

## ESPÉCIES FÉRRICAS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELULAR DE *GLOSSOSCOLEX PAULISTUS* COMO FUNÇÃO DO PH: UM ESTUDO DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE) SOBRE A IRREVERSIBILIDADE DA TRANSIÇÃO HEME

Leonardo M. Moreira<sup>a,b,\*</sup>, Vanessa J. S. V. Santos, Alessandra L. Poli<sup>a</sup>, Juliana P. Lyon<sup>b</sup>,  
Jamil Saade<sup>b</sup>, Antonio J. Costa-Filho<sup>c</sup>, Hidetake Imasato<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP,

<sup>c</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil.

**Resumo:** O presente trabalho está focado na transição das espécies heme férricas da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) induzida por sucessivas alterações de pH, envolvendo os meios ácido e alcalino. A ressonância Eletromagnética Paranuclear (RPE) foi utilizada para analisar as transições que ocorrem na primeira esfera do íon férrico como consequência da mudança de ligantes em ampla faixa de pH. Os resultados demonstraram um grau significativo de irreversibilidade nas transições heme, considerando-se que as espécies finais, que não apresentam qualquer alteração após 24 h de sua formação, são bastante diferentes das espécies iniciais. As espécies mais estáveis são a bis-histidina e espécies pentacoordenadas.

**Palavras-chave:** hemoglobina extracelular; *Glossoscolex paulistus*; Ressonância Paramagnética Eletrônica; heme férrico; hemicromo; irreversibilidade de transição, desnaturação.

**Área do Conhecimento:** Biofísica

### Introdução

A Hemoglobina gigante extracelular representa o ápice de complexidade das hemeoproteínas que carregam oxigênio (VINOGRADOV, 2004). Isso se deve a sua extraordinária massa supramolecular de aproximadamente 3,6 Mda, alta cooperatividade, estabilidades redos e oligomérica, etc.

A hemoglobina do anelídeo *Lumbricus terrestris* (HbLt) e a eletrocruorina mais estudada. A estrutura quaternária dessa proteína apresenta aproximadamente 180 cadeias polipeptídicas, envolvendo 144 subunidades globina e 36 cadeias não globina. O grupo heme, que é responsável pelo transporte do oxigênio molecular, está presente apenas nas globinas, enquanto as subunidades não globina, chamadas cadeias Linker (L1, L2, L3, L4) apresentam apenas função estrutural. A organização oligomérica consiste em dois discos hexagonais superpostos, sendo conhecida como “modelo do bracelete”. Cada bracelete contém doze dodecâmero, cada vértice hexagonal está associado a um dodecâmero, sendo que cada dodecâmero é constituído de três tetrâmeros abcd. Por sua vez, cada tetrâmero abcd é constituído por um trimero abc, que apresenta suas subunidades conectadas por pontes dissulfídicas, e um monômero d que mantido no tetrâmero por interações fracas.

A hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) pertence à mesma classe que a HbLt e exibe características estruturais semelhantes a dessa hemoglobina (OLIVEIRA et al., 2007). *G. paulistus* é um anelídeo encontrado em Araras, Rio Claro e Piracicaba, cidades do estado de São Paulo, Brazil. Mudanças no pH podem alterar drasticamente as configurações espaciais das cadeias polipeptídicas, bem como a primeira esfera de coordenação do centro férrico metálico. De fato, uma dissociação alcalina intensa está bem caracterizada em pH 9,0, assim como, a conformação nativa da HbGp é bem conservada em pH 7,0 (SANTIAGO et al., 2007; MOREIRA et al., 2008-a).

No presente trabalho, a possível reversão da transição heme da HbGp férrica em ampla faixa de pH é analisada com o objetivo de avaliar a influencia das cadeias polipeptídicas na transição heme. Essa proposta pode ser interessante pra melhorara a compreensão dos mecanismos de desenovelamento das hemeoproteínas bem como sua influencia na reversibilidade/ irreversibilidade das espécies férricas do bolsão heme.

### Material e Método

Preparo da proteína: A hemoglobina extracelular de *G. paulistus* foi preparada utilizando sangue

fresco extraído de minhocas. O sangue foi purificado por ultracentrifugação e filtração em coluna de gel Sephadex G-200 em pH 7.0 (IMASATO et al., 1995).

Medidas de RPE: Os espectros de RPE ( banda X , 9,5 GHz) foram medidos em um espectrômetro Bruker Elexsys E580 a 4 e 12 K. A temperatura foi controlada por um sistema criogênico Oxford ITC 503. As amostras RPE (50 $\mu$ L) contendo aproximadamente 20 mg mL<sup>-1</sup> da proteína foram congelados por imersão em nitrogênio líquido e então colocadas na cavidade retangular do espectrômetro. O poder da microonda foi de 4.0 mW, e outras condições de aquisição, como modulação da amplitude foram ajustados para alcançar uma relação sinal-ruído sem distorção do sinal ou saturação. Todos os dados de RPE foram corrigidos pela subtração de uma base correspondente ao sinal de RPE do tampão. Com o objetivo de avaliar uma seqüência específica de transições, a segunda transição do heme férrico através de alterações de pH foi desenvolvida três horas após a primeira transição para cada conjunto de medidas de RPE. Subseqüentemente, após 6 horas da primeira medida, uma análise espectral definitiva foi realizada para avaliar se as espécies finais sofreram qualquer alteração espectral.

## Resultados e Discussão

A figura 1 demonstra um espectro axial típico correspondente a uma espécie férrica aquometa com o par de picos a g~6,08 e 2,01, o qual é encontrado em pH 7.0. Esta espécie, que apresenta uma molécula solvente de água coordenando o íon férrico como um sexto ligante desse centro metálico, é praticamente “pura” no respectivo espectro, sugerindo uma grande estabilidade desta espécie em pH 7,0, bem como um caráter altamente conservado na montagem da proteína quando comparado com a forma ferrosa nativa do HbGp.

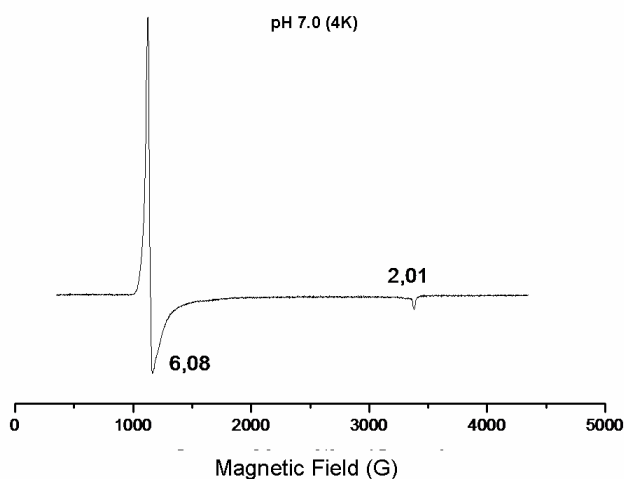


Figura 1- Espectro RPE da HbGb em pH 7.0 com os respectivos valores g indicados em cada pico espectral

A figura 2 apresenta vários espectros de RPE obtidos na faixa de pH ácido de maneira convencional, isto é, as transições foram desenvolvidas de forma direta, como 7.0→6.0, 7.0→5.0 etc. Esta figura é bastante representativa devido a transição evidente que ocorre abaixo do pH 4,0. De fato, é possível observar uma mudança espectral mais acentuada entre os espectros obtidos nos valores de pH 4,0 e 3,5. Em um artigo publicado anteriormente, uma transição similar nessa faixa de pH também foi detectada por UV-vis (MOREIRA et al., 2006). Em valores de pH abaixo de 3, 5, as transições se tornam mais drásticas, com picos mais intensos. Dessa forma, essa transição mais drástica pode ser associado ao ponto isoelétrico ácido bem estabelecido da hemoglobina extracelular gigante. Assim, é possível propor que, abaixo do ponto isoelétrico, a predominância de sítios catiônicos afeta a conformação espacial do polipeptídeo.

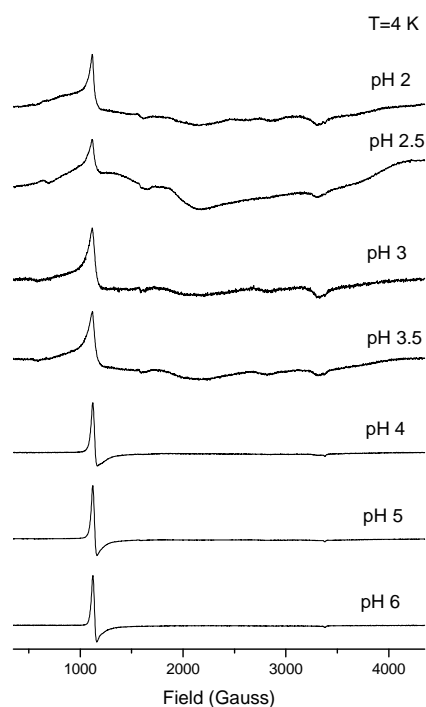


Figura 2- Espectro RPE da HbGb em vários valores de pH ácido obtido através de uma transição simples do pH 7,0.

A figura 3 representa várias transições de pH, envolvendo pequenas alterações, bem como alterações drásticas de pH. As transições

7.0→6.0→7.0, 7.0→5.0→7.0, e mesmo a mudança mais radical 7.0→4.0→8.0, não modificam o espectro original obtido em pH 7,0 de forma significativa. Dessa forma, podemos propor a existência de dois pontos decisivos que determinam o grau de transição entre as espécies heme férricas induzidas por pH. Assim, iniciando a análise a partir da neutralidade, ocorre um processo predominantemente irreversível quando os valores de pH de 9,0 e 3, 5 são excedidos. Nessas três transições 7.0→6.0→7.0, 7.0→5.0→7.0, 7.0→4.0→8.0, a flutuação entre valores de pH não alcança os valores mais decisivos de 9,0 e 3, 5, com relação a estabilidade estrutural da conformação espacial nativa. Estes valores representam alterações drásticas para a HbGp que alteram substancialmente o seu arranjo polipeptídico em volta do bolsão heme, tornando as alterações na primeira esfera de coordenação um processo definitivo de desenovelamento, e afetando, por consequência os ligantes coordenados ao íon férrico.

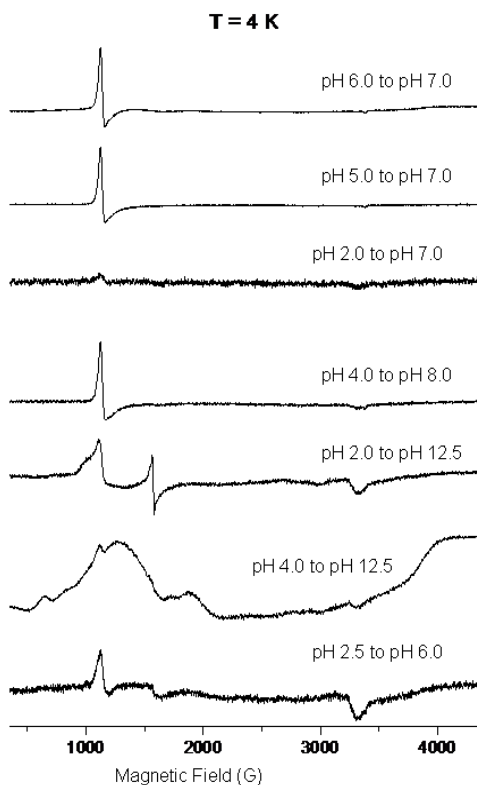


Figura 3- Espectro RPE da HbGp em vários valores de pH após um processo drástico de transição de pH com valores de pH ácido como passos intermediários

#### Conclusão

O presente trabalho demonstra que as transições do heme férrico da HbGp possuem predominantemente um caráter irreversível. De

fato, em todas as faixas de pH avaliadas, fica evidente que a transição de pH em retorno ao pH original não gera a configuração inicial dos heme férricos. Assim, a transição de pH promove alterações significativas no bolsão heme, bem como nas cadeias polipeptídicas, o que inibe o rearranjo para a configuração inicial no pH original. Isso ocorre como consequência de impedimentos estéricos e alterações mecânicas do arranjo da subunidade bem como da coordenação de alguns ligantes de campo forte endógenos, que impedem a obtenção da organização inicial. A intensa dissociação alcalina e ponto isoelétrico ácido determinam pontos decisivos de inflexão, que, quando excedidos acentuam a irreversibilidade das transições de heme férrico.

#### Referências

1. VINOGRADOV, S.N., 2004. The Stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris*. *Micron*, 35,127-129.
2. OLIVEIRA, M.S., MOREIRA, L.M., TABAK, M., 2007. Partial Characterization of Giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: A MALDI-TOF-MS study, *Int. J. Biol. Macromol.*, 40, 429-436.
3. MOREIRA, L.M., SANTIAGO, P.S., ALMEIDA, E.V., TABAK, M., 2008a. Interaction of giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) with zwitterionic surfactant *N*-hexadecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS): Effects of oligomeric dissociation. *Colloids Surf. B*, 61,153-163.
4. SANTIAGO, P.S., MOREIRA, L.M., ALMEIDA, E.V., TABAK, M., 2007. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin (HbGp) upon interaction with cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1770, 506-517.
5. IMASATO, H., TINTO, M.H., PERUSSI, J.R., TABAK, M., 1995. Fluorescence studies of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 217-226.
6. Moreira, L.M., Poli, A.L., Costa-Filho, A.J., Imasato, H., 2006. Pentacoordinate and Hexacoordinate Ferric Hemes in Acid Medium: EPR, Uv-vis and CD studies of the Giant

Extracellular Hemoglobin of  
Glossoscolex paulistus. Biophys.  
Chem., 124, 62-72.