

## ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA HEMOGLOBINA DA SERPENTE SEMI-AQUÁTICA *HELICOPS MODESTUS*

Lombardi, F. R.<sup>1</sup>; Santos, G. C.<sup>1</sup>; Olivieri, J. R.<sup>1</sup>; Bonilla-Rodriguez, G. O.<sup>2</sup>

**Resumo:** Foi proposto para Hb da serpente semi-aquática *Liophis miliaris* um processo de transição reversível dímero - tetrâmero dependente da ligação de O<sub>2</sub>. Este processo seria parcialmente explicado devido à substituição dos aminoácidos Glu(101) ⇒ Val e Glu(43) ⇒ Thr, que estão presentes na interface dimérica ( $\alpha_1\beta_2$ ). Tais substituições resultariam na perda de dois aminoácidos carregados negativamente na interface dimérica, contribuindo desse modo para a desestabilização do tetrâmero de hemoglobina. Com o objetivo de testarmos se tal processo é válido para a hemoglobina de *Helicops modestus*, utilizamos as técnicas de tonometria, cromatografia analítica de filtração em gel e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Os dados das propriedades funcionais de ligação de O<sub>2</sub> mostraram que a hemoglobina de *Helicops modestus*, tanto na forma stripped como na presença de cloreto, possui alta afinidade por oxigênio e processo cooperativo de ligação de O<sub>2</sub>, em toda a faixa de pH analisado. Na presença de ATP, a afinidade por oxigênio diminui acentuadamente entre pH 7,0 e 8,5 e a cooperatividade ( $n_H$ ) fica entre valores de 2,0 e 2,6. Nas três condições analisadas, observamos a presença de efeito Bohr alcalino, característico de hemoglobinas tetraméricas. Os dados de estresse osmótico sugerem que a desoxi-hemoglobina de *Helicops modestus*, quando na ausência de ânions, assume um novo estado conformacional, denominado estado T<sub>0</sub>, como proposto por Colombo & Seixas, (1999) para a hemoglobina humana. Os resultados obtidos através da constante de associação dímero-tetrâmero, mostraram que a hemoglobina desta serpente apresenta-se como um tetrâmero estável em solução. Os dados de SAXS mostraram que o raio de giro e dimensão máxima determinados para a hemoglobina de *Helicops modestus* são similares aos encontrados para a hemoglobina humana. Diante dos dados obtidos, concluímos que a hemoglobina de *Helicops modestus* é um tetrâmero estável em solução e que, portanto, não há provas da existência do mecanismo de dimerização proposto na literatura para a hemoglobina de *Liophis miliaris*.

---

<sup>1</sup> Departamento de Física, IBILCE/UNESP/São José do Rio Preto

<sup>2</sup> Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE/UNESP/São José do Rio Preto  
Endereço para correspondência: Depto. de Química e Ciências Ambientais, IBILCE-UNESP, Rua Cristovão Colombo, 2265, São José do Rio Preto - S.P., Brasil, 15054-000. Tel: 55-17-221-2200, Fax: 55-17-221-2356; e-mail: [bonilla@qca.ibilce.unesp.br](mailto:bonilla@qca.ibilce.unesp.br)

**Palavras chaves:** Hemoglobina, *Helicops modestus*, cooperatividade, oxigenação, estresse osmótico.

## INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$ . Sua massa molecular é de aproximadamente 64 Kda. Sua principal função é transportar oxigênio ( $O_2$ ) dos órgãos captadores deste gás para os tecidos e de parte do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) produzido no sentido inverso. O que mantém este oligômero unido são interações intermoleculares do tipo interação iônica, força de Van der Waals e ponte de hidrogênio, entre os resíduos de aminoácidos das diferentes cadeias (Baldwin & Chotia, 1979).

A interação entre  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$ , é muito estável, pois é mantida por interações entre 35 resíduos de aminoácidos (Voet *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 1997). Já a interação entre  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$  é mais susceptível pois, esta região (conhecida como interface dimérica) sofre grandes mudanças conformacionais durante o processo de oxigenação. Além de que, alterações nos resíduos de aminoácidos que compõem esta interface colaboram para que ocorra a dissociação da Hb (Kavanaugh *et al.*, 1992). Em soluções diluídas, a Hb humana dissocia-se em dímeros  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$ , cuja massa molecular é de 32 KDa (Manning *et al.*, 1996; Abraham *et al.*, 1997).

As hemoglobinas de serpentes, na ausência de fosfatos orgânicos (tal como, ATP), exibem alta afinidade de ligação de oxigênio, um pequeno efeito Bohr alcalino comparado à hemoglobina humana e ausência de cooperatividade. No entanto, na presença destes fosfatos, ocorre uma diminuição acentuada da afinidade por oxigênio e a ligação de oxigênio passa a ser cooperativa (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Bonilla *et al.*, 1994).

Em virtude desses achados, um mecanismo de transição dependente da ligação de  $O_2$  entre oxi-dímeros e desoxi-tetrâmeros foi proposto por Focesi *et al.*, (1987); Matsuura *et al.*, (1989). De acordo com este mecanismo sugeriu-se que as Hbs de algumas serpentes quando se encontrassem no estado desoxigenado a estrutura predominante seria o tetrâmero e, quando ocorresse a oxigenação toda população de Hb tetramérica passaria à dímero. Tal mecanismo foi baseado em análises funcionais e estruturais da hemoglobina de *Liophis miliaris*.

Posteriormente, este mecanismo de dissociação foi estendido para outras hemoglobinas de serpentes, tais como, *Bothrops alternatus* (Oyama *et al.*, 1993), *Mastigodryas bifossatus* (Bonilla *et al.*, 1994), *Boa constrictor* (Bonilla *et al.*, 1994) e *Helicops modestus* (Bonafe *et al.*, 1999).

A fim de elucidar a funcionalidade de tal mecanismo Matsuura *et al.*, (1989) sequenciaram as globinas de *Liophis miliaris*. Os resultados mostraram que na região de contato  $\alpha_1\beta_2$ , ocorreram duas substituições de resíduos de aminoácidos. O resíduo Glu (G3) foi substituído por Val e Glu (CD2) foi substituído por Thr. Ou seja, onde existiam duas cargas negativas, passaram a existir duas cadeias apolares grandes. A perda de duas cargas negativas, na interface dimérica, levaria a instabilidade do tetrâmero, favorecendo a formação de dímeros.

No presente trabalho, analisamos as propriedades funcionais de ligação de O<sub>2</sub>, a estabilidade tetramérica por determinação da constante de associação do estado ligado e espalhamento de raios X a baixo ângulo, com o intuito de tentarmos encontrar evidências funcionais e estruturais da presença ou não de dímeros de hemoglobinas de serpentes, como descrito para a hemoglobina da serpente semi-aquática *Liophis miliaris* (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1989).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes adultos da serpente semi-aquática *Helicops modestus* foram cedidos pelo Departamento de Botânica e Zoologia da UNESP-IBILCE, por intermédio do Prof. Dr. Arif Cais.

Para realizarmos a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com éter e o sangue foi coletado por punção cardíaca, usando uma seringa contendo solução salina com EDTA 1mM. Em seguida, as hemáceas foram lavadas com solução salina (TRIS-HCl 50mM pH 8,0 contendo NaCl 0,9% D-Glicose 0,2% e EDTA 1mM) por centrifugação quatro vezes (2.000xg por 10 minutos cada lavagem).

Posteriormente, realizamos a hemólise das hemáceas com tampão TRIS-HCl 30mM pH 9,0 contendo EDTA 1mM, seguida de uma centrifugação (8.000xg por 60 minutos) para retirada de material celular. Para a remoção dos fosfatos orgânicos, o hemolisado foi dialisado contra o mesmo tampão, sendo, em seguida, realizada uma

cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-25 (Sigma) em uma coluna (2,6 x 30cm) equilibrada com o mesmo tampão.

Realizamos também uma passagem do hemolisado por outra cromatografia de filtração em gel em Sephacryl HR S-100 para a retirada de proteínas com massas moleculares acima da hemoglobina.

Os estudos das propriedades de ligação de oxigênio foram realizados pelo método tonométrico-espectrofotométrico (Giardina & Amiconi, 1981) na forma *stripped* (que é a hemoglobina sem ânions) e na presença de ânions (cloreto e ATP). A concentração da proteína estava em torno de 50 - 60 $\mu$ M (heme) em tampão TRIS-HCl 50mM em diferentes valores de pH a 20°C .

Adicionamos em todos os experimentos de ligação de O<sub>2</sub> catalase e superóxido dismutase a fim de evitar a formação de meta-hemoglobina. Dados de equilíbrio de O<sub>2</sub> que possuísem valores de meta-hemoglobina superiores a 5% foram descartados. Os espectros da hemoglobina em solução foram coletados na faixa de 400 - 700nm com um espectrofotômetro CARY 100 Scan (*Varian*).

As mudanças conformacionais da hemoglobina de *Helicops modestus* foram estudadas pelo método de estresse osmótico (Colombo *et al.*, 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996), estimando o número diferencial de moléculas de água que se ligam à forma oxigenada desta hemoglobina, durante o processo de transição T  $\Rightarrow$  R. Os experimentos foram realizados com tampão TAPS -NaOH 30mM pH 8,0 a 20°C.

A constante de associação dímero - tetrâmero (<sup>4</sup>K<sub>2</sub>) foi determinada por cromatografia de filtração em gel usando o método proposto por Ackers (1975). Os experimentos foram realizados com uma coluna preenchida com Sephadex G-75 (1 x 20cm) em temperatura ambiente, previamente equilibrada com tampão TRIS-HCl 50mM pH 8,0. A amostra de hemoglobina, a qual foi estabilizada com monóxido de carbono com o intuito de evitar a oxidação, foi aplicada em grandes volumes na faixa de concentração de 1 a 60 $\mu$ M (heme).

O fluxo da coluna foi mantido por volta de 12mL/h, através do auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia). Leituras contínuas da absorbância do perfil de eluição foram realizadas usando uma cubeta de quartzo acoplada ao espectrofotômetro (*Varian*), em 541 ou 412nm dependendo da concentração de hemoglobina utilizada.

O volume de exclusão (V<sub>o</sub>) e o volume interno (V<sub>i</sub>) da coluna foram determinados com a passagem de azul dextran (M.M.: 2.000.000) e ATP (M.M.: 551) pela coluna, com leituras de absorbância em 520 e 260nm, respectivamente. Para

calibragem da coluna utilizamos como padrões: 1- Mioglobina (Sigma; M.M.: 16.800Da), 2- Anidrase Carbônica (Sigma; M.M.: 29.000Da) e 3- desoxi-hemoglobina humana (M.M.: 64.000Da).

Esta técnica envolve transformar os volumes de eluição em coeficientes de partição usando a equação 1, a seguir:

$$S = \frac{(V_e - V_o)}{V_i} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $V_e$  é o volume de eluição,  $V_o$  é o volume de exclusão (azul dextran) e  $V_i$  é o volume interno (ATP).  $V_o$  e  $V_i$  correspondem aos limites entre 0 e 1, respectivamente. Já que não encontramos diferenças entre usar coeficientes de partição ou volumes de eluição, nós decidimos utilizar os volumes de eluição para estimar a  ${}^4K_2$ .

A associação de dímeros pode ser representada pela expressão abaixo:

$$Hb_d + Hb_d = Hb_t \quad \text{Eq. 2}$$

onde a fração de dímeros  $f_d$  será descrita pela equação 3:

$$f_d = \frac{Hb_d}{(Hb_d + Hb_t)} \quad \text{Eq. 3}$$

A constante de associação para o estado ligado ( ${}^4K_2$ ) é representada pela fração de tetrâmeros dividido pela fração de dímeros, como descrito a seguir:

$${}^4K_2 = \frac{f_t}{f_d^2 * Hb} = \frac{(1 - f_d)}{f_d^2 * Hb} \quad \text{Eq. 4}$$

Assim, a concentração total de hemoglobina é  $f_t + f_d$ , e a equação anterior seria re-arranjada para:

$${}^4K_2 * f_d^2 * Hb + f_d - 1 = 0 \quad \text{Eq. 5}$$

sendo assim, tem-se uma equação quadrática com  $f_d = X$ . Pode-se, então, calcular a raiz de  $f_d$ :

$$f_d = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 * a * c}}{2 * a} = \frac{-1 + \sqrt{1 - 4 * K_2 * Hb * (-1)}}{2 * K_2 * Hb} \quad \text{Eq. 6}$$

Uma regressão não-linear foi realizada utilizando a equação 7 abaixo:

$$V_w = (f_d (V_d - V_t)) + V_t \quad \text{Eq. 7}$$

onde  $V_w$  refere-se à solução de Hb,  $f_d$  é a fração de dímeros e  $V_d$  e  $V_t$  representam os volumes de eluição para as formas diméricas e tetramérica, respectivamente (Nenortas & Beckett, 1994). Na equação 7,  $f_d$  foi substituído pela equação 6.

$V_t$  foi obtido pela passagem de desoxi-hemoglobina humana e  $V_d$  foi obtido baseado na aproximação usada por Perutz *et al.*, (1994) e Chiancone *et al.*, (1968):

$$V_d = \frac{(V_{Mb} + V_t)}{2} \quad \text{Eq. 8}$$

O equipamento utilizado na coleta de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foi um gerador de raios X com ânodo rotatório Rigaku RU 300. Nos experimentos de SAXS foi utilizado um alvo de cobre e radiação  $K\alpha=1,54\text{\AA}$ . A potência do aparelho escolhida foi de 5KW (50KV – 90mA). As contribuições na intensidade de espalhamento geradas pelo solvente, capilar e o ar foram subtraídas da intensidade total.

As medidas de SAXS foram realizadas usando concentrações de 10mg/ml de hemoglobina de *Helicops modestus* e o tempo de coleta foi de aproximadamente 7 horas, em temperatura ambiente (20°C). O tampão utilizado nos experimentos foi HEPES 30mM pH 7,0 e 8,0.

Informações da estrutura quaternária foram obtidas a partir da função de distribuição das distâncias  $p(r)$ :

$$p(r) = \frac{1}{2p^2} \int_0^{\infty} I(h) * (hr) * \sin(hr) dh \quad \text{Eq. 9}$$

A função  $p(r)$  é proporcional ao número de pares de elétrons separados pela distância  $r$  que é determinada pelas combinações entre todos os elementos da macromolécula.

O raio de giro da macromolécula em solução, é determinado pela aproximação de Guinier ou pela função  $p(r)$ . A vantagem de se utilizar a função  $p(r)$  está no fato de que toda a curva de espalhamento será utilizada nos cálculos de raio de giro, enquanto que no método de Guinier somente uma parte da curva será utilizada. O raio de giro de uma molécula é relacionado à  $p(r)$  pela expressão abaixo:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{\infty} p(r) * r^2 * dr}{2 \int_0^{\infty} p(r) * dr} \quad \text{Eq. 10}$$

A função  $p(r)$  tem sido determinada pela transformada de Fourier indireta usando o programa ITP desenvolvido por Glatter (1977). Este método mostrou-se mais eficiente do que o uso da transformada de Fourier direta. (Glatter, 1982).

As funções  $p(r)$  teóricas foram calculadas usando o programa Multibody (Glatter, 1980), modificado com o objetivo de facilitar a construção de modelos moleculares (Olivieri, 1992). Os modelos usados neste programa foram gerados a partir de um arranjo de pequenas esferas, as quais reproduzem a forma e o tamanho molecular desejado.

Para obter a função  $p(r)$  teórica, para a forma dimérica, foram utilizadas as coordenadas atômicas da hemoglobina humana (1HHO), depositadas no banco de dados de estruturas tridimensionais. Foram usadas as coordenadas de uma globina alfa e uma globina beta para gerar uma função  $p(r)$  da forma dimérica. Com estas coordenadas, foi montado o dímero de hemoglobina através do programa Multibody (Glatter, 1980) com o intuito de calcular o raio de giro e dimensão máxima. As mesmas coordenadas atômicas e procedimentos foram utilizados para gerar uma função  $p(r)$  para a forma tetramérica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados das propriedades funcionais de ligação de  $O_2$  mostraram que o hemolisado de *Helicops modestus*, na forma *stripped*, possui alta afinidade por oxigênio ( $P_{50}=0,85\text{mmHg}$ , em pH 7,5) (figura 1A), efeito Bohr alcalino de  $\Delta H^{\ddagger}=-0,53$  e

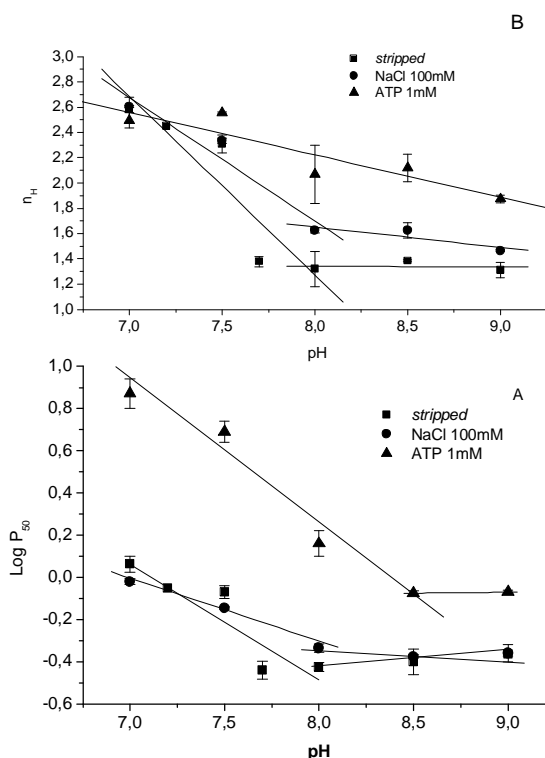
coeficiente de Hill ( $n_H$ ) sempre superior a 1,0 (figura 1B), o que indica processo cooperativo de ligação de  $O_2$ .

Na presença de ATP, a afinidade por oxigênio diminui acentuadamente ( $P_{50}=4,9\text{mmHg}$ , em pH 7,5) (figura 1A), ocorre um aumento do efeito Bohr alcalino para  $\Delta H^+ = -0,73$  e a cooperatividade fica em torno de 2,0, alcançando o valor de 2,6 em pH 7,5 (figura 1B). Este comportamento também foi observado para as hemoglobinas de *Bothrops alternatus* (Oyama Jr. *et al.*, 1993) e *Mastigodryas bifossatus* (Bonilla *et al.*, 1994).

Os valores de efeito Bohr obtidos por nós são muito diferentes dos determinados por Bonafe *et al.*, (1999) para mesma hemoglobina de *Helicops modestus*. Os autores sugerem que a hemoglobina desta serpente, quando na forma *stripped*, possui ausência de efeito Bohr alcalino e cooperatividade igual a 1,0, entre pH 7,0 – 9,0. Além do mais, eles mostram que, na presença de ATP, abaixo de pH 8,0, a cooperatividade é igual a 2,0, no entanto, acima de pH 8,0, ela possui  $n_H=1,0$ , o que caracterizaria ligação não cooperativa de  $O_2$ .

Os autores tentam sustentar, com esses dados, a existência de um mecanismo de dissociação dependente da ligação de  $O_2$ , como proposto para a hemoglobina de *Liophis miliaris* (Focesi *et al.*, 1987; Matsuura *et al.*, 1987; Focesi *et al.*, 1990; Focesi *et al.*, 1992). Em adição, Bonafe *et al.*, (1999) estende tal mecanismo para todos os animais ectotérmicos

Entretanto, nossos dados das propriedades funcionais de ligação de  $O_2$  sugerem que a hemoglobina de *Helicops modestus* é uma proteína tetramérica em solução. Com o intuito de confirmarmos tal suposição, realizamos análises de estresse osmótico, cromatografia analítica de filtração em gel e coleta de dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), como mostrado a seguir.

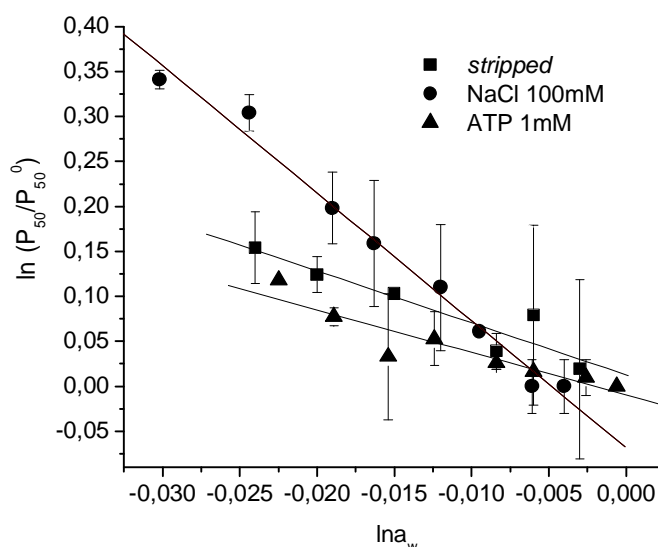


**Figura 1.** A) Gráfico ilustrando a dependência do  $\log P_{50}$ , da hemoglobina de *Helicops modestus*, em diferentes valores de pH. B) Gráfico ilustrando o comportamento da cooperatividade da hemoglobina de *Helicops modestus* em relação à variação do pH. Os experimentos foram realizados com tampão ADA e TAPS 30mM. A concentração da amostra foi de  $\pm 60\mu\text{M}$ .



Os resultados dos experimentos de estresse osmótico mostraram que o hemoglobina *stripped* da serpente *Helicops modestus* liga, durante o processo de oxigenação, 24 moléculas de  $24 \pm 7$  moléculas de água. Na presença de cloreto, o número de moléculas de água que se ligam à forma oxigenada aumenta para  $56 \pm 4$  e, na presença de ATP, este número diminui para  $20 \pm 2$  moléculas de água (figura 2).

Estes resultados sugerem que a hemoglobina de *Helicops modestus*, quando na ausência de ânions, assume um novo estado alostérico, denominado estado  $T_0$ , como proposto por Colombo e Seixas, (1999) para a hemoglobina humana. O estado  $T_0$  é um novo estado da forma desoxigenada, ele é mais hidratado que o estado desoxigenado clássico ( $T_x$ ).



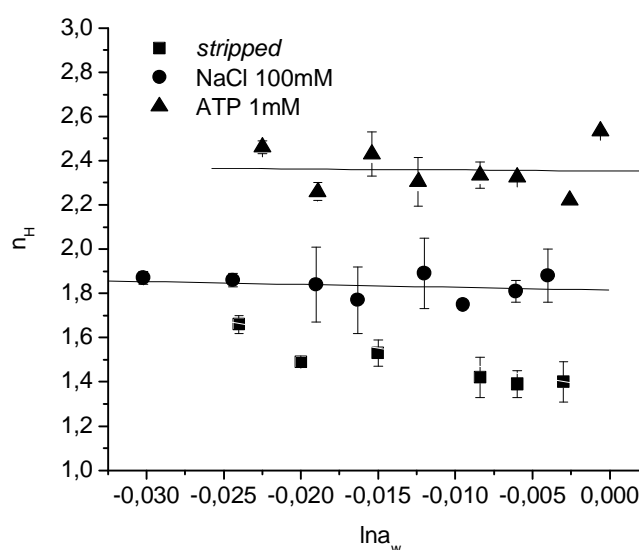
**Figura 2.** Gráfico ilustrando o comportamento da hemoglobina de *Helicops modestus* em função da variação da atividade de água. Os experimentos foram realizados em tampão TAPS 30mM pH 8,0 a 20°C. A concentração da amostra foi de  $\pm 60 \mu\text{M}$ .

Na presença de cloreto, a proteína adota o estado  $T_x$  menos hidratado, conseqüentemente, quando ocorre a transição conformacional de T para R, a hemoglobina expõe uma maior área ao solvente, isto pode ser comprovado pelo aumento no número de moléculas ligadas à forma oxigenada da hemoglobina de *Helicops modestus*, que foi de  $56 \pm 4$  moléculas de água.

Na presença de ATP, a hemoglobina de *Helicops modestus* comporta-se diferentemente do apresentado pela hemoglobina humana. Em vez de ligar à forma oxigenada 44 moléculas de água, como na hemoglobina humana (Tosqui *et al.*, 2000), a

hemoglobina de *Helicops modestus* liga apenas 20 moléculas de água, sugerindo um enfraquecimento na ligação entre ATP e hemoglobina.

Estes resultados reforçam a idéia de que a hemoglobina de *Helicops modestus* é uma proteína tetramérica em solução, já que seu comportamento é muito similar ao da hemoglobina humana, que é uma hemoglobina comprovadamente tetramérica (Chiancone *et al.*, 1968; Nenortas e Beckett, 1994). Além de que os valores de cooperatividade são sempre superiores a  $n_H=1,0$  (figura 3).



**Figura 3.** Gráfico ilustrando o comportamento da cooperatividade, da hemoglobina de *Helicops modestus*, em função da atividade de água. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 2.

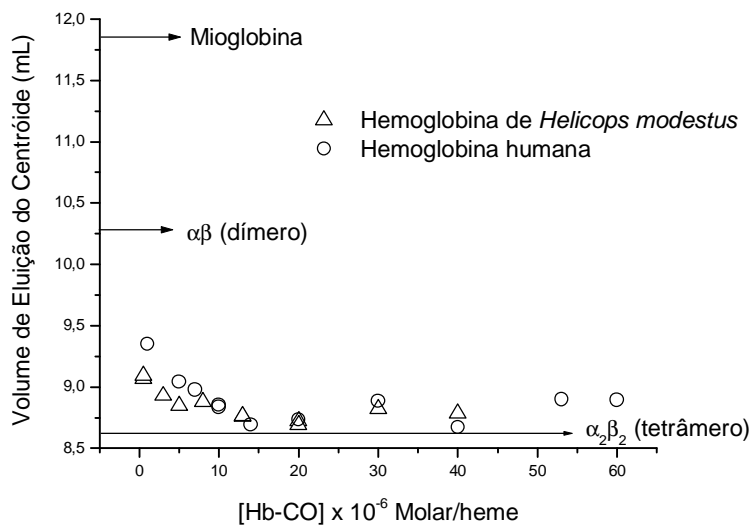
Os dados de cromatografia analítica de filtração em gel mostraram que a hemoglobina de *Helicops modestus* de 60 a 13 $\mu$ M possui predominantemente arranjos tetraméricos em solução. Abaixo desta concentração, começa ocorrer dimerização desta hemoglobina, entretanto, um pouco menos do que a hemoglobina humana, como pode ser observado na figura 4.

A constante de associação dímero – tetrâmero do estado ligado ( ${}^4K_2$ ) determinada para a hemoglobina de *Helicops modestus* foi estimada em  ${}^4K_2 = 1,6 \pm 0,17 \times 10^7 M^{-1}$ . Este valor está de acordo com os valores reportados na literatura, os quais ficam por volta de  ${}^4K_2 = 1,0 \times 10^6 M^{-1}$  (Valdes *et al.*, 1978; Ackers, 1992; Nenortas & Beckett, 1994; Dumoulin *et al.*, 1997; Manning *et al.*, 1996) e com os valores obtidos em nosso laboratório para a hemoglobina humana ( ${}^4K_2 = 2,0 \pm 0,2 \times 10^6 M^{-1}$ ).

De posse da constante de associação dímero – tetrâmero foi possível estimarmos a porcentagem de tetrâmeros e dímeros *in vitro* e *in vivo*. Nas condições experimentais (*in vitro*, 60 $\mu$ M), a hemoglobina de *Helicops modestus* apresenta 96,8% de tetrâmeros e *in vivo*, ou seja, no interior das hemáceas, 99% de tetrâmeros.

Dumoulin *et al.*, (1997) estudaram o comportamento de dissociação das hemoglobinas humana e fetal. Eles encontraram que a hemoglobina humana possui 40% e a hemoglobina fetal 80% de tetrâmeros em solução, quando a concentração de proteína é igual a 1 $\mu$ M. Nesta concentração, a hemoglobina de *Helicops modestus* apresenta 73% de tetrâmeros em solução.

Sendo assim, os dados de cromatografia analítica de filtração em gel corroboram os dados de estresse osmótico e das propriedades funcionais de ligação de O<sub>2</sub>, de que a hemoglobina de *Helicops modestus* possui a estrutura quaternária tetramérica na condição *in vivo*.



**Figura 4.** Gráfico ilustrando o comportamento do volume de eluição do centróide da hemoglobina humana e de *Helicops modestus* (todas na forma *stripped*) em função da concentração de hemoglobina. Os experimentos foram realizados em tampão TRIS-HCl pH 8,0 a temperatura ambiente, monóxido de carbono (CO) foi aplicado em todas as amostras, a fim de prevenir a formação de meta-hemoglobina.

Os dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo também sugerem que a hemoglobina de *Helicops modestus* é tetramérica, uma vez que o raio de giro determinado para esta proteína foi de 25 $\Delta$ , enquanto que o raio de giro determinado, por

nós, para a hemoglobina humana tetramérica foi de 23 $\Delta$  e para a hemoglobina humana dimérica foi de 17 $\Delta$ , tanto em pH 7,0 como em pH 8,0.

Conrad *et al.*, (1969) determinaram o raio de giro da oxi-hemoglobina humana, os valores obtidos pelos autores foi de 24,7 $\Delta$ , sendo um valor muito próximo do obtido por nós para a hemoglobina de *Helicops modestus* e hemoglobina humana.

Sendo assim, refutamos o modelo estrutural de dissociação proposto na literatura, para a hemoglobina de *Liophis miliaris* e, posteriormente, estendido para outras hemoglobinas de serpentes.

**Agradecimentos:** Agradecemos ao Prof. Dr. Arif Cais pela enorme contribuição na aquisição dos espécimes de serpentes. Agradecemos também a FAPESP pelo apoio financeiro destinado a este projeto de pesquisa (projeto número: 98/12.807-4). Agradecemos também à técnica Eliani I. N. Ohira pelo apoio técnico durante o desenvolvimento desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, D. J.; KELLOGG, G. E.; HOLT, J. M.; ACKERS, G. K. Hydrophobic Analysis of the Non-covalent Interactions Between Molecular Subunits of Structurally Characterized Hemoglobins. *J. Mol. Biol.* v. 272, p. 613-632, 1997.
- ACKERS, G. K. **The Proteins**, 1. ed. New York: Academic Press, p. 1-94, 1975.
- ACKERS, G. K.; DOYLE, M. L.; MYERS, D.; DAUGHERTY, M. A. Molecular Code for Cooperativity in Hemoglobin. *Science*. v. 255, p. 54-63, 1992.
- BALDWIN, J.; CHOTHIA, C. Hemoglobin: The Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism. *J. Mol. Biol.* v. 129, p. 175-220, 1979.
- BONAFE, C. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MATSUURA, M. S. A. ATP-induced Tetramerization and Cooperativity in Hemoglobin of Lower Vertebrates. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 1196-1198. 1999.
- BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; FOCESI Jr., A.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; CASHON, R. E. Functional Properties of the Hemoglobin from

the South american *Mastigodryas bifossatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 109A, p. 1085-1095. 1994.

CHIANCONE, E. Dissociation of Hemoglobin into Subunits. *J. Biol. Chem.* v. 243, p. 1212-1219, 1968.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSEGIAN, V. A. Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin. *Science.* v. 256, p. 655-659. 1992.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 4895-4899, 1996.

COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V. Novel Allosteric Conformation of Human Hb Revealed by the Hydration and Anion Effects on O<sub>2</sub> Binding. *Biochemistry.* v. 38, p. 11741-11748, 1999.

CONRAD, H.; MAYER, A.; THOMAS, H. P.; VOGEL, H. X-ray Small-angle Scattering from Aqueous Solutions of Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* v. 41, p. 225-229, 1969.

DUMOULIN, A.; MANNING, L. R.; JENKINS, W. T.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. Exchange of Subunit Interface Between Recombinant Adult and Fetal Hemoglobins. Evidence for a Functional Inter-Relationship Among Regions of the Tetramer. v. 272, p. 31326-31332, 1997.

FOCESI JÚNIOR., A.; OGO, S. H.; MATSUURA, M. S. A.; SAY, J. C. Further evidence of Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobin from *Liophis miliaris*. *J. Med. Biol. Res.* v. 20, p. 861-864. 1987.

FOCESI JÚNIOR, A.; SATIE, H.; MATSUURA, M. S. A. Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobins from *Liophis miliaris*. II. Evidence with the Stripped Proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 96B, p. 119-122, 1990.

FOCESI JÚNIOR, A.; BONILLA, G. O.; NAGATOMO, C. L.; MATSUURA, M. S. A. Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobin from *Liophis miliaris*. III. The Phenomenon in Snake Species of Different Evolutionary Levels. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 103, p. 985-989, 1992.

GIARDINA, B.; AMICONI, G. Measurement of Binding of Gaseous and Nongaseous ligands to Hemoglobins by Conventional Spectrophotometric Procedures. *Meth. Enzymol.* v. 76, 1981. 417 p.

- GLATTER, O. A New Method for the Evaluation of Small Angle Scattering Data. *J. Appl. Cryst.* v. 10, p. 415 - 421, 1977.
- GLATTER, O. Computation of distance distribution functions and scattering functions of models for small angle scattering experiments. *Acta Phys. Aust.* v. 52, p. 243-256, 1980.
- GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**. New York: Academic Press Inc, 1982.
- KAVANAUGH, J. S.; ROGERS, P. H.; CASE, D. A.; ARNONE, A. High-Resolution X-ray Study of Deoxyhemoglobin Rothschild 37 $\beta$ Arg: A Mutation that Creates an Intersubunit Chloride-Binding Site. *Biochemistry.* v. 31, p. 4111–4121, 1992.
- MANNING, L. R.; JENKINS, W. T.; HESS, J. R.; VANDEGRIFF, K.; WINSLOW, R. M.; MANNING, J. M. Subunit Dissociations in Natural and Recombinant Hemoglobins. v. 5, p. 775-781, 1996.
- MATSUURA, M.S.A., OGO, S.H.; FOCESI Jr., A. Dimer-tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*-I. Effect of organic polyphosphate. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 86, p. 683-687. 1987.
- MATSUURA, M. S.; FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The Amino Acid Sequence of the Alpha and Beta Chains of Hemoglobin from the Snake, *Liophis miliaris*. *J. Biol. Chem.* v. 264, p. 5515-5521, 1989.
- NENORTAS, E.; BECKETT, D. Reduced-Scale Large-Zone Analytical Gel Filtration Chromatography for Measurement of Protein Association Equilibrium. *Analytical Biochemistry.* v. 222, p. 366-373, 1994.
- NICHOLS, W. L.; ZIMM, B. H. E TEN EYCK, L. F. *Conformation-invariant Structure of the  $\alpha_1\beta_1$  Human Hemoglobin Dimer*. *J. Mol. Biol.* v. 270, p. 598 - 615. 1997.
- OLIVIERI, J. R.; CRAIEVICH, A. F. The Subdomain Structure of Human Serum Albumin in Solution under Different pH Conditions Studied by Small Angle X-ray Scattering. *Eur. Biophys. J.* v. 24, p. 77-84, 1995.
- OYAMA JÚNIOR., S.; NAGATOMO, C. L.; BONILLA, G. O.; MATSUURA, M. S. A.; FOCESI JÚNIOR., A. *Bothrops alternatus* Hemoglobin Components. Oxygen Binding Properties and Globin Chain Hydrophobic Analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 105B: p. 271-275. 1993.
- PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T.; WILLIANSOM, D. The Chloride Effect in Human hemoglobin: A New Kind of Allosteric Mechanism. *J. Mol. Biol.* v. 239, p. 555-560. 1994.

TOSQUI, P.; SEIXAS, F. A. V.; COLOMBO, M. F. On the stabilization of intermediate allosteric states of human and bovine hemoglobin by DPG revealed by the osmotic stress method. In: XXIX Annual Meeting of Biochemistry and Molecular Biology Brazilian Society. M-46, p. 130, 2000 Caxambu - Brazil.

VALDES, R.; VICKERS, L. P.; HALVORSON, H. R.; ACKERS, G. K. Reciprocal Effects in Human Hemoglobin: Direct Measurement of the Dimer-Tetramer Association Constant at partial Oxygen Saturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, p. 5493-5496, 1978.

VOET, D.; VOET, J. G. E PRATT, C. W. Fundamentos de Bioquímica, 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 166-167.

Prof. Dr. Fábio R. Lombardi  
e-mail: renatolombardi@ig.com.br  
UNIJALES – Centro Universitário de Jales – Unidade Central  
Fone (17) 3622-1620  
Av. Francisco Jalles, n.º 1.851  
CEP: 15700-000  
Jales - SP