



ESTUDOS CINÉTICOS E ELETROQUÍMICOS DA HEMOGLOBINA DE *GLOSSOSCOLEX PAULISTUS*

Regina P. da Silva
Francisco A. de O. Carvalho

Agência financiadora: CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Ciências exatas e da terra/Química

1. INTRODUÇÃO

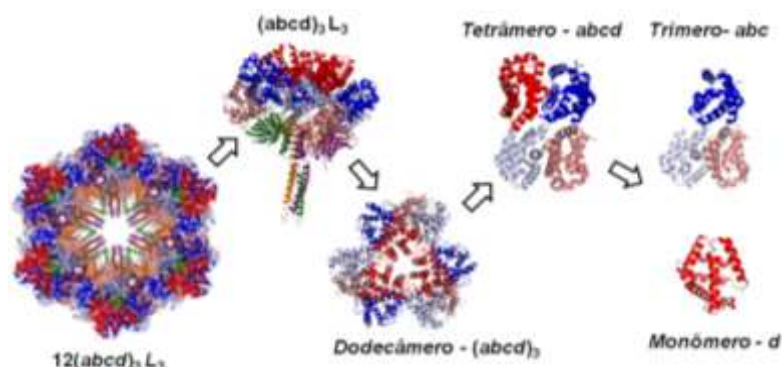
A hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) é extraída de uma minhoca endêmica das cidades de Rio Claro e Piracicaba, no interior de São Paulo (SANTIAGO et al, 2008). A espécie conhecida cientificamente por *Glossoscolex paulistus* pertence ao filo Anelídea, à classe Oligochaeta e à família *Glossoscolecidae* (RIGHI et al, 1971).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse em estudar as hemoglobinas extracelulares gigantes, devido à alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, alta cooperatividade e afinidade para ligar oxigênio (ROUSSELOT, 2006). Tais propriedades tornam as mesmas bastante singulares e interessantes para estudos com aplicações biotecnológicas. Grupos de pesquisas vêm estudando as hemoglobinas de *Lumbricus terrestris* (HbLt) *Arenicola marina* (HIRSCH et al, 1997) focalizando estas aplicações. Recentemente, estudos tem mostrado que a HbGp possui atividade peroxidase, sendo, portanto, capaz de catalisar várias moléculas, tais como o peróxido de hidrogênio.

A HbGp é uma hemoglobina extracelular gigante que apresenta massa molecular de 3,6 MDa determinada por ultracentrifugação analítica (AUC) (CARVALHO et al, 2008). Estudos por AUC e espectrometria de massas (OLIVEIRA et al, 2007) sugerem que a HbGp é similar a HbLt. Tendo em vista essa similaridade pode-se propor que a macroproteína em estudo apresenta uma disposição organizada envolvendo 144 cadeias polipeptídicas com grupo heme e 36 cadeias polipeptídicas sem grupos heme, denominadas de cadeias *Linker* (ROYER et al, 2001). A estrutura oligomérica é composta de dois discos hexagonais, que formam uma espécie de bicamada hexagonal. Cada camada é constituída por seis unidades (protômeros) de massa molecular 1/12 da molécula íntegra (ROYER et al, 2006) (Figura 1).

A HbGp é composta por quatro subunidades, com enovelamento típico para globinas, que contém o grupo heme, denominadas de cadeias *a*, *b*, *c* e *d*, sendo que as subunidades *a*, *b* e *c* estão ligadas por pontes dissulfeto formando o trímero *abc* e a subunidade *d* mantêm-se na forma monomérica (OLIVEIRA et al, 2007). A proteína possui também três cadeias polipeptídicas Linkers distintas (CARVALHO et al, 2011). O papel destas subunidades está provavelmente relacionado com a manutenção da estabilidade da estrutura oligomérica. A caracterização através de estudos por espectrometria de massas, MALDI-TOF-MS, e AUC, forneceu informação sobre as massas moleculares (*MM*) das subunidades da HbGp, observando que o monômero *d*, o trímero *abc* e as cadeias linkers possuem valores de *MM* de 16,6 kDa, 52 kDa e 26 – 32 kDa, respectivamente (CARVALHO et al, 2011).

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



Fonte: Adaptado de Royer et al, 2006.

Grandes avanços na caracterização da HbGp, e sobre o efeito de agentes desnaturantes, variação de temperatura e pH, adição de agentes químicos surfactantes, guanidina e ureia nos processos de dissociação, desnaturação e agregação da HbGp foram obtidos. No entanto, pouco é conhecido sobre mudanças estruturais e as interações a nível molecular destes agentes com a estrutura desta proteína. Tendo isto em vista, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a cinética do processo de desnaturação desta proteína em função da concentração de guanidina, a fim de fornecer informações importantes sobre o mecanismo de desenovelamento desta macromolécula.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Absorção Óptica Uv-Vis

A HbGp foi preparada utilizando sangue fresco de minhocas da espécie *Glossoscolex paulistus*, como reportado na literatura (SANTIAGO et al, 2010). Inicialmente, foi preparado um estoque 3,0 mg/mL em tampão tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0 a partir de um estoque concentrado de proteína 24 mg/mL. Num mesmo tampão foi preparado uma solução estoque 5,0 mol/L de cloridrato de guanidina (GuHCl). Amostras de proteína 0,2 mg/mL expostas em diferentes concentrações de desnaturantes na faixa de 1,0 a 2,0 mol/L foram preparadas. No intuito de monitorar o início da reação foram adicionadas alíquotas de tampão e GuHCl seguidas de homogeneização e posteriormente segundos antes da reação foi adicionado o volume correspondente de proteína.

Os experimentos foram realizados num espectrofotômetro UV-VIS da Biospectro, monitorando a variação da absorbância da amostra no comprimento de onda 414 nm em função do tempo. Realizou-se todos estes experimentos em triplicatas.

As constantes de velocidades para cada concentração de desnaturante foram obtidas a partir de ajustes dos dados experimentais no programa *origin*, utilizando a combinação de cinéticas de primeira ordem com diferentes constantes de velocidades, que caracterizam os vários processos resultantes da interação da proteína com os desnaturantes. A equação usada nas análises dos dados é mostrada a seguir:

$$A = \Delta A_1 e^{-k_1 t} + \Delta A_2 e^{-k_2 t} + A_0 \quad (\text{Equação 1})$$

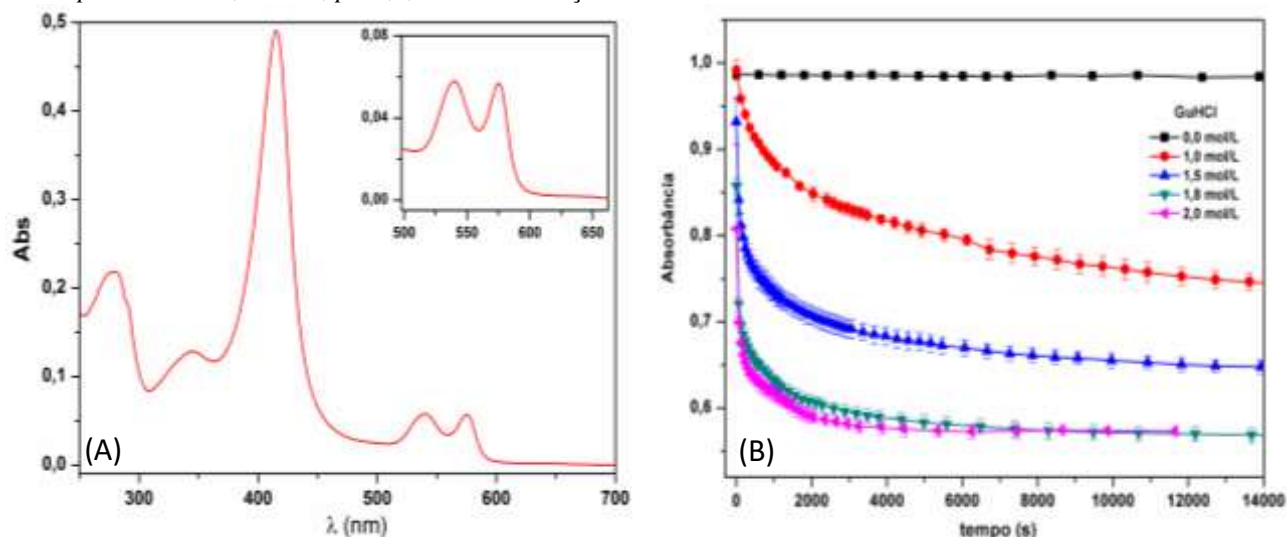
onde k_1 e k_2 são as constantes de velocidade de primeira ordem para os processos de oxidação rápido e lento, respectivamente. ΔA_1 e ΔA_2 são as variações de absorbância e A_0 é a absorbância no infinito. Os ajustes através da equação 1 apresentam valores de $R^2 \geq 0,994$, e indicam que a oxidação da HbGp na presença de GuHCl é caracterizado por um processo bi exponencial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* recém purificada apresenta um único pico centrado em torno de 73 mL característico da proteína nativa, não dissociada, corroborando estudos anteriores (Dados não mostrados) (CARVALHO et al, 2008). Outrossim, o estado de oxidação da proteína foi avaliado a partir da análise dos espectros de absorção óptica da proteína purificada (Figura 3A). O espectro da HbGp apresenta três bancas característica da proteína na forma oxi- reduzida, ou seja, o ferro do grupo heme no estado de oxidação 2, (Fe^{2+}) e a sexta coordenação do anel porfirínico ocupada pelo ligante oxigênio O_2 ,

que é característico da HbGp nativa. Esta espécie é caracterizada por uma banda intensa em torno de 415 nm denominada banda de Soret e duas outras menos intensas, as bandas Q (alfa e beta) centradas, respectivamente, em 540 nm e 575 nm. Outros dois picos centrados em 235-250 nm e 280-290 nm, característicos de proteínas, são devidos às transições eletrônicas envolvendo as ligações peptídicas (235-250 nm), e o segundo, devido à absorção dos aminoácidos aromáticos: tirosina, fenilalanina e triptofano.

Figura 3: (A) Espectro de absorção óptica da oxi-HbGp, 0,1 mg/mL, pH 7,0, medido a 25 °C. O inserto mostra a região das bandas Q na faixa de comprimento de onda de 500 a 670 nm. (B) Curvas cinéticas da auto-oxidação da oxi-HbGp em tampão tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0, nas concentrações de GuHCl indicadas.



A Figura 3B mostra a variação da absorvância (*abs*) da HbGp em função do tempo em diferentes concentrações da GuHCl. Na ausência de desnaturante os valores de *abs* permanece constante sugerindo que nenhuma alteração ocorre no ambiente do heme. Segundo STRAND e colaboradores (2004), neste pH a proteína se encontra na forma íntegra, onde o estado oligomérico é altamente preservado. Entretanto, o aumento da concentração do desnaturante induz um decréscimo nos valores de absorvância em função do tempo. Este comportamento indica que o GuHCl favorece a auto-oxidação da proteína. O nucleófilo que atua no processo de auto-oxidação é a molécula de água, que seria então deslocada pelo imidazol da histidina distal para a formação do hemicromo, que é uma espécie final comum à auto-oxidação de várias hemoproteínas (TSAI et al, 2000).

As constantes de velocidades em diferentes concentrações de GuHCl foram obtidas através dos ajustes dos dados experimentais (Figura 3B), e são reportados na Tabela 1. Na presença de 1,0 mol/L de GuHCl as constantes de velocidades do processo rápido e lento, k_1 e k_2 , são $(20 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O aumento da concentração de GuHCl favorece ambos os processos que são caracterizados por k_1 e k_2 com valores de $(239 \pm 12) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $(9,0 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. As constantes k_1 e k_2 são atribuídas aos processos de oxidação das subunidades, monômeros *d* e trímeros *abc*, que são predominantes em altas concentrações de desnaturantes. Nestas condições, o raio de giro diminui para aproximadamente 30 Å, o que realmente indica a separação das subunidades. Assim, para concentrações maiores de GuHCl uma espécie pentacoordenada é observada, o que sugere uma maior acessibilidade do solvente ao bolsão do heme promovendo a transição entre as espécies hemicromo e pentacoordenado (MOREIRA, 2005).

Tabela 1: Constantes cinéticas de auto-oxidação da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* no pH 7,0 em função da concentração de cloridrato de guanidina.

[GuHCl] mol/L	$k_{1obs} \times 10^{-4} (\text{s}^{-1})$	$k_{2obs} \times 10^{-4} (\text{s}^{-1})$
0,0	-	-
1,0	20 ± 1	$1,5 \pm 0,1$
1,5	117 ± 7	$4,5 \pm 0,2$
1,8	210 ± 10	$6,1 \pm 0,2$
2,0	239 ± 12	$9,0 \pm 0,3$

4. CONDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostra que o decréscimo na intensidade de absorção do heme está associado à perda de estrutura na proteína. O processo de auto-oxidação da HbGp na presença de GuHCl nas concentrações investigadas ocorre em duas etapas: um processo rápido e um lento associados a auto-oxidação do ferro das

subunidades monoméricas e triméricas. Outrossim, o aumento da concentração do desnaturante favorece ambos os processos.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, F.A.O.; SANTIAGO, P.S.; BORGES, J.C.; TABAK, M. *Anal. Biochem.*, v. 385, p. 257-263. 2008.
- CARVALHO, F.A.O.; CARVALHO, W.P.; SANTIAGO, P.S.; TABAK, M. *Process Biochem.*, v. 46, p. 2144-2151. 2011.
- HIRSCH, R.E.; JELICKS, L.A.; WITTENBERG, B.A.; KAUL, D.K.; SHEAR, H.L.; HARRINGTON, J.P. *Artif. Cell. Blood. Sub.*, v. 25, p. 439-444. 1997.
- MOREIRA, L. M. **Espécies formadas no centro férrico da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* em função do pH: troca de ligantes e desenovelamento polipeptídico.** São Carlos, 2005 191p. Tese de doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, M.S.; MOREIRA, L.M.; TABAK, M. *INTERN. J. BIOL. Macrom.*, v.40, p. 429-436. 2007.
- RIGHI, G. *Arquivos de Zoologia*, v. 20.29, p. 1-95. 1971.
- ROYER, W.E.; KNAPP, J.E.; STRAND, K.; HEASLET, H.A. *Trends Biochem. Sci.*, v. 26, p. 297-304. 2001.
- ROYER, W.E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J.E.; **Bhyravbhatla, B structure**, v. 14, p. 1167-1177. 2006.
- ROUSSELOT, M.; DEL'PY, E.; LA ROCHELLE, C.D.; LAGENTE, V.; PIROW, R.; REES, J.; HAGEGE, A.; LE GUEN, D.; HOURDEZ, S.; ZAL, F. *Biotechnology J.*, v. 1, p. 333-345. 2006.
- SANTIAGO, P.S.; MOURA, F.; MOREIRA, L.M.; DOMINGUES, M.M.; SANTOS, N.C.; TABAK, M. *Biophys. J.*, v. 94, p. 2228-2240. 2008.
- SANTIAGO, P.S.; CARVALHO, F.A.O.; DOMINGUES, M.M.; CARVALHO, J.W.P.; SANTOS, N.C.; TABAK, M. **Isoelectric Point Determination for *Glossoscolex paulistus* Extracellular Hemoglobin: Oligomeric Stability in acidic pH and Relevance to Protein-Surfactant Interactions.** *Langmir*. 2010.
- STRAND, K.; KNAPP, J.E.; BHYRAVBHATIA, B.; ROYER JR., W.E. *J. Mol. Biol.* v. 344, p. 119-134. 2004.
- TSAI, C.; FANG, T.; Ho, C. *Biochemistry*, v. 39: p. 13719-13729. 2000.