.0σ na região do grupo heme da cadeia α mostrando a hexacoordenação do ferro com o grupo heme, a água e a histidina.

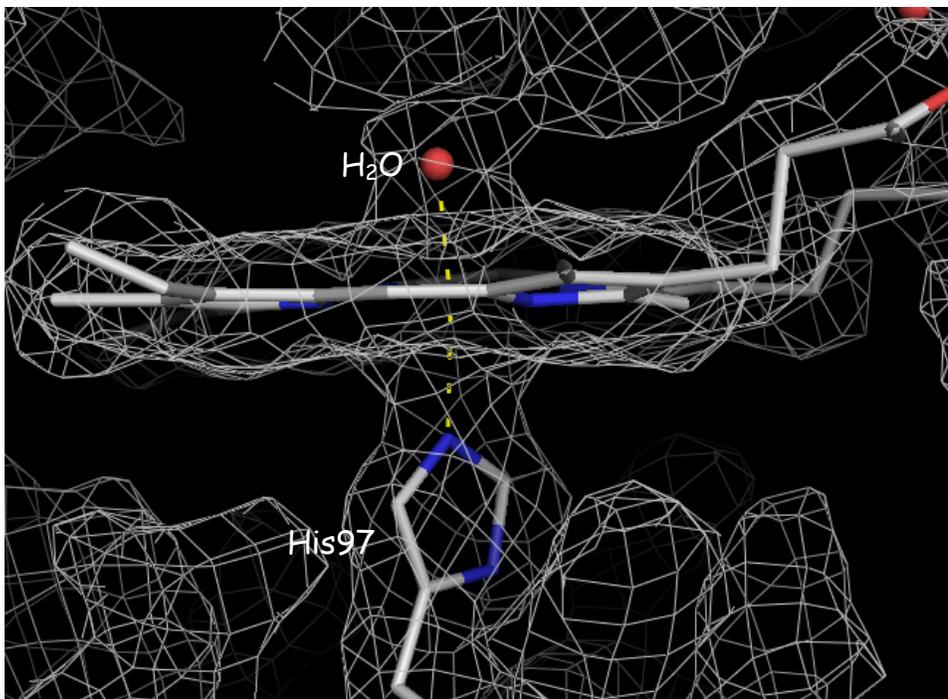


Fig. 14 Mapa de densidade 1.0σ na região do grupo heme da cadeia β mostrando a hexacoordenação do ferro com o grupo heme, a água e a histidina.

O cálculo do r.m.s.d. foi utilizado como método de escolha da melhor estrutura para realização de comparações estruturais. O melhor valor foi obtido para a comparação com a estrutura da oxihemoglobina humana (PDB ID: 1HHO - Shaanan, 1983), apresentando um r.m.s.d. de $0,58 \text{ \AA}$.

A estrutura tridimensional das duas proteínas é semelhante, indicado pela sobreposição das duas estruturas apresentada na figura 15 e o baixo valor do r.m.s.d.. Há pequenas diferenças na estrutura primária das duas hemoglobinas: as cadeias α e β apresentam 83,7% e 89,7% de identidade, respectivamente.



Fig. 15 Sobreposição das estruturas tridimensionais da hemoglobina de *C. thous* (amarelo) e humana (vermelho) gerada pelo programa Pymol. Este alinhamento estrutural foi realizado considerando-se somente a cadeia principal. As cadeias laterais dos aminoácidos não estão representadas.

Considerando-se a semelhança estrutural tridimensional e as pequenas diferenças no nível primário, uma análise estrutural detalhada do envolvimento de cada resíduo diferente, apresentados no alinhamento, foi realizada. As vizinhanças destes resíduos foram analisadas para verificação da consequência dessa alteração nas ligações inter e intra-cadeia, observando se a mudança implicaria em uma perda ou ganho de contato atômico, ou se estaria relacionada com diferenças na estabilidade estrutural. Além disso, é importante analisar as regiões de contatos na interface das subunidades, uma vez que uma simples alteração nos resíduos presentes nesta região pode provocar

empacotamento diferente da proteína, que pode ser verificado pela alteração no valor do r.m.s.d..

A figura 16 apresenta apenas as cadeias laterais das duas hemoglobinas sobrepostas, mostrando que apesar de não haver uma grande diferença na seqüência primária, a conformação de alguns aminoácidos é diferente. Isso resulta, conseqüentemente, em diferenças encontradas no tipo e na quantidade de contatos realizados pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

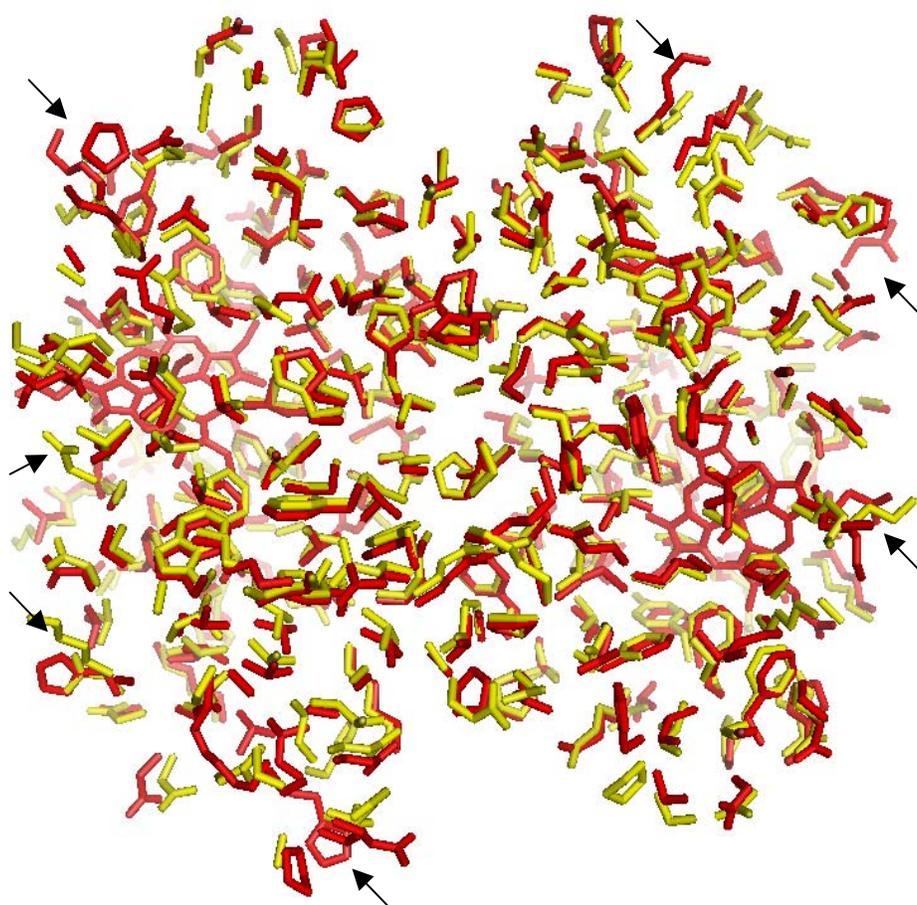


Fig. 16 Sobreposição das estruturas tridimensionais da hemoglobina de *C. thous* (amarelo) e humana (vermelho) gerada pelo programa Pymol. Este alinhamento estrutural foi realizado considerando-se somente a cadeia principal, mas apenas as cadeias laterais dos aminoácidos estão representadas. As setas indicam algumas regiões com diferenças na orientação das cadeias laterais.

Região $\alpha 1\beta 1$

A região $\alpha 1\beta 1$ é a região de contato mais conservada nas estruturas de hemoglobinas. Esses contatos de empacotamento são usados para controlar a estabilidade do oxigênio ligado (Yasuda e colaboradores, 2002 e Shikama e Matsuoka, 2003). É sabido que certas espécies de gansos que voam a altas altitudes tem hemoglobinas com afinidade de oxigênio anormalmente alta, devido a mutações que enfraquecem a interação das subunidades (Zhang e colaboradores, 1996).

A região $\alpha 1\beta 1$ da hemoglobina de *C. thous* é similar a oxihemoglobina humana, apresentando poucas substituições nesta região. Na oxihemoglobina humana, a α Leu34 faz um contato com β Pro125. Ambos aminoácidos estão mutados na hemoglobina de *C. thous*, onde $\alpha 34$ e $\beta 125$ são Gln. Como pode ser observado na figura 17 A, O NE2 de α Gln34 faz contato com o N da β Gln125.

Na oxihemoglobina humana, a α Ala111:O faz contato com β Gly119:CA. Essa região está representada na figura 17 B. Na hemoglobina de *C. thous* ao invés de Ala, está presente uma Cys, cujo oxigênio da carbonila da cadeia principal faz adicionalmente 3 contatos a mais com moléculas de solvente, além do contato com a cadeia β .

A α Pro119 é um resíduo importante na região $\alpha 1\beta 1$ e é altamente conservada nas hemoglobinas de vertebrados (Chong, 1999). Essa prolina interage fortemente com β Arg30 e com a β Met55. Na hemoglobina de *C. thous* essa cadeia lateral da arginina faz uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila de α Phe117 e está 4,22 Å distante do anel da prolina (figura 18 A).

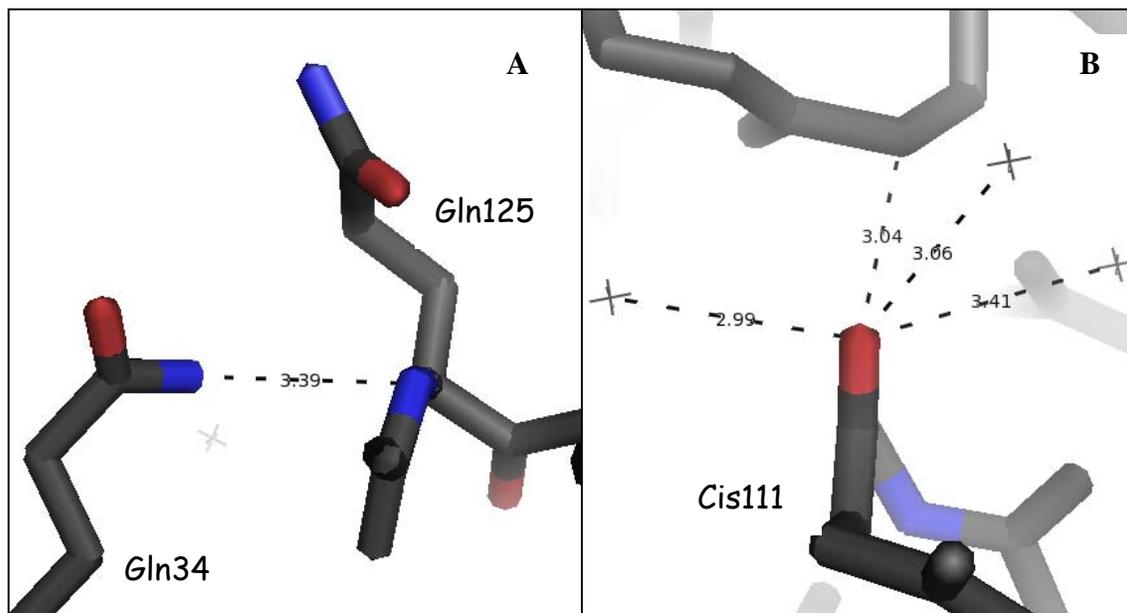


Fig. 17 (A) Representação do contato entre α Gln34 e β Gln125. (B) Contatos realizados pelo oxigênio da carbonila de α Cis111.

Na oxihemoglobina humana o resíduo β 33 é uma valina que faz contato com a α Pro119, mas, na hemoglobina de *C. thous* esse contato não existe. Essa prolina está mais próxima da α Ala123, presente na maioria das hemoglobinas de vertebrados (Tame, 1996). Tame e colaboradores (1996) encontraram esta mesma substituição Val \rightarrow Ile em β 33 na hemoglobina de truta e também em peixes. Esta β Ile33 ocupa a região deste contato, afastando a β Met55 da α Pro119. Na hemoglobina de *C. thous* e na oxihemoglobina humana, o contato entre α Pro119 - β Met55 existe (figura 18 B).

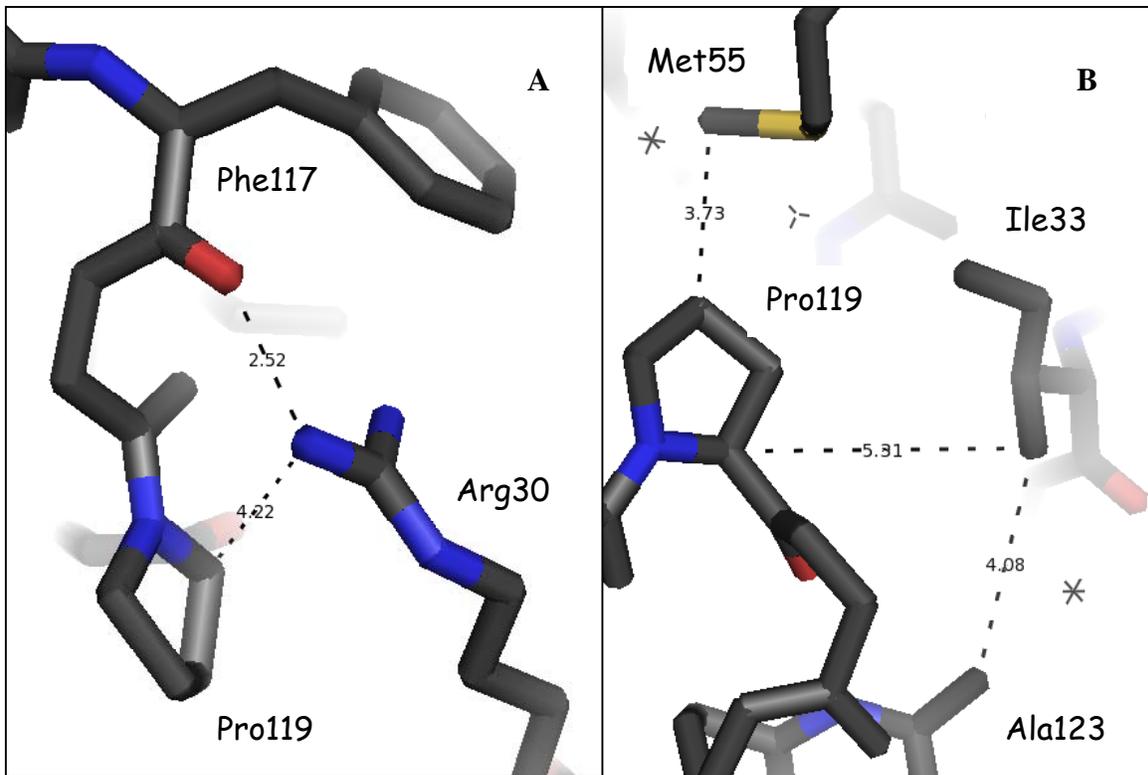


Fig. 18 (A) Representação dos contatos de Arg β 30 (B) Contatos e distâncias da α Pro119.

Região α 1 β 2

Essa região é a principal responsável pela mudança da conformação da hemoglobina.

Na hemoglobina de *C. thous* a carboxila da cadeia lateral do α Asp94 faz contato com o grupo indol do β Trp37 e o grupo guanidílico do β Arg40 faz contato com o fenol do α Tyr42. A figura 19 mostra uma visão detalhada da região de contato responsável pela maior alteração conformacional da hemoglobina. No estado R, a β His97 está posicionada entre α Thr38 e α Thr41. A conformação R da oxihemoglobina de *C. thous* é confirmada pelo contato entre β His97 e α Thr38. Neste caso, a β His97 encontra-se levemente deslocada em direção a α Thr41. Essas pequenas mudanças, embora não alterem a conformação da hemoglobina, são

responsáveis pelo pequeno desvio observado na sobreposição das estruturas tridimensionais.

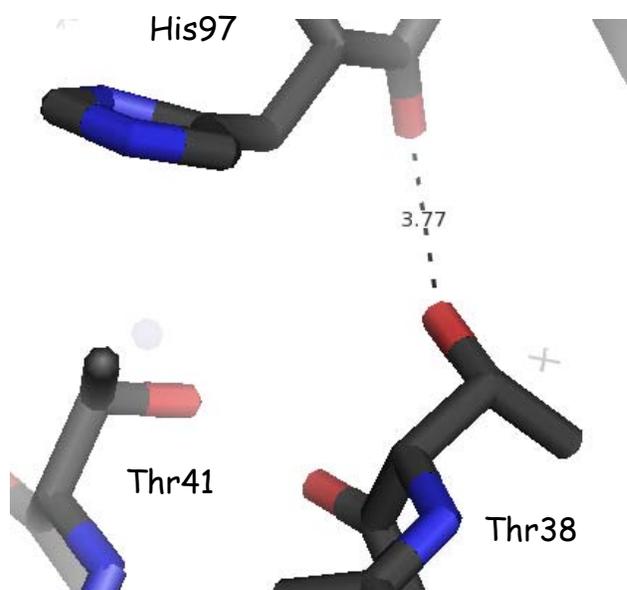


Fig. 19 (A) Representação dos resíduos da região 'dobradiça' responsáveis pela mudança de conformação da estrutura.

Todas essas características estruturais observadas para os resíduos mutados, de maneira geral, são responsáveis pelas diferenças estruturais observadas nas regiões dos *loops* que conectam as hélices e pouco na cadeia principal. Estas pequenas diferenças na estrutura das hemoglobinas podem estar relacionadas com as diferenças na estabilidade conformacional destas proteínas. Para esta comparação, existem muito poucos trabalhos na literatura corrente. Para avaliação final destas diferenças estruturais, refletindo na estabilidade das proteínas, é necessário uma análise detalhada da estrutura tridimensional juntamente com os dados da desnaturação química ou térmica, o que não tem sido fácil uma vez que existem pouquíssimos trabalhos nesta área. Os dados termodinâmicos para análise da estabilidade térmica e química de duas hemoglobinas, a de *C. thous* e *P. vetulus*, estão descritos no item a seguir.

4.5. Desnaturação química acompanhada por espectroscopia de fluorescência

As figuras 20 e 21 mostram a desnaturação química das hemoglobinas na presença de uréia e de guanidina, acompanhadas por fluorescência. Em todos os gráficos analisados, é observado um aumento na intensidade da banda de emissão fluorescente (351 nm) com o aumento da concentração do agente desnaturante. Este aumento das bandas de emissão corresponde às modificações no ambiente dos resíduos de triptofano, e consequência do aumento na absorção desse resíduo. A hemoglobina de *C. thous* possui 6 resíduos de triptofano expostos: 1 em cada cadeia α e 2 em cada cadeia β . Esses resíduos são também encontrados na mesma posição na hemoglobina humana e de cavalo.

A partir dos gráficos das figuras 20 e 21 foram obtidas as curvas de transição (figuras 22 e 23) em um comprimento de onda igual a 351 nm, onde houve maior alteração da emissão, para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural de proteínas.

A guanidina foi mais eficiente no desdobramento da proteína do que a uréia (Dempsey, 2005), como verificado para a faixa de transição nas curvas de F_u vs [desnaturante] e a dependência da concentração deste desnaturante. Para a hemoglobina de *C. thous* (figuras 22 e 23) o processo de desdobramento acompanhado por fluorescência é do tipo cooperativo com definição precisa da região de transição, conhecida como transição de dois estados.

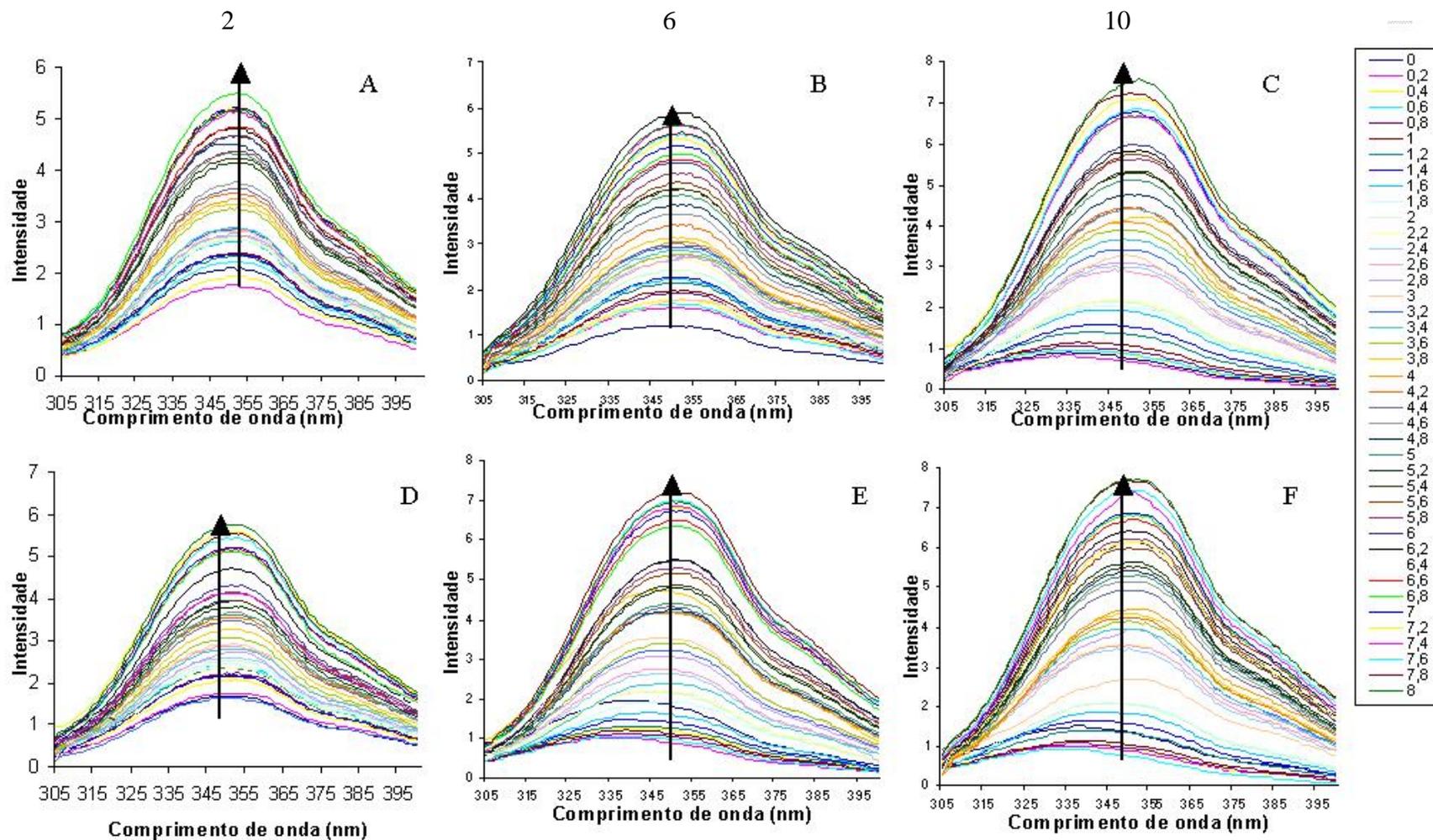


Fig. 20 Espectros de fluorescência da hemoglobina de *C. thous* (superior) e *P. vetulus* (inferior) em pH 2 (A,D), pH 6 (B,E) e pH 10 (C,F) em diferentes concentrações de uréia.

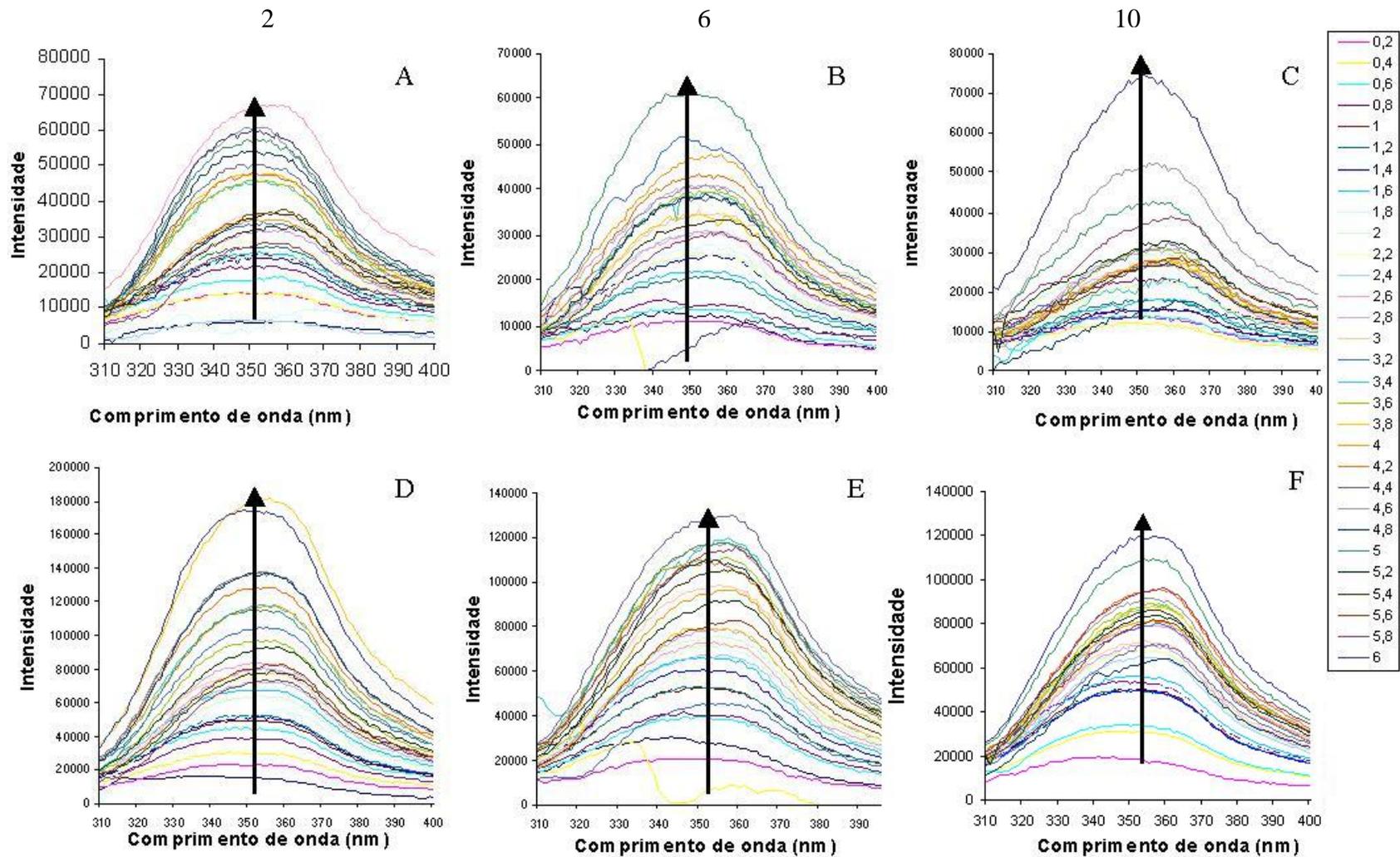


Fig. 21 Espectros de fluorescência da hemoglobina de *C. thous* (superior) e *P. vetulus* (inferior) em pH 2 (A,D), pH 6 (B,E) e pH 10 (C,F) em diferentes concentrações de guanidina.

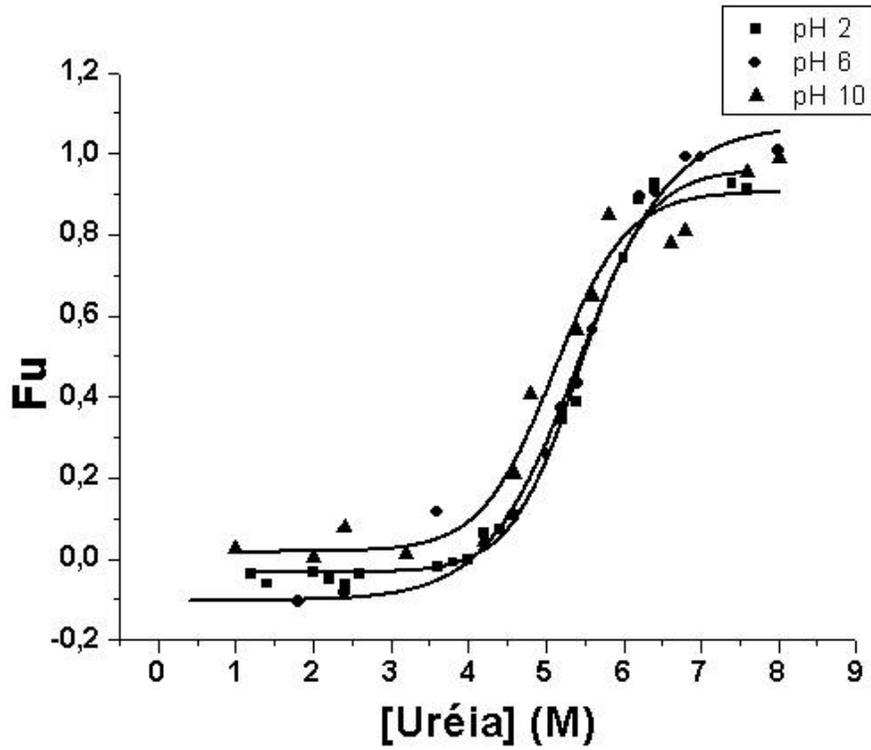


Fig. 22 Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 2,0, 6,0 e 10,0 na presença de uréia.

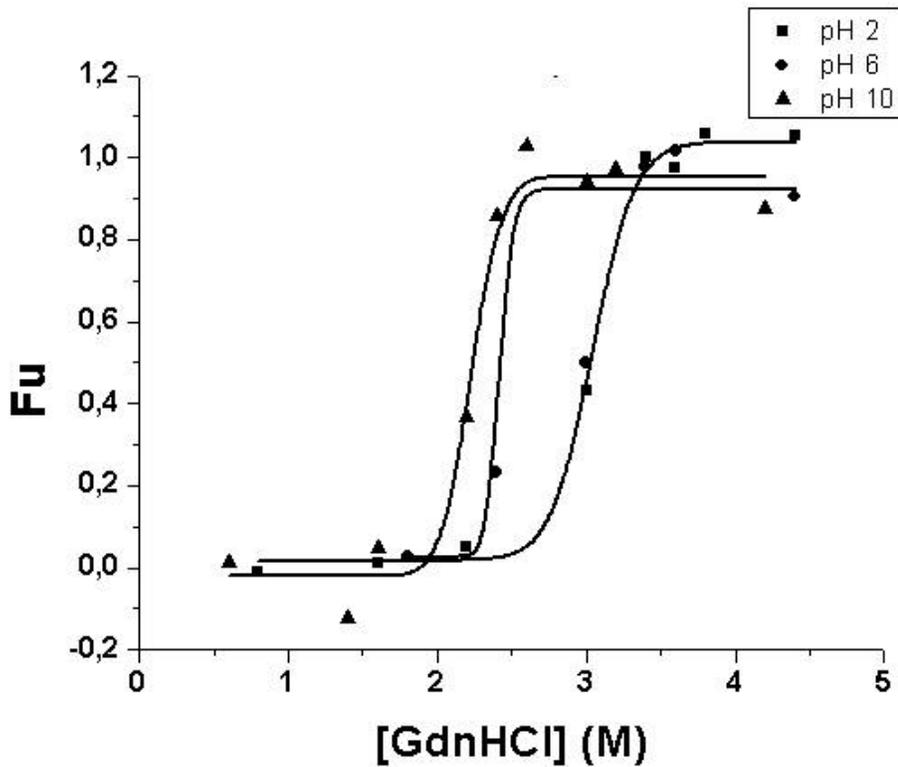


Fig. 23 Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 2,0, 6,0 e 10,0 na presença de guanidina.

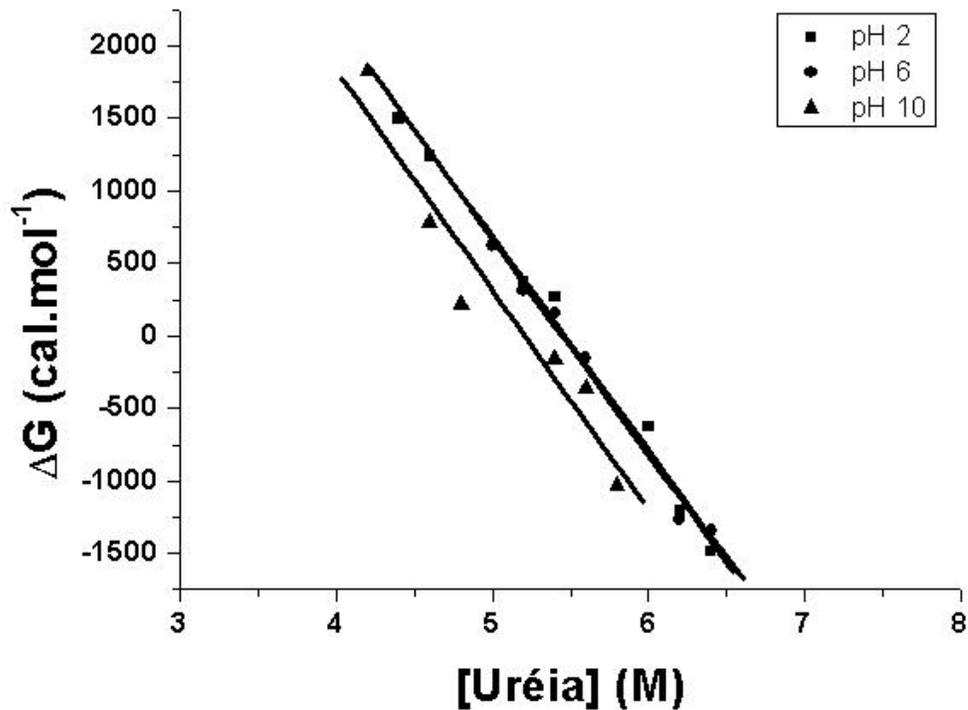


Fig. 24 Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, 6,0 e 10,0.

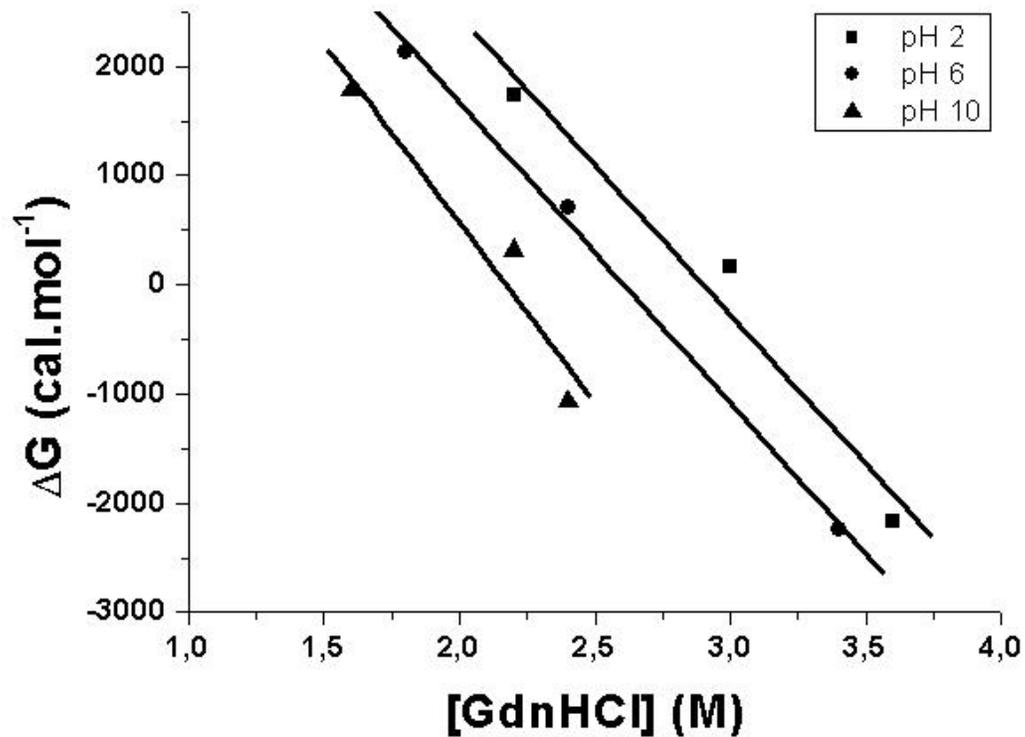


Fig. 25 Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) no desdobraimento da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de guanidina em pH 2,0, 6,0 e 10,0.

As figuras 24 e 25 mostram a variação linear do ΔG com a concentração dos desnaturantes uréia e guanidina, respectivamente, para a hemoglobina de *C. thous*. Utilizando a equação 8 e os dados obtidos a partir dessas figuras, foi calculado o valor da estabilidade da proteína na ausência de desnaturante e a 25°C, correspondente a variação da energia livre de Gibbs na ausência do desnaturante ($\Delta G_{H_2O}^{25}$). Os parâmetros termodinâmicos calculados com os dados da fluorescência para a hemoglobina de *C. thous* estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de transição obtidas pelos espectros de fluorescência para a hemoglobina de *C. thous*.

	pH	$\Delta G_{H_2O}^{25}$ (cal.mol ⁻¹)	D ½ (M)	<i>m</i>
Uréia	2	8063,8 ± 385,45	5,46	1475,84 ± 70,02
	6	8087,3 ± 482,32	5,44	1485,06 ± 85,27
	10	7933,0 ± 1087,89	5,21	1523,39 ± 213,35
GdnHCl	2	7935,1 ± 1612,67	2,90	2736,57 ± 539,56
	6	7181,1 ± 386,95	2,60	2756,26 ± 147,81
	10	7158,9 ± 1870,16	2,17	3296,79 ± 892,92

Os resultados obtidos indicam que a hemoglobina de *C. thous* tende a ser mais estável em pHs ácidos, uma vez que ocorre diminuição dos valores de $\Delta G_{H_2O}^{25}$ com o aumento do pH, e diminuição dos valores de $D_{1/2}$, que representa a quantidade necessária de agente desnaturante em que 50% das proteínas encontram-se no estado nativo e 50% encontram-se no estado desdobrado. A partir das curvas de ΔG^{25} vs [desnaturante] ajustadas, foram calculados os valores de *m* (equação 8), que representa a medida da dependência do ΔG^{25} na concentração do desnaturante (Pace e colaboradores, 1990). Como mostrado na tabela 3, os valores de *m* para a guanidina foram aproximadamente

duas vezes maior do que para a uréia, indicando maior eficiência da guanidina no processo de desdobramento.

Apesar da proximidade filogenética e a alta similaridade entre as seqüências das hemoglobinas estudadas, a hemoglobina de *P. vetulus* apresentou parâmetros de estabilidade estrutural diferentes, obtidos a partir da desnaturação química. Isso indica que, mesmo sendo as duas seqüências parecidas, as pequenas modificações de aminoácidos podem ser os responsáveis pela diferença na estabilidade. Ainda que os gráficos mostrados nas figuras 20 e 21 apresentem o mesmo padrão dos resultados encontrados para a hemoglobina de *C. thous*, ou seja, um aumento na intensidade da banda de emissão fluorescente com o aumento da concentração do agente desnaturante, o processo de transição foi diferente, conforme apresentado nas figuras 26, 27 e 28.

Os resultados encontrados para a *P. vetulus* com o uso de guanidina como agente desnaturante não puderam ser ajustados para um processo de transição característico de dois estados. Os valores das frações de proteínas no estado desdobrado foram calculados considerando-se as bandas de emissão (figura 21D, E e F). No entanto, as curvas de transição obtidas não puderam ser ajustadas segundo o modelo de dois estados, uma vez que as regiões pré e pós-transição não foram bem definidas. Neste caso, a hemoglobina parece interagir com o solvente e o desnaturante de forma pouco cooperativa sem definição precisa das regiões de transição, indicando que a proteína apresenta mudanças conformacionais que podem estar associadas a dissociação das subunidades e a formação de vários intermediários conformacionais.

O ensaio de desnaturação da hemoglobina de *P. vetulus* utilizando a uréia em pH 2,0 e pH 10,0 mostra que as curvas de transição seguem um modelo de três estados, apresentado um estado intermediário. Essas curvas de transição de três estados podem ser observadas nas

figuras 26 e 27 que representam a primeira e a segunda transição isoladamente.

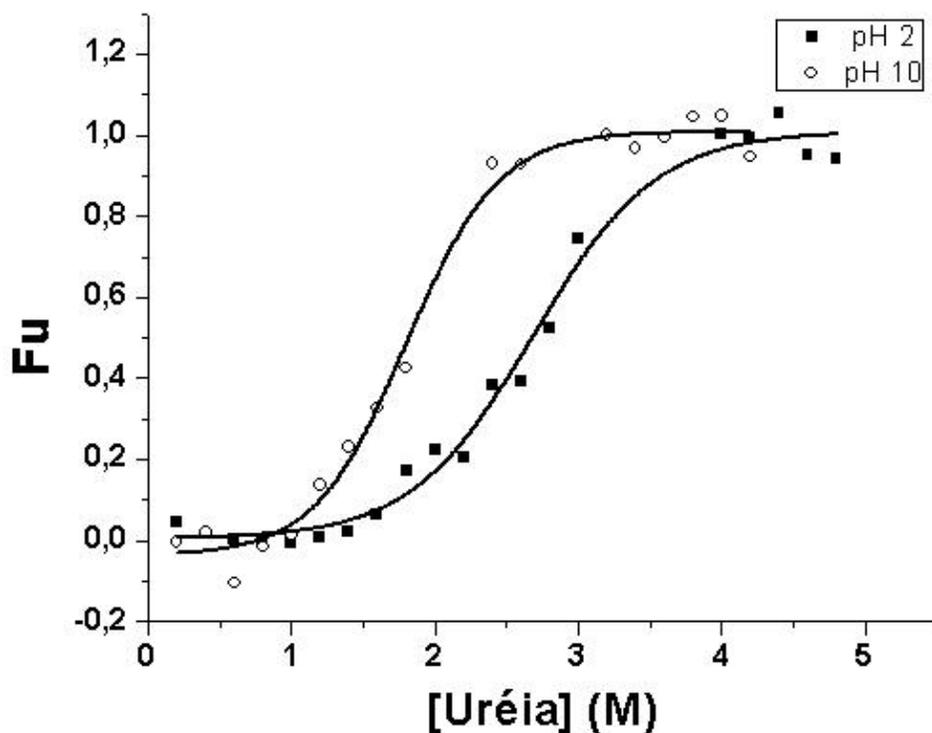


Fig. 26 Fração desnaturada da primeira transição da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 2,0 e 10,0, na presença de uréia.

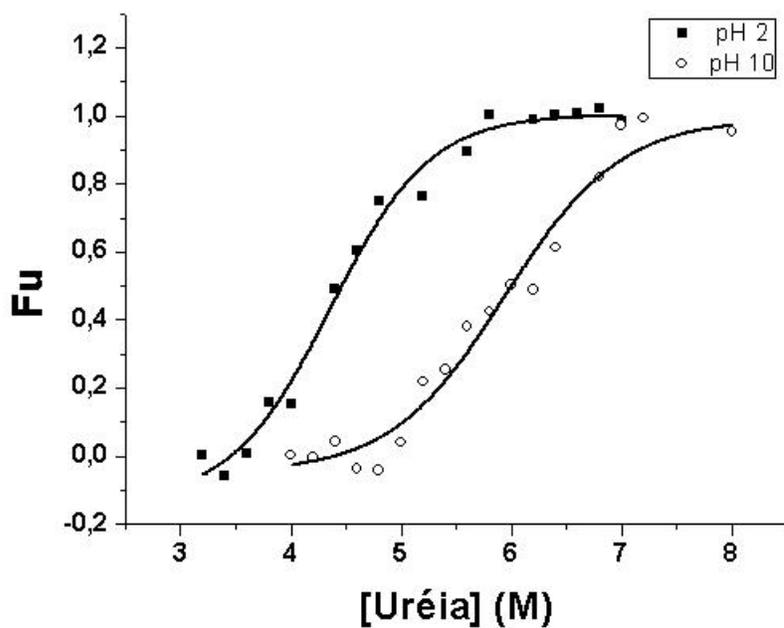


Fig. 27 Fração desnaturada da segunda transição da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 2,0 e 10,0, na presença de uréia.

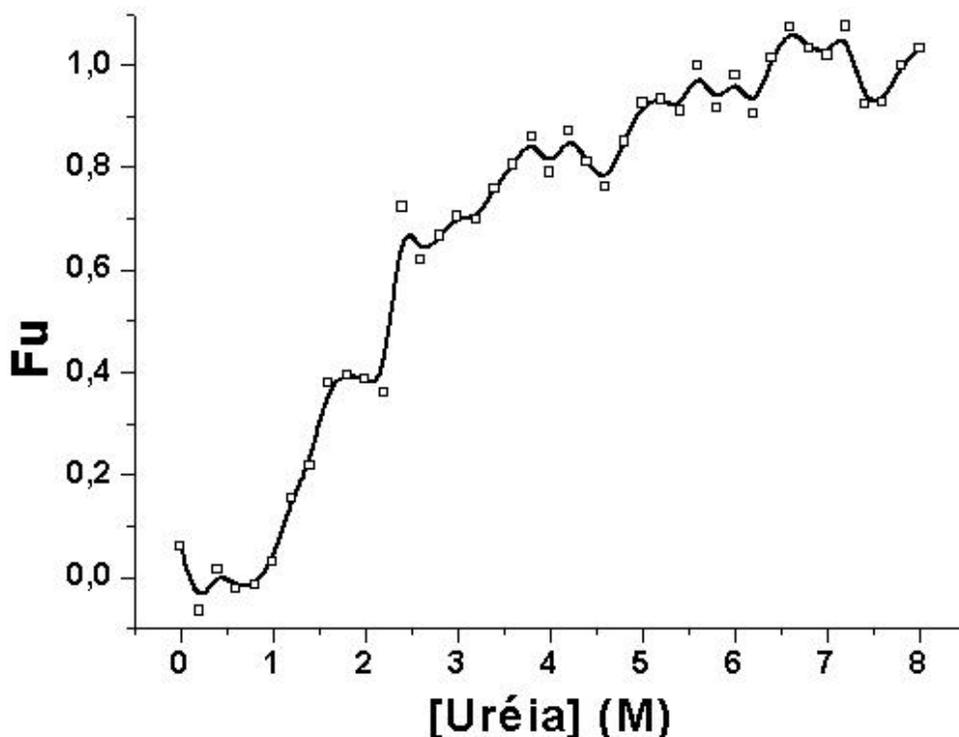


Fig. 28 Fração desnaturada da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 6,0 na presença de uréia.

A curva de desnaturação da hemoglobina de *P. vetulus* em pH 6 (figura 28) mostra trechos com pequenas transições, o que sugere a presença de vários intermediários, o que impossibilitou os ajustes das curvas e o cálculo dos parâmetros termodinâmicos. Esta instabilidade no padrão de desdobramento pode estar associada ao número de histidinas comparado com a hemoglobina de *C. thous* e o estado de ionização das mesmas, que apresentam um pKa de ionização próximo do pH analisado. Sabe-se que a estabilidade conformacional das proteínas pode ser fortemente afetada pelo equilíbrio ácido-base da histidina. A protonação de algumas histidinas no cerne da proteína pode desestabilizar o estado nativo e até causar desnaturação parcial.

As histidinas das hemoglobinas de *C. thous* e a *P. vetulus* podem estar localizadas em uma posição diferente na seqüência, ou mesmo uma possuir mais resíduos deste aminoácido que a outra. Além disso, a

região próxima a estes resíduos pode estar influenciando no valor do pKa na medida que realiza diferentes tipos de contato. A mutação de resíduos próximos ou de resíduos que interagem com essas histidinas pode ser crítica no papel dessas histidinas na molécula e conseqüentemente das alterações na estabilidade dependente do pH.

Este tipo de comparação no nível estrutural não é possível fazer no momento, uma vez que a seqüência e a estrutura tridimensional da hemoglobina de *P. vetulus* ainda não foram determinadas.

A figura 29 mostra a variação linear do ΔG obtido a partir dos dados das curvas de transição apresentadas nas figuras 26 e 27. A partir da equação 8 e dos dados obtidos neste gráfico, foram estimados os parâmetros termodinâmicos: a estabilidade conformacional na ausência de desnaturante, $\Delta G^{25}_{H_2O}$ em cada transição, o valor de m , que representa a medida da dependência do ΔG na concentração do desnaturante. Estes dados estão apresentados na tabela 4.

Para a hemoglobina de *P. vetulus*, o processo de desdobramento não foi do tipo cooperativo, indicando que essa hemoglobina pode se dissociar antes do processo de desnaturação completa, atingindo estados intermediários que não correspondem ao modelo de dois estados. Os parâmetros de estabilidade calculados a partir das curvas de transição de três estados indicam que a hemoglobina de *P. vetulus* tende a ser levemente mais estável em pHs básicos (tabela 4).

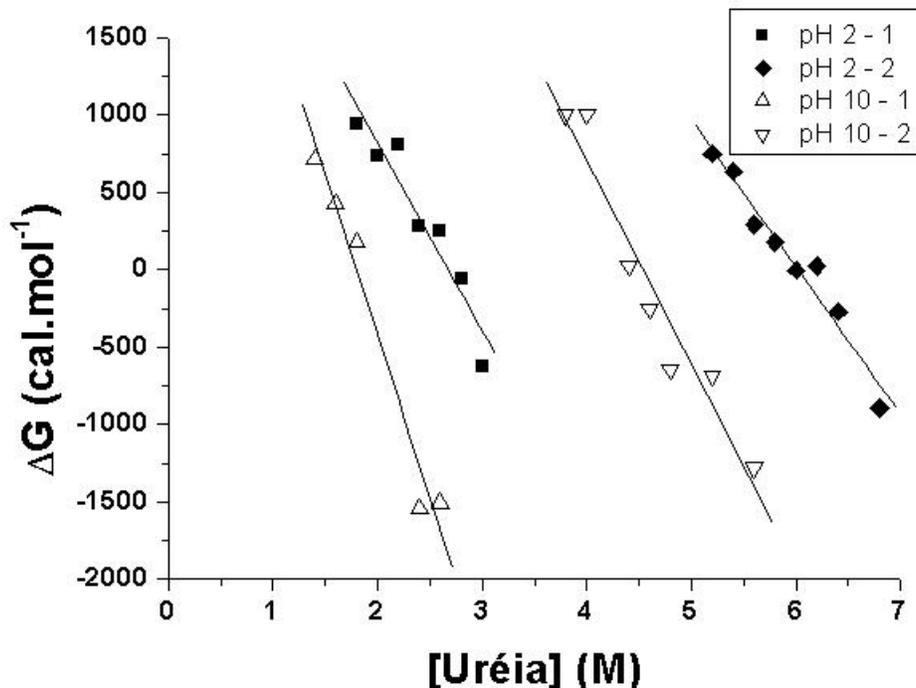


Fig. 29 Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *P. vetulus* com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, e 10,0.

Tabela 4. Parâmetros calculados a partir das curvas de transição parciais (1 e 2) obtidas com a variação da concentração de uréia em pH 2,0, e 10,0, para a hemoglobina de *P. vetulus*.

pH	Curva	$\Delta G_{H_2O}^{25}$ (cal.mol ⁻¹)	$D_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_{H_2O}^{Total}$ (cal.mol ⁻¹)
2	1	3266,74	2,67	1222,47	8996,06
		$\pm 419,54$		$\pm 172,43$	
	5729,32	6,02	951,90		
	$\pm 502,15$		$\pm 84,45$		
10	1	3721,26	1,79	2074,98	9696,22
		$\pm 444,60$		$\pm 220,76$	
	5974,96	4,54	1316,72		
	$\pm 709,87$		$\pm 152,14$		

Para a hemoglobina de *P. vetulus* o valor do $\Delta G_{H_2O}^{25}$ aumentou levemente com a diminuição do pH, mas o valor de $D_{1/2}$ diminuiu. Os valores de m encontrados mostraram uma dependência maior do ΔG

com a concentração do desnaturante na primeira do que na segunda transição.

Os valores dos parâmetros de estabilidade obtidos pelo processo de desnaturação química das hemoglobinas estudadas nesta dissertação foram levemente diferentes, o que pode ser justificado pela diferença estrutural das proteínas e a proximidade na escala evolutiva das espécies de raposas. No entanto, a discussão ampla destes resultados, de forma comparativa e extensiva a outras espécies, não é possível de ser realizada plenamente, considerando-se que poucos trabalhos foram reportados na literatura, além de que os parâmetros de estabilidade das hemoglobinas são divergentes e dependem da forma em que a hemoglobina foi purificada ou o tipo de agente desnaturante utilizado.

Puett e colaboradores (1973) em estudos de desnaturação da cianometahemoglobina humana com a guanidina em pH 8,0 encontraram um valor de $D_{1/2}$ de aproximadamente 2,71 M e um ΔG de 4.400 cal.mol⁻¹. Porém, os próprios autores questionaram o valor de ΔG encontrado, por ser um valor muito baixo.

Em contraste, Saito e Wada (1983) obtiveram, para a hemoglobina bovina em pH 7 o valor de $D_{1/2}$ de 1,45 M com a guanidina. No entanto, a variação de energia livre de Gibbs não foi estimada, dificultando, portanto, esta comparação.

Segundo os experimentos realizados por Inaba e colaboradores (1998) também com a cianometahemoglobina humana, em pH 7,4, o valor de $D_{1/2}$ encontrado na desnaturação com uréia foi de 4,8 M, com o m igual a 1.801,24 e um ΔG de 9.030,10 cal.mol⁻¹.

A cianometahemoglobina humana apresenta uma dependência maior do ΔG com a concentração do desnaturante e é mais estável do que a hemoglobina de *C. thous*. Embora os dados para a estabilidade da hemoglobina de *P. vetulus* tenham sido obtidos nos extremos de pH (2 e

10) eles indicam que esta hemoglobina apresenta estabilidade mais próxima da hemoglobina humana.

De forma geral, a hemoglobina de *C. thous* apresenta uma maior resistência à desnaturação com a guanidina. Os valores de $D_{1/2}$ foram maiores do que os valores reportados na literatura, com exceção para aquele obtido em pH básico, cujo valor é menor (2,17 M) do que o obtido por Puett e colaboradores (1973).

Para a hemoglobina de *P. vetulus* foram ajustados somente os dados obtidos em extremos de pH (2 e 10). Os demais ensaios em outros pHs não puderam ser analisados, considerando-se a variação do sinal e a dificuldade na definição das regiões de pré e pós-transição, mesmo que tenham sido qualitativamente estimadas como modelo de mais de dois estados.

Apesar da hemoglobina ter sido bastante estudada, sob vários aspectos bioquímicos e biofísicos, estudos sobre a sua estabilidade estrutural não são comumente encontrados na literatura. Considerando a escassez de dados para comparação e caracterização desta estabilidade, como poderia ser explicado a menor ou maior resistência das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus* aos diferentes agentes desnaturantes? A explicação para esses resultados pode ser atribuída às diferenças na estrutura tridimensional, nos vários níveis de organização estrutural e ao estado de oxidação do Ferro do grupo heme, que é importante no processo de estabilização dessas proteínas. Essa discussão será feita somente para a hemoglobina de *C. thous*, baseando-se na estrutura cristalográfica resolvida e apresentada neste trabalho.

Na hemoglobina de *C. thous* o grupo heme apresenta um leve desvio de planaridade e o átomo de ferro está levemente deslocado em direção a histidina proximal. Essas alterações são uma consequência da coordenação do Ferro oxidado com a água, que é o ligante encontrado

na hemoglobina quando ela está no estado de metahemoglobina. O complexo heme-globina formado nesse caso é mais instável.

No estado de oxihemoglobina o grupo heme é planar e o átomo de ferro está centralizado em relação ao grupo heme. O complexo heme-globina apresenta uma maior estabilidade quando o ligante observado é o oxigênio. Esse ligante aumenta a natureza covalente das ligações do átomo de ferro.

Rieder (1970) demonstrou a importância dos ligantes do Ferro do grupo heme na estabilidade da hemoglobina em experimentos de desnaturação de diversos derivados desta proteína, por uma variedade de agentes. Os ligantes do ferro afetam a ligação do grupo heme na globina e, conseqüentemente, a estabilização da proteína. Portanto, dependendo do ligante uma hemoglobina tende a ser mais ou menos estável.

Nos experimentos de Rieder (1970), quando uma solução de metahemoglobina foi aquecida a 65°C ocorreu precipitação imediata, com perda de mais de 50% em 5 minutos, e precipitação de 91% em 60 minutos. A adição de cianeto estabilizou a metahemoglobina: a precipitação foi reduzida a 9% quando aquecida por 60 minutos. A oxyhemoglobina foi mais estável que a metahemoglobina: 91% precipitou em 150 minutos. A deoxihemoglobina foi resistente à desnaturação: precipitou 8,4% em 150 minutos de aquecimento e houve pouca conversão para a metahemoglobina na ausência de oxigênio. A maior estabilidade foi encontrada na carboxihemoglobina: o monóxido de carbono conferiu maior estabilidade e inibiu a conversão da hemoglobina para a metahemoglobina. A metahemoglobina também foi muito mais estável em desnaturação alcalina. A adição de cianeto de potássio estabilizou a metahemoglobina, convertendo-a em cianometahemoglobina, e restaurou a taxa de desnaturação para a mesma taxa encontrada na desnaturação da oxihemoglobina. As bases

estruturais do efeito da adição de cianeto a metahemoglobina não estão definidas, mas imagina-se que ocorra um aumento na planaridade do grupo heme e aumento na estabilidade do complexo heme-globina, por diminuir o caráter iônico e aumentar a natureza covalente da ligação entre a histidina e o átomo de ferro. Com isso, a cianometahemoglobina adquire características estruturais mais próximas as da oxihemoglobina, que apresenta o grupamento heme mais planar e com o átomo de ferro mais próximo do centro do grupo heme.

4.6. Espectroscopia de dicroísmo circular

4.6.1 Desnaturação química

As transições do estado nativo para o desnaturado das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*, sob a ação da uréia e guanidina, foram acompanhadas também por dicroísmo circular na faixa do UV-distante (185-260 nm). Proteínas que apresentam sua estrutura secundária formada predominantemente por α -hélices exibem picos dicróicos negativos em 208 e 222 nm e um pico positivo entre 190 e 195 nm. Para o acompanhamento do processo de desnaturação química foram considerados os valores da variação da elipticidade medida a 222 nm na presença de uréia e guanidina, como é mostrado na figura 30. A partir destes espectros foram calculados os valores para a elipticidade molar. Somente os dados obtidos para a ação da uréia na hemoglobina de *C. thous* pH 10 foram computados e analisados. As outras curvas apresentaram várias regiões de transição com oscilações nos valores da elipticidade que dificultaram os ajustes. Isto pode ser conferido, em parte, pelo perfil dos espectros apresentados na figura 31. Estes dados

indicam que o desdobramento destas proteínas, nos pH analisados, pode estar associado ao processo de dissociação das subunidades, como sugerido por alguns dos resultados das curvas de emissão fluorescente, com o aparecimento de vários intermediários conformacionais, ou indicam a oscilação do sinal dicróico em decorrência de processos como agregação da proteína. A análise precisa destes dados sob o ponto de vista termodinâmico não foi possível uma vez que as transições não foram bem definidas.

A figura 32 apresenta a fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 10,0 na presença de uréia, com ajuste para duas transições. A partir desta curva foi obtido o gráfico da variação linear do ΔG com a concentração de uréia para as duas transições. Os parâmetros termodinâmicos obtidos estão listados na tabela 5.

A primeira transição ocorre em concentrações baixas do desnaturante e pode estar relacionada com o processo de dissociação das subunidades. O valor obtido para o ΔG_{H_2O} está próximo ao valor de 7933,0 cal.mol⁻¹ encontrado para o desdobramento da hemoglobina de *C. thous* sob as mesmas condições que foi acompanhado por fluorescência (tabela 3).

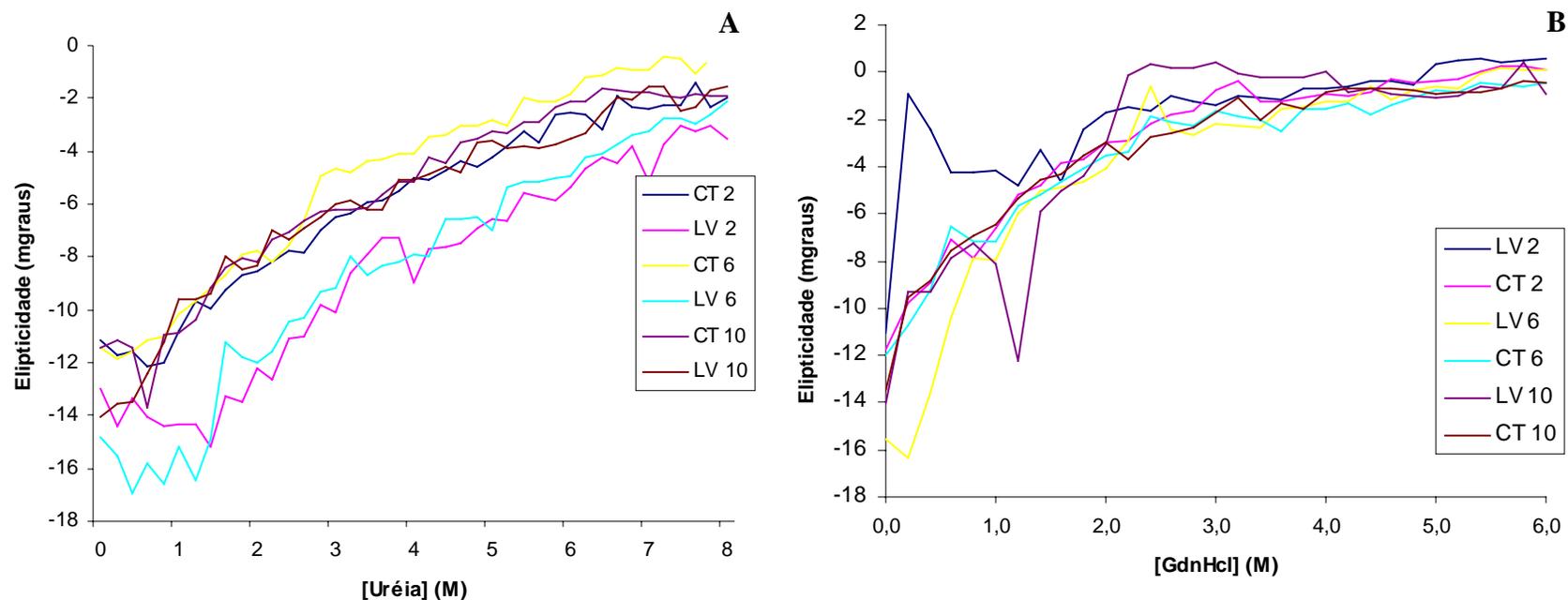


Fig. 30 Variação da elipticidade monitorada por dicroísmo circular em 222 nm, em pH 2,0, pH 6,0 e pH 10,0, das hemoglobinas de *C. thous* (CT) e *P. vetulus* (PV), em diferentes concentrações de uréia (A) e guanidina (B). As curvas mostram uma transição rápida para o estado desdobrado, mais evidente nas curvas obtidas com guanidina, em concentrações baixas do desnaturante, com um perfil semelhante para as duas hemoglobinas, porém de menor intensidade para a *P. vetulus*.

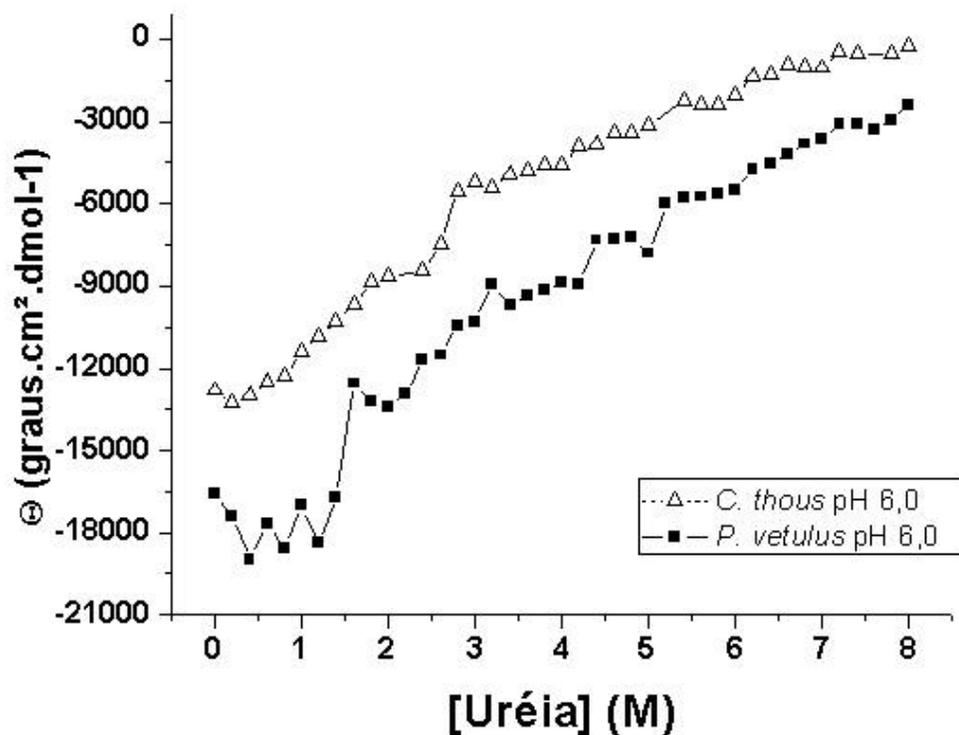


Fig. 31 Elipticidade molar da hemoglobina de *C. thous* em pH 6,0 e *P. vetulus* em pH 6,0 na presença de uréia evidenciando a presença de vários microestados.

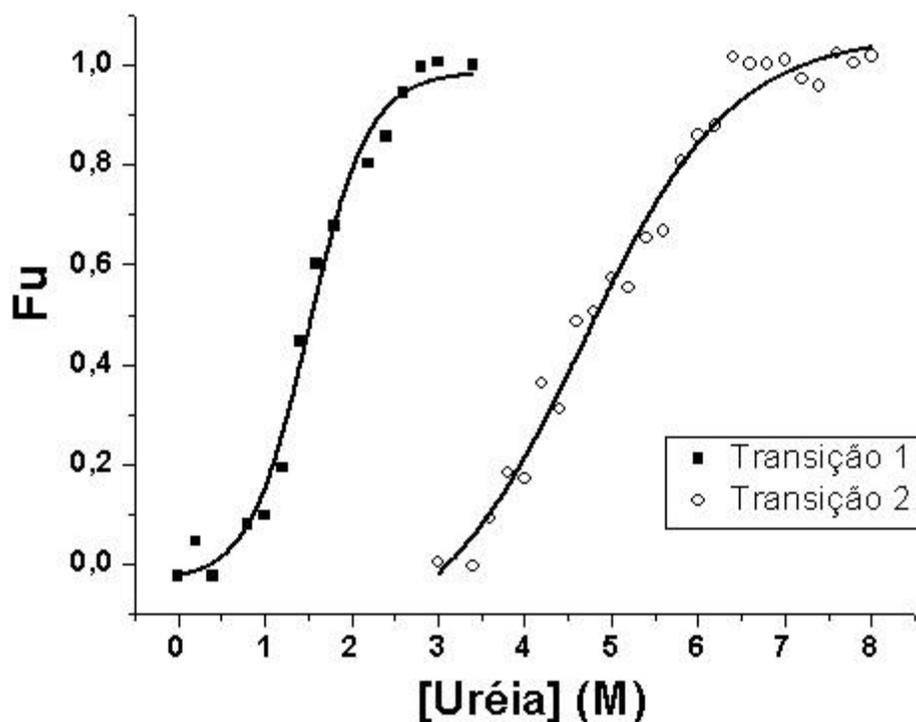


Fig. 32 Fração desnaturada da hemoglobina de *C. thous* em pH 10,0 na presença de uréia.

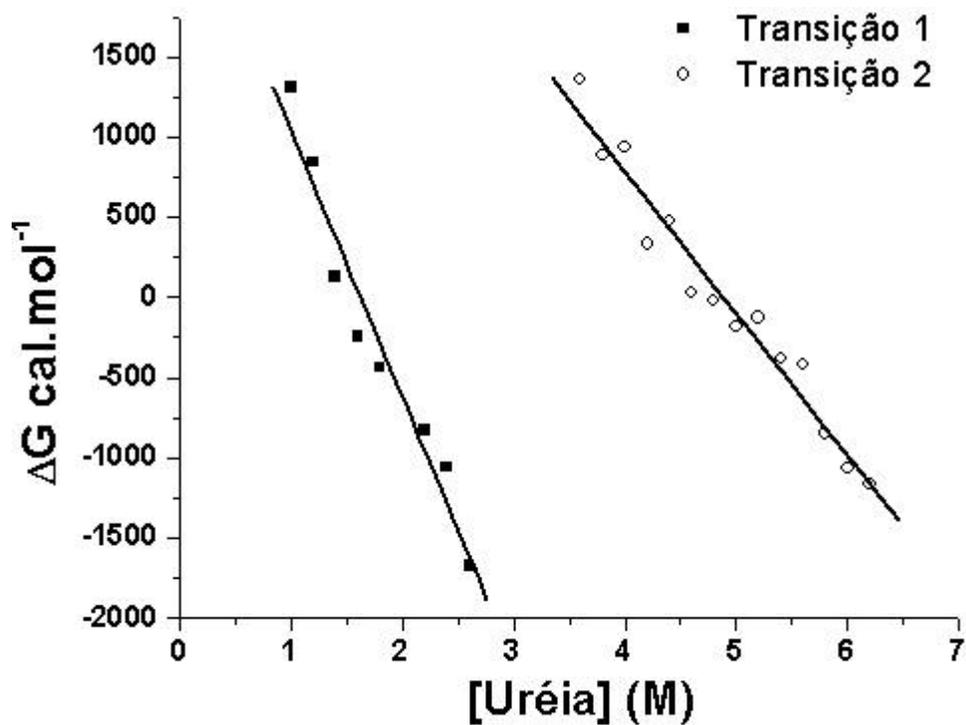


Fig. 33 Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da hemoglobina de *C. thous* com a variação da concentração de uréia para as duas transições em pH 10,0 .

Tabela 5. Parâmetros calculados a partir das curvas de transição parciais (1 e 2) obtidas com a variação da concentração de uréia em pH 10,0 para a hemoglobina de *C. thous*.

Curva	$\Delta G^{25}_{H_2O}$ (cal.mol ⁻¹)	$D \frac{1}{2}$ (M)	m	ΔG_{H_2O} Total (cal.mol ⁻¹)
1	2704,60 ± 283,76	1,66	1631,38 ± 152,88	7025,19
2	4320,59 ± 261,91	4,88	884,25 ± 52,74	

4.6.2 Desnaturação térmica.

O pH modifica o estado iônico das proteínas por alterar as cargas das cadeias laterais, podendo levar a mudanças conformacionais ocasionadas pela formação de novas ligações salinas e outras não covalentes intracadeia ou da proteína com o solvente. Essas mudanças conformacionais podem afetar a estabilidade da proteína, em um determinado pH.

O efeito do pH na estrutura secundária das hemoglobinas foi acompanhado por dicroísmo circular, na faixa de comprimento de onda de 195 a 260 nm, como mostrado nas figuras 34 A e B. Essas curvas foram utilizadas para estimar as modificações nas estruturas secundárias das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.

Os valores das elipticidade em 222 nm, correspondente à banda dicróica característica para estruturas em α -hélice, foram considerados para a análise das estruturas secundárias com a variação de pH na temperatura de 20°C. Estes dados estão representados na figura 35. A figura mostra que a hemoglobina de *C. thous* apresenta maior conteúdo de estruturas secundárias em pH 3,5, 8,5 e 10,0. A hemoglobina de *P. vetulus* apresenta maior conteúdo dessas estruturas em pH 3,5 e pH 9,5. Esses dados indicam, de forma qualitativa, que este maior conteúdo de estruturas secundárias refletem na maior organização estrutural que pode estar relacionada com a estabilidade destas proteínas nestes pHs analisados. Para determinar quantitativamente o efeito do pH na estabilidade dessas proteínas, experimentos de desnaturação térmica em diferentes pHs foram realizados.

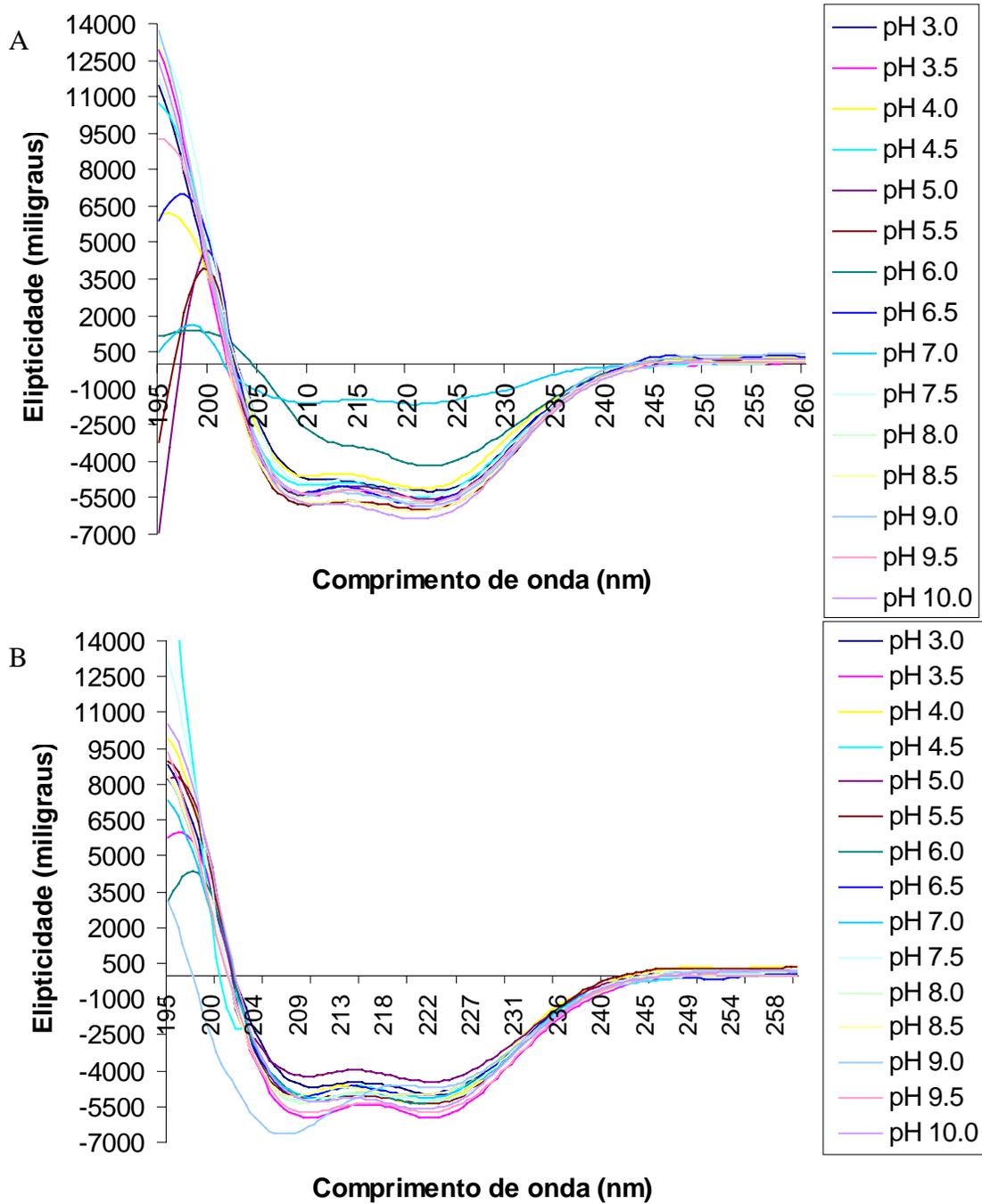


Fig. 34 Espectros de dicroísmo circular da hemoglobina de (A) *C. thous* e *P. vetulus* (B) em diferentes pHs.

As duas hemoglobinas foram analisadas quanto à estabilidade estrutural, sob o efeito da temperatura e do pH. Várias curvas de desnaturação térmica com variação de pH foram obtidas (figura 36 A e B). A partir dos dados dessas curvas, os parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural das hemoglobinas foram calculados e a dependência do pH na desnaturação térmica foi avaliada.

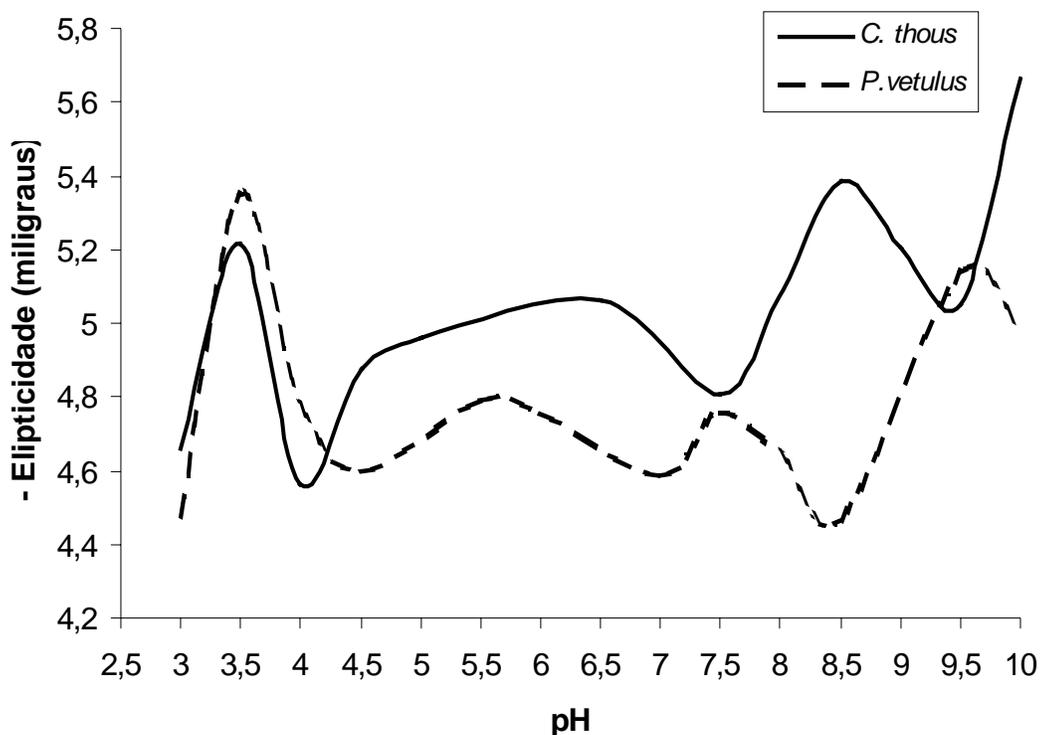


Fig. 35 Variação da elipticidade em 222 nm para as hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*, sob o efeito do pH.

A figura 37 apresenta as curvas de transição térmica na dependência do pH, ajustadas segundo os valores das frações desnaturadas das hemoglobinas. Todas as curvas são características de um modelo de transição de dois estados. A partir dessas curvas, foram obtidas as curvas da variação de energia livre com o aumento da temperatura, para o cálculo dos valores de T_m (figura 38), correspondentes ao ponto central da curva de desnaturação, quando ΔG é igual a zero.

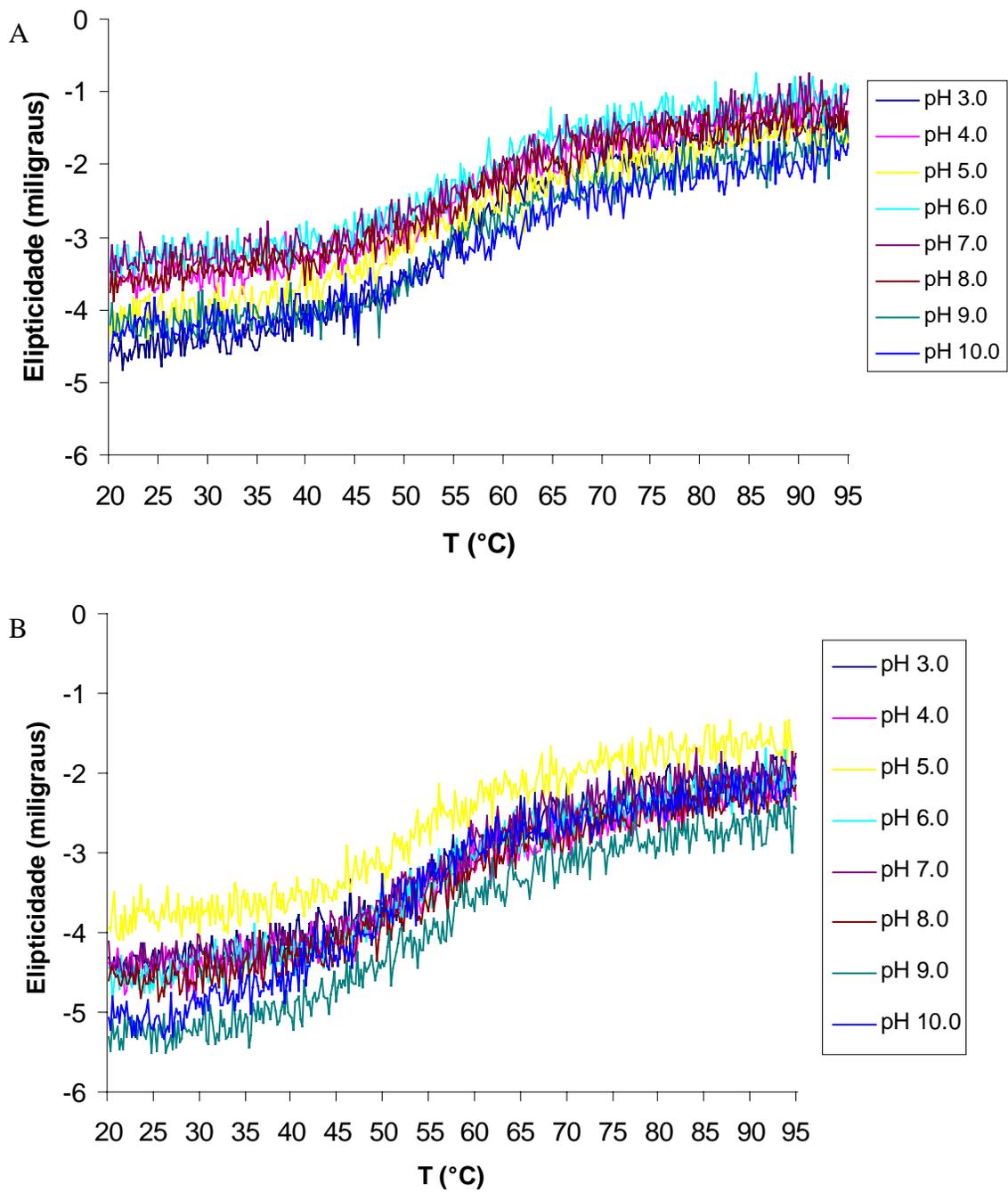


Fig. 36 Curvas de desnaturação térmica para as hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B) sob o efeito do pH variando de 3-10.

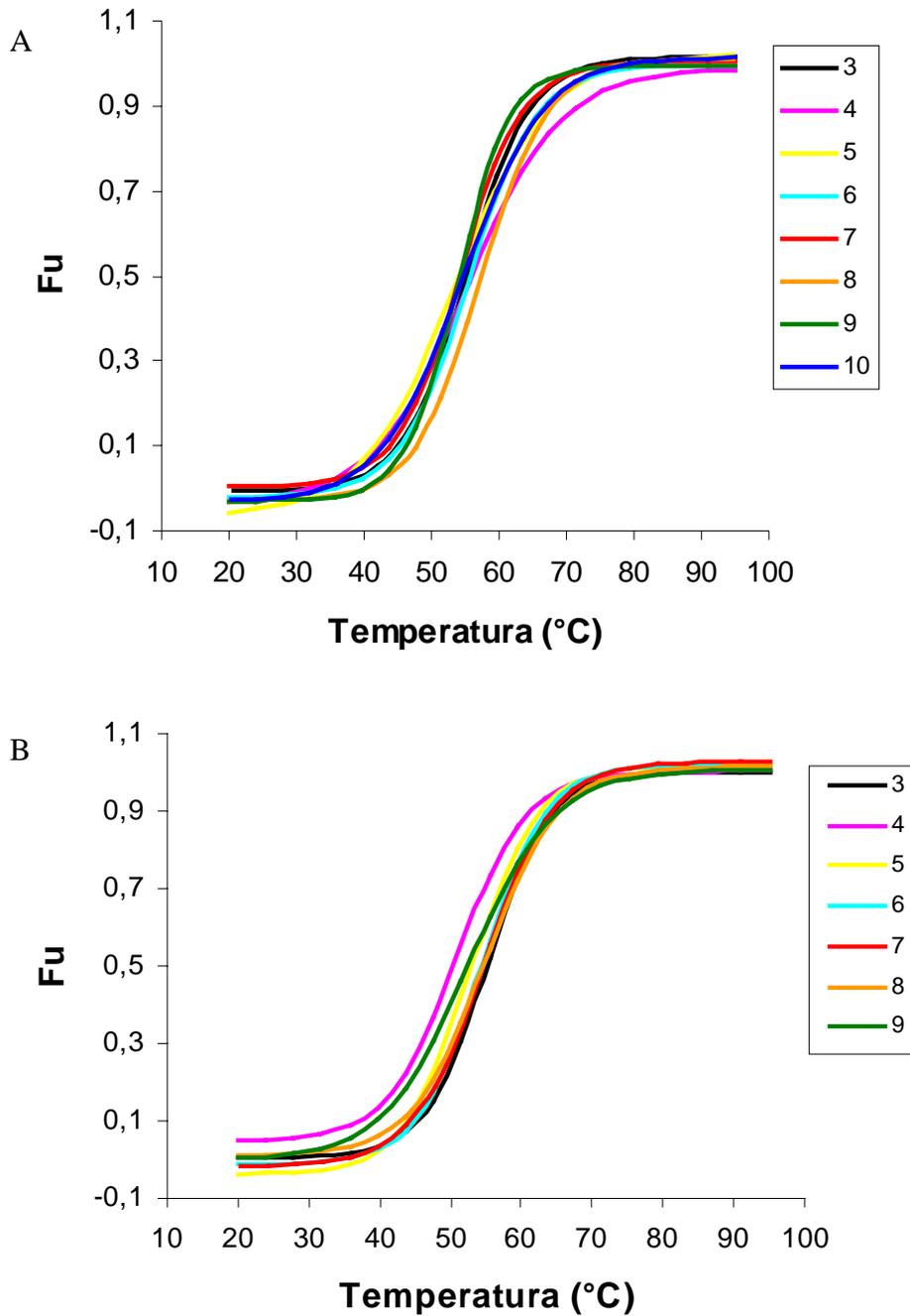


Fig. 37 Fração desnaturada termicamente das hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B), sob o efeito do pH.

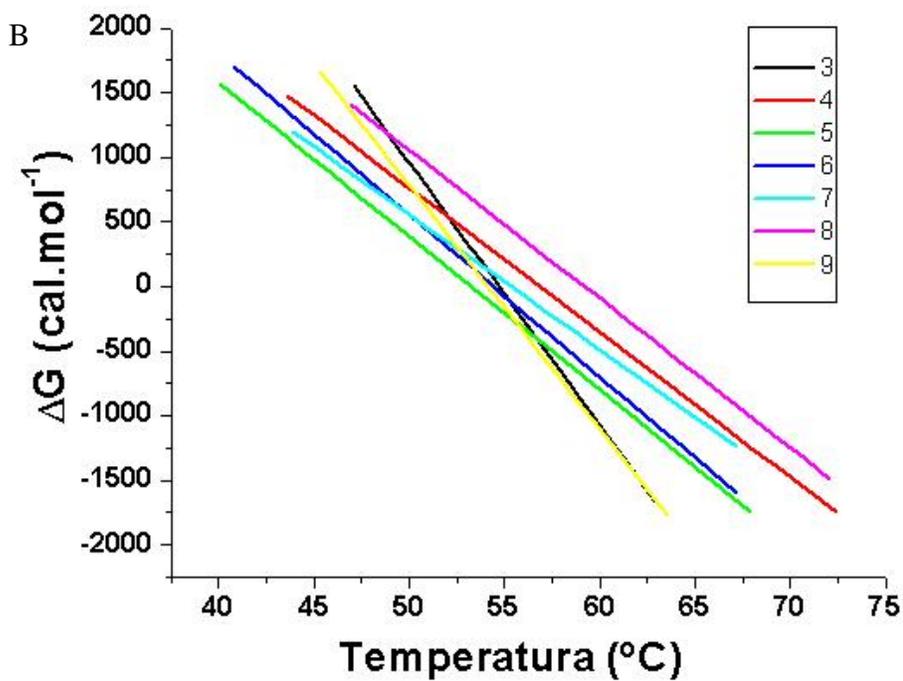
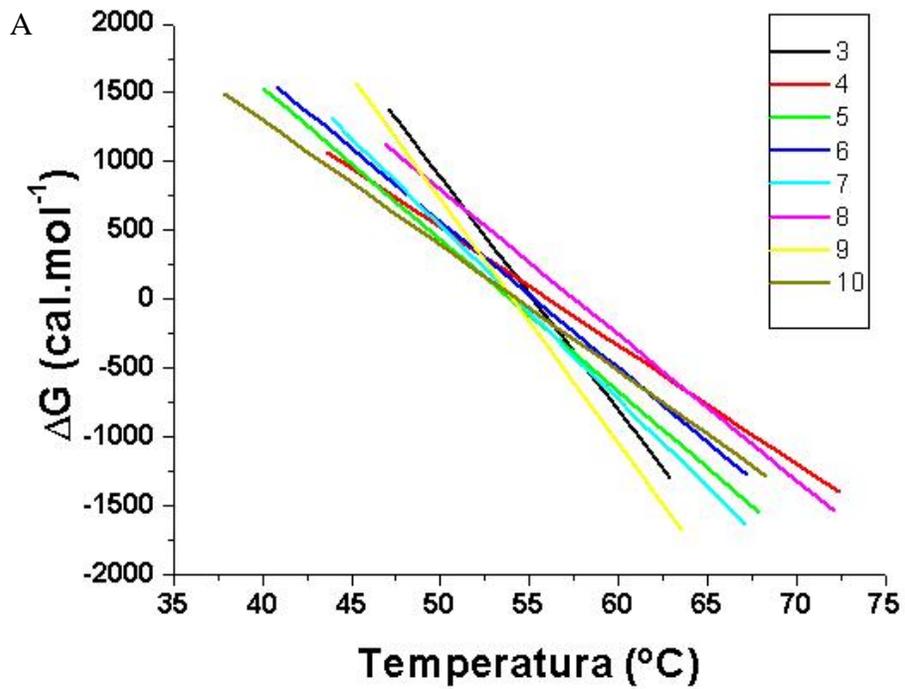


Fig. 38 Variação de energia livre de Gibbs (ΔG) com a temperatura em diferentes pHs para as hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B).

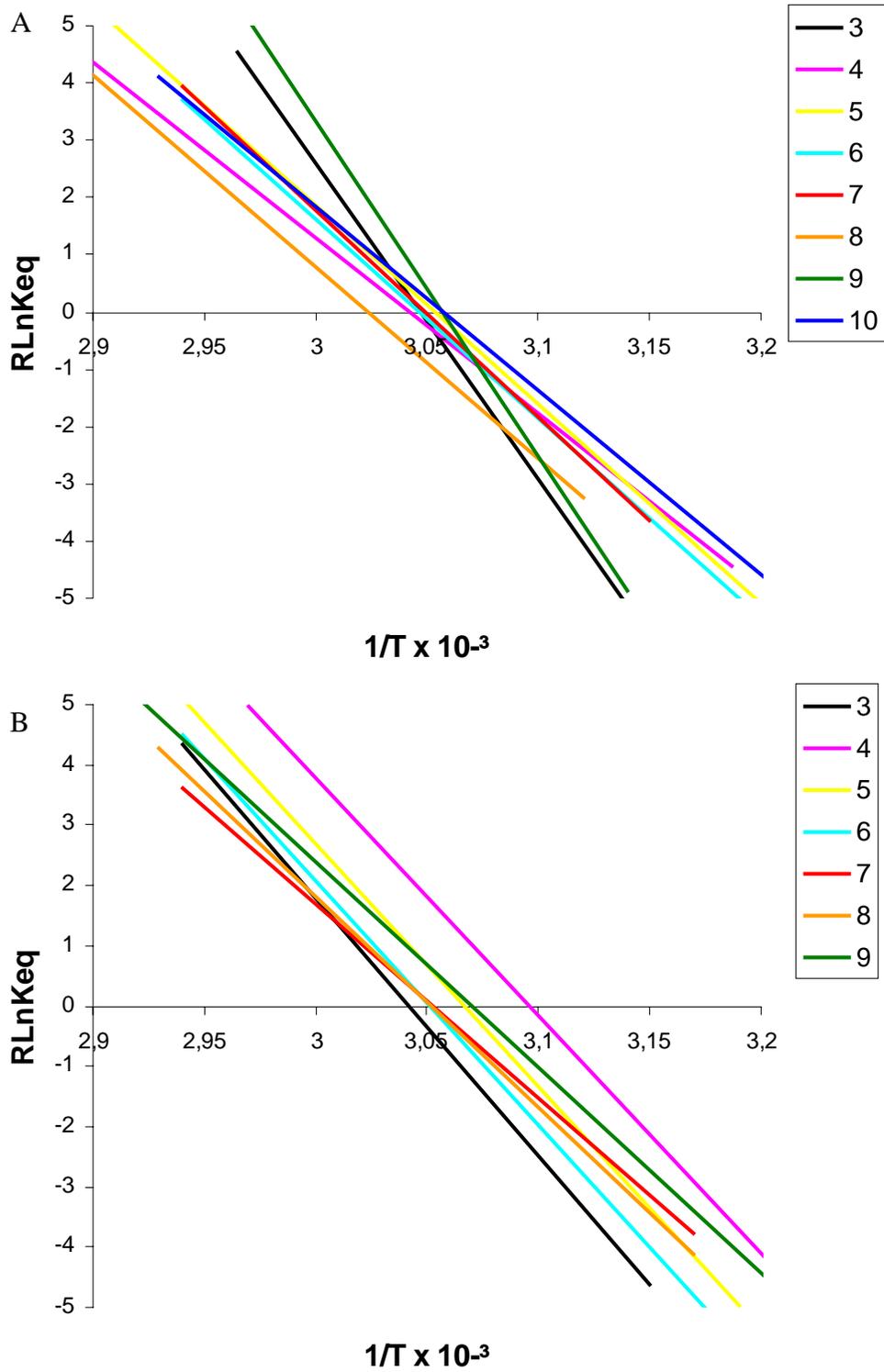


Fig. 39 Gráfico de Van't Hoff para a desnaturação térmica sob o efeito do pH das hemoglobinas de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B).

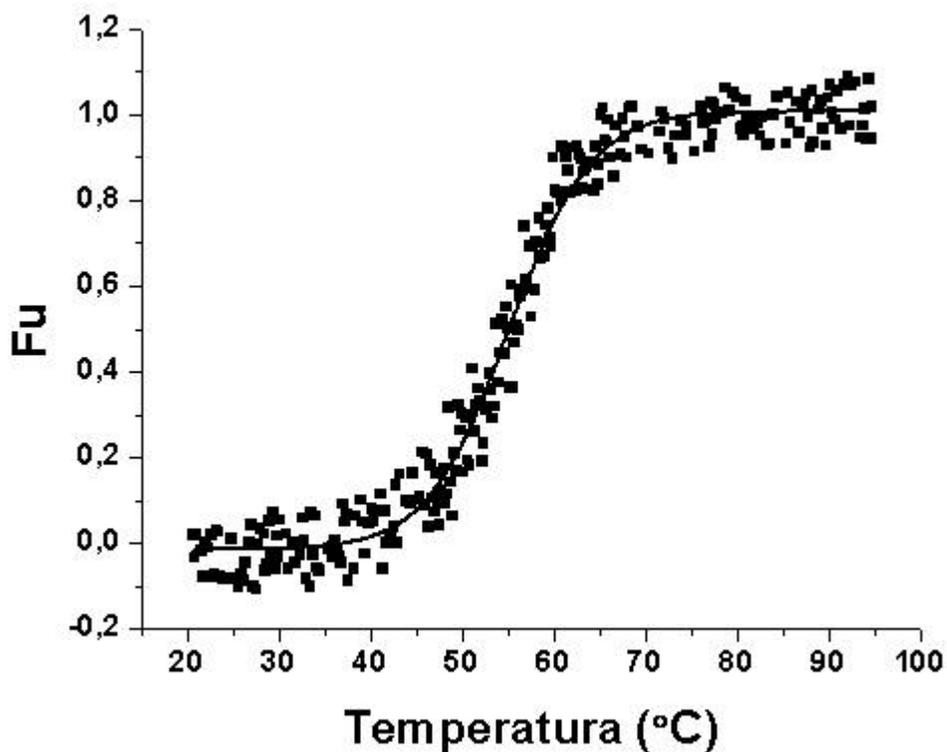


Fig. 40 Fração desnaturada termicamente da hemoglobina de *C. thous* em pH 3,0.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos das curvas de Van't Hoff foram considerados para o cálculo da energia livre de Gibbs a 25°C (ΔG^{25}), que corresponde à estabilidade termodinâmica e estrutural da proteína. Os parâmetros termodinâmicos para cada pH estão apresentados na tabela 6.

As figuras 37, 38 e 39 mostram somente os dados ajustados das sigmóides e retas, respectivamente, uma vez que a quantidade de pontos experimentais é muito grande e dificultaria a visualização destas curvas. Para ilustração desses pontos experimentais, é mostrado na figura 40 apenas uma curva de transição correspondente ao desdobramento da hemoglobina de *C. thous* sob efeito da temperatura e pH 3,0.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de transição térmicas sob o efeito do pH, obtidas para as hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.

			ΔH	ΔS	ΔG^{25}	
	pH	Tm (°C)	(kcal.mol ⁻¹)	(cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	(kcal.mol ⁻¹)	
<i>C. thous</i>	3	55,25	55,64 ± 1,949	169,56 ± 5,95	5,12	
	4	56,11	30,79 ± 0,967	93,67 ± 2,93	2,88	
	5	53,95	34,40 ± 1,612	105,04 ± 4,94	3,10	
	6	55,26	34,96 ± 1,408	106,47 ± 4,31	3,23	
	7	54,27	35,91 ± 1,372	109,52 ± 4,19	3,27	
	8	57,54	32,79 ± 1,304	99,15 ± 3,93	3,24	
	9	54,09	58,27 ± 1,433	178,14 ± 4,38	5,18	
	10	54,28	31,91 ± 1,108	97,6 ± 3,39	2,82	
	<i>P. vetulus</i>	3	55,38	42,07 ± 1,696	127,96 ± 5,18	3,94
		4	50,50	39,16 ± 1,808	121,23 ± 5,59	3,03
5		52,99	40,03 ± 1,816	122,81 ± 5,56	3,44	
6		54,59	40,64 ± 1,802	123,97 ± 5,52	3,69	
7		54,51	32,25 ± 1,716	98,44 ± 5,25	2,91	
8		54,55	34,96 ± 1,474	106,71 ± 4,5	3,16	
	9	52,51	34,05 ± 2,190	104,53 ± 2,83	2,90	

Os valores de Tm foram praticamente os mesmos para todos os pHs analisados, para as duas hemoglobinas. Os valores de ΔH , ΔS e ΔG variaram pouco nos diferentes pHs indicando a dependência parcial do pH na desnaturação térmica das duas hemoglobinas. Com exceção dos pH 3 e 9 para a *C. thous* e pH 7, 8 e 9 para a *P. vetulus*.

A hemoglobina de *C. thous* apresenta maior estabilidade térmica em pH 3 e pH 9 e a hemoglobina de *P. vetulus* apresenta maior estabilidade térmica em pH 3. As curvas de desnaturação térmica para a hemoglobina de *P. vetulus* em pH 10 apresentaram oscilações que não permitiram o ajuste.

O maior valor de ΔG^{25} encontrado para a hemoglobina de *C. thous* foi de 5,18 kcal.mol⁻¹ no pH 9, enquanto que, para a hemoglobina de *P.*

vetulus o maior valor, encontrado no pH 3, foi de 3,94 kcal.mol⁻¹. Esta diferença na estabilidade é decorrente tanto de contribuições entrópicas quanto contribuições entálpicas, considerando-se que os valores de ΔH e ΔS , no processo de desdobraimento, foram aproximadamente 25% maiores para a hemoglobina de *C. thous*.

A diferença entre os valores de energia livre das duas hemoglobinas se deve provavelmente as diferenças nas interações não covalentes intra-cadeia e diferenças na organização estrutural e ambiente molecular correspondente a estas alterações nos diferentes pHs, ou também, diferenças nas interações não covalentes das proteínas com o solvente.

Os valores de energia livre, obtidos a partir dos dados registrados nos espectros de CD foram calculados com base na elipticidade no comprimento de onda de 222 nm, que corresponde a banda dicrónica característica das estruturas em α -hélice. As duas técnicas espectroscópicas, DC e fluorescência, fornecem resultados complementares no acompanhamento de mudanças conformacionais em proteínas, induzidas por ligantes e/ou agentes desnaturantes. O CD, na faixa de comprimento de onda estudada, permite acompanhar as mudanças conformacionais somente no nível das estruturas secundárias. No entanto, o desaparecimento das bandas dicrónicas e a diminuição da elipticidade para próximo de zero, nos vários comprimentos de onda, indicam que a proteína está desnaturada. Em contraste, a técnica de fluorescência permite o acompanhamento de mudanças conformacionais no nível tridimensional, por modificação da intensidade da banda de emissão ou pelo deslocamento desta banda para comprimentos de onda maiores que 320 nm. Essas duas técnicas foram consideradas para análise da estabilidade das hemoglobinas a partir do processo de desnaturação química e térmica, com avaliação da

dissociação de subunidades, quando possível, que precede o desdobramento das proteínas.

No caso da desnaturação térmica acompanhada por CD, os valores da estabilidade foram menores do que aqueles obtidos na desnaturação química. As curvas de desnaturação térmica para as duas hemoglobinas (figura 36) mostram que o sinal dicróico permaneceu entre -1500 e -2000 até o final da transição, na temperatura de 95°C. Isso indica que parte da estrutura poderia estar ainda preservada, o que sugere que o processo de desnaturação, sob essas condições pode não ter ocorrido completamente e que as transições observadas corresponderiam à formação de intermediários relacionados à dissociação e a ruptura de parte das estruturas secundárias. Estes dados são apenas sugestivos e precisam ser confirmados em experimentos que associem outros agentes desnaturantes com a temperatura, além dos pHs analisados. A explicação para este fato pode estar relacionada com a estabilidade conferida às hemoglobinas pela coordenação covalente do ferro com o grupo heme, que não se desfaz com o efeito da temperatura. Por outro lado, as hemoglobinas, sob o efeito combinado da variação do pH e dos agentes desnaturantes químicos, uréia e guanidina, foram completamente desdobradas, o que levou aos maiores valores de ΔG^{25} apresentados nas tabelas 3, 4 e 5. Portanto, os dados dos parâmetros termodinâmicos, com exceção do T_m , obtidos a partir da desnaturação térmica foram considerados principalmente para analisar as diferenças entre as duas hemoglobinas estudadas.

Em proteínas oligoméricas, o processo de desnaturação pode ocorrer em vários estados, sendo que o primeiro corresponde, geralmente, à dissociação das subunidades, mantendo a estrutura dos monômeros. Posteriormente, ocorre a desnaturação com o desdobramento de todas as cadeias que formam o oligômero. Segundo experimentos de Kirschner e Tanford (1964), o processo de dissociação

das subunidades de hemoglobina humana por sais inorgânicos aparentemente é dependente da concentração da proteína, mas é independente dos ligantes do átomo de Ferro do grupo heme (água, oxigênio). No processo de dissociação as interações intra-cadeia que mantém a associação entre os dímeros são desfeitas, mas isso não afeta diretamente o ligante do grupo heme.

Em contraste, Rieder (1970) demonstrou a importância dos ligantes do Ferro do grupo heme na estabilidade da hemoglobina em experimentos de desnaturação de diversos derivados da hemoglobina por uma variedade de agentes. Os ligantes do ferro afetam a ligação do grupo heme a globina, e, conseqüentemente a estabilização da molécula de hemoglobina.

Portanto, dependendo do ligante uma hemoglobina tende a ser mais ou menos susceptível a desnaturação. Mas o processo de dissociação das cadeias, que, apesar de ser parte da desnaturação, não é influenciado diretamente pelo ligante do Ferro do grupo heme.

No processo de desnaturação é preciso romper as interações hidrofóbicas que estabilizam a ligação do grupo heme a globina, além da ligação do Ferro à histidina proximal. Portanto, a estabilidade dessas proteínas está relacionada não só a organização estrutural das subunidades, mas também à organização estrutural do grupo heme e dos ligantes do Ferro. Neste caso, diferenças no ambiente estrutural dos ligantes do átomo de Ferro podem modificar o posicionamento deste átomo em relação ao centro do grupo heme, ocasionando diferenças na planaridade do grupo heme, o que influencia diretamente a força com a qual o grupo heme estará unido à globina.

Embora possa haver diferença de alguns aminoácidos na seqüência das duas hemoglobinas, o processo de dissociação das subunidades e a desnaturação sob o efeito do pH são pouco influenciados. Isso pode ser justificado pela proximidade filogenética das

espécies estudadas. As faixas de pH em que ocorre a dissociação das subunidades, a desnaturação e onde as hemoglobinas apresentaram maior estabilidade são semelhantes, embora o comportamento das hemoglobinas seja diferente: a hemoglobina de *C. thous* tende a ser mais estável em pH ácido e a hemoglobina de *P. vetulus* tende a ser mais estável em pH básico.

Na Tabela 7 estão listados os valores de Tm determinados para hemoglobinas de diversas espécies: da metahemoglobina eqüina em pH 7,0 por Cho e Choy (1979), da hemoglobina humana em pH 7,0 por Reza e colaboradores (2002), da hemoglobina e metahemoglobina humana em pH 6,5 por Michnik e colaboradores (2005), além dos valores calculados nesse trabalho para as hemoglobinas de *C. thous* e *P.vetulus*.

Tabela 7. Tm de hemoglobinas de diferentes espécies e calculados a partir das curvas de transição térmicas sob o efeito do pH, para as hemoglobinas de *C. thous* e *P.vetulus*.

	pH	Tm (°C)
MetaHb eqüina		68,5
OxiHb Humana	7,0	70,3
<i>C. thous</i>		54,3
<i>P. vetulus</i>		54,5
OxiHb Humana	6,5	71,0
MetaHb Humana		62,0

As hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus* apresentam valores de Tm menores em mais de 10°C quando comparados com hemoglobinas humanas ou eqüinas. Além das diferenças na seqüência das hemoglobinas, há a influência do estado de oxidação do Ferro. Como mostrado na tabela 7, há uma diferença de mais de 10°C entre os

valores de T_m da oxihemoglobina e da metahemoglobina humana. Apesar do valor de T_m ser menor, esse não é um bom indicador da estabilidade de uma proteína.

De forma generalizada, diversas forças intermoleculares são responsáveis pela estabilidade de proteínas. No caso específico das hemoglobinas, alguns trabalhos tem sido reportados mostrando a relação da estabilidade dessas proteínas com o empacotamento das hélices e a organização estrutural do grupo heme. Lecomte e colaboradores (2005), em um estudo evolutivo da família das globinas, atribuem como principal determinante da estabilidade das hemoglobinas as interações não covalentes no empacotamento das hélices e entre as hélices e o grupo heme. Perutz (1978), em um estudo teórico sobre interações eletrostáticas, sugeriu que essas interações são responsáveis por boa parte das características estruturais das proteínas e, quando as cadeias polipeptídicas dobram, os resíduos polares tendem a se organizar no exterior, onde podem ser solvatados. Borgese e colaboradores (1982), em estudos com hemoglobinas de peixes da Antártida, que apresentam termoestabilidade menor que a de peixes de mais alta latitude, sugerem que as interações hidrofóbicas são importantes e podem ter um papel principal em determinar a estabilidade de moléculas de hemoglobina.

Considerando os dados acima referenciados, sobre as forças responsáveis pela estabilidade de proteínas e a estrutura da hemoglobina de *C. thous*, resolvida e apresentada nesta presente dissertação, uma análise estrutural comparativa entre as hemoglobinas foi realizada, com o objetivo de determinar quais resíduos ou interações moleculares que podem estar relacionadas com a estabilidade da hemoglobina de *C. thous*. Estes dados estão apresentados no tópico 4.7 da análise da estrutura tridimensional vs estabilidade conformacional.

4.6.3 Efeito do CTAB

O CTAB é um surfactante catiônico que apresenta a parte hidrofílica carregada positivamente. Quando adicionado em solução, os surfactantes migram para a interface diminuindo a tensão superficial da solução quando comparada com a tensão superficial do solvente puro (Tanford, 1980). Em baixas concentrações na água, os surfactantes apresentam-se na forma monomérica dispersos e com pouco ou nenhum contato entre si na solução. Quando a concentração do surfactante em solução aquosa ultrapassa um limite característico, denominado concentração micelar crítica (cmc), a parte hidrofóbica destes monômeros passa a fazer contato entre si formando um núcleo micelar e a parte hidrofílica forma uma estrutura como uma concha que fica em contato com o ambiente aquoso, mantendo a parte hidrofóbica isolada da solução.

Surfactantes podem induzir a formação de micelas em concentrações mais altas. A introdução de moléculas de surfactante na solução requer uma organização local das moléculas de água que envolvem a cauda de hidrocarboneto. Entretanto, na formação de micelas ou agregados, que é um processo espontâneo, as interações desfavoráveis da água com o hidrocarboneto são minimizadas e a entropia do sistema aumenta. O processo de micelização é um processo espontâneo cooperativo que ocorre em uma faixa de concentração, acima da concentração crítica de micela (Tanford, 1980).

Surfactantes são muito utilizados no estudo de estrutura e estabilização de proteínas. As proteínas e surfactantes iônicos têm grupos carregados e porções hidrofóbicas, por isso as interações entre

surfactantes e proteínas são complexas, envolvendo diferentes tipos de forças intermoleculares (Tofani e colaboradores, 2004).

Os surfactantes podem causar diversos efeitos, dentre eles a desnaturação da proteína e podem induzir a formação e estabilização de α -hélice em concentrações pouco abaixo da concentração crítica de formação de micela (Sjörger e colaboradores, 2005). No caso da hemoglobina, os surfactantes podem ainda aumentar o efeito de auto-oxidação dessas proteínas (Ajloo e colaboradores, 2002 B).

A desnaturação de proteínas pelos surfactantes catiônicos ocorre devido a ligação da região carregada (cabeça polar) desses surfactantes com cargas opostas na superfície da proteína, seguido por um desdobramento e exposição do interior hidrofóbico e interação da parte apolar do surfactante nestas regiões da proteína.

Devido ao tipo de interação e o processo de desnaturação causado pelos surfactantes, pode-se inferir que não apenas a região hidrofóbica próxima ao grupo heme, mas também outras regiões hidrofóbicas nas hemoglobinas podem sofrer mudanças conformacionais pela interação com surfactantes (Nakaya *et al*, 1971).

A figura 41 mostra as curvas dicróicas das hemoglobinas estudadas, na presença de CTAB. A adição de CTAB causou alteração na elipiticidade, com aumentos e diminuições de regiões distintas nas bandas dicróicas nos espectros apresentados, dependentes da concentração desse agente. O aspecto dos espectros dicróicos para as duas hemoglobinas indica que o CTAB interage com essas proteínas de forma diferenciada. Para a hemoglobina de *C. thous* (figura 40 A), o CTAB na concentração de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM (concentração igual a cmc) causou um aumento nas elipiticidades e nas banda dicróicas correspondentes às estruturas secundárias do tipo α -hélices. Na concentração de 5 mM ocorreu uma pequena variação da banda dicróica abaixo de 210 nm. Estes espectros indicam que houve um aumento na

quantidade de α -hélices por indução do CTAB até a concentração 1 mM e redução dessas estruturas em 5 mM, indicado pela alteração da banda dicróica de 208 e 205 nm.

Na hemoglobina de *P. vetulus* (figura 41 B) houve um aumento da banda dicróica na concentração de CTAB de 0,1 mM e 0,5 mM. Isso indica que houve um aumento na quantidade de α -hélices presentes por indução do CTAB. Mas, com o aumento da concentração para 1 mM, igual a cmc, e 5 mM, os valores das elipticidades retornaram ao valores correspondentes ao CTAB na concentração de 0,1 mM. Isso indica que o aumento da concentração do CTAB não estabilizou as α -hélices formadas. Esses dados estão de acordo com resultados obtidos para α -globulina (Prakash e Nandi 1982). Estes autores observaram que tanto o CTAB como o sódio dodecil sulfato (SDS), este último com maior intensidade, quando em baixas concentrações induzem um aumento na quantidade de α -hélice de α -globulina. E que essa indução na estrutura secundária é reduzida em concentrações mais altas de surfactante.

Embora os espectros indiquem o aumento na quantidade de α -hélices, esses dados não são representativos para definir se a estabilidade das regiões de α -hélices foi mantida. Pode ocorrer a desnaturação da proteína e formação de novas hélices com desestruturação das hélices da estrutura nativa e formação de um padrão de estrutura secundária completamente novo.

Meyer e Kauzmann (1962), em um estudo de interação de SDS com várias proteínas, mostraram que o surfactante não foi capaz de desestruturar as α -hélices das proteínas e que o SDS pode resultar na formação de novas regiões de hélice que não estão presentes na conformação nativa da proteína.

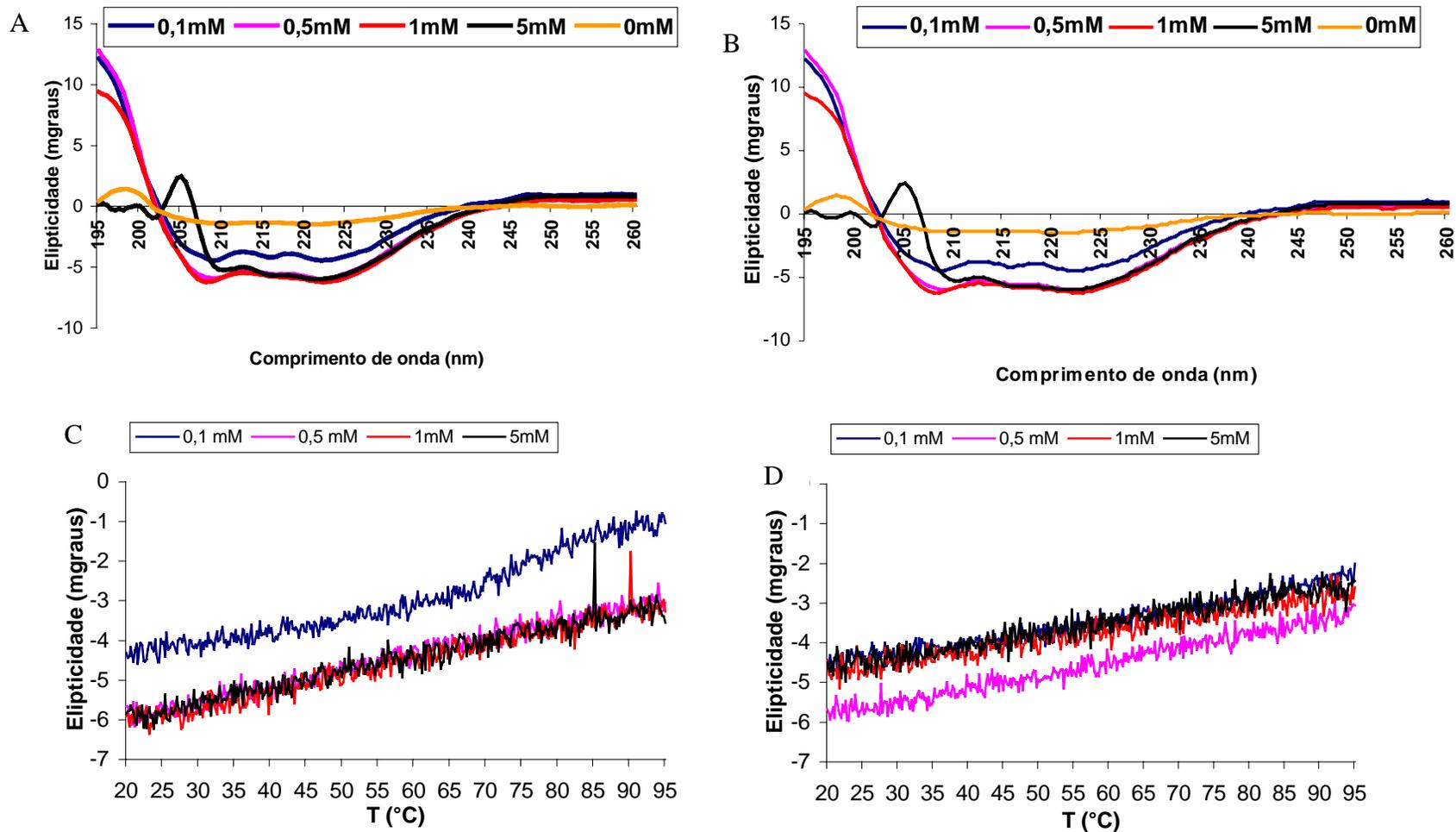


Fig. 41 Efeito da adição de brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) na estrutura secundária da hemoglobina de *C. thous* (A) e *P. vetulus* (B) e na desnaturação térmica de *C. thous* (C) e *P. vetulus* (D).

Na tabela 8 estão apresentados os valores da elipticidade nas regiões características de α -hélice obtidos de acordo com a concentração de CTAB.

Tabela 8. Valores da elipticidade a 208 nm e 222 nm sob o efeito de CTAB para as hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*.

		Elipticidade (miligraus)				
		0 M	0,1 mM	0,5 mM	1mM	5mM
<i>C. thous</i>	208nm	-1,35	-4,29	-5,83	-6,19	-3,74
	222nm	-1,45	-4,43	-6,01	-6,19	-5,97
<i>P. vetulus</i>	208nm	-4,39	-5,04	-6,63	-5,43	-4,93
	222nm	-4,58	-4,58	-4,63	-5,95	-4,80

Estes dados indicam que as concentrações críticas para o aumento de estruturas em hélice para *C. thous* e *P. vetulus* foram de 0,5 e 1 mM, respectivamente. Nessas concentrações, o CTAB provavelmente forma as micelas internalizando e estabilizando as proteínas que passam a interagir preferencialmente com elas mesmas mantendo a camada de água que corresponde ao processo conhecido como hidratação preferencial. A adição de CTAB ocasionou um maior aumento da elipticidade nas regiões de α -hélice na hemoglobina de *C. thous* do que na hemoglobina de *P. vetulus*.

No fenômeno de hidratação preferencial a proteína ligar-se à água e não ao agente, que é então excluído da esfera de hidratação mais próxima à superfície da proteína, segundo um efeito que é denominado de solvofóbico (Timashef e Arakawa, 1989).

As curvas de desnaturação térmica na presença do surfactante estão apresentadas nas figuras 41 C e D. Essas curvas mostram que, para as duas hemoglobinas, a desnaturação térmica, nas concentrações de surfactante indicadas, não ocorreu. Porém, a curva para a hemoglobina de *C. thous* na concentração de 0,1 mM de CTAB, mostra

uma pequena faixa de transição, não muito precisa, para o estado desdobrado (curva em azul). Esse dado sugere que a desnaturação térmica é dependente da concentração do surfactante e que nas concentrações de 0,5 e 1 mM, o CTAB atua como um estabilizador da estrutura da hemoglobina. Os monômeros de CTAB provavelmente se associam na forma de micelas e discriminam as moléculas de hemoglobinas do solvente tornando-as mais estáveis e resistente a desnaturação.

A estabilização ou desestabilização são conseqüências particulares de um fenômeno termodinâmico: a ligação preferencial dos componentes do solvente (água + agente) pela proteína. Agentes com comportamento solvofóbicos como glicerol, polietilenoglicol, podem estabilizar ou desestabilizar proteínas de acordo com a concentração e as condições do solvente (Timasheff, 1998). A ação desse agente é definida pelo balanço entre a afinidade da proteína pela água e a afinidade da proteína pelo agente em particular. Desta forma, o parâmetro de interação preferencial pelo solvente pode ser positivo, negativo, ou zero, dependendo se a interação entre a proteína e o solvente é desfavorável, favorável, ou indiferente, respectivamente (Timasheff, 1993).

Comparando-se estes gráficos àqueles apresentados na figura 33, onde o processo de desnaturação térmica, na ausência de surfactantes, é evidente, fica claro que os padrões de desnaturação térmica foram alterados na presença do surfactante, e que o CTAB pode estar influenciando na estabilização da proteína, nas concentrações citadas.

Na figura 42 é mostrada a curva de transição térmica ajustada segundo os valores das frações desnaturadas da hemoglobina de *C. thous* na concentração de 0,1 mM CTAB. A partir desses dados apresentados foi obtida a curva da variação de energia livre com o aumento da temperatura (figura 43).

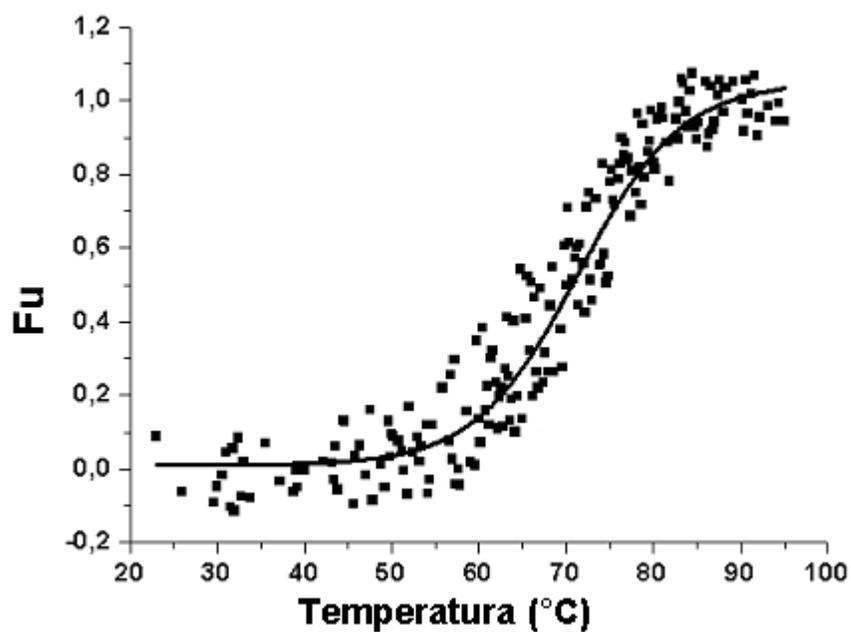


Fig. 42 Fração desnaturada termicamente da hemoglobina de *C. thous*, na presença de CTAB 0,1 mM.

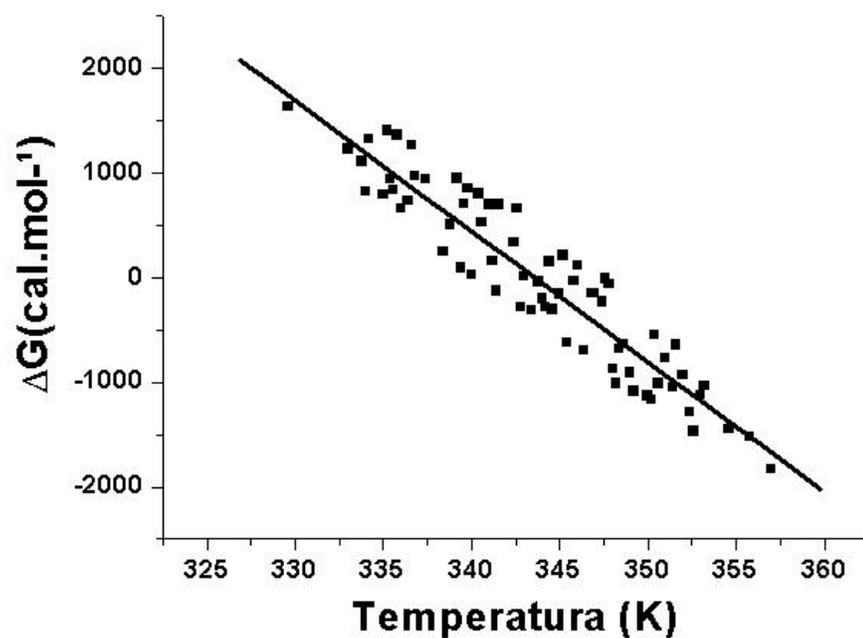


Fig. 43 Variação de energia livre de Gibbs (ΔG) com aumento da temperatura para a hemoglobina de *C. thous* na presença de CTAB 0,1 mM.

O gráfico de variação da energia livre nos permitiu calcular a temperatura de transição T_m correspondente ao ponto central da curva de desnaturação, quando ΔG é igual a zero, que foi equivalente a 70,53°C. Este valor foi maior do que o de 54,27°C (Tabela 6), encontrado sem o CTAB e indica que o CTAB, nesta concentração é um agente estabilizante da estrutura da hemoglobina.

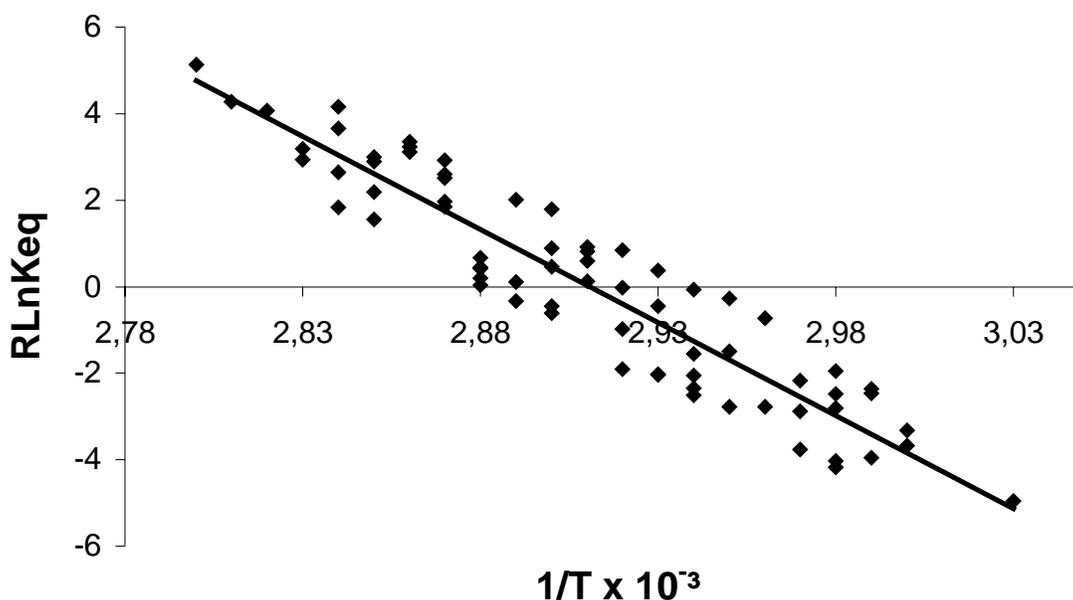


Fig. 44 Gráfico de van't Hoff para a desnaturação da hemoglobina de *C. thous* na presença de CTAB 0,1 mM.

O efeito dos surfactantes na desnaturação de proteínas depende da concentração do surfactante, da concentração e da natureza da proteína (Moosavi-Movahedi, 2005).

A partir do gráfico de van't Hoff, mostrado na figura 44, foram obtidos os valores de $\Delta H = 43,13 \pm 1,890 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S = 125,52 \pm 5,5 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. O valor da estabilidade correspondente ao ΔG^{25} foi de $5,72 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

A análise desses dados, comparando-os com aqueles obtidos para a hemoglobina sob o efeito do pH (figura 37, pH 7 ΔG^{25} 3,27 kcal.mol⁻¹), permite concluir que o efeito de estabilização do CTAB foi com contribuição entrópica e entálpica ($\Delta H = 35,91 \pm 1,372$ kcal.mol⁻¹ e $\Delta S = 109,52 \pm 4,19$ cal.mol⁻¹.K⁻¹ na ausência de CTAB), proveniente da redução da camada de solvatação da proteína com delimitação do solvente e o CTAB e da organização das proteínas por interações não covalentes entre cadeias, respectivamente.

4.7. Análise da estrutura tridimensional vs estabilidade estrutural

Uma análise estrutural comparativa entre as hemoglobinas de *C. thous* (HbCt) e hemoglobina humana (PDB ID: 1HHO) e entre as hemoglobinas de *C. thous* e hemoglobina eqüina (PDB ID: 1NS9 Robinson e colaboradores, 2003) foi realizada com o objetivo de determinar quais resíduos ou interações moleculares podem estar relacionadas com a estabilidade da hemoglobina de *C. thous*. No tópico '4.4 Análise do modelo', já foram realizadas as análises das substituições em relação a estrutura tridimensional.

No PDB encontram-se disponíveis atualmente 381 estruturas de variantes de hemoglobinas diversas, mas apenas essas duas hemoglobinas foram escolhidas para esse modelo de estudo devido à ausência de dados relativos à estabilidade das outras hemoglobinas na literatura.

Na figura 45 está apresentado o alinhamento das seqüências da hemoglobina humana e da hemoglobina de *C. thous*. As cadeias α apresentam 83,7% de identidade, e 24 substituições de um total de 141 resíduos. As cadeias β são mais conservadas: apresentam 89,7% de identidade, e 14 substituições em 146 resíduos.

Dentre essas substituições, seis localizadas na cadeia α nas posições 10, 17, 19, 26, 57 e 73 e quatro localizadas na cadeia β nas posições 12, 13, 33 e 104 não resultaram em mudanças significativas no arranjo das interações no ambiente molecular das mesmas, que pudessem estar relacionadas com a estabilidade da proteína.

Nas tabelas 9 e 10 estão apresentadas as substituições que foram consideradas significativas e a alteração observada nas cadeias α e β , respectivamente.

De um total de 28 substituições, comparando a hemoglobina humana com a hemoglobina de *C. thous*, a maioria delas foram observadas nas regiões de superfície que interagem com o solvente, de um resíduo apolar por um resíduo polar, favorecendo a interação com o solvente. Essas substituições podem levar a um aumento nas interações intra-cadeia da hemoglobina de *C. thous* tendendo a aumentar a estabilidade da molécula quando comparada com a hemoglobina humana. A figura 47 mostra um exemplo dessas substituições. As substituições foram classificadas como positivas, negativas ou neutras, dependendo da alteração que podem influenciar na estabilidade da hemoglobina. Uma substituição positiva é aquela que pode ter como consequência o aumento da estabilidade. Uma substituição negativa pode ocasionar a perda de interações que podem levar a diminuição da estabilidade. E uma substituição neutra é uma substituição em que a diferença estrutural pode não levar a alteração na estabilidade.

Quatro substituições foram classificadas como negativas pela perda de contatos ou de par iônico, e também pela substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar em regiões de núcleo hidrofóbico. A perda dessas interações na hemoglobina de *C. thous* tende a desestabilizar a estrutura. A perda dos pares iônicos e de interações hidrofóbicas tem uma influência direta na termoestabilidade, podendo diminuir a estabilidade térmica da hemoglobina de *C. thous* quando comparada com a hemoglobina humana.

Uma substituição foi classificada como neutra, pois não tem alteração de contatos e apenas ocasiona uma diferença na estrutura secundária.

De forma geral, das 28 substituições consideradas significativas, 23 foram consideradas positivas por aumentar o número de contatos intra ou inter cadeias, que podem aumentar a estabilidade da molécula.

```

1HHOA      VLSPADKTNV KAAWGKVGAAH AGEYGAEALE RMFLSFPTTK TYFPHFDSLH
CTHOUSA    VLSPADKTNI KSTWDKIGGH AGDYGGEALD RTFQSFPTTK TYFPHFDSLSP
*****: *:.*.*:*. * **:*.*:**: * * ***** *****

1HHOA      GSAQVKGHGK KVADALTNAV AHVDDMPNAL SALSDLHAHK LRVDPVNFKL
CTHOUSA    GSAQVKAHGK KVADALTNAV AHLDDLPGAL SALSDLHAYK LRVDPVNFKL
*****.******.* ** **:*:*.* ** *****:* *****

1HHOA      LSHCLLVTLA AHLPAEFTPA VHASLKDFLA SVSTVLTSKY R 141
CTHOUSA    LSHCLLVTLA CHHPTEFTPA VHASLKDFFT AVSTVLTSKY R 141
*****.* *:*:***** *****: :***** *

HHOB       VHLTPEEKSA VTALWGKVNV DEVGGEALGR LLVVYPWTQR FFESFGDLST
CTHOUSB    VHLTAEKSL VSGLWGKVNV DEVGGEALGR LLIVYPWTQR FFDSFGDLST
****.* ** *:.***** ***** **:*:***** **:*:*****

HHOB       PDAVMGNPKV KAHGKKVLGA FSDGLAHLDN LKGTfATLSE LHCDKLHVDP
CTHOUSB    PDAVMSNAKV KAHGKKVLNS FSDGLKNLDN LKGTfAKLSE LHCDKLHVDP
*****.*.* ** *****.*: ***** :*** *****.* ** *****

HHOB       ENFRLLG NVL VCVLAAHFGK EFTPPVQAAY QKVVAGVANA LAHKYH
CTHOUSB    ENFKLLGNVL VCVLAAHFGK EFTPQVQAAY QKVVAGVANA LAHKYH
***:*:***** ***** ***** ***** ***** *****

```

Fig. 45 Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina humana (HHO). Os resíduos de aminoácidos idênticos são representadas por "*", as substituições conservativas são representadas por ":" e as substituições semi-conservativas são representadas por ".".

Tabela 9. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação a hemoglobina humana.

N° resíduo	Humana	<i>C. thous</i>	Classificação	Alteração observada
12	Ala	Ser	Positiva	Cadeia lateral faz 3 contatos polares a mais com a cadeia principal e a carbonila faz mais um contato polar com o solvente. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo carregado na superfície na HbCt.
13	Ala	Thr	Positiva	Cadeia lateral faz 1 contato polar a mais com a cadeia principal. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo carregado na superfície na HbCt.
15	Gly	Asp	Positiva	Cadeia lateral passa a fazer mais 2 contatos polares com o solvente. Carbonila faz mais um contato polar com o solvente na HbCt.
23	Glu	Asp	Positiva	Aumento de 4 para 7 contatos polares: um da carbonila com o solvente e com o N do Glu27. Cadeia lateral faz mais um contato polar com o solvente na HbCt.
30	Glu	Asp	Positiva	Cadeia lateral faz mais 2 contatos polares com o solvente na HbCt.
32	Met	Thr	Positiva	Por ser uma região hidrofóbica e estabilizadora do grupo heme, a substituição deveria ser desfavorável, mas a cadeia lateral faz contato polar com a carbonila da Ala28, estabilizando a substituição na HbCt.
34	Leu	Gln	Positiva	Cadeia lateral faz mais 2 contatos polares com o solvente, a carbonila mais um contato polar com o solvente. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo carregado na superfície na HbCt.

50	His	Pro	Negativa	A substituição causa perda de 2 contatos polares da cadeia lateral com o solvente e do par iônico da His50 com a cadeia lateral do Asp74.
68	Asn	Thr	Positiva	Cadeia lateral faz mais 2 contatos polares com o solvente na HbCt.
76	Met	Leu	Positiva	Região hidrofóbica próxima ao grupo heme. Há substituição por um resíduo apolar.
78	Asn	Gly	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.
89	His	Tyr	Negativa	Região de superfície. A substituição causa a perda do par iônico da His89 com o Asp85 na HbCt.
111	Ala	Cys	Positiva	Cadeia lateral da cisteína posicionada para o interior da molécula. Há a substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar na região de superfície na HbCt.
113	Leu	His	Positiva	Região de núcleo hidrofóbico. A substituição melhora as interações de empacotamento e ressonância com a Hist112. A cadeia lateral realiza contato polar com o N da Hist112 e com a Tyr24 na HbCt.
115	Ala	Thr	Positiva	Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo carregado na superfície.
129	Leu	Fen	Positiva	Substituição realizada em um núcleo hidrofóbico próximo ao grupo heme.
130	Ala	Thr	Positiva	Alanina está melhor posicionada na hemoglobina humana, próxima ao núcleo hidrofóbico, mas na substituição a Treonina está com a cadeia lateral voltada para região hidrofílica e muito hidratada na HbCt.
131	Ser	Ala	Negativa	Região de superfície. Substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.

Tabela 10. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia β da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação a hemoglobina humana.

N° resíduo	Humana	<i>C. thous</i>	Classificação	Alteração observada
5	Pro	Ala	Neutra	A hélice da cadeia beta começa a partir do resíduo 4 na humana e 5 na HbCt.
43	Glu	Asp	Positiva	A substituição ocasiona a formação de par iônico com a Arg92 da cadeia alfa1 na HbCt.
56	Gli	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
58	Pro	Ala	Positiva	A substituição dos resíduos 56 e 58 ocasiona a quebra da hélice. Na HbCt há uma região de "loop" no resíduo 57.
69	Gli	Asn	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
70	Ser	Ala	Positiva	Região hidrofóbica próxima ao grupo heme. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.
76	Ala	Lys	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
77	His	Asn	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
87	Thr	Lys	Positiva	A substituição ocasiona a formação de par iônico com o Glu90 intracadeia na HbCt. (Figura 47)
125	Pro	Gln	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.

Na figura 46 está apresentado o alinhamento das seqüências da hemoglobina eqüina e da hemoglobina de *C. thous*. As cadeias α apresentam 81,6% de identidade e 26 substituições de um total de 141 resíduos. Neste caso, as cadeias β são menos conservadas: apresentam 79,4% de identidade e 30 substituições em 146 resíduos.

As 10 substituições na cadeia α nas posições 10, 17, 23, 26, 30, 63, 71, 85, 116 e 130 e na cadeia β 14 substituições nas posições 4, 5, 10, 13, 21, 33, 50, 69, 73, 75, 104, 121, 125 e 126 não levaram à mudanças que possa estar relacionadas com a estabilidade estrutural da proteína, devido ao tipo da substituição observado no alinhamento estrutural, como a consequência dessa substituição observada na estrutura tridimensional. Nas tabelas 11 e 12 estão apresentadas as substituições que foram consideradas significativas e a alteração observada nas cadeias α e β , respectivamente.

Embora haja semelhança das substituições da hemoglobina eqüina comparada com a hemoglobina de *C. thous* o efeito observado foi bem diferente do observado para a hemoglobina humana. Em relação à seqüência, a hemoglobina de *C. thous* está mais próxima da hemoglobina humana do que da hemoglobina eqüina.

De um total de 30 substituições significativas, 16 são consideradas substituições positivas, 5 neutras e 11 negativas.

O número de substituições negativas foi maior do que quando a hemoglobina de *C. thous* foi comparada com a hemoglobina humana. Portanto, não é possível concluir, a partir dessas diferenças e as mudanças nas estruturas, qual das duas hemoglobinas seria mais estável.

Na cadeia α foram observadas 9 substituições positivas, 3 substituições neutras e 4 substituições negativas. Na cadeia β foram observadas 7 substituições positivas, 7 substituições negativas e 2

substituições neutras. As substituições na cadeia β provocaram alterações estruturais mais evidentes.

As substituições positivas foram definidas da mesma forma como foi definido para a comparação com a hemoglobina humana, da substituição de resíduos polares na superfície. As substituições negativas são caracterizadas pela perda de pares iônicos, pela substituição de resíduos apolares por resíduos polares em regiões hidrofóbicas, mas, em especial, pela perda do efeito de ressonância no empacotamento de resíduos de aminoácidos com anel aromático, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Na figura 48 é mostrado um exemplo desse tipo de substituição.

Comparando-se os dados obtidos com os ensaios de termoestabilidade, o valor obtido de T_m para a metahemoglobina eqüina foi de $68,5^\circ\text{C}$, maior que o valor obtido para a hemoglobina de *C. thous* de $54,3^\circ\text{C}$ no mesmo pH. Essa diferença pode ser explicada, em parte, pelo efeito de ressonância dos aminoácidos aromáticos existente na hemoglobina eqüina e ausente na hemoglobina de *C. thous*. Mas, como não estão disponíveis na literatura parâmetros de estabilidade da hemoglobina eqüina, como o ΔG^{25} é difícil fazer uma análise mais precisa desses dados.

```

NS9A      VLSAADKTNV  KAAWSKVGGH  AGEYGAEALE  RMFLGFPTTK  TYFPHFDLSH
CTHOUSA   VLSPADKTNI  KSTWDKIGGH  AGDYGGEALD  RTFQSFPTTK  TYFPHFDLSP
***.*****: *:.*.*:*** **:**.***: * * .***** *****

NS9A      GSAQVKAHGK  KVGDALTLAV  GHLDDLPGAL  SDLSNLHAHK  LRVDPVNFKL
CTHOUSA   GSAQVKAHGK  KVADALTTAV  AHLDDLPGAL  SALSDLHAYK  LRVDPVNFKL
***** ** .**** ** .***** * **:***:* *****

NS9A      LSHCLLSTLA  VHLPNDFTPA  VHASLKDFLS  SVSTVLTSKY  R
CTHOUSA   LSHCLLVTLA  CHHPTEFTPA  VHASLKDFFT  AVSTVLTSKY  R
***** ** * * .:**** *****: :***** *

NS9B      VQLSGEEKAA  VLALWDKVNE  EEVGGEALGR  LLVYYPWTQR  FFDSFGDLSN
CTHOUSB   VHLTAEKSL  VSGLWAKVNV  DEVGGEALGR  LLIVYPWTQR  FFDSFGDLST
*:.*.***: * .** ** :***** **:***** *****.

NS9B      PGAVMGNPKV  KAHGKKVLHS  FGEGVHHLDN  LKGTFAALSE  LHCDKLHVDP
CTHOUSB   PDSVMSNAKV  KAHGKKVLNS  FSDGLKNLDN  LKGTFAKLSE  LHCDKLHVDP
*.:**.*.** *****:* *.:*::*** ***** ** *****

NS9B      ENFRLLGNVL  VVVLARHFGK  DFTPELQASY  QKVVAGVANA  LAHKYH
CTHOUSB   ENFKLLGNVL  VCVLAHFFGK  EFTPQVQAAY  QKVVAGVANA  LAHKYH
***:***** * **:**** :***:***: ***** *****

```

Fig. 46 Alinhamento da seqüência da hemoglobina, cadeias alfa e beta, de *C. thous* (CTHOUS) e da hemoglobina eqüina (NS9). Os resíduos de aminoácidos idênticos são representadas por "*", as substituições conservativas são representadas por ":" e as substituições semi-conservativas são representadas por ".".

Tabela 11. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação à hemoglobina eqüina.

N° resíduo	Eqüina	<i>C. thous</i>	Classificação	Alteração observada
4	Ala	Pro	Neutra	A hélice da cadeia beta começa a partir do resíduo 3 na hemoglobina eqüina e 4 na HbCt.
12	Ala	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
13	Ala	Thr	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
15	Ser	Asp	Positiva	Região de superfície. O aumento da carga possibilita a formação de mais contatos polares com o solvente.
32	Met	Thr	Positiva	Por ser uma região hidrofóbica estabilizadora do grupo heme a substituição deveria ser desfavorável, mas a cadeia lateral faz contato polar com a carbonila da Ala28, estabilizando a substituição na hemoglobina de <i>C. thous</i> .
34	Leu	Gln	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
50	His	Pro	Negativa	A substituição causa perda do par iônico da histidina com o Glu30.
68	Leu	Thr	Neutra	A leucina está posicionada perto do núcleo hidrofóbico, mas a treonina está posicionada na superfície.
82	Asp	Ala	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
89	His	Tyr	Positiva	Região de superfície. A tirosina melhora o "packing" por estar próxima a Tyr140.

107	Ser	Val	Neutra	A serina está em um núcleo hidrofílico na hemoglobina eqüina e a valina está posicionada em um núcleo hidrofóbico na HbCt.
111	Val	Cys	Negativa	Região hidrofóbica perto do grupo heme. A substituição de um aminoácido apolar é desfavorável.
113	Leu	His	Positiva	Região hidrofóbica. A histidina melhora as interações de "packing" por estar próxima as His20 e His112, a Tyr24 e ao Trp14 na HbCt. (Figura 48)
115	Ala	Thr	Positiva	Alanina da hemoglobina eqüina está em um núcleo hidrofílico, a treonina está na superfície na HbCt.
129	Leu	Fen	Positiva	Substituição realizada em um núcleo hidrofóbico próximo ao grupo heme.
131	Ser	Ala	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.

Tabela 12. Substituições significativas observadas na comparação da cadeia α da estrutura tridimensional da hemoglobina de *C. thous* (HbCt) em relação à hemoglobina eqüina.

N° resíduo	Eqüina	<i>C. thous</i>	Classificação	Alteração observada
2	Gln	His	Positiva	A histidina melhora o empacotamento por estar perto da Tyr145.
9	Ala	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
12	Leu	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.

16	Asp	Ala	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.
20	Glu	Val	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.
52	Gli	Asp	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
53	Ala	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
56	Gli	Ser	Positiva	Região de superfície. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
58	Pro	Ala	Neutra	A substituição dos resíduos 56 e 58 ocasiona a quebra da hélice. Na HbCt o resíduo 57 está em uma região de "loop".
72	Gli	Ser	Negativa	Região hidrofóbica próxima ao grupo heme. Há substituição de um resíduo apolar por um resíduo polar.
76	His	Lys	Negativa	A substituição da histidina causa a perda da interação com os resíduos aromáticos.
77	His	Asn	Negativa	A substituição da histidina causa a perda da interação com os resíduos aromáticos.
87	Ala	Lys	Neutra	A alanina está em uma região hidrofóbica perto do grupo heme mas a lisina está na superfície na HbCt.
112	Val	Cys	Negativa	Região hidrofóbica perto do grupo heme. A substituição de um aminoácido apolar é desfavorável.
116	Arg	His	Positiva	A histidina melhora o "packing" por estar perto dos aromáticos Phe118 e da His117.
129	Ser	Ala	Negativa	Região de superfície. Há substituição de um resíduo polar por um resíduo apolar.

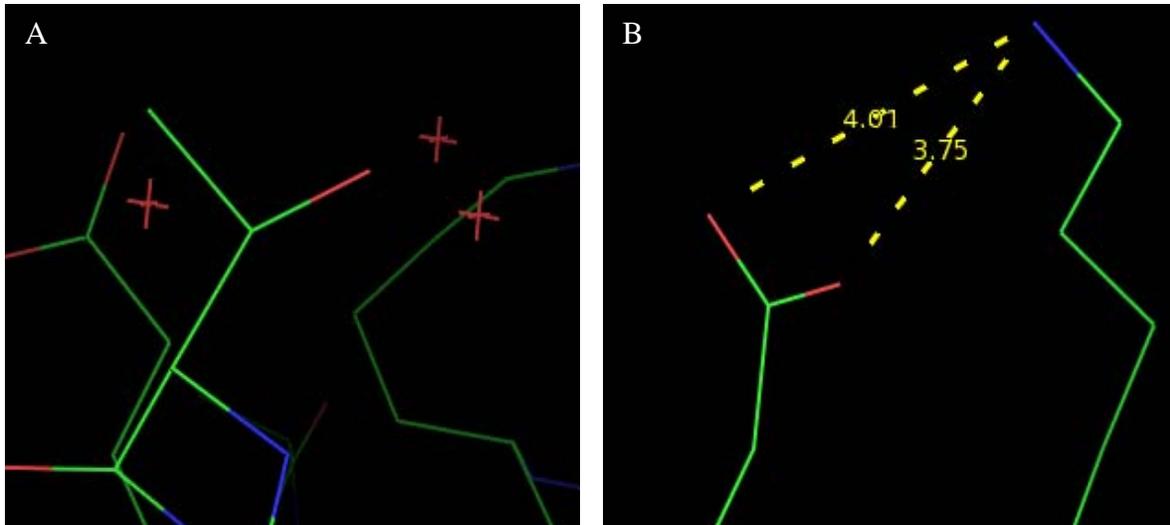


Figura 47 (A) Hemoglobina humana, cadeia β , leucina 87. (B) Hemoglobina de *C. thous*, cadeia β , lisina 87 interagindo com glutamato 90.

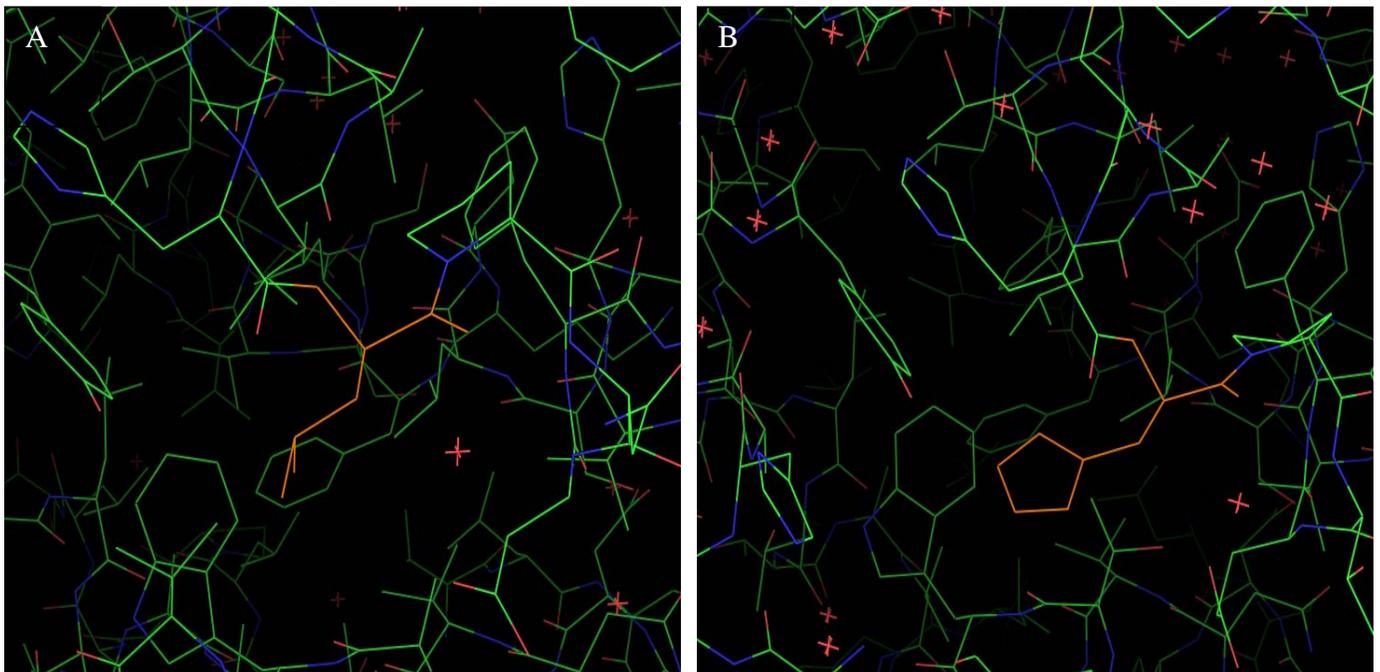


Figura 48 Região hidrofóbica em torno do resíduo 113 da cadeia α . (A) Hemoglobina eqüina cadeia α , leucina 113. (B) Hemoglobina de *C. thous* cadeia α , histidina 113. A substituição favorece a interação entre os resíduos aromáticos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hemoglobina foi uma das primeiras proteínas a ser estudada estruturalmente. Graças aos esforços iniciais de Max Perutz no estudo da estrutura tridimensional da hemoglobina foram desenvolvidas técnicas que permitem a resolução da estrutura de uma proteína por difração de raios-X.

Inicialmente, eram conhecidas somente duas conformações, R e T, da hemoglobina. Atualmente, sabe-se que dependendo da condição em que a hemoglobina se encontra podem ser encontradas diferentes conformações, que implicam na função biológica da molécula.

A hemoglobina de *C. thous* é a segunda estrutura cristalográfica da família dos Canídeos depositada no PDB (PDB ID: 2B7H) e representa um modelo de qualidade estrutural, como indicado pela estatística da resolução e refinamento do modelo (tabela 2), como exemplo os valores de R_{factor} de 0,168 e R_{free} de 0,232. A estrutura dessa hemoglobina apresenta uma água como ligante do ferro caracterizando a metahemoglobina e uma organização estrutural das subunidades semelhante às outras hemoglobinas. Na hemoglobina de *C. thous* o grupo heme apresenta um leve desvio de planaridade e o átomo de ferro está levemente deslocado em direção a histidina proximal. Essas alterações são consequência da coordenação do Ferro oxidado com a água, que é o ligante encontrado na hemoglobina quando ela está no estado de metahemoglobina. O complexo heme-globina formado nesse caso é mais instável. A sua estrutura cristalográfica foi utilizada como um modelo de estudo para análise do comprometimento estrutural tridimensional com substituições de aminoácidos em posições

específicas. Para isso, foram utilizadas estruturas cristalográficas de hemoglobinas de humano e de cavalo, disponíveis no PDB. Além dessas substituições uma análise detalhada da relação estrutura vs estabilidade foi feita.

Este é o primeiro trabalho de determinação de estrutura cristalográfica de uma proteína apresentado na forma de uma dissertação na pós-graduação em Biologia Molecular do departamento de Biologia Celular. Além disso, foi um dos trabalhos que possibilitou inclusão da Dra Sonia M. De Freitas, orientadora desse trabalho, como usuária do LNLS, bem como facilitou a concretização das colaborações científicas com pesquisadores do LNLS e a disponibilização de toda a infra-estrutura daquele laboratório para estudos em biofísica molecular. A resolução da estrutura cristalográfica dessa hemoglobina foi uma das metas descritas na Rede Nacional de Biologia Molecular Estrutural (RENABIME) do LNLS-CNPq, onde um dos grupos participantes era o grupo da Dra Sonia M. De Freitas como coordenadora. Dentre os objetivos descritos para os projetos dessa rede, estavam a resolução da estrutura tridimensional de um complexo formado pela tripsina e um inibidor de serinoproteases e a resolução da estrutura desta hemoglobina. Até o presente momento, este foi o único grupo da RENABIME que cristalizou e resolveu estrutura de proteínas. Portanto, este trabalho representa um marco importante na pesquisa do grupo de biofísica estrutural do laboratório de biofísica da UnB.

Apesar de ser uma proteína bastante estudada, sob vários aspectos da bioquímica, não existem na literatura dados sobre os parâmetros de estabilidade dessa proteína em diferentes condições desnaturantes, já que os estudos têm sido fundamentados na análise da função, por meio de experimentos de medida de saturação de oxigênio. Este trabalho, além de fornecer novas informações sobre parâmetros de estabilidade de duas hemoglobinas de canídeos, apresenta um novo

modelo de estudo de proteínas onde as modificações na estrutura tridimensional podem fornecer explicações sobre a alteração da estabilidade conformacional. E neste caso específico existem vários exemplos de hemoglobinas com estruturas tridimensionais conservadas apresentando várias mutações na seqüência.

Durante o desenvolvimento desse trabalho pudemos observar que a aquisição desses parâmetros de estabilidade da hemoglobina é um processo difícil e depende das características estruturais intrínsecas da proteína. Por sofrer auto-oxidação em condições fisiológicas, é preciso controlar e avaliar o estado de oxidação do ferro, assim como o ligante da hemoglobina.

Por ser uma proteína multimérica, o processo de desnaturação da hemoglobina varia de acordo com a condição de pH e o tipo de desnaturante utilizado. Esse processo pode ser observado acontecendo de uma forma direta, em um processo de dois estados, ou de uma forma mais suave onde podem ser observados um ou mais estados intermediários que se formam durante o processo de dissociação das subunidades, que é parte do processo de desnaturação da hemoglobina. Dependendo das condições, pode-se até mesmo observar apenas o processo de dissociação em dímeros e monômeros, e não se observar a desnaturação dos monômeros com a perda da estrutura e da interação do grupo heme com a globina.

A fluorescência e o dicróismo circular são técnicas que permitem p estudo de diferentes ambientes moleculares e permitem a determinação de parâmetros termodinâmicos de forma indireta. No processo de desnaturação observado pela fluorescência, os espectros apresentaram uma forma geral semelhante. Mas, na análise das frações desnaturadas, a partir dos ajustes das curvas experimentais, foram observados comportamentos diferentes das hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus*. De maneira geral, as duas hemoglobinas apresentaram características

de proteínas estáveis, nos pHs analisados. No entanto, a hemoglobina de *C. thous* foi bem mais estável em pH ácido apresentando um processo de desdobramento de dois estados, acompanhado por fluorescência, e um processo de desdobramento em 3 estados, de acordo com a análise por dicróismo circular. A hemoglobina de *P. vetulus* foi bem mais estável em pH básico, e o processo não foi do tipo cooperativo, indicando que essa hemoglobina pode se dissociar antes do processo de desnaturação completa.

A guanidina foi um agente desnaturante que provocou muita oscilação dos dados experimentais. Em consequência disso, os dados da hemoglobina de *P. vetulus* não puderam ser analisados, mostrando que essa hemoglobina é mais sensível à guanidina.

Nos experimentos de dicróismo circular, devido à maior sensibilidade da técnica, as curvas apresentaram várias regiões de transição com oscilações nos valores da elipticidade que dificultaram os ajustes. Somente os dados obtidos para a ação da uréia na hemoglobina de *C. thous* pH 10 foram computados e analisados, devido ao aparecimento de vários intermediários conformacionais.

Em relação ao parâmetro de estabilidade, ΔG , o valor encontrado para a hemoglobina de *P. vetulus* foi maior que o observado para a hemoglobina de *C. thous*, mas, comparando com o único dado existente na literatura da cianometahemoglobina humana, que apresenta um ligante do Ferro diferente, a hemoglobina de *C. thous* é mais instável que esta humana e a hemoglobina de *P. vetulus* é mais estável que essa. Nesta comparação, as razões das diferenças na estabilidade podem ser atribuídas, em parte, ao tipo do ligante do ferro.

O efeito do pH na estrutura secundária das hemoglobinas foi acompanhado por dicróismo circular, sendo que a hemoglobina de *C. thous* apresentou maior conteúdo relativo dessas estruturas em pH 3,5, 8,5 e 10 e a hemoglobina de *P. vetulus* foi mais estável em pH 3,5 e pH

9,5. Esses dados indicam, de forma qualitativa, uma maior estabilidade nesses pHs, mas que de forma geral essas hemoglobinas são resistentes a mudanças de pH. Esta baixa influência do pH foi confirmada quantitativamente na desnaturação térmica pela pouca variação nos valores de T_m .

Em contraste com os dados observados na fluorescência, a hemoglobina de *C. thous* apresentou maior estabilidade térmica em pH 9 e a hemoglobina de *P. vetulus* em pH 3. As curvas apresentaram oscilação nos valores obtidos, indicando que mesmo com a variação de temperatura e pH a hemoglobina se organiza de forma a manter a sua estrutura conforme a variação do meio. Mas, as curvas de DC indicam que a hemoglobina não foi completamente desnaturada. Portanto, o valor de ΔG obtido, assim como o pH que apresentou maior estabilidade térmica, não podem ser comparados com outros dados, mas apenas entre si, pois foi observada apenas parte do processo de desnaturação. Estes dados são apenas indicativos desse processo e precisam ser confirmados com a associação de outros agentes desnaturantes com a temperatura e o pH. Portanto, os parâmetros de estabilidade que foram mais considerados foram os obtidos pela desnaturação química.

A determinação de parâmetros termodinâmicos nos processos de interação molecular e na análise da estabilidade estrutural de proteínas e a cristalização e resolução da estrutura tridimensional de proteínas têm sido parte das linhas de pesquisas desenvolvidas no laboratório de Biofísica, sob a coordenação da Prof Dra Sonia M. de Freitas (Freitas, 1997, Freitas, 1999, Souza, 2000, Silva, 2001, Teles, 2004). A estabilidade de uma proteína pode ser determinada por meio da variação de energia livre calculada durante o processo de desnaturação de uma proteína. Proteínas consideradas estáveis apresentam um valor de ΔG variando de 5 a 15 kcal.mol⁻¹. O valor encontrado para as hemoglobinas está dentro desse intervalo

Com relação às análises realizadas com o surfactante catiônico, já foi relatado na literatura que, dependendo da concentração, o mesmo pode ocasionar diversos efeitos como formação e estabilização de α -hélices, desnaturação e precipitação, agregação ou estabilização das proteínas.

Na adição de CTAB às hemoglobinas estudadas foi observado um efeito de estabilização pelo fenômeno de hidratação preferencial, onde os monômeros de CTAB provavelmente se associam na forma de micelas, internalizam as moléculas de hemoglobinas que interagem com o solvente tornando-as mais estáveis e resistente à desnaturação.

Esse efeito de estabilização foi observado na desnaturação térmica. A adição de CTAB nas hemoglobinas de *C. thous* e *P. vetulus* na concentração de 0,5 e 1 mM elevaram o valor do T_m. O efeito de estabilização foi observado para as outras concentrações de CTAB nas duas hemoglobinas. O aumento da temperatura, associado ao efeito de estabilização da adição do CTAB, não foi suficiente para que se chegasse ao estado desnaturado da hemoglobina na maior parte dos casos. São precisos outros estudos associando outras condições desnaturantes à adição do CTAB e outros tipos de surfactante.

Fundamentado na estrutura tridimensional foi possível fazer comparações da hemoglobina de *C. thous* com as hemoglobinas existentes no PDB. Esta análise foi feita com a hemoglobina humana e eqüina por serem as únicas que apresentam algum indicativo de estabilidade conformacional, permitindo a comparação dos dados.

Comparada com a hemoglobina humana, as substituições de aminoácidos apresentadas na hemoglobina de *C. thous* tendem a ser estabilizadoras. Em contrapartida, comparando com a hemoglobina eqüina, as modificações apresentadas na hemoglobina de *C. thous* tendem a ser desfavoráveis para a estabilidade conformacional. Neste caso, pode ocorrer a perda de contatos do tipo empacotamento de anéis

aromáticos ("packing"), com perda da estabilidade proporcionada pela ressonância dos elétrons dos resíduos de aminoácidos aromáticos. Essas alterações podem ser a causa do valor maior de T_m observado na hemoglobina eqüina, em comparação com a hemoglobina de *C. thous*, considerando-se que a primeira apresenta esse tipo de empacotamento e a segunda não.

Esse é um modelo de estudo que foi apresentado para a hemoglobina, mas tem aplicação para qualquer tipo de proteína. Para as proteínas que apresentam um grande número de estruturas tridimensionais depositadas no PDB, esse estudo pode ser feito, considerando as diferentes estruturas e abordando as diferenças na seqüência primária como se fossem mutações. Mas, é essencial que os estudos de estabilidade estrutural e os dados dos parâmetros termodinâmicos tenham sido obtidos para fundamentar a análise da relação estrutura vs estabilidade.

Para uma melhor análise da relação da estrutura tridimensional com a estabilidade conformacional são necessárias mais informações sobre os parâmetros de estabilidade em diferentes condições, em diversos tipos de experimentos, como foi sugerido por nós durante todo esse trabalho. Proteínas que apresentam uma organização multimérica ou com vários domínios são difíceis de serem estudadas, uma vez que essa complexidade estrutural geralmente dificulta a obtenção desses parâmetros, como foi o caso da hemoglobina.

Essas informações são fundamentais para o planejamento racional para a produção de proteínas recombinantes, como está apresentado neste trabalho, e também para a determinação dos parâmetros termodinâmicos e de estabilidade, assim como estudos relativos à função de proteínas.

À medida que outros trabalhos sobre a estabilidade de hemoglobinas de diferentes espécies forem desenvolvidos e publicados,

este modelo de estudo poderá ser aplicado para analisar substituições que possam ser classificadas como estabilizantes ou desestabilizantes.

Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento racional de proteínas com modificações que levem ao aumento da estabilidade, em particular as hemoglobinas, visando a produção de sangue artificial, uma tendência que vem crescendo nos últimos anos.

6. CONCLUSÕES

- A estrutura tridimensional cristalográfica da hemoglobina C. thous foi resolvida. Esta estrutura foi depositada no pdb com o código PDB ID: 2BH7 e é a segunda estrutura de canídeo apresentada neste banco de dados.
- O modelo cristalográfico foi considerado de ótima qualidade esteroquímica.
- O modelo apresentou a mesma organização estrutural da hemoglobina humana na conformação R.
- O padrão de desnaturação para as hemoglobinas estudadas e a obtenção dos parâmetros de estabilidade é complexo
- A desnaturação completa da hemoglobinas é iniciada pelo processo de dissociação das subunidades, seguida da desnaturação das mesmas.
- O processo de desnaturação varia de acordo com o desnaturante. A guanidina foi mais eficiente na desnaturação que a uréia.
- Modificações na estrutura tridimensional podem fornecer explicações sobre a alteração da estabilidade conformacional.
- A ausência de dados na literatura para comparação de parâmetros termodinâmicos com hemoglobinas de outras espécies dificultou a análise comparativa da estabilidade estrutural entre essas proteínas.
- Os valores de variação de energia livre (ΔG) foram próximos aos da hemoglobina humana
 - Hb P. vetulus maior que Hb humana.
 - Hb C. thous menor que Hb humana.

- De forma geral os valores de ΔG encontrados foram compatíveis com valores encontrados para proteínas estáveis estruturalmente.
- O CTAB é um agente estabilizador da estrutura de hemoglobinas na concentração de 0,5mM para a Hb de *P. vetulus* e na concentração de 0,1mM para a Hb de *C. thous*.
 - ΔG sem CTAB 3,27 kcal.mol⁻¹
 - ΔG com CTAB 5,72 kcal.mol⁻¹
- O modelo de estudo da relação estrutura tridimensional x estabilidade estrutural pode ser aplicável a outras proteínas.
- Vários resíduos de aminoácidos que não alteram a estrutura tridimensional e aumentam o número de interações foram identificados. A presença destes aminoácidos pode fortalecer e estabilizar a estrutura tridimensional. Todos esses resíduos são candidatos para a produção de proteínas recombinantes.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajloo, D.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Hakimelahi, G.H.; Saboury, A.A.; Gharibi, H. The effect of dodecyl trimethylammonium bromide on the formation of methemoglobins and hemichrome. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2002 B 26:185-196.

Ajloo, D.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Sadeghi, M. Comparative structural and functional studies of avian and mammalian hemoglobins. *Acta Biochim Pol.* 2002 A 49(2):459-470.

Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. North-Holland Publishing Company. 1971.

Azevedo, W.F. Jr. Cristalização de macromoléculas biológicas. 2004. Disponível em http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/xtal/cristal_wfa.pdf

Baldwin, J.; Chothia, C. Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J Mol Biol.* 1979 129(2):175-220.

Bardeleben, C.; Moore, R.L.; Wayne, R.K. A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005 37(3):815-831.

Borgese, T.A.; Harrington, J.; Borgese, J.M.; Nagel, R.L. Thermostability of fish hemoglobins. *Comp Biochem Physiol* 1982 72B:7-11

Bradberry, S.M. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol. Rev.* 2003 22(1):13-27.

Brimhall, B.; Duerst, M.; Jones, R.T. The amino acid sequence of dog (*Canis familiaris*) hemoglobin. *J. Mol. Evol.* 1977 9(3):231-235.

Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J.-S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1998 54:905-921.

C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Ed John Wiley & Sons. 1980.

Cho, K.C.; Choy, C.L. Thermal stability of hemoglobin and myoglobin: effect of spin states. *Biochim Biophys Acta.* 1980 622(2):320-330.

Chong, K.T.; Miyazaki, G.; Morimoto, H.; Oda, Y.; Park, S.Y. Structures of the deoxy and CO forms of haemoglobin from *Dasyatis akajei*, a cartilaginous fish. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1999 55(7):1291-1300.

Coates, M.L. Hemoglobin function in the vertebrates: an evolutionary model. *J Mol Evol.* 1975 6(4):285-307.

Dalponte, J.; Courtenay, O. "3.9 Hoary fox" Em: *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs: Status Survey and Consenation Action Plan*. Ed. IUCN - The World Conservation Union. 2004.

Deane, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. *Serviço Nacional de Educação Sanitária*. Rio de Janeiro, 1956.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. Disponível em <http://www.pymol.org>

Dempsey, C.E.; Piggot, T.J.; Mason, P.E. Dissecting contributions to the denaturant sensitivities of proteins. *Biochemistry*.2005 44(2):775-781.

Drzazga, Z.; Michnik, A.; Bartoszek, M.; Beck E. Thermal Stability of Haemoglobin Solutions Under DC and AC Magnetic Field and UV and IR Radiation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2001 65(2):575-582.

Fadel, V.; Canduri, F.; Olivieri, J.R.; Smarra, A.L.; Colombo, M.F.; Bonilla-Rodriguez, G.O.; de Azevedo, W.F. Jr. Crystal structure of hemoglobin from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) using synchrotron radiation. *Protein Pept Lett*. 2003 10(6):551-559.

Fermi, G. & Perutz, M.F. *Atlas of molecular structures in biology: haemoglobin and myoglobin*. Ed. Clarendon Press. 1981.

Freitas, S.M.; de Mello, L.V.; da Silva, M.C.; Vriend, G.; Neshich, G.; Ventura, M.M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS Lett* 1997 409(2):121-127.

Freitas, S.M.; Ikemoto, H.; Ventura, M.M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). *J Protein Chem* 1999 18(3):307-313.

Goorha, Y.K.; Prabal, D.; Chatterjee, T.; Dhot, P.S.; Prasad, R.S. Artificial Blood. *Medical Journal Armed Forces India*. 2003 1(59):45-50.

Gorr, T.A.; Mable, B.K.; Kleinschmidt, T. Phylogenetic analysis of reptilian hemoglobins: trees, rates, and divergences. *J Mol Evol*. 1998 47(4):471-485.

Gratzer, W.B.; Allison, A.C. Multiple haemoglobins. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc*. 1960 35:459-506.

Hemopure ® © 2007 Biopure Corporation <http://www.biopure.com/>

- Hernández, R.G. Metahemoglobinemia. *Revista de Ciencias Médicas La Habana*. 1999 5 (1) disponível em:
http://www.cpicmha.sld.cu/hab/vol5_1_99/hab08199.htm
- Jancarik, J.; Kim, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 1991 24:409-411.
- Jones, T. A.; Zou, J. Y.; Cowan, S. W.; Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* 1991 A 47:110-119.
- Kirschner, A.G.; Tanford, C. The dissociation of hemoglobin by inorganic salts. *Biochemistry*. 1964 3:291-296.
- Kleywegt, G.J. and Jones, T.A. Databases in protein crystallography. *Acta Cryst* 1998 D 54, 1119-1131 disponível em: <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>
- Kristinsson H.G. Acid-induced unfolding of flounder hemoglobin: evidence for a molten globular state with enhanced pro-oxidative activity. *J Agric Food Chem*. 2002 50(26):7669-7676.
- Kristinsson H.G.; Hultin, H.O. Changes in trout hemoglobin conformations and solubility after exposure to acid and alkali pH. *J Agric Food Chem*. 2004 52(11):3633-43.
- Lainson, R.; Dye, C; Shaw, J.J; MacDonald, D.W.; Courtenay, O.; Souza, A.A.; Silveira, F.T. Amazonian Visceral Leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relations to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990 85:135-137.

Laskowski, R. A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993 26:283-291.

Lecomte, J.T.; Vuletich, D.A.; Lesk, A.M. Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 15(3):290-301.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 3a. ed. São Paulo. Ed. Sarvier. 2002.

Manwell, C. Comparative physiology: blood pigments. *Annu. Rev. Physiol.* 1960 22:191-244.

McRee, D.E. *Practical Protein Crystallography*. Academic Press. 1993.

Meyer, M.L.; Kauzmann, W. The effects of detergents and urea on the rotatory dispersion of ovalbumin. *Arch Biochem Biophys.* 1962 99:348-349.

Michnik, A.; Drzazga, Z., Kluczevska, A.; Michalik, K. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophys Chem.* 2005 118(2-3):93-101.

Moosavi-Movahedi, A.A. Thermodynamics of Protein Denaturation by Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of the Iranian Chemical Society.* 2005 2(3):189-196

Murshudov, G.N.; Lebedev, A.; Vagin, A.A.; Wilson, K.S.; Dodson, E.J. Efficient anisotropic refinement of Macromolecular structures using FFT. *Acta Cryst.* 1999 D 55, 247-255.

Nakaya, K.; Yamada, K.; Onozawa, M.; Nakamura, Y. Interaction of cetylpyridinium chloride with oxymyoglobin. *Biochim Biophys Acta.* 1971 251(1):7-13.

Nowak, R.M. *Walker's mammals of the world*. V. 2. 6a. ed. Ed. John Hopkins. 1999

Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* 1997 276:307-326.

Pace, C.N.; Shirley, B.A.; Thomson, J.A. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein structure: A practical approach* Ed. T.E. Creighton. 1990.

Perutz, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*. 1970 228:726-739.

Perutz, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 1978 239(6):92-125.

Perutz, M.F.; Fermi, G.; Poyart, C.; Pagnier, J.; Kister, J. A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J. Mol. Biol.* 1993 233(3):536-545.

Perutz, M.F.; TenEyck, L.F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1972 36:295-310.

Prakash, V.; Nandi, P.K. Studies on the conformation of α -globulin from *Sesamum indicum* L. in cationic and nonionic detergents. *Journal of Biosciences* 1982 4(3):331-345.

Puett, D.; Friebele, E.; Hammonds, R.G. Jr. A comparison of the conformational stabilities of homologous hemoproteins. Myoglobin from several species, human hemoglobin and subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1973 328(2):261-277.

- Reza, D.M.; Akbar, M.M.; Parviz, N. Ghourchian, Hedayat-Olah, Shahrokh S. Inhibition of human hemoglobin autoxidation by sodium n-dodecyl sulphate. *J Biochem Mol Biol*. 2002 35(4):364-370.
- Richard, V.; Dodson, G.G.; Mauguen, Y. Human deoxyhaemoglobin-2,3-diphosphoglycerate complex low-salt structure at 2.5Å resolution. *J. Mol. Biol*. 1993 233(2):270-274.
- Rieder, R.F. Hemoglobin stability: observations on the denaturation of normal and abnormal hemoglobins by oxidant dyes, heat, and alkali. *J Clin Invest*. 1970 49(12):2369-2376.
- Riggs, A. Molecular control of hemoglobin function. Em: *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells*. Ed. John Wiley & Sons. 1972
- Robinson, V.L.; Smith, B.B.; Arnone, A. A pH-dependent aquomet-to-hemichrome transition in crystalline horse methemoglobin. *Biochemistry*. 2003 42(34):10113-10125.
- Runkel, D.; Dresler, S.L.; Brimhall, B.; Jones, R.T. The tryptic peptides of coyote (*Canis latrans*) hemoglobin. *Biochem. Genet*. 1974 12(6):467-473.
- Saito, Y.; Wada, A. Comparative study of GuHCl denaturation of globular proteins. II. A phenomenological classification of denaturation profiles of 17 proteins. *Biopolymers*. 1983 22(9):2123-2132.
- Shaanan, B. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol*. 1983 171(1):31-59.
- Shikama, K.; Matsuoka, A. Human haemoglobin: a new paradigm for oxygen binding involving two types of alphabeta contacts. *Eur J Biochem*. 2003 270(20):4041-4051.

Silva, L. P.; Leite, J. R. S. A.; Bloch Jr, C.; Freitas, S.M. Stability of a Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Protein and Peptide Letters*. 2001 8(1)33-38.

Sjogren, H.; Ericsson, C.A.; Evenas, J.; Ulvenlund, S. Interactions between charged polypeptides and nonionic surfactants. *Biophys J*. 2005 89(6): 4219-4233.

Souza, E.M.; Teles, R.C.; de Freitas, S.M. Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *J Protein Chem* 2000 19(6):507-513.

Sullivan, B. Oxygenation properties of snake hemoglobin. *Science*. 1967 157(794):1308-1310.

Tame, J.R.; Wilson, J.C.; Weber, R.E. The crystal structures of trout Hb I in the deoxy and carbonmonoxy forms. *J Mol Biol*. 1996 259(4):749-760.

Tanaka, P.P.; Tanaka, M.A.A. Hemoglobin-based blood substitutes: current status and perspectives. *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2003 53(4):543-554.

Teles, R.C.; de Souza, E.M.; Calderon, L.A.; de Freitas, S.M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Phytochemistry*. 2004 65(7):793-799.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 22:4673-80.

Timasheff, S. N. and Arakawa, T. Stabilization of protein structure by solvents. Em *Protein structure, a practical approach*. Ed T. E. Creighton. 1989.

Timasheff, S.N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem.* 1998 51:355-432.

Timasheff, S.N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1993 22:67-97.

Tofani, L.; Féis, A.; Snoke, R.E.; Berti, D.; Baglioni, P.; Smulevich, G. Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant complexes. *Biophys J.* 2004 87(2):1186-1195.

Tsuda, K.; Kikkawa, Y.; Yonekawa, H.; Tanabe, Y. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genet. Syst.* 1997 72(4):229-238.

Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 1997)30:1022-1025.

Vinogradov, S.N.; Hoogewijs, D.; Bailly, X.; Arredondo-Peter, R.; Gough, J.; Dewilde, S.; Moens, L.; Vanfleteren, J.R. A phylogenomic profile of globins. *BMC. Evol. Biol.* 2006 6(1):31.

Wayne, R.K.; Geffen, E.; Girman, D.J.; Koepfli, K.P.; Lau, L.M.; Marshall, C.R. Molecular systematics of the Canidae. *Syst. Biol.* 1997 46(4):622-653.

Wayne, R.K.; Nash, W.G.; O'Brien, S.J. Chromosomal evolution of the Canidae. I. Species with high diploid numbers. *Cytogenet. Cell Genet.* 1987 44(2-3):123-133.

Weber, R. E. Functions of Invertebrate Hemoglobins with Special Reference to Adaptations to Environmental Hypoxia. *Amer. Zool.* 1980 20:79-101.

Weber, R. E. Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to environmental oxygen availability. Em: *Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control*. Ed. Oxford Pergamon. 1982.

Winslow, R.M. Blood substitutes-a moving target. *Nat Med.* 1995 1(11):1212-1217.

Yasuda, J.; Ichikawa, T.; Tsuruga, M.; Matsuoka, A.; Sugawara, Y.;, Shikama, K. The alpha 1 beta 1 contact of human hemoglobin plays a key role in stabilizing the bound dioxygen. *Eur J Biochem.* 2002 269(1): 202-211.

Zhang, J.; Hua, Z.; Tame, J.R.; Lu, G.; Zhang, R.; Gu, X. The crystal structure of a high oxygen affinity species of haemoglobin (bar-headed goose haemoglobin in the oxy form). *J Mol Biol.* 1996 255(3):484-493.