

## **QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo**

### **Guia de estudos**

#### ***Aula 4: Hemoglobina e tamponamento do sangue; Estratégias de análise de proteínas***

Continue se empenhando nas leituras básicas, e se aprofunde nos temas conforme necessidade. Lembre-se que na página 16 do guia da aula 3, há o tema “3.3 trabalhando com proteínas”, o qual é uma leitura complementar desta aula 4.

Atente-se para os itens 3.4 e 3.5 (página 17 do guia), nos quais a hemoglobina fetal e hemoglobinas anormais são abordadas, e para o quadro 5.1 (páginas 30 e 31 do guia), aonde se comenta os efeitos do monóxido de carbono na hemoglobina.

Na última página do guia há um pequeno texto (uma página) de leitura básica sobre adaptação a hipóxia (baixa concentração de oxigênio) observada em elevadas altitudes.

## Proteínas desnaturadas podem renaturar

Retiradas as condições desnaturantes, algumas proteínas reassumem sua conformação nativa — este processo chama-se *renaturação*. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional de uma proteína é consequência de sua estrutura primária, ou seja, é determinada, unicamente, por sua sequência de aminoácidos.

Durante muito tempo, admitiu-se que o processo de enovelamento da cadeia polipeptídica recém-sintetizada nos ribossomos era autônomo, não requerendo nenhum fator adicional, nem fornecimento de energia. Esta visão passou a ser questionada diante da constatação de que a velocidade e a eficiência da renaturação *in vitro* são muito menores do que *in vivo*. Realmente, na década de 1990, demonstrou-se que as células dispõem de um aparato muito eficiente para assessorar a proteína durante a “montagem” de sua estrutura nativa. Este aparato é constituído por uma família de proteínas denominadas *chaperonas*<sup>6</sup>. Elas ligam-se a proteínas nascentes e, por meio de etapas cíclicas, sustentadas por hidrólise de ATP, impedem ou revertem interações inadequadas de regiões potencialmente complementares. Também facilitam o transporte de proteínas através de membranas desde o citosol até o destino final, seja a secreção ou a inclusão em uma organela.

As proteínas assessoras possibilitam, ainda, a estabilização de proteínas em condições desfavoráveis, como altas temperaturas etc. As chaperonas foram identificadas na década de 1970 em *Drosophila melanogaster* como proteínas de choque térmico, *Hsp* (de *Heat shock protein*), induzidas quando as células eram submetidas a altas temperaturas.

As proteínas assessoras são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas desde em bactérias até em mamíferos. Distúrbios no processo de enovelamento da cadeia proteica, e a consequente agregação de moléculas, estão envolvidos em diversas condições patológicas, como as doenças de Alzheimer, de Parkinson, aquelas causadas por príons (Seção 2.4) etc.

### A substituição de aminoácidos pode alterar a função das proteínas

Uma mutação que resulte na substituição de um aminoácido em uma posição crítica na molécula da proteína pode ter consequências danosas para o desempenho da sua função. O exemplo clássico é a substituição, nas cadeias  $\beta$  da hemoglobina, de um resíduo de glutamato, cuja cadeia lateral polar negativa localiza-se na superfície externa da molécula, por valina, com grupo R apolar. As moléculas da hemoglobina substituída, quando desoxigenadas, agregam-se devido a ligações hidrofóbicas envolvendo as cadeias laterais apolares de valina. Os agregados formam um precipitado fibroso que distorce as hemácias, que adquirem forma de foice — *sickle*, em inglês — e, por isso, a hemoglobina alterada é chamada de *hemoglobina S*, em contraposição à hemoglobina normal, a *hemoglobina A*. Estas células deformadas obstruem os capilares, impedindo a oxigenação adequada dos tecidos; também são mais frágeis que as normais e sofrem hemólise facilmente (têm meia-vida de 16 a 20 dias em lugar dos 120 dias das hemácias normais), ocasionando anemia grave. A doença é conhecida como *anemia falciforme*, e manifesta-se somente quando a mutação ocorre em homozigose: indivíduos heterozigotos são normais. Outras hemoglobinas mutantes estão analisadas no próximo capítulo.

## 2.9 Purificação de proteínas — Estratégia geral

Início da leitura básica

A purificação de uma proteína inicia-se com a liberação da proteína do material biológico onde ela ocorre — órgãos, tecidos ou células isoladas como hemácias, bactérias e leveduras — pelo rompimento destas estruturas, que pode ser obtido por métodos diversos. A homogeneização mecânica em meio isotônico, por exemplo, produz o maceramento dos tecidos (ou órgãos) e a lise das células, originando um *extrato celular*, constituído por fragmentos de membrana plasmática, organelas (núcleos, mitocôndrias etc.) e o citosol. Os diversos componentes celulares podem ser separados por *fracionamento celular*, um procedimento que consiste em centrifugar o extrato celular em velocidades progressivamente maiores. Geralmente, quanto menor for uma estrutura, maior será a força centrífuga necessária para sedimentá-la; como os componentes celulares diferem em tamanho, eles sedimentarão em velocidades diferentes, podendo, assim, ser separados uns dos outros. Quando a proteína desejada localiza-se apenas em uma das frações obtidas — mitocôndrias, por exemplo — o fracionamento celular propicia uma purificação inicial considerável.

Uma vez conseguida uma preparação contendo a proteína, esta pode ser separada de outras proteínas e de outros tipos de moléculas por métodos que se baseiam em solubilidade, tamanho, carga elétrica ou afinidade por determinados compostos. O método de purificação a ser escolhido dependerá da particular proteína que se pretende isolar e, usualmente, empregam-se combinações sequenciais de diferentes métodos. Frequentemente, o primeiro passo empregado para a separação de proteínas de extratos brutos é a precipitação por adição de sais (sulfato de amônio é o mais comumente usado) ou solventes orgânicos miscíveis com água — a separação, neste caso, baseia-se em diferenças de solubilidade apresentadas pelas proteínas. Estas técnicas permitem uma purificação parcial e devem ser seguidas de outras, mais seletivas, como cromatografia e eletroforese.

A purificação da proteína deve ser monitorada ao longo das diferentes etapas de separação e, para isso, é necessário

dispor de um método que permita detectar e quantificar especificamente a proteína de interesse. Esta situação está exemplificada na Seção 5.5.1, com a purificação de uma enzima. A estratégia descrita para o isolamento de proteínas aplica-se, basicamente, à purificação de muitas outras moléculas biológicas.

Atualmente, proteínas podem ser obtidas por um caminho totalmente diferente, graças ao desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante. O gene que codifica a proteína desejada pode ser isolado das células de origem e expresso em organismos com crescimento rápido, como bactérias e leveduras. Graças às técnicas empregadas, a proteína heteróloga, que na célula original ocorre em concentrações da ordem de 0,002%, passa a representar de 30 a 40% do conteúdo proteico das células recombinantes. Obviamente, esta alta concentração facilita muito o isolamento da proteína.

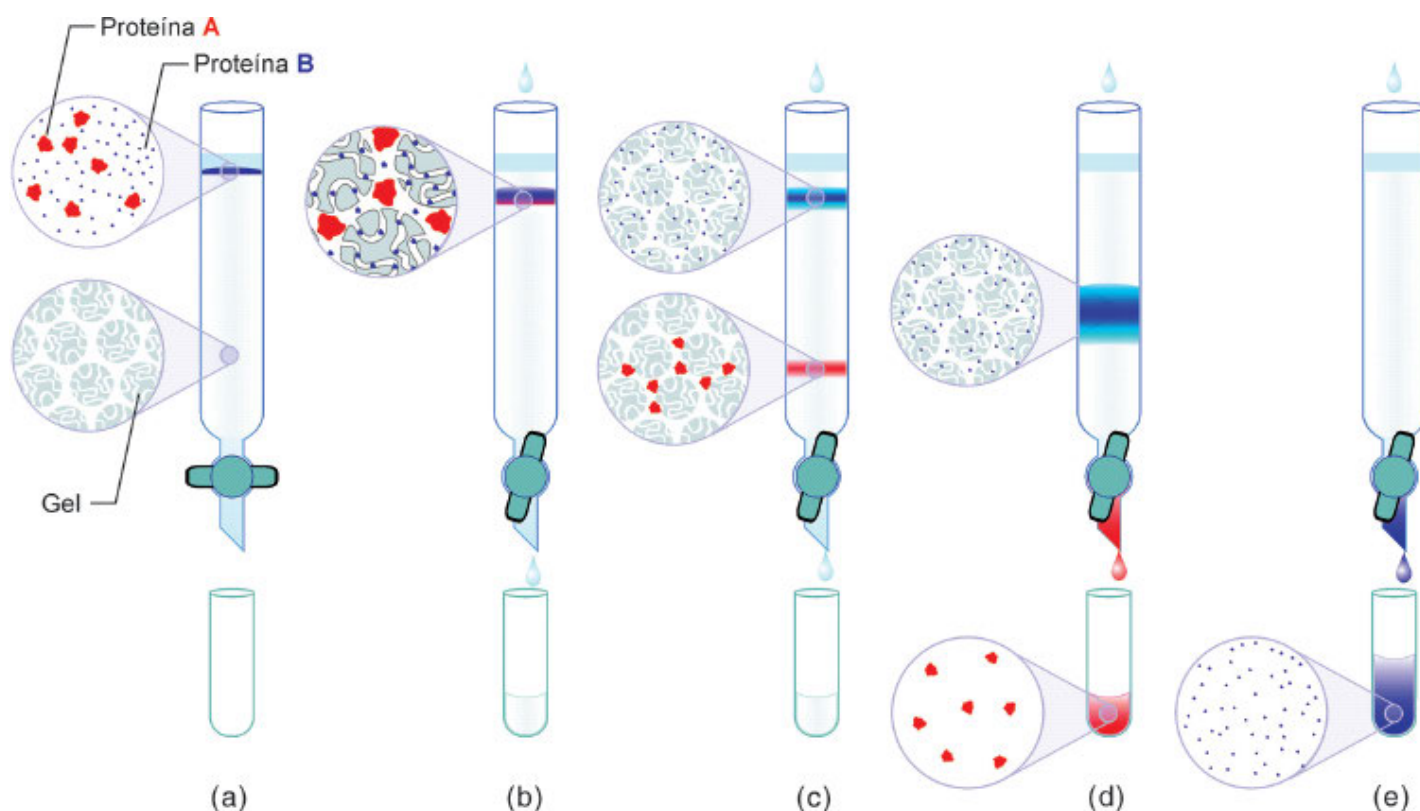
## 2.10 Métodos de purificação de proteínas

### 2.10.1 Cromatografia em coluna

Na *cromatografia em coluna*, uma amostra da mistura de proteínas é aplicada no topo de uma coluna formada por uma matriz hidratada, que pode ser constituída de diversos tipos de materiais, denominados conjuntamente *resinas*. A coluna, então, é eluída com uma solução apropriada para a separação da proteína de interesse. As diferentes proteínas migrarão através da coluna com velocidades diferentes que dependerão do seu grau de interação com a matriz, o que permite a separação. Os vários tipos de cromatografia em coluna disponíveis diferem quanto à matriz utilizada e são classificados de acordo com a propriedade das proteínas que é discriminada pela matriz: tamanho (cromatografia de exclusão), carga iônica (cromatografia de troca iônica) e especificidade de ligação (cromatografia de afinidade).

#### Cromatografia de exclusão (filtração em gel)

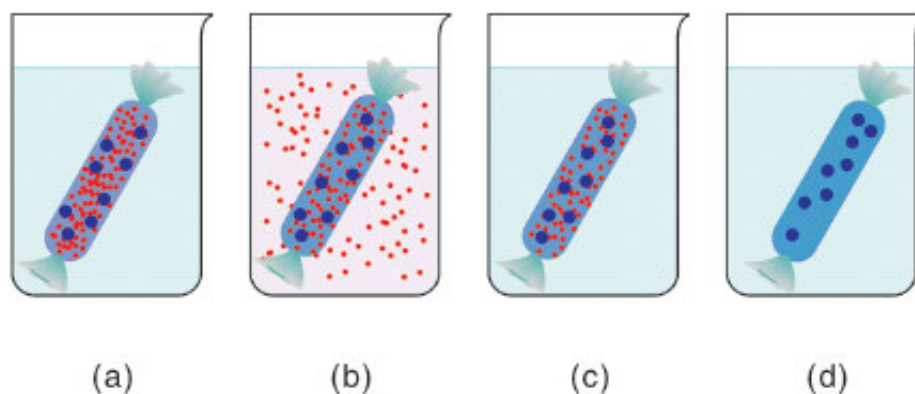
A *cromatografia de exclusão*, também chamada de *cromatografia por filtração em gel*, separa moléculas que diferem quanto ao tamanho, como acontece com as proteínas, cuja massa molar varia de alguns milhares (5.733 para insulina) a milhões (2.800.000 para hemocianina, uma proteína transportadora de oxigênio de certos invertebrados). A matriz, nesta técnica, é um gel constituído por esferas com poros de tamanho definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, ao passo que as maiores, não — são “excluídas”. Deste modo, as moléculas menores percorrem, ao longo de uma coluna com esse material, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão da coluna em primeiro lugar (Figura 2.18). Um material comumente empregado para a fabricação de géis cromatográficos é *dextrana*, um polímero de glicose, comercialmente disponível com o nome de *Sephadex*<sup>®</sup>; este produto é sintetizado com poros de diversos tamanhos, permitindo a exclusão de moléculas com um largo intervalo de massa molar.



**Figura 2.18** Filtração em gel. Uma mistura formada por duas proteínas (A e B), com massas molares diferentes, é aplicada sobre uma coluna de gel formado por esferas porosas (a). As moléculas da proteína menor (proteína B) podem penetrar nos poros das

esferas (b), percorrendo a coluna mais lentamente (c); a proteína maior (proteína A) é, então, eluída primeiramente (d) e a proteína menor, depois (e).

A filtração em gel também pode ser empregada para diminuir a concentração de sais de uma solução de proteína após sua precipitação por adição de altas concentrações de sulfato de amônio. Para tanto, deve-se fazer a filtração em um gel que exclua a proteína, que será eluída primeiramente. Outro processo rotineiramente utilizado para separar proteínas de substâncias de pequena massa molar é a diálise. A *diálise* não é uma técnica cromatográfica, mas é um tipo de filtração molecular. A mistura de proteína e moléculas pequenas é colocada dentro de um saco de material semipermeável, como o celofane (acetato de celulose). Quando o saco de diálise é imerso em tampão, as moléculas proteicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise (Figura 2.19).



**Figura 2.19** Diálise. O saco de diálise contendo a mistura de proteína (azul) e moléculas pequenas (vermelhas) é imerso em um volume grande de solução tampão (a). Como a membrana semipermeável permite a passagem apenas das moléculas pequenas, sua concentração dentro e fora do saco tende a se igualar (b). Após várias trocas de tampão (c), restam apenas as moléculas de proteína dentro do saco de diálise (d).

### Cromatografia de troca iônica

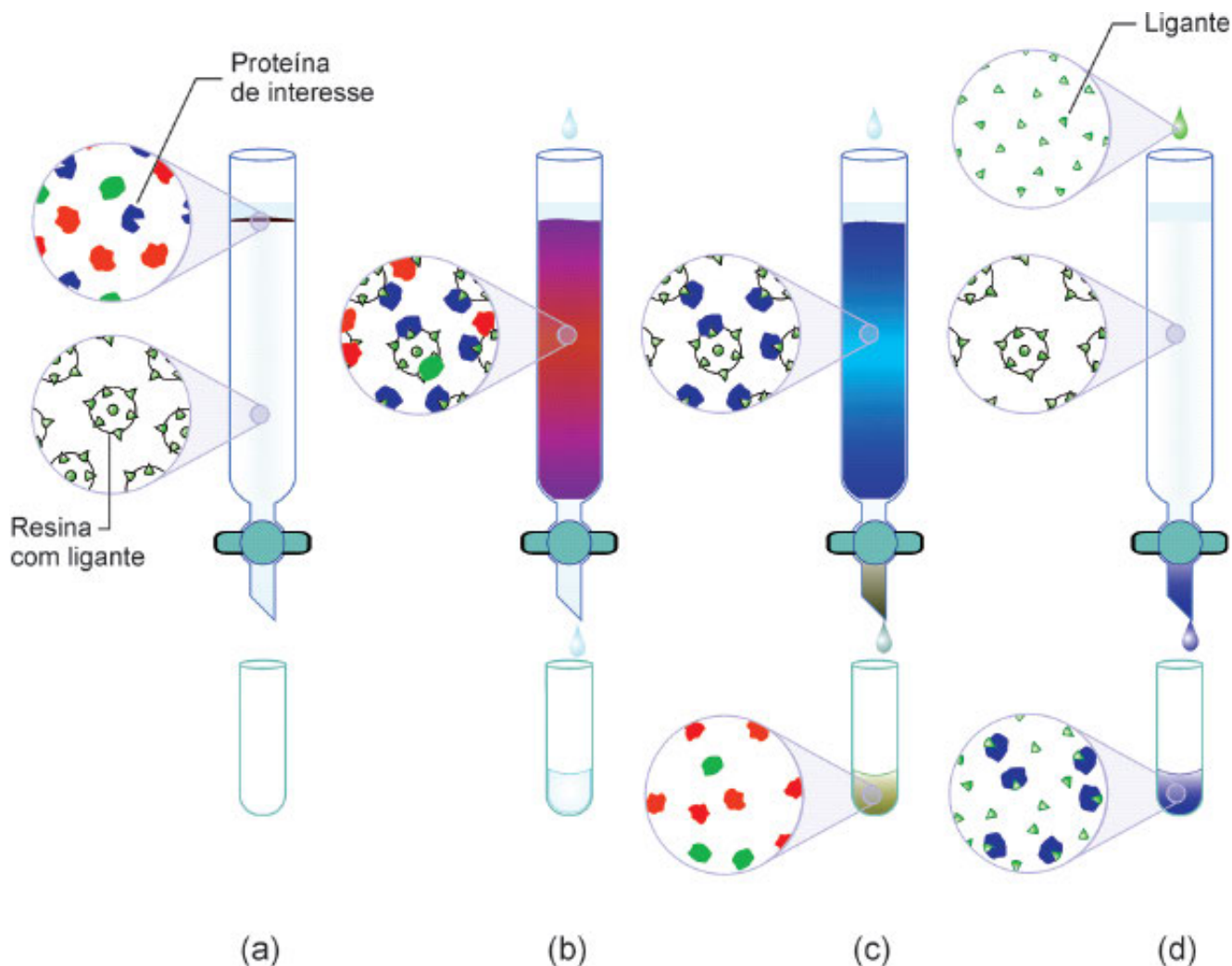
As *resinas de troca iônica* comumente utilizadas para purificar proteínas são formadas por celulose ligada covalentemente a grupos com carga positiva ou negativa (Tabela 2.6). Moléculas com carga de mesmo sinal que a resina são eluídas primeiramente, seguidas por moléculas com carga oposta, em uma ordem definida pela magnitude da carga apresentada pela proteína nas condições da cromatografia. Geralmente, escolhem-se valores de pH e de concentração salina que determinem a ligação da proteína de interesse à resina escolhida; seguem-se alterações dessas condições que levem à eluição da proteína.

**Tabela 2.6** Algumas resinas utilizadas para cromatografia de troca iônica de proteínas.

Resina	Grupo ionizável
Fosfofocelulose	$-\text{PO}_3^{2-}$
Carboximetilcelulose	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Dietilaminoetilcelulose	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

### Cromatografia de afinidade

Muitas proteínas ligam-se específica e não covalentemente a determinadas moléculas: enzimas, hormônios e anticorpos ligam-se, respectivamente, a substratos, receptores ou antígenos. Tais proteínas podem ser purificadas por *cromatografia de afinidade*. O princípio do método consiste em unir a molécula pela qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel, sendo a mais utilizada a *agarose*, um polímero de açúcares encontrado em algas vermelhas. A mistura de proteínas é passada por uma coluna preparada com esse material: a proteína de interesse fica adsorvida à coluna, graças à interação com o ligante, e as outras proteínas passam livremente. A proteína adsorvida pode ser eluída da coluna por adição de solução concentrada do ligante (Figura 2.20). Se a proteína for uma enzima, o ligante pode ser o substrato, o produto ou o inibidor competitivo. No caso de purificação de anticorpos, o ligante utilizado é o antígeno. O receptor de insulina, uma proteína da superfície celular, foi isolado por cromatografia de afinidade em agarose contendo insulina covalentemente ligada. A cromatografia de afinidade tem, obviamente, um poder de resolução muito maior do que os outros métodos cromatográficos (Tabela 5.6), embora seja restrita a uma classe especial de proteínas.



**Figura 2.20** Cromatografia de afinidade. Uma mistura de proteínas (representadas em cores diferentes) é passada através de uma coluna da resina (esferas brancas), contendo um ligante (espículas em verde), pelo qual a proteína de interesse tem afinidade (a); as proteínas percorrem a coluna (b) e somente a proteína de interesse é retida (c); a eluição é feita com uma solução concentrada de ligante, que, competindo com suas moléculas ligadas à matriz, libera a proteína desejada (d).

## 2.10.2 Eletroforese

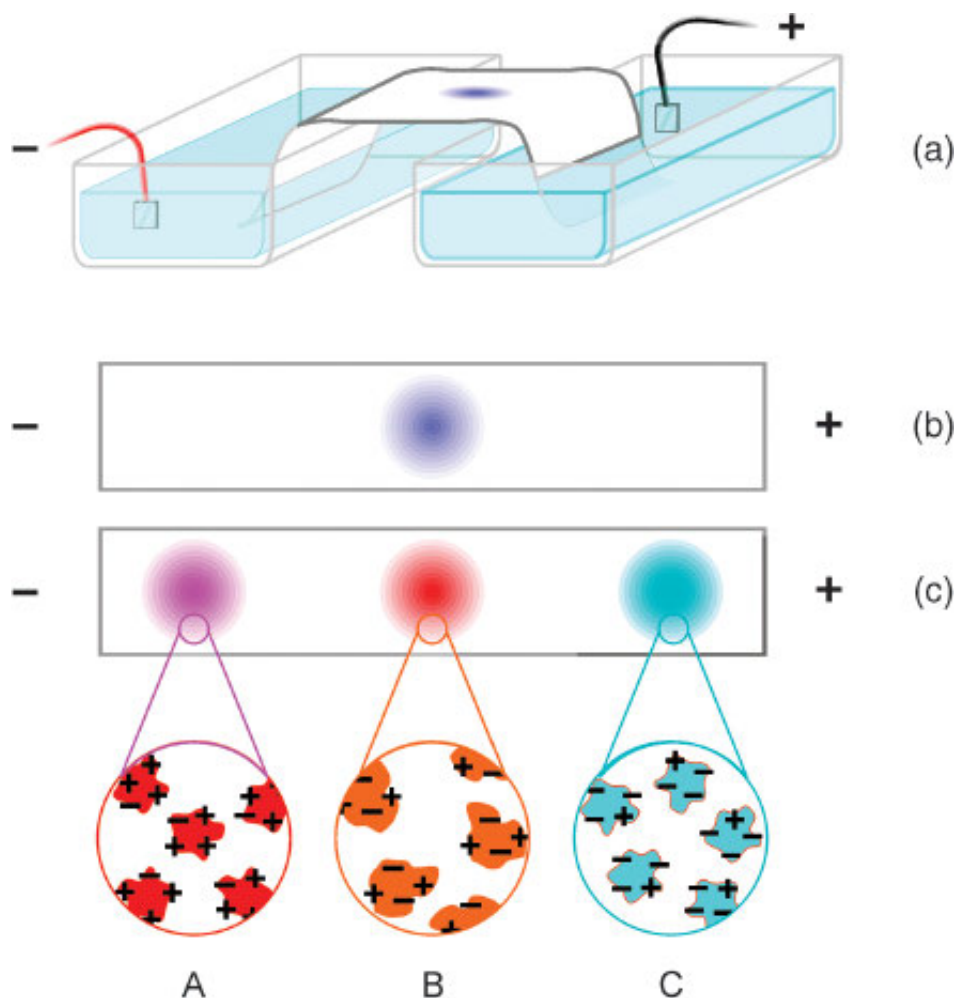
Em um mesmo pH, proteínas diferentes apresentarão cargas líquidas diferentes, o que determinará velocidades de migração diferentes, se as proteínas forem submetidas a um campo elétrico. Este é o princípio da *eletroforese*. As diferentes técnicas de eletroforese empregam, invariavelmente, um suporte sólido — como papel ou gel — que evita a mistura das proteínas por convecção e permite utilizar pequenas quantidades de material.

Na *eletroforese em papel*, a amostra é aplicada sobre uma tira de papel ou de acetato de celulose, saturada com solução tampão. As extremidades da tira são imersas em reservatórios distintos contendo tampão, onde ficam os eletrodos (Figura 2.21). O sistema é submetido a uma diferença de potencial apropriada e as proteínas migram em direção ao polo de carga oposta à sua, com velocidades proporcionais às suas cargas. Depois de algum tempo da corrida eletroforética, a posição das proteínas é revelada por coloração específica.

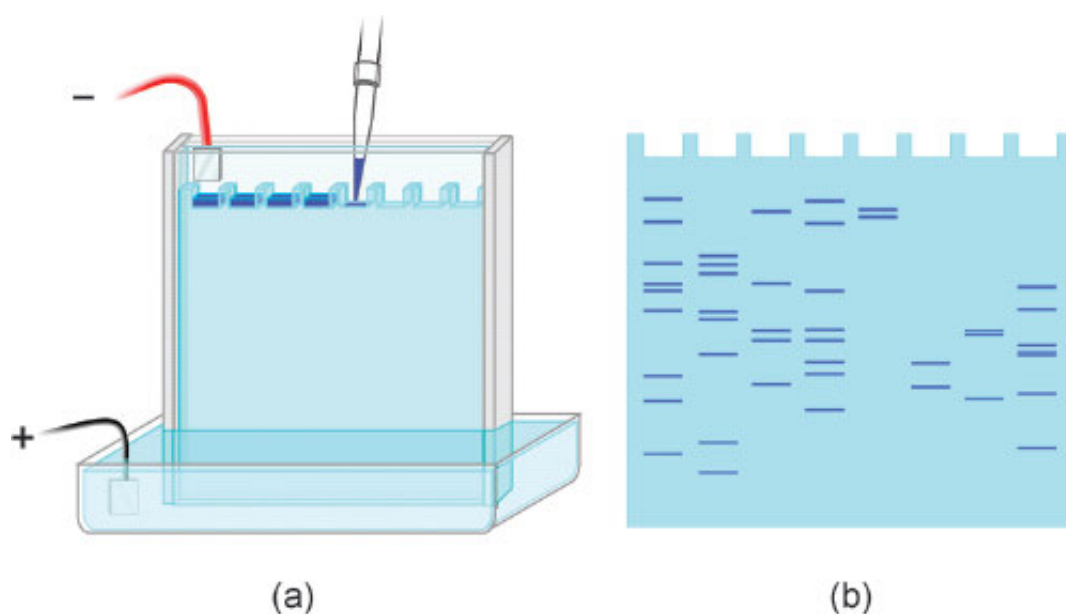
A *eletroforese em gel* é um dos métodos mais utilizados para analisar misturas de proteínas ou outras macromoléculas. Os géis utilizados como suporte — agarose e poliacrilamida — podem ser preparados com porosidade variável, propiciando separação das moléculas segundo o seu tamanho, além da sua carga. Proteínas menores migram mais depressa que as maiores, formando uma série de bandas definidas, que podem ser visualizadas por coloração específica (Figura 2.22). Uma variante desta técnica, conhecida pela sigla *SDS-PAGE*, emprega um gel de poliacrilamida, em presença do detergente dodecilsulfato de sódio (SDS, Figura 2.17). O SDS liga-se a grupos hidrofóbicos das proteínas, causando sua desnaturação. Esta associação, com a maioria das proteínas, segue o mesmo padrão: uma molécula de SDS a cada dois resíduos de aminoácidos. Cada molécula de detergente ligada atribui uma carga negativa à proteína desnaturada, mascarando a carga intrínseca da molécula nativa: todas as proteínas de uma mistura apresentarão carga negativa e migrarão em direção ao polo positivo. O resultado é a formação de um complexo com forma alongada, com uma densidade de cargas negativas proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. Este método, portanto, separa proteínas segundo a sua massa molar. Se a proteína apresentar estrutura quaternária, suas subunidades serão desnaturadas e dissociadas por SDS e a eletroforese permite determinar a massa molar de cada uma delas. O emprego da eletroforese em



gel, ao longo das diferentes etapas de um processo de purificação de proteínas, além de permitir a sua separação, fornece informações adicionais, tais como: o número de proteínas presentes na preparação, a sua massa molar e de quantas subunidades são formadas.



**Figura 2.21** Eletroforese em papel. Uma mistura de três proteínas — A, B e C — é aplicada sobre uma tira de papel ou acetato de celulose, umedecida com tampão. A tira é colocada em um aparato apropriado e um campo elétrico é aplicado ao sistema (a). As proteínas migram, de sua posição inicial (b) para os polos, de acordo com a carga que apresentam no pH do tampão utilizado. Depois de algum tempo, a eletroforese é interrompida e a posição das proteínas é revelada (c).



**Figura 2.22** Eletroforese em gel. As amostras são colocadas em pequenas depressões (poços) formadas na parte superior do gel, contido entre placas de plástico e imerso em tampão (a). O aparato é submetido a um campo elétrico e as proteínas migram, formando bandas: quanto menor a massa molar da proteína, maior a distância migrada. Em (b), o resultado obtido, após revelação das bandas formadas no gel por coloração específica para proteínas. Nesta eletroforese, foram utilizadas amostras contendo diferentes misturas de proteínas.

## Bibliografia

- Boyer RF: *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*. Benjamin Cummings, 2006.
- De Maio A *et al.*: Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* **17** (2): 139-143, 2012.
- Diaz-Espinoza R, Soto C: High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* **19** (4): 370-377, 2012.
- Douglas PM, Cyr DM: Interplay between protein homeostasis networks in protein aggregation and proteotoxicity. *Biopolymers* **93** (3): 229-36, 2010.
- Fairman JW *et al.*: The structural biology of  $\beta$ -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 1-9, 2011.
- Knowles TPJ *et al.*: The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15** (6): 384-396, 2014.
- Orij R *et al.*: Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1810** (10): 933-944, 2011.
- Pace, CN: Energetics of protein hydrogen bonds. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 681-682, 2009.
- Roe S (ed.): *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, 2001.
- Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.
- Tinoco I *et al.*: *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Science*, 4th ed. Prentice Hall, 2002.
- Tompa P: On the supertertiary structure of proteins. *Nat Chem Biol* **8** (7): 597-600, 2012.
- Woolfson DN *et al.*: New currency for old rope: from coiled-coil assemblies to  $\alpha$ -helical barrels. *Curr Opin Struct Biol* **22** (4): 432-441, 2012.

---

<sup>1</sup> As estruturas primárias e tridimensionais de inúmeras proteínas, determinadas geralmente por difração de raios X das proteínas no estado cristalino, podem ser encontradas em um banco de dados, o *Protein Data Bank (PDB)*, disponível na Internet.

<sup>2</sup> Os resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica são numerados de + a *n* a partir do amino terminal. Nos exemplos citados, a numeração seria: Ala1-Ser2-Lys3 e Lys1-Ser2-Ala3.

<sup>3</sup> Um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo apresenta carga parcial positiva e pode associar-se a outro átomo eletronegativo, formando uma ligação mais fraca, não covalente, chamada *ligação (ponte) de hidrogênio*. Nos sistemas biológicos, os átomos eletronegativos são, geralmente, oxigênio e nitrogênio e, menos frequentemente, enxofre. A energia de formação de uma ligação de hidrogênio (4 a 30 kJ • mol<sup>-1</sup>) é cerca de vinte vezes menor que a energia de formação de ligações covalentes.

<sup>4</sup> A concanavalina A é uma proteína vegetal do grupo das *lectinas*, que têm alta afinidade por açúcares específicos e que, por isto, são utilizadas na purificação de carboidratos por cromatografia de afinidade (Seção 2.10.1).

<sup>5</sup> A camada de solvatação da proteína resulta da organização de moléculas de água em torno dos grupos carregados dos aminoácidos presentes na superfície da molécula proteica.

<sup>6</sup> Denominação originada do termo francês *chaperon*, utilizado para designar uma senhora que, antigamente, acompanhava e vigiava moças solteiras.



# 3 Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma

O metabolismo das células aeróbias depende do recebimento contínuo de oxigênio, usado na oxidação de nutrientes, e da remoção constante do CO<sub>2</sub> resultante deste processo. Nos organismos pluricelulares, as trocas gasosas com o meio não podem ser feitas eficientemente por simples difusão, existindo sistemas especializados incumbidos desta função. É o caso dos vertebrados, nos quais este papel é exercido por sistemas respiratório e circulatório complexos, do qual participam elementos componentes do sangue. O transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos é efetuado pela hemoglobina presente nas hemácias. O CO<sub>2</sub> produzido pelos tecidos é convertido a ácido carbônico, que se ioniza em bicarbonato e H<sup>+</sup> (Seção 1.4). O bicarbonato é transportado pelo sangue até os pulmões, onde é eliminado como CO<sub>2</sub>; os íons H<sup>+</sup> são associados à hemoglobina no nível dos tecidos e dela dissociados no nível dos pulmões. Deste modo, embora haja grande formação de CO<sub>2</sub> nos tecidos, a presença da hemoglobina restringe as variações de pH a apenas centésimos de unidades, mantendo o sangue e os tecidos em meio notavelmente constante.

Em resumo, a hemoglobina tem duas funções essenciais: transportar oxigênio e exercer um poderoso efeito tampão.

## 3.1 Estrutura da hemoglobina

A hemoglobina está presente nas hemácias, com cerca de 270 milhões de moléculas por célula, equivalendo a aproximadamente 1/3 do seu peso.

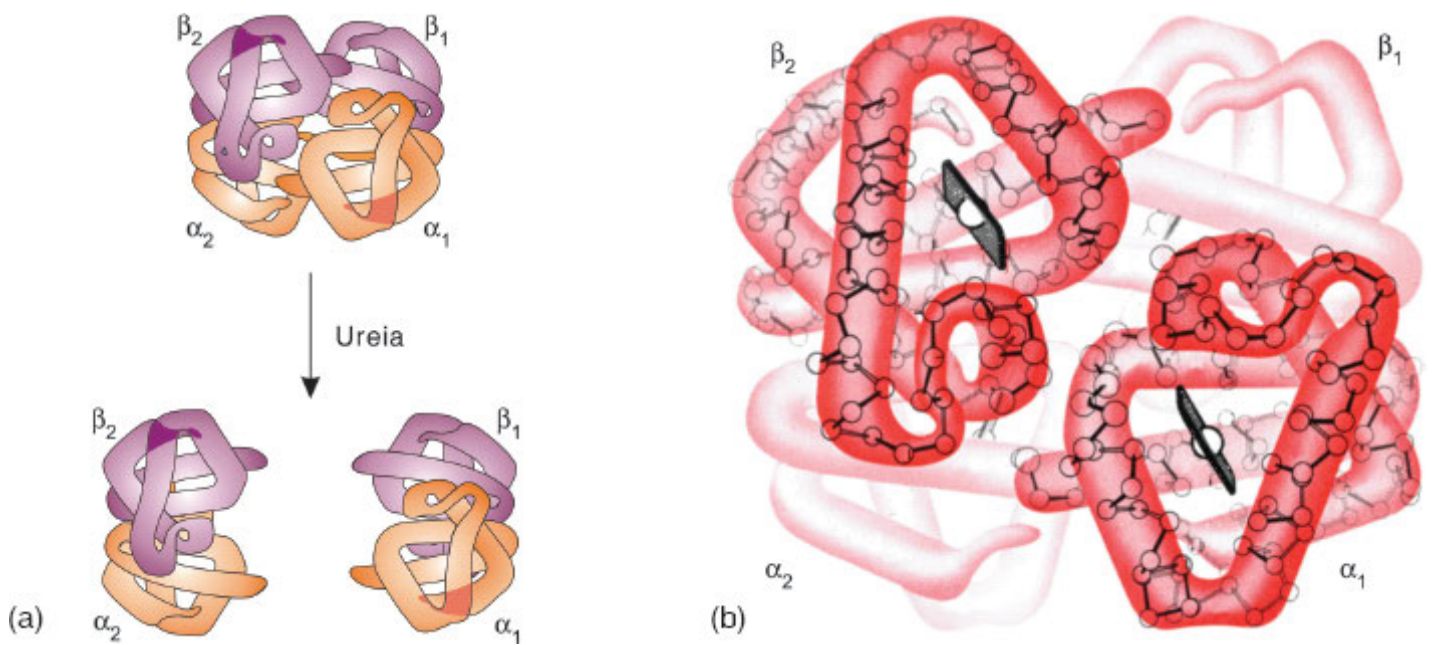
A hemoglobina predominante (mais de 95% do total) nos seres humanos adultos (HbA) é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas  $\alpha$  (com 141 aminoácidos) ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e duas  $\beta$  (com 146 aminoácidos) ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ). Apesar de apresentarem diferenças na sequência de aminoácidos, os dois tipos de subunidades e a mioglobina exibem estrutura terciária semelhante (Seção 2.4). Apresentam a maior extensão da cadeia formada por segmentos em  $\alpha$ -hélice, conectados por regiões sem estrutura regular. As hélices recebem letras e os seus aminoácidos constituintes, números; por exemplo, F8 é o oitavo aminoácido da hélice F.

Na estrutura quaternária da hemoglobina, as ligações não covalentes são muito mais numerosas entre subunidades diferentes —  $\alpha/\beta$  — do que entre subunidades iguais —  $\alpha/\alpha$  e  $\beta/\beta$ . O resultado desta associação desigual é uma molécula tetramérica composta pela união de dois dímeros,  $\alpha_1 \beta_1$  e  $\alpha_2 \beta_2$  (Figura 3.1 a). O contato entre os dois dímeros é estabelecido nas interfaces designadas  $\alpha_1 \beta_2$  e  $\alpha_2 \beta_1$  (Figura 3.1 b). *Estas interfaces sofrem modificações importantes na oxigenação e desoxigenação da hemoglobina.*

## 3.2 Ligação do oxigênio à hemoglobina

### O grupo prostético heme é o sítio de ligação do oxigênio

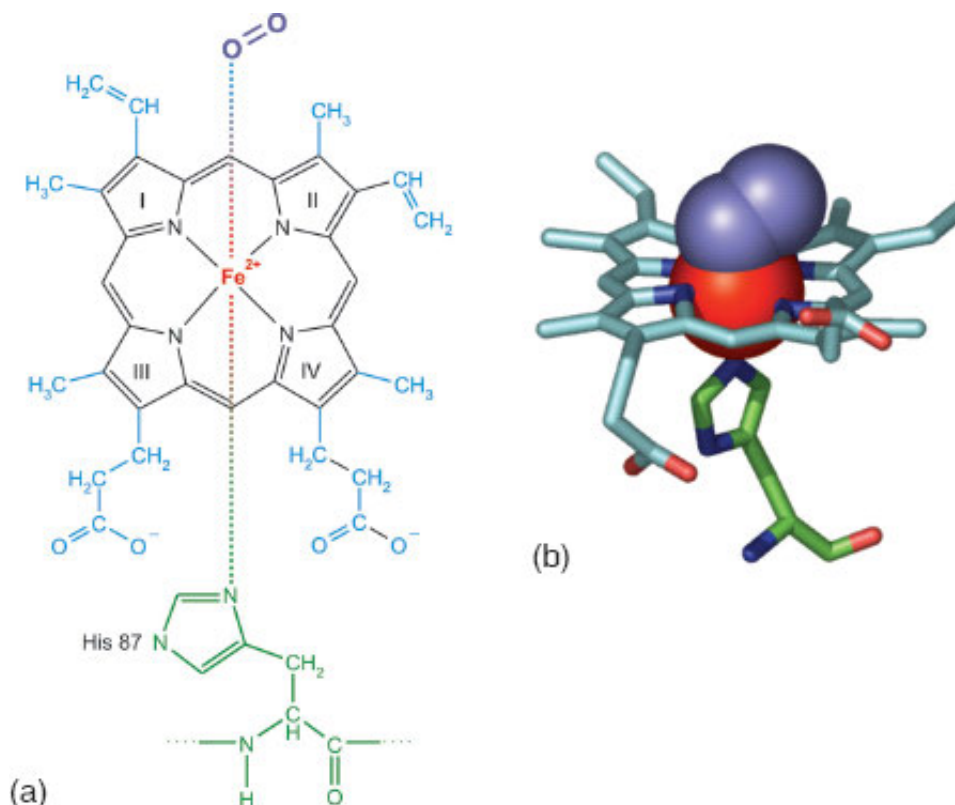
A hemoglobina é uma hemoproteína (Seção 2.6): cada uma de suas cadeias está associada a um grupo prostético *heme* (Figura 3.2). O heme é uma molécula de porfirina contendo um íon de ferro, que, na mioglobina e na hemoglobina, permanece no estado ferroso, Fe<sup>2+</sup>. As porfirinas consistem em um anel plano, resultante da fusão de quatro núcleos pirrólicos, com substituintes variáveis, que caracterizam seus subtipos; na hemoglobina é encontrado o isômero denominado *protoporfirina IX*<sup>1</sup>. O heme confere à hemoglobina, e ao sangue, sua cor característica.



**Figura 3.1** Estrutura quaternária da hemoglobina. a) A associação entre subunidades diferentes é mais forte que entre subunidades iguais: quando a hemoglobina é suspensa em solução concentrada de ureia, o tetrâmero dissocia-se em dímeros  $\alpha\beta$ ; os grupos heme não estão mostrados. b) Esquema enfocando as áreas de contato entre os dímeros, com a interface  $\alpha_1\beta_2$  à frente; cada grupo heme fica alojado em um bolsão hidrofóbico.

O grupo heme localiza-se dentro de uma cavidade hidrofóbica, delimitada sobretudo por aminoácidos apolares, que estabelecem interações hidrofóbicas com o anel porfirínico. Este ambiente apolar torna possível a ligação do oxigênio ao ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sem que ele seja oxidado ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

O íon de ferro fica no centro do grupo heme, formando seis ligações: com os quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, com a cadeia polipeptídica — em um resíduo de histidina, a His F8, chamada de *histidina proximal* — e pode, ainda, ligar-se reversivelmente a uma molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ). As duas últimas ligações são perpendiculares ao plano do anel e situam-se em lados opostos do plano do heme (Figura 3.2). Ao sítio de ligação do ferro com oxigênio podem ligar-se outras moléculas pequenas, como CO e  $\text{H}_2\text{S}$ , com afinidade ainda maior que o oxigênio, o que explica sua alta toxicidade para organismos aeróbios.



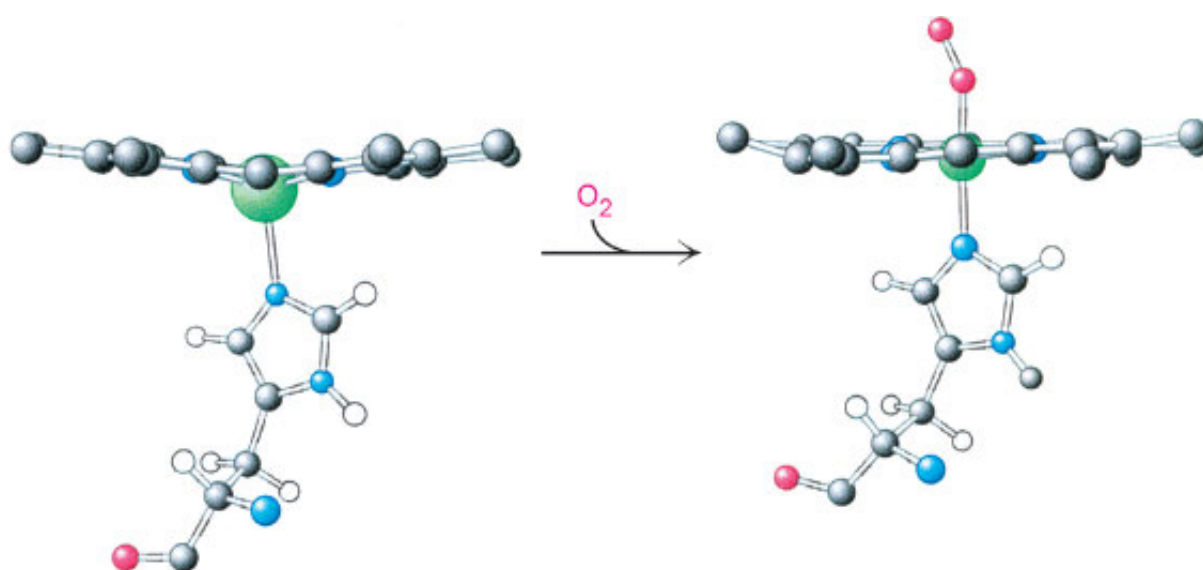
**Figura 3.2** Estrutura do grupo heme (protoporfirina IX e um íon de ferro) da oxi-hemoglobina. a) O íon  $\text{Fe}^{2+}$  liga-se aos átomos de nitrogênio dos núcleos pirrólicos (numerados de I a IV) do anel porfirínico (em preto, com as cadeias laterais em azul), à molécula de oxigênio e ao grupo imidazólico da histidina proximal (His F8). b) Representação tridimensional do heme e das ligações do  $\text{Fe}^{2+}$ .

Uma molécula de hemoglobina totalmente oxigenada contém quatro moléculas de  $O_2$  e é denominada *oxi-hemoglobina* (oxi-Hb ou  $HbO_2$ ), em contraposição à forma desprovida de oxigênio, chamada *desoxi-hemoglobina* (*desoxi-Hb* ou *Hb*). A ligação do oxigênio ao grupo heme altera a cor da hemoglobina, que passa de azulada (sangue venoso) a vermelha (sangue arterial).

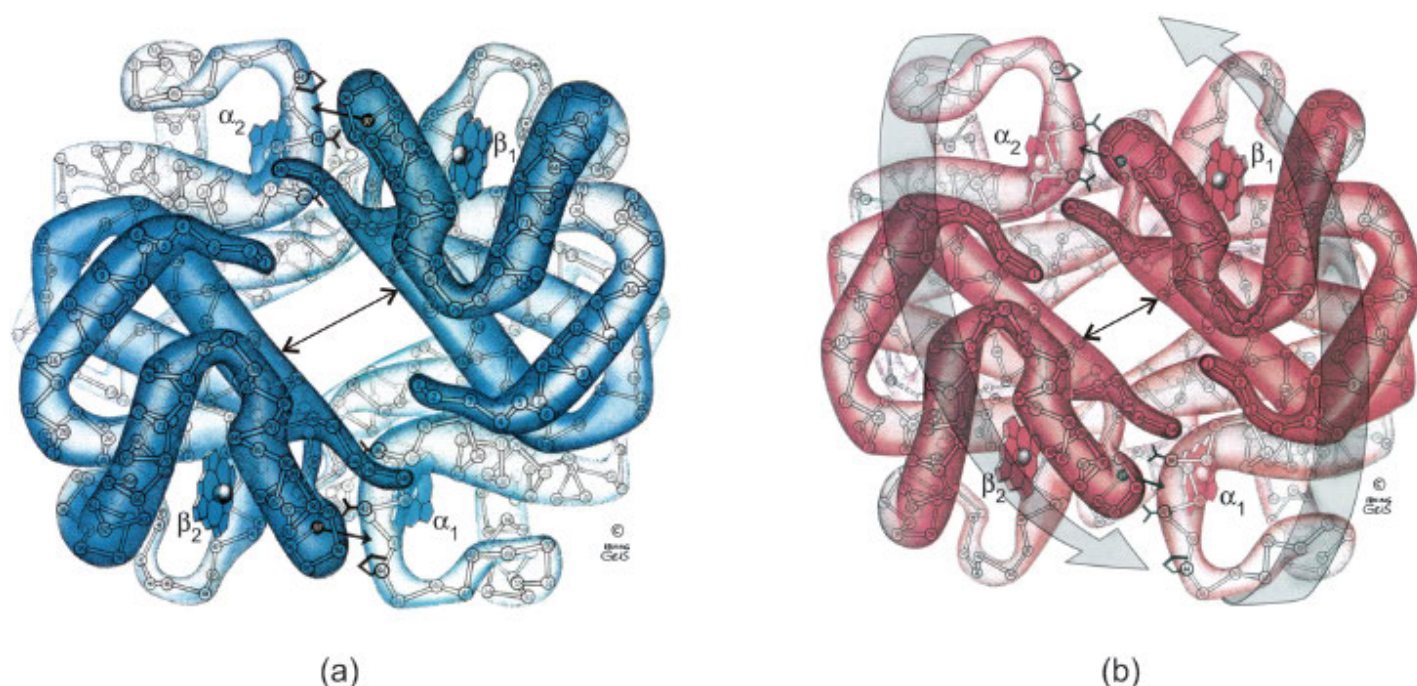
### A ligação com oxigênio desencadeia alterações na conformação da hemoglobina

As hemoglobinas oxigenada e desoxigenada têm estruturas tão diferentes, que apresentam formas cristalinas distintas.

A oxigenação da hemoglobina determina alterações estruturais sequenciais. Na desoxi-Hb, os íons de ferro estão situados fora do plano do grupo heme e o anel porfirínico é ligeiramente côncavo. Quando o oxigênio se liga ao heme de uma das subunidades, o ferro se desloca para o plano do anel, que se torna mais achatado, arrastando a His 87 à qual está ligado (Figura 3.3) e, conseqüentemente, o próprio segmento da cadeia polipeptídica que contém este aminoácido. A movimentação deste segmento desloca um segmento contíguo, segmentos estes que compõem as interfaces  $\alpha_1 \beta_2$  e  $\alpha_2 \beta_1$  entre os dímeros, provocando o rompimento de várias ligações não covalentes. Há uma alteração da disposição relativa dos dímeros, que resulta em estreitamento do bolsão entre as subunidades  $\beta$  (Figura 3.4). Deste modo, o pequeno deslocamento do ferro (cerca de 0,5 Å), causado pela ligação do oxigênio ao grupo heme de uma subunidade, dispara uma seqüência de eventos mecanicamente transmitidos, que alteram a estrutura quaternária da hemoglobina.



**Figura 3.3** A ligação do oxigênio ao  $Fe^{2+}$  do grupo heme provoca o deslocamento do ferro para o plano do anel porfirínico, que se torna mais achatado, deslocando a histidina proximal e iniciando uma série de alterações estruturais na hemoglobina. (Adaptada de Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L.: Biochemistry, 5th edition. Freeman and Company, 2002.)



**Figura 3.4** Estrutura tridimensional da desoxi-Hb (a) e oxi-Hb (b), com as cadeias  $\beta$  em primeiro plano. Na transformação desoxi-



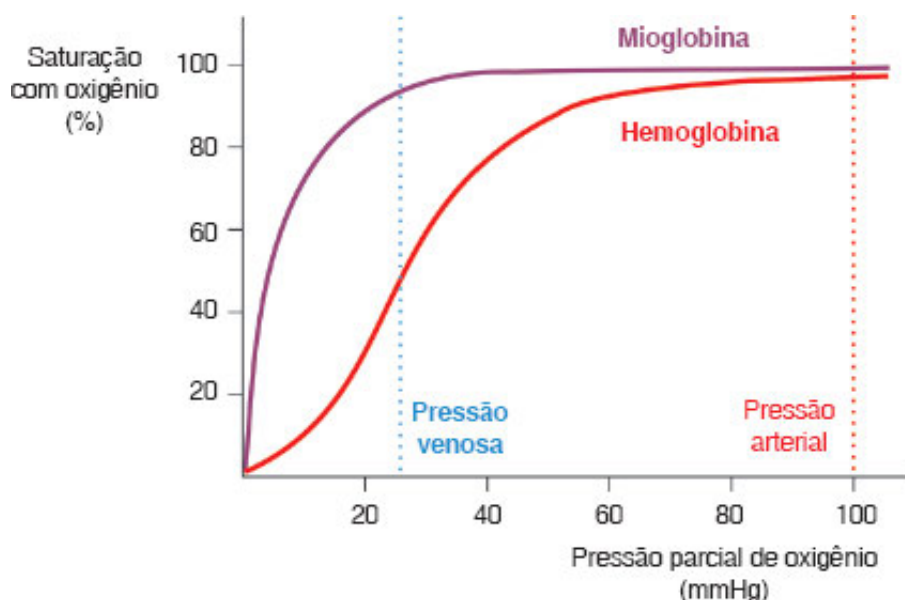
Hb → oxi-Hb, há movimentação de um dímero em relação ao outro, simbolizada pelas setas largas cinza sobre a molécula de oxi-Hb e evidenciada pela mudança na posição relativa de alguns aminoácidos; ocorre, ainda, um estreitamento da cavidade central entre as cadeias  $\beta$ , indicado pelas setas finas pretas.

### A hemoglobina liga-se ao oxigênio cooperativamente

A ligação do oxigênio implica rearranjos moleculares sucessivos, já que a mudança de conformação de uma subunidade acarreta alteração das outras. Estes movimentos coordenados determinam a cinética de oxigenação da hemoglobina: a ligação da primeira molécula de oxigênio facilita o preenchimento dos outros grupos heme. As sucessivas conformações assumidas pela molécula de hemoglobina têm afinidades crescentes pelo oxigênio: a ligação da quarta molécula é 300 vezes mais eficiente do que a ligação da primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de *cooperatividade*. Como a cooperatividade resulta da influência exercida por um sítio sobre outros localizados em subunidades diferentes de uma mesma molécula, só pode ser apresentada por proteínas oligoméricas, como a hemoglobina e as enzimas alostéricas (Seção 19.2.1). No caso da mioglobina, formada por uma única cadeia polipeptídica e um único grupo heme, não existe cooperatividade.

A diferença no mecanismo de oxigenação de mioglobina e hemoglobina está traduzida nas cinéticas de oxigenação destas proteínas em função da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) (Figura 3.5): enquanto a mioglobina apresenta uma curva hiperbólica, a hemoglobina exibe uma curva sigmoide. A forma hiperbólica é esperada para uma proteína com um único sítio de ligação. A curva sigmoide indica que a ligação das moléculas de oxigênio aos quatro heme não é independente, e que o preenchimento de um heme aumenta a afinidade por oxigênio dos outros heme.

A cooperatividade exibida pela hemoglobina proporciona uma resposta mais sensível a variações na concentração de oxigênio, adequando-se, com perfeição, à sua função de transportar este gás. No sangue arterial que sai dos pulmões dos seres humanos, a  $pO_2$  é alta, em média, 100 mmHg (ou 100 torr ou 13,3 kPa<sup>2</sup>) e a hemoglobina fica 98% saturada com oxigênio; nos tecidos extrapulmonares, onde a  $pO_2$  é baixa (sangue venoso), ela libera grande parte do oxigênio. Por exemplo, a  $pO_2$  nos capilares que irrigam um músculo em atividade é cerca de 20 mmHg e a saturação da hemoglobina cai para 33%, ou seja, ela libera 65% do oxigênio associado. A mioglobina seria um transportador bem menos eficiente, já que menos de 10% do seu oxigênio seria liberado nessas condições. Todavia, sua alta afinidade por oxigênio, mesmo em baixa  $pO_2$ , permite que ela desempenhe eficientemente a função de reservatório de oxigênio nos músculos de mamíferos, onde é encontrada em abundância. A mioglobina tem afinidade por oxigênio maior que a hemoglobina em qualquer  $pO_2$ , o que permite que ele seja transferido do sangue para o músculo, onde fica associado à mioglobina e pode ser utilizado pelas mitocôndrias das células musculares.



**Figura 3.5** Curva de saturação com oxigênio de mioglobina e hemoglobina; estão indicados os valores normais, ao nível do mar, da  $pO_2$  venosa e da  $pO_2$  arterial.

### 3.3 Fatores que interferem na ligação com oxigênio

O aumento da temperatura, a presença de determinados compostos orgânicos fosforilados, o aumento da pressão parcial de  $CO_2$  e a diminuição de pH são fatores que provocam a redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

O efeito da temperatura, no intervalo de 37 a 41°C, tem grande importância fisiológica porque permite maior oferta de

oxigênio à medida que a temperatura se eleva. No caso de febre, ocorre aceleração do metabolismo celular, com maior demanda de oxigênio; em grupos musculares sob contração intensa, há um aumento da temperatura local, resultante do metabolismo intenso. Em ambas as situações, a diminuição da afinidade da hemoglobina por oxigênio é uma adaptação favorável.

### 3.3.1 2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

#### As hemácias contêm um composto que diminui a afinidade da hemoglobina por oxigênio

A hemoglobina de mamíferos, quando presente nas hemácias, tem afinidade menor por oxigênio do que quando purificada. Este fenômeno resulta da presença, nestas células, de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) (Figura 3.6), um composto sintetizado a partir de 1,3-bisfosfoglicerato, um intermediário da glicólise. A relação entre estes dados ficou esclarecida quando se adicionou BPG à hemoglobina purificada e observou-se uma redução da sua afinidade por oxigênio, traduzida por um deslocamento para a direita na sua curva de saturação com oxigênio (Figura 3.7).

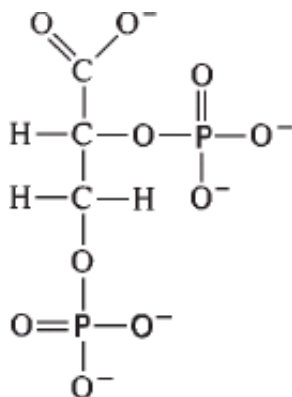


Figura 3.6 Estrutura do 2,3-bisfosfoglicerato (BPG).

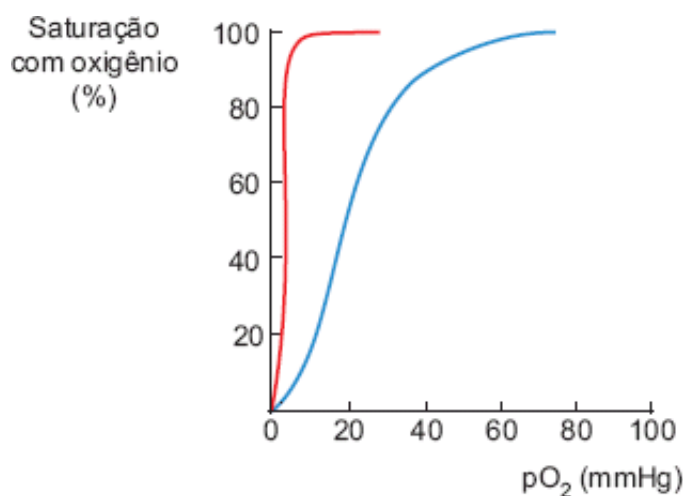
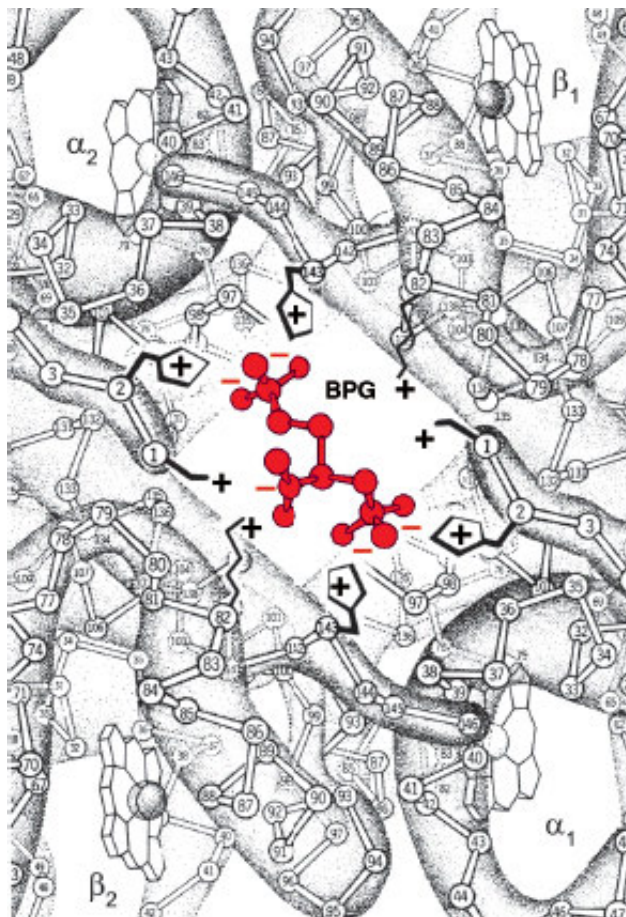


Figura 3.7 Efeito do BPG sobre a afinidade da hemoglobina por oxigênio. A saturação foi medida na ausência (curva vermelha) e na presença de BPG (curva azul). Na ausência de BPG, a afinidade da hemoglobina por oxigênio é tão alta, que a curva de ligação se torna hiperbólica.

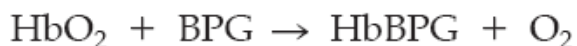
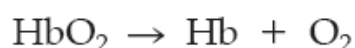
O BPG liga-se fortemente à desoxi-Hb, que apresenta a cavidade entre as subunidades  $\beta$  suficientemente grande para alojá-lo. Esta cavidade é circundada por cadeias laterais de aminoácidos carregadas positivamente, que interagem com os grupos negativos do BPG (Figura 3.8). Na oxi-Hb, a cavidade é menor (Figura 3.4), o que dificulta a ligação do BPG. A consequência é o predomínio da forma desoxigenada da hemoglobina, o que equivale a um decréscimo na sua afinidade por oxigênio.



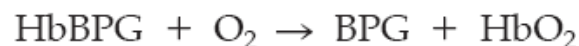
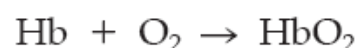
**Figura 3.8** Ligação do BPG à cavidade entre as cadeias  $\beta$  da desoxi-Hb. Os grupos com carga positiva que interagem com os grupos negativos do BPG são: amino terminal (Val 1), imidazólico (His 2 e His 143) e amino (Lys 82), pertencentes a aminoácidos das duas cadeias  $\beta$ .

O efeito do BPG manifesta-se em baixas pressões de oxigênio, sendo suplantado por pressões elevadas de oxigênio, nas quais prevalece a oxi-Hb, como indicado nas equações seguintes (as quais não consideram que cada molécula de hemoglobina pode combinar-se com 1 a 4 moléculas de  $O_2$ ):

$pO_2$  baixa  
(tecidos)



$pO_2$  alta  
(pulmões)



Nas condições de alta  $pO_2$  dos pulmões, a hemoglobina fica saturada com oxigênio, mesmo na presença de BPG, cujo papel fisiológico é aumentar substancialmente a liberação de oxigênio nos tecidos extrapulmonares, onde a  $pO_2$  é baixa.

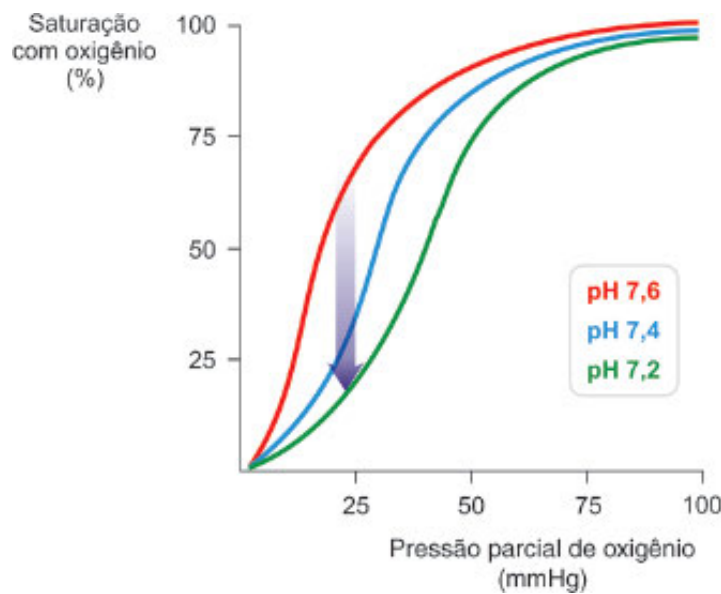
O nível de BPG nas hemácias aumenta, de modo gradativo, em condições associadas com hipóxia tecidual (oxigenação deficitária dos tecidos) prolongada, como: comprometimento do sistema cardiorrespiratório, estado anêmico e permanência em grandes altitudes. Este mecanismo adaptativo compensa a menor disponibilidade de oxigênio existente nessas situações, com um aumento na liberação do gás para os tecidos.

### 3.3.2 pH: efeito Bohr

#### A ligação do oxigênio à hemoglobina depende do pH: efeito Bohr

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia com o pH, mesmo dentro do estreito limite fisiológico de variação do pH: é tanto menor quanto menor o pH (Figura 3.9).





**Figura 3.9** Efeito do pH sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. A porcentagem de moléculas de hemoglobina oxigenada diminui com o aumento da concentração de  $H^+$  (ver seta no gráfico), em baixas pressões parciais de oxigênio ( $pO_2$ ).

pCO2 na verdade

A afinidade da hemoglobina por oxigênio também diminui com acréscimos na pressão parcial de  $CO_2$  ( $pCO_2$ ), produzindo desvios da curva de saturação com oxigênio para a direita, um resultado semelhante ao da diminuição de pH (Figura 3.9). O  $CO_2$  reage com os grupos amino terminais das cadeias da hemoglobina, formando a carbamino-hemoglobina, que tem afinidade menor por  $O_2$ .

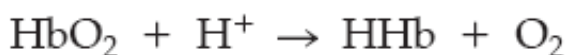
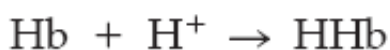
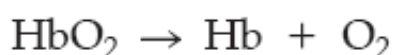
Os íons  $H^+$ , como acontece com o BPG, ligam-se preferencialmente à desoxi-Hb, que passa a constituir a forma predominante, o que corresponde a uma diminuição na afinidade da hemoglobina por oxigênio. A associação preferencial dos íons  $H^+$  à desoxi-Hb evidencia que esta forma da proteína é uma base de Brønsted mais forte do que a forma oxigenada. Esta diferença de comportamento ácido-base é consequência da movimentação das subunidades da hemoglobina, devido à associação/dissociação de oxigênio, que modifica a relação espacial entre determinados aminoácidos e acarreta variações nos valores de  $pK_a$  de seus grupos ionizáveis.

Alterações importantes referem-se à posição relativa de resíduos de aminoácidos localizados nas interfaces  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$  entre os dímeros — eles sofrem alteração no valor de  $pK_a$ , devido a mudanças no seu microambiente, perdendo prótons quando a hemoglobina é oxigenada e ganhando prótons quando ela é desoxigenada. Em resumo, a conversão de oxi-Hb em desoxi-Hb é acompanhada por captação de prótons, e a sua oxigenação, por liberação de prótons.

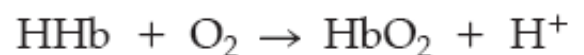
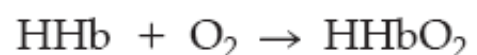
A influência do pH e da concentração de  $CO_2$  sobre a oxigenação da hemoglobina tem grande importância fisiológica, porque no nível dos tecidos a acentuada produção de  $CO_2$  pelo metabolismo e o decréscimo no pH resultante estão sempre associados a uma maior demanda de oxigênio. O efeito do pH e da pressão parcial de  $CO_2$  sobre a união entre Hb e  $O_2$  é denominado *efeito Bohr*.

O conjunto dos fenômenos relacionados com o aumento do caráter básico da hemoglobina causado por sua desoxigenação e o aumento do caráter ácido quando ela se liga ao oxigênio, que constituem o efeito Bohr, pode ser representado pelas equações:

$pO_2$  e pH mais baixos  
(tecidos)



$pO_2$  e pH mais altos  
(pulmões)



A representação do efeito Bohr não levou em conta a estequiometria do processo: cada molécula de hemoglobina pode combinar-se com + a 4 moléculas de  $O_2$  e associar-se ou liberar de 1,2 a 2,8  $H^+$ , dependendo de condições como o pH, a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato etc.

### 3.3.3 Hemoglobina e o tamponamento do sangue

A análise das equações que resumem o efeito Bohr revela o papel fundamental desempenhado pela hemoglobina na manutenção do pH plasmático: à medida que a  $pO_2$  diminui e a concentração de  $H^+$  aumenta, a hemoglobina libera  $O_2$  e capta  $H^+$ . Quando a  $pO_2$  aumenta e a concentração de  $H^+$  diminui, ela se liga a  $O_2$  e libera  $H^+$ . Estas são as condições encontradas nos tecidos e nos alvéolos pulmonares, respectivamente.

Nos capilares que irrigam os tecidos, o  $CO_2$  produzido pelo metabolismo celular difunde-se até as hemácias, onde é hidratado rapidamente em uma reação catalisada pela anidrase carbônica (Seção 1.4), formando  $H_2CO_3$ . No pH do sangue (7,4), o  $H_2CO_3$  dissocia-se em  $HCO_3^-$  e  $H^+$ :

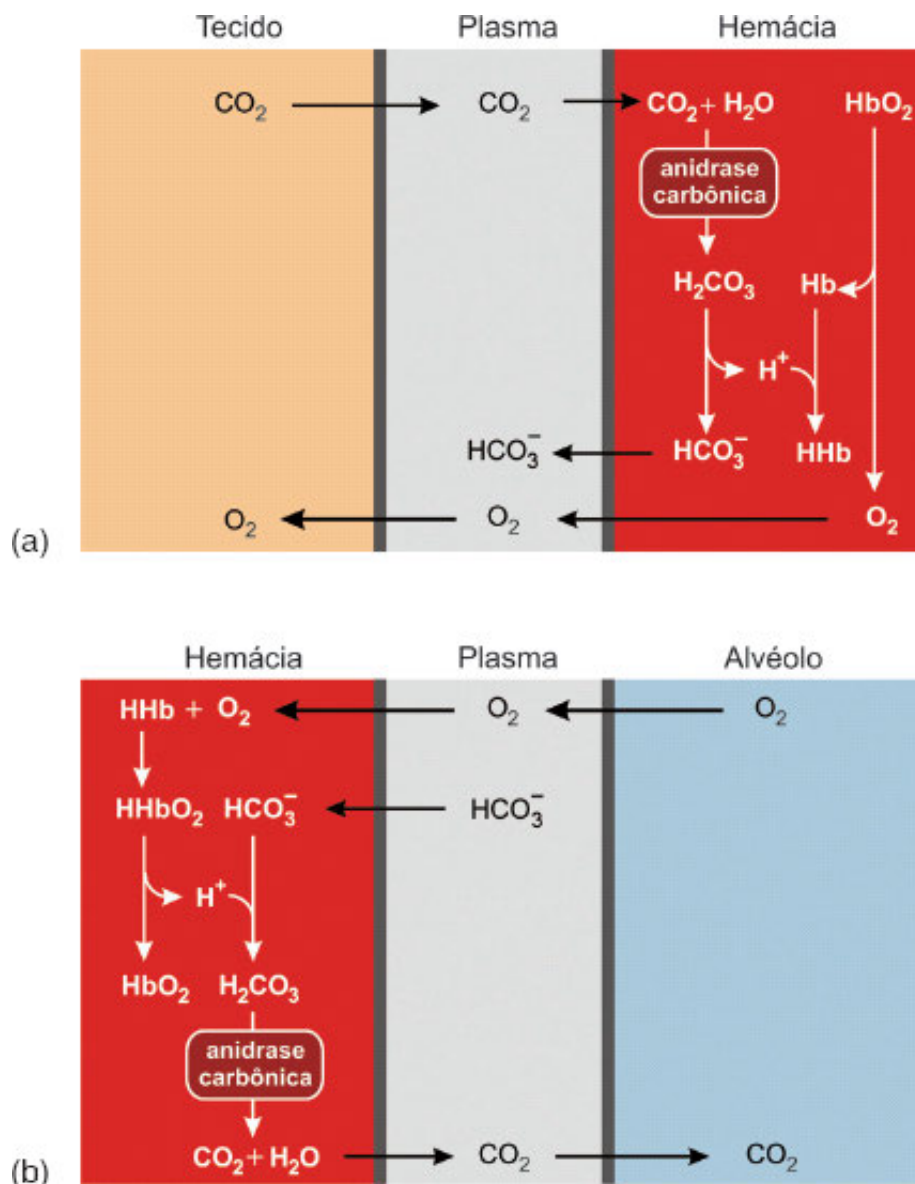


A ocorrência destas duas reações consecutivas explica por que um aumento na concentração de  $CO_2$  causa uma diminuição do pH. Este aumento de acidez, associado à baixa  $pO_2$  tecidual, faz com que a hemoglobina libere  $O_2$  e capte  $H^+$ , impedindo que ocorram grandes variações de pH. O  $HCO_3^-$ , produzido nas hemácias, difunde-se para o plasma e é transportado até os pulmões (Figura 3.10). Cerca de 90% do  $CO_2$  produzido nas células são transportados aos pulmões por este mecanismo; 5% como carbamino-hemoglobina e 5% permanecem em solução.

Nos pulmões a situação inverte-se. A alta  $pO_2$  leva à oxigenação da hemoglobina e à dissociação de  $H^+$ . O  $HCO_3^-$  desloca-se do plasma para o interior das hemácias e combina-se com os  $H^+$ , formando  $H_2CO_3$ , que é convertido em  $CO_2$  e  $H_2O$  pela anidrase carbônica. O  $CO_2$  difunde-se das hemácias para o plasma, depois para os alvéolos pulmonares e é expirado. A liberação de prótons pela hemoglobina corrige o valor de pH que, de outro modo, tenderia a aumentar pois, com a baixa  $pCO_2$  alveolar, o  $CO_2$  é eliminado no ambiente, consumindo  $H^+$  e  $HCO_3^-$ :



Assim, a manutenção do pH fisiológico, imprescindível para o desempenho de qualquer função vital, é obtida pela ação coordenada do sistema Hb/HbO<sub>2</sub> e do sistema CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



**Figura 3.10** Esquema dos processos que ocorrem nos tecidos (a) e nos pulmões (b) e possibilitam a manutenção do pH plasmático.

### 3.4 Hemoglobina fetal

O feto humano, e de outros mamíferos, tem uma hemoglobina diferente da HbA, a principal hemoglobina dos adultos. A *hemoglobina fetal (HbF)* tem uma cadeia polipeptídica chamada  $\gamma$  (gama) em substituição à cada cadeia  $\beta$ . A estrutura da HbF é, então,  $\alpha_2\gamma_2$ , em contraposição à estrutura  $\alpha_2\beta_2$  da HbA.

HbF tem maior afinidade por oxigênio que HbA: sua curva de saturação com oxigênio é deslocada para a esquerda em relação à curva de saturação da HbA (Figura 3.5). Graças a esta propriedade, o feto pode obter oxigênio do sangue da mãe, através da placenta — efetivamente, HbF é oxigenada à custa da HbA materna.

A diferença de afinidade por oxigênio entre HbF e HbA é devida à força de ligação de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG, Seção 3.3.1) aos dois tipos de hemoglobina. Nas cadeias  $\gamma$ , um aminoácido com carga positiva foi substituído por um polar sem carga. Ou seja, na molécula de HbF existe um par a menos de grupos positivos na cavidade onde se insere o BPG (Figura 3.8), que, por isto, liga-se mais fracamente que na HbA. Como a concentração de BPG é igual nas hemácias da mãe e do feto, e a HbF liga-se menos eficientemente ao BPG, a forma desoxigenada desta hemoglobina fica menos estável e a sua afinidade por oxigênio aumenta: o oxigênio flui da oxi-Hb da mãe para a desoxi-Hb do feto.

### 3.5 Hemoglobinas anormais

Foram descritas mais de 700 anomalias hereditárias nos seres humanos causadas por mutações que determinam alterações na estrutura da hemoglobina ou diminuição da síntese de suas cadeias polipeptídicas. São as chamadas *hemoglobinopatias*, que podem ser clinicamente insignificantes ou constituírem doenças graves. O estudo das hemoglobinas mutantes introduziu o conceito de *patologia molecular*, que se refere a doenças causadas pela alteração de uma única proteína.

As mutações na molécula de hemoglobina ocasionam, frequentemente, a substituição de um único aminoácido,

trazendo consequências variáveis, segundo sua localização. Quando está localizado na superfície da molécula, sua alteração geralmente é inócua. A grande exceção a esta regra é a *hemoglobina S (HbS)*, que causa a *anemia falciforme* (Seção 2.8). A frequência do gene de HbS, ao contrário dos genes de outras hemoglobinas mutadas, é alta, chegando a 40% em algumas regiões da África. Como a sobrevivência dos homocigotos para HbS é baixa, somente uma forte pressão seletiva poderia explicar a alta incidência do gene defeituoso — o heterocigoto deveria ter alguma vantagem em relação ao homocigoto normal. De fato, os portadores do gene mutado são resistentes a uma forma letal de *malária*. A incidência desta doença e a frequência do gene para HbS são altamente correlacionadas — 70 anos após esta descoberta, o mecanismo de proteção pelo gene mutado ainda é questionado. A anemia falciforme demonstra claramente que mutações deletérias podem constituir ferramentas da evolução, determinando uma maior probabilidade de sobrevivência de seus portadores.

Mutações afetando aminoácidos situados no interior da molécula geralmente determinam a síntese de hemoglobinas não funcionais. A perda da função normal pode resultar de perturbações da estrutura terciária, como acontece quando há substituição de um aminoácido por prolina, que interrompe uma  $\alpha$ -hélice. Em outros casos, a troca de aminoácidos com cadeia lateral apolar por outros com grupo R polar altera o caráter hidrofóbico da cavidade onde se aloja o grupo heme, ocasionando a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .

O segundo grupo de lesões genéticas é caracterizado pela síntese não estequiométrica das subunidades da hemoglobina — são as *talassemias*, que têm alta incidência na região do Mar Mediterrâneo (*thalassa*, em grego, significa mar). Nas  $\alpha$ -*talassemias*, geralmente causadas por deleção gênica, a produção das cadeias  $\alpha$  é defeituosa, enquanto nas  $\beta$ -*talassemias*, resultantes de vários tipos de mutações, faltam as cadeias  $\beta$ . Os homocigotos apresentam anemia severa e essa condição é denominada *talassemia maior*; os heterocigotos são assintomáticos (*talassemia menor*) e, como acontece na anemia falciforme, apresentam alguma proteção contra a *malária*.

A hemoglobina pode sofrer alterações químicas transitórias, resultantes de processos endógenos, como é o caso de sua ligação à glicose, formando a *hemoglobina glicada* ( $\text{HbA}_{1c}$ ), em uma reação não enzimática. A concentração de  $\text{HbA}_{1c}$  aumenta quando a concentração de glicose no sangue é anormalmente elevada (hiperglicemia), como ocorre em pacientes com diabetes (Seção 21.4).  $\text{HbA}_{1c}$  apresenta uma alta afinidade por oxigênio e resposta atenuada ao 2,3-bisfosfoglicerato (Seção 3.3.1). A conjugação desses fatores dificulta a liberação do oxigênio ligado à hemoglobina, podendo contribuir para a hipóxia celular e a instalação da microangiopatia diabética.

Outra modificação da hemoglobina é a oxidação do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) do grupo heme ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que origina a *meta-hemoglobina (HbM)*, que não se liga ao oxigênio. Níveis elevados de HbM (meta-hemoglobinemia) podem ser devidos a mutações ou à ação de drogas e poluentes ambientais.

A manutenção do íon no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) depende de diversos fatores, como a integridade do nicho hidrofóbico da hemoglobina onde se insere o grupo heme, formado por resíduos de aminoácidos apolares, e a atuação de sistemas enzimáticos antioxidantes presentes nas hemácias (Seção 12.3) — mutações que afetem esses fatores podem causar a *meta-hemoglobinemia congênita*, que é rara e letal quando em homocigose.

A *meta-hemoglobinemia adquirida* resulta da exposição a reagentes oxidantes e de incidência relativamente frequente. Na prática médica, pode ser causada por medicamentos, como anestésicos locais (benzocaína), nitrofenóis (dinitrofenol — Seção 11.5), fertilizantes (nitratos) e produtos industriais, como anilina, corante usado na fabricação de *jeans*. Pacientes submetidos a procedimentos que utilizam benzocaína tópica na orofaringe e traqueia (broncoscopia, endoscopia) podem apresentar concentração elevada de HbM. O tratamento consiste na administração de agentes redutores como azul de metileno.

O aumento de HbM no sangue se manifesta clinicamente por cianose (coloração azulada) de lábios e extremidades, cor marrom do sangue arterial (HbM tem cor marrom) e redução da saturação arterial de oxigênio; dependendo do nível de HbM, pode ocorrer hipóxia grave e até morte.

Em seres humanos saudáveis, os mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo mantêm teores de HbM menores do que 1% da hemoglobina total. Porém, a exposição a um agente oxidante chega a aumentar esse valor em mais de mil vezes.

Término da leitura básica

## Bibliografia

- Allison AC: The discovery of resistance to malaria of sickle-cell heterozygotes. *Biochem Molec Biol Educ* **30**: 279-287, 2002.
- Campbell KL *et al.*: Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nat Genet* **42** (6): 536-540, Year published: 2010.
- Cyrklaff M *et al.*: Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Science* **334** (6060): 1283-1286, 2011.
- Flandrois M *et al.*: La méthémoglobinémie: une maladie à ne pas oublier (Methemoglobinemia: A rare but important condition to recognize). *Arch Pediatr* **20** (10): 1160-1161, 2013.
- Giardina B *et al.*: The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol Scand* **182** (3): 229-244, 2004.

# Função Proteica

Início leitura avançada

- 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio 158
- 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas 174
- 5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares 179

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é importante para entender seu funcionamento; no entanto, a estrutura mostrada em duas dimensões em uma página é ilusoriamente estática. As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem de modo quase invariável de interações com outras moléculas, e essas interações são afetadas de maneiras fisiologicamente importantes por mudanças sutis ou súbitas na conformação proteica. Este capítulo analisa de que forma as proteínas interagem com outras moléculas e como essas interações estão relacionadas com a estrutura dinâmica da proteína. As interações moleculares são de extrema importância para a função proteica. Como foi visto no capítulo anterior, a função das proteínas fibrosas como elementos estruturais de células e tecidos depende de interações quaternárias estáveis e de longa duração entre cadeias polipeptídicas idênticas. Como será abordado neste capítulo, as funções de muitas outras proteínas envolvem interações com uma grande variedade de moléculas diferentes. A maioria dessas interações é transitória, embora possa ser a base de processos fisiológicos complexos como o transporte do oxigênio, a função imune e a contração muscular, tópicos examinados neste capítulo. As proteínas que realizam esses processos esclarecem os princípios essenciais da função proteica citados a seguir, alguns deles já comentados no capítulo anterior:

As funções de muitas proteínas envolvem a ligação reversível com outras moléculas. Uma molécula que interage de modo reversível com uma proteína é chamada de **ligante**, que pode ser qualquer tipo de molécula, incluindo outra proteína. A natureza transitória das interações proteína-ligante é fundamental para a vida, pois permite que um organismo responda de maneira rápida e reversível a mudanças ambientais e condições metabólicas.

Um ligante interage com uma região da proteína chamada de **sítio de ligação**, que é complementar a ele em tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Além disso, a interação é específica: a proteína pode diferenciar milhares de moléculas diferentes no seu ambiente e interagir seletivamente somente com uma ou algumas. Determinada proteína pode ter sítios de ligação separados para vários ligantes diferentes. Essas interações moleculares específicas são cruciais na manutenção do alto grau de ordem em um sistema vivo. (Esta discussão exclui a ligação da água, que pode interagir fraca e inespecificamente com muitas partes de uma proteína. O Capítulo 6 estuda a água como ligante específico para muitas enzimas.)

As proteínas são flexíveis. Mudanças na conformação podem ser sutis, refletindo vibrações moleculares e pequenos movimentos de resíduos de aminoácidos por toda a proteína. Assim, diz-se que uma proteína flexível está “respirando”. Mudanças na conformação também podem ser muito significativas, com segmentos importantes da estrutura proteica movendo-se por uma distância de vários nanômetros. Mudanças conformacionais específicas frequentemente são essenciais para a função proteica.

A interação de uma proteína com seu ligante está acoplada a uma mudança de conformação da proteína que torna o sítio de ligação mais complementar ao ligante, permitindo uma interação mais firme. A adaptação estrutural que ocorre entre proteína e ligante é chamada de **encaixe induzido**.

Em uma proteína com várias subunidades, mudanças conformacionais em uma delas com frequência afetam a conformação das demais.

As interações entre proteínas e ligantes podem ser reguladas, geralmente por meio de interações específicas com um ou mais ligantes adicionais, causando mudanças conformacionais na proteína que afetam a interação com o primeiro ligante.

As enzimas representam um caso especial de função proteica. Elas se ligam a outras moléculas e as transformam quimicamente – ou seja, catalisam reações. As moléculas sobre as quais as enzimas exercem seus efeitos são



chamadas de **substratos** da reação em vez de ligantes, e o sítio de ligação é chamado de **sítio catalítico** ou **sítio ativo**. Este capítulo enfatiza as funções não catalíticas das proteínas. No Capítulo 6, será estudada a catálise enzimática, tópico central em bioquímica. O leitor perceberá que os temas deste capítulo – ligação, especificidade e mudança conformacional – continuarão no próximo capítulo, com o acréscimo da participação das proteínas nas alterações químicas.

## 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

A mioglobina e a hemoglobina talvez sejam as proteínas mais estudadas e melhor compreendidas. Foram as primeiras a ter sua estrutura tridimensional elucidada e ilustram quase todos os aspectos do mais central dos processos bioquímicos: a interação reversível de um ligante com uma proteína. Esse modelo clássico de função proteica é muito útil para compreender como as proteínas funcionam. 🧠 **Proteínas de ligação ao oxigênio-mioglobina: armazenamento de oxigênio**

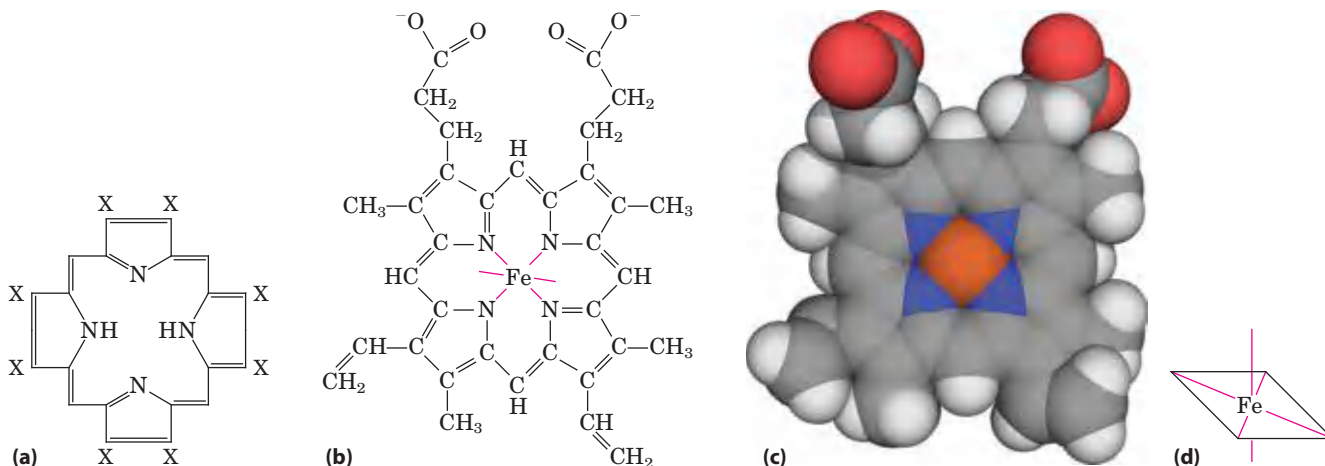
### O oxigênio liga-se ao grupo prostético heme

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas (consultar Tabela 2-3) e não pode ser transportado para os tecidos em quantidade suficiente se estiver simplesmente dissolvido no plasma sanguíneo. A difusão do oxigênio pelos tecidos também não é eficiente em distâncias maiores do que alguns milímetros. A evolução de animais maiores e multicelulares dependeu do desenvolvimento de proteínas capazes de transportar e armazenar oxigênio. Contudo, nenhuma cadeia lateral dos aminoácidos das proteínas é adaptada para a ligação reversível de moléculas de oxigênio. Essa função é exercida por determinados metais de transição, entre eles o cobre e o ferro, que apresentam forte tendência para ligar

oxigênio. Os organismos multicelulares exploram as propriedades dos metais, sobretudo do ferro, para o transporte do oxigênio. Contudo, o ferro livre promove a formação de espécies de oxigênio altamente reativas, como as hidroxilas, que podem danificar o DNA e outras macromoléculas. Por isso, o ferro usado nas células está ligado em formas que o sequestram e/ou o tornam menos reativo. Nos organismos multicelulares – especialmente aqueles nos quais o ferro, na sua capacidade de transportar oxigênio, deve ser transportado a grandes distâncias –, o ferro é incorporado em um grupo prostético chamado de **heme**, ligado à proteína. (Lembre-se do Capítulo 3 que um grupo prostético é um composto associado permanentemente a uma proteína e que contribui para sua função.)

O heme consiste em uma complexa estrutura orgânica em anel, **protoporfirina**, à qual se liga um único átomo de ferro no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (**Figura 5-1**). Esse átomo de ferro tem seis ligações de coordenação, quatro delas com os átomos de nitrogênio que fazem parte do sistema plano do **anel de porfirina** e duas perpendiculares à porfirina. Os átomos de nitrogênio coordenados (que têm caráter de doador de elétrons) ajudam a prevenir a conversão do ferro do heme para o estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). No estado  $\text{Fe}^{2+}$ , o ferro liga oxigênio de forma reversível; no estado  $\text{Fe}^{3+}$ , ele não liga oxigênio. O heme é encontrado em muitas proteínas transportadoras de oxigênio, assim como em algumas proteínas que participam das reações de oxirredução (transferência de elétrons), como os citocromos (Capítulo 19).

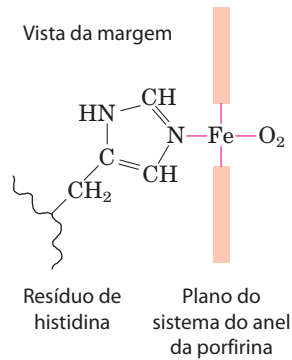
As moléculas de heme livres (não ligadas a uma proteína) deixam o  $\text{Fe}^{2+}$  com duas ligações de coordenação “abertas”. A reação simultânea de uma molécula de  $\text{O}_2$  com duas moléculas de heme livres (ou dois  $\text{Fe}^{2+}$  livres) pode resultar em uma conversão irreversível de  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ . Nas proteínas que contêm heme, essa reação é impedida pelo sequestro do heme no interior da estrutura da proteína. Assim, o acesso às duas ligações de coordenação abertas fica restrito. Uma delas está ocupada pelo nitrogê-



**FIGURA 5-1 Heme.** O grupo heme está presente na mioglobina, na hemoglobina e em muitas outras proteínas, designadas hemoproteínas. O heme consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina IX, com um átomo de ferro ligado no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). (a) As porfirinas, das quais a protoporfirina IX é apenas um exemplo, consistem em quatro anéis

pírrólicas unidos por pontes de meteno, com substituições em uma ou mais posições marcadas com X. (b, c) Duas representações do heme (derivadas de PDB ID 1CCR). O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do anel e ligadas ao sistema do anel planar da porfirina, e (d) duas perpendiculares a ele.





**FIGURA 5-2 Vista lateral do grupo heme.** Esta vista mostra as duas ligações de coordenação com o  $\text{Fe}^{2+}$  perpendiculares ao sistema de anel da porfirina. Uma é ocupada por um resíduo de His, também chamado de His proximal; a outra é o sítio de ligação para o oxigênio. As quatro ligações de coordenação remanescentes estão no plano do anel e ligadas ao sistema de anel planar da porfirina.

nio da cadeia lateral de um resíduo de histidina. A outra é o sítio de ligação para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) (**Figura 5-2**). Quando o oxigênio se liga, as propriedades eletrônicas do ferro são alteradas; isso leva à mudança de cor do sangue venoso pobre em oxigênio, roxo-escuro, para o vermelho-brilhante do sangue arterial rico em oxigênio. Algumas moléculas pequenas, como o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), coordenam com o ferro do heme com maior afinidade do que o  $\text{O}_2$ . Quando uma molécula de CO está ligada ao heme, o  $\text{O}_2$  é excluído; por isso o CO é altamente tóxico para os organismos aeróbios (tópico explorado mais adiante, no Quadro 5-1). Pelo fato de envolverem e sequestrarem o heme, as proteínas de ligação ao oxigênio regulam o acesso do CO e de outras moléculas pequenas ao ferro do heme.

### As globinas são uma família de proteínas de ligação ao oxigênio

As **globinas** formam uma ampla família de proteínas, todas com estruturas primária e terciária semelhantes. As globinas são comumente encontradas em todas as classes dos eucariotos e mesmo em algumas bactérias. A maioria atua no armazenamento ou no transporte de oxigênio, embora algumas tenham um papel de sensores de oxigênio, óxido nítrico ou monóxido de carbono. O nematódeo simples *Caenorhabditis elegans* tem genes que codificam 33 diferentes globinas. Nos humanos e em outros mamíferos, existem, pelo menos, quatro tipos de globinas. A mioglobina monomérica facilita a difusão do oxigênio no tecido muscular. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de mamíferos marinhos, como as focas e as baleias, pois também exerce função de armazenamento de oxigênio em mergulhos prolongados. A hemoglobina tetramérica é responsável pelo transporte do oxigênio na corrente sanguínea. A neuroglobina monomérica se expressa em neurônios e ajuda a proteger o cérebro da hipóxia (baixo nível de oxigênio) ou da isquemia (restrição do suprimento de sangue). A citoglobina, outra globina monomérica, é encontrada em altos níveis em uma gama de tecidos, mas sua função não é conhecida.

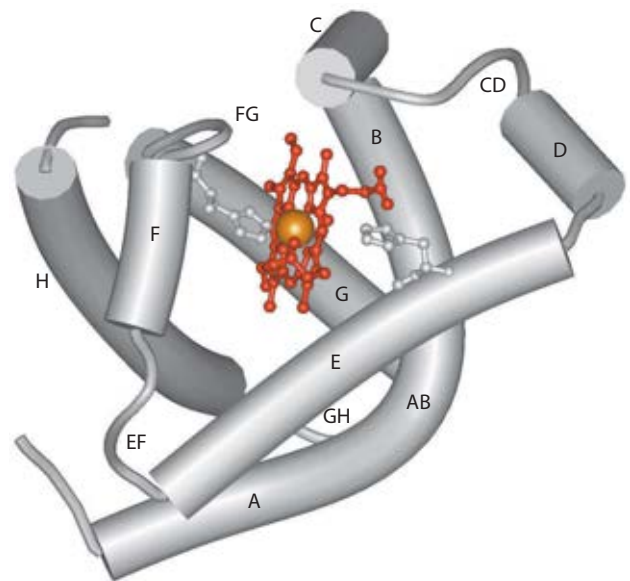
### A mioglobina tem um único sítio de ligação ao oxigênio

A mioglobina ( $M_r$  16.700; abreviada Mb) consiste em um único polipeptídeo de 153 resíduos de aminoácidos com uma molécula de heme. Como é típico de um polipeptídeo de globina, a mioglobina é formada por oito segmentos  $\alpha$ -helicoidais conectados por inflexões (**Figura 5-3**). Cerca de 78% dos resíduos de aminoácidos das proteínas estão nessas hélices  $\alpha$ .

Qualquer discussão detalhada sobre a função proteica envolverá a estrutura proteica. No caso da mioglobina, primeiro serão apresentadas certas regras estruturais características das globinas. Como pode ser visto na Figura 5-3, os segmentos helicoidais são denominados de A a H. Um resíduo de aminoácido é designado pela posição na sequência de aminoácidos ou por sua localização na sequência de um segmento  $\alpha$ -helicoidal específico. Por exemplo, o resíduo de His coordenado com o heme na mioglobina, His<sup>93</sup> (o 93º resíduo a contar da extremidade aminoterminal da sequência polipeptídica), é também chamado de His F8 (o oitavo resíduo da hélice  $\alpha$  F). As inflexões na estrutura são designadas AB, CD, EF, FG, e assim por diante, refletindo os respectivos segmentos conectados.

### As interações proteína-ligante podem ser quantitativamente descritas

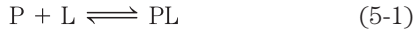
A função da mioglobina depende da capacidade da proteína de não somente ligar oxigênio, mas também de liberá-lo quando e onde ele for necessário. Como a função em bioquímica frequentemente gira em torno de uma interação



**FIGURA 5-3 Mioglobina.** (PDB ID 1MBO) Os oito segmentos  $\alpha$ -helicoidais (mostrados aqui como cilindros) estão marcados de A até H. Os resíduos não helicoidais nas inflexões que os conectam estão marcados como AB, CD, EF, e assim por diante, indicando os segmentos que eles interconectam. Algumas inflexões, incluindo BC e DE, são abruptas e não contêm resíduos; elas normalmente não estão marcadas. (O segmento curto visível entre D e E é um artefato da representação computacional.) O heme está ligado em um bolsão formado na maior parte pelas hélices E e F, embora resíduos de aminoácidos de outros segmentos da proteína também participem.

proteína-ligante reversível desse tipo, uma descrição quantitativa dessa interação constitui a parte central de muitas investigações bioquímicas.

Em geral, a ligação reversível de uma proteína (P) a um ligante (L) pode ser descrita por uma **expressão de equilíbrio** simples:



A reação é caracterizada por uma constante de equilíbrio,  $K_a$ , tal que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5-2)$$

onde  $k_a$  e  $k_d$  são constantes de velocidade (mais detalhes adiante). O termo  $K_a$  é uma **constante de associação** (não confundir com o  $K_a$  que significa a constante de dissociação do ácido; p. 62) que descreve o equilíbrio entre o complexo e os seus componentes separados. A constante de associação é uma medida da afinidade do ligante L pela proteína.  $K_a$  tem unidades de  $M^{-1}$ ; um valor mais alto de  $K_a$  corresponde a uma afinidade mais alta do ligante pela proteína.

O termo de equilíbrio  $K_a$  é equivalente também à razão entre as velocidades das reações para a frente (associação) e reversa (dissociação) que formam o complexo PL. A velocidade de associação é descrita pela constante de velocidade  $k_a$ , e a dissociação pela constante de velocidade  $k_d$ . Conforme será discutido no capítulo seguinte, as constantes de velocidade são constantes de proporcionalidade, que descrevem a fração de um conjunto de reagentes que reage em um dado espaço de tempo. Quando a reação envolve uma molécula, como na reação de dissociação  $PL \rightarrow P + L$ , a reação é de *primeira ordem* e a constante de velocidade ( $k_d$ ) tem unidade de tempo recíproca ( $s^{-1}$ ). Quando a reação envolve duas moléculas, como a reação de associação  $P + L \rightarrow PL$ , ela é chamada de *segunda ordem*, e a constante de velocidade ( $k_a$ ) tem unidades de  $M^{-1} s^{-1}$ .

**CONVENÇÃO-CHAVE:** As constantes de equilíbrio são escritas com  $K$  maiúsculo e as constantes de velocidade com  $k$  minúsculo. ■

O rearranjo da primeira parte da Equação 5-2 mostra que a razão entre a proteína ligada e a livre é diretamente proporcional à concentração do ligante livre:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (5-3)$$

Quando a concentração do ligante for muito maior do que a concentração dos sítios de interação com o ligante, a interação com a proteína não altera de modo significativo a concentração do ligante livre (não ligado) – isto é,  $[L]$  permanece constante. Essa condição é muito aplicável à maioria dos ligantes que interagem com proteínas nas células e simplifica a descrição do equilíbrio de ligação.

Agora é possível considerar o equilíbrio de ligação do ponto de vista da fração,  $\theta$  (teta), dos sítios de interação com o ligante na proteína que estão ocupados pelo ligante:

$$\theta = \frac{\text{sítios de interação ocupados}}{\text{total de sítios de interação}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad (5-4)$$

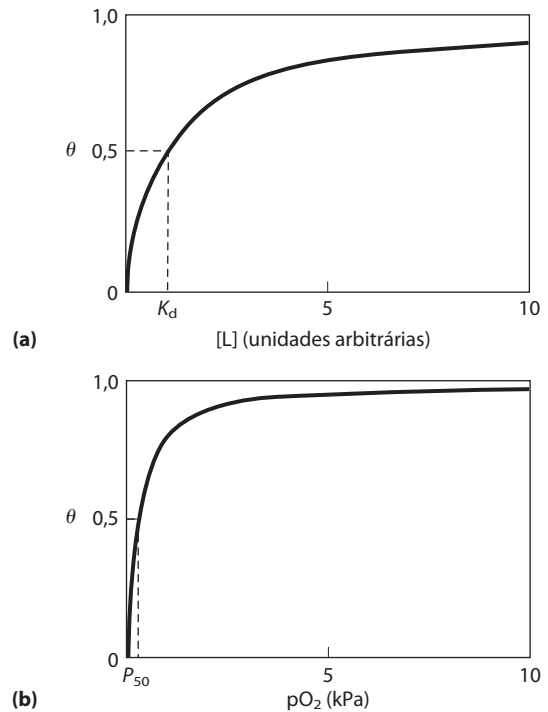
Substituindo  $K_a[L][P]$  por  $[PL]$  (ver Equação 5-3) e rearranjando os termos, obtém-se

$$\theta = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \quad (5-5)$$

O valor de  $K_a$  pode ser determinado a partir de uma curva de  $\theta$  versus a concentração do ligante livre,  $[L]$  (**Figura 5-4a**). Qualquer equação do tipo  $x = y/(y + z)$  descreve uma hipérbole, e conclui-se que  $\theta$  é uma função hiperbólica de  $[L]$ . A fração dos sítios de interação ocupados pelo ligante se aproxima assintoticamente da saturação à medida que  $[L]$  aumenta. A  $[L]$  na qual a metade dos sítios disponíveis está ocupada (i.e.,  $\theta = 0,5$ ) corresponde a  $1/K_a$ .

No entanto, é mais comum (e intuitivamente mais simples) considerar a **constante de dissociação,  $K_d$** , que é a recíproca de  $K_a$  ( $K_d = 1/K_a$ ), sendo dada em unidades de concentração molar (M).  $K_d$  é a constante de equilíbrio para a liberação do ligante. As expressões relevantes mudam para

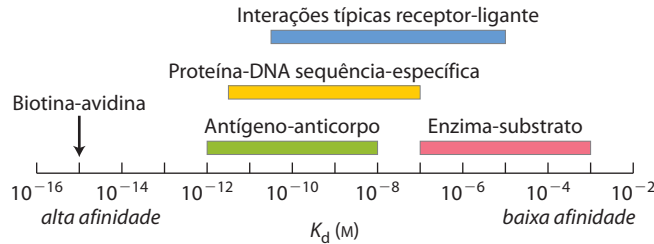
$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (5-6)$$



**FIGURA 5-4 Representação gráfica da interação com o ligante.** A fração ocupada dos sítios de interação com o ligante,  $\theta$ , é representada graficamente em relação à concentração do ligante livre. Ambas as curvas são hipérbolas retangulares. **(a)** Curva de ligação hipotética para o ligante L. A  $[L]$  na qual a metade dos sítios de ligação estão ocupados é equivalente a  $1/K_a$  ou  $K_d$ . A curva tem uma assíntota horizontal quando  $\theta = 1$  e uma vertical (não mostrada) quando  $[L] = -1/K_a$ . **(b)** Curva que descreve a ligação do oxigênio à mioglobina. A pressão parcial do  $O_2$  no ar acima da solução é expressa em quilopascals (kPa). O oxigênio liga-se fortemente à mioglobina, com  $P_{50}$  de apenas 0,26 kPa.

**TABELA 5-1** Algumas constantes de dissociação proteicas

Proteína	Ligante	$K_d$ (M)*
Avidina (clara de ovo)	Biotina	$1 \times 10^{-15}$
Receptor de insulina (humano)	Insulina	$1 \times 10^{-10}$
Imunoglobulina anti-HIV (humana) <sup>†</sup>	gp41 (proteína de superfície do HIV-1)	$4 \times 10^{-10}$
Proteína de ligação a níquel ( <i>E. coli</i> )	Ni <sup>2+</sup>	$1 \times 10^{-7}$
Calmodulina (rato) <sup>‡</sup>	Ca <sup>2+</sup>	$3 \times 10^{-6}$ $2 \times 10^{-5}$



As barras coloridas indicam as variações das constantes de dissociação típicas de várias classes de interações nos sistemas biológicos. Poucas interações, como as que ocorrem entre a proteína avidina e o cofator enzimático biotina, estão fora das variações normais. A interação biotina-avidina é tão forte que pode ser considerada irreversível. As interações proteína-DNA sequência-específicas refletem proteínas que se ligam a uma sequência nucleotídica específica no DNA, em oposição à ligação não específica a qualquer sítio no ácido nucleico.

\* Uma constante de dissociação registrada é válida somente para as condições particulares da solução sob as quais foi medida. Os valores de  $K_d$  para uma interação proteína-ligante podem ser alterados, às vezes em várias ordens de magnitude, por mudanças na concentração salina da solução, no pH, ou por outras por variáveis.

<sup>†</sup> Esta imunoglobulina foi isolada como parte do esforço para desenvolver uma vacina contra o HIV. As imunoglobulinas (descritas adiante no capítulo) são altamente variáveis e a  $K_d$  registrada aqui não deve ser considerada uma característica de todas as imunoglobulinas.

<sup>‡</sup> A calmodulina tem quatro sítios de ligação para o cálcio. Os valores mostrados refletem os sítios de ligação com a menor e a maior afinidade observadas em um conjunto de medidas.

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \quad (5-7)$$

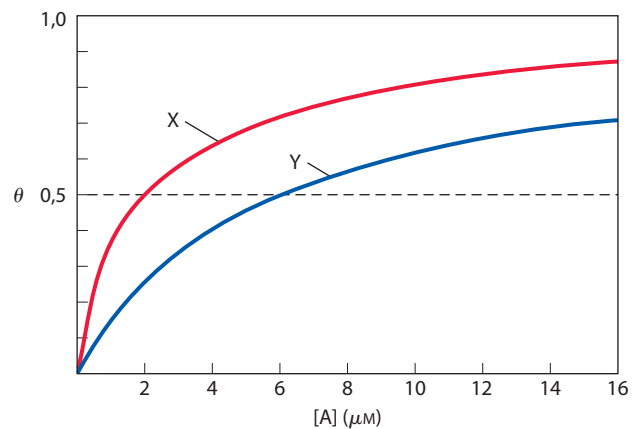
$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (5-8)$$

Quando  $[L]$  for igual a  $K_d$ , metade dos sítios estará ocupada. À medida que  $[L]$  cai abaixo de  $K_d$ , cada vez menos proteínas terão ligantes associados. A  $[L]$  deve ser nove vezes maior do que  $K_d$  para que sejam ocupados 90% dos sítios disponíveis.

Na prática,  $K_d$  é usado muito mais frequentemente do que  $K_a$  para expressar a afinidade de uma proteína por um ligante. Observe que um valor mais baixo de  $K_d$  corresponde a uma afinidade mais alta do ligante pela proteína. A matemática pode ser reduzida às afirmações simples:  $K_d$  é equivalente à concentração molar do ligante na qual a metade dos sítios de interação está ocupada. Nesse ponto, diz-se que a proteína alcançou a metade da saturação com relação à interação com o ligante. Quanto maior a força da interação proteica com o ligante, mais baixa será a concentração necessária do ligante para que metade dos sítios seja ocupada, e assim mais baixo o valor de  $K_d$ . Na Tabela 5-1 estão algumas constantes de dissociação representativas; a escala mostra variações típicas das constantes de dissociação encontradas nos sistemas biológicos.

**PROBLEMA RESOLVIDO 5-1** Constantes de dissociação receptor-ligante

Duas proteínas, X e Y, interagem com o mesmo ligante, A, com as curvas de ligação mostradas abaixo.



Qual é a constante de dissociação,  $K_d$ , para cada proteína? Qual das proteínas (X ou Y) tem a maior afinidade pelo ligante A?

**Solução:** É possível determinar as constantes de dissociação pela análise do gráfico. Uma vez que  $\theta$  representa a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante, a concentração do ligante na qual a metade dos sítios está ocupada – isto é, o ponto onde a curva de ligação cruza a linha onde  $\theta = 0,5$  – é a constante de dissociação. Para X,  $K_d = 2 \mu\text{M}$ ; para Y,  $K_d = 6 \mu\text{M}$ . A proteína X tem maior afinidade pelo ligante, já que está semissaturada a uma  $[A]$  mais baixa.

A ligação do oxigênio à mioglobina segue os padrões discutidos anteriormente. No entanto, como o oxigênio é um gás, é necessário fazer alguns pequenos ajustes nas equações para que os experimentos no laboratório possam ser realizados de modo mais conveniente. Em primeiro lugar, substitui-se a concentração do oxigênio dissolvido pela  $[L]$ , na Equação 5-8, a fim de obter

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \quad (5-9)$$

Visto que, para qualquer ligante,  $K_d$  é igual a  $[O_2]$  na qual a metade dos sítios de interação com o ligante está ocupada, ou  $[O_2]_{0,5}$ , a Equação 5-9 se torna

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \quad (5-10)$$

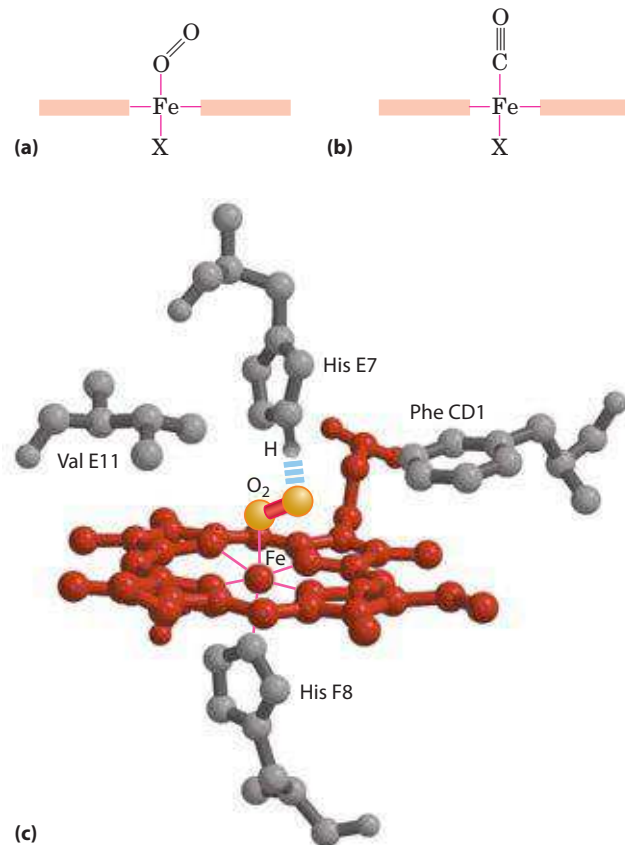
Em experimentos usando o oxigênio como ligante, o que varia é a pressão parcial do oxigênio ( $pO_2$ ) na fase gasosa sobre a solução, pois isso é mais fácil de medir do que a concentração do  $O_2$  dissolvido na solução. A concentração de uma substância volátil em solução é sempre proporcional à pressão parcial local do gás. Assim, definindo a pressão parcial do oxigênio na  $[O_2]_{0,5}$  como  $P_{50}$ , a substituição na Equação 5-10 nos dá

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \quad (5-11)$$

A Figura 5-4b apresenta uma curva de interação para a mioglobina que relaciona  $\theta$  com  $pO_2$ .

## A estrutura da proteína afeta a forma de interação com o ligante

A interação entre ligante e proteína raramente é tão simples como sugerem as equações apresentadas. A interação é muito afetada pela estrutura da proteína e com frequência é acompanhada por mudanças conformacionais. Por exemplo, a especificidade com a qual o heme interage com seus diversos ligantes é alterada quando ele é um componente da mioglobina. O monóxido de carbono se liga a três moléculas de heme livre mais de 20.000 vezes melhor do que o  $O_2$  (isto é, o  $K_d$  ou a  $P_{50}$  para a ligação do CO ao heme livre é mais de 20.000 vezes mais baixo do que para o  $O_2$ ), mas ele se liga somente 200 vezes melhor do que o  $O_2$  quando o heme está ligado à mioglobina. A diferença pode ser parcialmente explicada por impedimento estérico. Quando o  $O_2$  se liga ao heme livre, o eixo da molécula do oxigênio é posicionado em um ângulo em relação à ligação Fe—O (Figura 5-5a). Em contrapartida, quando o CO se liga ao heme livre, os átomos de Fe, C e O se posicionam em linha reta (Figura 5-5b). Em ambos os casos, a ligação reflete a



**FIGURA 5-5** Efeitos estéricos causados pela interação do ligante ao heme da mioglobina. **(a)** O oxigênio liga-se ao heme com o seu eixo formando um ângulo, uma conformação de ligação facilmente ajustada pela mioglobina. **(b)** O monóxido de carbono liga-se ao heme livre com seu eixo perpendicular ao plano do anel porfirínico. O CO, quando ligado ao heme na mioglobina, é forçado a adotar um ângulo inadequado porque o arranjo perpendicular é bloqueado estericamente pela His E7, a His distal. Este efeito enfraquece a ligação do CO à mioglobina. **(c)** Outra visão do heme da mioglobina (derivada de PDB ID 1MBO) mostrando o arranjo dos resíduos dos aminoácidos-chave ao redor do heme. O oxigênio liga-se por uma ligação de hidrogênio à His distal, His E7 (His<sup>64</sup>), facilitando a posterior ligação de  $O_2$ .

geometria dos orbitais híbridos em cada ligante. Na mioglobina, a His<sup>64</sup> (His E7), no lado do heme onde o  $O_2$  se liga, está longe demais para coordenar com o ferro do heme, mas se relaciona com o ligante que estiver interagindo com o heme. Esse resíduo, chamado de *His distal* (para distinguir de *His proximal*, His F8), forma uma ligação de hidrogênio com o  $O_2$  (Figura 5-5c), mas pode ajudar a impedir a ligação linear do CO, o que explica a redução seletiva na ligação do CO ao heme na mioglobina (e na hemoglobina). Uma redução na ligação do CO é fisiologicamente importante, pois este gás é um subproduto pobre do metabolismo celular. Outros fatores, ainda não bem definidos, também podem modular a interação do heme com o CO nessas proteínas.

A ligação do  $O_2$  ao heme da mioglobina também depende dos movimentos moleculares, ou “respirações”, na estrutura da proteína. A molécula de heme está profundamente enterrada no polipeptídeo dobrado, sem um caminho direto para o trânsito do oxigênio da solução circundante para o sítio de interação com o ligante. Se a proteína fosse rígida, o  $O_2$  não entraria ou sairia do bolsão do heme em uma taxa



mensurável. Contudo, a flexibilização molecular rápida das cadeias laterais dos aminoácidos gera cavidades transitórias na estrutura da proteína, e o  $O_2$  entra e sai movendo-se através dessas cavidades. Simulações em computador de flutuações estruturais rápidas na mioglobina sugerem que existem muitas dessas vias. Uma das principais é gerada pela rotação da cadeia lateral da His distal (His<sup>64</sup>), que ocorre em uma escala de tempo de nanossegundo ( $10^{-9}$  s). Mesmo mudanças conformacionais sutis podem ser críticas para a atividade da proteína.

Na neuroglobina, citoglobina e em algumas globinas encontradas em plantas e invertebrados, a His distal (His E7) está coordenada diretamente com o ferro do heme. Nessas globinas, o oxigênio ou outros ligantes devem deslocar a His distal no processo de ligação.

## A hemoglobina transporta oxigênio no sangue

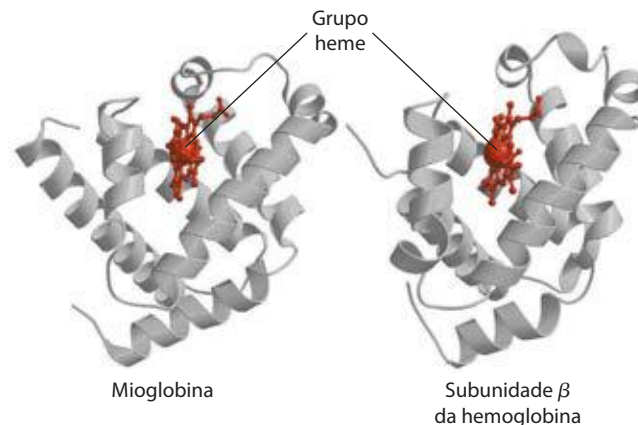
**Proteínas de ligação ao oxigênio-hemoglobina: transporte de oxigênio**  
Quase todo o oxigênio carregado pelo sangue total em animais está ligado à hemoglobina e é transportado por ela nos eritrócitos. Os eritrócitos humanos normais são pequenos discos bicôncavos (6 a 9  $\mu\text{m}$  de diâmetro), formados a partir de células-tronco precursoras, chamadas de **hemocitoblastos**. No processo de maturação, a célula-tronco produz células-filhas que produzem grandes quantidades de hemoglobina, perdendo em seguida suas organelas intracelulares – núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os eritrócitos são, portanto, células vestigiais, incompletas, incapazes de se reproduzir e, nos humanos, destinadas a viver por somente 120 dias. Sua principal função é carregar hemoglobina dissolvida no citosol em concentração muito alta (~34% do peso total).

A hemoglobina está cerca de 96% saturada com oxigênio no sangue arterial que passa dos pulmões, pelo coração até os tecidos periféricos. No sangue venoso que retorna ao coração, ela está somente cerca de 64% saturada. Assim, cada 100 mL de sangue que banha um tecido libera um terço do oxigênio que carrega, ou 6,5 mL de  $O_2$  gasoso, na pressão atmosférica e na temperatura corporal.

A mioglobina, com sua curva hiperbólica de ligação ao oxigênio (Figura 5-4b), é relativamente insensível a pequenas alterações na concentração do oxigênio dissolvido e, por isso, funciona bem como proteína de armazenamento de oxigênio. A hemoglobina, com suas múltiplas subunidades e sítios de ligação para o  $O_2$ , é mais adequada para o transporte do oxigênio. Conforme será visto, as interações entre as subunidades de uma proteína multimérica permitem uma resposta altamente sensível a pequenas alterações na concentração do ligante. As interações entre as subunidades da hemoglobina causam mudanças conformacionais que alteram a afinidade da proteína pelo oxigênio. A modulação da ligação do oxigênio permite que a proteína de transporte de  $O_2$  responda a alterações na demanda de oxigênio pelos tecidos.

## As subunidades da hemoglobina têm estrutura semelhante à da mioglobina

A hemoglobina ( $M_r$  64.500; abreviada Hb) é aproximadamente esférica, com diâmetro de quase 5,5 nm. É uma proteína tetramérica, contendo quatro grupos prostéticos heme, cada um associado com uma cadeia polipeptídica. A



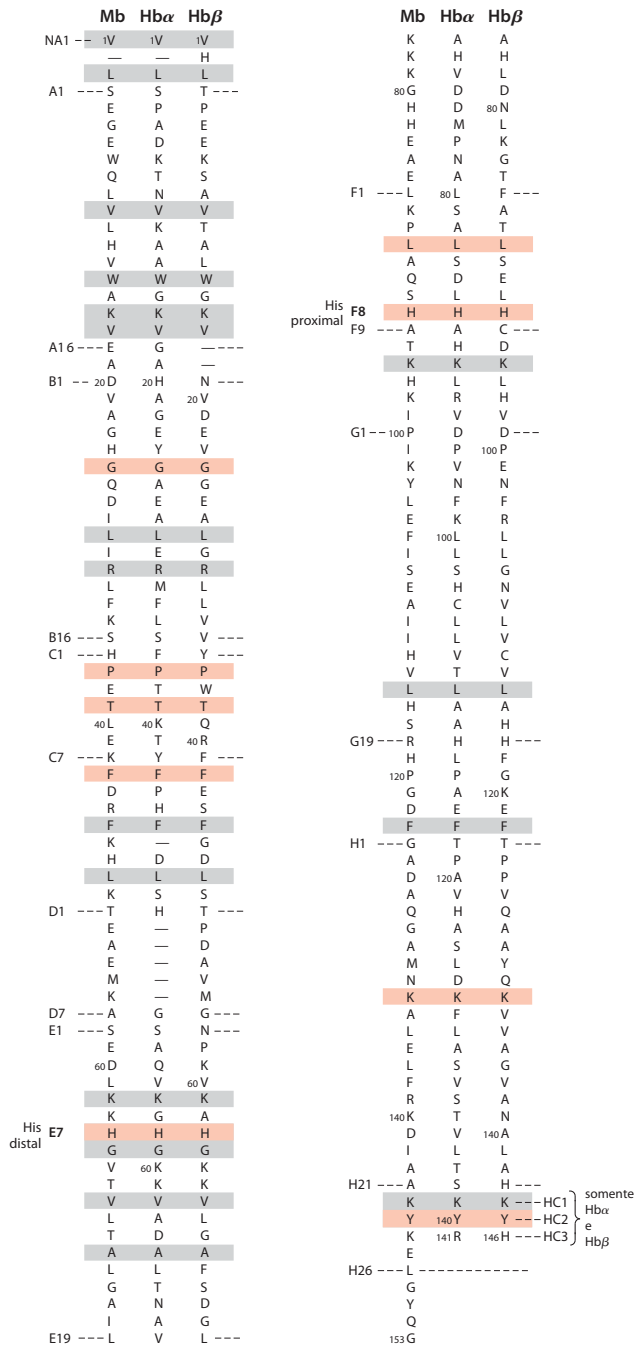
**FIGURA 5-6** Comparação entre a estrutura da mioglobina (PDB ID 1MBO) e a da subunidade  $\beta$  da hemoglobina (derivada de PDB ID 1HGA).

hemoglobina do adulto contém dois tipos de globina, duas cadeias  $\alpha$  (com 141 resíduos cada uma) e duas cadeias  $\beta$  (com 146 resíduos cada uma). Apesar de menos da metade dos resíduos de aminoácidos ser idêntica na sequência polipeptídica das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , a estrutura tridimensional dos dois tipos de subunidades é muito semelhante. Além disso, sua estrutura é muito semelhante à da mioglobina (Figura 5-6), apesar de a sequência de aminoácidos dos três polipeptídeos ser idêntica apenas em 27 posições (Figura 5-7). Os três polipeptídeos são membros da família proteica das globinas. A convenção para a denominação de hélice, descrita para a mioglobina, também se aplica para os polipeptídeos da hemoglobina, exceto pelo fato de a subunidade  $\alpha$  não ter a hélice curta D. O bolsão de ligação ao heme é composto na maior parte pelas hélices E e F em cada uma das subunidades.

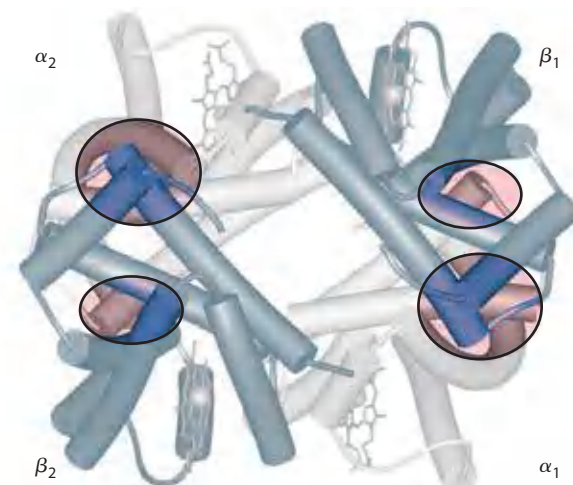
A estrutura quaternária da hemoglobina caracteriza interações fortes entre as subunidades diferentes. A interface  $\alpha_1\beta_1$  (e seu complemento  $\alpha_2\beta_2$ ) envolve mais de 30 resíduos, e sua interação é suficientemente forte para que esses dímeros  $\alpha\beta$  permaneçam intactos mesmo que o tratamento suave da hemoglobina com ureia separe o tetrâmero nos dímeros. A interface  $\alpha_1\beta_2$  (e  $\alpha_2\beta_1$ ) envolve 19 resíduos (Figura 5-8). As interações hidrofóbicas predominam em todas as interfaces, mas existem também muitas ligações de hidrogênio e alguns pares iônicos (ou pontes salinas) cuja importância será discutida adiante.

## A hemoglobina sofre mudança estrutural quando se liga ao oxigênio

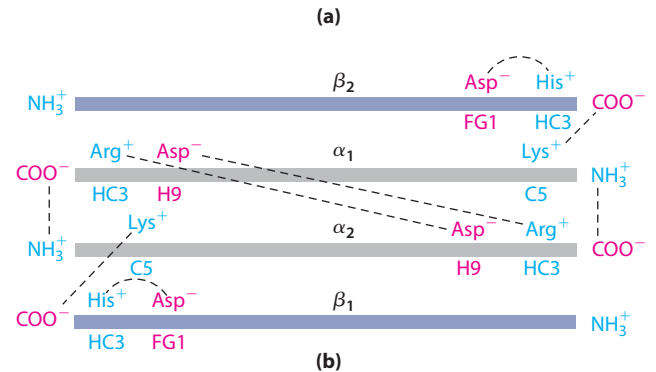
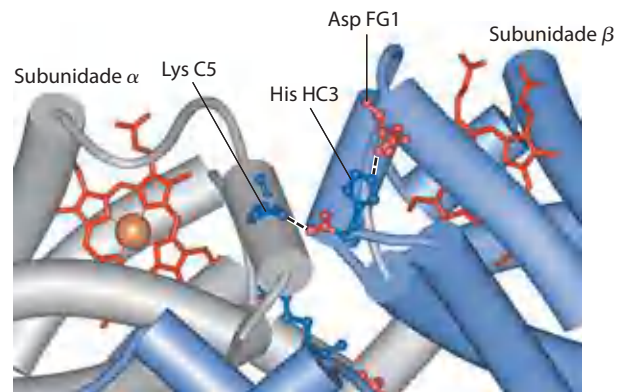
A análise por raios X revelou duas conformações principais da hemoglobina: o **estado R** e o **estado T**. Embora o oxigênio se ligue à hemoglobina nos dois estados, ele tem muito mais afinidade pela proteína no estado R. A ligação do oxigênio estabiliza o estado R. Experimentalmente, quando o oxigênio não está presente, o estado T é mais estável, e é, assim, a conformação predominante da **desoxiemoglobina**. Originalmente, T e R significavam “tenso” e “relaxado”, pois o estado T é estabilizado por um número maior de pares iônicos, muitos dos quais ficam na interface  $\alpha_1\beta_2$  (e  $\alpha_2\beta_1$ ) (Figura 5-9). A ligação do  $O_2$  à subunidade da



**FIGURA 5-7** A sequência de aminoácidos da mioglobina de baleia e das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina humana. As linhas tracejadas assinalam os limites das hélices. Para um alinhamento ótimo, pequenas lacunas tiveram que ser introduzidas nas duas seqüências da Hb, onde haviam aminoácidos presentes nas seqüências usadas na comparação. Com exceção da hélice D que não existe na Hb $\alpha$ , esse alinhamento permite o uso da convenção de letras das hélices que enfatiza o posicionamento comum dos resíduos de aminoácidos que são idênticos nas três estruturas (sombreados). Os resíduos sombreados em cor salmão são conservados em todas as globinas conhecidas. Observe que a designação comum de letras e números das hélices para os aminoácidos não corresponde necessariamente a uma posição comum na seqüência linear de aminoácidos nos polipeptídeos. Por exemplo, o resíduo His distal é His E7 nas três estruturas, mas corresponde a His<sup>64</sup>, His<sup>68</sup> e His<sup>63</sup> nas seqüências lineares de Mb, Hb $\alpha$  e Hb $\beta$ , respectivamente. Os resíduos não helicoidais nas extremidades carboxi e amino, além do primeiro (A) e do último (H) segmento  $\alpha$ -helicoidal, estão assinalados com NA e HC, respectivamente.

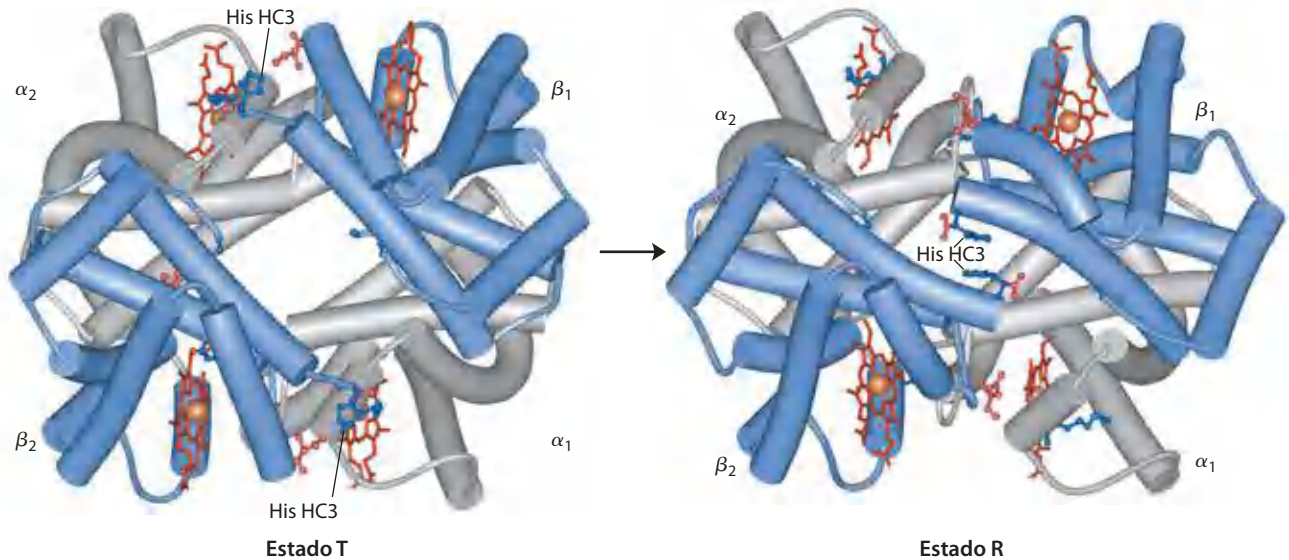


**FIGURA 5-8** Interações dominantes entre as subunidades da hemoglobina. (PDB ID 1HGA) Nesta representação, as subunidades  $\alpha$  estão em cinza-claro e as subunidades  $\beta$  estão em cinza-escuro. As interações mais fortes (destacadas) ocorrem entre subunidades diferentes. Quando o oxigênio se liga, o contato  $\alpha_1\beta_1$  se altera um pouco, mas existe uma grande alteração no contato  $\alpha_1\beta_2$ , com o rompimento de vários pares iônicos.



**FIGURA 5-9** Alguns pares iônicos que estabilizam o estado T da desoxiemoglobina. (a) Visão de perto de uma porção da molécula da desoxiemoglobina no estado T (PDB ID 1HGA). As interações entre os pares iônicos His HC3 e Asp FG1 da subunidade  $\beta$  (em azul) e entre Lys C5 da subunidade  $\alpha$  (em cinza) e His HC3 (seu grupo  $\alpha$ -carboxílico) da subunidade  $\beta$  estão indicadas com linhas tracejadas. (Lembre que HC3 é o resíduo carboxiterminal da subunidade  $\beta$ .) (b) As interações entre estes pares iônicos e entre outros não mostrados em (a) estão esquematizadas nesta representação das cadeias polipeptídicas estendidas da hemoglobina.





**FIGURA 5-10 A transição T → R.** (PDB ID 1HGA e 1BBB) Nesta representação da desoxiemoglobina, as subunidades β estão em azul e as subunidades α estão em cinza, como na Figura 5-9. Cadeias laterais carregadas positivamente e cadeias terminais envolvidas em pares iônicos estão mostradas em azul, e suas parceiras carregadas negativamente, em vermelho. A Lys C5 de cada subunidade α e a Asp FG1 de cada subunidade β são visíveis, mas não estão marcadas (compare com a Figura 5-9a). Observe que a molécula está com orientação ligeiramente diferente da Figura 5-9. A transição do estado

T para o estado R altera de modo considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos. Mais perceptivelmente, os resíduos de His HC3 na extremidade carboxiterminal das subunidades β que, no estado T, estão envolvidos em pares iônicos, no estado R sofrem rotação em direção ao centro da molécula, onde não estão mais em pares iônicos. Outro resultado significativo da transição T → R é um estreitamento do bolsão entre as subunidades β.

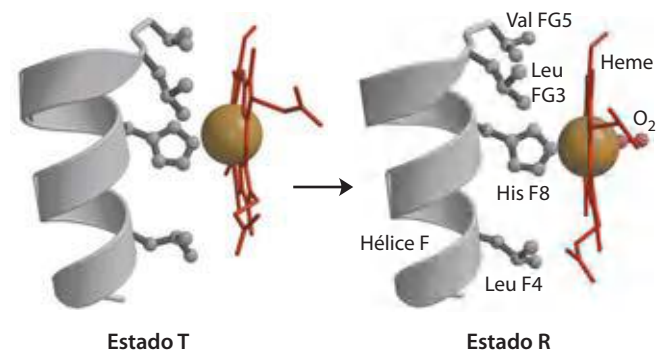
hemoglobina no estado T desencadeia uma mudança na conformação para o estado R. Quando toda a proteína sofre essa transição, a estrutura das subunidades individuais se altera pouco, mas os pares de subunidades αβ deslizam um sobre o outro e sofrem rotação, estreitando o bolsão entre as subunidades β (Figura 5-10). Nesse processo, alguns dos pares iônicos que estabilizam o estado T são rompidos e alguns novos são formados.

Max Perutz propôs que a transição T → R é desencadeada por mudanças na posição de cadeias laterais de aminoácidos-chave que circundam o heme. No estado T, a porfirina é levemente pregueada, fazendo com que o ferro do heme projete-se um pouco para o lado da His proximal (His F8). A ligação do O<sub>2</sub> faz o heme assumir uma posição mais planar, deslocando a posição da His proximal e da hélice F ligada (Figura 5-11). Essas mudanças levam a ajustes nos pares iônicos na interface α<sub>1</sub>β<sub>2</sub>.

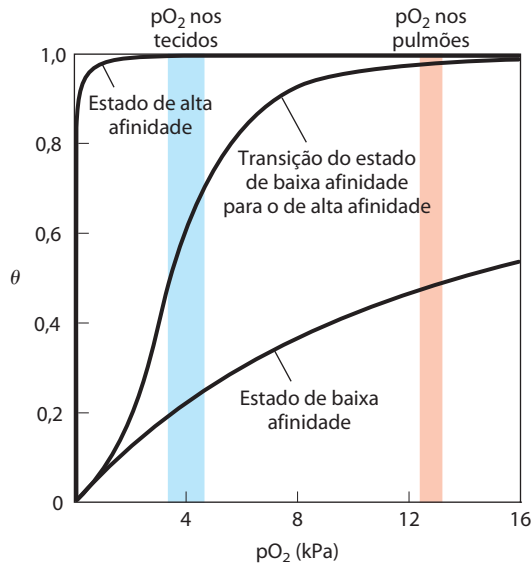
### A hemoglobina se liga ao oxigênio de forma cooperativa

A hemoglobina deve se ligar com eficiência ao oxigênio nos pulmões – onde a pO<sub>2</sub> é cerca de 13,3 kPa – e liberá-lo nos tecidos, onde a pO<sub>2</sub> é de 4 kPa. A mioglobina, ou qualquer proteína que se ligue ao oxigênio com uma curva de ligação hiperbólica, é mal adaptada para essa função, pelo motivo ilustrado na Figura 5-12. A proteína que se liga ao O<sub>2</sub> com alta afinidade capta oxigênio de maneira eficiente nos pulmões, mas não o libera muito nos tecidos. Por sua vez, se a proteína se liga ao oxigênio com afinidade suficientemente baixa para liberá-lo nos tecidos, não o capta muito nos pulmões.

A hemoglobina resolve o problema passando por uma transição de um estado de baixa afinidade (o estado T) para um de alta afinidade (o estado R) à medida que mais moléculas de O<sub>2</sub> vão sendo ligadas. Como resultado, a hemoglobina tem uma curva de ligação ao oxigênio híbrida em forma de S, ou sigmoide (Figura 5-12). Proteínas com uma única cadeia polipeptídica com um único sítio de ligação não geram uma curva de ligação sigmoide – mesmo se a ligação produzir uma mudança de conformação –, porque cada molécula do ligante interage de modo independente e não afeta a interação de outra molécula. Em contrapartida, a ligação do O<sub>2</sub> às subunidades individuais da hemoglobina pode alterar a afinidade nas subunidades adjacentes. A primeira molécula de O<sub>2</sub> que interage com a desoxiemoglobina o faz



**FIGURA 5-11 Mudanças de conformação próximas ao heme pela ligação do O<sub>2</sub> à desoxiemoglobina.** (Derivado de PDB ID 1HGA e 1BBB) Acredita-se que a alteração da posição da hélice F quando o heme se liga ao O<sub>2</sub> seja um dos ajustes que desencadeia a transição T → R.



**FIGURA 5-12 Curva sigmoide de ligação (cooperativa).** A curva sigmoide de ligação pode ser vista como uma curva híbrida que reflete a transição de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade. Devido a sua ligação cooperativa, evidenciada por uma curva sigmoide, a hemoglobina é mais sensível às pequenas diferenças na concentração de O<sub>2</sub> entre os tecidos e os pulmões, o que lhe permite se ligar ao oxigênio nos pulmões (onde a pO<sub>2</sub> é alta) e liberá-lo nos tecidos (onde a pO<sub>2</sub> é baixa).

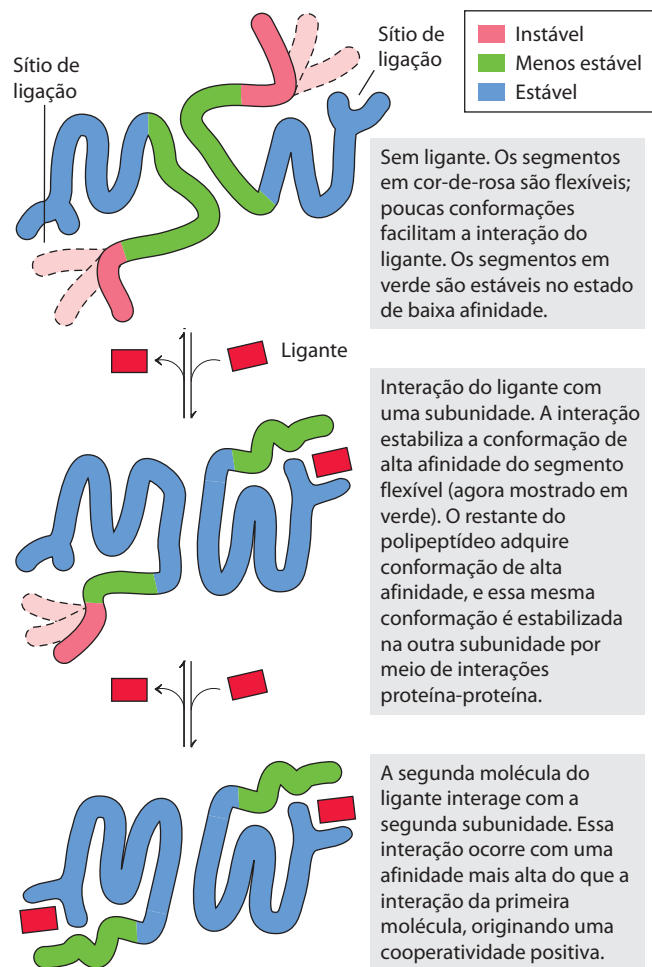
fracamente, pois se liga a uma subunidade no estado T. Sua ligação, contudo, leva a mudanças conformacionais transferidas às subunidades adjacentes, facilitando a ligação de moléculas adicionais de O<sub>2</sub>. De fato, a transição T → R ocorre mais facilmente na segunda subunidade depois da ligação do O<sub>2</sub> à primeira subunidade. A última (quarta) molécula de O<sub>2</sub> se liga ao heme de uma subunidade que já está no estado R, e por isso se liga com afinidade muito mais alta do que a primeira.

Uma **proteína alostérica** é aquela em que a interação com um ligante em um sítio afeta as propriedades de ligação de outro sítio na mesma proteína. O termo “alostérico” deriva do grego *allos*, “outro”, e *stereos*, “sólido” ou “forma”. Proteínas alostéricas são as que têm “outras formas”, ou conformações, induzidas pela interação com ligantes denominados moduladores. A mudança conformacional induzida pelo(s) modulador(es) interconverte formas mais ativas e menos ativas da proteína. Os moduladores das proteínas alostéricas podem ser inibidores ou ativadores. Quando o ligante normal e o modulador são idênticos, a interação é chamada de **homotrópica**. Quando o modulador é uma molécula diferente do ligante normal, a interação é **heterotrópica**. Algumas proteínas têm dois ou mais moduladores e, em função disso, podem participar de interações homotrópicas e heterotrópicas.

A interação cooperativa de um ligante com uma proteína multimérica, como observado com a ligação do O<sub>2</sub> à hemoglobina, é uma forma de ligação alostérica. A interação de um ligante afeta a afinidade de qualquer sítio de ligação ainda não ocupado, e o O<sub>2</sub> pode ser considerado como ligante e modulador homotrópico ativador. Existe apenas um sítio de ligação para o O<sub>2</sub> em cada subunidade,

de forma que os efeitos alostéricos que dão origem à cooperatividade são mediados por mudanças conformacionais transmitidas de uma subunidade à outra por interações subunidade-subunidade. Uma curva sigmoide é sinal de ligação cooperativa. Ela permite uma resposta muito mais sensível à concentração do ligante, sendo importante para a função de muitas proteínas multiméricas. O princípio da alosteria também se aplica às enzimas reguladoras, como será visto no Capítulo 6.

As mudanças conformacionais cooperativas dependem de variações na estabilidade estrutural de diferentes partes da proteína, conforme descrito no Capítulo 4. Os sítios de ligação de uma proteína consistem em segmentos estáveis próximos a segmentos relativamente instáveis, sendo os últimos capazes de mudanças frequentes na conformação ou de desordem intrínseca (**Figura 5-13**).



**FIGURA 5-13 Mudanças estruturais em uma proteína multimérica no processo de interação cooperativa com o ligante.** A estabilidade estrutural não é uniforme em toda a molécula da proteína. Aqui está mostrando uma proteína dimérica hipotética, com regiões de alta (em azul), média (em verde) e baixa (em vermelho) estabilidade. Os sítios de interação com o ligante são formados por segmentos de alta e baixa estabilidade, de forma que a afinidade pelo ligante é relativamente baixa. As mudanças conformacionais que ocorrem pela interação com o ligante transformam a proteína de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade, uma forma de encaixe induzido.

No momento da interação com o ligante, as partes móveis do sítio de ligação na proteína devem ser estabilizadas em uma conformação particular, afetando a conformação das subunidades polipeptídicas adjacentes. Se o sítio de ligação como um todo fosse altamente estável, poucas mudanças estruturais ocorreriam nesse sítio ou seriam propagadas para outras partes da proteína após a interação com o ligante.

Como no caso da mioglobina, outros ligantes, além do oxigênio, podem interagir com a hemoglobina. Um exemplo importante é o CO, que interage 250 vezes melhor com a proteína do que o O<sub>2</sub>. A exposição humana ao CO pode ter consequências trágicas (Quadro 5-1).

### A interação cooperativa do ligante pode ser descrita em termos quantitativos

A ligação cooperativa do oxigênio pela hemoglobina foi analisada pela primeira vez por Archibald Hill, em 1910. Desse trabalho, surgiu a abordagem geral para o estudo da interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas.

Para uma proteína com  $n$  sítios de ligação, o equilíbrio da Equação 5-1 torna-se



e a expressão para a constante de associação torna-se

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \quad (5-13)$$

A expressão para  $\theta$  (ver Equação 5-8) é

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \quad (5-14)$$

Rearranjar e então tomar o log em ambos os lados resulta em

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \frac{[L]^n}{K_d} \quad (5-15)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1 - \theta}\right) = n \log [L] - \log K_d \quad (5-16)$$

em que  $K_d = [L]_{0,5}^n$ .

A Equação 5-16 é a **equação de Hill**, e uma curva do  $\log[\theta/(1 - \theta)]$  versus  $\log [L]$  é chamada de **curva de Hill**. Com base na equação, a curva de Hill deveria ter uma inclinação de  $n$ . Contudo, a inclinação determinada experimentalmente na verdade não reflete o número de sítios de ligação, mas o grau de interação entre eles. A inclinação de uma curva de Hill é, por isso, denominada  $n_H$ , o **coeficiente de Hill**, que é a medida do grau de cooperatividade. Se  $n_H$  for igual a 1, a interação com o ligante não é cooperativa, situação que pode surgir mesmo em uma proteína multimérica se as subunidades não se comunicam. Um  $n_H$  maior que 1 indica cooperatividade positiva. Essa é a situação observada na hemoglobina, na qual a interação com uma molécula do ligante facilita a interação de outras. O limite superior teórico para  $n_H$  é alcançado quando  $n_H = n$ . Nesse caso, a ligação é completamente cooperativa: todos os sítios de ligação na proteína serão ocupados com os ligantes de maneira si-

multânea, e não haverá, em nenhuma situação, proteínas parcialmente saturadas. Esse limite nunca é alcançado na prática, e o valor de  $n_H$  é sempre menor do que o número real de sítios de ligação na proteína.

Um  $n_H$  menor que 1 indica cooperatividade negativa, na qual a interação de uma molécula de ligante *impede* a interação de outras. São raros os casos bem documentados de cooperatividade negativa.

Para adaptar a equação de Hill à ligação do oxigênio com a hemoglobina é preciso substituir novamente  $[L]$  por  $pO_2$  e  $K_d$  por  $P_{50}^n$ :

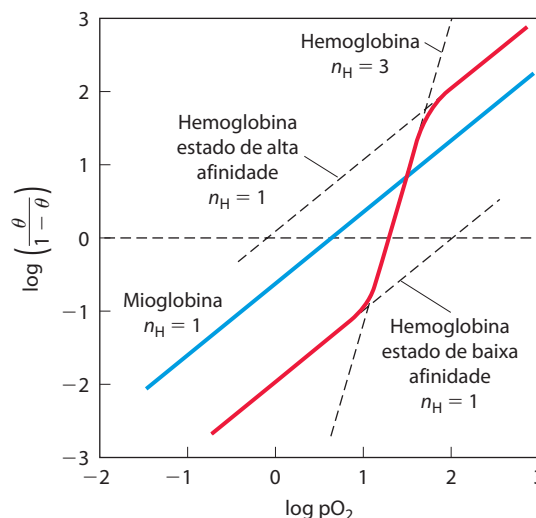
$$\log\left(\frac{\theta}{1 - \theta}\right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \quad (5-17)$$

As curvas de Hill para a mioglobina e a hemoglobina estão apresentadas na **Figura 5-14**.

### Dois modelos sugerem mecanismos para a ligação cooperativa

Os bioquímicos têm hoje muitas informações sobre os estados T e R da hemoglobina, mas muito ainda permanece para ser estudado sobre como ocorre a transição T  $\rightarrow$  R. Dois modelos para a interação cooperativa de ligantes a proteínas com múltiplos sítios de ligação têm influenciado muito as considerações sobre esse problema.

O primeiro modelo foi proposto por Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, em 1965, sendo chamado de **modelo MWC** ou **modelo combinado** (**Figura 5-15a**). Esse modelo presume que as subunidades de uma proteína de ligação cooperativa são funcionalmente idênticas, que cada subunidade pode existir em (pelo menos) duas conformações, e que todas as subunidades



**FIGURA 5-14** Curvas de Hill para a ligação do oxigênio à mioglobina e à hemoglobina. Quando  $n_H = 1$ , não há cooperatividade evidente. O grau máximo de cooperatividade observado para a hemoglobina corresponde a cerca de  $n_H = 3$ . Observe que embora isto indique um alto nível de cooperatividade,  $n_H$  é menor que  $n$ , que é o número de sítios de ligação para o O<sub>2</sub> na hemoglobina. Isto é normal para uma proteína que exhibe comportamento alostérico de ligação.

## QUADRO 5-1



## MEDICINA

## Monóxido de carbono: um assassino furtivo

Lago Powell, Arizona, agosto de 2000. Uma família estava aproveitando suas férias em uma casa-barco alugada quando o gerador de eletricidade foi ligado para fazer funcionar um aparelho de ar-condicionado e um televisor. Quinze minutos mais tarde, dois irmãos, com 8 e 11 anos, pularam do convés da popa para nadar. A abertura do exaustor do gerador estava situada imediatamente abaixo do convés, espaço onde os dois foram nadar. Em dois minutos, os dois meninos foram envolvidos pelo monóxido de carbono que havia se concentrado no espaço abaixo do convés. Os dois se intoxicaram e morreram afogados. Essas mortes, juntamente com uma série de outras mortes ocorridas na década de 1990, que tinham ligação com casas-barco de modelo semelhante, levaram por fim ao recolhimento e à reestruturação da montagem do exaustor do gerador.

O monóxido de carbono (CO), gás incolor e inodoro, é responsável por mais da metade das mortes anuais por envenenamento no mundo. Tem uma afinidade pela hemoglobina 250 vezes maior do que a do oxigênio. Em consequência, níveis relativamente baixos de CO podem ter efeitos substanciais e trágicos. O complexo formado pela ligação do CO à hemoglobina é chamado de carboxiemoglobina, ou COHb.

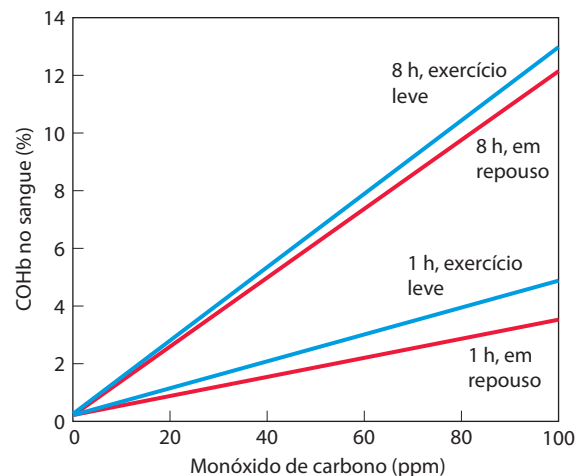
Pequena parte do CO é produzida por processos naturais, mas altos níveis localizados geralmente resultam de atividade humana. Motores e exaustores de caldeiras são fontes importantes, já que o CO é um subproduto da combustão incompleta de combustíveis fósseis. Somente nos Estados Unidos, cerca de 4.000 pessoas morrem por envenenamento por CO por ano, de modo acidental ou intencional. Muitas das mortes acidentais envolvem a produção não detectada de CO em ambientes fechados, por mau funcionamento ou vazamento de caldeiras domésticas, liberando a substância dentro de casa. No entanto, o envenenamento também pode ocorrer em espaços abertos, quando pessoas desavisadas inalam o CO do escapamento de geradores, motores de popa, motores de tratores, veículos de recreação ou aparadores de grama.

Os níveis de CO na atmosfera raramente são perigosos, variando de menos de 0,05 parte por milhão (ppm) em áreas não habitadas e remotas até 3 a 4 ppm em algumas cidades do hemisfério norte. Nos Estados Unidos, o limite de CO determinado pelo governo (Occupational Safety and Health Administration [OSHA]) em locais de trabalho é de 50 ppm por pessoa por turno

de oito horas. A forte ligação do CO à hemoglobina indica que a COHb pode acumular-se ao longo do tempo, quando as pessoas são expostas a uma fonte constante e de baixo nível de CO.

Em média, em indivíduos saudáveis, menos de 1% da hemoglobina total está complexada como COHb. Uma vez que o CO é um produto da fumaça do tabaco, muitos fumantes têm níveis de COHb na faixa de 3 a 8% do total da hemoglobina, podendo aumentar para 15% nos fumantes inveterados. Os níveis de COHb equilibram-se em 50% nas pessoas que respiram ar contendo 570 ppm de CO por várias horas. Métodos confiáveis foram desenvolvidos para relacionar o conteúdo de CO na atmosfera com os níveis de COHb no sangue (Figura Q-1). Testes com casas-barco com escapamento do gerador semelhante ao responsável pelas mortes no Lago Powell mostraram níveis de CO alcançando de 6.000 a 30.000 ppm sob o convés, e níveis de O<sub>2</sub> sendo reduzidos de 21 para 12% no mesmo local. Mesmo acima do convés foram detectados níveis de CO de 7.200 ppm, suficientemente altos para causar morte em poucos minutos.

Como uma pessoa é afetada pela COHb? Em níveis de menos de 10% do total de hemoglobina, raramente se observam sintomas. Em 15%, o indivíduo sente dor de cabeça leve. Em 20 a 30%, a dor de cabeça é forte



**FIGURA Q-1** Relação entre os níveis de COHb no sangue e a concentração de CO no ar ambiente. São mostradas quatro condições diferentes, comparando-se os efeitos de exposição breve *versus* exposição prolongada e exposição em repouso *versus* exposição durante exercício leve.

sofrem transição de uma conformação para a outra simultaneamente. Nesse modelo, nenhuma proteína tem subunidades em conformações diferentes. As duas conformações estão em equilíbrio. O ligante pode interagir com ambas as conformações, mas interage com cada uma com afinidade diferente. A interação sucessiva das moléculas do ligante à conformação de baixa afinidade (mais estável na ausência

do ligante) torna mais provável a transição para a conformação de alta afinidade.

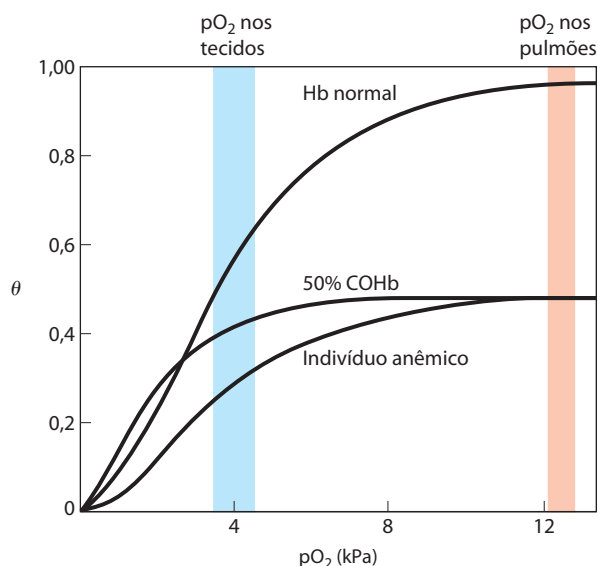
No segundo modelo, o **modelo sequencial** (Figura 5-15b), proposto em 1966 por Daniel Koshland e colaboradores, a interação com o ligante pode induzir uma mudança de conformação em uma subunidade individual. Essa mudança provoca uma alteração similar em uma subunidade



e geralmente acompanhada por náusea, tontura, confusão, desorientação e alguns distúrbios visuais; esses sintomas costumam ser reversíveis pelo tratamento com oxigênio. Em níveis de COHb de 30 a 50%, os sintomas neurológicos tornam-se mais graves, e em níveis próximos de 50%, o indivíduo perde a consciência e pode entrar em coma. Pode seguir-se deficiência respiratória. Com a exposição prolongada, alguns danos tornam-se permanentes. A morte normalmente ocorre quando os níveis de COHb ultrapassam 60%. A necropsia nos meninos que morreram no Lago Powell revelou níveis de COHb de 59 e 52%.

A ligação do CO à hemoglobina é afetada por muitos fatores, incluindo exercício (Figura Q-1) e mudanças na pressão atmosférica relacionadas com a altitude. Devido aos seus níveis basais de COHb mais altos, os fumantes expostos a uma fonte de CO com frequência apresentam sintomas mais rapidamente do que os não fumantes. Os indivíduos com doenças cardíacas, pulmonares ou sanguíneas que reduzem a disponibilidade do oxigênio para os tecidos também podem experimentar sintomas em níveis mais baixos de exposição ao CO. Os fetos são particularmente mais suscetíveis ao risco de envenenamento por CO, pois a hemoglobina fetal tem uma afinidade pelo CO um pouco mais alta do que a hemoglobina do adulto. Têm sido relatados casos de exposição ao CO nos quais o feto morre, mas a mãe sobrevive.

Parece surpreendente que a perda da metade da nossa hemoglobina para a COHb possa ser fatal – sabe-se que as pessoas com qualquer uma das várias condições de anemia conseguem viver razoavelmente bem com metade do total de hemoglobina ativa. No entanto, a ligação do CO faz mais do que remover proteína do reservatório disponível para se ligar ao oxigênio. Ela também afeta a afinidade pelo oxigênio das subunidades remanescentes da hemoglobina. Quando o CO se liga a uma ou duas subunidades do tetrâmero da hemoglobina, a afinidade pelo  $O_2$  é substancialmente aumentada nas subunidades restantes (Figura Q-2). Assim, o tetrâmero com duas moléculas de CO pode se ligar ao  $O_2$  de modo eficiente nos pulmões – mas libera muito pouco nos tecidos. A privação do oxigênio nos tecidos torna-se grave rapidamente. Para aumentar o problema, os efeitos do CO não estão limitados à interferência com a função da hemoglobina. O CO liga-se a outras hemoproteínas e a uma grande variedade de metaloproteínas. As consequências dessas interações ainda não estão bem



**FIGURA Q-2** Várias curvas de ligação do oxigênio: para hemoglobina normal, para hemoglobina de um indivíduo anêmico com somente 50% de sua hemoglobina funcional, e para hemoglobina de um indivíduo com 50% das subunidades ocupadas com CO. A  $pO_2$  no pulmão e nos tecidos humanos está indicada.

explicadas, mas podem ser responsáveis por alguns dos efeitos de longo prazo do envenenamento agudo, mas não fatal, por CO.

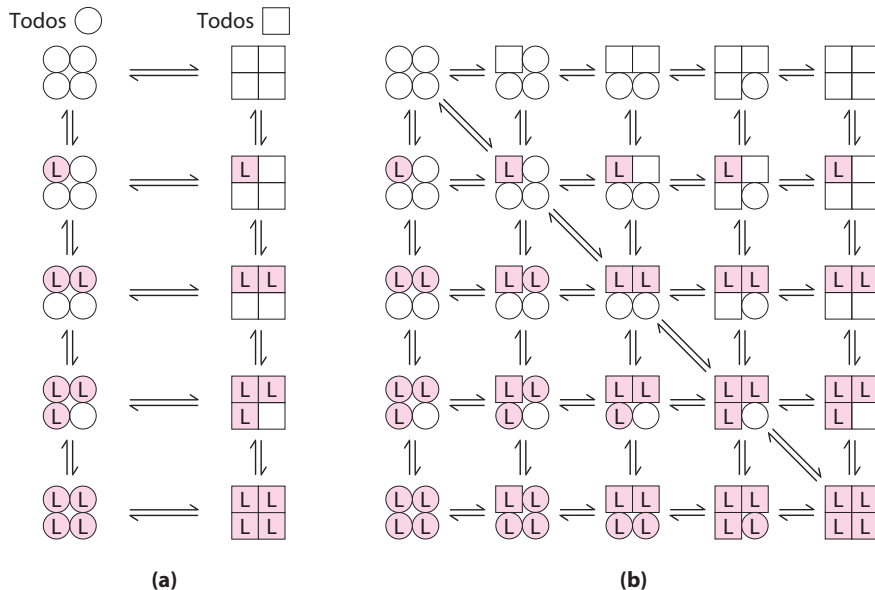
Na suspeita de envenenamento por CO, é essencial que a pessoa seja levada para longe da fonte do gás, mas isso nem sempre resulta em recuperação rápida. Quando um indivíduo é removido de um local poluído com CO para uma atmosfera normal, o  $O_2$  começa a substituir o CO na hemoglobina – mas os níveis de COHb diminuem muito lentamente, pois a meia-vida é de 2 a 6,5 horas, dependendo dos fatores ambientais. Porém, se forem administrados, por meio de uma máscara, 100% de oxigênio a uma pressão de 3 atm (303 kPa), a velocidade de troca pode ser aumentada em quatro vezes, e a meia-vida para a troca  $O_2$ -CO pode ser reduzida para algumas dezenas de minutos. Assim, o tratamento rápido por uma equipe médica adequadamente equipada é fundamental.

Os detectores de CO são altamente recomendados em todas as casas, sendo uma medida simples e barata para evitar possíveis tragédias.

adjacente, sendo mais provável a interação de uma segunda molécula do ligante. Existem mais estados intermediários possíveis nesse modelo do que no modelo combinado. Os dois não são mutuamente exclusivos; o modelo combinado pode ser visto como o caso restritivo “tudo ou nada” do modelo sequencial. No Capítulo 6, esses modelos serão utilizados para investigar as enzimas alostéricas.

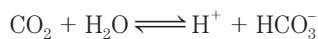
## A hemoglobina também transporta $H^+$ e $CO_2$

Além de carregar praticamente todo o oxigênio de que as células necessitam dos pulmões para os tecidos, a hemoglobina transporta dois produtos finais da respiração celular –  $H^+$  e  $CO_2$  – dos tecidos para os pulmões e para os rins, onde são excretados. O  $CO_2$ , produzido pela oxidação



**FIGURA 5-15** Dois modelos gerais para a interconversão de formas inativas e ativas de uma proteína durante a interação cooperativa com o ligante. Embora os modelos possam ser aplicados para qualquer proteína – incluindo qualquer enzima (Capítulo 6) – que exiba ligação cooperativa, aqui são mostradas quatro subunidades porque o modelo foi originalmente proposto para a hemoglobina. **(a)** No modelo combinado ou “tudo ou nada” (modelo MWC), postula-se que todas as subunidades estejam na mesma conformação, todas na forma O (baixa afinidade ou inativas) ou na forma □ (alta afinidade ou ativas). Dependendo do equilíbrio,  $K_{eq}$ , entre as formas O e □, a interação com uma ou mais moléculas do ligante (L) desviará o equilíbrio na direção da forma □. As subunidades que ligam L estão sombreadas. **(b)** No modelo sequencial, cada subunidade individual pode estar na forma O ou na forma □. Assim, é possível um grande número de conformações.

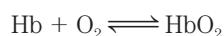
dos combustíveis orgânicos na mitocôndria, é hidratado e forma bicarbonato:



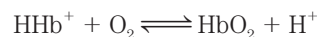
Esta reação é catalisada pela **anidrase carbônica**, enzima particularmente abundante nos eritrócitos. O  $\text{CO}_2$  não é muito solúvel em solução aquosa; é possível a formação de bolhas de  $\text{CO}_2$  nos tecidos e no sangue se ele não for convertido em bicarbonato. Como pode-se observar pela reação catalisada pela anidrase carbônica, a hidratação do  $\text{CO}_2$  resulta em aumento na concentração de  $\text{H}^+$  (uma redução no pH) nos tecidos. A ligação do  $\text{O}_2$  pela hemoglobina é profundamente influenciada pelo pH e pela concentração de  $\text{CO}_2$ , de forma que a conversão desse gás em bicarbonato é fundamental na regulação da ligação do oxigênio e sua liberação no sangue.

A hemoglobina transporta para os pulmões e para os rins cerca de 40% do total do  $\text{H}^+$  e 15 a 20% do  $\text{CO}_2$  formado nos tecidos – o restante do  $\text{H}^+$  é absorvido pelo tampão bicarbonato do plasma e o restante do  $\text{CO}_2$  é transportado como  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_2$  dissolvidos. A ligação do  $\text{H}^+$  e do  $\text{CO}_2$  tem uma relação inversa com a ligação do oxigênio. No pH relativamente baixo e na alta concentração de  $\text{CO}_2$  dos tecidos periféricos, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminui quando o  $\text{H}^+$  e o  $\text{CO}_2$  se ligam e o  $\text{O}_2$  é liberado para os tecidos. Nos capilares do pulmão, ao contrário, quando o  $\text{CO}_2$  é excretado e o pH do sangue consequentemente aumenta, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta, e a proteína se liga a mais  $\text{O}_2$  para transportar para os tecidos periféricos. Esse efeito do pH e da concentração de  $\text{CO}_2$  sobre a ligação e a liberação do oxigênio pela hemoglobina é chamado de **efeito Bohr**, referência ao fisiologista dinamarquês que o descobriu em 1904, Christian Bohr, pai de Niels Bohr.

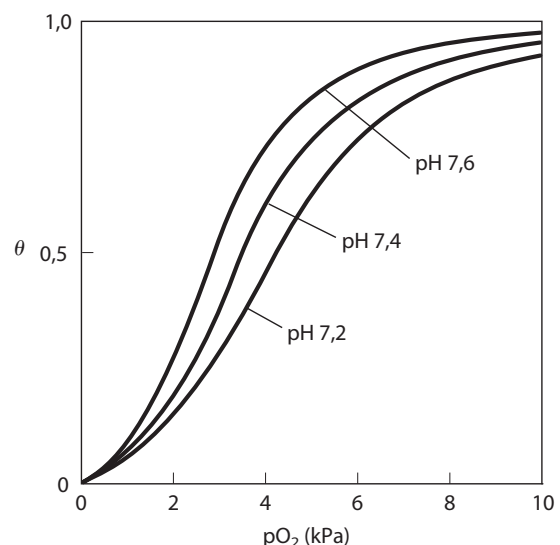
O equilíbrio da ligação para a hemoglobina e uma molécula de oxigênio pode ser designado pela reação



mas essa não é uma relação completa. Para considerar o efeito da concentração do  $\text{H}^+$  neste equilíbrio de ligação, a reação é reescrita como



onde  $\text{HHb}^+$  é a forma protonada da hemoglobina. Esta equação nos diz que a curva de saturação da hemoglobina pelo  $\text{O}_2$  é influenciada pela concentração de  $\text{H}^+$  (**Figura 5-16**). A hemoglobina se liga tanto ao  $\text{O}_2$  quanto ao  $\text{H}^+$ , mas com afinidade inversa. Quando a concentração do oxigênio é alta, como nos pulmões, a hemoglobina se liga ao  $\text{O}_2$  e libera prótons. Quando a concentração é baixa, como nos tecidos periféricos, ela se liga ao  $\text{H}^+$  e o  $\text{O}_2$  é liberado.

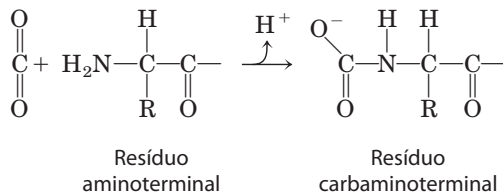


**FIGURA 5-16** Efeito do pH sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina. O pH do sangue é 7,6 nos pulmões e 7,2 nos tecidos. As medidas experimentais das ligações à hemoglobina frequentemente são realizadas a pH 7,4.



O  $O_2$  e o  $H^+$  não se ligam ao mesmo sítio na hemoglobina. O  $O_2$  se liga ao átomo de ferro do heme, enquanto o  $H^+$  se liga a qualquer um dos vários resíduos de aminoácidos na proteína. A principal contribuição para o efeito Bohr é feita pela His<sup>146</sup> (His HC3) das subunidades  $\beta$ . Esse resíduo, quando protonado, forma um dos pares iônicos – com a Asp<sup>94</sup> (Asp FG1) – que auxilia na estabilização da desoxiemoglobina no estado T (Figura 5-9). O par iônico estabiliza a forma protonada da His HC3, dando a esse resíduo uma  $pK_a$  anormalmente alta no estado T. A  $pK_a$  diminui para seu valor normal de 6,0 no estado R porque o par iônico não pode se formar, e esse resíduo está não protonado na oxiemoglobina a pH 7,6, o pH do sangue nos pulmões. À medida que a concentração de  $H^+$  aumenta, a protonação da His HC3 promove a liberação do oxigênio por favorecer a transição para o estado T. A protonação dos resíduos aminotermiais das subunidades  $\alpha$ , de determinados resíduos de His e talvez de outros grupos tem efeito semelhante.

Assim, as quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina se comunicam entre si, não somente com relação à ligação do  $O_2$  aos seus grupos heme, mas também com relação à ligação do  $H^+$  a resíduos específicos. Além disso, a hemoglobina se liga ao  $CO_2$  também de uma maneira inversamente relacionada à ligação do oxigênio. O dióxido de carbono se liga como grupo carbamato ao grupo  $\alpha$ -amino da extremidade aminotermial de cada cadeia de globina, formando carbaminoemoglobina:

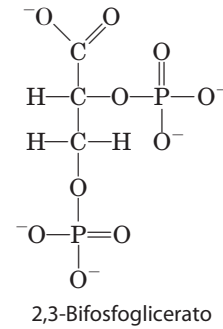


Esta reação produz  $H^+$ , contribuindo para o efeito Bohr. Os carbamatos ligados formam também pontes salinas adicionais (não mostradas na Figura 5-9) que auxiliam na estabilização do estado T e promovem a liberação do oxigênio.

Quando a concentração do dióxido de carbono é alta, como nos tecidos periféricos, algum  $CO_2$  se liga à hemoglobina e reduz a afinidade pelo  $O_2$ , causando sua liberação. Quando, ao contrário, a hemoglobina chega aos pulmões, a alta concentração do oxigênio promove a ligação do  $O_2$  e a liberação do  $CO_2$ . É a capacidade de transmitir informação da interação com o ligante de uma subunidade polipeptídica para as outras que faz a molécula de hemoglobina ser tão maravilhosamente adaptada na integração do transporte de  $O_2$ ,  $CO_2$  e  $H^+$  pelos eritrócitos.

### A ligação do oxigênio com a hemoglobina é regulada pelo 2,3-bifosfoglicerato

A interação do **2,3-bifosfoglicerato (BPG)** com as moléculas de hemoglobina aprimora a função desta, sendo um exemplo de modulação alostérica heterotípica.

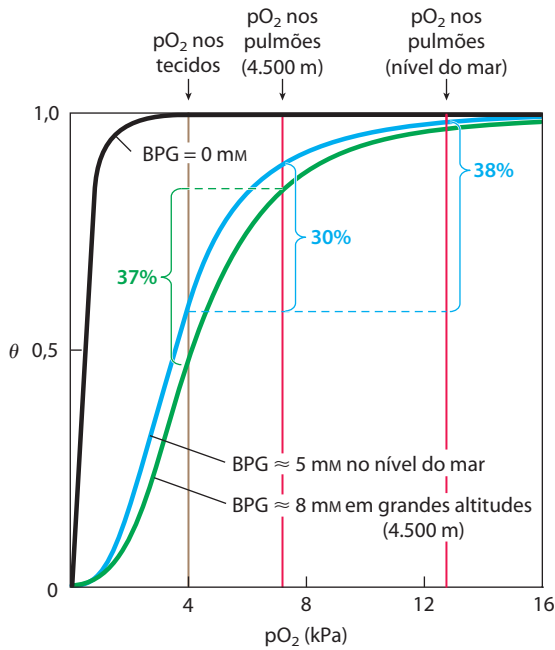


O BPG está presente em concentração relativamente alta nos eritrócitos. Quando a hemoglobina é isolada, ela contém grande quantidade de BPG, difícil de ser removida por completo. Na verdade, as curvas de ligação entre hemoglobina e  $O_2$  examinadas até agora foram obtidas na presença de BPG. Sabe-se que o BPG reduz muito a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio – existe uma relação inversa entre a ligação do  $O_2$  e do BPG. Por isso, é possível descrever outro processo de ligação para a hemoglobina:



O BPG liga-se a um sítio distante do sítio de ligação do oxigênio e regula a afinidade do  $O_2$  pela hemoglobina em relação à  $pO_2$  nos pulmões. O BPG é importante na adaptação fisiológica à  $pO_2$  mais baixa nas grandes altitudes. Em um ser humano saudável ao nível do mar, a ligação do  $O_2$  à hemoglobina é regulada de modo que a quantidade de  $O_2$  liberada nos tecidos se aproxime de 40% da quantidade máxima que o sangue é capaz de transportar (Figura 5-17). Imagine que essa pessoa seja transportada repentinamente do nível do mar para uma altitude de 4.500 metros, onde a  $pO_2$  é muito mais baixa. A liberação de  $O_2$  para os tecidos é reduzida. No entanto, após poucas horas na maior altitude, a concentração de BPG no sangue começa a aumentar, levando a uma redução na afinidade da hemoglobina pelo  $O_2$ . Esse ajuste no nível de BPG tem somente um pequeno efeito na ligação do  $O_2$  nos pulmões, mas seu efeito é considerável na liberação do  $O_2$  nos tecidos. Como resultado, a liberação do oxigênio para os tecidos é restaurada para cerca de 40% do  $O_2$  que pode ser transportado pelo sangue. A situação é revertida quando a pessoa retorna ao nível do mar. A concentração de BPG nos eritrócitos aumenta também em pessoas que sofrem de **hipoxia**, ou seja, redução da oxigenação dos tecidos periféricos devido ao funcionamento inadequado dos pulmões ou do sistema circulatório.

O sítio de ligação do BPG na hemoglobina é a cavidade entre as subunidades  $\beta$  no estado T (Figura 5-18). Essa cavidade é revestida por resíduos de aminoácidos com cargas positivas que interagem com os grupos do BPG carregados negativamente. Ao contrário do  $O_2$ , somente uma molécula de BPG se liga a cada tetrâmero da hemoglobina. O BPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio porque estabiliza o estado T. A transição ao estado R estreita o bolsão de ligação para o BPG, impedindo sua ligação. Na ausência do BPG, a hemoglobina é convertida mais facilmente ao estado R.

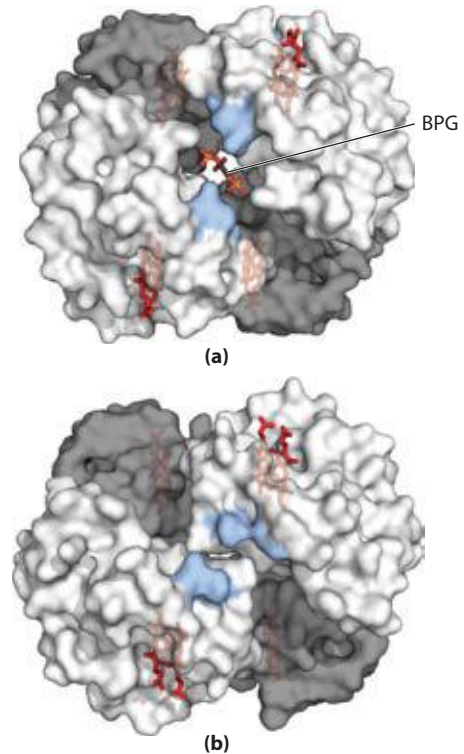


**FIGURA 5-17 Efeito de BPG sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina.** A concentração de BPG no sangue humano normal é de 5 mM no nível do mar e 8 mM nas grandes altitudes. Observe que a hemoglobina se liga muito fortemente ao oxigênio na ausência de BPG, e a curva de ligação parece hiperbólica. Na verdade, o coeficiente de Hill medido para a cooperatividade da ligação do O<sub>2</sub> se reduz muito pouco (de 3 para cerca de 2,5) quando o BPG é removido da hemoglobina, mas a parte ascendente da curva sigmoide está confinada a uma região muito pequena próxima à origem. No nível do mar, a hemoglobina está quase totalmente saturada com O<sub>2</sub> nos pulmões, mas somente um pouco acima de 60% nos tecidos, de forma que a quantidade de O<sub>2</sub> liberada nos tecidos alcança cerca de 38% do máximo que pode ser transportado no sangue. Em grandes altitudes, a liberação do O<sub>2</sub> é reduzida em um quarto, para 30% do máximo. Um aumento na concentração de BPG, contudo, reduz a afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub>, de forma que aproximadamente 37% do que pode ser transportado é liberado novamente para os tecidos.

A regulação da ligação do oxigênio à hemoglobina pelo BPG tem importante função no desenvolvimento fetal. Como o feto precisa captar oxigênio do sangue da mãe, a hemoglobina fetal precisa ter maior afinidade pelo O<sub>2</sub> do que a hemoglobina materna. O feto sintetiza subunidades γ em vez de β, formando a hemoglobina α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>. Esse tetrâmero tem uma afinidade muito mais baixa pelo BPG do que a hemoglobina normal do adulto, tendo uma afinidade mais alta pelo O<sub>2</sub>. **Proteínas de ligação ao oxigênio – a hemoglobina é suscetível à regulação alostérica**

**A anemia falciforme é uma doença molecular da hemoglobina**

A anemia falciforme, doença humana hereditária, demonstra de forma impressionante a importância da sequência de aminoácidos na determinação das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas globulares e, portanto, suas funções biológicas. Sabe-se que existem quase 500 variantes genéticas da hemoglobina na população humana; a maioria delas é muito rara. A

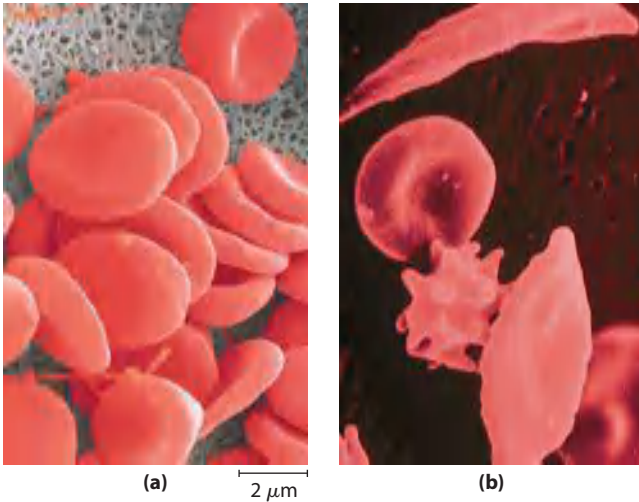


**FIGURA 5-18 Ligação do BPG à desoxiemoglobina.** (a) A ligação do BPG estabiliza o estado T da desoxiemoglobina (PDB ID 1B86). As cargas negativas do BPG interagem com vários grupos positivamente carregados (mostrados em azul nesta imagem de contorno de superfície) que circundam o bolsão entre as subunidades β no estado T. (b) O bolsão para ligação do BPG desaparece com a oxigenação que segue a transição para o estado R (PDB ID 1BBB). (Compare com a Figura 5-10.)

maior parte das variações consiste em diferenças em um único resíduo de aminoácido. Os efeitos sobre a estrutura e a função da hemoglobina com frequência são pequenos, mas às vezes podem ser extraordinários. Cada variação é produto de alteração em um gene. Os genes variantes são denominados alelos. Como os humanos geralmente têm duas cópias de cada gene, um indivíduo pode ter duas cópias de um alelo (sendo, portanto, homocigoto para esse gene) ou uma cópia de cada um de dois alelos diferentes (portanto, heterocigoto).

A anemia falciforme ocorre em indivíduos que herdaram o alelo para a hemoglobina falciforme de ambos os pais. Os eritrócitos desses indivíduos são anormais e em menor número. O sangue contém muitos eritrócitos longos e finos em forma de foice, além de um grande número de células imaturas (**Figura 5-19**). Quando a hemoglobina das células falciformes (chamada de hemoglobina S) é desoxigenada, ela torna-se insolúvel e forma polímeros que se agregam em fibras tubulares (**Figura 5-20**). A hemoglobina normal (hemoglobina A) permanece solúvel após a desoxigenação. As fibras insolúveis induzem a deformação dos eritrócitos, e a proporção das células falciformes aumenta muito à medida que o sangue é desoxigenado.

As propriedades alteradas da hemoglobina S resultam da substituição de um único aminoácido, Val em vez de



**FIGURA 5-19** Comparação entre **(a)** eritrócitos normais, uniformes e em forma de taça e **(b)** eritrócitos com formas variadas vistos na anemia falciforme, que variam desde os normais até os pontudos ou em forma de foice.

Glu na posição 6 das duas cadeias  $\beta$ . O grupo R da valina não tem carga, ao passo que o glutamato tem carga negativa em pH 7,4. Por isso, a hemoglobina S tem duas cargas negativas a menos do que a hemoglobina A (uma a menos em cada cadeia  $\beta$ ). A substituição do resíduo Glu pelo Val cria um ponto de contato hidrofóbico “adesivo” na posição 6 da cadeia  $\beta$ , que está na superfície externa da molécula. Devido a esses pontos, as moléculas de desoxiemoglobina S se associam anormalmente entre si, formando os agregados longos e fibrosos característicos dessa enfermidade.

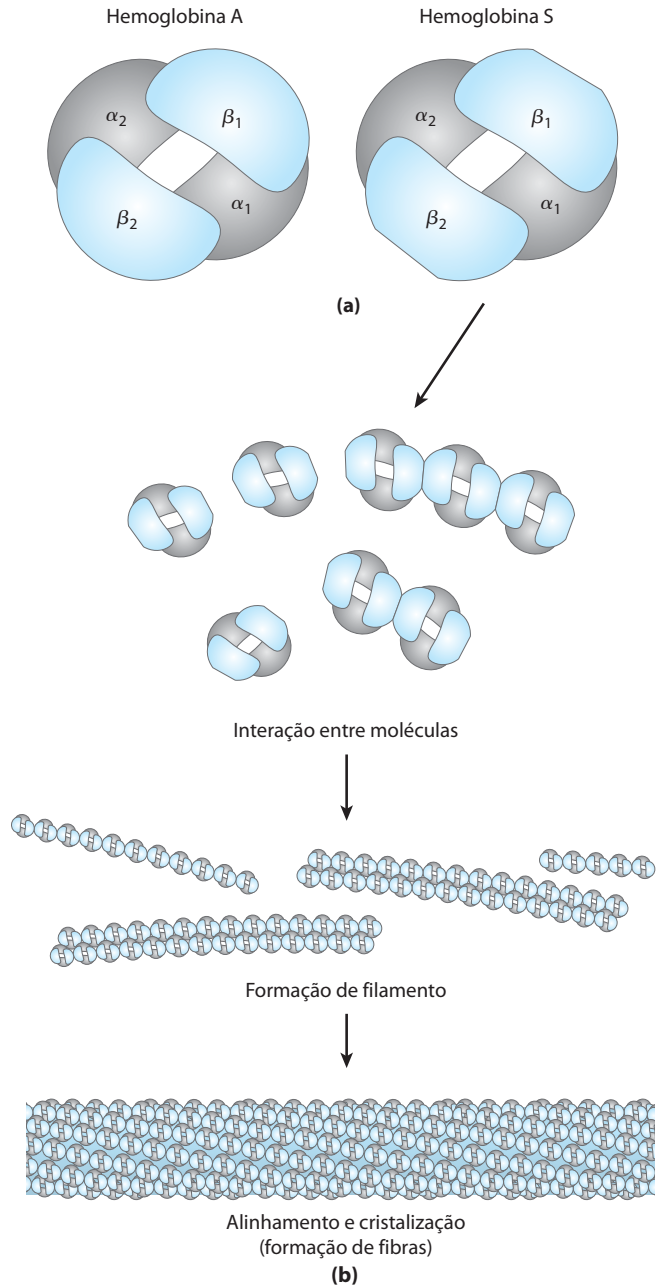
**Proteínas de ligação ao oxigênio – defeitos na hemoglobina causam doença genética séria**

A anemia falciforme, como observado, ocorre em indivíduos homocigotos para o alelo falciforme do gene que codifica a subunidade  $\beta$  da hemoglobina. Os indivíduos que recebem o alelo falciforme apenas de um dos pais (sendo, portanto, heterocigotos) apresentam uma condição mais branda chamada de traço falciforme; somente cerca de 1% de seus eritrócitos torna-se falciforme com a desoxigenação. Esses indivíduos podem ter vida totalmente normal se evitarem exercícios vigorosos ou outros estresses do sistema circulatório.

A anemia falciforme é dolorosa e fatal. As pessoas com essa doença sofrem crises repetidas provocadas por esforço físico. Tornam-se fracas, com vertigens e ofegantes, sentem ruídos cardíacos e aumento na pulsação. O conteúdo de hemoglobina do seu sangue é somente a metade do valor normal de 15 a 16 g/100 mL, porque as células falciformes são muito frágeis e se rompem com facilidade; isso resulta em anemia (“falta de sangue”). Uma consequência ainda mais grave é que os capilares ficam bloqueados pelas células longas e com morfologia anormal, causando muita dor e interferindo com a função normal dos capilares – principal fator para a morte prematura de muitos pacientes.

Sem tratamento médico, as pessoas com anemia falciforme geralmente morrem na infância. Curiosamente, a fre-

quência do alelo falciforme na população é muito alta em determinadas partes da África. A investigação desse assunto levou à constatação de que, nos indivíduos heterocigotos, o alelo confere resistência pequena, mas significativa, a formas letais da malária. A seleção natural resultou em uma população de alelos que equilibra os efeitos deletérios da condição homocigota com a resistência à malária propiciada pela condição heterocigota. ■



**FIGURA 5-20 Hemoglobina normal e falciforme. (a)** As diferenças sutis entre a conformação da hemoglobina A e da hemoglobina S resultam da mudança de um único aminoácido nas cadeias  $\beta$ . **(b)** Como resultado desta mudança, a desoxiemoglobina S tem uma porção hidrofóbica na sua superfície, o que causa a agregação das moléculas em filamentos que se associam em fibras insolúveis.



### RESUMO 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

- ▶ A função proteica frequentemente necessita de interações com outras moléculas. Uma proteína interage com uma molécula, conhecida como ligante, no seu sítio de ligação. As proteínas sofrem alterações conformacionais quando interagem com o ligante, processo chamado de encaixe induzido. Em uma proteína multimérica, a interação do ligante com uma subunidade pode afetar a interação com as outras subunidades. A interação com o ligante pode ser regulada.
- ▶ A mioglobina contém um grupo prostético heme, que se liga ao oxigênio. O heme consiste em um único átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  coordenado no interior de uma porfirina. O oxigênio se liga reversivelmente à mioglobina; essa ligação reversível simples pode ser descrita por uma constante de associação  $K_a$  ou uma constante de dissociação  $K_d$ . Para uma proteína monomérica como a mioglobina, a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante é uma função hiperbólica da concentração do ligante.
- ▶ A hemoglobina adulta normal tem quatro subunidades contendo heme, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , semelhantes em estrutura entre si e com a mioglobina. A hemoglobina existe em dois estados estruturais alternados, T e R. O estado T é mais estável quando o oxigênio não está ligado. A ligação do oxigênio promove a transição para o estado R.
- ▶ A ligação do oxigênio à hemoglobina é alostérica e cooperativa. Quando o  $\text{O}_2$  ocupa um sítio de ligação, a hemoglobina sofre mudanças conformacionais que afetam os outros sítios de ligação – exemplo de comportamento alostérico. As mudanças conformacionais entre os estados T e R, mediadas pelas interações subunidade-subunidade, resultam em ligação cooperativa; isto é representado por uma curva de ligação sigmoide e pode ser analisado por uma curva de Hill.
- ▶ Dois modelos principais têm sido propostos para explicar a interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas: o modelo combinado e o modelo sequencial.
- ▶ A hemoglobina também se liga ao  $\text{H}^+$  e ao  $\text{CO}_2$ , resultando na formação de pares iônicos que estabilizam o estado T e reduzem a afinidade da proteína pelo  $\text{O}_2$  (o efeito Bohr). A ligação do  $\text{O}_2$  à hemoglobina é modulada também pelo 2,3-bisfosfoglicerato, que se liga ao estado T e o estabiliza.
- ▶ A anemia falciforme é uma doença genética causada pela substituição de um único aminoácido ( $\text{Glu}^6$  por  $\text{Val}^6$ ) nas cadeias  $\beta$  da hemoglobina. A mudança gera uma região hidrofóbica na superfície da hemoglobina que causa a agregação das moléculas em feixes de fibras. Essa condição homocigota resulta em graves complicações médicas. **Término leitura avançada**

## 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas

Foi visto como as conformações das proteínas de ligação ao oxigênio afetam e são afetadas pela interação de ligantes pequenos ( $\text{O}_2$  ou  $\text{CO}$ ) com o grupo heme. No entanto,

a maioria das interações proteína-ligante não envolve um grupo prostético. Em vez disso, o sítio de ligação com o ligante mais comumente se parece ao sítio de ligação da hemoglobina com o BPG – uma fenda na proteína revestida por resíduos de aminoácidos, organizados para tornar a interação altamente específica. A diferenciação eficaz entre os ligantes é a norma nos sítios de ligação, mesmo quando os ligantes apresentam apenas pequenas diferenças estruturais.

Todos os vertebrados têm um sistema imune capaz de fazer a distinção molecular entre “próprio” e “não próprio” e destruir o que for identificado como não próprio. Dessa forma, o sistema imune elimina vírus, bactérias e outros patógenos e moléculas que possam representar ameaça ao organismo. Em nível fisiológico, a resposta imune constitui um conjunto intrincado e coordenado de interações entre muitas classes de proteínas, moléculas e tipos celulares. No nível das proteínas individuais, a resposta imune demonstra como um sistema bioquímico altamente sensível é desenvolvido a partir de interações reversíveis entre ligantes e proteínas.

### A resposta imune caracteriza um conjunto de células e proteínas especializadas

A imunidade é realizada por uma grande variedade de **leucócitos** (células brancas do sangue), incluindo os **macrófagos** e os **linfócitos**, todos desenvolvidos na medula óssea a partir de células-tronco não diferenciadas. Os linfócitos deixam a corrente sanguínea e patrulham os tecidos, cada célula produzindo uma ou mais proteínas capazes de reconhecer e de se ligar a moléculas que poderiam sinalizar uma infecção.

A resposta imune consiste em dois sistemas complementares, o sistema imune humoral e o celular. O **sistema imune humoral** (do latim *humor*; “fluido”) é dirigido para infecções bacterianas e vírus extracelulares (encontrados nos fluidos do corpo), mas também pode responder a proteínas estranhas. O **sistema imune celular** destrói células hospedeiras infectadas por vírus, além de destruir alguns parasitas e tecidos estranhos.

No centro da resposta imune humoral estão proteínas solúveis chamadas de **anticorpos** ou **imunoglobulinas**, abreviadas como **Ig**. As imunoglobulinas se ligam a bactérias, vírus ou moléculas grandes identificadas como estranhas e as conduzem para a destruição. Constituindo 20% do total de proteínas sanguíneas, as imunoglobulinas são produzidas pelos **linfócitos B**, ou **células B**, que completam seu desenvolvimento na medula óssea.

Os agentes no centro da resposta imune celular são uma classe de **linfócitos T**, ou **células T** (assim chamadas porque os últimos estágios de seu desenvolvimento ocorrem no timo), conhecidas como **células T citotóxicas** (**células  $T_C$** ). O reconhecimento de células infectadas ou de parasitas envolve proteínas chamadas de **receptores de células T** na superfície das células T citotóxicas. Os receptores são proteínas normalmente encontradas na superfície externa das células e que se estendem através da membrana plasmática; eles reconhecem e interagem com ligantes extracelulares, desencadeando mudanças no interior da célula.

**Condição de hipóxia e o bisfosfoglicerato**

O 2,3-BPG (**bisfosfoglicerato**) é uma substância encontrada no interior da hemácia responsável por reduzir a afinidade da hemoglobina (Hb) pelo oxigênio ( $O_2$ ) através da sua ligação à hemoglobina, com a finalidade de facilitar a liberação do oxigênio para os tecidos. O 2,3-BPG existe em quantidade idêntica à da hemoglobina e encontra-se em combinação com este pigmento.<sup>[1][2]</sup>

O BPG liga-se fortemente à desoxiHb em uma relação molar 1:1, porém sua ligação à oxihb é mais fraca. Por isso, a presença de BPG ajuda a manter a conformação desoxi da hemoglobina, reduzindo assim sua afinidade pelo oxigênio. A ligação do BPG com a conformação desoxi da hemoglobina pode ser diminuída utilizando uma alta concentração salina, sugerindo assim um caráter iônico para essa associação.

O nível de BPG no organismo pode variar de acordo com algumas condições como, por exemplo, altas altitudes, falta de oxigenação (hipóxia), anemia e insuficiência respiratória. Níveis aumentados de BPG no organismo são parcialmente responsáveis pela adaptação às grandes altitudes, um processo fisiológico complexo onde estão envolvidos dois eventos; o aumento da quantidade de hemoglobina nos eritrócitos e o aumento do número de eritrócitos, processo esse que demora algumas semanas para ser finalizado.

A hemoglobina mostra-se com a afinidade reduzida pelo oxigênio quando os níveis de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) estão altos. O 2,3-BPG é formado a partir do 1,3-bisfosfoglicerato, um intermediário na degradação da glicose. Os níveis de 2,3-BPG aumentam em condições de hipóxia prolongada, como a permanência na altitude. É uma adaptação à diminuição na oferta de oxigênio, que visa compensar essa disponibilidade diminuída com um aumento da liberação de  $O_2$  pela hemoglobina. Com uma afinidade reduzida pelo oxigênio, a hemoglobina o libera de maneira mais eficiente.

A mioglobina, uma proteína semelhante a uma subunidade da hemoglobina, é encontrada em grande quantidade no músculo, funcionando como um reservatório adicional de oxigênio. Por ter uma afinidade maior por oxigênio em relação a hemoglobina, em qualquer  $pO_2$ , a mioglobina recebe o  $O_2$  transportado pela hemoglobina e o libera em condições de  $pO_2$  muito baixas, para ser utilizado pelas mitocôndrias das células musculares.