

KÁDIMA NAYARA TEIXEIRA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA
EM MIOGLOBINAS NATIVAS E RECOMBINANTES DE MOLUSCOS
DO GÊNERO *Biomphalaria***

Belo Horizonte

2010

KÁDIMA NAYARA TEIXEIRA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA
EM MIOGLOBINAS NATIVAS E RECOMBINANTES DE MOLUSCOS
DO GÊNERO *Biomphalaria***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Marcelo Matos Santoro

Co-orientador: Prof. Oscar Bruña Romero

Belo Horizonte

2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia e Físico - Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

*A gratidão é uma dádiva, e dádivas são dadas apenas a pessoas que realmente merecem...
Não por mim, mas por Aquele de quem não podemos esconder nada, e por este motivo sabe
exatamente a quem dá-las.*

Kádima N. Teixeira

"Liderança é uma combinação de estratégia e caráter. Se você precisa ficar sem um, que seja sem a estratégia." (General Norman Schwarzkopf)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | XI |
| LISTA DE TABELAS..... | XIV |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XV |
| ABSTRACT..... | XVIII |
| RESUMO..... | XIX |
| INTRODUÇÃO..... | XXI |
| 1. REVISÃO DA LITERATURA..... | 24 |
| 1.1. AS GLOBINAS..... | 24 |
| 1.1.1. Estrutura tridimensional das globinas..... | 24 |
| 1.1.2. Categorias das globinas..... | 28 |
| 1.1.3. Diversidade das globinas..... | 29 |
| 1.2. AS MIOGLOBINAS..... | 30 |
| 1.2.1. Mioglobinas de invertebrados..... | 32 |
| 1.2.1.1. Mioglobinas de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>..... | 33 |
| 1.2.2. Algumas funções descritas para as mioglobinas..... | 36 |
| 1.2.3. Outras funções atribuídas à mioglobina..... | 37 |
| 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA..... | 47 |
| 3. OBJETIVOS..... | 50 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL..... | 50 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 50 |
| 4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 4.1. ANIMAIS..... | 53 |
| 4.2. PARTE I: ESTUDO DAS MIOGLOBINAS NATIVAS DE <i>Biomphalaria</i>..... | 53 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1. Purificação das mioglobinas nativas de moluscos das espécies <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> | 53 |
| 4.2.1.1. Filtração molecular..... | 54 |
| 4.2.1.2. Troca iônica..... | 54 |
| 4.2.1.3. Fase reversa..... | 55 |
| 4.2.2. SDS-PAGE..... | 55 |
| 4.2.3. Coloração de proteínas por solução de azul de Coomassie..... | 56 |
| 4.2.4. Obtenção do ponto isoelétrico (pI) experimental das mioglobinas nativas..... | 56 |
| 4.2.5. Obtenção da massa molecular experimental das proteínas purificadas a partir da musculatura estomacal..... | 56 |
| 4.2.6. Sequenciamento de aminoácidos por degradação de Edman..... | 57 |
| 4.2.7. Medida da taxa de auto-oxidação das mioglobinas nativas..... | 57 |
| 4.2.8. Medida da quantidade de mioglobina na musculatura radular e estomacal..... | 58 |
| 4.3. PARTE II: ESTUDO DAS MIOGLOBINAS RECOMBINANTES DE <i>Biomphalaria</i> | 59 |
| 4.3.1. Subclonagem dos cDNAs das mioglobinas da musculatura radular de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> em vetor de expressão em procariotos..... | 59 |
| 4.3.1.1. Extração e digestão do DNA plasmidial..... | 59 |
| 4.3.1.2. Reação de ligação e transformação bacteriana..... | 62 |
| 4.3.1.3. Preparo de células quimiocompetentes..... | 62 |
| 4.3.1.4. Eletroforese em gel de agarose..... | 63 |
| 4.3.1.5. Análise (<i>screening</i>) dos clones..... | 64 |
| 4.3.2. Teste de indução..... | 66 |
| 4.3.3. Teste de solubilidade das mioglobinas recombinantes (rMioglobinas)..... | 66 |
| 4.3.4. Expressão das rMioglobinas..... | 67 |
| 4.3.5. Lise bacteriana..... | 67 |
| 4.3.6. Solubilização dos corpos de inclusão..... | 68 |

| | |
|---|----|
| 4.3.7. Purificação das rMioglobinas..... | 68 |
| 4.3.7.1. Cromatografia de troca-iônica..... | 68 |
| 4.3.7.2. Cromatografia de afinidade..... | 68 |
| 4.3.8. Análise da identidade das rMioglobinas por <i>Western blot</i> | 69 |
| 4.3.8.1. Eletrotransferência..... | 69 |
| 4.3.8.2. <i>Immunoblotting</i> | 69 |
| 4.3.9. Análise da pureza das rMioglobinas por SDS-PAGE e espectrometria de massas..... | 70 |
| 4.3.10. Troca de tampão das rMioglobinas..... | 70 |
| 4.3.10.1. Tampão utilizado para reação enzimática das rMioglobinas com Fator Xa..... | 71 |
| 4.3.10.2. Tampão utilizado para a ligação de hemina e transformação das rMioglobinas em oxidase utilizando CCl ₄ | 71 |
| 4.3.10.3. Tampão utilizado para a transformação das rMioglobinas em oxidase utilizando H ₂ O ₂ | 71 |
| 4.3.11. Estimativa de concentração de proteínas..... | 71 |
| 4.3.12. Reação enzimática com Fator Xa..... | 72 |
| 4.3.13. Ligação de hemina às rMioglobinas..... | 72 |
| 4.3.14. Transformação das rMioglobinas em oxidases..... | 72 |
| 4.3.14.1. Teste com CCl ₄ | 73 |
| 4.3.14.2. Teste com H ₂ O ₂ | 74 |
| 4.3.15. Análise da atividade oxidase das rMioglobinas de <i>Biomphalaria</i> e das mioglobinas comerciais de cavalo e baleia..... | 74 |
| 4.4. PARTE III: ANÁLISE ESTRUTURAL IN SILICO DAS MIOGLOBINAS RADULARES DE MOLUSCOS DO GÊNERO <i>Biomphalaria</i> | 75 |
| 4.4.1. Modelagem molecular..... | 75 |
| 4.4.2. Alinhamento global de sequências primárias, análise da composição de aminoácidos e da posição dos resíduos de aminoácidos em relação ao grupo heme na estrutura das mioglobinas .. | 76 |

| | |
|--|-----|
| 5. RESULTADOS | 78 |
| 5.1. PARTE I | 78 |
| 5.1.1. Purificação das mioglobinas nativas de <i>B. glabrata</i>, <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> | 78 |
| 5.1.1.1. Filtração molecular | 78 |
| 5.1.1.2. Troca aniônica | 78 |
| 5.1.1.3. Fase reversa | 78 |
| 5.1.2. Análise do material purificado por SDS-PAGE | 87 |
| 5.1.3. Ponto isoelétrico experimental das mioglobinas nativas | 91 |
| 5.1.4. Massa molecular das mioglobinas nativas do estômago | 94 |
| 5.1.5. Sequenciamento de aminoácidos das mioglobinas nativas do estômago | 97 |
| 5.1.6. Auto-oxidação das mioglobinas nativas do músculo radular e do estômago de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> | 97 |
| 5.2. PARTE II | 101 |
| 5.2.1. Subclonagem do cDNA de mioglobina do músculo radular de <i>Biomphalaria glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> | 101 |
| 5.2.2. Teste de indução da expressão protéica das rMioglobinas | 103 |
| 5.2.3. Solubilidade das rMioglobinas | 105 |
| 5.2.4. Lise bacteriana e solubilização dos corpos de inclusão | 107 |
| 5.2.5. Purificação das rMioglobinas | 110 |
| 5.2.5.1. Cromatografia de troca-catiônica | 110 |
| 5.2.5.2. Cromatografia de afinidade | 110 |
| 5.2.6. Corte da cauda de histidina e demais aminoácidos do N-terminal das rMioglobinas | 116 |
| 5.2.7. Ligação de hemina às rMioglobinas | 118 |
| 5.2.8. Análise da transformação e atividade oxidase das rMioglobinas de <i>Biomphalaria</i> e das mioglobinas comerciais de coração de cavalo e baleia em oxidase | 121 |
| 5.2.8.1. Experimentos controle | 121 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.8.2. Tentativa de transformação com CCl ₄ | 126 |
| 5.2.8.3. Tentativa de transformação com H ₂ O ₂ | 129 |
| 5.3. PARTE III..... | 132 |
| 5.3.9. Modelagem molecular das mioglobinas de <i>Biomphalaria</i> e demais análises <i>in silico</i> | 132 |
| 5.3.9.1. Obtenção dos modelos de estrutura..... | 132 |
| 5.3.9.2. Análise do posicionamento de resíduos importantes para a atividade oxidase em mioglobinas..... | 135 |
| 5.3.9.2.1. Transformação com CCl ₄ : importância das histidinas..... | 135 |
| 5.3.9.2.2. Transformação com H ₂ O ₂ : importância tirosinas..... | 135 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 142 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 156 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 159 |
| 9. APÊNDICE..... | 175 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ilustração do grupo heme..... | 26 |
| Figura 2. Ilustração do enovelamento de globina (<i>globin folding</i>)..... | 27 |
| Figura 3. Foto de indivíduo adulto da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> | 35 |
| Figura 4. Adutos de heme formados após o tratamento com BrCCl_3 | 41 |
| Figura 5. Mecanismo proposto para a ligação da histidina ao aduto de heme tratado com BrCCl_3 | 42 |
| Figura 6. Mecanismo proposto para a ligação do aduto de heme tratado com H_2O_2 à mioglobina..... | 44 |
| Figura 7. Mecanismo proposto para a ligação da histidina ao aduto de heme tratado com H_2O_2 à mioglobina por meio do resíduo de tirosina 103..... | 45 |
| Figura 8. Esquema do vetor de expressão em procariontes pET16b..... | 61 |
| Figura 9A. Perfil cromatográfico da filtração molecular do extrato da musculatura radular..... | 80 |
| Figura 9B. Perfil cromatográfico da filtração molecular do extrato da musculatura estomacal..... | 81 |
| Figura 10A. Perfil cromatográfico da troca iônica das mioglobinas nativas do extrato da musculatura radular..... | 82 |
| Figura 10B. Perfil cromatográfico da troca iônica das mioglobinas nativas do extrato da musculatura estomacal..... | 83 |
| Figura 11. Cromatogramas da purificação das mioglobinas do estômago por fase reversa..... | 84 |
| Figura 12. Espectro de absorção dos picos provenientes da cromatografia de fase reversa..... | 86 |
| Figura 13. SDS-PAGE 12,5% corado por prata..... | 88 |
| Figura 14A. Análise da intensidade das bandas de proteínas do extrato bruto radular e estomacal dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> | 89 |
| Figura 14B. Análise da intensidade das bandas de proteínas do extrato bruto radular e estomacal dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15A. Perfil cromatográfico da cromatofocalização das mioglobinas radulares..... | 92 |
| Figura 15B. Perfil cromatográfico da cromatofocalização das mioglobinas estomacais..... | 93 |
| Figura 16. Gráficos de espectrometria de massa..... | 96 |
| Figura 17A. Espectros de absorção (500-700 nm) da mioglobina nativa radular de <i>B. glabrata</i> e de <i>B. tenagophila</i> | 98 |
| Figura 17B. Espectros de absorção (500-700 nm) da mioglobina nativa estomacal de <i>B. glabrata</i> e de <i>B. tenagophila</i> | 99 |
| Figura 18. Gel de agarose 1% do PCR de colônia para análise dos clones de rMioglobina..... | 102 |
| Figura 19. SDS-PAGE 12,5% do teste de indução protéica do clone de mioglobina de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> | 104 |
| Figura 20. SDS-PAGE 12,5% do teste de solubilidade do clone de mioglobina de <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> | 106 |
| Figura 21. Fotografia do teste de Gram realizado antes e após a lise bacteriana..... | 108 |
| Figura 22. SDS-PAGE 12,5% para análise das etapas de lise bacteriana..... | 109 |
| Figura 23. Perfil cromatográfico da troca-iônica do extrato bruto bacteriano..... | 111 |
| Figura 24. Perfil cromatográfico da afinidade do material proveniente da troca-iônica..... | 112 |
| Figura 25. SDS-PAGE 12,5%, corado pelo método da prata, das rMioglobinas purificadas... | 113 |
| Figura 26. Gráficos de espectrometria de massas das rMioglobinas..... | 114 |
| Figura 27. <i>Western blot</i> das proteínas recombinantes após a purificação..... | 115 |
| Figura 28. SDS-PAGE 12,5% da reação de digestão enzimática com Fator Xa..... | 117 |
| Figura 29A. Espectros de absorção (200-800 nm) da ligação do grupo prostético (hemina) com a rMioglobina de <i>B. glabrata</i> | 119 |
| Figura 29B. Espectros de absorção (200-800 nm) da ligação do grupo prostético (hemina) com a rMioglobina de <i>B. tenagophila</i> | 120 |
| Figura 30. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo do controle da influência do peróxido de hidrogênio na cinética de reação..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| Figura 31. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com mioglobinas comerciais não tratadas..... | 124 |
| Figura 32. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da cinética da reação de teste da função oxidase com rMioglobinas não tratadas..... | 125 |
| Figura 33. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da reação de teste da função oxidase com mioglobinas após serem tratadas com CCl ₄ | 127 |
| Figura 34. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com rMioglobinas de <i>Biomphalaria</i> após serem tratadas com CCl ₄ | 128 |
| Figura 35. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com mioglobinas comerciais após serem tratadas com H ₂ O ₂ | 130 |
| Figura 36. Gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo da cinética da reação de teste da função oxidase com rMioglobinas de <i>Biomphalaria</i> após serem tratadas com H ₂ O ₂ | 131 |
| Figura 37. Alinhamento global das sequências primárias das mioglobinas de <i>Biomphalaria</i> com o molde e o controle, para a modelagem molecular..... | 133 |
| Figura 38. Modelos de estrutura gerados por modelagem por homologia <i>in silico</i> | 134 |
| Figura 39. Alinhamento global das sequências primárias das mioglobinas de <i>Biomphalaria</i> , com as mioglobinas comerciais utilizadas como controle para a atividade oxidase..... | 136 |
| Figura 40. Posição do resíduo de histidina 118 nos modelos de estrutura das mioglobinas de <i>B. glabrata</i> e de <i>B. tenagophila</i> | 138 |
| Figura 41. Modelos de estrutura das mioglobinas de <i>B. glabrata</i> e de <i>B. tenagophila</i> e estruturas experimentais das mioglobinas de baleia e de coração de cavalo..... | 139 |
| Figura 42. Posição dos resíduos de fenilalanina (Phe) e da Ser 99 em relação ao grupo heme nas mioglobinas de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> | 140 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Sequência nucleotídica dos iniciadores universais T7 <i>promoter</i> e T7 <i>terminator</i> | 66 |
| Tabela 2. Reagentes e protocolo de reação utilizados na PCR de colônia para análise dos supostos clones positivos..... | 66 |
| Tabela 3. Programa utilizado para a PCR de colônia..... | 66 |
| Tabela 4. Tempos de retenção dos picos 1 (holomioglobina) e 2 (apomioglobina) provenientes da cromatografia de fase reversa das espécies de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> | 86 |
| Tabela 5. Valores de ponto isoelétrico das apomioglobinas radulares e estomacais de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> | 96 |
| Tabela 6. Massa molecular experimental das mioglobinas radulares e estomacais de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> | 96 |
| Tabela 7. Taxas de auto-oxidação obtidas para as mioglobinas radulares e estomacais de <i>Biomphalaria</i> | 101 |
| Tabela 8. Quantidade de mioglobina encontrada por unidade de massa na musculatura radular e estomacal de <i>Biomphalaria</i> | 101 |
| Tabela 9. Clones positivos de <i>B. tenagophila</i> e de <i>B. glabrata</i> | 103 |
| Tabela 10. Valor percentual de identidade entre as proteínas a serem modeladas e o molde.... | 134 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| A/Abs | Absorbância |
| aa | Aminoácido |
| ACN | Acetonitrila |
| A.U. | Do inglês <i>Arbitrary unit</i> |
| cDNA | Do inglês <i>Complementary DNA</i> |
| CAPS | Ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propano sulfônico |
| Da | Dalton |
| O.D. | Do inglês <i>Optical density</i> |
| EDTA | Do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> |
| FPLC | Do inglês <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| g | Gramas |
| h | Hora |
| HPLC | Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo |
| kb | Quilobase |
| kDa | Quilodalton |
| kV | Quilovolts |
| L | Litro |
| LB | Luria-Bertani |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |

| | |
|------------|--|
| mRNA | RNA mensageiro |
| m/z | Relação massa/carga |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| pb | Pares de base |
| PCR | Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PCR-RFLP | Do inglês PCR - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> |
| PDB | Do inglês <i>Protein Data Bank</i> |
| pI | Ponto isoelétrico |
| PMSF | Do inglês <i>Phenylmethanesulphonyl fluoride</i> |
| PSA | Persulfato de amônio |
| PTGC | Polisulfona com suporte de propileno e glicerol |
| p/v | Peso por volume |
| rMiglobina | Mioglobina recombinante |
| rpm | Rotação por minuto |
| RT- PCR | Do inglês <i>Reverse Transcritase - Polymerase Chain Reaction</i> |
| s | Segundos |
| SDS | Do inglês <i>Sodium Dodecyl Suphate</i> |
| SDS-PAGE | Do inglês <i>Sodium Dodecyl Suphate - Polyacrilamyde Gel Electrophoresis</i> |
| TAE | Tampão Tris-acetato-EDTA |
| TEMED | N', N', N', N'-tetrametilenodiamina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TPCK | Do inglês <i>Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone</i> |
| Tris | Tris (hidroximetil) - aminometano |
| U | Unidade/unidades |
| U.A. | Unidade arbitrária |

| | |
|-----|-------------------|
| V | Volts |
| v/v | Volume por volume |
| x g | Gravidade |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |

ABSTRACT

Myoglobin is one of the most studied and characterized heme protein. The focus in this protein with approximately 15-17 kDa has a relevant justification; despite of the solid data about myoglobin, this protein increasingly presents versatility in its function in the organism, and it could play an indirect role in appearing and establishing pathologies.

Pathologies related with myoglobin can range from membrane lipids peroxidation to serious hepatopathologies. Some pathologies are related with the capability of myoglobin to acquire oxidase activity after an interaction with exogenous agents as alkyl halides, or endogenous agents exemplified by hydrogen peroxide which is normally produced by cellular metabolism. Previous studies showed that it was necessary a specific tyrosine residue presence to covalently bind heme group at myoglobin proteinic part to acquire oxidase activity after being transformed using hydrogen peroxide; distal histidine e histidine residue 97 are required for oxidase activity if alkyl halide are used.

In this work, oxidase activity was not observed in *Biomphalaria* myoglobins treated with CCl_4 , according to previous studies about the necessity of specific histidines, which are not present at *Biomphalaria* myoglobins; residual oxidase activity observed in these myoglobins before the treatment, was lost. After the hydrogen peroxide treatment oxidase activity was observed in *Biomphalaria* myoglobins. These myoglobins have no tyrosine residues; it is suggested that another amino acid residue could be evolved in the reaction mechanism to provide oxidase activity. Some biochemical parameters of these myoglobins were obtained experimentally (molecular mass, isoelectric point, etc). During analysis it was detected the presence of myoglobin in the stomach, and not only in radular muscle as described in the literature. In both radular and stomach tissues the colour due to myoglobin is different, and according with the quantification of the myoglobin content and autoxidation rates, it is possible that the myoglobins in these two organs could be isoforms.

RESUMO

A mioglobina é uma das hemeproteínas mais estudadas e bem caracterizadas atualmente. A concentração de estudos nessa proteína de aproximadamente 15-17 kDa possui justificativa relevante; apesar dos dados já consolidados sobre a mioglobina, essa vem apresentando cada vez mais versatilidade em termos de função e atividades no organismo, podendo participar indiretamente do surgimento e estabelecimento de patologias.

As patologias envolvendo a mioglobina podem variar desde peroxidação de lipídeos de membrana até hepatopatologias graves. Algumas das patologias estão relacionadas à capacidade da mioglobina adquirir atividade enzimática oxidase após uma interação com agentes exógenos, como haletos de alquila ou agentes endógenos, exemplificados pelo peróxido de hidrogênio que é produzido normalmente no organismo como metabólito das reações químicas celulares.

Estudos anteriores mostraram que seria necessária a presença de um resíduo de tirosina específico para ligar covalentemente o grupo heme à parte protéica da mioglobina para que ela adquirisse atividade oxidase após ser tratada com peróxido de hidrogênio; a histidina distal e um resíduo de histidina 97 seriam necessários para tal propósito, ao se utilizar um haleto de alquila na transformação.

No presente trabalho não foi observada atividade oxidase nas mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* estudadas, após seu tratamento com CCl_4 , concordando com a literatura a respeito da necessidade dos resíduos de histidina supracitados, os quais não estão presentes nessas mioglobinas, e a atividade residual observada antes do tratamento com o haleto de alquila, foi perdida.

Após o tratamento com peróxido de hidrogênio foi observada atividade oxidase nas mioglobinas dos moluscos estudados, as quais não possuem nenhum resíduo de tirosina na sequência primária, o que sugere que outro mecanismo de reação, envolvendo outros resíduos, foi adotado para o surgimento da atividade oxidase.

As mioglobinas de *Biomphalaria* também tiveram alguns parâmetros bioquímicos obtidos experimentalmente (massa molecular, ponto isoelétrico, etc). Durante as análises foi observada a presença dessa proteína no estômago, além de sua presença na musculatura radular de *Biomphalaria*, como descrito previamente na literatura. Nesses dois tecidos a coloração observada devido à presença da mioglobina é diferente, e de acordo com a quantificação do conteúdo de mioglobina e taxas de auto-oxidação obtidas, essas mioglobinas poderiam ser isoformas.

INTRODUÇÃO

As mioglobinas são hemeproteínas encontradas em vários *taxa* de organismos, desde bactérias a vertebrados. Suas funções fisiológicas são baseadas em sua capacidade de ligação reversível ao oxigênio. O entendimento das funções fisiológicas da mioglobina tem mudado com o passar das décadas. Atualmente sabe-se que o papel da mioglobina apenas como uma proteína de armazenamento de oxigênio é possivelmente uma concepção errônea. Funções como agente regulador de suprimento e utilização de oxigênio, participante da fosforilação oxidativa e transdutor de sinais estão sendo analisadas (Wittenberg & Wittenberg, 2003).

A mioglobina também expressa atividade catalítica, a qual é importante para funções tais como a atividade enzimática de NO dioxigenase e peroxidase que podem ser parcialmente responsáveis por algumas patofisiologias (Wilson & Reeder, 2008) e a função de “sequestradora” intracelular de NO (óxido nítrico), protegendo enzimas respiratórias sensíveis a NO, tal como o citocromo C oxidase, complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (Eich *et al.* 1996; Brunori, 2001).

A afinidade da mioglobina pelo o oxigênio e as mudanças na estrutura da mesma por xenobióticos constituem um importante campo de estudo devido às novas características adquiridas pela mioglobina após sua interação com os xenobióticos. Haletos de alquila, como BrCCl_3 , podem ser reduzidos por várias hemeproteínas para formar radicais alquila. Esta reação tem importância toxicológica uma vez que a redução desses xenobióticos a radicais triclorometil pelo citocromo P-450 é um evento inicial para a hepatotoxicidade. Reações similares foram observadas em mioglobinas, como a debrominação redutiva de BrCCl_3 para formar metabólitos heme-derivados que foram irreversivelmente ligados à proteína. (Osawa *et al.*, 1990).

De modo geral, a transformação de mioglobinas e de outras hemeproteínas em enzimas oxidases pode ter importância toxicológica, uma vez que elas podem causar danos a tecidos

expostos a vários xenobióticos e agentes endógenos. Neste contexto, essas proteínas podem possivelmente contribuir para geração de quadros patológicos.

Existem outros pontos relevantes em relação à importância fisiológica da mioglobina. Tal proteína tem sido utilizada como modelo em muitos estudos para a compreensão da interação droga-proteína (Cheema *et al.*, 2007). As interações entre drogas e proteínas podem influenciar a ação das primeiras de diferentes maneiras; as proteínas podem facilitar a distribuição da droga pelo organismo ou podem inativá-las. As drogas, em contrapartida, podem modificar as funções biológicas das proteínas em questão.

Com base nas informações da literatura com relação ao possível envolvimento de mioglobinas em processos metabólicos e no desenvolvimento de quadros patológicos, torna-se importante a análise dessas proteínas a fim de gerar dados que possam contribuir para o esclarecimento de tais atividades, bem como do mecanismo químico envolvido em seu surgimento, visando sua posterior exploração para fins terapêuticos.

REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. AS GLOBINAS

As proteínas pertencentes à denominada superfamília “globinas” são proteínas que apresentam funções diversas; considerando a espécie do organismo em análise (Wajcman *et al.*, 2009), as representantes mais comuns e mais estudadas dessa superfamília são as mioglobinas e as hemoglobinas.

1.1.1. Estrutura tridimensional das globinas

As globinas são compostas por uma parte protéica, denominada apoproteína, e por uma parte prostética representada pelo grupo heme. Este grupo prostético é quimicamente ativo participando de vários processos biológicos, e confere às globinas a capacidade de ligação a moléculas como O₂, NO e CO (*Op. cit.*).

O grupo heme é constituído por uma parte orgânica, a protoporfirina, e por um átomo de ferro central (Figura 1). A protoporfirina é formada por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metênicas, formando assim um anel maior, ao qual se ligam quatro radicais metil, dois vinil e dois propionato. Tais radicais podem estar dispostos de 15 maneiras diferentes, porém uma única disposição é encontrada em sistemas biológicos, a disposição que fornece a protoporfirina IX (Suzuki & Imai, 1998).

A parte protéica das globinas, em geral, consiste de seis a oito segmentos de α -hélices conectadas por alças curtas (Bolognesi *et al.*, 1997). Esta estrutura descrita como *three-over-three helical sandwich*, caracteriza o denominado “enovelamento de globina” ou *myoglobin fold*, como foi descrito por Kendrew e colaboradores (1958), ao resolverem experimentalmente a estrutura tridimensional da mioglobina. Tal padrão de enovelamento é predominantemente constituído por estruturas secundárias em α -hélices sobrepostas, às quais o grupo heme se encontra ligado de forma não covalente, por interações hidrofóbicas (Wajcman *et al.*, 2009). As

hélices são nomeadas de A a H, e os resíduos de aminoácidos são numerados seqüencialmente dentro de cada α -hélice (Figura 2).

A maioria das globinas é composta de 140 a 150 resíduos de aminoácidos, dos quais somente três resíduos são altamente conservados: E7-His (Histidina número sete da hélice E), CD1-Phe e F8-His, que fazem parte da cavidade na qual se insere o grupo heme. Os resíduos CD1-Phe e F8-His (histidina proximal) são estritamente conservados nas globinas, enquanto o resíduo E7-His (histidina distal) pode ser substituído por glutamina em algumas globinas de vertebrados e por valina, leucina, tirosina ou glutamina em globinas de invertebrados (Vinogradov *et al.*, 1993). O resíduo F8-His liga-se ao átomo de ferro do grupo heme prendendo-o à parte protéica.

Na evolução de proteínas observam-se mudanças em sua seqüência primária, e na maioria dos casos a divergência de seqüência primária e de estrutura tridimensional é progressiva. Porém, a estrutura tridimensional tende a ser mais conservada que a seqüência primária, e por essa razão é possível identificar proteínas relacionadas por meio de sua similaridade estrutural (Lesk, 2001).

Apesar da porcentagem de identidade entre os resíduos de aminoácidos variar largamente entre as sequencias primárias das globinas, o padrão característico de hidrofobicidade dos resíduos em cada segmento de α -hélice permanece conservado. A análise das seqüências primárias e das estruturas de globinas de vertebrados mostrou que seu interior (*core*) consiste em 33 resíduos de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos, ocupando um volume aproximadamente constante (Perutz *et al.*, 1965).

Observa-se que a identidade entre seqüências primárias de globinas de organismos filogeneticamente afastados é pequena; as mioglobinas de *Physiter catodon* (baleia) e *Aplysia sp.* (molusco) possuem aproximadamente 25% de identidade e, no entanto, apresentam alta similaridade estrutural (Suzuki & Imai, 1998).

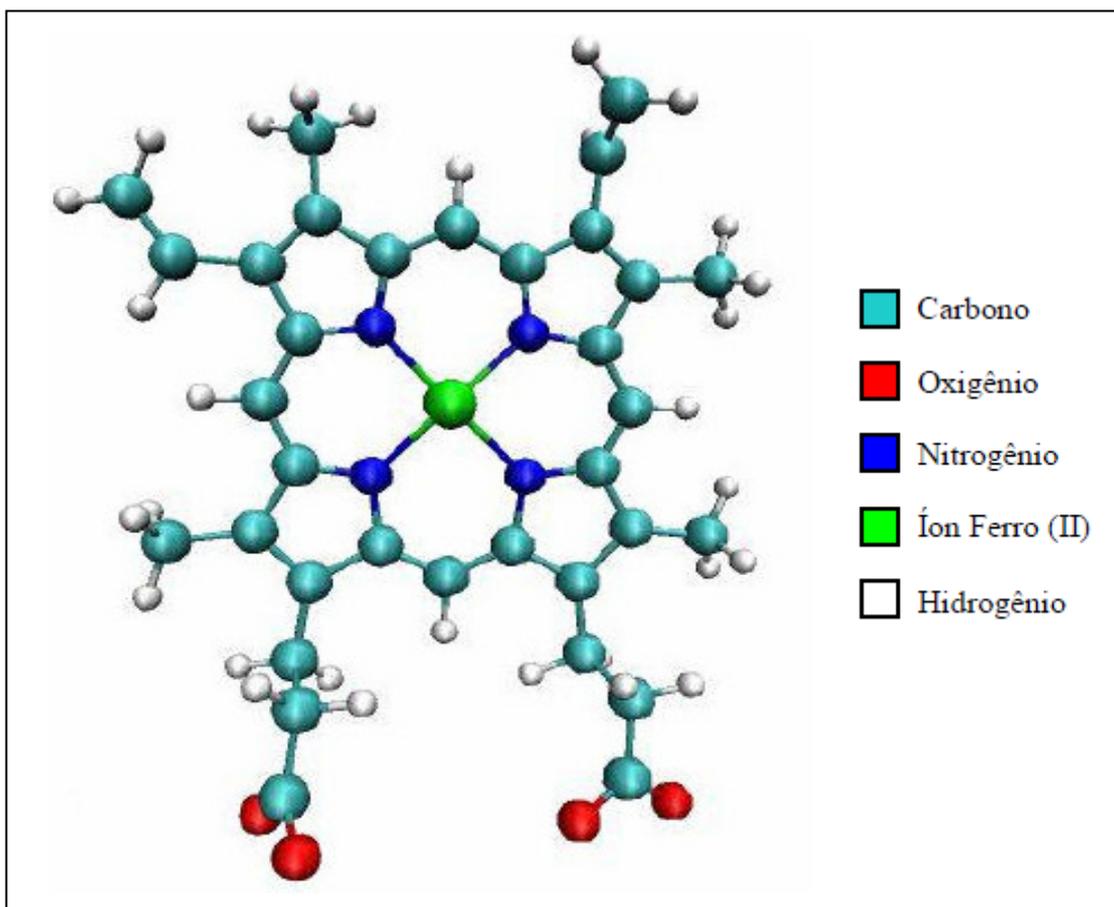


Figura 1. Ilustração do grupo heme. Adaptado da tese PUC-Rio, certificação digital nº 0610635/CA.

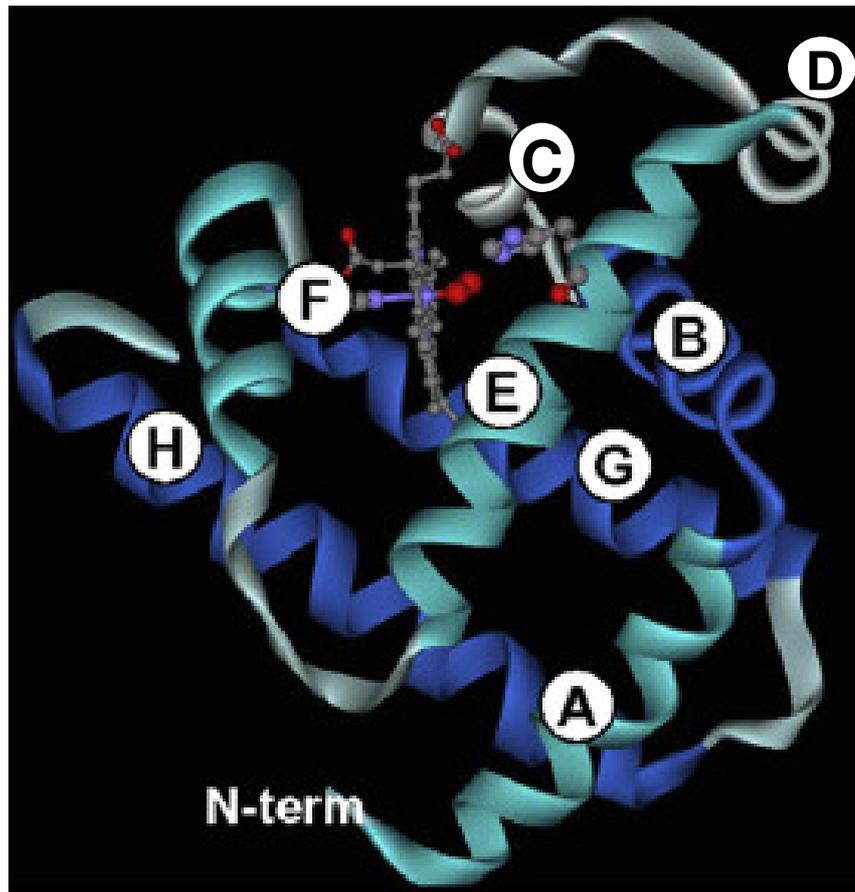


Figura 2. Ilustração do enovelamento de globina (*globin folding*). Adaptado de Wajcman *et al.*, 2009.

Desse modo, globinas cujas estruturas tridimensionais não são conhecidas, podem ter sua sequência primária alinhada de maneira bastante confiável a sequências primárias de globinas com estrutura tridimensional resolvida experimentalmente para obtenção de um modelo de estrutura (Kapp *et al.*, 1995).

O primeiro alinhamento detalhado de globinas de invertebrados e vertebrados (Lesk & Chothia, 1980 apud Kapp *et al.*, 1995) revelou que esse enovelamento é conservado entre sequências que apresentam identidade menor que 16%, um fato incomum ao se observar outras famílias de proteínas, que apresentam divergências substanciais na estrutura secundária quando são comparadas sequências com baixa identidade (Chothia & Lesk, 1986; Chothia & Lesk, 1987).

1.1.2. Categorias das globinas

Fukami-Kobayashi e colaboradores (1995), por meio da análise da sequência primária e estrutura gênica de mioglobinas e hemoglobinas de vários *taxa* de organismos, propuseram que seria possível separar essas proteínas em três categorias.

A primeira categoria é a categoria da “Globina universal”, constituída por globinas com 145 a 155 resíduos de aminoácidos, dos quais alguns seriam conservados, como a histidina proximal, na posição F8 e a fenilalanina CD1 (Kapp *et al.*, 1995). A maioria das mioglobinas e hemoglobinas, distribuídas de bactérias a mamíferos, faz parte dessa categoria, e sua estrutura tridimensional é o clássico “enovelamento de globina” descrito anteriormente.

A categoria da “Globina compacta” compreende as globinas com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos, como a mioglobina de *Paramecium*. Essas globinas são caracterizadas pela ausência da hélice A (ou pelo seu encurtamento), diminuição da região entre as hélices C-E, e perda de parte da hélice F. Tais globinas também recebem a denominação de “Globinas truncadas” (Vinogradov *et al.*, 1993).

A terceira categoria recebe o nome de “Globina IDO-like” e seria composta por globinas que apresentam homologia com a enzima indolamina dioxigenase (IDO), como a mioglobina de *Sulculus* (molusco) e *Saccharomyces* (levedura) (Suzuki & Imai, 1998).

1.1.3. Diversidade das globinas

Mioglobinas e hemoglobinas com grande diversidade em sua estrutura (monômero, dímeros, etc) e função são encontradas em vários tipos de organismo, como vem sendo observado com as descobertas ao longo dos anos (*Op. cit.*).

Webster (1987) foi o primeiro a descobrir a hemoglobina da bactéria gram-negativa *Vitreoscilla*, composta por duas subunidades idênticas de 16 kDa, expressa sob condições de hipóxia.

A hemoglobina encontrada na bactéria *Escherichia coli* é uma proteína quimérica de 44 kDa, contendo um grupo heme e uma flavina como grupos prostéticos, o que confere a capacidade de ligação reversível ao oxigênio e atividade de hidropteridina redutase (Vasudevan, *et al.*, 1991).

Outro tipo de hemoglobina foi descrita na cianobactéria *Nostoc commune* (Potts *et al.*, 1992); esta proteína possui 12,5 kDa e parece estar envolvida na fixação de nitrogênio, funcionando como uma “seqüestradora” de oxigênio.

Em eucariotos unicelulares, como a alga verde *Chlamydomonas eugametos*, foram isoladas duas hemoglobinas presentes predominantemente nos cloroplastos cujos genes são nucleares. Essas proteínas possuem massa molecular que varia de 17-18 kDa (Couture *et al.*, 1994).

A primeira evidência de uma hemoglobina em protozoários foi observada em *Paramecium caudatum* (Sato & Tamiya, 1937 apud Suzuki & Imai, 1998). A massa molecular dessa proteína foi estimada em 13-15 kDa, uma das menores globinas descritas.

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada uma hemoglobina quimérica com aproximadamente 400 aminoácidos. Trata-se de uma hemoglobina similar à encontrada na bactéria *Escherichia coli*, com dois domínios distintos, um domínio amino-terminal homólogo às globinas e um domínio carboxi-terminal com função de redutase, contendo uma flavina como grupo prostético; por esse motivo essa proteína denomina-se flavohemoglobina (Zhu & Riggs, 1992).

As hemoglobinas de plantas leguminosas são denominadas leghemoglobinas, e são abundantemente encontradas nos nódulos das raízes dessas plantas. Elas são monoméricas e possuem massa molecular em torno de 16 kDa. Plantas não leguminosa também possuem hemoglobinas, que podem ser homodiméricas ou monoméricas (Vinogradov *et al.*, 2006).

Em vertebrados, além das hemoglobinas e mioglobinas, duas outras proteínas foram descritas como membros da superfamília das globinas, a neuroglobina (Burmester *et al.*, 2000) e a citoglobina (Burmester *et al.*, 2002). A citoglobina está presente virtualmente em todos os tecidos, por outro lado, a neuroglobina está presente em células do sistema nervoso central e periférico, e em células da retina (Trent & Hargrove, 2002). A sequência primária dessas duas globinas possui apenas aproximadamente 25% de identidade com a hemoglobina e a mioglobina humana, porém alguns resíduos de aminoácidos estão altamente conservados (Pesce *et al.*, 2002)

1.2. AS MIOGLOBINAS

As mioglobinas são hemeoproteínas pertencentes à superfamília das globinas que podem ser encontradas em vários *taxa* de organismos, desde bactérias a vertebrados.

Hemeoproteínas similares são denominadas *myoglobin-like* (ou *globin-like*) ou tipo mioglobina, como a globina presente em bactérias (comumente chamada de hemoglobina), a globina de plantas (leghemoglobina), a globina de protozoários (hemoglobina, ou mioglobina para alguns autores) e a globina presente em invertebrados (mioglobina ou hemoglobina tecidual) (Vinogradov *et al.*, 1993). Em vertebrados a mioglobina é normalmente encontrada na

musculatura estriada esquelética e cardíaca (Wittenberg, 1970), conferindo a esses tecidos uma cor avermelhada.

As mioglobinas compartilham características estruturais e espectrais comuns, caracterizam-se por apresentarem um espectro óptico de absorção em duas áreas (bandas) do espectro de luz visível: α (em torno de 580 nm) e β (em torno de 540 nm) quando em sua forma oxigenada (Suzuki & Imai, 1998).

A habilidade de ligação a O_2 , CO e NO conferida pelo grupo heme às mioglobinas é explorada *in vivo* para executar uma série de funções bioquímicas e fisiológicas (Wilson & Reeder, 2008). Essa proteína é enovelada de modo que o seu grupo heme fique em um ambiente hidrofóbico, o que limita o tamanho das moléculas que podem acessá-lo e interagir com o átomo de ferro. (Cornforth & Jayasingh, 2004).

Na mioglobina fisiologicamente funcional, o átomo de ferro do grupo heme encontra-se no estado ferroso (Fe^{2+}) (Livingston & Brown, 1981). Nesse estado de oxidação, o átomo de ferro pode formar seis ligações coordenadas: quatro com os átomos de nitrogênio dos grupos pirrólicos do núcleo porfirínico, uma quinta ligação é formada com o átomo de nitrogênio do anel imidazólico do resíduo de histidina proximal e a sexta coordenação fica disponível para formar uma ligação com um ligante que determina a cor do complexo da mioglobina (Fennema, 2000).

Em condições normais o principal ligante da mioglobina é oxigênio molecular. De acordo com seus ligantes comuns em sistemas biológicos ela pode se apresentar, basicamente, em três formas: na forma de deoximioglobina, oximioglobina e metamioglobina, o que faz com que os tecidos que a contenham apresentem colorações diferentes, desde vermelho intenso a uma cor acastanhada (Faustman & Cassens, 1990). A prevalência da cor do órgão ou tecido depende do grau de oxidação das mioglobinas, o que pode ser utilizado para inferir o conteúdo de mioglobina no tecido, a afinidade da mioglobina pelo oxigênio, e conseqüentemente uma possível função, além da função clássica de estoque intracelular de oxigênio.

A forma da proteína não oxigenada (deoximioglobina) possui cor púrpura opaca, enquanto a forma oxigenada (oximioglobina) apresenta cor vermelha brilhante (Giddings, 1977).

A mioglobina pode também sofrer oxidação pelo oxigênio, com o ferro heme sendo convertido para o estado férrico (Fe^{3+}) (Wallace *et al.*, 1982). A forma oxidada de mioglobina, a metamioglobina, não é capaz de se ligar ao oxigênio e assim ela é fisiologicamente inativa. A metamioglobina apresenta cor marrom (castanho).

1.2.1. Mioglobinas de invertebrados

Em contraste com os vertebrados, as globinas de invertebrados exibem uma extensa variabilidade de estrutura e de função (Vinogradov, 1985). As divergências estruturais e funcionais têm sido observadas inter-espécie, mas também dentro de um mesmo organismo, e são correlacionada à ampla variação nas condições físico-químicas sob as quais as globinas de invertebrados operam *in vivo* (Weber & Vinogradov, 2001), refletindo a especialização e adaptação à grande diversidade de ambientes ocupados por esses organismos (Gow *et al.*, 2005).

Em invertebrados uma das ocorrências mais marcantes de musculatura vermelha (indicando a presença de mioglobina) é observada na massa bucal (musculatura radular) e no estômago triturador de moluscos gastrópodes. A mioglobina é muito abundante em tais músculos; no caso do molusco marinho *Aplysia sp.* a concentração dessa proteína é 2 a 3 vezes maior do que no músculo esquelético e cardíaco humano (Read, 1966).

As mioglobinas de moluscos têm sido as mais estudadas dentre as mioglobinas de invertebrados (Read, 1966), e têm fornecido evidências importantes para o estudo das globinas. O filo Mollusca é um dos maiores do reino Metazoa, e suas proteínas respiratórias apresentam uma marcante diversidade de estrutura e função. Neste aspecto pode-se contrastar a estrutura monomérica convencional das mioglobinas de vertebrados com a de moluscos gastrópodes, cujas mioglobinas podem ser compostas por monômeros ou dímeros, com cadeias de 15-17 kDa. As

mioglobinas díméricas são formadas por duas subunidades idênticas, que podem ser unidas por pontes dissulfeto (Terwilliger & Terwilliger, 1985).

No gastrópode *Sulculus diversicolor* foi descrita uma mioglobina de 39 kDa que apresenta 35% de identidade com a enzima indolamina dioxigenase (IDO) (Suzuki & Furukohri, 1989). A IDO é uma enzima de 45 kDa contendo o grupo heme, e é responsável pela degradação do triptofano em vertebrados (Shimizu, 1978).

A mioglobina de *Sulculus diversicolor* possui resíduos de histidina conservados, um dos quais é provável ser a histidina proximal; entretanto a análise da seqüência de aminoácidos derivada do cDNA não indicou relação evolutiva significativa com nenhuma mioglobina ou hemoglobina típica. Foi proposto que nesses gastrópodes o gene de mioglobina típica tenha sido alterado ou perdido, e uma indolamina dioxigenase modificada, derivada da duplicação do gene verdadeiro dessa enzima, evoluiu como uma possível substituta (Suzuki & Takagi, 1992). A descoberta dessa mioglobina indica a existência de um caminho alternativo para a evolução da mioglobina (Suzuki *et al.*, 1998).

1.2.1.1. Mioglobinas de moluscos do gênero *Biomphalaria*

O gênero *Biomphalaria* abriga espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, o agente etiológico da esquistossomose, uma doença que afeta 200 milhões de indivíduos em 74 países de clima tropical (Verjoviski-Almeida *et al.*, 2003).

O *Biomphalaria* é um molusco gastrópode de água doce que pode ser encontrado em uma variedade de ambientes naturais e artificiais (lagos, córregos, represas, barragens, etc). Ele se adapta a diferentes condições ambientais e é capaz de resistir a variações nas características físicas, químicas e biológicas do local em que vive (Paraense, 1972).

No Brasil existem 10 espécies de *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. schrammi*, *B. kuhniana*, *B. intermedia*, *B. amazonica*, *B. oligoza*, *B.*

occidentalis; e uma subespécie do gênero, o *B. tenagophila guaibensis* (Paraense & Corrêa, 1963).

Das espécies reportadas, apenas *B. glabrata* (Figura 3), *B. tenagophila* e *B. straminea* são encontradas naturalmente infectadas pelo *Schistosoma mansoni*. Apesar do *B. glabrata* ser considerado o hospedeiro intermediário mais importante, devido à sua larga distribuição e alta susceptibilidade ao trematódeo (Paraense & Corrêa, 1963), é conhecido que *B. tenagophila* é um importante vetor em áreas do sul do país (Paraense & Corrêa, 1987), e que *B. straminea* é a espécie responsável pela manutenção de elevadas prevalências da esquistossomose nas zonas do agreste e zona costeira da região Nordeste do Brasil (Teles, 1996).

Os moluscos têm fornecido evidências importantes para o estudo das globinas (Suzuki & Imai, 1998), sendo que a maioria dos estudos de globinas de moluscos concentra-se em espécies marinhas. A mioglobina do molusco de água doce, *Biomphalaria glabrata*, foi caracterizada por Dewilde e colaboradores (1998) a partir de uma biblioteca de cDNA. Trata-se de uma proteína de 148 aminoácidos, com um único domínio e massa molecular teórica de 16.049,29 Da. Este trabalho foi considerado muito importante para estudos de estrutura, função e para auxiliar na elucidação da história evolutiva das globinas e do filo Mollusca, uma vez que ele confirmou que esse filo não possui origem monofilética, como observado pela primeira vez com o uso de SSU-rRNA (subunidade menor do RNA ribossomal) como marcador molecular (Winnepenninckx *et al.*, 1996).

A mioglobina de *B. glabrata* não apresenta uma histidina como resíduo distal (E7), e sim um resíduo de glutamina, diferente do que se encontra na maioria dos vertebrados; e na hélice B é observado um resíduo de valina (B10). Esses resíduos, em tais posições, influenciam na afinidade do grupo heme pelo o oxigênio (Dewilde *et al.*, 1998). Isso torna essa mioglobina interessante para estudos de interação do grupo heme à suas moléculas ligantes, a qual pode ser afetada pela mudança do resíduo.



Figura 3. Foto de indivíduo adulto da espécie *Biomphalaria glabrata*. (Arquivo pessoal)

1.2.2. Algumas funções descritas para as mioglobinas

As funções atribuídas às mioglobinas estão relacionadas à sua capacidade de ligação reversível ao oxigênio, e algumas dessas funções não foram, ainda, totalmente elucidadas. A função clássica é o estoque intracelular de oxigênio molecular para períodos de déficit temporário desse gás, no caso de uma contração cardíaca ou uma contração muscular esquelética (Millikan, 1937).

Acredita-se também no estoque de oxigênio para períodos mais longos de hipóxia, sendo esta função mais evidente em aves e mamíferos marinhos, que permanecem em períodos de apneia quando mergulham. Essa função é embasada na observação de que tais animais possuem um conteúdo muscular (mg/kg corpóreo) de mioglobina 10 a 30 vezes maior que animais não mergulhadores; por exemplo, o golfinho possui 13 vezes mais mioglobina por grama de tecido que um camundongo (Noren & Williams, 1999).

A difusão facilitada de oxigênio mediada pela mioglobina em células musculares esqueléticas é uma função ainda controversa. Acredita-se que a mioglobina seja capaz de interagir com a membrana celular, ligar o oxigênio capilar e difundi-lo para a mitocôndria (Wittenberg, 1970). Evidências experimentais têm sido apresentadas a favor (Merx *et al.*, 2001) e contra (Jürgens *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 2001) essa hipótese.

A função de “sequestradora” de oxigênio pode ser exemplificada pelas leghemoglobinas. A leghemoglobina de soja (*Glycine max*) possui grande afinidade pelo oxigênio; acredita-se que seja para manter baixos os níveis de oxigênio nos nódulos das raízes dessas plantas, protegendo assim a enzima nitrogenase que é sensível a essa molécula (Powell & Gannon, 1988; Wittenberg & Wittenberg, 1990).

Em vertebrados o NO é um potente vasodilatador e inibidor da enzima citocromo C oxidase e, conseqüentemente, inibidor da cadeia respiratória. Com base em sua capacidade de ligação ao NO, a mioglobina pode funcionar como uma “sequestradora” de NO na musculatura

cardíaca e esquelética evitando danos a esses tecidos (Brunori, 2001). Dados experimentais forneceram suporte para essa função da mioglobina ao relatarem alterações, relacionadas ao NO, em funções de miócitos cardíacos e esqueléticos de camundongos deficientes nessa proteína (Grange *et al.*, 2001).

Similar à função de “sequestradora” de NO, foi demonstrado que a mioglobina possui o papel de “sequestradora” de espécies reativas de oxigênio (Flögel, *et al.*, 2001b) e também apresenta função de peroxidase (George & Irvine, 1955; Khan *et al.*, 1998).

A fosforilação oxidativa mediada pela mioglobina nos cardiomiócitos (Doeller & Wittenberg, 1991), a atividade de oxidase de hemoglobinas bacterianas (Wittenberg & Wittenberg, 1990) e a presença de uma hemoglobina com função óptica no ocelo do nematódeo parasita *Mermis nigrescens* (Burr *et al.*, 2000), denotam outras funções dessa proteína.

1.2.3. Outras funções atribuídas à mioglobina

A mioglobina foi a primeira proteína a ter sua estrutura tridimensional resolvida, por Kendrew e colaboradores em 1958 e, vários anos após, muito têm sido descoberto a respeito dessa proteína. O entendimento das funções fisiológicas da mioglobina tem mudado com o passar das décadas. Atualmente sabe-se que, o papel da mioglobina apenas como uma proteína de armazenamento de oxigênio é possivelmente uma concepção errônea (Wittenberg & Wittenberg, 2003).

Em 2001, Ascenzi e colaboradores propuseram para a mioglobina um papel de agente antiparasitário no organismo. De acordo com esses pesquisadores a colonização preferencial do tecido muscular esquelético e cardíaco pelo *Trypanosoma cruzi* é devido ao papel da mioglobina como “sequestradora” de NO, uma vez que a mesma está presente em alta concentração nesses tecidos (0,2–0,4 mM). Tal suposição foi baseada no conhecimento de que a oximioglobina reage rápida e reversivelmente com o NO produzindo nitrato e mioglobina oxidada (metamioglobina),

a qual é reduzida posteriormente para o estado fisiologicamente ativo por uma enzima redutase (Livingston *et al.*, 1985).

O NO foi descrito como um potente inibidor da enzima citocromo C oxidase da cadeia transportadora de elétrons, deste modo a função da mioglobina como sequestradora de NO leva à efetiva proteção da respiração celular. Por outro lado, a mioglobina estaria protegendo o parasita *T. cruzi* dos efeitos adversos do NO como agente antiparasitário (Ascenzi *et al.*, 2001).

Existem outros pontos relevantes com relação à importância biológica da mioglobina. Essa proteína tem sido utilizada como modelo de estudo para a compreensão da interação droga-proteína (Cheema *et al.*, 2007). As interações entre drogas e proteínas podem influenciar a ação das primeiras de diferentes maneiras. As proteínas podem facilitar a distribuição da droga pelo organismo ou podem inativá-las. As drogas, por outro lado, podem modificar as funções biológicas das proteínas. Um dos enfoques, portanto, para a compreensão do mecanismo consiste em relacionar a interação das drogas com componentes macromoleculares das células e correlacionar como tais interações afetam suas propriedades funcionais e estruturais (Chakraborti, 2003).

Apesar de a mioglobina estar presente no interior de células musculares, algumas drogas de uso terapêutico podem atravessar a membrana plasmática e alcançá-la. A interação droga-proteína, em geral, pode influenciar a ação das mesmas de vários modos. As proteínas podem facilitar a distribuição das drogas pelo organismo ou inativá-las disponibilizando uma concentração de droga livre insuficiente para sensibilizar os receptores, e podem também retardar sua excreção. Por outro lado, as drogas também podem modificar funções biológicas das proteínas (Martin *et al.*, 1991).

A mioglobina tem sido usada como modelo de estudo para o entendimento da interação de drogas tais como as fenotiazinas (Bhattacharyya *et al.*, 1994; Bhattacharyya *et al.*, 1998; Ascenzi *et al.*, 1999a), porfirinas (Sil *et al.*, 1996), proflavinas (Ascenzi *et al.*, 1999b), bezafibrato (Coletta *et al.*, 1999) e clofibrato (Ascenzi *et al.*, 1993).

Dentre os aspectos supracitados relacionados às mioglobinas e suas possíveis funções biológicas, existem também evidências que suportam a hipótese de que a mioglobina pode iniciar o processo de estresse oxidativo em algumas doenças, as quais incluem a formação de isoprostano a partir de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) *in vitro* (Moore *et al.* 1998).

Um estudo realizado por Vuletich e colaboradores (2000) sugere que a mioglobina tratada com peróxido de hidrogênio possui um papel na peroxidação de lipídeos. Acredita-se que a formação de LDL tem papel significativo na patogênese da aterosclerose; a mioglobina em presença de peróxido de hidrogênio é capaz de catalisar a oxidação de moléculas de LDL *in vitro*, desse modo essa proteína pode estar envolvida no desenvolvimento de patologias vasculares.

A afinidade da mioglobina pelo oxigênio e as mudanças em sua estrutura por meio de xenobióticos constituem um importante campo de estudo. Haletos de alquila, como BrCCl_3 e CCl_4 podem ser reduzidos por várias hemeproteínas para formar radicais alquila. Este tipo de reação possui importância toxicológica uma vez que a redução de BrCCl_3 e CCl_4 para o radical triclorometil pelo complexo enzimático citocromo P-450 microsossomal é o evento inicial da hepatotoxicidade causada por xenobióticos, sendo que após esta reação o metabolismo do citocromo P-450 é inativado no retículo endoplasmático (Osawa *et al.*, 1990). Em experimentos realizados em ratos, nos quais o grupo heme do citocromo P-450 foi radioativamente marcado, foi observado que a administração de CCl_4 faz com que aproximadamente 28% do total de grupos heme tornem-se irreversivelmente ligados à proteína (Davies *et al.*, 1986).

Acredita-se que a formação de grupos heme alterados por intermediários reativos é responsável pela inativação de outras proteínas além do citocromo P-450. Estudos anteriores sobre os adutos de heme alterados formados a partir da reação da mioglobina com BrCCl_3 revelaram que o aduto de heme ligado à proteína é funcionalmente ativo. Especificamente, o aduto de heme poderia ser reduzido em condições anaeróbicas para o estado ferroso e

rapidamente re-oxidado na presença de ar para o estado férrico, o que sugere a existência de uma atividade oxidase (Osawa *et al.*, 1993).

A debrominação redutora de BrCCl_3 a radical triclorometil pela mioglobina faz com que o grupo prostético heme torne-se covalentemente ligado a ela, transformando a mioglobina de proteína de estoque de oxigênio à enzima oxidase (Figura 4). O ciclo de oxido-redução eventualmente leva à perda da atividade oxidase da mioglobina. A transformação de mioglobinas, e talvez de outras hemoproteínas, em oxidases pode ter importância toxicológica nas causas de injúria de tecidos resultante da exposição a vários xenobióticos e agentes endógenos, bem como aquelas injúrias causadas por inativação do processo de catálise (Osawa *et al.*, 1990).

A análise do espectro de absorção eletrônica dos estados oxidado e reduzido da mioglobina ligada ao grupo heme alterado sugere que os resíduos de histidina 64 e 97 encontram-se ligados ao ferro do grupo heme, e o resíduo 97 substitui o resíduo 93 de histidina proximal nativo. Essas modificações podem ser responsáveis pelo aumento da atividade redutora da mioglobina alterada (Osawa *et al.*, 1991) (Figura 5).

É conhecido que o peróxido de hidrogênio oxida e causa inativação de várias hemoproteínas, incluindo a mioglobina, hemoglobina, citocromo P-450, prostaglandina sintase, catalase, entre outras. O mecanismo pelo qual ocorre a inativação é desconhecido, porém sabe-se que ocorre destruição do grupo heme. Uma forma ativa transitória da mioglobina é formada quando o grupo heme é ligado covalente à proteína devido a uma reação realizada em baixa concentração de peróxido de hidrogênio (*Op. cit.*).

A alteração da mioglobina para uma enzima que pode formar metabólitos tóxicos de oxigênio apresenta importância patológica, especialmente em relação aos possíveis danos causados por isquemia e reperfusão no tecido cardíaco, onde a mioglobina está presente em grande quantidade e o peróxido de hidrogênio é formado (Osawa *et al.*, 1991).

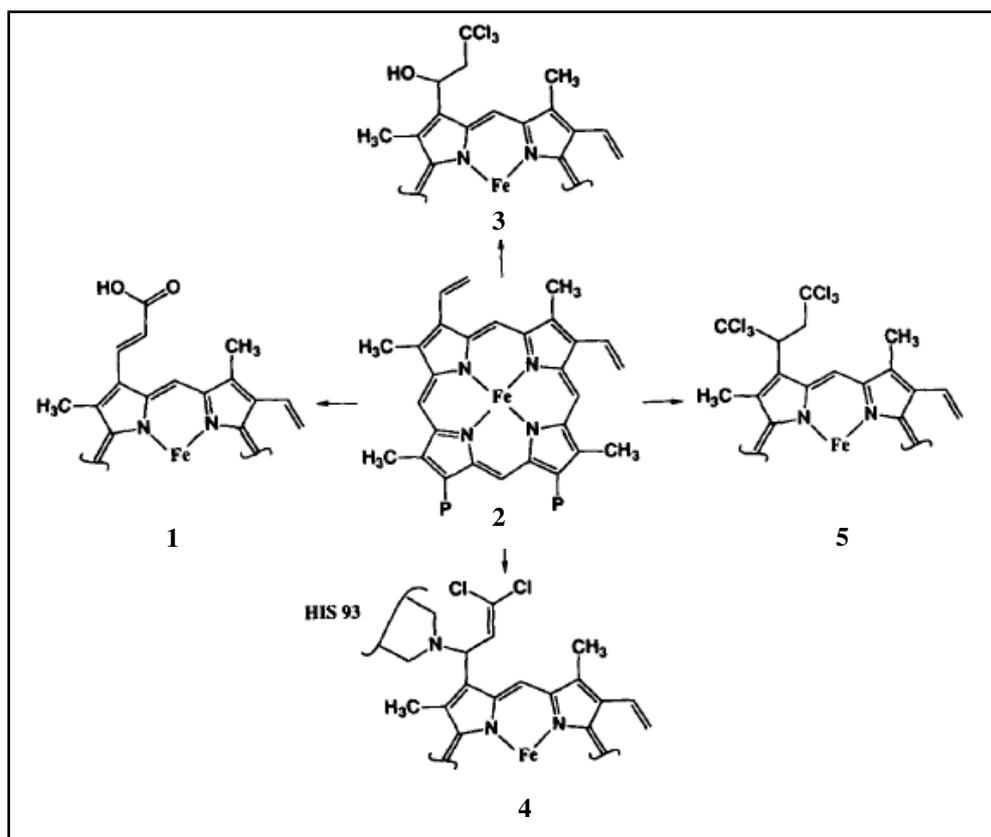


Figura 4. Adutos de heme formados após o tratamento com BrCCl_3 . 1, 3, 4 e 5: adutos de heme. Apenas a estrutura 4 é capaz de se ligar à mioglobina e conferir atividade. P: Grupo propionil. Fonte: Osawa *et al.*, 1993.

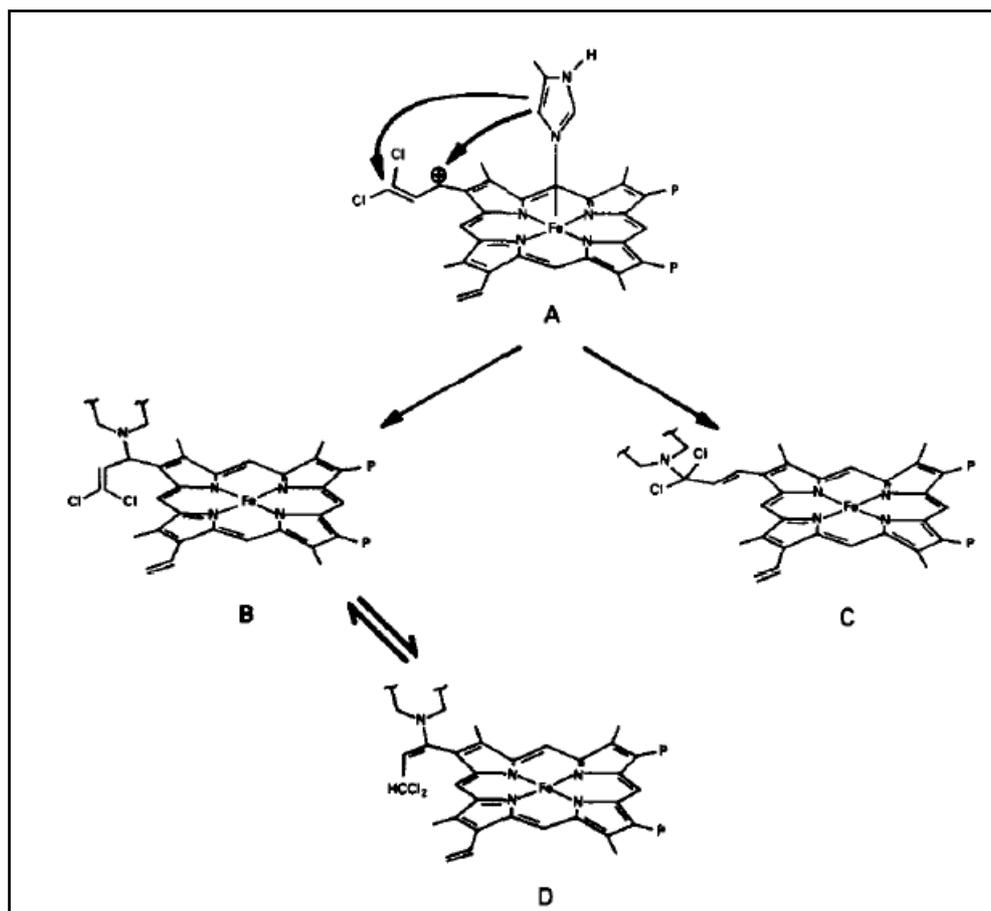


Figura 5. Mecanismo proposto para a ligação da histidina ao aduto de heme tratado com BrCCl_3 . B e C: possíveis ligações formadas. D: forma tautomérica de B. Fonte: Osawa *et al.*, 1991.

Acredita-se que o aminoácido modificado e ligado covalentemente ao grupo heme após a reação com peróxido de hidrogênio em baixa concentração seja um resíduo de tirosina (Catalano *et al.*, 1989), entretanto existem evidências de que a modificação de histidinas possa existir (Rice *et al.*, 1983) (Figura 6).

Em 1989, Catalano e colaboradores descreveram que a reação da mioglobina de coração de cavalo com peróxido de hidrogênio oxida o átomo de ferro para o estado ferril (Fe (IV)=O) produzindo um radical de proteína que é rapidamente dissipado por meio de um mecanismo não bem elucidado. A reação resulta em uma ligação covalente entre a mioglobina e seu grupo prostético alterado, sendo o cromóforo do grupo prostético ligado covalentemente à mioglobina, muito similar ao do grupo heme não alterado. A análise de aminoácidos, o sequenciamento amino-terminal e a espectrometria de massas sugerem que o grupo heme seja ligado à proteína por meio de um resíduo de tirosina. O sítio de ligação no grupo heme alterado ainda não está bem determinado, mas sabe-se que o seu grupo vinil não é essencial para reação. Os resultados mais consistentes apontam que a ligação covalente ocorre entre o resíduo de tirosina 103 e um meso carbono do grupo heme (Figura 7).

Atualmente é bem aceito que a mioglobina expressa atividade catalítica, a qual é importante para suas funções. Porém, sabe-se que algumas dessas funções, sejam elas inerentes ou adquiridas após a reação com algum agente interno ou externo ao organismo, podem ser parcialmente responsáveis pelo surgimento de patofisiologias, o que faz com que a mioglobina se torne um objeto importante de estudo (Wilson & Reeder, 2008).

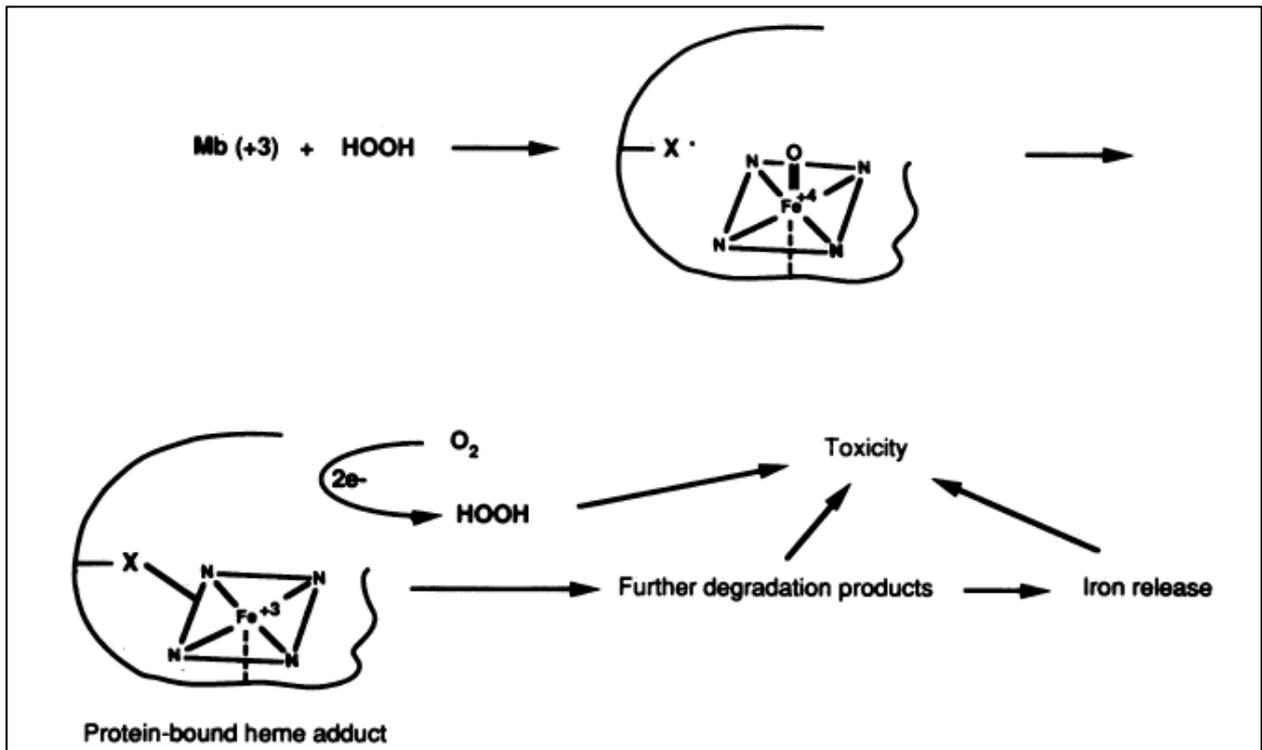


Figura 6. Mecanismo proposto para a ligação do aduto de heme tratado com H₂O₂ à mioglobina. X: aminoácido. Fonte: Osawa *et al.*, 1991.

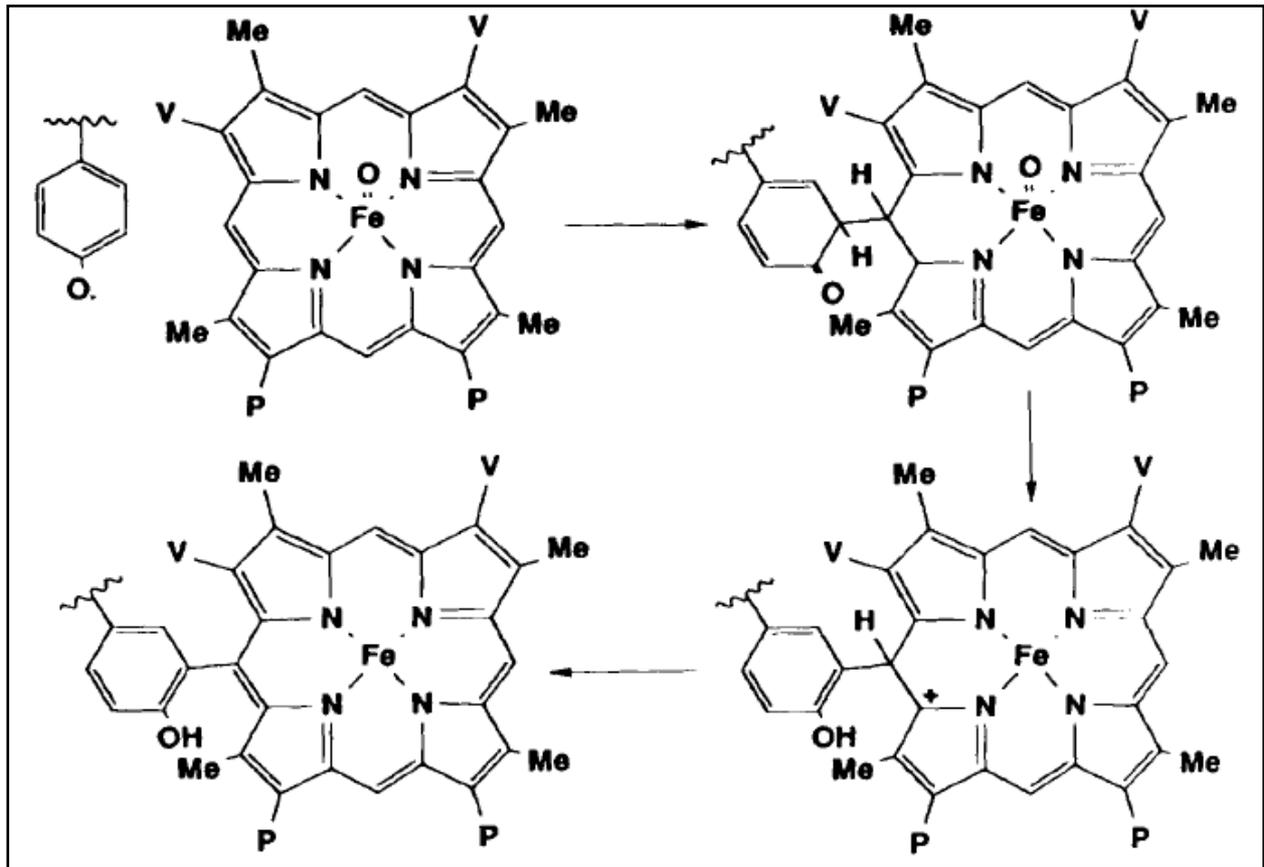


Figura 7. Mecanismo proposto para a ligação do resíduo de tirosina 103 ao grupo heme, após o tratamento com H₂O₂. Fonte: Catalano *et al.*, 1989.

JUSTIFICATIVA & RELEVÂNCIA



2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As mioglobinas são proteínas pertencentes a uma superfamília ancestral de globinas ligadas ao grupo heme que podem ser encontradas em mamíferos, moluscos, anelídeos e artrópodes. Os membros dessa superfamília dividem características estruturais e espectrais comuns, além de características funcionais tais como habilidade de ligação a O₂, CO e NO ao átomo de ferro do grupo heme. Essas propriedades são exploradas *in vitro* por estar envolvidas com uma série de funções bioquímicas e fisiológicas (Wilson & Reeder, 2008).

As funções mais conhecidas das mioglobinas incluem o transporte e estoque de oxigênio molecular e seu importante papel no metabolismo do NO. As funções dessas proteínas em invertebrados são geralmente mais diversas, como o tamponamento de oxigênio e funções enzimáticas no organismo (Trandafir *et al.*, 2007).

De fato, das funções conferidas às mioglobinas, algumas já estão bem descritas outras, no entanto, necessitam de maiores estudos. Deste modo, o presente trabalho se propôs a estudar algumas funções já descritas para essas proteínas, as quais não estão bem elucidadas, como a atividade de oxidase que possui relação com algumas patologias humanas causadas por xenobióticos. A atividade oxidase foi comparada entre mioglobinas que possuem como resíduo distal (E7), uma histidina (mioglobina de coração de cavalo e de baleia), a qual é bastante conservada em vertebrados, e mioglobinas que possuem uma glutamina nesta posição (mioglobina de moluscos do gênero *Biomphalaria*), a qual também pode ser observada em vertebrados, como elefantes (Tada *et al.*, 1998).

Tal análise pode contribuir para estudos futuros que visam o esclarecimento do mecanismo envolvido no surgimento da atividade enzimática e/ou de outras atividades biológicas da mioglobina no organismo. Deste modo, foi proposto o estudo de características bioquímicas intrínsecas das mioglobinas nativas de moluscos do gênero *Biomphalaria*, que são mioglobinas nas quais a sequência primária carece de resíduos de aminoácidos considerados

essenciais para a aquisição de atividades não totalmente esclarecidas, e compará-las com mioglobinas consideradas padrão para estudos nesse âmbito por meio de técnicas espectroscópicas, cromatográficas, bioinformática e espectrometria de massas.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo geral a caracterização bioquímica de mioglobinas nativas de moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, bem como a subclonagem da região de DNA codificadora das mioglobinas radulares pertencentes às duas primeiras espécies. A obtenção de proteínas recombinantes possibilitou a análise de uma possível atividade enzimática (atividade oxidase), a qual, em humanos, pode estar relacionada a algumas patologias.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Parte I: Análise das mioglobinas nativas de *Biomphalaria*

Parte I A: Mioglobinas radulares

- Purificação de mioglobinas nativas da musculatura radular (bulbo) de moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*;
- Determinação do ponto isoelétrico experimental dessas mioglobinas nativas;
- Obtenção da taxa de auto-oxidação das mioglobinas radulares de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e do conteúdo de mioglobina por massa de tecido analisado.

Parte I B: Mioglobinas estomacais

- Purificação de mioglobinas nativas da musculatura estomacal de moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila*;
- Determinação de massa molecular experimental das mioglobinas estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*;

- Determinação do ponto isoelétrico experimental das mioglobinas estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*;
- Sequenciamento amino-terminal das mioglobinas estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*;
- Obtenção da taxa de auto-oxidação das mioglobinas estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e do conteúdo de mioglobina por massa de tecido analisado.

Parte II: Análise das mioglobinas radulares recombinantes (rMioglobinas) de *Biomphalaria*

Parte IIA: Obtenção das mioglobinas radulares recombinantes

- Subclonagem dos cDNAs das mioglobinas radulares de *B. glabrata* e *B. tenagophila* em um vetor de expressão em procariotos;
- Transformação de bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes;
- Estabelecimento de um protocolo de expressão e purificação satisfatórios para as rMioglobinas;
- Ligação do grupo prostético (hemina) nas rMioglobinas.

Parte IIB: Análise da atividade oxidase nas rMioglobinas

- Determinação de um protocolo para transformação das rMioglobinas em enzimas oxidases;
- Análise da suposta atividade oxidase das rMioglobinas por espectrofotometria;
- Obtenção do modelo de estrutura tridimensional das mioglobinas radulares, por modelagem molecular, para fornecer suporte à análise do mecanismo químico que leva ao surgimento da atividade oxidase.

ANIMAIS, MATERIAL &
MÉTODOS



4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Moluscos gastrópodes das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* foram utilizados para a obtenção de mioglobina nativa, a qual representa a proteína alvo deste trabalho. Os moluscos, cujos indivíduos matrizes foram gentilmente cedidos e identificados pelo Dr. Wladimir Lobato Paraense do Departamento de Malacologia-Fundação Instituto Oswaldo Cruz/R.J., foram criados em nosso próprio laboratório, em aquários com suprimento de alimento e carbonato de cálcio adequados.

Esse trabalho foi dividido em três partes: estudo das mioglobinas nativas de *Biomphalaria*, estudo das mioglobinas recombinantes de *Biomphalaria* e análise *in silico* das mioglobinas radulares de *Biomphalaria*.

4.2. PARTE I: ESTUDO DAS MIOGLOBINAS NATIVAS DE *Biomphalaria*

4.2.1. Purificação das mioglobinas nativas de moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*

Este projeto constitui uma extensão da pesquisa realizada durante o trabalho de mestrado, desse modo, alguns dados relativos às mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* em questão foram obtidos nesse período, como por exemplo, o protocolo de purificação das mioglobinas nativas.

Durante a dissecação dos animais, para a retirada da musculatura radular, local onde foi descrita a presença de mioglobina em *Biomphalaria* (Dewilde *et al.*, 1998), foi observada uma coloração vermelho-castanho no estômago triturador dos animais indicando, possivelmente, a presença de uma hemoproteína, que poderia ser uma mioglobina.

Deste modo, foram retirados, além da musculatura radular, os estômagos (musculatura estomacal) de indivíduos das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, tomando os cuidados necessários para evitar a contaminação deste órgão por hemolinfa ou musculatura radular. Não foi possível a obtenção de estômagos dos exemplares de *B. straminea* devido à indisponibilidade de animais.

O extrato bruto da musculatura radular e da musculatura estomacal foram preparados conforme Dewilde e colaboradores (1998), e posteriormente centrifugados durante 10 min a 16.000 x g para obtenção e coleta do sobrenadante, o qual foi utilizado no processo cromatográfico. O mesmo protocolo de purificação estabelecido para as mioglobinas da musculatura radular foi utilizado para o extrato bruto estomacal. O processo consistiu em três etapas de cromatografia líquida:

4.2.1.1. Filtração molecular

A cromatografia de filtração molecular foi realizada em aparelho de FPLC (Pharmacia), utilizando coluna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia). O tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M foi utilizado como fase móvel; frações de 1,0 mL foram coletadas com fluxo de 30 mL/h. As frações com leitura de densidade óptica (O.D.) em 405 nm (Banda Soret- absorção do grupo heme) foram dialisadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5, em membrana com poros de 1.000 Da (Spectrum), durante 12 h a 4°C sob agitação lenta.

4.2.1.2. Troca iônica

As frações dialisadas provenientes da filtração molecular foram submetidas à cromatografia de troca iônica utilizando coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) acoplada em um aparelho de FPLC (Pharmacia). Como tampão A foi utilizado Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 e como tampão B, Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo NaCl 1 M. Frações de 1,5 mL foram coletadas em

um fluxo de 60 mL/h e gradiente linear de 0 a 100% em 20 min. Novamente, as frações com leitura de O.D. a 405 nm foram coletadas para dar prosseguimento ao processo de purificação.

4.2.1.3. Fase reversa

Esta etapa de cromatografia foi realizada em aparelho de HPLC (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (Shim-pack CLC-ODS 4,6x250 mm). A fase móvel foi composta de soluções A (Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% v/v) e B (Acetonitrila (ACN) 80% v/v contendo TFA 0,1% v/v). Foi utilizado um fluxo foi de 60 mL/h e gradiente linear de 0 a 100% em 30 min.

Alíquotas dos picos, com leitura de O.D. em 405, obtidos nas três etapas cromatográficas foram analisadas por SDS-PAGE.

4.2.2. SDS-PAGE

O material purificado e os extratos brutos foram analisados por SDS-PAGE, sendo o gel de concentração 5% e o de separação 12,5%, e corado pelo método da prata conforme Laemmli e colaboradores (1970). Alguns géis foram corados por solução de azul de Coomassie.

Para a aplicação no gel as amostras foram misturadas a igual volume de tampão de amostra 2X, não redutor, preparado com azul de bromofenol 0,2% p/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 10% v/v, e fervidas por 3 min.

A eletroforese foi executada a 120 V durante 4 h e em todas as corridas foi incluído um padrão de massa molecular para proteínas (Bench Marck protein ladder, Invitrogen ou Low weight marker, Sigma).

4.2.3. Coloração de proteínas por solução de azul de Coomassie

Após a eletroforese, alguns géis foram corados com uma solução corante contendo azul de Coomassie R-250 a 0,075% p/v, etanol a 50% v/v e ácido acético a 10% v/v em água destilada. Após, foi feita a descoloração do gel utilizando-se uma solução descorante contendo etanol a 25% v/v e ácido acético a 10% v/v em água destilada.

4.2.4. Obtenção do ponto isoelétrico (pI) experimental das mioglobinas nativas

O ponto isoelétrico foi determinado pela técnica de cromatofocalização, que separa proteínas por cromatografia líquida em coluna de acordo com o valor de pI (Sluyterman & Wijdenes, 1978). Neste experimento foi utilizada uma coluna Mono P 5/5 (Amersham Pharmacia) acoplada a um aparelho de FPLC. Um gradiente de pH na faixa de 9,0 a 6,0 foi formado na coluna aplicando-se 1 mL de NaOH 5 M e em seguida utilizando o tampão Dietanolamina-HCl 25 mM, pH 9,5, chamado de *Start buffer*, conforme instruções do fabricante.

Aproximadamente 100-200 µg da mioglobina purificada, na forma apo, obtida a partir da musculatura radular de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, e obtida a partir da musculatura estomacal de *B. glabrata*, e *B. tenagophila* foram dialisadas em *Start buffer*. Cada uma das proteínas foi aplicada separadamente na coluna cromatográfica, sendo a fase móvel constituída pelo tampão *Polybuffer 96* pH 6,0 (Amersham Pharmacia). O pH no qual as proteínas foram eluídas foi medido pelo potenciômetro, previamente calibrado, acoplado ao FPLC. Posteriormente o valor de pH foi confirmado em um potenciômetro isolado. O pH encontrado na eluição é pI da proteína. Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.2.5. Obtenção da massa molecular experimental das proteínas purificadas a partir da musculatura estomacal

As massas moleculares das mioglobinas nativas da musculatura radular das três espécies de *Biomphalaria* estudadas foram determinadas durante o trabalho de mestrado. Desse modo,

somente as proteínas do estômago foram analisadas neste experimento. A massa das proteínas de interesse foi determinada por análise ESI/Q-TOF MS utilizando o espectrômetro de massa Q-ToF micro TM (Micromass, Manchester, UK) do Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas-ICB/UFMG, equipado com uma fonte operando no modo positivo. A voltagem capilar e de cone foram 2500 kV e 40 V, respectivamente. As calibrações do espectrômetro de massa foram feitas com iodeto de sódio na faixa de 200-2300 m/z. As amostras foram diluídas em solução de ACN 50% v/v contendo ácido fórmico 0,2% v/v e aplicadas no aparelho com fluxo de 5-10 µL/min. Os resultados foram analisados no programa Mass Lynx 4.0.

4.2.6. Sequenciamento de aminoácidos por degradação de Edman

A tentativa de sequenciamento de aminoácidos das mioglobinas purificadas do extrato estomacal de *B. tenagophila* e de *B. glabrata* foi realizado em aparelho automático PPSQ-21A Protein sequence (Shimadzu) do Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas-ICB/UFMG.

As proteínas foram dosadas de acordo com a metodologia descrita por Lowry e colaboradores (1951), e 20 nmol foram diretamente submetidos, em fase líquida (TFA 0,1% v/v), ao sequenciamento. Neste processo apenas a forma apo das proteínas foi utilizada.

4.2.7. Medida da taxa de auto-oxidação das mioglobinas nativas

A análise da auto-oxidação das oximioglobinas foi realizada conforme descrito por Dosi e colaboradores (2006), com algumas modificações. Tal análise foi feita pelo monitoramento das mudanças no espectro de absorção na faixa de comprimento de onda de 400-750 nm, medidas em intervalos de tempo de 15 min, durante um período de 5 h a 25°C. Os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro UV-160A UV-Visible recording spectrophotometer (Shimadzu) equipado com célula com temperatura controlada.

A oximioglobina foi preparada, no momento da análise, pela redução da proteína pura em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4, contendo EDTA 50 µM e hidrossulfito de sódio 1

mg/mL. A amostra foi imediatamente levada ao espectrofotômetro e as medidas foram iniciadas. A taxa de auto-oxidação foi calculada por meio da diminuição gradativa dos valores de absorvância em 540 ou 575 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.8. Medida da quantidade de mioglobina na musculatura radular e estomacal

A medida da quantidade de mioglobina por unidade de tecido muscular radular e estomacal de *Biomphalaria* foi calculada de acordo com Krzywicki (1982), com algumas modificações. Músculos radulares e estomacais foram cuidadosamente dissecados, limpos e secos em um concentrador à vacuo. Os mesmos foram pesados e a mesma massa de tecido para cada órgão e espécie de *Biomphalaria* foi macerada em um mesmo volume (para os tecidos e para as espécies de *Biomphalaria*) de solução de nitrito de sódio 0,8% e cianeto de potássio 50 mM para conversão e manutenção das mioglobinas na forma de metamioglobinas. Em seguida, as amostras foram analisadas nos comprimentos de onda de 215, 280, 405 e 540 nm para calcular a quantidade de mioglobina por miligrama de tecido. Como padrão foi utilizada a mioglobina de coração de cavalo. Esse experimento foi realizado em triplicata.

4.3. PARTE II: ESTUDO DAS MIOGLOBINAS RECOMBINANTES DE *Biomphalaria*

4.3.1. Subclonagem dos cDNAs das mioglobinas da musculatura radular de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila* em vetor de expressão em procariotos

4.3.1.1. Extração e digestão do DNA plasmidial

Os cDNAs das mioglobinas da musculatura radular de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila* foram amplificados por PCR e clonados no vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) entre os sítios para as endonucleases de restrição *Nde* I e *Bam* HI ou *Bgl* II, que foram por sua vez inseridos em iniciadores específicos utilizados para a produção dos cDNAs.

Clones bacterianos, cujos plasmídeos tinham sido analisados mediante as mesmas enzimas de restrição para verificar a presença do cDNA das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, foram escolhidos para a subclonagem no vetor de expressão em procariotos pET16b (Novagen) (Figura 8). Os clones escolhidos foram o 1424(12)-pCR 2.1 de *B. glabrata* e 1433(5)-pCR 2.1 de *B. tenagophila*. Os clones contendo os cDNAs e um clone contendo o vetor pET16b íntegro foram crescidos em meio de cultura líquido LB (peptona bacteriológica 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) contendo ampicilina 100 µg/mL, a 37°C sob agitação de 180 rpm, durante aproximadamente 13 h.

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando um protocolo de minipreparação por lise alcalina de fabricação própria conforme Sambrook e colaboradores (1989), com algumas modificações. A concentração do DNA foi estimada pela leitura de O.D. a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação das leituras de O.D. a 260 e 280 nm. A qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Os plasmídeos resultantes da subclonagem do cDNA de cada espécie, assim como o vetor de expressão pET16b foram digeridos com as devidas enzimas de restrição (Invitrogen; Biolabs

ou GE). Aproximadamente 2 µg do plasmídeo contendo o cDNA da mioglobina (inserto) e aproximadamente 1 µg do vetor pET16b foram digeridos em reação dupla (as duas endonucleases na mesma reação). Na reação foram utilizadas 10 unidades de cada enzima e o tampão ótimo para a ação das mesmas conforme recomendações do fabricante, sendo a mistura incubada a 37°C durante 4 h. Posteriormente, a reação foi inativada a 75°C por 20 min.

Após, o produto de digestão foi aplicado em gel de agarose 1% e a banda referente ao cDNA de mioglobina, de aproximadamente 500 pb, foi cortada e extraída do gel utilizando o *kit QiA quick gel extration* (QiAgen) ou o *kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega), conforme as recomendações do fabricante. O mesmo procedimento de extração a partir do gel foi feito para o vetor pET16b.

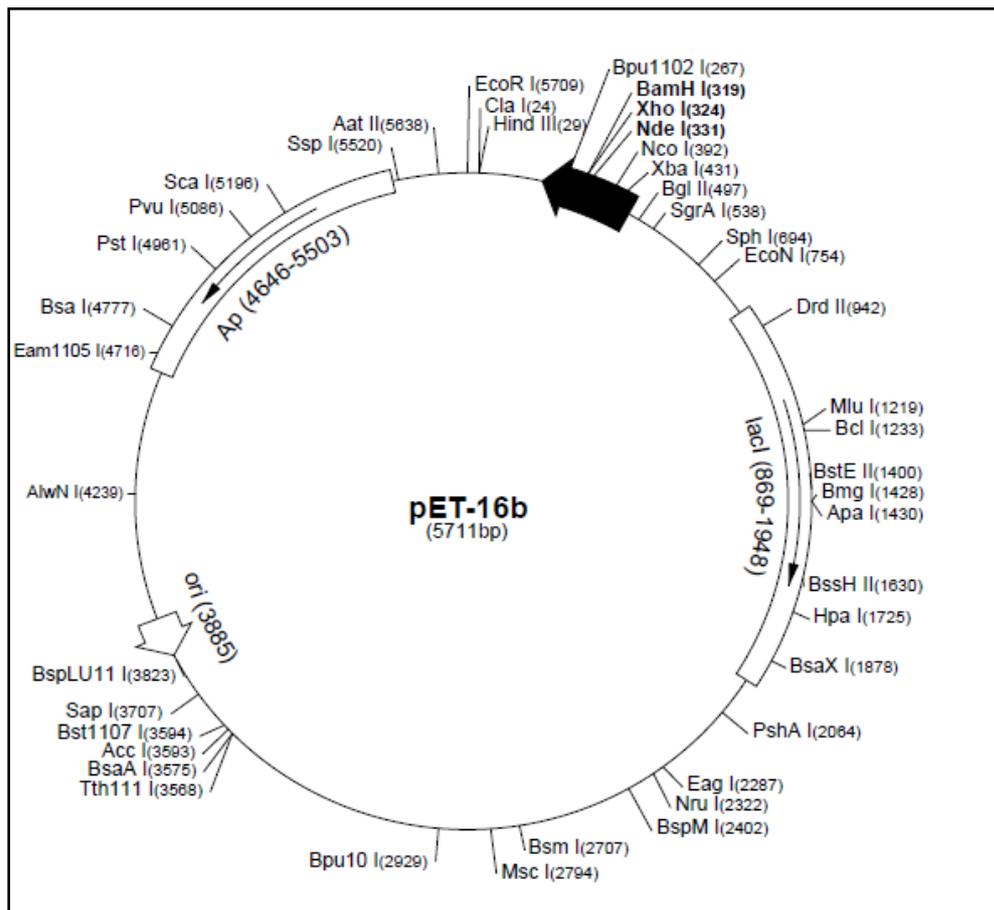


Figura 8. Esquema do vetor de expressão em procariontes pET16b.

4.3.1.2. Reação de ligação e transformação bacteriana

Os DNAs extraídos do gel (inserto e vetor) foram então submetidos a uma nova eletroforese em gel de agarose 1% para quantificação e estabelecimento da proporção para a reação de ligação. A reação de ligação do cDNA de mioglobina (inserto) no vetor foi feita na proporção de 3:1 utilizando 5 unidades da enzima T4 DNA ligase (Sigma) e o tampão ótimo para sua ação conforme especificações do fabricante. A duração da reação foi de 4 h a 22°C.

O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes BL21 (DE3) *star* por meio do protocolo de choque térmico conforme Sambrook e colaboradores (1989), com algumas modificações. O produto da ligação (2 µL) foi acrescentado às bactérias (50 µL), em seguida foi incubado em gelo durante 30 min, e imediatamente após, colocado à temperatura de 42°C por 30 s.

O material foi incubado novamente em gelo por 1,5 min e foram acrescentados 950 µL de meio LB líquido a temperatura ambiente. A cultura foi incubada a 37°C durante 1 h em meio sem antibiótico, sob agitação de aproximadamente 150 rpm.

Finalizada a incubação o material foi centrifugado a 1.400 x g por 5 min em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 100 µL de meio LB líquido e as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (peptona bacteriológica 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar bacteriológico 1,5%) contendo ampicilina 100 µg/mL, onde foram incubadas durante 16 h a 37°C.

4.3.1.3. Preparo de células quimiocompetentes

Bactérias *E. coli* da linhagem BL 21 (DE3) *star* foram utilizadas no preparo de células quimiocompetentes. Inicialmente, foi feito um pré-inóculo das bactérias em meio LB líquido, este foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação de aproximadamente 150 rpm. Após o crescimento, o pré-inóculo foi utilizado no preparo de um inóculo de 1:20 em meio LB líquido,

sendo o crescimento monitorado em espectrofotômetro (UV-160A UV-visible recording spectrophotometer, Shimadzu) até a cultura alcançar uma leitura de O.D. de 0,4 em comprimento de onda de 600 nm. Alcançada a leitura, a cultura foi centrifugada a 2.200 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1/2 volume (volume inicial de cultura) de solução de CaCl₂ 50 mM, estéril e gelada, e incubadas no gelo por 20 min.

Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 2.200 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1/10 do volume (volume inicial de cultura) de solução de CaCl₂ 50 mM, estéril e gelada. As células foram incubadas no gelo por 2 h. Posteriormente, foi acrescentado glicerol estéril para uma porcentagem de 15% v/v, e alíquotas de 50 µL das células foram estocadas a -80° C.

Antes de proceder ao uso, as células foram testadas quanto a uma possível contaminação com plasmídeos contendo o gene de resistência ao antibiótico (ampicilina) presente no vetor de clonagem.

4.3.1.4. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose 1% foi preparado com tampão TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M), e foi adicionado brometo de etídio para uma concentração final de 0,5 µg/mL. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi o mesmo utilizado no preparo do gel.

Todas as amostras de DNA analisadas por eletroforese foram misturadas com o tampão de amostras para DNA 6X preparado com azul de bromofenol 0,3% p/v, xilenocianol 0,3% p/v, glicerol 50% v/v e EDTA 1,0 mM, pH 8,0. As eletroforeses foram executadas a 70 ou 100 V. Em todas as eletroforeses foi incluído um padrão de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.3.1.5. Análise (*screening*) dos clones

As colônias obtidas da transformação foram analisadas quanto à presença do inserto por PCR de colônia ou por digestão do DNA plasmidial dos supostos clones com endonucleases de restrição. A PCR de colônia foi feita com os iniciadores universais T7 *promoter* e T7 *terminator* (Novagen), conforme a Tabela 1, e as amplificações foram realizadas em termociclador M.J. Research, Inc. Mod. PTC-100. O protocolo de reação e o programa utilizados na amplificação estão listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Os clones positivos foram crescidos em meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL e estocados em glicerol 15% a -80 °C.

| INICIADOR | SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA |
|----------------------|----------------------------|
| <i>T7 promoter</i> | 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' |
| <i>T7 terminator</i> | 5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3' |

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos iniciadores universais *T7 promoter* e *T7 terminator*.

| REAGENTES | PROTOCOLO |
|---------------------------------|-----------|
| DNA molde | Cultura |
| Tampão 10X (Cenbiot) | 1X |
| Mix dNTP | 0,2 mM |
| <i>T7 promoter</i> | 0,25 µM |
| <i>T7 terminator</i> | 0,25 µM |
| MgCl ₂ (Cenbiot) | 1,5 mM |
| <i>Taq</i> polimerase (Cenbiot) | 1 U |

Tabela 2. Reagentes e protocolo de reação utilizados na PCR de colônia para análise dos supostos clones positivos.

| ETAPAS | PROGRAMA |
|----------------------|----------------|
| 1. <i>Hot start</i> | 95°C - 3 min |
| 2. Desnaturação | 94°C - 30 s |
| 3. Anelamento | 55°C - 1min |
| 4. Extensão | 72°C - 1.5 min |
| 5. Extensão final | 72°C - 10 min |
| 6. Repetição (2 a 4) | 30 vezes |

Tabela 3. Programa utilizado para a PCR de colônia.

4.3.2. Teste de indução

Para testar a expressão dos clones, uma colônia de cada clone foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL. A cultura cresceu durante 12h a 37°C com agitação de 180 rpm. A partir deste pré-inóculo foi feito um inóculo de 1:100 em 10 mL de LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL, o crescimento foi monitorado até a cultura atingir uma leitura de O.D. de 0,6 a 600 nm. Neste ponto uma alíquota de 1 mL foi retirada, foi feita a leitura de O.D., em seguida a alíquota foi centrifugada e o *pellet* foi estocado a -20°C. Esta alíquota é o controle de expressão basal da cultura.

Em seguida, 0,05 mM de IPTG foi acrescentado à cultura e esta foi novamente incubada a 37°C, 180 rpm. De 1 em 1 h foi coletada uma alíquota da cultura até a cultura alcançar 4h de indução. Todas as alíquotas tiveram sua O.D. estimada para acertar o número de células em cada uma e posteriormente elas foram centrifugadas e os *pellets* foram lisados com SDS 5% em PBS para análise por SDS-PAGE 12,5%. O gel foi corado por solução de azul de Coomassie.

4.3.3. Teste de solubilidade das mioglobinas recombinantes (rMioglobinas)

Os corpos de inclusão são agregados protéicos, comumente formados por proteínas recombinantes. Para verificar se as mioglobinas recombinantes, expressas pelas bactérias, eram solúveis (presente no sobrenadante após a lise bacteriana) foi feito um pré-inóculo dos clones em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL. A cultura cresceu durante 12 h a 37°C com agitação de 180 rpm. A partir deste pré-inóculo foi feito um inóculo de 1:100 em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL. O crescimento foi monitorado até a cultura atingir uma leitura de O.D 600 nm igual a 0,6 e em seguida foram acrescentados 0,05 mM de IPTG. A cultura foi novamente incubada a 37°C a 180 rpm durante 3 h.

Um mL de cultura de cada clone foi aliqotado e centrifugado por 1 min a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* bacteriano foi ressuspendido em 100 µL de tampão Tris-

HCl 150 mM pH 9,0 contendo lisozima 100 µg/mL, incubado a 37°C por 20 min e em seguida sonificado em ultrassom de ponta (Branson Sonifier 450) por 20 s, no gelo.

O sonificado foi centrifugado por 2 min a 12.000 x g, sobrenadante e *pellet* foram separados e analisados por SDS-PAGE 12,5% corado por azul de Coomassie.

4.3.4. Expressão das rMioglobinas

A expressão das rMioglobinas foi realizada em condições experimentais que propiciaram a formação de corpos de inclusão: agregados protéicos insolúveis (agitação vigorosa e temperatura ideal de expressão em *E. coli*), e assim obter-se uma maior quantidade de proteínas recombinantes. Os inóculos foram feitos a partir de um pré-inóculo crescidos no dia anterior à expressão, nas mesmas condições citadas no item 4.2.1.1.

O inóculo foi feito em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina. Após a cultura atingir a O.D. a 600 nm de 0,6 foi acrescentada à mesma mais ampicilina (100 µg/mL). Finalmente o IPTG foi acrescentado para a concentração final de 0,05 mM, e a cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm.

4.3.5. Lise bacteriana

Após a expressão das mioglobinas, a cultura foi centrifugada durante 20 min, 16.200 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano foi ressuscitado em PBS pH 7,4 (50 mL/L de cultura) contendo os inibidores de protease: PMSF 200 µM, EDTA 5 mM, Pepstatina A 1 µM e Iodoacetamida 200 µM, e novamente centrifugado nas mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado.

O *pellet* bacteriano foi ressuscitado novamente em PBS pH 7,4 (20 mL/L de cultura) contendo os inibidores de protease. A lise foi feita por sonicação em ultrassom de ponta, utilizando amplitude de 20%, em banho de gelo. Foram realizados quatro ciclos de sonicação,

cada um com 4,5 min de duração, sendo 30 s de sonicação e 30 s de descanso. As centrifugações entre as sonicações foram feitas a 4°C, 16.200 x g durante 10 min. A lise das bactérias foi confirmada pelo teste de Gram. No final, foi obtido um *pellet* branco, composto principalmente por corpos de inclusão. Alíquotas dos sobrenadantes foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% para verificação da possível perda da proteína de interesse.

4.3.6. Solubilização dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão foram solubilizados em uma solução de N-lauril sarcosil (sal de sódio) 1%, na proporção de 20 mL/L de cultura. Uma alíquota do material solubilizado foi analisada por SDS-PAGE 12,5% corado por azul de Coomassie.

4.3.7. Purificação das rMioglobinas

A purificação das rMioglobinas foi realizada em duas etapas de cromatografia líquida:

4.3.7.1. Cromatografia de troca-iônica

A primeira etapa de purificação foi uma troca-catiônica utilizando uma coluna Resource™ Q 16x30 mm (Pharmacia/Biotech) acoplada a um sistema de FPLC. A fase móvel foi constituída de tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 (tampão A) e de tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 contendo NaCl 1 M (tampão B). O pico referente à rMioglobina foi coletado no gelo a um fluxo de 60 mL/h. Foi utilizado um gradiente linear de 0 a 100% em 20 min. Após a coleta da proteína de interesse, foram acrescentados os inibidores PMSF 200 µM, EDTA 5 mM, Pespstatina A 1 µM e Iodoacetamida 200 µM.

4.3.7.2. Cromatografia de afinidade

O material eluído da troca-iônica foi submentido a uma cromatografia por afinidade utilizando uma coluna HisTrap™ FF 0,7x2,5 cm (GE Healthcare Life Sciences). A fase móvel

foi composta por tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,5 (tampão A) e de tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4 contendo Imidazol 0,5 M (tampão B). O pico referente à rMioglobina foi coletado no gelo a um fluxo de 60 mL/h. Nessa etapa de cromatografia foram testadas eluições com e sem a formação de um gradiente de concentração de imidazol.

4.3.8. Análise da identidade das rMioglobinas por *Western blot*

4.3.8.1 Eletrotransferência

A eletrotransferência das rMioglobinas (5µg) e do extrato bruto das bactérias recombinantes para a membrana de nitrocelulose foi realizada conforme a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979).

A membrana de nitrocelulose foi lavada em água destilada durante 20 min. Os papéis de filtro (poros de 0,2 µm, Sigma) e as esponjas de suporte foram imersas durante 20 min em tampão contendo metanol 20%, Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3. Este tampão foi utilizado no processo de eletrotransferência, o qual foi realizado a 4°C por 14 h a 24 V em um sistema Mini protean II cell (Biorad).

4.3.8.2. Immunoblotting

Para controle da eletrotransferência, a porção da membrana de nitrocelulose contendo o padrão de massa molecular foi cortada e corada com uma solução de Ponceau-S (Merck) 0,2% e ácido acético 1%.

Em seguida, a porção da membrana contendo as proteínas de interesse foi lavada em água destilada por 5 min e logo após foi lavada com PBS-Tween 20 a 0,05% durante 20 min. Após as lavagens, a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS-Tween 20 0,05% e BSA 1%, durante 1 h. Em seguida, a membrana foi lavada novamente em PBS-Tween 20 a 0,05%. A partir deste ponto foi utilizado o *kit* comercial HisDetectorTM (KPL) para detecção de proteínas

contendo resíduos de histidina em sequência (cauda de histidina), conforme as recomendações do fabricante.

4.3.9. Análise da pureza das rMioglobinas por SDS-PAGE e espectrometria de massas

A pureza das mioglobinas recombinantes foi confirmada por SDS-PAGE 12,5% corado pelo método da prata, e por espectrometria de massa utilizando o aparelho MALDI-TOF/TOF (Bruker) do Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas - ICB/UFMG.

As amostras foram misturadas em uma solução de matriz saturada *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid* (1:3 v/v), distribuídas em uma placa alvo do MALDI e deixadas secar a temperatura ambiente por 15 min. A massa média das proteínas foi adquirida em modo positivo linear, com calibração externa, utilizando o Padrão de calibração de proteínas II (Bruker Daltonics): Tripsinogênio $[M+ H]^+ = 23.982$ Da, Proteína A $[M+ H]^+ = 44.613$ Da, Albumina bovina $[M+ H]^+ = 66.431$ Da, Proteína A $[M+ 2H]^{2+} = 22.306$ Da, Albumina bovina $[M+ 2H]^{2+} = 33.216$ Da. O programa Flex Analysis (Bruker Daltonics) foi utilizado para a interpretação dos dados.

4.3.10. Troca de tampão das rMioglobinas

Durante o processo de purificação observou-se uma incompatibilidade das rMioglobinas com algumas técnicas e tampões utilizados, desse modo para atender à necessidade dos experimentos subsequentes os tampões adequados foram trocados por ultrafiltração, uma vez que foi observado, durante o processo experimental, que o processo de diálise causa a agregação das mioglobinas.

A ultrafiltração foi realizada em aparato Amicon modelo 8010 (Milipore), com membrana de PTGC (Sigma) com poros de 10.000 Da. A troca de tampão foi realizada no gelo, com agitação lenta, sendo a troca realizada com 3 a 4 volumes (da amostra inicial) do tampão necessário para o experimento subsequente.

4.3.10.1. Tampão utilizado para reação enzimática das rMioglobinas com Fator Xa

Para retirada da cauda de histidina da porção amino-terminal das rMioglobinas com o Fator Xa, o tampão utilizado foi Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM e CaCl₂ 2 mM.

4.3.10.2. Tampão utilizado para a ligação de hemina e transformação das rMioglobinas em oxidase utilizando CCl₄

Para a ligação de hemina às rMioglobinas e para a reação de transformação das mesmas em oxidase utilizando CCl₄ foi utilizado o tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4.

4.3.10.3. Tampão utilizado para a transformação das rMioglobinas em oxidase utilizando H₂O₂

Após a retirada da cauda de histina das rMioglobinas e da ligação de hemina, as proteínas foram colocadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,7 para proceder à reação de transformação dessas proteínas em oxidase utilizando H₂O₂.

4.3.11. Estimativa de concentração de proteínas

Para as reações a seguir a concentração das rMioglobinas foi estimada utilizando a equação abaixo descrita por Warburg & Christian (1941).

$$\text{mg/mL} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$$

A₂₈₀ - Absorvância em 280 nm

A₂₆₀ - Absorvância em 260 nm

4.3.12. Reação enzimática com Fator Xa

O Fator Xa (Sigma) foi ressuspendido em um tampão de estoque contendo HEPES 20 mM pH 8,0 NaCl 500 mM, CaCl₂ 2 mM e glicerol 50%, na concentração de 2,3 mg/mL. A reação de clivagem foi feita no tampão proveniente da cromatografia de afinidade (B) na proporção de massa de 1:25 Fator Xa: rMioglobina. A reação foi incubada a 25°C durante 6, 12, 24 e 36 h. Após, foi feita uma análise por SDS-PAGE 12,5% corado com azul de Coomassie.

Para a separação das rMioglobinas e do Fator Xa foi utilizada uma cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna Resource™ Q 16x30 mm (Pharmacia/Biotech) acoplada a um sistema de FPLC. A fase móvel foi constituída de tampão Fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4 (tampão A) e de tampão Fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 1,0 M (tampão B). O pico referente à rMioglobina foi coletado a um fluxo de 60 mL/h com gradiente linear de 0 a 100% em 20 min.

4.3.13. Ligação de hemina às rMioglobinas

Para obtenção de holomioglobinas recombinantes o grupo prostético hemina foi ligado às apomioglobinas. As apomioglobinas, em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4, foram incubadas com hemina na relação de massa molar de 1:1 (apomioglobina:hemina) no gelo por 2,5 h sob agitação lenta. A ligação do grupo prostético foi verificada pelo surgimento de leitura de absorvância a 405 nm.

4.3.14. Transformação das rMioglobinas em oxidases

Neste experimento foram utilizadas holomioglobinas recombinantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, e como controles as holomioglobinas comerciais de coração de cavalo e de baleia (Sigma).

4.3.14.1 Teste com CCl₄

Este experimento foi realizado utilizando-se um protocolo desenvolvido por Osawa *et al.* (1990), porém com algumas modificações. De acordo com esse pesquisador a atividade oxidase da mioglobina é proveniente da ligação covalente do grupo heme ao resíduo de histidina 93 (His 93).

A reação para transformação das mioglobinas em oxidase foi realizada em sistema anaeróbico, o qual foi obtido pela saturação com nitrogênio gasoso. As mioglobinas (150 μM) foram solubilizadas em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4. Posteriormente foi acrescentado hidrossulfito de sódio 300 μM para redução do grupo prostético. Em seguida foi acrescentado CCl₄ na relação molar de 0,14:10 (mioglobina:CCl₄), e a reação foi incubada por 2,5 h a temperatura ambiente, sob agitação lenta, para a formação dos adutos de heme. Após, foi acrescentado KCN (relação molar de 0,14:40 (mioglobina:KCN)) para estabilizar as mioglobinas na forma de metamioglobinas. O pH da reação foi diminuído para 2,0 pela adição de HCl para desligamento dos grupos prostéticos que não formaram o aduto capaz de se ligar covalentemente à mioglobina.

O isolamento da mioglobina-oxidase (mioglobina supostamente transformada) foi realizado por cromatografia de fase reversa utilizando uma coluna C8 Aquapore RP 300 250x4,6 mm acoplada a um cromatógrafo Akta explorer (Amersham Pharmacia Biotech). A fase móvel foi composta pelas soluções (A) TFA 0,1% e (B) ACN/Isopropanol 1:1. O gradiente linear de 0-100% foi realizado em 30 min. A cromatografia foi monitorada a 280 e 405 nm para coleta do material de interesse, o qual deveria apresentar absorção simultânea nos dois comprimentos de onda citados.

4.3.14.2. Teste com H₂O₂

Para este experimento foi utilizado um protocolo desenvolvido a partir dos protocolos propostos por Rice *et al.* (1983), Catalano *et al.* (1989), e Osawa *et al.* (1991).

A reação para transformação das mioglobinas em oxidase utilizando H₂O₂ foi realizada em sistema anaeróbico. A mistura de mioglobina (150 µM) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,7 foi saturada com nitrogênio gasoso, para retirada do ar, e em seguida foi acrescentado H₂O₂ 330 µM. A reação foi incubada por 1 h, em repouso, a temperatura ambiente.

4.3.15. Análise da atividade oxidase das rMioglobinas de *Biomphalaria* e das mioglobinas comerciais de cavalo e baleia

A análise da atividade oxidase das mioglobinas foi realizada em espectrofotômetro UV-160A UV-Visible recording spectrophotometer (Shimadzu) equipado com célula com temperatura controlada. Todas as reações foram realizadas a 25°C, sendo o volume de reação igual a 1 mL. As mioglobinas testadas foram preparadas e imediatamente analisadas quanto à atividade oxidase. A presença de atividade oxidase foi detectada pela diminuição da absorvância a 340 nm, absorção da molécula redutora NADH, ao longo de um período de tempo pré-estabelecido.

Para o teste de atividade oxidase, as mioglobinas (10 nmol) foram adicionadas ao tampão citrato-fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 6,5, contendo ácido ascórbico 1 mM (agente redutor); essa mistura foi incubada por 5 min a 25°C, e em seguida foram acrescentados 120 µM de NADH. Imediatamente foi iniciada a análise cinética da reação, com tempo de duração de 20 min. Os experimentos de cinética foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados pelo teste estatístico *t* de Student.

4.4. PARTE III: ANÁLISE ESTRUTURAL *IN SILICO* DAS MIOGLOBINAS RADULARES DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria*

4.4.1. Modelagem molecular

Apesar das mioglobinas apresentarem um tipo clássico de enovelamento conhecido como *myoglobin fold*, pequenas discrepâncias são observadas entre as estruturas. A obtenção de modelos de estrutura tridimensional das mioglobinas de *Biomphalaria* foram úteis para tentar entender se tais discrepâncias poderiam contribuir para a presença da função oxidase, ou mesmo tentar explicar sua ausência nessas proteínas.

A primeira etapa para a construção de um modelo estrutural das mioglobinas de *Biomphalaria* foi a escolha do molde. A busca foi realizada por uma ferramenta de alinhamento global disponibilizada na internet no *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), desse modo as buscas ficaram restritas a globinas pertencentes a moluscos, cuja estrutura já foi resolvida experimentalmente. A preferência foi dada àqueles moldes cuja estrutura foi resolvida por difração de raios X com maior resolução. Após a escolha do molde, foi escolhido um controle positivo para a modelagem; uma mioglobina de molusco com estrutura resolvida por difração de raios X, com porcentagem de identidade com o molde semelhante ao valor de identidade das mioglobinas de *Biomphalaria* com o mesmo.

Para a modelagem foi utilizado o programa Modeller 9v2 (Sali & Blundell, 1993) e Deep View/Swiss-PdbViewer v.4.0.1. (Guex & Peitsch, 1997), de acordo com Tramontano (1998).

4.4.2. Alinhamento global de sequências primárias, análise da composição de aminoácidos e da posição dos resíduos de aminoácidos em relação ao grupo heme na estrutura das mioglobinas

Todos os alinhamentos globais de sequências primárias realizadas nesse trabalho foram realizados utilizando o programa ClustalW (Tompson *et al.*, 1994). A composição de aminoácidos das mioglobinas analisadas foi obtida utilizando-se uma ferramenta disponível no programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999).

A análise da posição de resíduos de aminoácidos que estão, ou podem estar envolvidos com a atividade oxidase da mioglobinas, assim como a posição do grupo heme, foi realizada pelos programas ViewerLite 5.0 (Accelrys Inc.) e Deep View/Swiss-PdbViewer v.4.0.1. (Guex & Peitsch, 1997).

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1. PARTE I

5.1.1. Purificação das mioglobinas nativas de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*

5.1.1.1. Filtração molecular

A mioglobina nativa do músculo radular e do estômago de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* foi purificada em três etapas de cromatografia líquida. As frações coletadas na primeira etapa, a filtração molecular, foram analisadas em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 405 nm (comprimento de onda absorvido pelo grupo heme da mioglobina) e 280 nm, para verificação da presença de proteínas totais.

Nas três espécies de *Biomphalaria* foi observada a leitura de densidade óptica em 405 nm nas frações 10 e 11, tanto na purificação do extrato radular quanto estomacal, sendo os perfis cromatográficos muito semelhantes entre si (Figuras 9A e 9B).

5.1.1.2. Troca aniônica

O resultado da cromatografia por troca iônica foi semelhante para os extratos radular e estomacal das três espécies de *Biomphalaria*. A proteína não se ligou à resina da coluna de troca catiônica, porém essa etapa de purificação foi importante para excluir proteínas contaminantes presentes no material proveniente da filtração molecular (Figura 10).

5.1.1.3. Fase reversa

Os tempos de retenção dos picos protéicos obtidos nessa etapa de cromatografia apresentaram tempos de retenção semelhantes para as três espécies de *Biomphalaria* analisadas (Tabela 4). O material purificado a partir do extrato de músculo estomacal de *B. glabrata* e *B.*

tenagophila apresentou dois picos bem definidos (Figura 11), sendo os tempos de retenção de tais picos semelhantes entre as duas espécies de moluscos em questão, e também muito parecidos com os valores encontrados para as mioglobinas radulares das mesmas espécies.

O pico da fase reversa referente à hemeproteína foi identificado pela leitura de O.D. realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm. Foi observada leitura de O.D. no comprimento de onda de 405 nm apenas nos picos 1 das amostras radulares e estomacais (Figura 12).

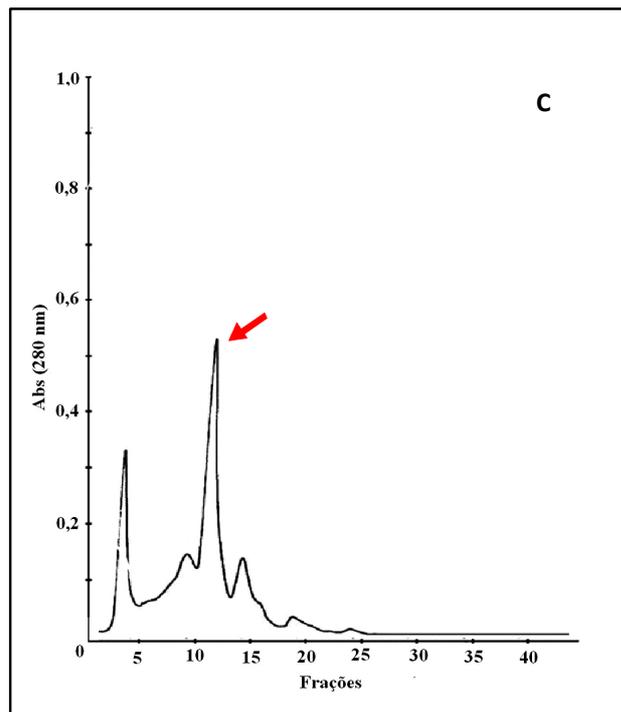
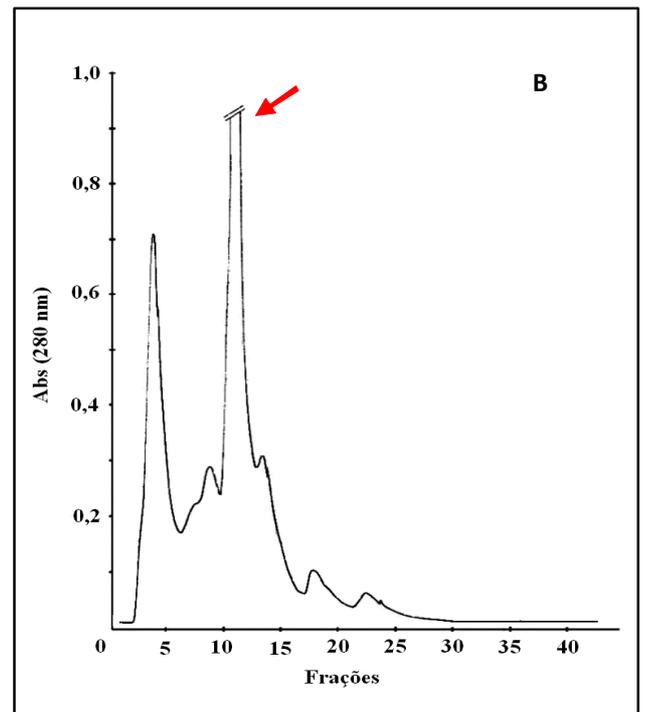
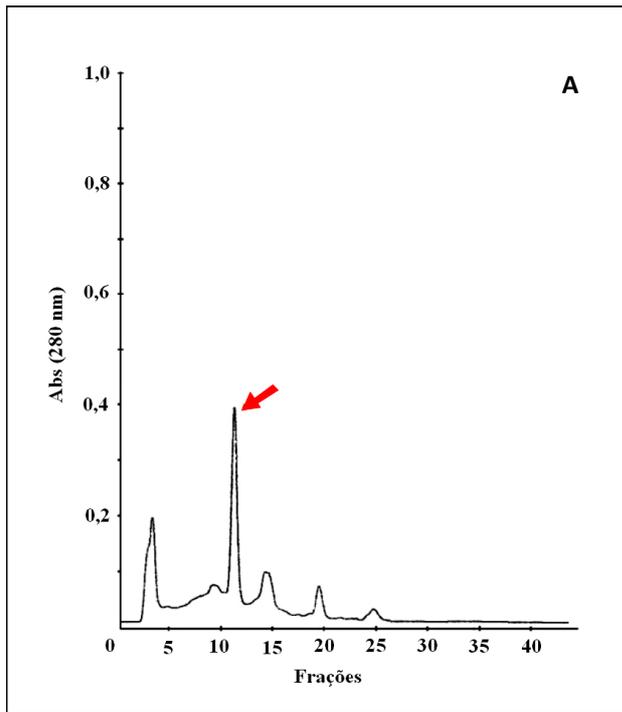


Figura 9A. Perfil cromatográfico da filtração molecular do extrato da musculatura radular. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. C: *B. straminea*. A seta aponta o pico referente à mioglobina.

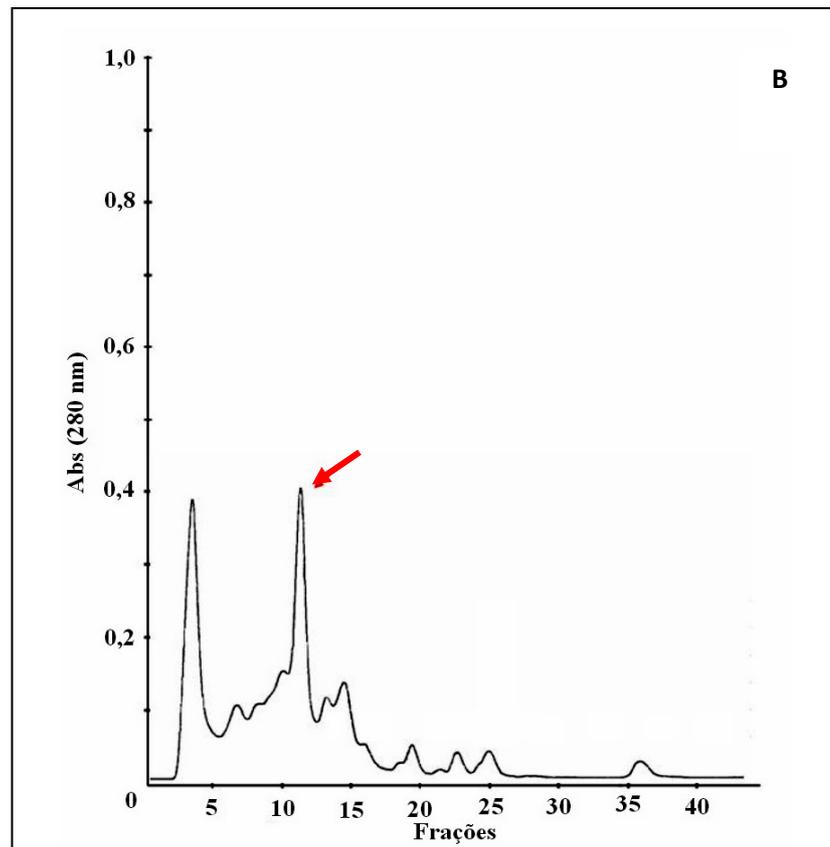
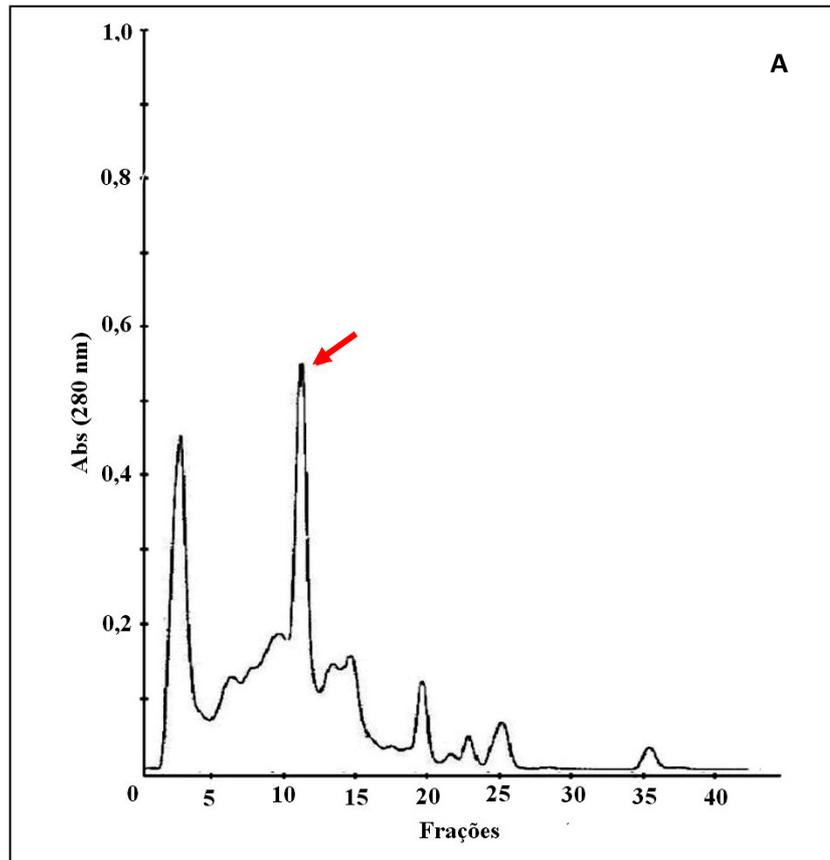


Figura 9B. Perfil cromatográfico da filtração molecular do extrato da musculatura estomacal. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. A seta aponta o pico referente à mioglobina.

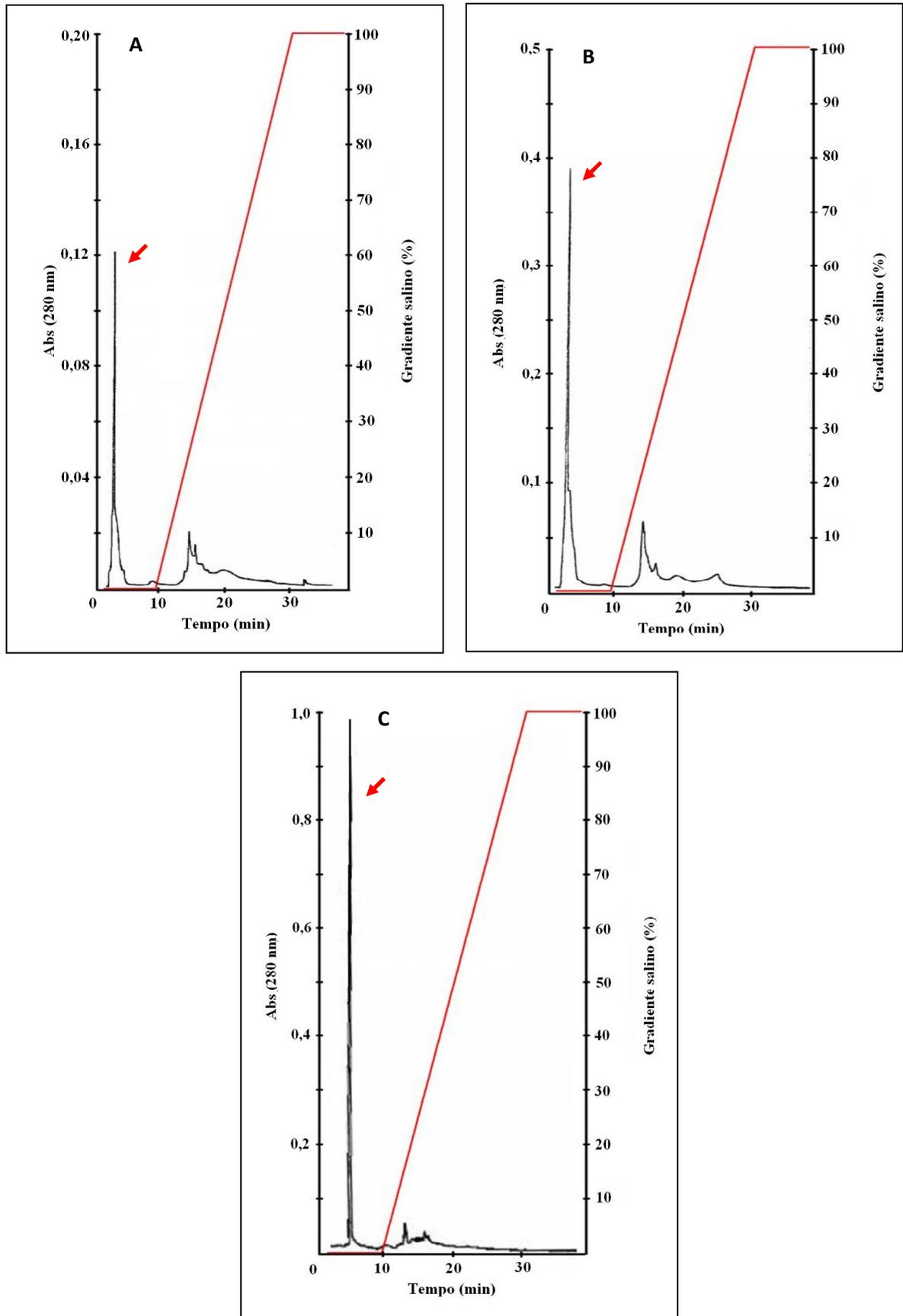


Figura 10A. Perfil cromatográfico da troca iônica das mioglobinas nativas do extrato da musculatura radular. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. C: *B. straminea*. O pico referente à mioglobina é apontado pela seta.

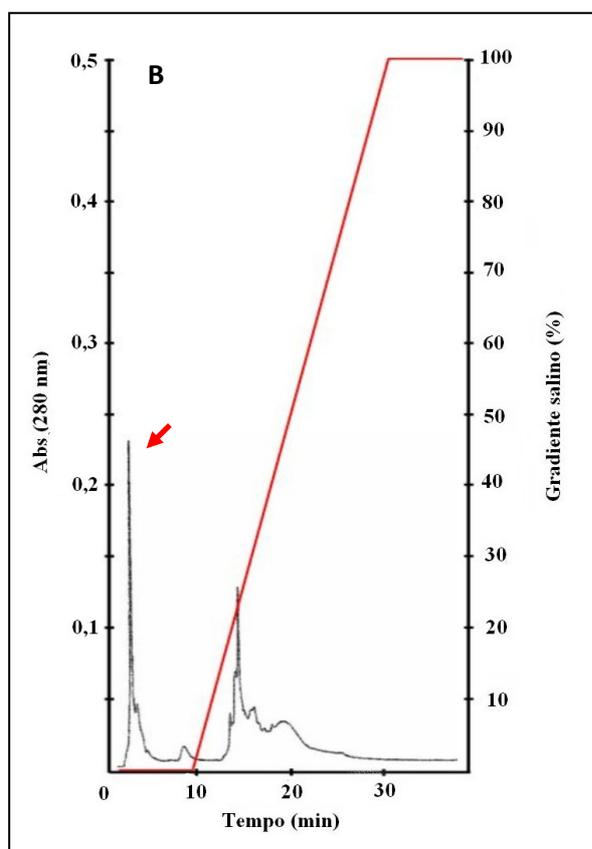
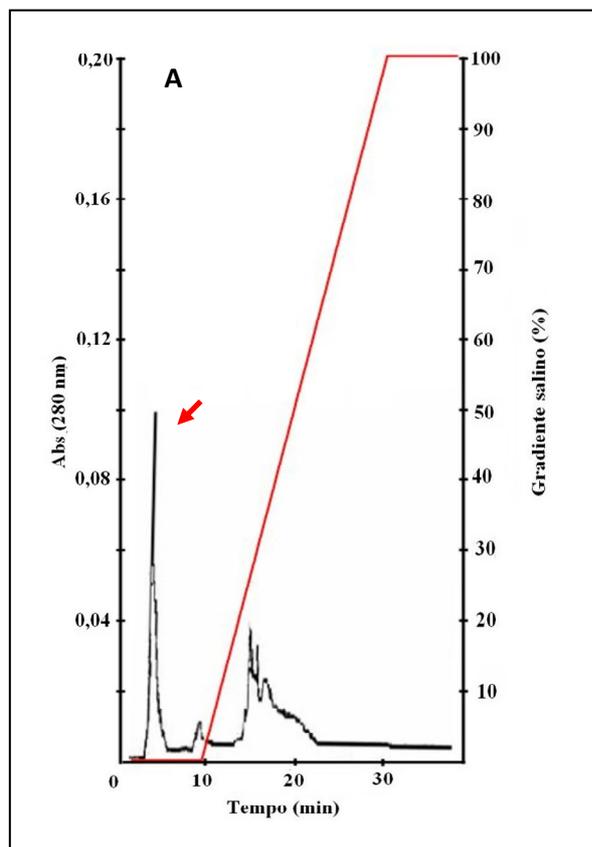


Figura 10B. Perfil cromatográfico da troca iônica das mioglobinas nativas do extrato da musculatura estomacal. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. O pico referente à mioglobina é apontado pela seta.

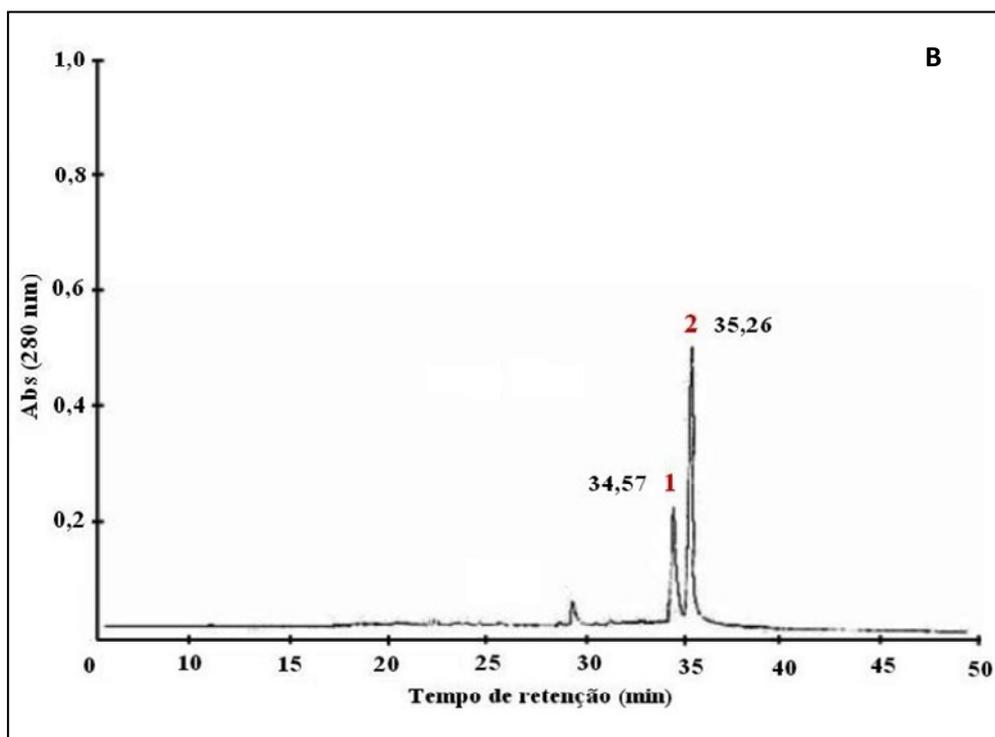
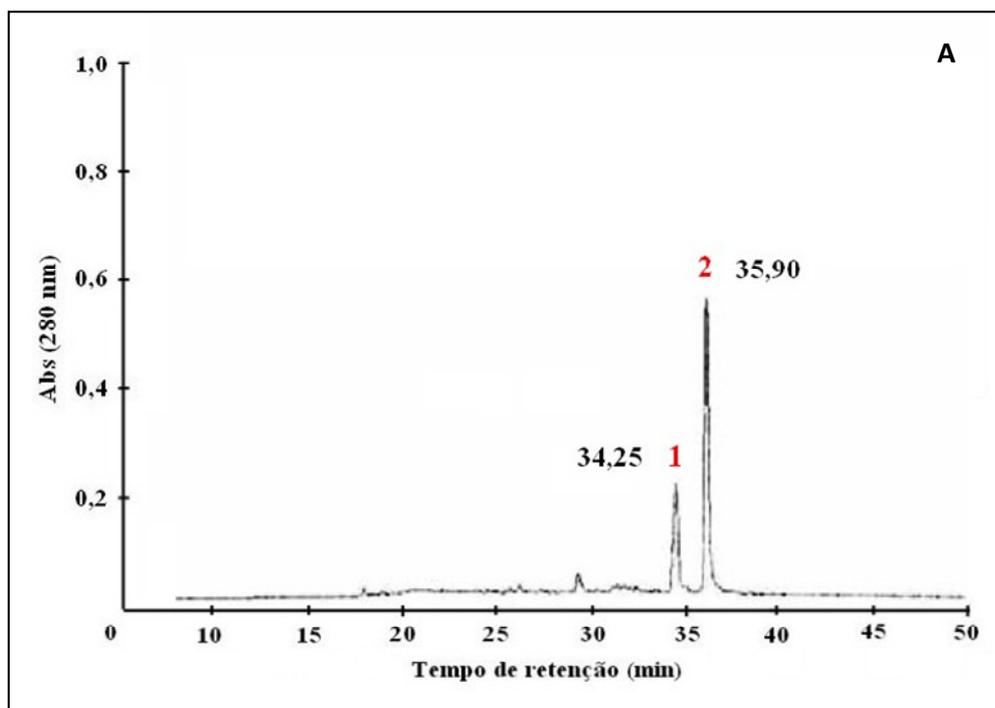


Figura 11. Cromatogramas da purificação das mioglobinas do estômago por fase reversa. A: *B. glabrata*, B: *B. tenagophila*.

| Espécie | Musculatura radular | | Musculatura estomacal | |
|-----------------------|---------------------|----------|-----------------------|----------|
| | Pico 1 * | Pico 2 * | Pico 1 * | Pico 2 * |
| <i>B. glabrata</i> | 34,12 | 35,7 | 34,25 | 35,9 |
| <i>B. tenagophila</i> | 34,37 | 35,21 | 34,57 | 35,26 |
| <i>B. straminea</i> | 34,27 | 35,41 | — | — |

Tabela 4. Tempos de retenção dos picos 1 (holomioglobina) e 2 (apomioglobina) provenientes da cromatografia de fase reversa das espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*. * min

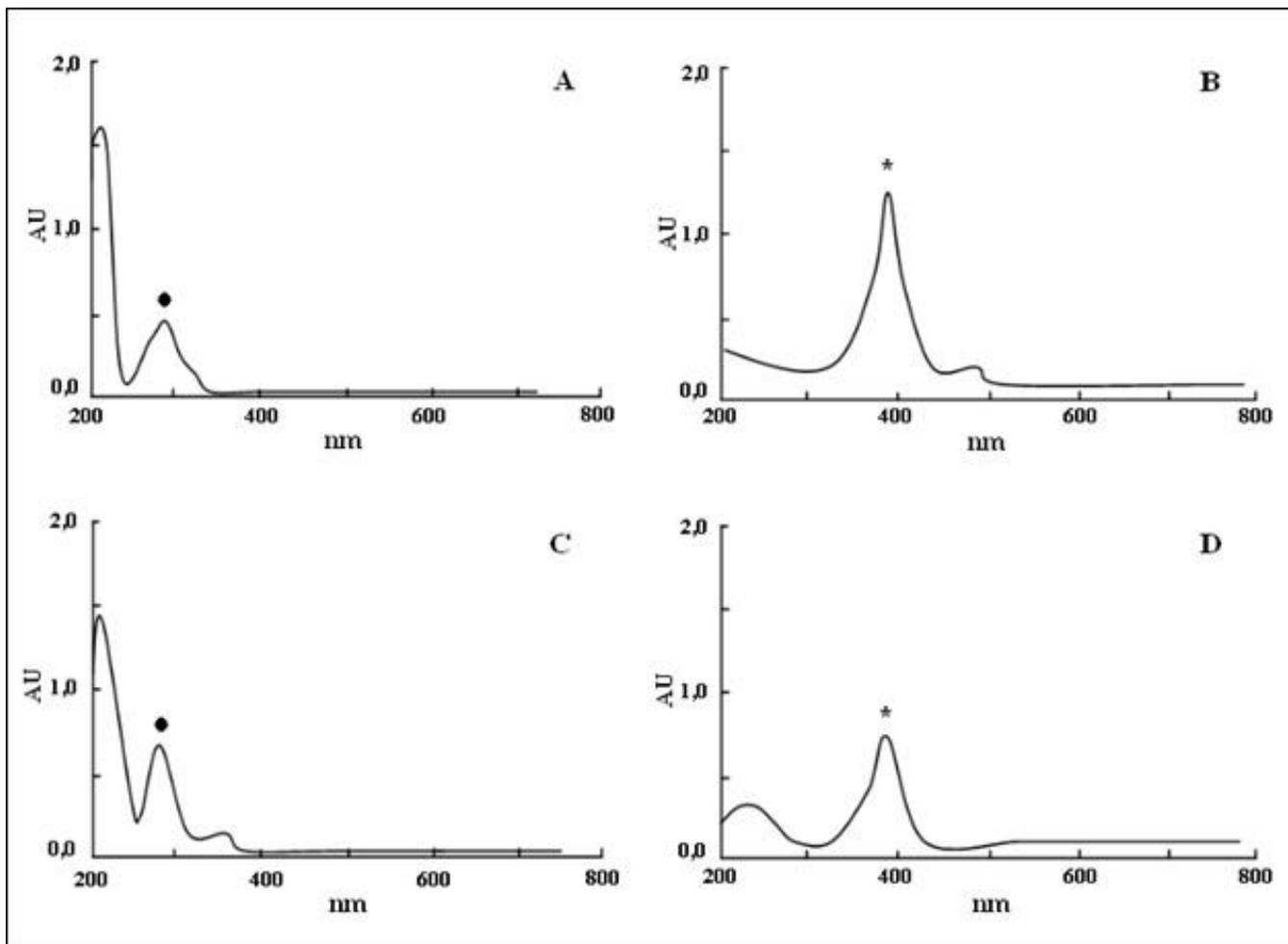


Figura 12. Espectro de absorção (200-800 nm) dos picos provenientes da cromatografia de fase reversa. A e B: *B. glabrata*, pico 2 (apomioglobina) e pico 1 (holomioglobina), respectivamente. C e D: *B. tenagophila*, picos 2 (apomioglobina) e 1 (holomioglobina), respectivamente. ● Absorção da proteína. * Absorção do grupo heme.

5.1.2. Análise do material purificado por SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE 12,5% mostrou que a purificação da proteína foi satisfatória. De acordo com a eletroforese as mioglobinas analisadas possuem massa molecular de aproximadamente 15 kDa (Figura 13).

Foram analisados também os extratos brutos estomacais e radulares de *B. tenagophila* e de *B. glabrata*. É possível observar que em ambos os extratos a mioglobina é a proteína predominante (Figuras 14A e 14B).

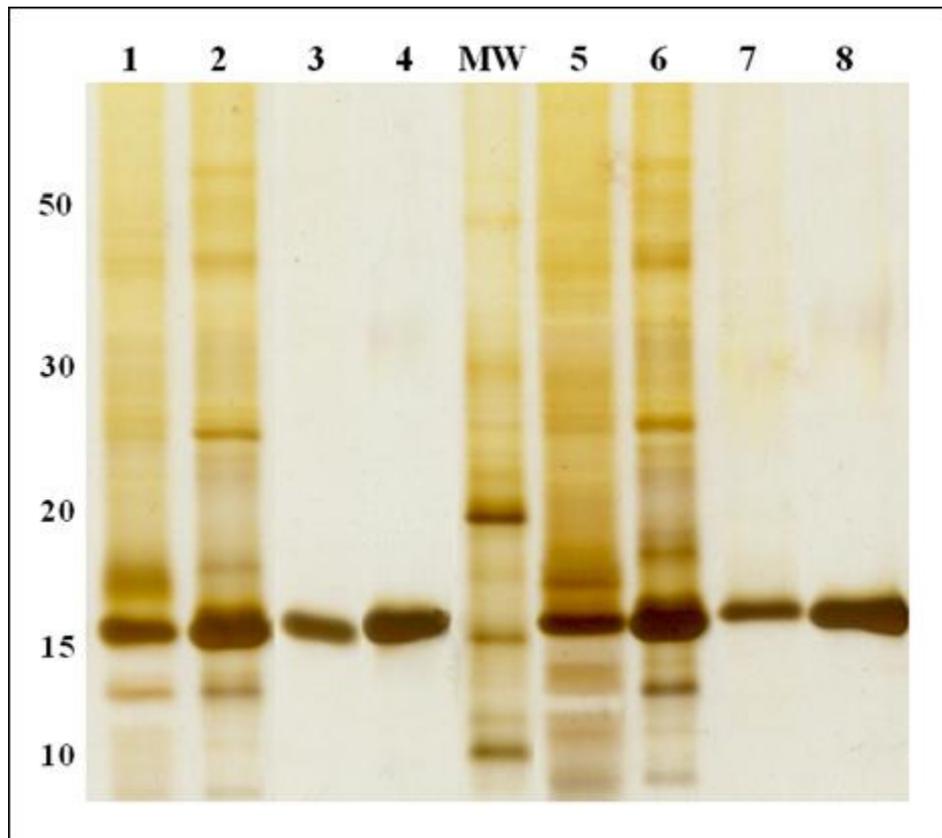


Figura 13. SDS-PAGE 12,5% corado por prata. MW: Padrão de massa molecular Benchmark – Invitrogen (kDa), 1: Extrato bruto estomacal de *B. tenagophila*. 2: Extrato bruto radular de *B. tenagophila*. 3: Mioglobina estomacal de *B. tenagophila*. 4: Mioglobina radular de *B. tenagophila*. 5: Extrato bruto estomacal de *B. glabrata*. 6: Extrato bruto radular de *B. glabrata*. 7: Mioglobina estomacal de *B. glabrata*. 8: Mioglobina radular de *B. glabrata*.

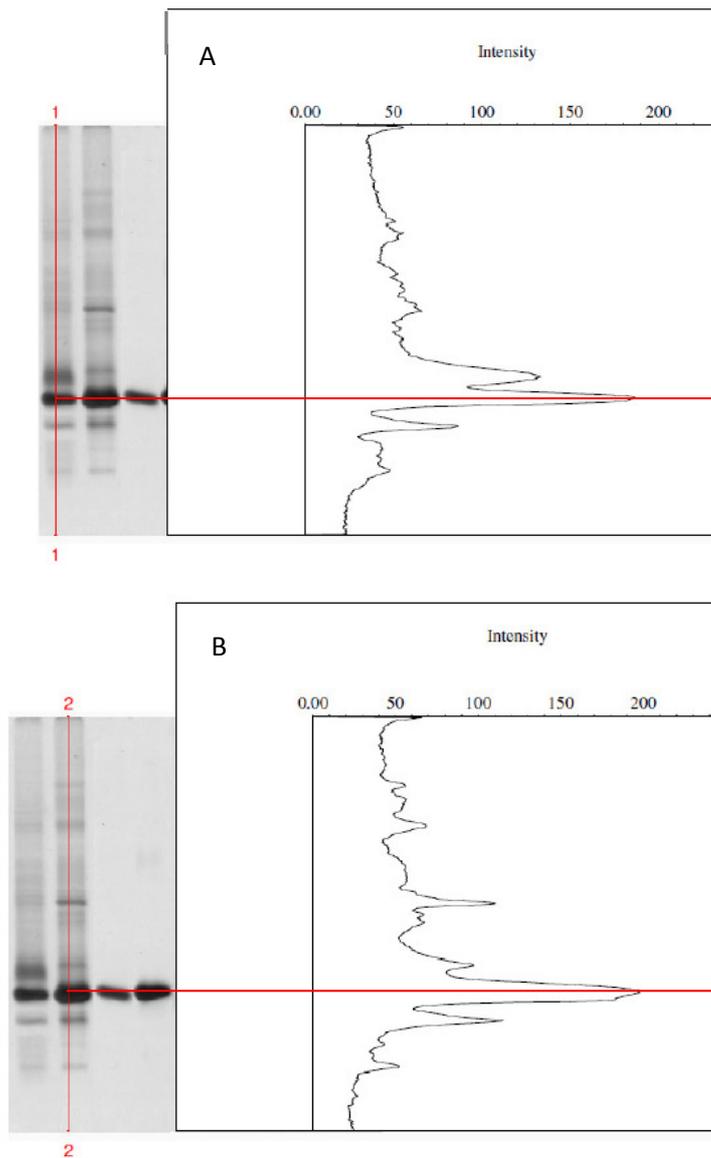
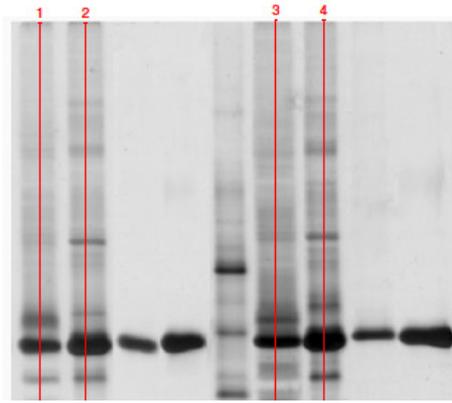


Figura 14A. Análise da intensidade das bandas de proteínas do extrato bruto radular e estomacal dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. A: Extrato bruto estomacal de *B. tenagophila*. B: Extrato bruto radular de *B. tenagophila*.

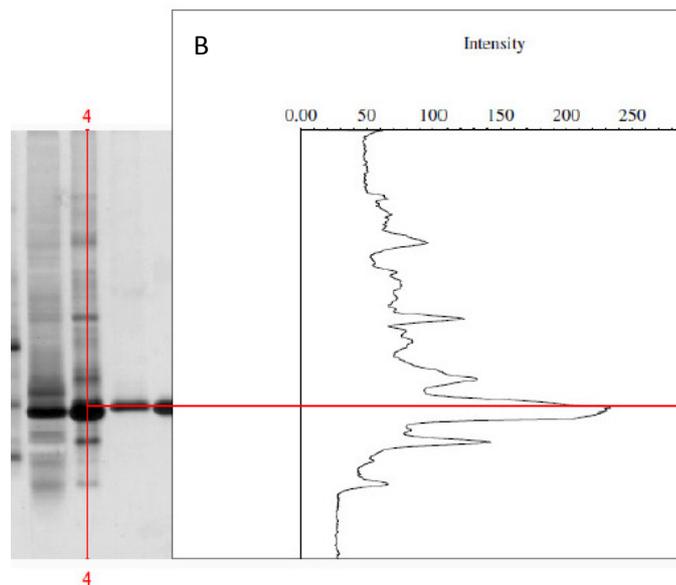
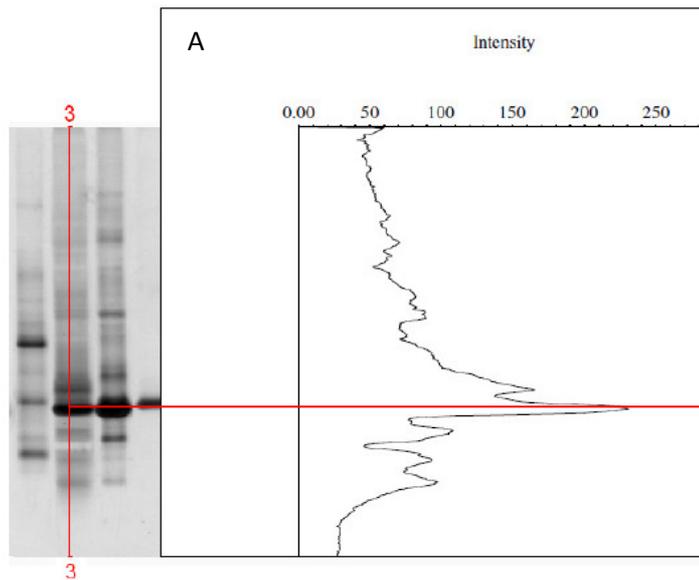
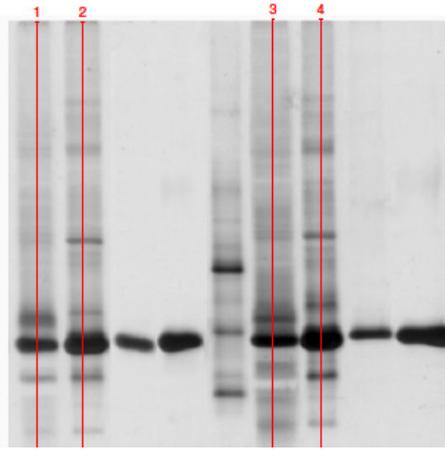


Figura 14B. Análise da intensidade das bandas de proteínas do extrato bruto radular e estomacal dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. A: Extrato bruto estomacal de *B. glabrata*. B: Extrato bruto radular de *B. glabrata*.

5.1.3. Ponto isoelétrico experimental das mioglobinas nativas

Os valores de ponto isoelétrico experimental das mioglobinas nativas radulares de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, obtidos por cromatofocalização, foram semelhantes entre si, em torno de 7,8 – 7,9.

Os valores de ponto isoelétrico experimental das mioglobinas nativas estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, obtidos pela mesma técnica citada, também foram semelhantes entre si, e semelhantes àqueles observados para as proteínas radulares. (Figuras 15A e 15B). Na Tabela 5 estão listados os valores de pI obtidos para as mioglobinas do músculo radular e do estômago.

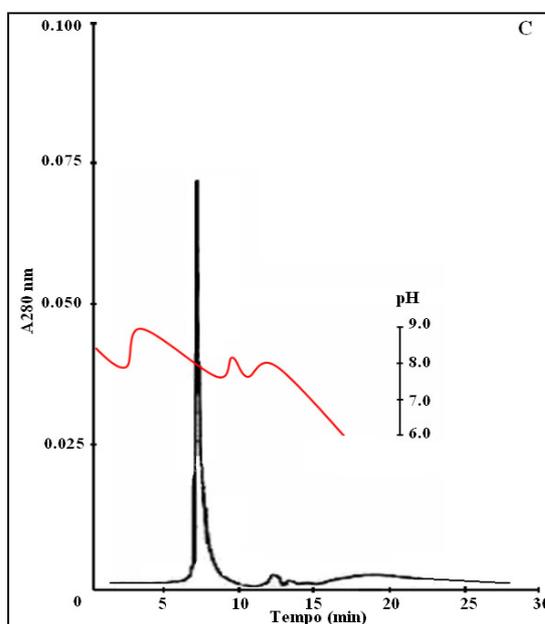
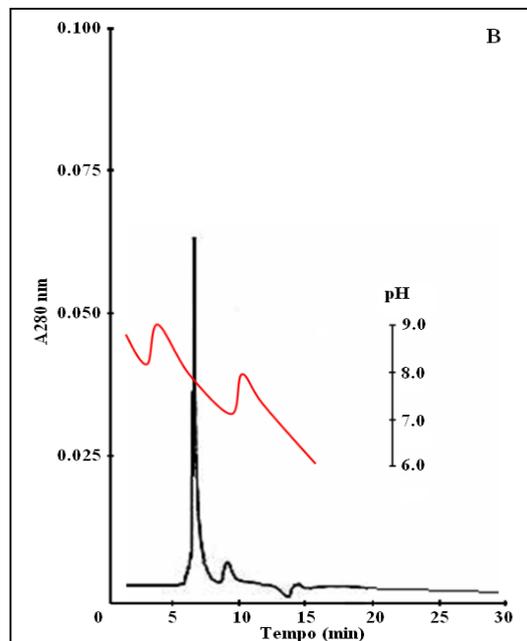
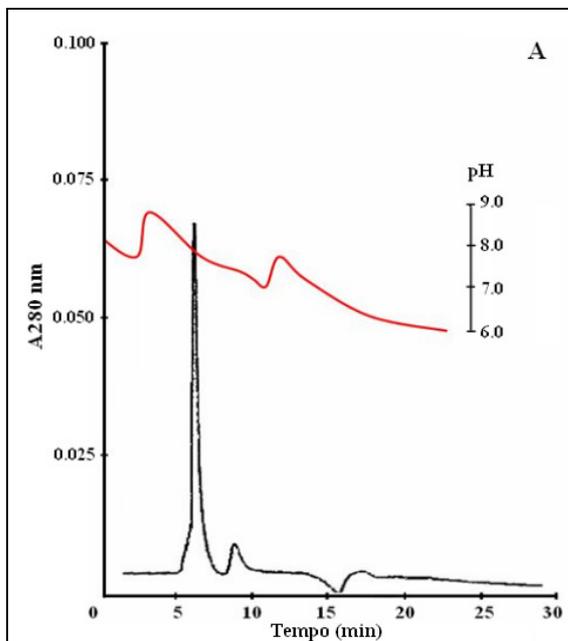


Figura 15A. Perfil cromatográfico da cromatofocalização das mioglobinas radulares. A: *B. straminea*, B: *B. tenagophila*, C: *B. glabrata*. e estomacais, D: *B. tenagophila*, E: *B. glabrata*.

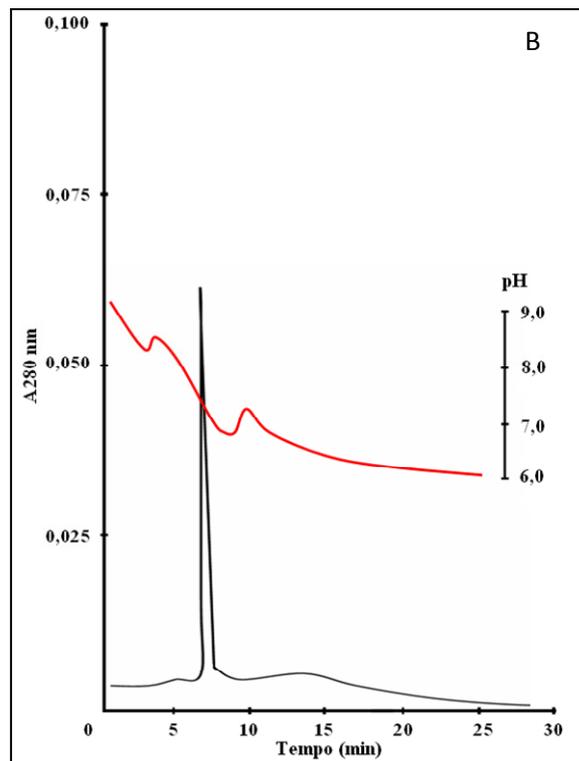
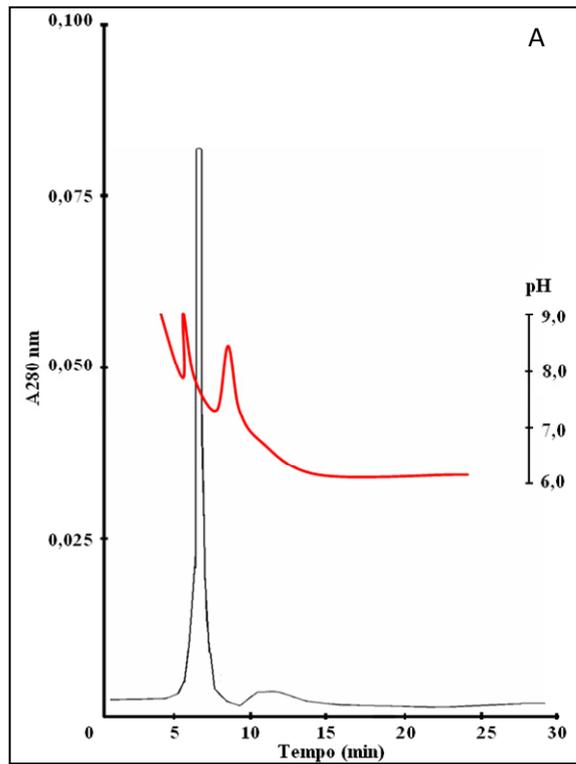


Figura 15B. Perfil cromatográfico da cromatofocalização das mioglobinas estomacais. A: *B. tenagophila*. B: *B. glabrata*.

5.1.4. Massa molecular das mioglobinas nativas do estômago

Para a obtenção da massa molecular experimental somente o pico 2 proveniente da fase reversa foi analisado. O pico 2 é o material que não apresentou leitura de absorvância em 405 nm, provavelmente a forma apo da proteína que estaria perdendo o grupo heme durante o processo de purificação devido a manipulação e ao uso de solvente orgânico. A massa obtida para a mioglobina estomacal de *B. glabrata* foi 16.095,2 Da e para *B. tenagophila* foi 16.124,9 Da (Figura 16), massas muito semelhantes às encontradas para as mioglobinas do músculo radular (Tabela 6).

| Espécie | Mioglobina do músculo radular | Mioglobina do estômago |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| <i>B. glabrata</i> | 7,82 | 7,77 |
| <i>B. tenagophila</i> | 7,97 | 7,98 |
| <i>B. straminea</i> | 7,84 | — |

Tabela 5. Valores de ponto isoelétrico das apomioglobinas radulares e estomacais de moluscos do gênero *Biomphalaria*.

| | <i>B. glabrata</i> | <i>B. tenagophila</i> | Fonte |
|----------------------|--------------------|-----------------------|---------------|
| Mioglobina radular | 16.095,10 | 16.122,40 | Mestrado |
| Mioglobina estomacal | 16.095,28 | 16.124,92 | Este trabalho |

Tabela 6. Massa molecular experimental das mioglobinas radulares e estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

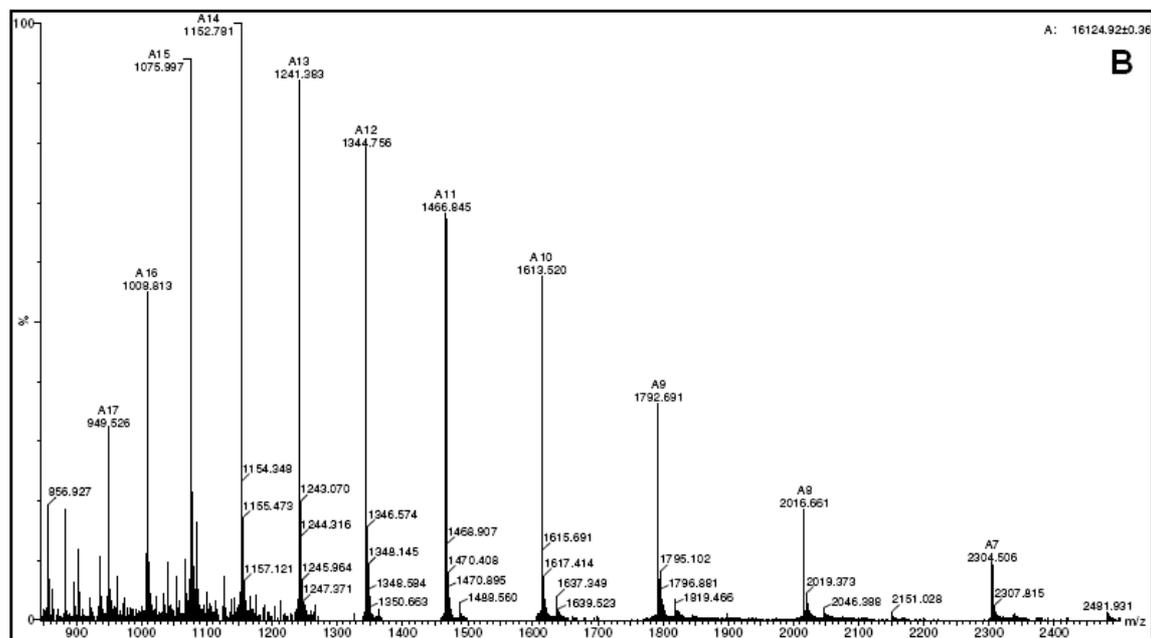
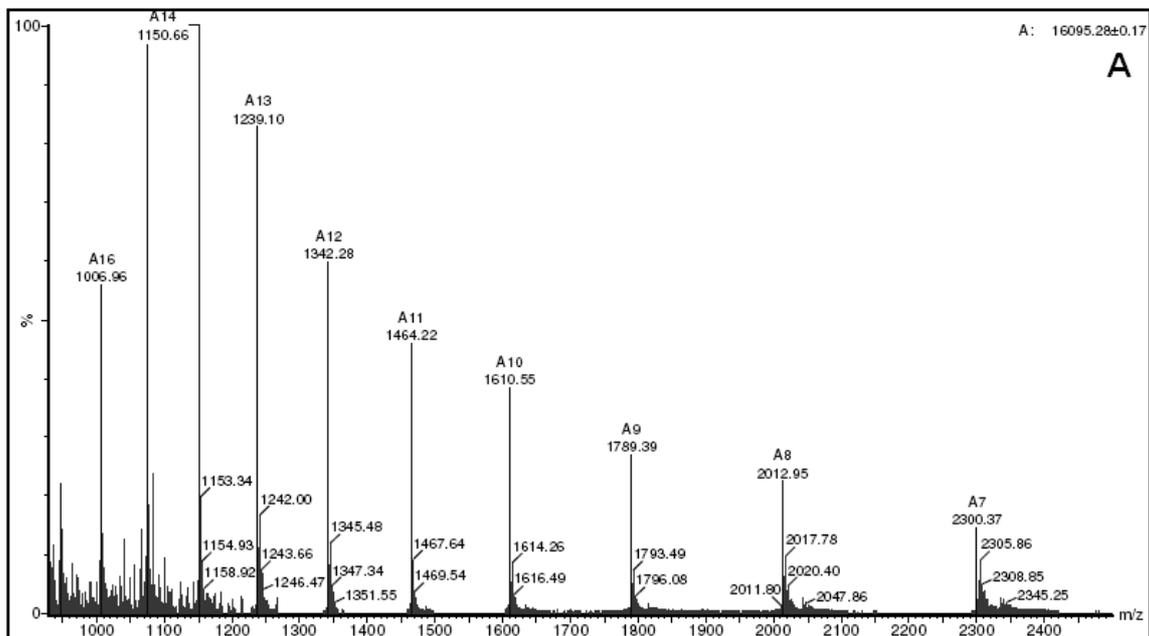


Figura 16. Gráficos de espectrometria de massa. A: Mioglobina estomacal de *B. glabrata*. B: Mioglobina estomacal de *B. tenagophila*.

5.1.5. Sequenciamento de aminoácidos das mioglobinas nativas do estômago

O sequenciamento de aminoácidos da porção amino-terminal das mioglobinas nativas do estômago de *B. tenagophila* e de *B. glabrata* por degradação de Edman não foi possível. Após 20 ciclos nenhum sinal significativo foi obtido, indicando que estas proteínas se apresentam provavelmente bloqueadas na porção amino-terminal.

5.1.6. Auto-oxidação das mioglobinas nativas do músculo radular e do estômago de *B. glabrata* e *B. tenagophila*

Por meio da diminuição do valor de absorvância das mioglobinas radulares e estomacais de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, em 575 nm, foi possível obter a taxa de auto-oxidação das mesmas. Foram encontrados dois pontos isobécticos para as mioglobinas estomacais e radulares, de mesmo valor, para as duas espécies de *Biomphalaria* estudadas: em 530 e 590 nm (Figuras 17A e B). A taxa de auto-oxidação da mioglobina radular de *B. glabrata* é 2,5 vezes mais lenta que a taxa observada para a mioglobina estomacal da mesma espécie, já em relação à *B. tenagophila* ambas as taxas de auto-oxidação apresentaram valores semelhantes. Os valores das constantes de auto-oxidação podem ser observados na Tabela 7. A quantidade de mioglobina por unidade de massa de tecido calculada para cada espécie de *Biomphalaria* pode ser visualizada na Tabela 8, no qual os valores entre as espécies, para cada tecido analisado, foram muito similares.

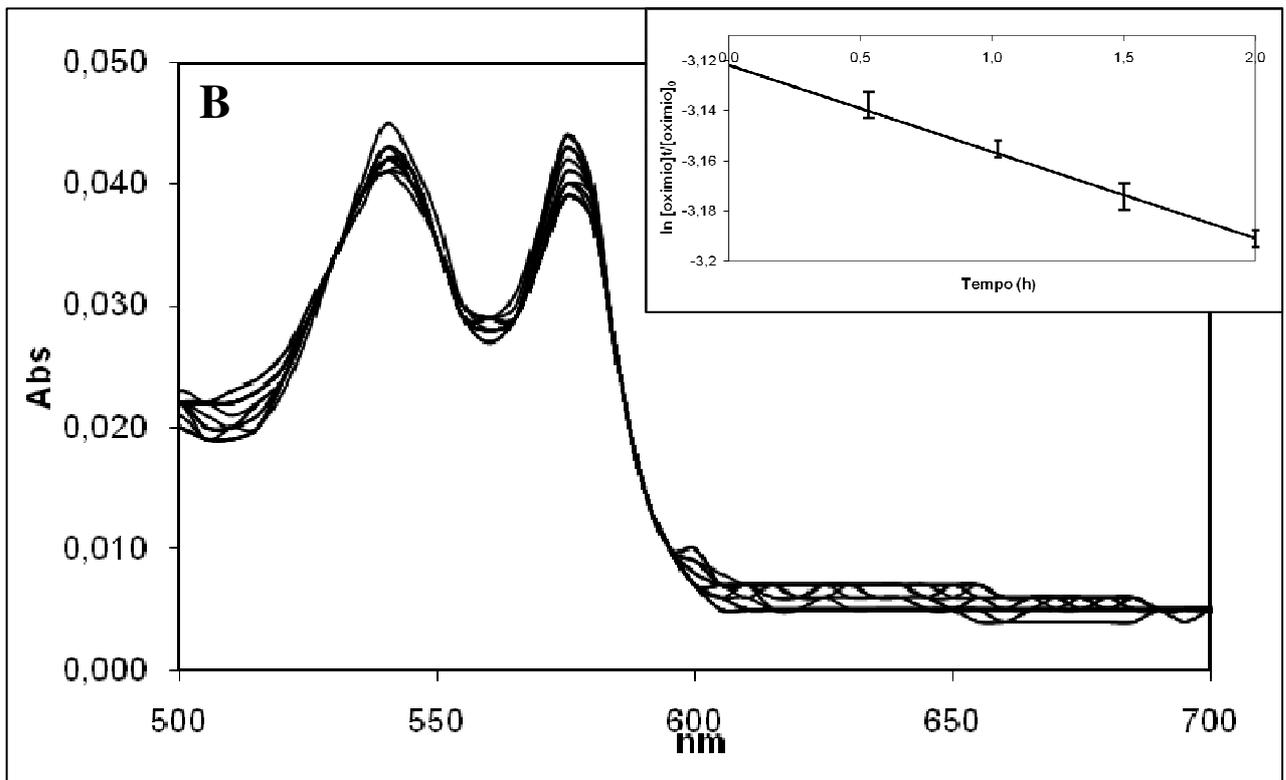
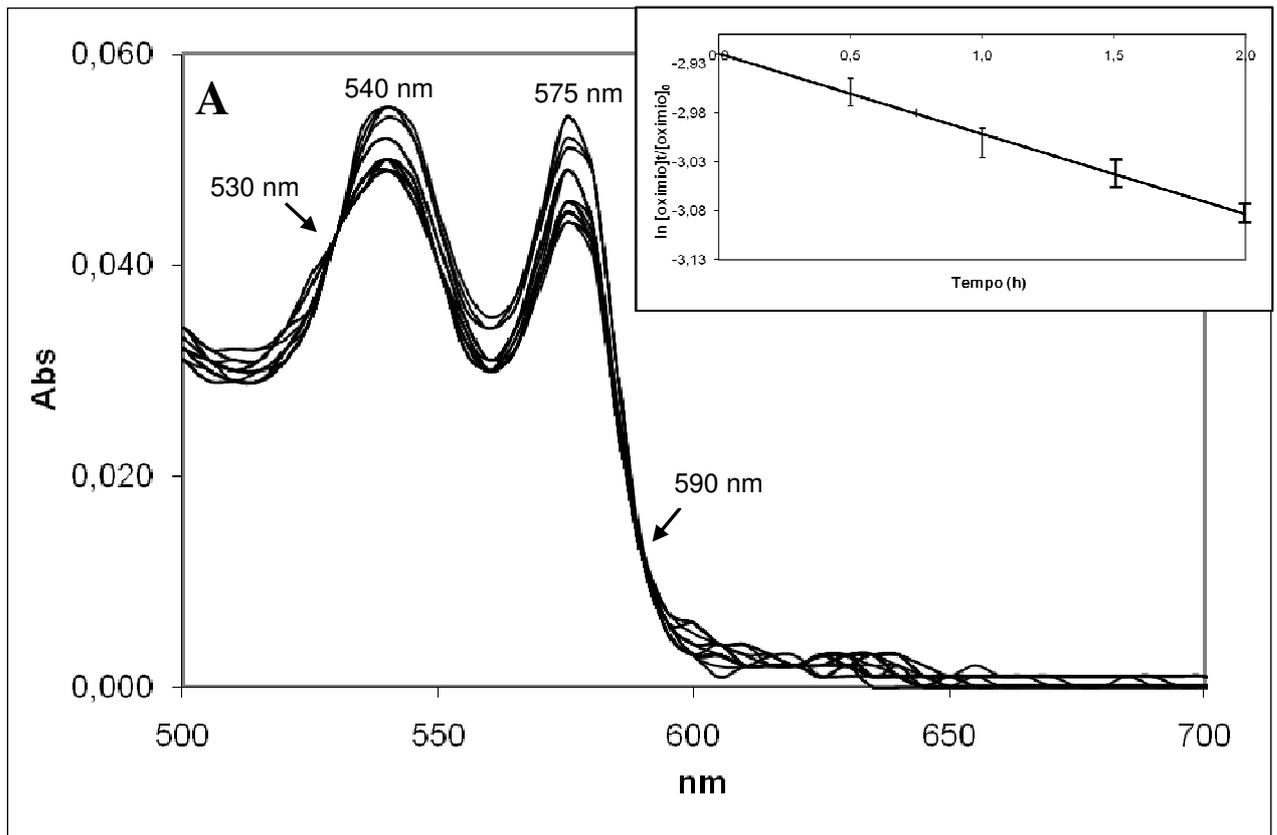


Figura 17A. Espectros de absorção (500-700 nm) da mioglobina nativa radular de *B. glabrata* (A) ($R^2 = 0,982$) e de *B. tenagophila* (B) ($R^2 = 0,99$). Os dados de absorção de 400-495 e de 705-750 nm não foram mostrados.

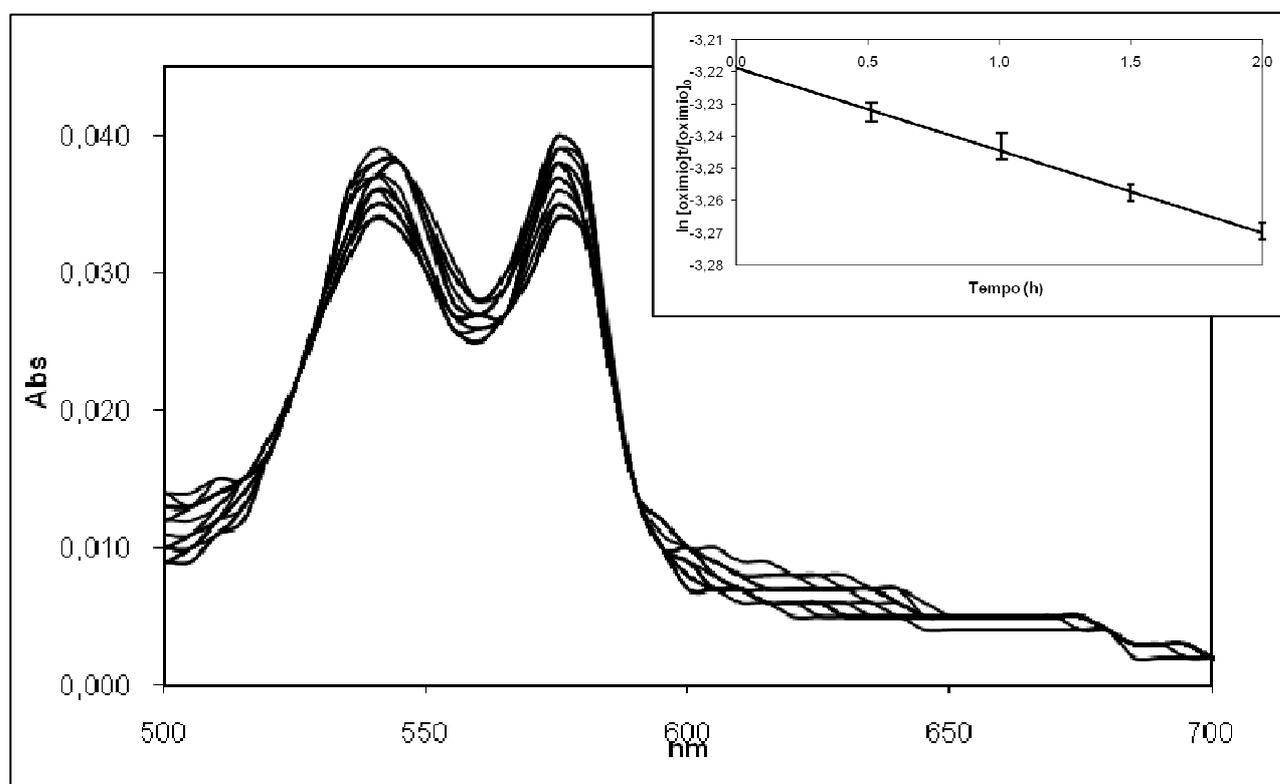
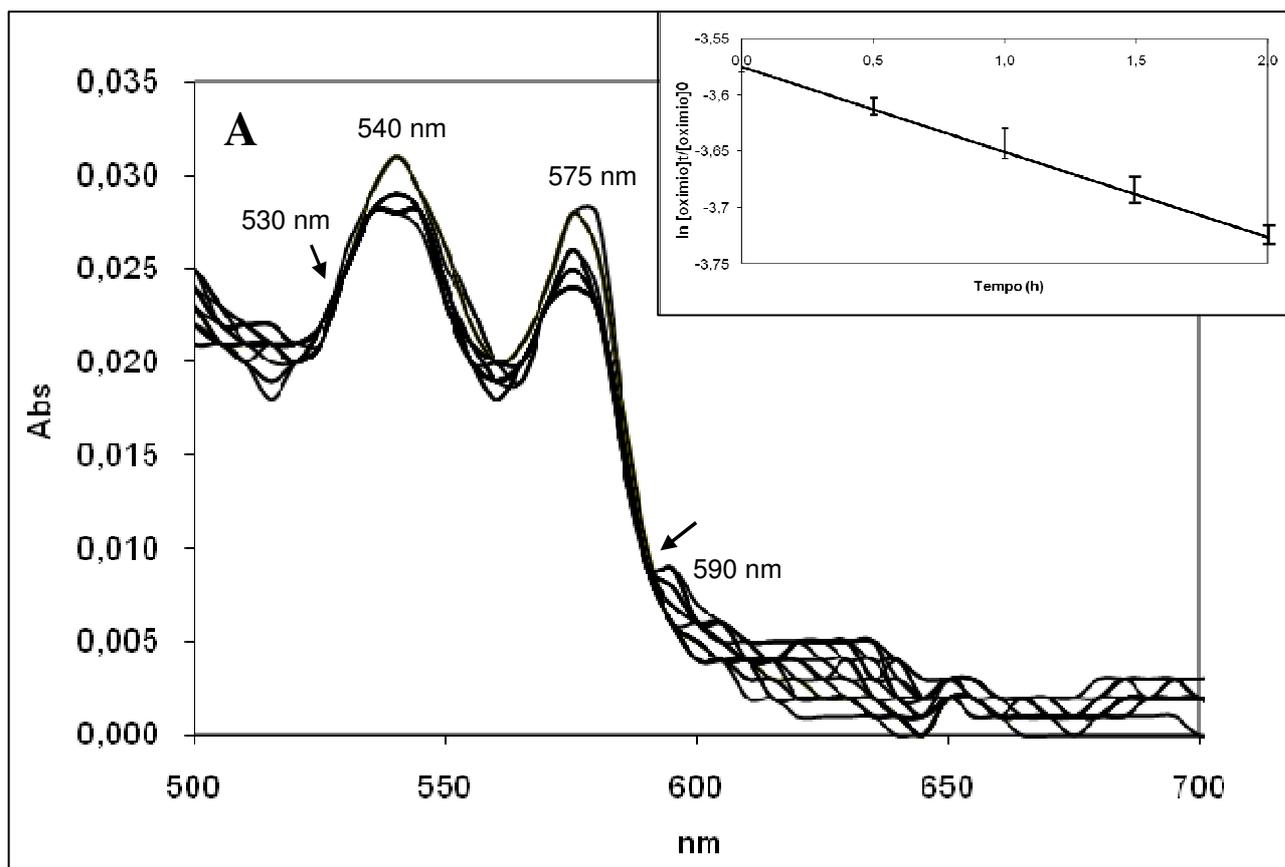


Figura 17B. Espectros de absorção (500-700 nm) da mioglobina nativa estomacal de *B. glabrata* (A) e de *B. tenagophila* (B). Os dados de absorção de 400-495 e de 705-750 nm não foram mostrados.

| Taxa de auto-oxidação | <i>B. glabrata</i> | <i>B. tenagophila</i> |
|------------------------------|--|---|
| Mioglobina radular | $2,0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0,0004$ | $1,2 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0,00099$ |
| Mioglobina estomacal | $8,0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1} \pm 0,0002$ | $1,0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0,00142$ |

Tabela 7. Taxas de auto-oxidação obtidas para as mioglobinas radulares e estomacais de *Biomphalaria*.

| Mioglobina/massa de tecido ($\mu\text{g}/\text{mg}$) | <i>B. glabrata</i> | <i>B. tenagophila</i> |
|--|---------------------------|------------------------------|
| Músculo radular | $1,73 \pm 0,020$ | $1,68 \pm 0,112$ |
| Músculo estomacal | $1,51 \pm 0,034$ | $1,47 \pm 0,022$ |

Tabela 8. Quantidade de mioglobina encontrada por unidade de massa na musculatura radular e estomacal de *Biomphalaria*.

5.2. PARTE II

5.2.1. Subclonagem do cDNA de mioglobina do músculo radular de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila*

Os clones positivos obtidos estão listados na Tabela 9. O resultado do *screening* é mostrado na Figura 18. Os números dos clones (1424 e 1433) são referentes ao número do indivíduo, inicialmente gentilmente cedido pelo Dr. Wladimir Lobato Paraense (Departamento de Malacologia-Fundação Instituto Oswaldo Cruz/R.J) para a produção do cDNA das mioglobinas para a clonagem.

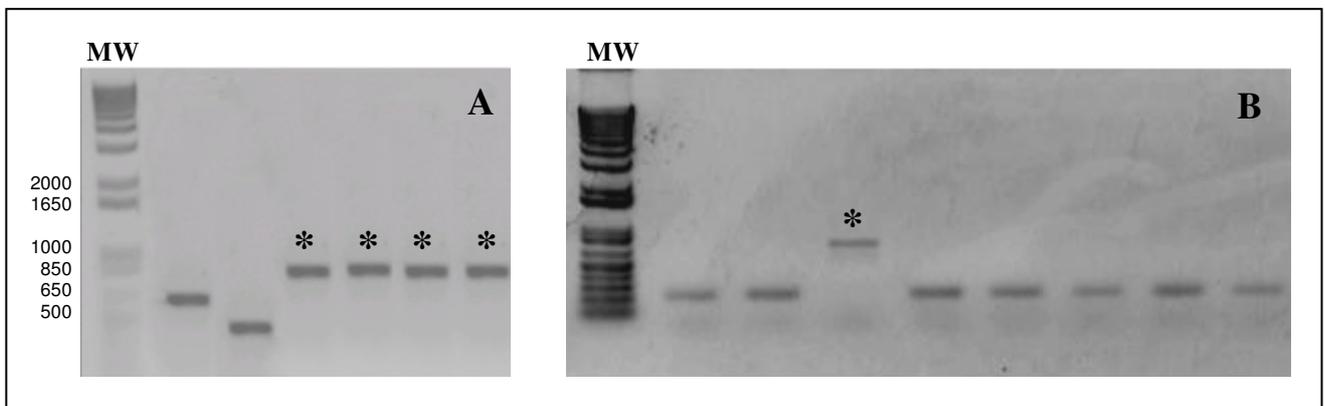


Figura 18. Gel de agarose 1% do PCR de colônia para análise dos clones de rMioglobina. Clones positivos: ~750-850 pb. A: *B. tenagophila*. B: *B. glabrata*. MW: Padrão de peso molecular 1kb DNA ladder plus – Invitrogen (kb). * Clones positivos.

| Espécie | Clones obtidos |
|-----------------------|--|
| <i>B. glabrata</i> | 1424 (1) |
| <i>B. tenagophila</i> | 1433 (22), 1433 (23), 1433 (25), 1433 (26) |

Tabela 9. Clones positivos de *B. tenagophila* e de *B. glabrata*.

5.2.2. Teste de indução da expressão protéica das rMioglobinas

Após o teste de expressão, realizado para determinar o tempo de expressão das proteínas recombinantes, um clone de cada espécie de molusco foi escolhido e estes foram utilizados para a realização dos experimentos subsequentes. Foi estabelecido o protocolo de 3 h de indução para o clone 1424pET16b (1) (*B. glabrata*) e 4 h para o clone 1433pET16b (23) (*B. tenagophila*), como mostrado na Figura 19.

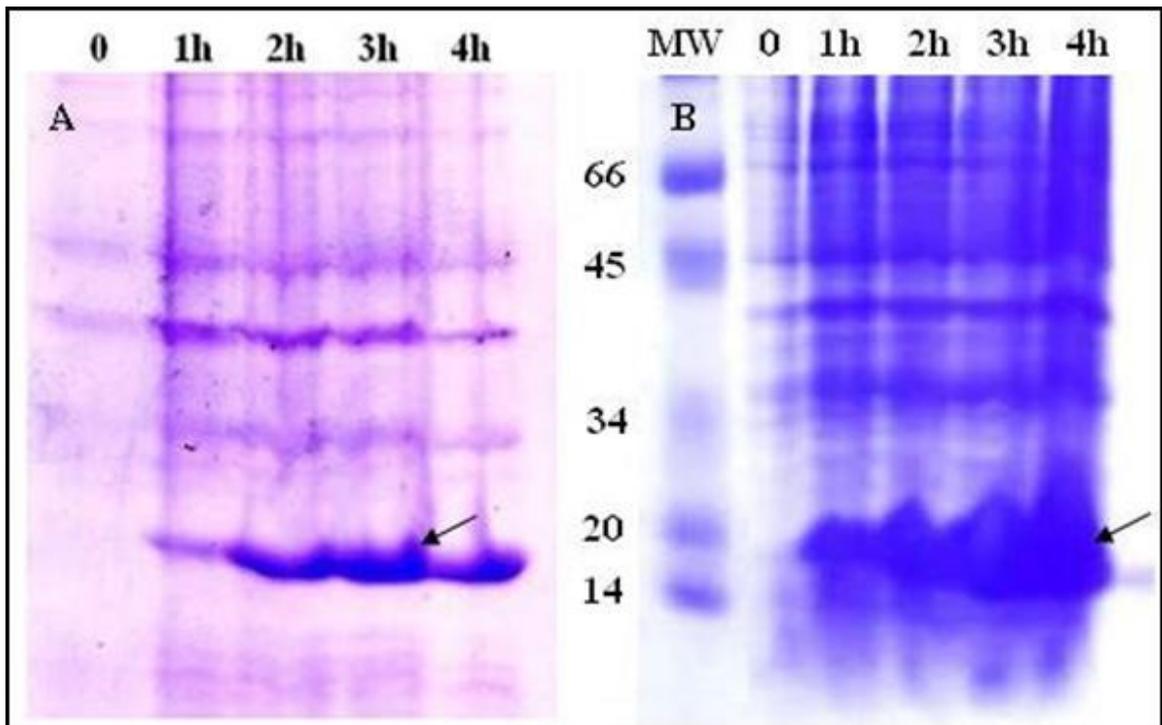


Figura 19. SDS-PAGE 12,5% do teste de indução protéica do clone de mioglobina de (A) *B. glabrata* e (B) *B. tenagophila*. MW: Padrão de massa molecular (kDa). Acima das canaletas está sinalizado o tempo de indução. A seta aponta a proteína de interesse em seu tempo necessário para uma indução satisfatória.

5.2.3. Solubilidade das rMioglobinas

Após um prévio teste de expressão, um clone de cada espécie de molusco foi escolhido e estes foram utilizados para a realização dos experimentos subsequentes. O teste de solubilidade mostrou que a proteína de interesse, após a lise bacteriana, estava presente no *pellet*, ou seja, a proteína é insolúvel (Figura 20).

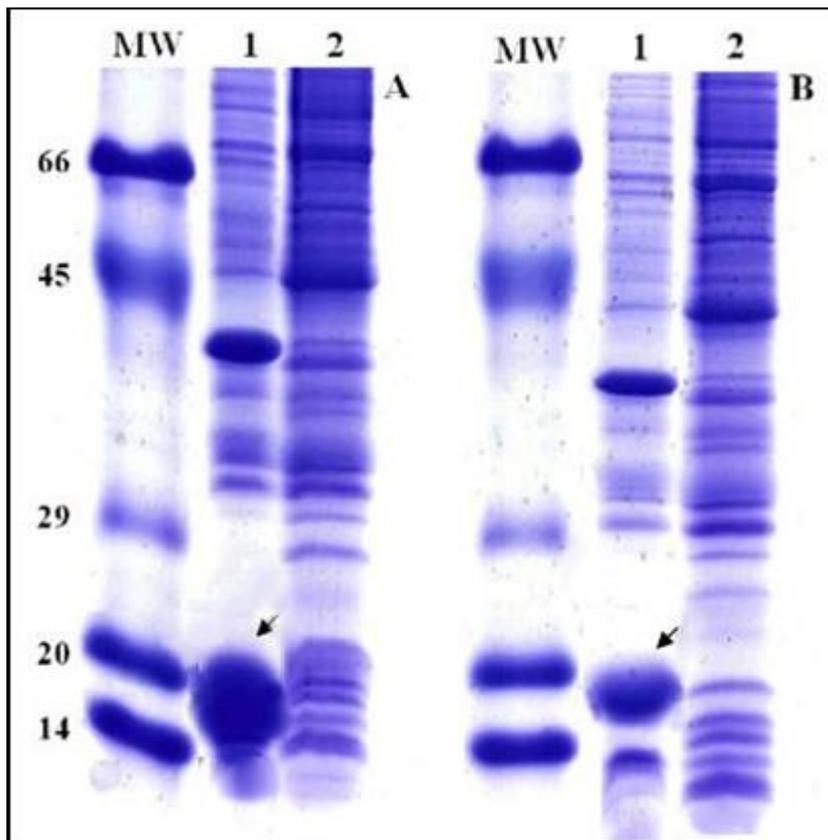


Figura 20. SDS-PAGE 12,5% do teste de solubilidade do clone de mioglobina de (A) *B. tenagophila* e (B) *B. glabrata*. MW: Padrão de massa molecular (kDa). 1. *Pellet*. 2. Sobrenadante. A seta indica a banda referente à mioglobina.

5.2.4. Lise bacteriana e solubilização dos corpos de inclusão

Os sobrenadantes reservados durante o processo de lise e os corpos de inclusão solubilizados foram analisados por SDS-PAGE. O mesmo volume de tampão foi usado em todas as etapas de lise, assim como na etapa de solubilização, e um mesmo volume de cada foi aplicado no gel.

A análise da lise bacteriana por sonicação pelo teste de Gram (Figura 21) mostrou que quatro ciclos eram suficientes para a lise bacteriana. A eficiência de lise se encontra entre aproximadamente 98 a 99%. A análise por SDS-PAGE 12,5% mostrou que a perda da proteína de interesse foi insignificante em relação à quantidade de proteínas contaminantes retirada do extrato bruto, o que facilitou a purificação (Figura 22).

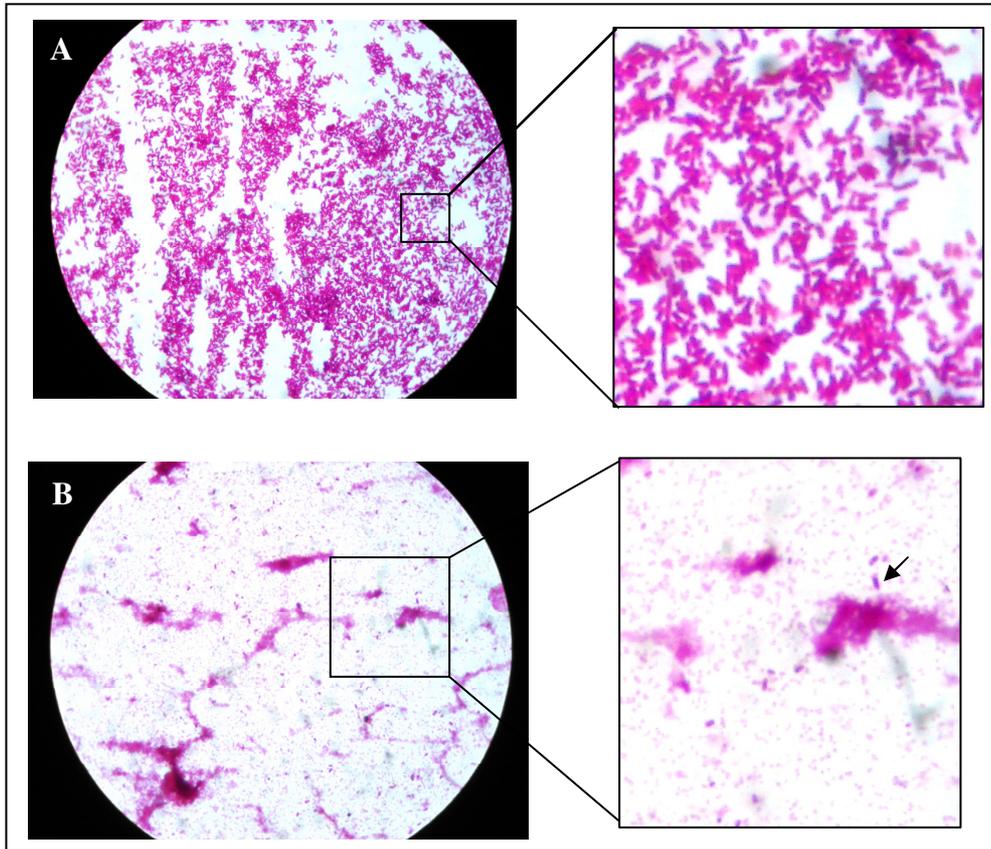


Figura 21. Fotografia do teste de Gram (aumento 100 x) realizado antes (A) e após (B) a lise bacteriana. No detalhe do aumento da Figura B podem ser percebidas algumas bactérias intactas (seta).

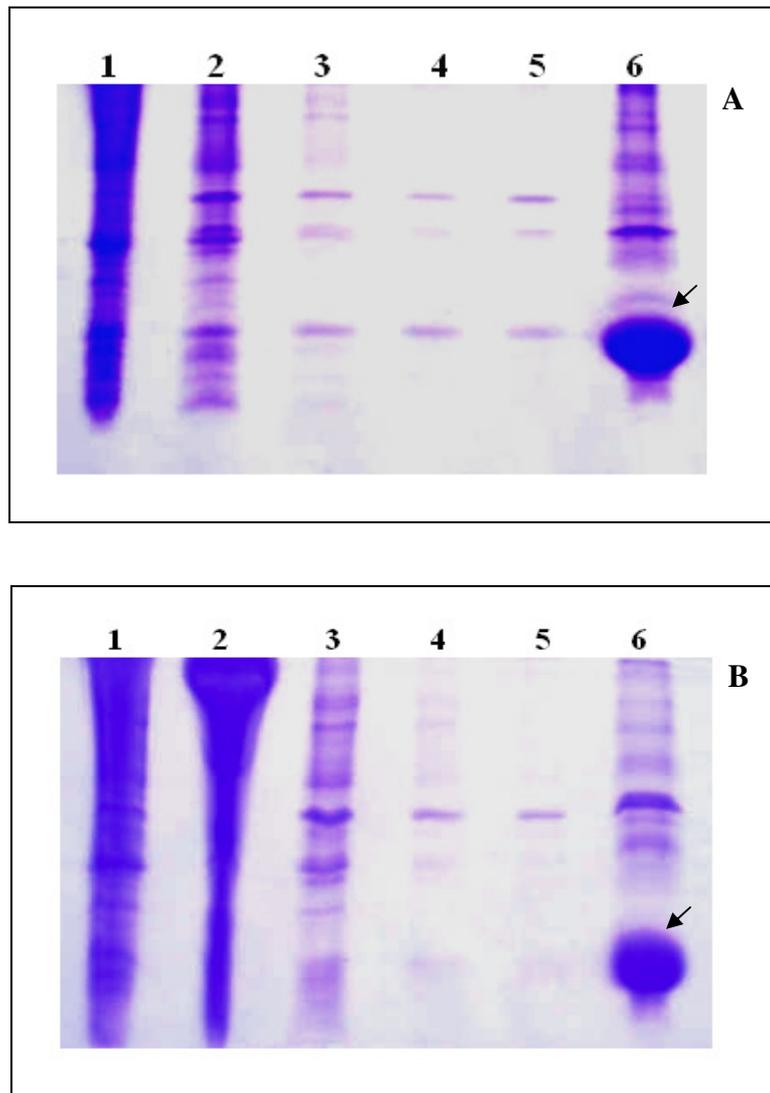


Figura 22. SDS-PAGE 12,5% para análise das etapas de lise bacteriana. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. Canaletas de 1 a 5: sobrenadantes provenientes das etapas seqüenciais de lise. Canaleta 6: *Pellet* (corpos de inclusão) solubilizado, obtido ao final da lise. As setas apontam as rMioglobinas.

5.2.5. Purificação das rMioglobinas

5.2.5.1. Cromatografia de troca-catiônica

O perfil cromatográfico da troca-catiônica obtido para as rMioglobinas foi semelhante para as duas espécies de *Biomphalaria* analisadas neste trabalho, sendo que a proteína de interesse se comportou de maneira parecida com a mioglobina nativa desses moluscos, ou seja, não interagiu com a resina (Figura 23). O pico referente à rMioglobina foi identificado pela técnica de SDS-PAGE e submetido à cromatografia de afinidade.

5.2.5.2. Cromatografia de afinidade

O pico referente à rMioglobina foi eluído com a adição direta do tampão contendo 0,5 M de imidazol (Figura 24).

Após as duas etapas cromatográficas as proteínas recombinantes foram consideradas puras por análise de SDS-PAGE (Figura 25) e por espectrometria de massas (Figura 26). A massa observada na espectrometria para ambas as rMioglobinas foi e aproximadamente 18.500 Da, destes, aproximadamente 2.500 Da são provenientes da cauda de histidina e outros aminoácidos acrescentados na porção amino-terminal das mioglobinas devido ao processo de clonagem, os quais foram removidos posteriormente por clivagem enzimática com Fator Xa. O resultado do *western blot* contribuiu para confirmar a identidade das proteínas recombinantes (Figura 27).

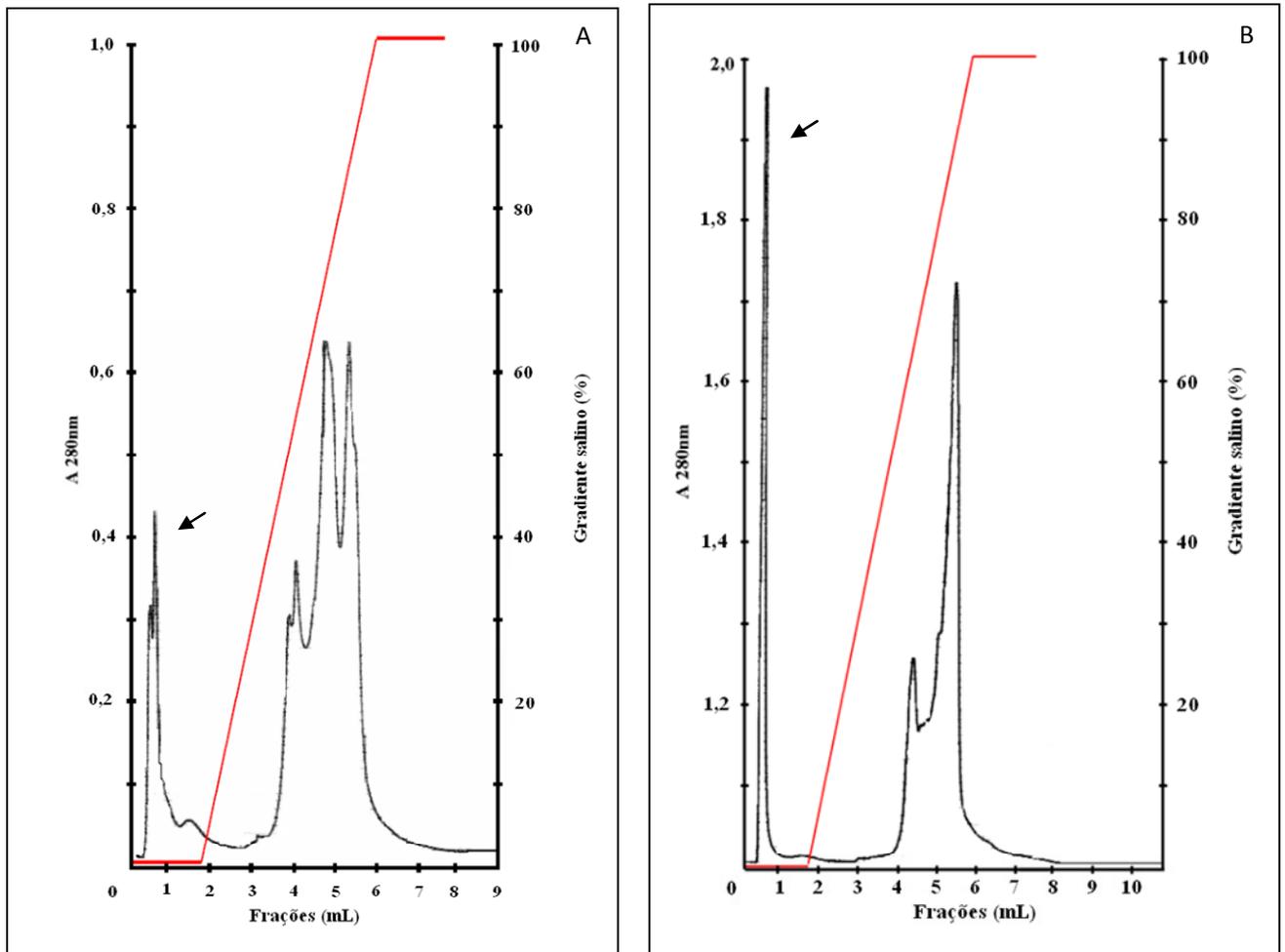


Figura 23. Perfil cromatográfico da troca-iônica do extrato bruto bacteriano. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. A seta aponta o pico referente à rMioglobina.

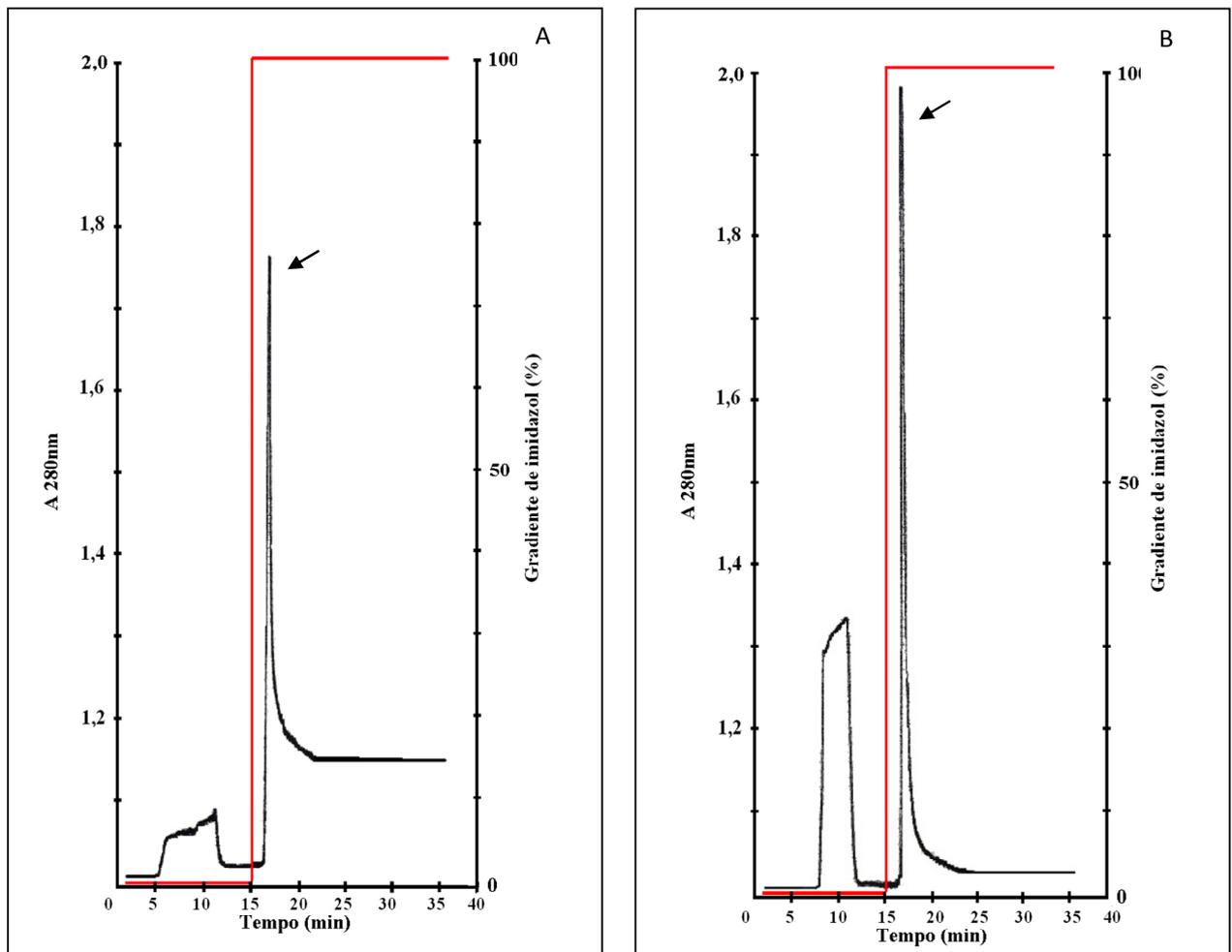


Figura 24. Perfil cromatográfico da afinidade do material proveniente da troca-iônica. A: *B. glabrata*. B: *B. tenagophila*. A seta aponta o pico referente à rMioglobina

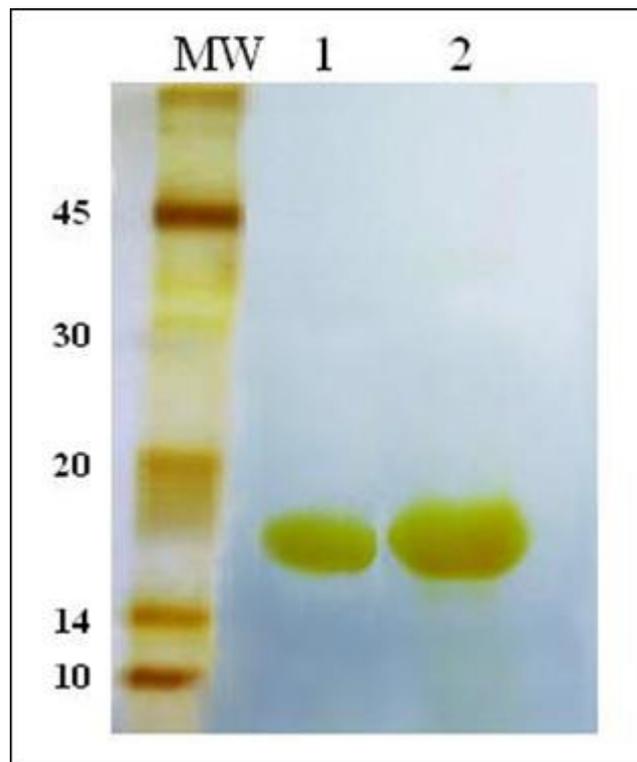


Figura 25. SDS-PAGE 12,5%, corado pelo método da prata, das rMioglobinas purificadas. MW: Padrão de massa molecular Low weight Sigma (kDa). 1: *B. glabrata*. 2: *B. tenagophila*.

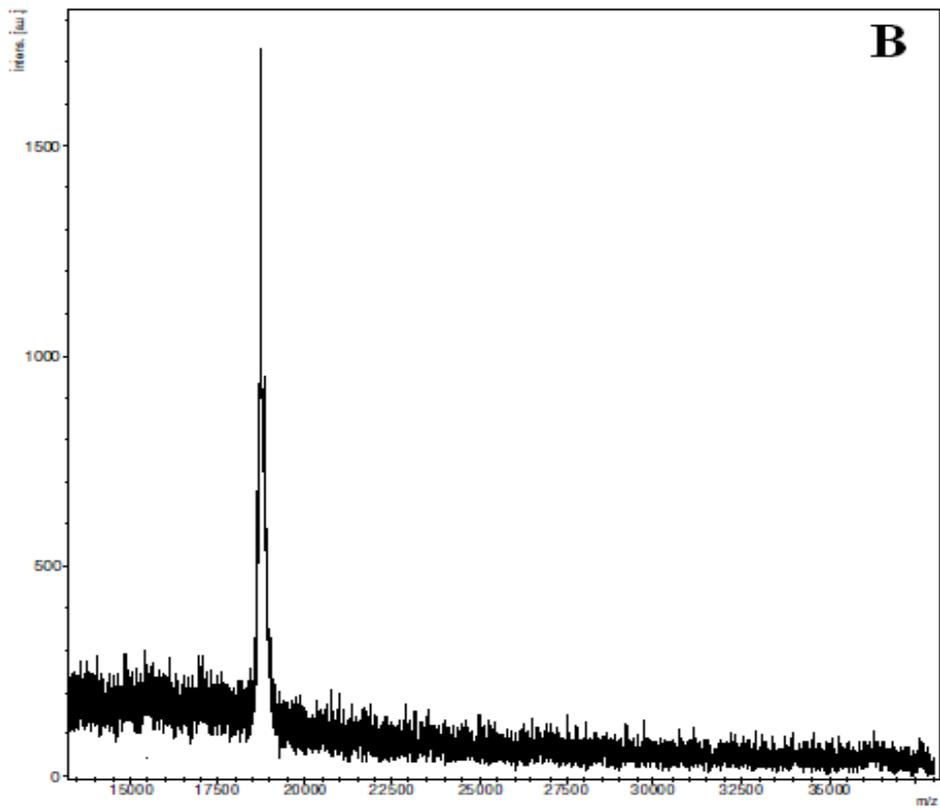
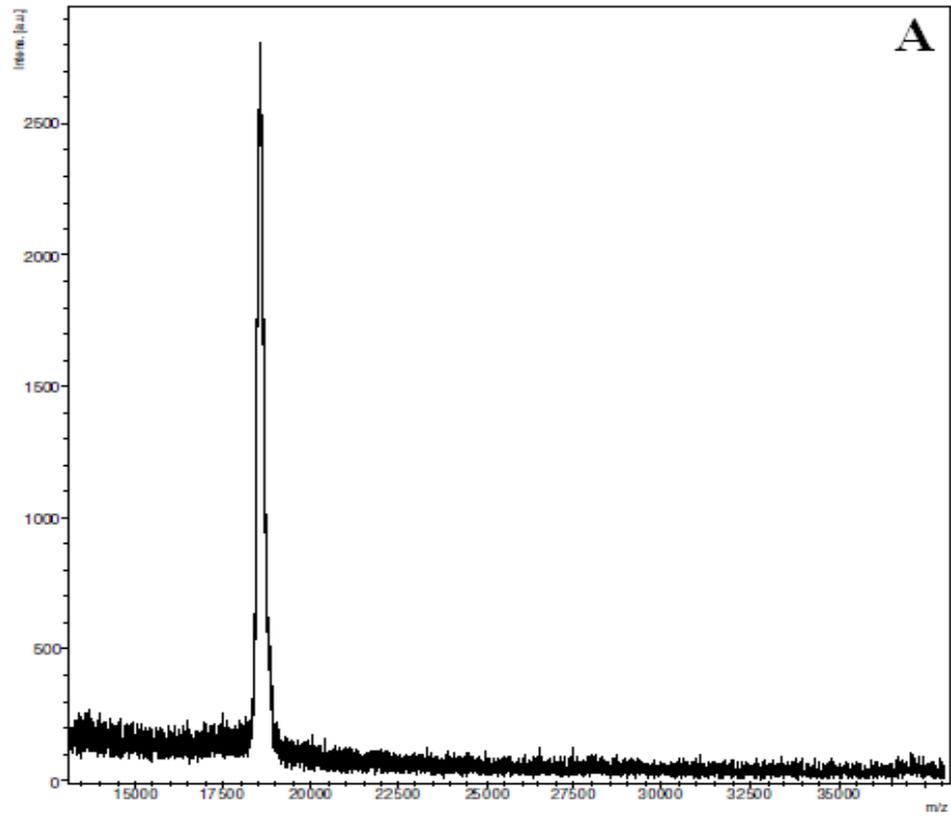


Figura 26. Gráficos de espectrometria de massas das rMióglobinas. A: *B. tenagophila*. B: *B. glabrata*.

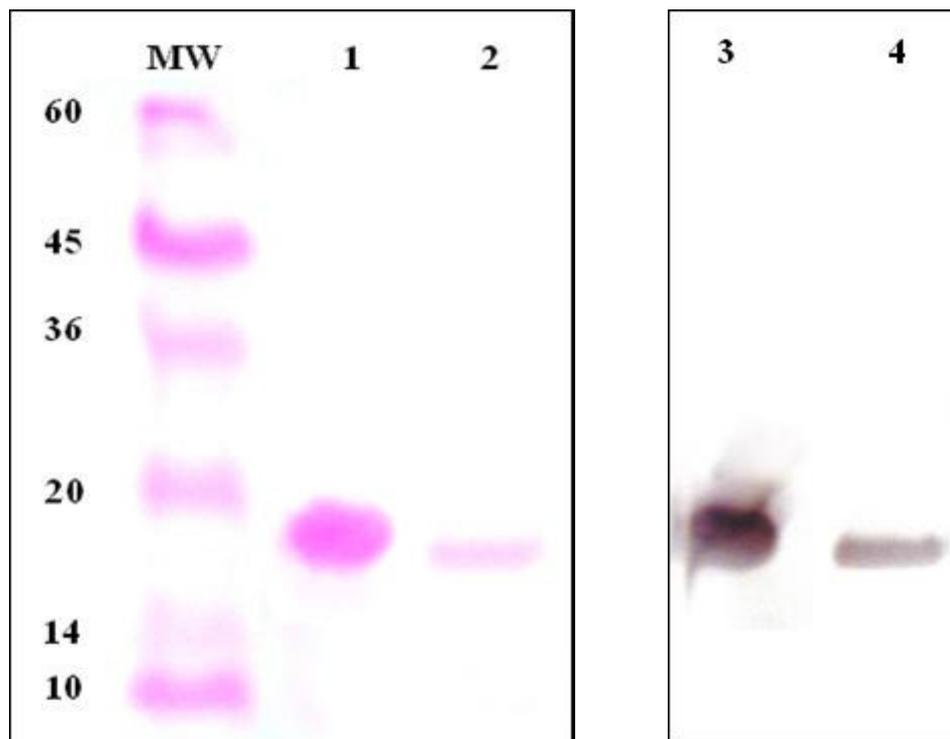


Figura 27. Western blot das proteínas recombinantes após a purificação. MW: Padrão de massa molecular Low weight Sigma (kDa) corado com Ponceau. 1: rMioglobina de *B. tenagophila* corado com Ponceau. 2: rMioglobina de *B. glabrata* corado com Ponceau. 3 e 4: Resultado do western blot para a rMioglobina de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, respectivamente.

5.2.6. Corte da cauda de histidina e demais aminoácidos do N-terminal das rMioglobinas

A reação de corte com Fator Xa se mostrou eficiente logo nas primeiras 6 h de reação. Com 36 h foi observado um pouco de degradação da mioglobina. O protocolo de reação com Fator Xa foi estabelecido com duração de 6 a 24 h, dependendo da quantidade e volume de material a ser digerido. A Figura 28 representa a reação realizada com apenas um dos clones, porém o resultado para ambos foi semelhante.

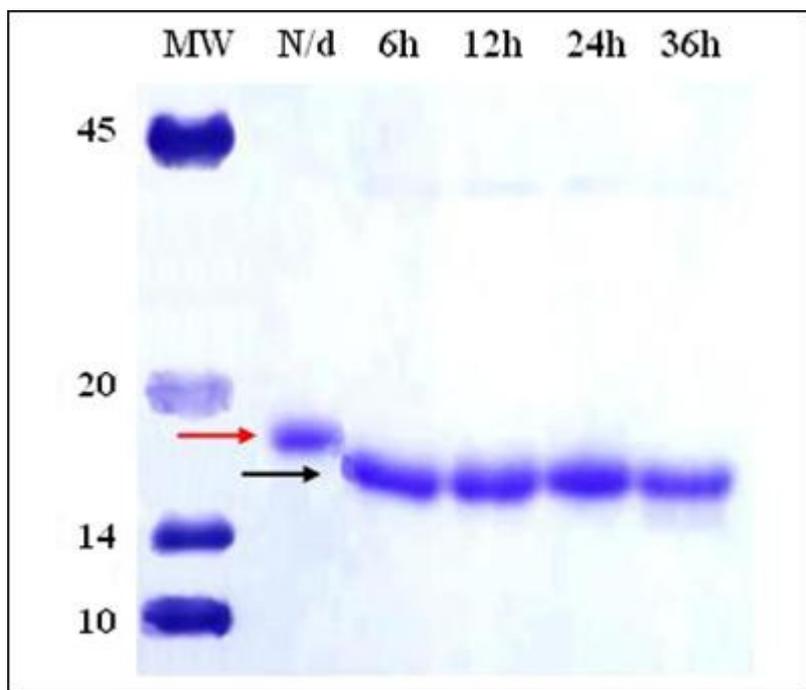


Figura 28. SDS-PAGE 12,5% da reação de digestão enzimática com Fator Xa. MW: Padrão de massa molecular Low weight Sigma (kDa). A seta vermelha aponta a mioglobina não digerida (N/d), e a seta preta aponta a mioglobina após a digestão.

5.2.7. Ligação de hemina às rMioglobinas

A mudança no espectro de absorção das rMioglobinas antes e após a ligação do grupo prostético mostra que o mesmo foi ligado às proteínas. A mudança de cor da mistura também indica a ligação do grupo prostético à proteína. A hemina livre, em solução, apresenta cor esverdeada, ao se ligar à mioglobina a mistura se torna avermelhada (absorção em 405 nm). As Figuras 29A e 29B mostram os resultados obtidos.

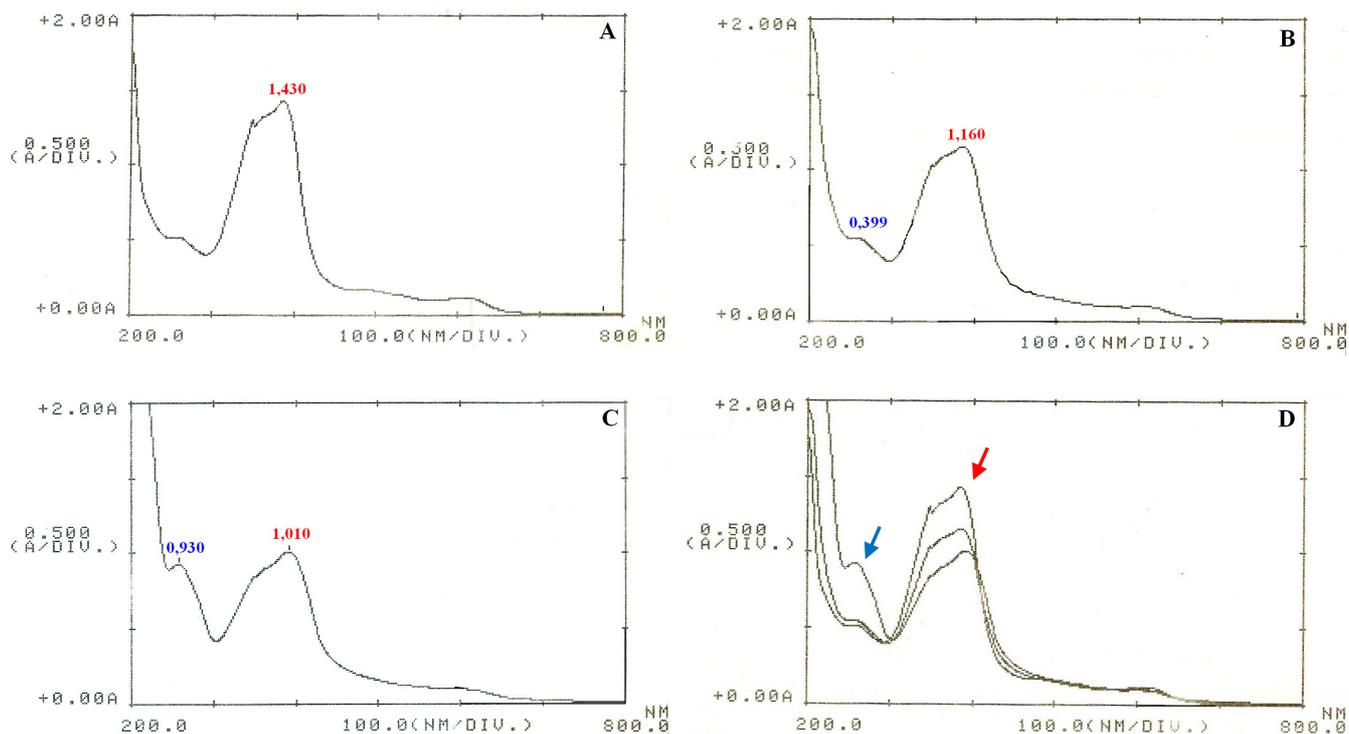


Figura 29A. Espectros de absorção (200-800 nm) da ligação do grupo prostético (hemina) com a rMioglobina de *B. glabrata*. A: Hemina livre em solução de NaOH. B: Acréscimo de rMioglobina à solução de hemina anterior. C: Aumento da quantidade de rMioglobina à solução de hemina. Em azul é mostrado o valor de absorção a 280 nm, e em vermelho a 400 nm. D: Sobreposição dos espectros A, B e C. A seta azul aponta o aumento da absorção da rMioglobina devido ao aumento de sua quantidade na solução de hemina, e a seta vermelha aponta o decréscimo da absorção de hemina, provavelmente pela sua ligação à rMioglobina.

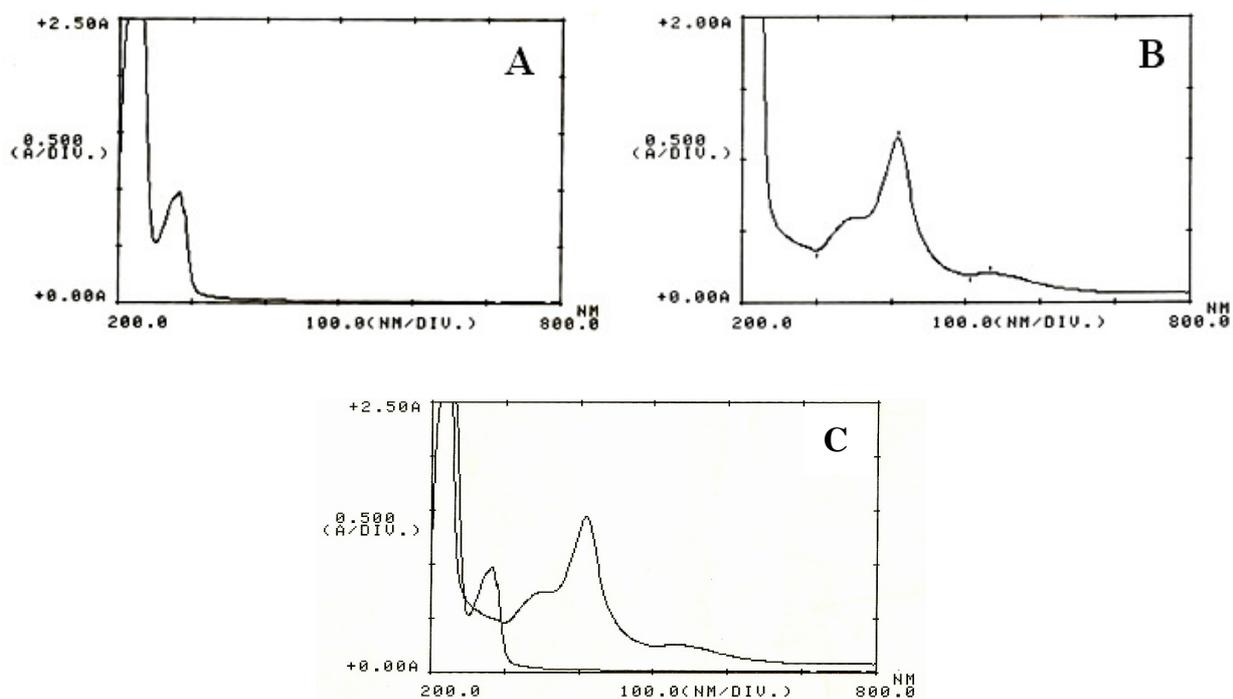


Figura 29B. Espectros de absorção (200-800 nm) da ligação do grupo prostético (hemina) com a rMioglobina de *B. tenagophila*. A: rMioglobina de *B. tenagophila* sem o grupo prostético (forma apo). B: rMioglobina de *B. tenagophila* ligada ao grupo prostético. C. Sobreposição dos espectros A e B.

5.2.8. Análise da transformação e atividade oxidase das rMioglobinas de *Biomphalaria* e das mioglobinas comerciais de coração de cavalo e baleia em oxidase

5.2.8.1. Experimentos controle

Para confirmar a ausência de atividade oxidase nas mioglobinas (sem nenhum tratamento) a serem testadas, para certificar que neste experimento a oxidação das moléculas de NADH não fosse causada pelo peróxido de hidrogênio utilizado na transformação das mioglobinas (transformação com H₂O₂) ou por aquele proveniente da própria reação realizada por enzimas oxidase, foram realizadas cinéticas de reação nas mesmas condições descritas no item 4.2.14.:

- Reação A. Contendo H₂O₂, porém sem acréscimo de mioglobina.
- Reações B. Contendo as mioglobinas não tratadas, sem H₂O₂ ou CCl₄, na reação (controle negativo).

Não foi realizada nenhuma reação controle para observar a influência do CCl₄ na reação, pois ele foi retirado das amostras de mioglobinas tratadas, por cromatografia, antes de proceder ao uso das mesmas.

As Figuras 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 são representativas dos experimentos realizados em triplicata.

As médias dos resultados obtidos foram analisadas estatisticamente por teste *t* de Student, sendo valor de $p > 0,05$.

A Figura 30 mostra o resultado da reação A, na qual o peróxido de hidrogênio não causou a oxidação do NADH, uma vez que não foi observada diminuição significativa do valor de absorvância desta molécula.

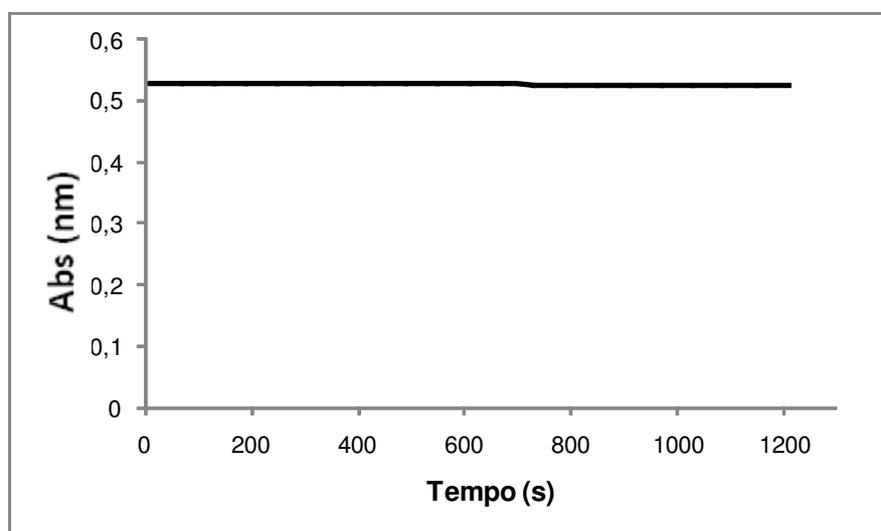


Figura 30. Gráfico de absorvância *versus* tempo do controle da influência do peróxido de hidrogênio na cinética de reação.

Os resultados das reações B (controles negativos) podem ser observados nas Figuras 31 e 32. A Figura 31 mostra o resultado das mioglobinas comerciais de cavalo e baleia, onde podemos observar a ausência de atividade oxidase das mioglobinas analisadas e a ausência de agentes capazes de oxidase as moléculas de NADH na reação, uma vez que nestes experimentos a variação da absorvância não foi significativa.

A Figura 32 mostra os resultado obtido para as rMioglobinas de *Biomphalaria*. É possível observar uma variação do valor da absorbância na reação com a rMioglobina de *B. glabrata* de aproximadamente 0,034 UA, e de aproximadamente 0,033 com a rMioglobina de *B. tenagophila*. Apesar de baixo, ele foi considerado significativo.

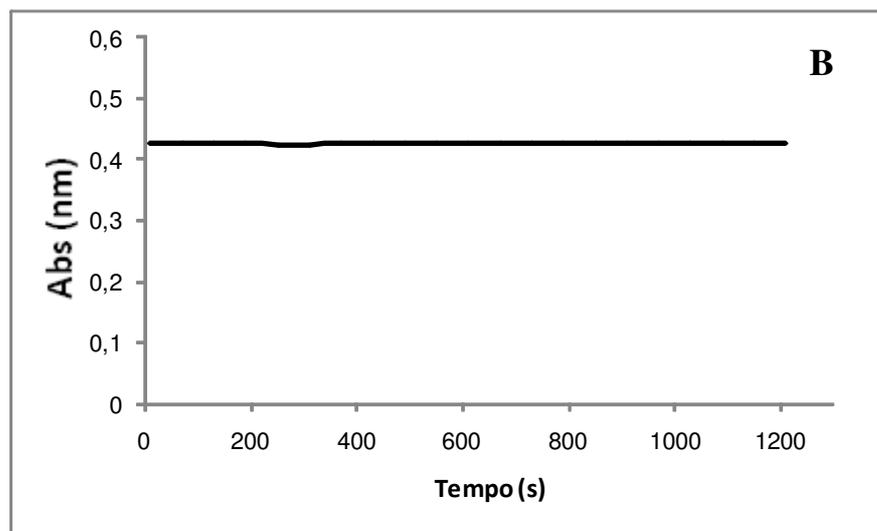
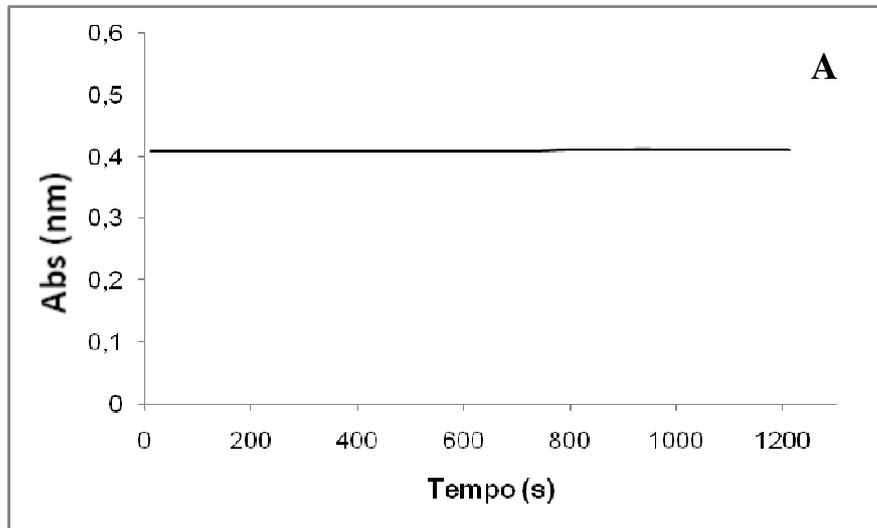


Figura 31. Gráfico de absorbância *versus* tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com mioglobinas comerciais não tratadas. A: Mioglobina de coração de cavalo. B: Mioglobina de baleia.

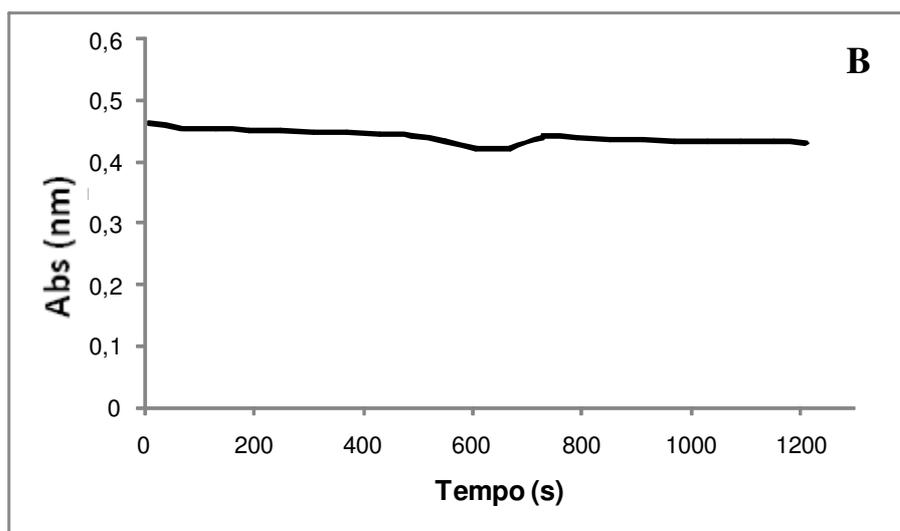
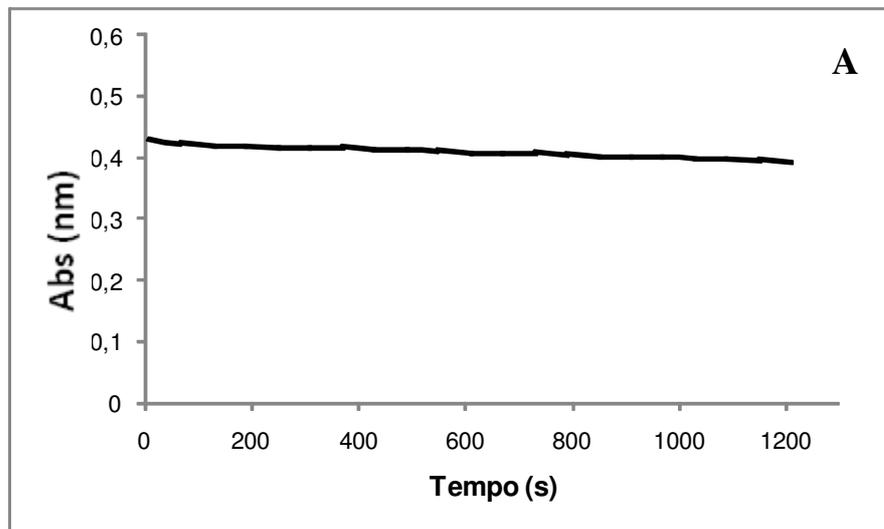


Figura 32. Gráfico de absorvância *versus* tempo da cinética da reação de teste da função oxidase com rMioglobinas não tratadas. A: rMioglobina de *B. glabrata*. B: rMioglobina de *B. tenagophila*.

5.2.8.2. Tentativa de transformação com CCl₄

Na Figura 33 é possível observar uma diminuição do valor de absorvância a 340 nm nas reações utilizando as mioglobinas comerciais, tratadas com CCl₄. Para a mioglobina de coração de cavalo foi observada uma diminuição da absorvância de aproximadamente 0,40 UA, e para a mioglobina de baleia a diminuição foi de aproximadamente 0,50 UA. Os valores de diminuição de absorvância a 340 nm, o que indica a oxidação do NADH, obtidos neste experimento, quando comparados aos valores dos controles negativos, sugere que após o tratamento com o CCl₄ a atividade oxidase foi adquirida pelas mioglobinas em questão.

O resultado da análise da presença de atividade oxidase nas rMioglobinas de *B. glabrata* e *B. tenagophila* é mostrada na Figura 34. Como pode ser observado, a diminuição do valor de absorvância a 340 nm para a rMioglobina de *B. glabrata* foi de aproximadamente 0,017 UA e para a rMioglobina de *B. tenagophila* a diminuição é de aproximadamente 0,019 UA. Em relação às mioglobinas comerciais tratadas com CCl₄, estes valores são muito baixos (menores que os controles negativos) e não poderiam, portanto, indicar a presença de atividade oxidase nessas mioglobinas, de acordo com o resultado do teste estatístico (teste *t* de Student) realizado ($p > 0,05$).

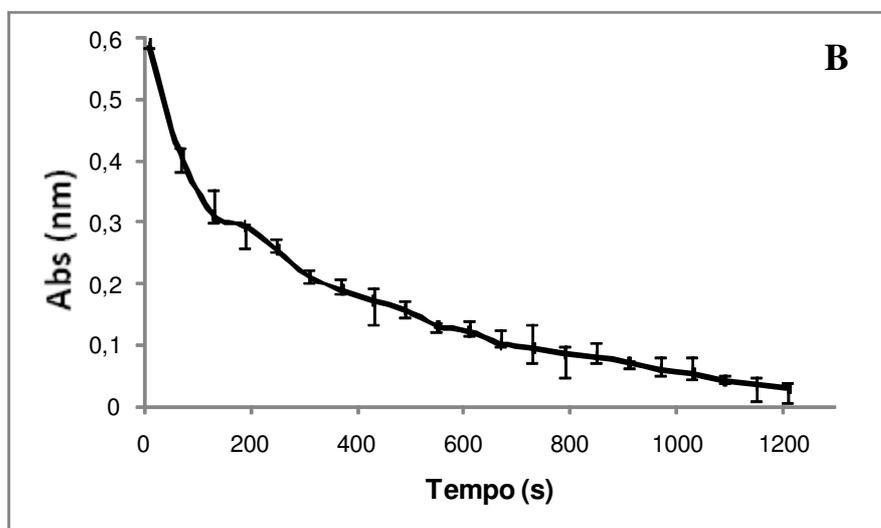
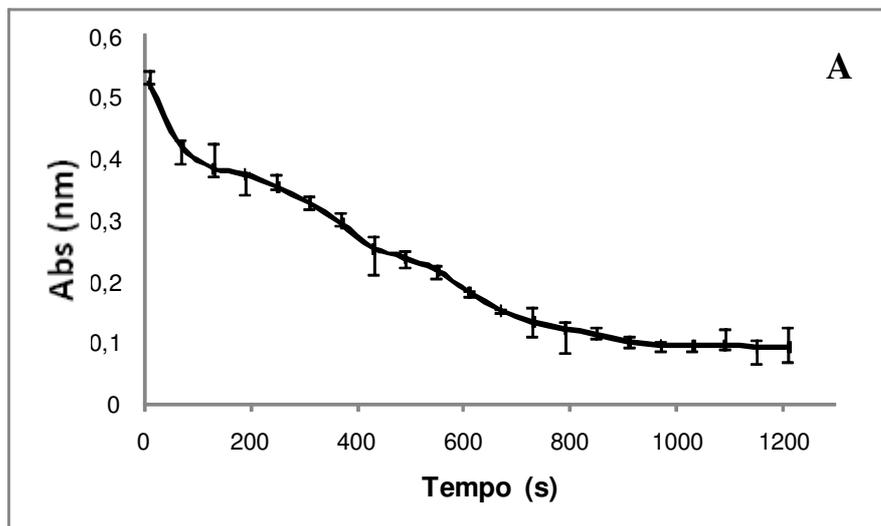


Figura 33. Gráfico de absorbância *versus* tempo da reação de teste da função oxidase com mioglobinas após serem tratadas com CCl_4 . A: Mioglobina de coração de cavalo. B: Mioglobina de baleia.

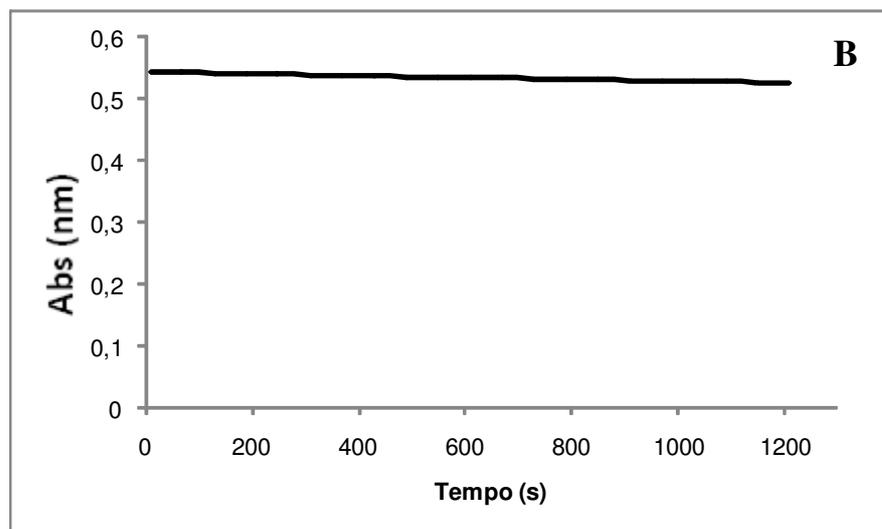
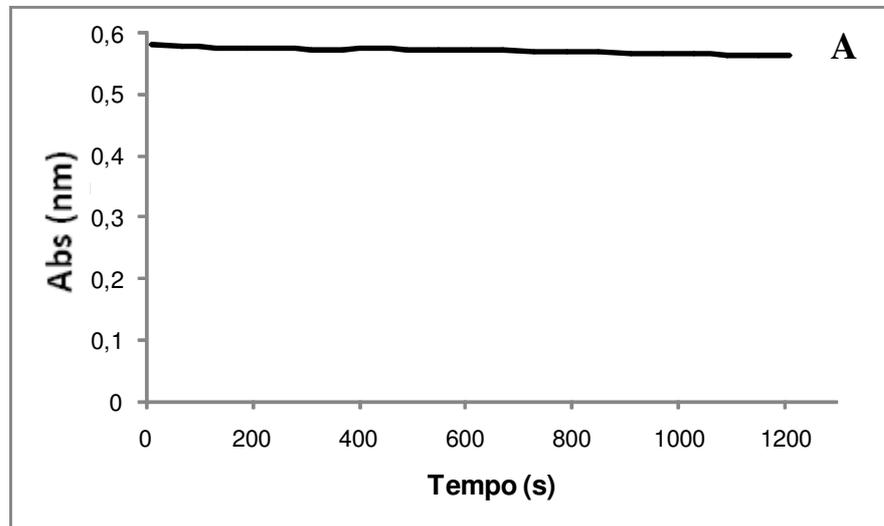


Figura 34. Gráfico de absorvância *versus* tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com rMioglobinas de *Biomphalaria* após serem tratadas com CCl_4 . A: de *B. glabrata*. B: rMioglobina de *B. tenagophila*.

5.2.8.3. Tentativa de transformação com H₂O₂

A Figura 35 mostra uma diminuição do valor de absorvância de NADH a 340 nm nas reações onde foram utilizadas as mioglobinas comerciais de cavalo e baleia tratadas com H₂O₂. Na reação com a mioglobina de coração de cavalo foi observada uma diminuição da absorvância de aproximadamente 0,20 UA, e na reação na qual foi utilizada a mioglobina de baleia a diminuição foi de aproximadamente 0,25 UA. Valores um pouco menores de variação foram obtidos nas reações com as rMioglobinas de *Biomphalaria* tratadas com H₂O₂: 0,13 UA para a rMioglobina de *B. glabrata* e 0,15 UA para a mioglobina de *B. tenagophila* (Figura 36).

Apesar de esses valores serem menores em relação aos valores obtidos nas reações realizadas com as mesmas proteínas tratadas com CCl₄, em relação às reações controle, e de acordo com o resultado do teste estatístico (teste *t* de Student) realizado ($p > 0,05$), essa variação pode ser considerada como atividade oxidase adquirida pelas mioglobinas tratadas com H₂O₂.

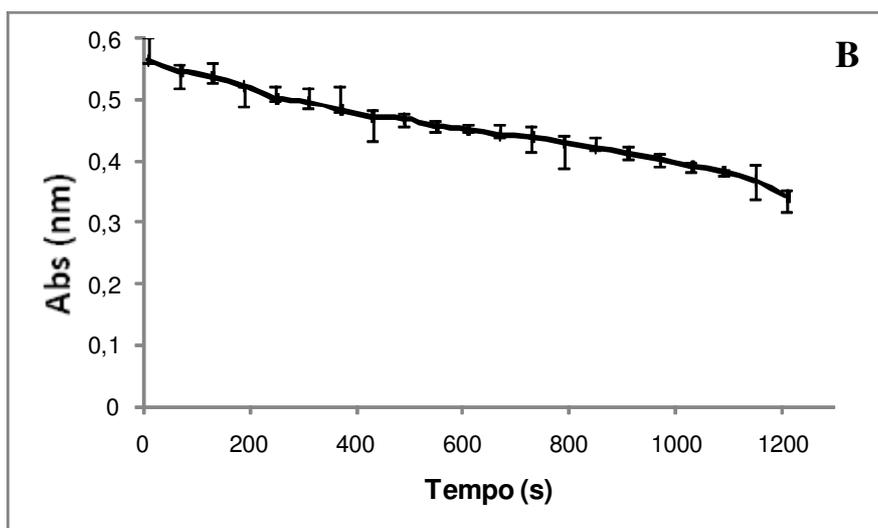
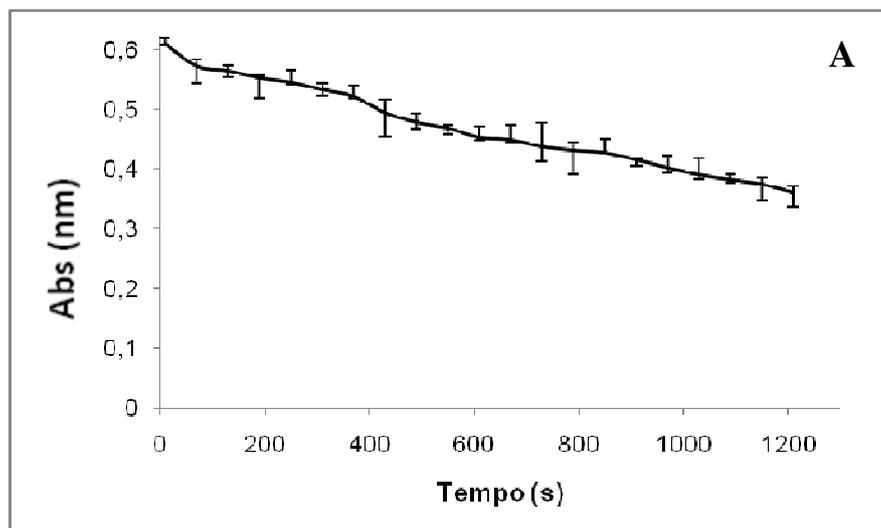


Figura 35. Gráfico de absorbância *versus* tempo da cinética de reação de teste da função oxidase com mioglobinas comerciais após serem tratadas com H_2O_2 . A: Mioglobina de coração de cavalo. B: Mioglobina de baleia.

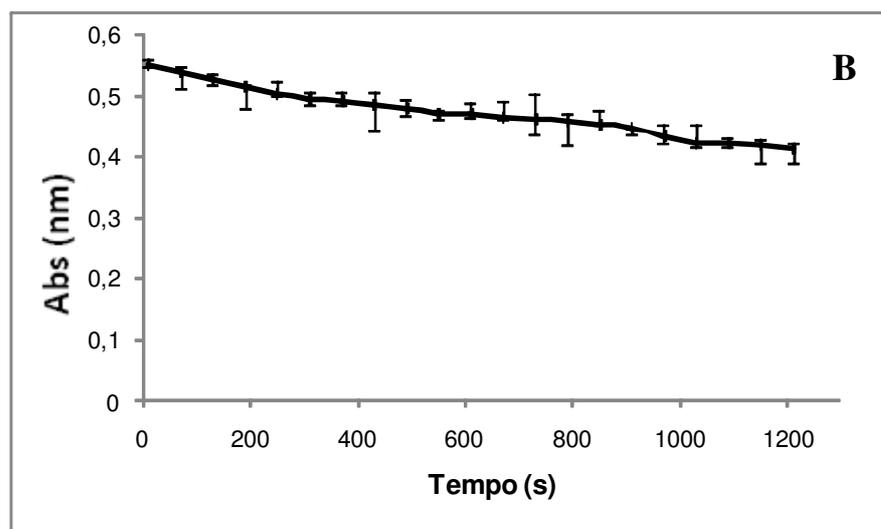
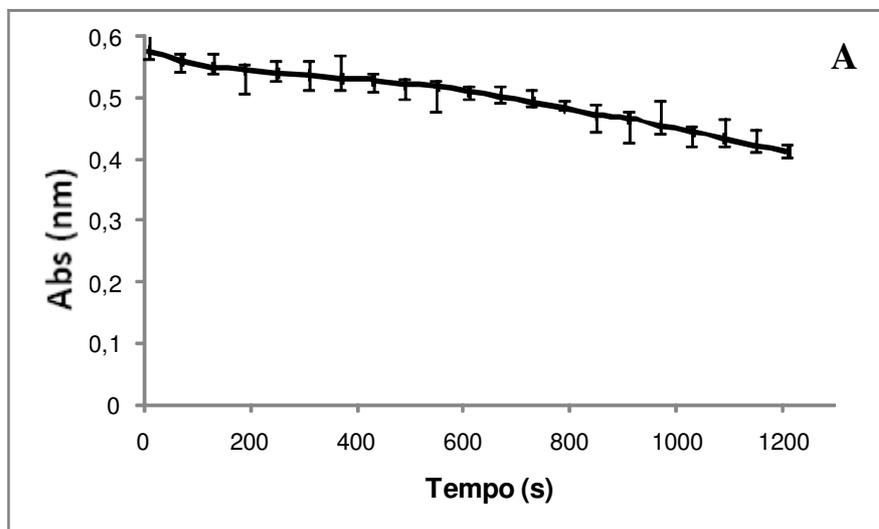


Figura 36. Gráfico de absorvância *versus* tempo da cinética da reação de teste da função oxidase com rMioglobinas de *Biomphalaria* após serem tratadas com H_2O_2 . A: rMioglobina de *B. glabrata*. B: rMioglobina de *B. tenagophila*.

5.3. PARTE III

5.3.9. Modelagem molecular das mioglobinas de *Biomphalaria* e demais análises *in silico*

5.3.9.1. Obtenção dos modelos de estrutura

Para cada uma das três espécies de *Biomphalaria* foi realizada uma busca individual por alinhamento global no PDB.

Como as sequências primárias das mioglobinas das três espécies de *Biomphalaria* analisadas neste trabalho são muito semelhantes (96 a 98% de identidade), o mesmo molde foi escolhido para a modelagem por homologia. O molde mais propício, de acordo com os resultados da busca no PDB foi uma hemoglobina homodimérica (cadeias A e B) de um molusco marinho denominado *Scapharca inaequivalvis* pertencente à classe Bivalvia (PDB: 2AV0), cuja resolução da estrutura é 1,50 Å. Para molde foi utilizada a cadeia A.

O controle positivo escolhido foi a mioglobina de *Aplysia limacina*, um molusco marinho pertencente à classe Gastropoda (PDB: 1MBA). O valor da resolução da mioglobina controle é 1,60 Å. A identidade das seqüências pode ser observada na Tabela 10.

A Figura 37 mostra o alinhamento das sequências primárias das três mioglobinas de *Biomphalaria* (cada uma com 150 resíduos de aminoácidos), a mioglobina molde e o controle positivo, ambas com 146 resíduos de aminoácidos.

Os modelos gerados para as mioglobinas dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e para o controle positivo são compatíveis com o clássico *myoglobin fold*. A sobreposição da estrutura do controle positivo, obtida experimentalmente por cristalografia e difração de raios X, com o seu modelo gerado por modelagem molecular mostrou que o mesmo foi satisfatório uma vez que não foram observadas grandes discrepâncias entre as estruturas (Figura 38).

| Espécie de molusco | Código PDB | Identidade com o molde (2AV0) |
|-------------------------|------------|-------------------------------|
| <i>B. glabrata</i> | _____ | 27% |
| <i>B. tenagophila</i> | _____ | 27% |
| <i>B. straminea</i> | _____ | 27% |
| <i>A. limacina</i> (C+) | 1MBA | 23% |

Tabela 10. Valor percentual de identidade entre as proteínas a serem modeladas e o molde.

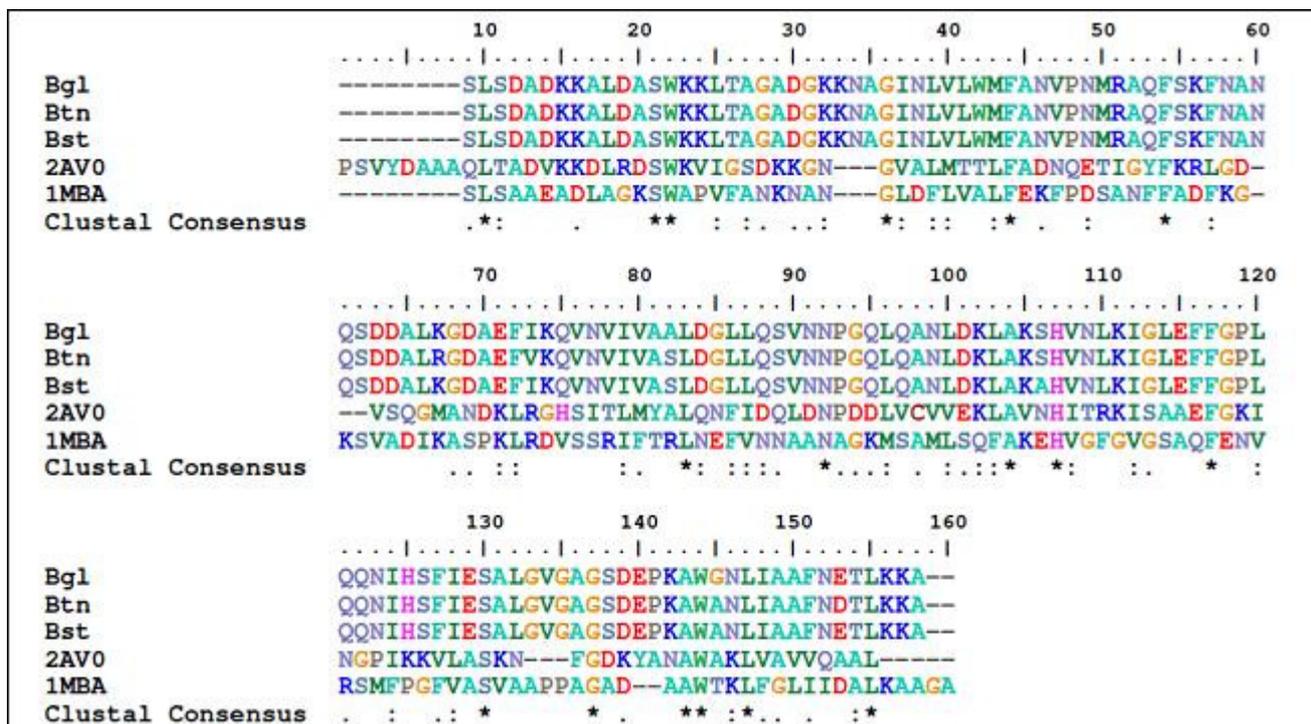
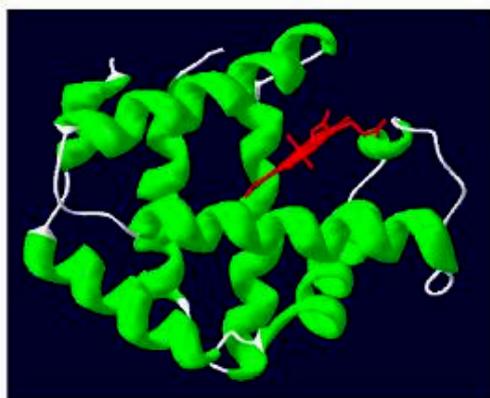
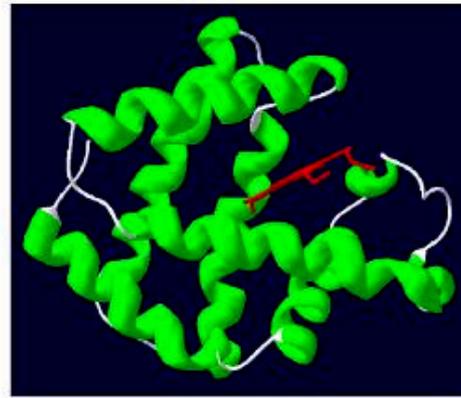


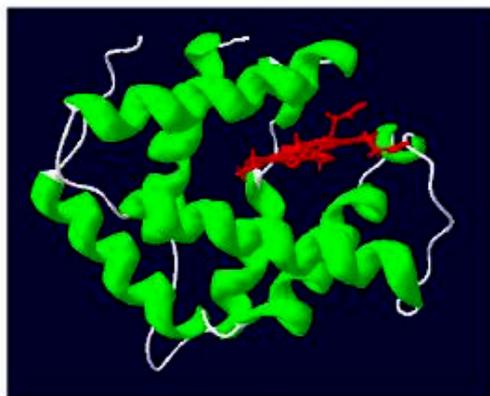
Figura 37. Alinhamento global das sequências primárias das mioglobinas de *Biomphalaria*, com o molde e o controle para a modelagem molecular. Bgl: *B. glabrata*, Btn: *B. tenagophila*, Bst: *B. straminea*, 2AV0: molde, 1MBA: controle.



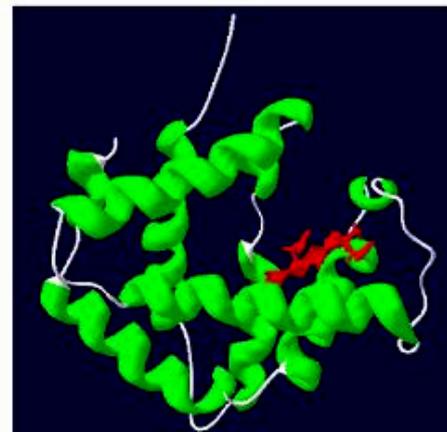
2AV0



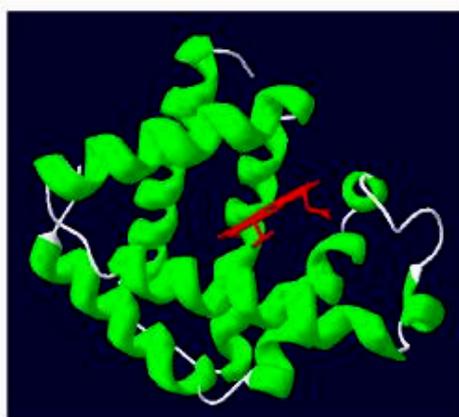
1MBA



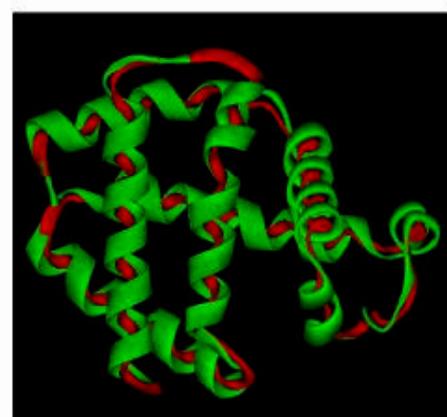
B. glabrata



B. tenagophila



Modelo controle



Sobreposição do controle 1MBA
(verde) com seu modelo (vermelho)

Figura 38. Modelos de estrutura gerados por modelagem por homologia *in silico*.

5.3.9.2. Análise do posicionamento de resíduos importantes para a atividade oxidase em mioglobinas

5.3.9.2.1. Transformação com CCl₄: importância das histidinas

O grupo heme é ligado à mioglobina pela histidina proximal (F8), resíduo 93 na sequência primária da mioglobina de cavalo e de baleia, e pelo resíduo de aminoácido 100 nas sequências primárias das mioglobinas das três espécies de *Biomphalaria* estudadas.

A histidina distal (E7), que auxilia na interação do grupo heme ao seu ligante, é o resíduo 64 na sequência primária das mioglobinas de cavalo e de baleia. Este resíduo não está presente nas mioglobinas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Em substituição encontra-se um resíduo de glutamina na posição 68. A atividade oxidase nas mioglobinas de cavalo e baleia, de acordo com a literatura, é devida à ligação covalente do resíduo de histidina 93 ao grupo vinil I do grupo heme, após uma reação com o BrCCl₃, o mesmo resultado pode ser esperado no tratamento com CCl₄, um haleto de alquila assim como o BrCCl₃. A histidina 97 também é importante para a atividade oxidase em mioglobinas, este resíduo, porém não está presente em nenhuma das espécies de *Biomphalaria* estudadas (Figura 39). Apenas duas histidinas estão presentes na sequência primária das mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* estudadas, o resíduo proximal e o resíduo 118 (Figura 40).

5.3.9.2.2. Transformação com H₂O₂: importância tirosinas

A atividade oxidase nas mioglobinas de cavalo e baleia após o tratamento com H₂O₂, de acordo com a literatura, é devida a uma ligação covalente do resíduo de tirosina 103 ao grupo heme. As mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* estudadas não apresentam nenhum resíduo de tirosina em sua sequência primária (Figura 39 e Apêndice 1).

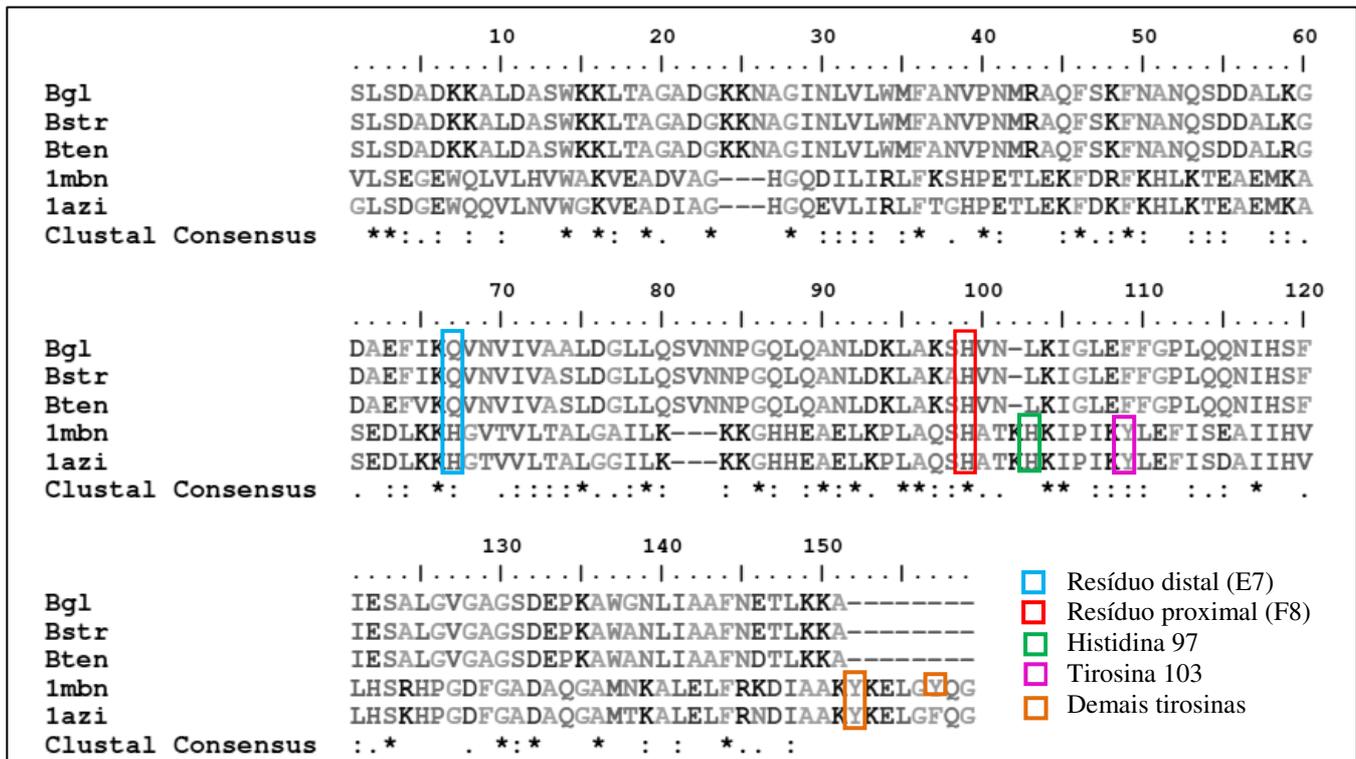


Figura 39. Alinhamento global das seqüências primárias das mioglobinas de *Biomphalaria*, com as mioglobinas comerciais utilizadas como controle para a atividade oxidase. Bgl: *B. glabrata*, Btn: *B. tenagophila*, Bst: *B. straminea*, lmbn: mioglobina de baleia, lazi: mioglobina de coração de cavalo.

Assim como a tirosina, a serina possui uma hidroxila na cadeia lateral, a qual é importante para a interação com o grupo heme para conferir atividade oxidase às mioglobinas.

Nas mioglobinas de cavalo e baleia existe um resíduo de serina (Ser 92) próximo ao grupo heme, porém a interação do grupo heme ocorre com o resíduo de tirosina 103. Apesar das mioglobinas de *Biomphalaria* não possuírem nenhum resíduo de tirosina, elas possuem muitos resíduos de serina (10 ou 11), quase o dobro da quantidade de serinas das mioglobinas de cavalo (5) e baleia (6). A mioglobina de *B. glabrata* apresenta um resíduo de serina (Ser 99) próximo à histidina proximal (His 100) que está bem próxima ao grupo heme, e na mioglobina de *B. tenagophila*, além da Ser 99, há uma Ser 75, também muito próxima ao grupo heme (Figura 40). Os resíduos de fenilalanina, que provavelmente estão envolvidos na aquisição da atividade oxidase pelas mioglobinas, estão evidenciados nas mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* estudadas neste trabalho, como mostra a Figura 41. A maioria dos resíduos de fenilalanina se encontra próxima do grupo heme, compondo o bolso hidrofóbico no qual o mesmo se insere (Figura 42).

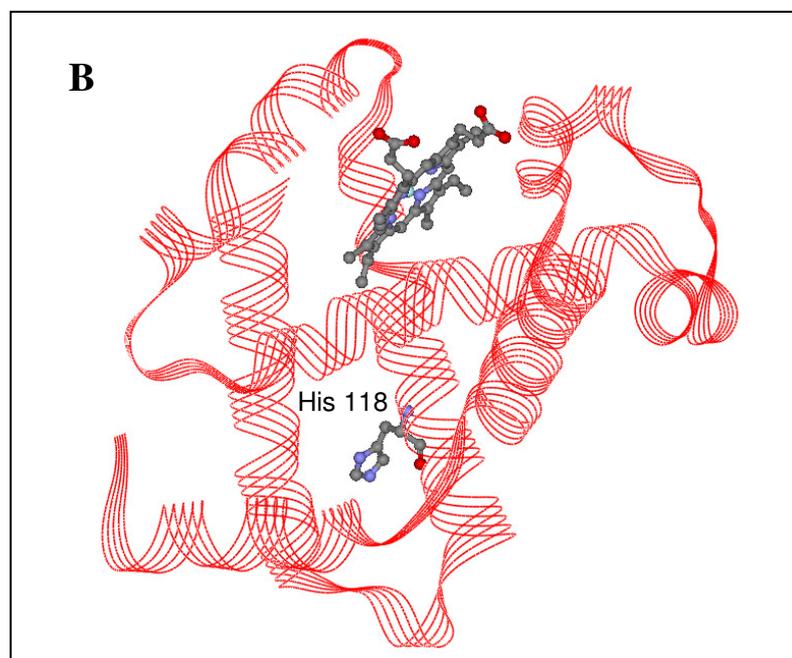
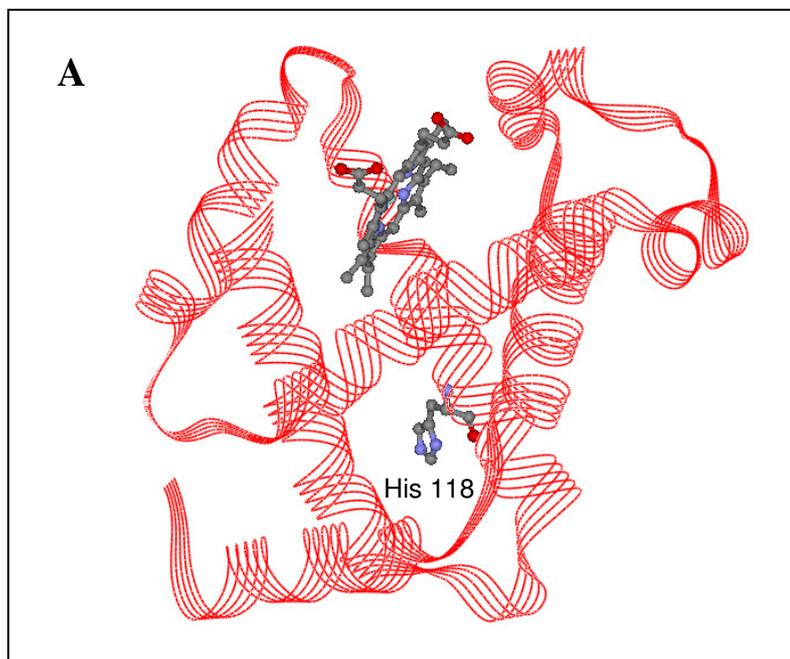


Figura 40. Posição do resíduo de histidina 118 nos modelos de estrutura das mioglobinas de *B. glabrata* (A) e de *B. tenagophila* (B). O posicionamento das estruturas foi similar.

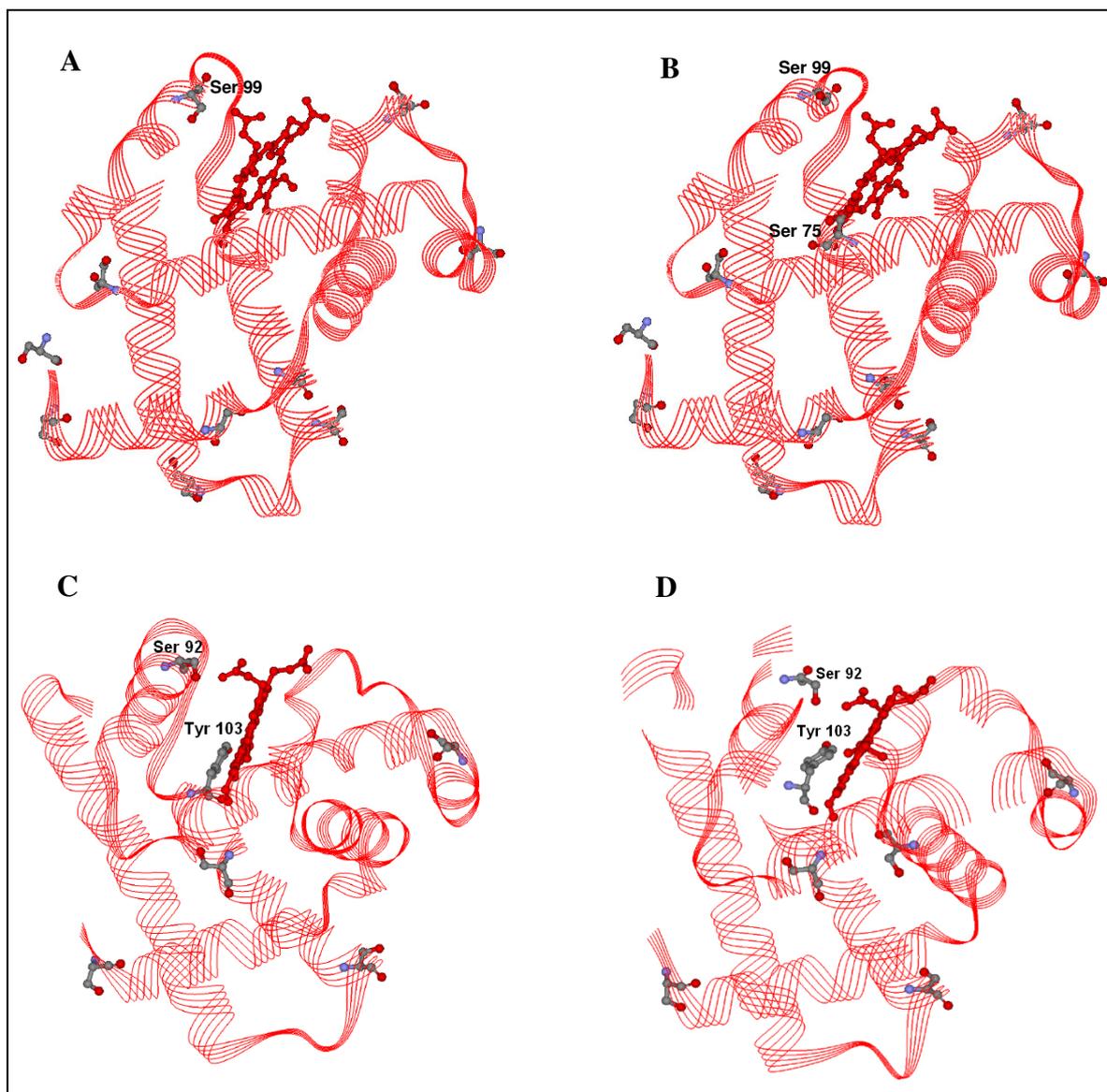


Figura 41. Modelos de estrutura das mioglobinas de *B. glabrata* (A) e de *B. tenagophila* (B); estruturas experimentais das mioglobinas de baleia (C) e de coração de cavalo (D). Em evidência estão os resíduos de serina (Ser) e tirosina (Tyr). Os demais resíduos evidenciados e não nomeados são serinas. O posicionamento das estruturas foi similar.

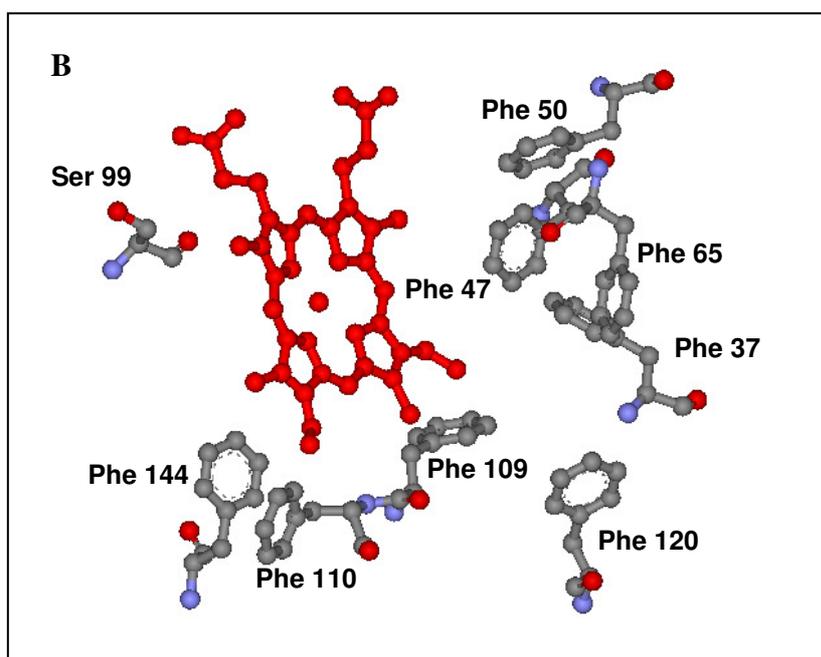
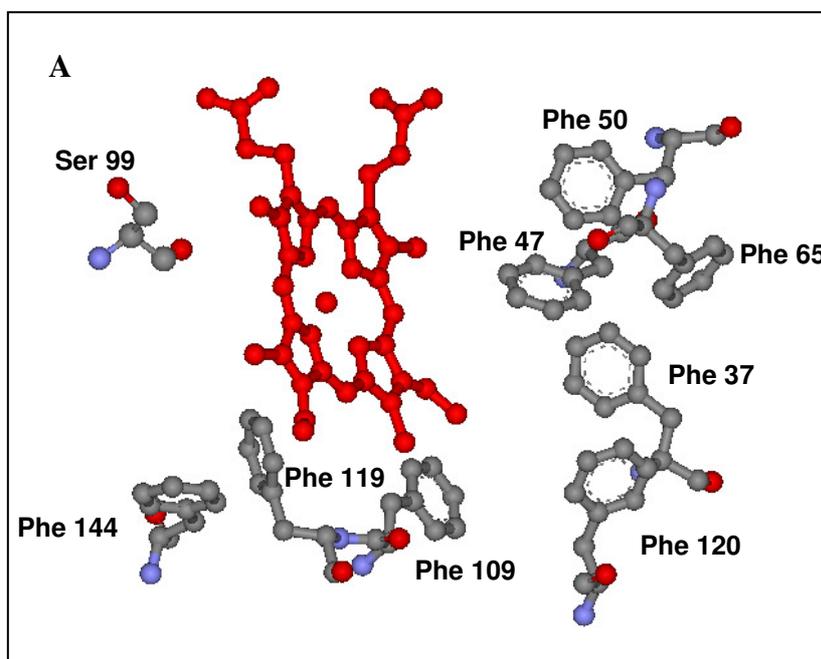


Figura 42. Posição dos resíduos de fenilalanina (Phe) e da Ser 99 em relação ao grupo heme nas mioglobinas de *B. glabrata* (A) e *B. tenagophila* (B).

DISCUSSÃO



6. DISCUSSÃO

As globinas estão presentes em vários filos de organismos, e no filo Mollusca (reino Metazoa) parecem ser mais comuns nas espécies que vivem expostas a baixas pressões de oxigênio (Weber, 1980). Essas proteínas se encontram distribuídas em alguns tecidos e também na hemolinfa desses invertebrados; nessa última podem ser encontradas globinas intracelulares ou extracelulares. Globinas teciduais são comumente encontradas na musculatura radular, no tecido neural e no coração de vários moluscos gastrópodes. Em moluscos bivalves as globinas são encontradas no músculo adutor, no músculo cardíaco e no músculo podal (Weber & Vinogradov, 2001).

As globinas de moluscos têm sido amplamente estudadas, e os resultados de tais estudos denotam sua enorme variabilidade em termos estruturais e funcionais, e mostram que ainda há muito que se estudar a respeito dessas proteínas (Ordway & Garry, 2004).

As funções fisiológicas das mioglobinas citoplasmáticas têm recebido maior atenção em relação às hemoglobinas; essa atenção é baseada na falta de cooperatividade, ausência de heterogeneidade funcional, transições conformacionais e sensibilidade a pH e a efetores alostéricos apresentados pela mioglobina. Em termos de localização, as mioglobinas geralmente ocorrem em órgãos propensos a um déficit de oxigênio, e tal ocorrência desafia a categorização dos organismos em relação à filogenia e condições ambientais. Com base em seus sítios histológicos, estrutura e propriedades fisiológicas, as mioglobinas de invertebrados podem ser divididas em três classes: mioglobinas citoplasmáticas não circulantes, mioglobinas eritrocitárias (citoplasmáticas), e mioglobinas extracelulares (Weber & Vinogradov, 2001).

As mioglobinas citoplasmáticas podem ser encontradas em vários tipos de tecidos e células (músculos, nervos, tentáculos, brânquias e gametas) de animais invertebrados filogeneticamente diversificados. Especificamente em moluscos, as mioglobinas são encontradas

no músculo radular, parede corporal, músculo adutor, musculatura estomacal (Terwilliger & Terwilliger, 1985) e tecido neural (Kraus *et al.*, 1988).

Dewilde e colaboradores (1998) relataram a presença de uma mioglobina monomérica na musculatura radular do molusco *B. glabrata* e forneceram sobre ela dados de sequência nucleotídica e de sequência primária, afinidade de ligação a oxigênio, massa molecular aparente e teórica. Demais dados sobre essa proteína e suas isoformas presentes em *B. tenagophila* e *B. straminea* foram obtidas no trabalho de mestrado precedente a esta tese, como a massa molecular experimental.

Outros dados bioquímicos foram gerados no presente trabalho, assim como dados referentes a uma mioglobina estomacal purificada a partir das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*. O estômago desses animais foi identificado morfológicamente após dissecação; trata-se de um órgão anular de paredes espessas, e um revestimento de fibras musculares em círculos. A cavidade é preenchida com concreções semitransparentes inseridas na parede interna do órgão (Ghiretti *et al.*, 1959).

Para a caracterização das mioglobinas estomacais, essas foram inicialmente isoladas, sendo observado que o comportamento dessas proteínas, durante as etapas cromatográficas, muito semelhante ao comportamento das mioglobinas radulares. Dentre essas características estão o volume de eluição e o tempo de retenção. Isso indica que elas possuem características químicas semelhantes entre si, porém apenas com tais dados não é possível afirmar que as mioglobinas estomacais e radulares sejam a mesma proteína em cada uma das espécies consideradas, uma vez que não foram analisadas as sequências nucleotídicas das mioglobinas estomacais, ou mesmo suas sequências primárias devido a um impedimento técnico do sequenciamento de aminoácidos devido a um bloqueio na porção amino-terminal das mesmas.

A mioglobina radular de *B. glabrata* possui um bloqueio na extremidade amino-terminal (Dewilde *et al.*, 1998), assim como as mioglobinas radulares de *B. tenagophila* e *B. straminea* (dados obtidos no mestrado). Esse bloqueio, que também está presente nas mioglobinas estomais

de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, pode ser uma modificação pós-traducional, como uma acetilação. Proteínas com serina e alanina como primeiro resíduo da extremidade amino-terminal são frequentemente acetiladas (Polevoda & Sherman, 2002). As mioglobinas radulares das espécies de *Biomphalaria* estudadas neste trabalho possuem um resíduo de serina; esse resíduo pode ser também o primeiro da sequência primária das mioglobinas estomacais.

A massa molecular experimental obtida para as mioglobinas estomacais foram muito semelhantes às das radulares, no caso da espécie *B. glabrata*, esse valor foi praticamente idêntico. Tais valores, de aproximadamente 16 kDa, corroboram com os valores encontrados na literatura para globinas de cadeia única (Suzuki & Imai, 1998). A técnica de SDS-PAGE também mostrou esse resultado, e confirmou a eficiência do processo cromatográfico em relação à pureza das proteínas isoladas. A análise do gel utilizando o programa Quantity one (Bio Rad) mostrou que os extratos brutos radulares de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* possuem conteúdos protéicos muito parecidos entre si, assim como os extratos brutos estomacais. Os extratos radulares e estomacais de uma mesma espécie apresentam similaridade para a maioria das proteínas, sendo que a mioglobina representa aproximadamente 80% do total de proteínas do extrato radular e aproximadamente 85% do total de proteínas do extrato estomacal.

Os pontos isoelétricos das mioglobinas radulares e estomacais dos moluscos *Biomphalaria* analisados nesse trabalho também foram semelhantes entre as espécies. Os valores obtidos, em torno de 8,0, corroboram com a faixa de valores de ponto isoelétrico de outras mioglobinas bem descritas na literatura, como a de coração de cavalo (7,3) e a de baleia (8,3) (Westermeier *et al.*, 1985). Para proteínas, o ponto isoelétrico varia com o número de grupos inseridos em sua sequência, e varia também se os grupos inseridos são eletricamente carregados (Legendre *et al.*, 1998).

Em relação à estrutura tridimensional, as mioglobinas de moluscos apresentam grande diversificação, podendo ser encontradas como dímeros unidos por pontes dissulfeto, na ordem Anfineura (chitons). Smith e colaboradores (1988) sugeriram que a presença simultânea, em

chitons, de mioglobinas monoméricas e diméricas no mesmo tecido (órgão) está relacionada ao fato de esses organismos possuírem um habitat intertidal, o que requer sistemas de ligação ao oxigênio otimizados para ambientes aquáticos e terrestres.

A mioglobina monomérica do chiton da espécie *Liolophura japonica* parece ser altamente resistente à auto-oxidação (0,0073/h), que se apresenta de 3 a 20 vezes mais lenta se comparada às mioglobinas de outros moluscos (Suzuki *et al.*, 1993). As mioglobinas radulares (0,0020/h e 0,0012/h) e estomacais (0,0008/h e 0,0010/h) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* (respectivamente) possuem taxas de auto-oxidação mais baixas que a mioglobina de *Liolophura japonica*, indicando uma resistência ainda maior à auto-oxidação. A taxa de auto-oxidação da mioglobina estomacal de *B. tenagophila* é 1,2 vezes menor que a da sua equivalente radular, e para *B. glabrata* a mioglobina estomacal possui uma taxa de auto-oxidação 2,5 vezes menor que a radular.

Em 1992, Carver e colaboradores construíram uma mioglobina recombinante de baleia na qual o resíduo de leucina B10, posição 29, foi substituída por uma fenilalanina. Essa mutação produziu uma proteína, que em sua forma oxigenada, se mostrou idêntica à proteína nativa em termos de estrutura, porém sua afinidade pelo oxigênio aumentou aproximadamente 15 vezes e sua taxa de auto-oxidação diminuiu. Isso indica que a taxa de auto-oxidação está ligada à constituição de aminoácidos da proteína; como essa taxa foi diferente para as mioglobinas estomacais e radulares de *Biomphalaria*, uma diferença na sequência primária talvez pudesse dar suporte a essa divergência de valores.

Os experimentos de auto-oxidação foram todos realizados *in vitro* e nas mesmas condições experimentais, desde a obtenção das mioglobinas até a finalização do teste de auto-oxidação propriamente dito. Deste modo, poderia ser descartada a possibilidade de a diferença entre os valores das taxas de auto-oxidação das mioglobinas de uma mesma espécie de *Biomphalaria* estar ligada a condições fisiológicas, ou a microambientes químicos fornecidos pelo organismo dos moluscos em estudo.

O músculo radular das espécies de *Biomphalaria* possui uma cor vermelha intensa, enquanto a musculatura estomacal apresenta uma coloração castanha, exceto em indivíduos albinos, nos quais a hemoglobina da hemolinfa confere uma cor vermelha acentuada aos tecidos que irriga. Segundo Warris e Rhodes (1977), em tecidos profundamente coloridos tais como os que podem ser encontrados em bovino adulto, a mioglobina pode representar 90% ou mais do pigmento total. Em tecido muscular pálido, tal como de peito de frango, a mioglobina pode representar até metade do pigmento total.

O átomo de ferro do grupo heme varia entre o estado reduzido (ferroso) e o oxidado (férico). Na forma oxidada ele não possui a capacidade de ligar-se ao oxigênio molecular. Estando reduzido, o ferro reage facilmente com a água e com o oxigênio. Quando a mioglobina, contendo o átomo de ferro no estado ferroso, se une ao oxigênio molecular, forma-se a oximioglobina (oxigenação), e quando se liga à água é formada a deoximioglobina (deoxigenação). Em ambos os estados a mioglobina confere cor vermelha aos tecidos nos quais se encontra. O ferro ferroso pode se converter em ferro férico, e então forma-se a metamioglobina (oxidação) que possui uma cor marrom ou castanha, e é incapaz de se ligar ao oxigênio (Guilherme *et al.*, 2008).

Os experimentos realizados para quantificar o conteúdo de mioglobina por unidade de massa (tecido) no músculo radular e estomacal descartaram a possibilidade da diferença na coloração estar ligada a uma maior ou menor concentração muscular de mioglobina. A metodologia utilizada para quantificar o conteúdo de mioglobina, após transformá-la em sua forma meta é satisfatória, uma vez que outras proteínas que possuem grupo heme tais como os citocromos, flavinas e catalases estão presentes somente em quantidades relativamente pequenas, e desta forma têm menores efeitos na cor do tecido muscular (Ledward, 1984).

Para tentar explicar, quimicamente, a diferença no valor da taxa de auto-oxidação das miglobinas radulares e estomacais entre as espécies de *Biomphalaria* e também entre as moglobinas de uma mesma espécie, uma hipótese seria uma diferença na estrutura terciária das

mioglobinas analisadas, ou alguma alteração de posicionamento de aminoácidos que estão próximos ao grupo heme e que não necessariamente gere uma alteração tridimensional que possa ser observada na superfície da molécula.

Diferenças estruturais poderiam afetar o posicionamento do grupo heme, ou o ambiente ao seu redor, e deste modo influenciar na velocidade com a qual o oxigênio se liga e desliga do átomo de ferro central desse grupo prostético. Um alinhamento global das sequências primárias das mioglobinas radulares de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* (Data bank EF646379.1: dado obtido no mestrado) mostrou que apesar de se tratar de espécies de molusco do mesmo gênero, suas mioglobinas apresentavam cinco resíduos de aminoácidos diferentes, o que poderia ser suficiente para gerar uma mudança estrutural.

Os resíduos de aminoácidos CD1-Phe e F8-His (resíduo proximal) que fazem parte do bolso hidrofóbico ao qual o grupo heme se insere são altamente conservados em todas as globinas, enquanto o resíduo E7-His (resíduo distal) pode ser substituído por glutamina em algumas globinas de vertebrados e por valina, leucina, tirosina ou glutamina em um considerável número de globinas de invertebrados. A histidina E7 está associada com a propriedade ligação-ligante; quando a mioglobina está em sua forma oxigenada esse resíduo é capaz de formar uma ponte de hidrogênio com o oxigênio molecular e estabilizá-lo (Phillips & Schoenborn, 1981), desse modo é aceitável que sua substituição altere a estabilidade do ligante.

As sequências de aminoácidos das mioglobinas de *Paramphistomum epiclitum* e *Isoparorchis hypselobagri* (trematódeos) pertencentes ao filo Platelmino, um dos mais primitivos filos de invertebrados, possuem 147 e 148 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Rashid *et al.*, 1997). Em ambas as mioglobinas, a histidina distal E7 está substituída por uma tirosina, o que normalmente causa uma rápida auto-oxidação do átomo de ferro do grupo heme, e deste modo o oxigênio não pode se ligar a ele. Em contraste, mioglobinas de trematódeos mostram-se como moléculas funcionais com alta afinidade ao oxigênio. Sequências primárias de mioglobinas, com 154 a 158 resíduos de aminoácidos, foram determinadas para nematódeos

como *Ascaris suum* (Blaxter *et al.*, 1994a), *Nippostrongylus brasiliensis* (Blaxter *et al.*, 1994b) and *Caenorhabditis elegans* (Kloek *et al.* 1993). Nas mioglobinas de *Ascaris* e *C. elegans*, um resíduo de glutamina ocorre na posição distal E7, enquanto na mioglobina de *Nippostrongylus* esta posição é ocupada por um resíduo de leucina. Esse tipo de substituição de aminoácidos é observada também em outras globinas, como a hemoglobina. A hemoglobina de *Paramecium* é uma globina compacta; um alinhamento da sequência primária dessa hemoglobina com mioglobinas de vertebrados e de invertebrados sugere que a histidina distal E7 está substituída por um resíduo de glutamina nesse protozoário (Moens *et al.*, 1996).

A presença ou ausência de um resíduo de histidina na posição distal E7 tem um efeito substancial na auto-oxidação das mioglobinas. A taxa de auto-oxidação pode ser influenciada pelo pH; a influência do pH na mioglobina de *Aplysia* (Shikama & Katagiri, 1984) e *Dolabella* (Suzuki, 1986), que possuem resíduo distal E7-Val, e *Galeorhinus* (Suzuki, 1987), que possui um resíduo distal E7-Gln, é bastante diferente da influência sobre a mioglobina de baleia, que possui uma histidina nessa posição. Entretanto a influência do pH na hemoglobina de *Paramecium* é bastante similar a essa última. Sugere-se, deste modo, que a hemoglobina de *Paramecium* possua uma estrutura distintamente diferente do usual *globin fold* (Tsubamoto *et al.*, 1990).

Com base em tais relatos da literatura, a substituição de um resíduo de aminoácido por outro específico, em uma determinada posição não é suficiente para prever como a taxa de auto-oxidação será influenciada. Talvez o posicionamento do resíduo substituído dependa da posição de outros resíduos de aminoácidos para que o primeiro adquira um posicionamento que cause maior ou menor interferência na auto-oxidação da mioglobina.

Em relação à coloração da musculatura do estômago, a taxa de auto-oxidação da mioglobina está intimamente relacionada ao surgimento da cor castanha (marrom), como resultado da formação de metamioglobina (Ochiai *et al.*, 2009). Estudos com mioglobinas de peixes mostraram que a alta instabilidade dessas proteínas está relacionada a altas (rápidas) taxas

de auto-oxidação, assim mioglobinas com baixas taxas de auto-oxidação são resistentes à formação de metamioglobina (Chow *et al.*, 1991).

Essa explicação contradiz os dados de auto-oxidação obtidos para *Biomphalaria*, ao relacioná-la com a cor da musculatura estomacal. Porém, fisiologicamente, essa coloração poderia ser explicada pela interferência do pH estomacal na taxa de auto-oxidação, que é acelerada em altas temperaturas e pH ácidos (Matsuura *et al.*, 1962).

Este trabalho envolve uma pesquisa de cunho básico, e foca uma proteína muito estudada. Porém, o fato de ser conhecida, não faz da mioglobina uma proteína com assunto estagnado. Muitos pesquisadores têm relatado a versatilidade de funções dessa proteína no organismo, e tal versatilidade reside no fato de a mioglobina ser uma hemoproteína.

Dentre as funções, ou papéis, atribuídos à mioglobina está a capacidade de atuar como uma enzima oxidase. Essa capacidade é na verdade uma consequência da interação do grupo heme com alguns xenobióticos, como os haletos de alquila e com agentes endógenos, como o peróxido de hidrogênio. Essa interação produz grupos heme alterados, que acredita-se levar à inativação (perda da capacidade de ligação ao oxigênio) não só da mioglobina, mas de outras hemoproteínas, como o citocromo P-450 (Ortiz de Montellano & Correia, 1983).

Em 1990, Osawa e colaboradores relataram que a mioglobina de baleia e a mioglobina de coração de cavalo adquiriam atividade oxidase quando seu grupo heme, modificado pelo haleto de alquila BrCCl_3 , ligava-se covalentemente ao resíduo de histidina proximal 93. Em 1991, o mesmo pesquisador e seus colaboradores relataram que tal atividade era adquirida pela interação de um átomo de nitrogênio do imidazol de uma histidina e de um grupo CCl_2 (proveniente do BrCCl_3) com o grupo vinil I do heme. Além disso, os resíduos de histidina 97 e/ou 64 (resíduo distal) estariam ligados ao átomo ferro do grupo heme, e a histidina proximal 93 estaria substituída pela histidina 97. Esse “embaralhamento” de histidinas seria responsável pela atividade oxidase gerada na mioglobina.

De acordo com Catalano *et al.* (1989) e Kelman *et al.*, (1994), a atividade oxidase atribuída à mioglobina pode ser induzida também pelo tratamento da mesma com peróxido de hidrogênio. Neste caso, porém, a ligação covalente do grupo heme à parte protéica da mioglobina seria realizada por resíduo de tirosina, que na mioglobina de baleia e de coração de cavalo corresponde ao resíduo 103.

Para analisar essa atividade oxidase da mioglobina foram testadas em nosso laboratório as transformações com o haleto de alquila CCl_4 e com peróxido de hidrogênio, utilizando mioglobinas radulares recombinantes de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* e as mioglobinas de coração de cavalo e de baleia como controles. Ainda não haviam sido descritos na literatura experimentos com CCl_4 para essas duas últimas mioglobinas que são consideradas padrão em experimentos utilizando essa proteína.

Pela análise dos experimentos, devido ao decaimento da absorção de NADH, constatou-se que as mioglobinas de baleia e de coração de cavalo adquiriram atividade oxidase ao serem tratadas com o haleto de alquila CCl_4 , ao contrário das mioglobinas de *Biomphalaria*.

O mecanismo de ação do CCl_4 para transformar a mioglobina em uma oxidase é semelhante ao mecanismo utilizado pelo BrCCl_3 ; o íon CCl_2^{-2} é liberado desses compostos e interage com a histidina proximal (Osawa *et al.* 1990). As mioglobinas de *Biomphalaria*, assim como a de outros invertebrados, possuem um resíduo de glutamina como resíduo distal, e o resíduo de aminoácido 97 é uma leucina. A ausência dos resíduos-chave (histidinas) pode explicar o motivo do não surgimento (ou acentuação) da atividade oxidase após o tratamento com o haleto de alquila. As mioglobinas de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* possuem apenas dois resíduos de histidina em sua sequência primária, enquanto as mioglobinas de coração de cavalo e de baleia possuem 11 e 12 resíduos, respectivamente.

Um dos resíduos de histidina é o resíduo distal, o outro resíduo presente nas mioglobinas de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* está localizado na posição 118, e devido à sua distância em relação ao grupo heme é pouco provável que pudesse haver alguma interação entre eles.

A glutamina, que substitui a histidina distal possui átomos de nitrogênio em sua cadeia lateral; o nitrogênio é o átomo envolvido na ligação covalente entre o grupo heme e a parte protéica da mioglobina, mediada pelo haleto de alquila. Porém, apenas a presença do nitrogênio parece não ser suficiente para concluir a interação. As mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* estudadas são ricas em resíduos de lisina que possui cadeia lateral com características químicas parecidas com a histidina, em relação à carga e presença de átomos de nitrogênio, porém nenhum deles está próximo o suficiente para interagir com o grupo heme.

A ligação covalente do grupo heme a um resíduo de aminoácido após o tratamento com xenobióticos causa um movimento significativo dos resíduos do centro ativo, o qual pode perturbar toda a estrutura tridimensional da hemoproteína. Sabe-se que mioglobinas alteradas covalentemente são hidrolizadas mais rapidamente pela tripsina se comparada à sua forma nativa (Osawa & Pohl, 1989). Isso pode ajudar a explicar o motivo pelo qual a administração de CCl₄, assim como outros xenobióticos que levam à formação de hemoproteínas alteradas, causa perda de função e destruição de enzimas, como o citocromo P-450 (Davies *et al.*, 1986).

A mioglobina alterada por essas condições é rapidamente oxidada pelo oxigênio molecular, presumivelmente levando à formação de espécies reduzidas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (Osawa & Pohl, 1989).

A mioglobina em sua forma meta possui uma atividade redutase (devido ao seu átomo de ferro) que foi classificada por diversos nomes, como por exemplo diaforase, sistema de redução aeróbico e anaeróbico, e sistema enzimático redutor dependente de NADH (Bekhit & Faustman, 2005). O processo de transformação da mioglobina por xenobióticos causar inativação da sua capacidade redutora; ao ser alterada a mioglobina adquire capacidade de realizar ciclos de reação redox, o que é chamado de ativação suicida, uma vez que a atividade redutora é perdida após a reação (Osawa & Pohl, 1989). Nas mioglobinas de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* nós supomos que esse fenômeno tenha ocorrido, uma vez que sua atividade redutora intrínseca observada antes do tratamento com CCl₄ foi diminuída.

O oxigênio molecular ao sofrer redução, por adição de um elétron, gera o radical superóxido. No tecido muscular este radical pode ser gerado pelos sistemas de membrana de transferência de elétrons, por meio da auto-oxidação da oximioglobina a metamioglobina, pela ativação de leucócitos ou ainda por meio da oxidação de compostos redutores, como o ácido ascórbico. Este radical não tem um potencial redox suficiente para iniciar uma oxidação lipídica, mas pode ser transformado em outras espécies oxidantes mais potentes, tais como o radical peridroxila ou peroxila (HOO^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Carreras, 2004), o qual possui a capacidade de atravessar membranas biológicas, além de originar radicais livres muito reativos (Halliwell & Gutteridge, 1984).

O peróxido de hidrogênio é um composto normalmente formado no organismo e também pode entrar no organismo de forma exógena e atingir o interior das células, onde ele ou seus radicais podem interagir com moléculas como a mioglobina. A interação do peróxido de hidrogênio com hemeproteínas pode causar a destruição do grupo heme, porém em pequenas quantidades esse composto pode atuar de forma contrária. A mioglobina pode ser ativada por baixas concentrações de peróxido de hidrogênio gerando um radical oxoferril intermediário de vida curta, capaz de iniciar reações de peroxidação (Chan *et al.*, 1997).

Esse fenômeno de ativação pode ter implicações toxicológicas significativas; esse é um dos motivos que faz com que haja um crescente interesse em identificar as espécies de radicais que se formam após a exposição da metamioglobina ao peróxido de hidrogênio. Esse interesse é estimulado pela evidência de que essa reação pode ajudar a elucidar a origem da peroxidação de lipídeos no organismo, como os lipídeos de membrana, entre outras injúrias celulares (Kelman & Mason, 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as mioglobinas de *Biomphalaria*, assim como as mioglobinas comerciais utilizadas, podem desenvolver atividade oxidase uma vez que possuam alguns resíduos de aminoácidos-chave, os quais não necessariamente são os resíduos previamente descritos na literatura.

Várias substâncias, incluindo drogas e compostos endógenos como o peróxido de hidrogênio, podem inativar o citocromo P-450 (Osawa *et al.*, 1993), assim como o CCl₄, ou conferir atividade a outras hemoproteínas. A mioglobina não é primariamente uma proteína catalítica, mas tem sido demonstrado que ela apresenta uma atividade peroxidase-like (Miki *et al.*, 1989; Galaris *et al.*, 1990). Similar às peroxidases clássicas, a mioglobina cliva o peróxido de hidrogênio, retendo um de seus equivalentes oxidantes no átomo de ferro do grupo heme na forma de espécies oxo-ferril. Entretanto, um segundo equivalente oxidante está localizado na parte protéica da mioglobina, na forma de um radical livre (Davies, 1991; Arduini *et al.*, 1992), diferente da peroxidase de rabanete de cavalo, na qual o segundo equivalente oxidante é um radical catiônico presente na porfirina (Roberts *et al.*, 1981). Foi proposto que a natureza do sítio radical da metamioglobina seria um radical peroxila de um resíduo de tirosina (Davies, 1991), entretanto isso tem sido contestado (Wilks & Ortiz de Montellano, 1992).

Uma atividade oxidase discreta foi adquirida pelas mioglobinas *Biomphalaria* após o tratamento das mesmas com peróxido de hidrogênio, entretanto esta atividade não pode ser atribuída a uma interação de uma tirosina com o grupo heme, uma vez que essas mioglobinas não possuem esse resíduo em sua sequência primária.

De acordo com literatura, a reação de transformação envolve o resíduo de tirosina 103 nas mioglobinas de baleia e de coração de cavalo, mais precisamente, a oxidação do grupo hidroxila da cadeia lateral desse aminoácido.

Nós especulamos que outro resíduo de aminoácido com um grupo hidroxila na cadeia lateral possa ter substituído a interação da tirosina. As mioglobinas de *Biomphalaria* apesar de não possuírem tirosinas, possuem vários resíduos de serina em sua sequência; 10 e 11 resíduos em *B. glabrata* e *B. tenagophila*, respectivamente (Apêndice 1). Ambas as mioglobinas apresentam um resíduo de serina (Ser 99) próximo ao resíduo proximal (His 100), o qual está próximo do grupo heme, e a mioglobina de *B. tenagophila* possui ainda uma outra serina (Ser 75) que devido à sua proximidade, também pode interagir com o grupo heme.

Há uma divergência relacionada com a natureza do mecanismo que envolve o surgimento da atividade oxidase. Utilizando espectroscopia EPR para estudar a formação dos adutos de heme após o tratamento com peróxido de hidrogênio, King e colaboradores (1967) sugeriram que a oxidação de um resíduo de histidina ou fenilalanina produzem um radical que é, eventualmente, transferido à um resíduo de tirosina. Utilizando esta mesma técnica foi demonstrado que um radical peroxila é formado e que essa espécie é derivada da reação do oxigênio molecular com um radical livre proveniente da parte protéica da mioglobina, o qual não seria um radical de tirosina (Kelman & Mason, 1992).

Muitos resíduos de fenilalanina estão presentes nas mioglobinas de *Biomphalaria*, próximos ao grupo heme. Esses resíduos poderiam ser, em parte, responsáveis pelo surgimento da atividade oxidase nessas proteínas. Talvez esses resíduos de aminoácidos estejam utilizando as serinas, que possuem hidroxila na cadeia lateral, para formar radicais reativos, os quais foram descritos anteriormente para a tirosina 103. Tal alteração no mecanismo primário do surgimento da atividade oxidase poderia explicar a atividade oxidase discreta observada nas mioglobinas de *B. glabrata* e de *B. tenagophila*.

Uma variedade de xenobióticos são conhecidos por causar uma ligação cruzada do grupo heme à proteínas (Osawa et al, 1993). A importância do potencial toxicológico dos adutos de heme formados reside em provocar estresse oxidativo e oxidação de moléculas que são essenciais para o bom funcionamento do organismo. Além disso, sabe-se que a subsequente degradação do aduto heme-proteína pode apresentar influência toxicológica devido à liberação de ferro livre, um conhecido pro-oxidante (Sakaida *et al.*, 1990).

CONCLUSÕES



7. CONCLUSÕES

- A mioglobina é uma proteína que pode ser encontrada, não apenas na musculatura radular, mas também na musculatura estomacal de moluscos gastrópodes do gênero *Biomphalaria*. A presença dessa proteína, porém, não necessariamente poderia ser identificada pela cor vermelha que normalmente confere aos tecidos;
- Devido a características químicas diferentes, como a taxa de auto-oxidação observada *in vitro* e nas mesmas condições experimentais, a mioglobina estomacal poderia ser uma isoforma da mioglobina radular, porém um seqüenciamento é necessário para tornar essa hipótese verdadeira;
- A atividade oxidase adquirida pela mioglobina após seu tratamento com CCl₄ não está presente nas mioglobinas das espécies de *Biomphalaria* analisadas neste trabalho. Sugere-se que essas mioglobinas não apresentem os resíduos-chave (histidina distal e histidina 97) ou outros resíduos que possam substituí-los para que ocorra o mecanismo de reação responsável por tal atividade.

Porém, deve ocorrer alguma alteração de posicionamento de aminoácidos, capaz de causar o desaparecimento de uma atividade enzimática residual intrínseca observada nas mioglobinas antes do tratamento com o haleto.

- A atividade oxidase foi adquirida pelas mioglobinas de *Biomphalaria* analisadas neste trabalho após seu tratamento com peróxido de hidrogênio.

Isso sugere que não seria necessária a presença do resíduo de tirosina 103, ou qualquer resíduo de tirosina, para que ocorra o mecanismo de reação responsável pelo surgimento da atividade oxidase, uma vez que tais mioglobinas não possuem tirosina em

sua sequência primária. Possivelmente, outro resíduo pode estar envolvido nesse mecanismo de reação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDUINI, A.; MANCINELLI, G.; RADATTI, G.L.; DAMONTI, W.; HOCHSTEIN P.; CADENAS, E. Reduction of sperm whale ferrylmyoglobin by endogenous reducing agents: Potential reducible loci of ferrylmyoglobin. *Free Radical Biol. Med.* 13: 449-454, 1992.

ASCENZI, P.; BERTOLLINI, A.; COLETTA, M.; DESIDERI, A.; GIARDINA, B.; POLIZIO, F.; SANTUCCI, R.; SCATENA, R.; AMICONI, G. Cooperative effect of inositol hexakisphosphate, bezafibrate and clofibrac acid on the spectroscopic properties of the nitric oxide derivative of ferrous human hemoglobin. *J. Inorg. Biochem.* 50:263–272, 1993.

ASCENZI, P.; BERTOLLINI, A.; COLETTA, M.; LUCACCHINI, A. Stabilisation of the T-state of ferrous human adult haemoglobin by chlorpromazine and trifluoperazine. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 185–187, 1999a.

ASCENZI, P.; COLASANTI, M.; FASANO, M.; BERTOLLINI, A. Stabilization of the T-state of human hemoglobin by proflavin, an antiseptic drug. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47: 991–995, 1999b.

ASCENZI, P.; SALVATIA, L.; BRUNORI M. Does myoglobin protect *Trypanosoma cruzi* from the antiparasitic effects of nitric oxide? *FEBS Letters* 501: 103-105, 2001.

BEKHIT, A.E.D.; FAUSTMAN, C. Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci.* 71(3): 407-439, 2005.

BHATTACHARYYA, J.; BHATTACHARYYA, M.; CHAKRABORTI, A. S.; CHAUDHURI, U.; PODDAR, R.K. Interaction of chlorpromazine with myoglobin and hemoglobin - a comparative study. *Biochem. Pharmacol.* 47: 2049–2053, 1994.

BHATTACHARYYA, J.; BHATTACHARYYA, M.; CHAKRABORTI, A.S.; CHAUDHURI, U.; PODDAR, R. K. Structural organisation of hemoglobin and myoglobin influence their binding with phenothiazines. *Int. J. Biol. Macromol.* 23: 11–18, 1998.

BLAXTER, M.L.; INGRAM, L.; TWEEDIE, S. Sequence, expression and evolution of the globins of the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol. Biochem. parasitol.* 68: 1-14, 1994b.

BLAXTER, M.L.; VANFLETEREN, J.R.; XIA, J.; MOENS L. Structural characterization of an *Ascaris* myoglobin. *J. Biol. Chem.* 269: 30181–30186, 1994a.

BOLOGNESI, M.; BORDO, D.; RIZZI, M.; TARRICONE, C.; ASCENZI, P. Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68: 29-68, 1997.

BRUNORI, M. Nitric oxide, cytochrome c oxidase and myoglobin. *Trends Biochem. Sci.* 26a(4): 209-10, 2001.

BURMESTER, T., EBNER, B., WEICH, B., AND HANKELN, T. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues, *Mol. Biol. Evol.* 19: 416-421, 2002.

BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKELN, T. A Vertebrate Globin Expressed in the Brain. *Nature* 407: 520-523, 2000.

BURR, A.H.J.; HUNTS, P.; WAGAR, D.R.; DEWILDE, S.; BLAXTER, A.L.; VANFLETEREN, J. R.; MOENS, L. A hemoglobin with an optical function. *J. Biol. Chem.* 275(7): 4810-4815, 2000.

CARRERAS, I.F. Influencia de la suplementación de antioxidantes y de la administración de enrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave. Girona, Espanha, Tese (Doutorado)-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries - Universitat de Girona, 304p. 2004.

CARVER, T.E.; BRANTLEY, R.E. JR; SINGLETON, E.W.; ARDUINI, R.M.; QUILLIN, M.L.; PHILLIPS, G.N. JR; OLSON, J.S. A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O₂ affinity and low autooxidation rate. *J. Biol. Chem.* 267(20): 14443-14450, 1992.

CATALANO, C.E.; CHOE, Y.S.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Reactions of the protein radical in peroxide-treated myoglobin. Formation of a heme-protein cross-link. *J. Biol Chem.* 264(18):10534–10541, 1989.

- CHAKRABORTI, A.S. Interaction of porphyrins with heme proteins – a brief review. *Mol. Cell. Biochem.* 253(1-2):49-54, 2003.
- CHAN, H.W.S. The mechanism of autoxidation. In: *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Chan, H.W.S. (ed) Academic Press, London, U.K., pp. 1-16, 1987.
- CHEEMA, M.A.; TABOADA, P.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.; SIDDIQ, M.; MOSQUERA, V. Modification of the thermal unfolding pathways of myoglobin upon drug interaction in different aqueous media. *J. Phys. Chem. B* 111: 13851-13857, 2007.
- CHOTHIA, C.; LESK, A.M. The evolution of protein structures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 52:399-405, 1987.
- CHOTHIA, C.; LESK, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5(4): 823-826, 1986.
- CHOW, C. J. Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* 39, 22-26, 1991.
- COLETTA, M.; ANGELETTI, M.; ASCENZI, P.; BERTOLLINI, A.; DELLA LONGA, S.; DE SANCTIS, G.; PRIORI, A.M.; SANTUCCI, R.; AMICONI, G. Coupling of the oxygen- linked interaction energy for inositol hexakisphosphate and bezafibrate binding to human HbA. *J. Biol. Chem.* 274: 6865–6874, 1999.
- CORNFORTH, D.P.; JAYASINGH, P. Colour and pigment. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*. JENSEN, W.K.; DEVINE, C.; DIKEMAN, M. (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 249-256, 2004.
- COUTURE, M.; CHAMBERLAND, H.; ST-PIERRE, B.; LAFONTAINE, J.; GUERTIN, M.; Nuclear genes encoding chloroplast haemoglobins in the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*. *Mol. Gen. Genet.* 243: 185-197, 1994.

DAVIES, H.W.; THOMAS, P.E.; POHL, L.R. In: *Biological Reactive Intermediates III* KOCSIS, J.J.; JOLLOW, D.J.; WITMER, C.M.; NELSON, J.O.; SNYDER, R. (eds) Plenum Publishing Corp., New York, pp. 253-261, 1986.

DAVIES, M.J. Identification of a globin free radical in equine myoglobin treated with peroxides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1077: 86-90, 1991.

DEWILDE, S.; WINNEPENNINGX, B.; ARNDT, N.H.L.; NASCIMENTO, D.G.; SANTORO, M. M.; KNIGHT, M.; MILLER, A. N.; KERLAVAGE, A. R.; GEOGHAGEN, N.; VAN MARCK, E.; LIU, L. X.; WEBER, R. E.; MOENS, L. Characterization of the myoglobin and its coding gene of the mollusc *Biomphalaria glabrata*. *J. Biol. Chem.* 273(22): 13583-13592, 1998.

DOELLER, J.E.; WITTENBERG, B.A. Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocytes: effect of sodium nitrite. *Am. J. Physiol.* 261: H53-H62, 1991.

DOSI, R.; DI MARO, A.; CHAMBERY, A.; COLONNA, G.; COSTANTINI, S.; GERACI, G.; PARENTE, A. Characterization and kinetics studies of water buffalo (*Bubalus bubalis*) myoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145: 230-238, 2006.

EICH, R.F.; LI, T.; LEMON, D. D.; DOHERTY, D.H.; CURRY, S. R.; AITKEN, J. F.; MATHEWS, A. J.; JOHNSON, K. A.; SMITH, R. D.; PHILLIPS, G. N. JR; OLSON, J. S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry.* 35(22): 6976-83, 1996.

FAUSTMAN, C.; CASSENS, R.G. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *J. Muscle Foods* 1: 217-243. 1990.

FENNEMA, O.R. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza,, 2000.

FLÖGEL, U.; MERX, M.W.; GÖDECKE, A.; DECKING, U.K.M.; SCHRADER, J. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98b(2): 735-470, 2001.

FUKAMI-KOBAYASHI, K.; MIZUTANI, M.; GO, M. Correlation between module boundaries and intron positions in haemoglobin from various taxa. In: Go, M. and Shimmel, P., *Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures*, Elsevier Science, The Netherlands, pp. 271-282, 1995.

GALARIS, D.; SEVANIAN, A.; CADENAS, E.; HOCHSTEIN, P. Ferrylmyoglobin-catalyzed linoleic acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 281(1): 163-169, 1990.

GEORGE, P.; IRVINE, D.H. A possible structure for the higher oxidation state of metmyoglobin. *Biochem. J.* 60(4): 596-604, 1955.

GHIRETTI, F.; GHIRETTI-MAGALDI, A.; TOSI, L. Pathways of terminal respiration in marine invertebrates. The cytochrome system of *Aplysia*. *J. Gen. Physiol.*, 6: 42, 1959.

GIDDINGS, G.G. The basis of colour in muscle foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 9: 81-117, 1977.

GOW, A.J.; PAYSON, A.P.; BONAVENTURA, J. Invertebrate hemoglobins and nitric oxide: How heme pocket structure controls reactivity. *J. Inorg. Biochem.* 99: 903-911, 2005.

GRANGE, R.W.; MEESON, A.; CHIN, E.; LAU, K.S.; STULL, J. T.; SHELTON, J.M.; WILLIAMS, R.S.; GARRY, D.J. Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281(5): 1487-1494, 2001.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723, 1997.

GUILHERME, C.A.; SANTOS, L.H.M.; BECHER, L.; STREMEL, P.I. Alterações bioquímicas na cor da carne. In: *Anais da VI semana de tecnologia em alimentos Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR*, 2(29), 2008.

HALL, T.A. BioEdit: an user - friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14, 1984.

JURGENS, K.D.; PETERS, T.; GROS, G. Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(9): 3829-3833, 1994.

KAPP, O.H.; MOENS, L.; VANFLETEREN, J.; TROTMAN, C.N.A.; SUZUKI, T.; VINOGRADOV, S.N. Alignment of 700 globin sequences: extent of amino acid substitution and its correlation with variation in volume. *Protein Science* 4: 2179-2190, 1995.

KELMAN, D.J.; DEGRAY, J.A.; MASON, R.P. Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *J. Biol. Chem.* 269(10): 7458-7463, 1994.

KELMAN, D.J.; MASON, R.P. The myoglobin-derived radical formed on reaction of metmyoglobin with hydrogen peroxide is not a tyrosine peroxy radical. *Free Radic. Res. Commun.* 16 (1): 27-33, 1992.

KENDREW, J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H.; PHILIPS, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* 181: 662-666, 1958.

KHAN, K.K.; MONDAL, M.S.; PADHY, L.; MITRA, S. The role of distal histidine in peroxidase activity of myoglobin - Transient-kinetics study of the reaction of H₂O₂ with wild-type and distal-histidine-mutated recombinant human myoglobin. *Eur. J. Biochem.* 257: 547-555, 1998.

KING, N.K.; LOONEY, F.D.; WINFIELD, M.E. Amino acid free radicals in oxidised metmyoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* 88: 233-235, 1967.

KLOEK A.P.; SHERMAN D.R.; GOLDBERG D.E. Novel gene structure and evolutionary context of *Caenorhabditis elegans* globin. *Gene* 129: 215-221, 1993.

KRAUS, D.W.; DOELLER, J.E.; SMITH, P.R. A physiological comparison of bivalve mollusc cerebro-visceral connectives with and without neurohemoglobin. I. Ultrastructural and electrophysiological characteristics. *Biol. Bull.* 174: 54-66, 1988.

KRZYWICKI, K. The determination of haem pigments in meat. *Meat Sci.* 7: 29–36, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685, 1970.

LEDWARD, D.A. Haemoproteins in meat and meat products. In: *Developments in Food Proteins*, vol. 3, HUDSON, B.J.F. (ed). Elsevier Applied Science, New York, pp. 33-68, 1984.

LEGENDRE, J.M.; BERGOT, A.; TURZO, A.; MORIN, P.P.; HUMPHERY-SMITH, I. Hemoglobin alpha chain isoelectric point modification under the action of urea, sodium cyanate, succinic anhydride or diethylene triamine pentaacetic acid anhydride. *Pathol. Biol.* 46(8): 605-612, 1998.

LESK, A.M. *Introduction to Protein Architecture: The Structural Biology of Proteins*. Oxford University Press, Oxford, 2001.

LIVINGSTON, D.J.; BROWN, W.D. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technol.* 35 (5): 244-252, 1981.

LIVINGSTON, D.J.; MCLACHLAN, S.J.; LA MAR, G.N.; BROWN, W.D. Myoglobin: cytochrome b5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase. *J. Biol. Chem.* 260: 15699-156707, 1985.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275, 1951.

MARTIN, A.; SWARBRICK, J.; CAMMARATA, A. In: *Physical Pharmacy*, 3rd ed. Virghese Publishing House, India, pp 314–351, 1991.

- MATSUURA, F.; HASHIMOTO, K.; KIKAWADA, S.; YAMAGUCHI, K. Studies on the auto-oxidation velocity of fish myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 28: 210–216, 1962.
- MERX, M.W.; FLÖGEL, U.; STUMPE, T.; GÖDECKE, A.; DECKING, U.K.M.; SCHRADER, J. Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J.* 15(6): 1077-1079, 2001.
- MIKI, H.; HARADA, K.; YAMAZAKI, I.; TAMURA, M.; WATANABE, H. Electron spin resonance spectrum of Tyr-151 free radical formed in reactions of sperm whale metmyoglobin with ethyl hydroperoxide and potassium irridate. *Arch Biochem Biophys*. 275(2): 354-362, 1989.
- MILLIKAN, G.A.; Experiments on muscle haemoglobin in vivo: the instantaneous measurement of muscle metabolism. *Proc. R. Soc.* 123 b: 218–241, 1937.
- MOENS, L.; VANFLETEREN, J.; VAN DER PEER, Y.; PEETERS, K.; KAPP, O.; CZELUZNIAK, J. Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol. Biol. Evol.* 13: 324–333, 1996.
- MOORE, K.P.; HOLT, S.G.; PATEL, R.P.; SVISTUNENKO, D.A.; ZACKERT, W.; GOODIER, D.; REEDER, B.J.; CLOZEL, M.; ANAND, R.; COOPER, C.E.; MORROW, J.D.; WILSON, M.T.; DARLEY-USMAR, V.; ROBERTS, L.J. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J Biol Chem*. 273(48): 31731-7, 1998.
- NOREN, S.R.; WILLIAMS, T.M. Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol.* 126: 181-191, 1999.
- OCHIAI, Y.; UEKI, N.; WATABE, S. Effects of point mutations on the structural stability of tuna myoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 153, 223–228, 2009.
- ORDWAY, G.A.; GARRY, D.J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* 207: 3441-3446, 2004.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.; CORREIA, M.A. Suicidal destruction of cytochrome P450 during oxidative drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 481-503, 1983.

OSAWA, Y., HIGHET, R.J., BAX, A., POHL, L.R. Characterization by NMR of the heme-myoglobin adduct formed during the reductive metabolism of BrCCl₃: Covalent bonding of the proximal histidine to the ring I vinyl group. *J. Biol. Chem.* 266: 3208–3214, 1991.

OSAWA, Y.; JOHN, S.; DARBYSHIRE, F.; STEINBACHG, P.J.; BROOKS, B.R. Metabolism-based transformation of myoglobin to an oxidase by BrCCl₃ and molecular modeling of the oxidase form. *J. Biol. Chem.* 268(4): 2953-2959, 1993.

OSAWA, Y.; MARTINS, B.M.; GRIFFINLL, P.R.; YATES, J.R.; SHABANOWITZLI, J.; HUNTN, D.F.; MURPHY, A.C. LING CHEN; COTTER, R.J.; POHL, L.R. Metabolism-based covalent bonding of the heme prosthetic group to its apoprotein during the reductive debromination of BrCCl₃ by myoglobin. *J. Biol. Chem.* 265 (18): 10340- 10346, 1990.

OSAWA, Y.; POHL, L.R. Covalent bonding of the prosthetic heme to protein: a potential mechanism for the suicide inactivation or activation of hemoproteins. *Chem Res Toxicol.* 2(3):131–141, 1989.

PAPADOPOULOS, S.; ENDEWARD, V.; REVESZ-WALKER, B.; JURGENS, K.D.; GROS, G. Radial and longitudinal diffusion of myoglobin in single living heart and skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(10): 5904-5909, 2001.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southern most Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 577, 1987.

PARAENSE, W.L. Fauna planorbídica do Brasil. In: Lacaz, C. S., *et al.*, *Introdução à geografia médica do Brasil*, Edgard Bluncher, Ed. Universidade de São Paulo, pp. 213-239, 1972.

PARAENSE, W.L.; CORRÊA, L.R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 5: 15-22, 1963.

PERUTZ, M.F.; KENDREW, J.C.; WATSON, H.C. Structure and function of haemoglobin II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 13: 669-678, 1965.

PESCE, A.; BOLOGNESI, M.; BOCEDI, A.; ASCENZI, P.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; HANKELN, T.; BURMESTER, T. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* 3: 1146-1151, 2002.

PHILLIPS, S.E.; SCHOENBORN, B.P. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature.* 292(5818): 81-82, 1981.

POLEVODA, B.; SHERMAN, F. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biology* 3(5): 1-6, 2002.

POTTS, M.; ANGELONI, S.V.; EBEL, R.E.; BASSAM, D. Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* 256: 1690-1692, 1992.

POWELL, R.; GANNON, F. The leghaemoglobins. *Bioessays* 9: 117-121, 1988.

RASHID, K.A.; VAN HAUWAERT, M.L.; HAQUE, M.; SIDDIQI, A.H.; LASTERS, I.; DE MAEYER, M.; GRIFFON, N.; MARDEN, M.C.; DEWILDE, S.; CLAUWAERT, J.; VINOGRADOV, S.N.; MOENS, L. Trematode myoglobins, functional molecules with a distal tyrosine. *J. Biol. Chem.* 272(5): 2992-2999, 1997.

READ, K.R.H. Molluscan haemoglobin and myoglobin. In: Wilbur, K. M.; Yonge, C.M. *Physiology of Mollusca*, vol. 2, Academic Press, New York, pp. 209-232, 1966.

RICE, R.H.; LEE, Y.M.; BROWN, W.D. Interactions of heme proteins with hydrogen peroxide: protein crosslinking and covalent binding of benzo[a]pyrene and 17 beta-estradiol. *Arch Biochem Biophys.* 221: 417-427, 1983.

ROBERTS, J.E.; HOFFMAN, B.M.; RUTTER, R.; HAGER, L.P. Electron-nuclear double resonance of horseradish peroxidase compound I. Detection of the porphyrin pi-cation radical. *J. Biol. Chem.* 256(5):2118-2121, 1981.

SAKAIDA, I.; KYLE, M.E; FARBER, J.L. Autophagic degradation of protein generates a pool of ferric iron required for the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* 37:435-442, 1990.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SHIKAMA, K.; KATAGIRI, T. *Aplysia* oxymyoglobin with an unusual stability property. *J. Mol. Biol.* 174: 697-704, 1984.

SHIMIZU, K. Ontogeny of hemoglobin. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.* 41(6): 1242-1250, 1978.

SIL, S.; CHAKRABORTI, A.S. Comparative studies on the interaction of protoporphyrin with hemoglobin and myoglobin. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 33: 285-291, 1996.

SLUYTERMAN, L.A.; WIJDENES, J. Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. II. Experimental verification. *J. Chromatogr.* 150: 31-44, 1978.

SMITH, S.E.; BRITAIN, T.; WELLS, R.M.G. A kinetic and equilibrium study of ligand binding to the monomeric and dimeric haem-containing globins of two chitons. *Biochem. J.* 252: 673-678, 1988.

SUZUKI, T. Amino acid sequence of myoglobin from the mollusc *Dolabella auricularia*. *J. Biol. Chem.* 261: 3692-3699, 1986.

SUZUKI, T. Autoxidation of oxymyoglobin with the distal(E7) glutamine. *Biochim. Biophys. Acta.* 914: 170-176, 1987.

SUZUKI, T.; FURUKOHRI, T. The ear-shell (*Sulculus diversicolor aquatilis*) myoglobin is composed of an unusual 39 kDa polypeptide chain. *Experientia* 45: 998-1002, 1989.

SUZUKI, T.; FURUKOHRI, T.; OKAMOTO, S. Amino acid sequence of myoglobin from the chiton *Liolophura japonica* and a phylogenetic tree for molluscan globins. *J. Protein Chem.* 12(1): 45-50, 1993.

SUZUKI, T.; IMAI, K. Evolution of myoglobin. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 979-1004, 1998.

SUZUKI, T.; KAWAMICHI, H.; IMAI, K. A myoglobin evolved from indoleamine 2,3-dioxygenase, a tryptophan-degrading enzyme *Comp. Biochem. Physiol.* 121b: 117-128, 1998.

SUZUKI, T.; TAKAGI, T.A myoglobin evolved from indoleamine-2,3-dioxygenase. *J. Mol. Biol.* 228: 698-700, 1992.

TADA, T.; WATANABE, Y.; MATSUOKA, A.; IKEDA-SAITO, M.; IMAI, K.; NI-HEI, Y., SHIKAMA, K. African elephant myoglobin with an unusual autoxidation behavior: comparison with the H64Q mutant of sperm whale myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1387(1-2): 165-176, 1998.

TELES, H.M. Distribution of *Biomphalaria straminea* in the southern neotropical region of Brazil. *Rev. Saúde Pública* 30(4): 341-349, 1996.

TERWILLIGER, R.C.; TERWILLIGER, N.B. Molluscan hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* 81b: 255-261, 1985.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680, 1994.

TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1979.

TRAMONTANO, A. Homology Modeling with Low Sequence Identity. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 14: 293-300, 1998.

TRANDAFIR, F.; HOOGEWIJS, D.; ALTIERI, F.; RIVETTI DI VAL CERVO, P.; RAMSER, K.; VAN DOORSLAER, S.; VANFLETEREN, J.R.; MOENS, L.; DEWILDE, S. Neuroglobin and cytoglobin as potential enzyme or substrate. *Gene*. 398: 103–113, 2007.

TRENT, J.T.; HARGROVE, M.S. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 277: 19538-19545, 2002.

TSUBAMOTO, Y.; MATSUOKA, A.; YUSA, K.; SHIKAMA, K. Protozoan myoglobin from *Paramecium caudatum*. Its autoxidation reaction and hemichrome formation. *Eur. J. Biochem.* 193: 55–59, 1990.

VASUDEVAN, S.G.; ARMAREGO, W.L.F.; SHAW, D.C.; LILLEY, P.E.; DIXON, N.E.; POOLE, R.K. Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 226: 49-58, 1991.

VERJOVISKI-ALMEIDA, S.; DeMARCO, R.; MARTINS, E.A.L.; GUIMARÃES, P.E.M.; OJOPI, E.P.B.; PAQUOLA, A.C.M.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA JR., M.Y.N.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.; LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.C.; MARQUES, R.C.P.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SÁ, R.G.; STUKART, G.C.; SOARES, M.B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.B.N.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.M.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L. C. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 35(2): 148-157, 2003.

VINOGRADOV, S.N. The structure of invertebrate extracellular haemoglobins (erythrocrucorins and chlorocrucorins). *Comp. Biochem. Physiol.* 82b: 1-15, 1985.

VINOGRADOV, S.N.; HOOGEWIJS, D.; BAILLY, X.; ARREDONDO-PETER, R.; GOUGH, J.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; VANFLETEREN, J.R. A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol. Biol.* 7: 31, 2006.

VINOGRADOV, S.N.; WALZ, D.A.; POHAJDAK, B.; MOENS, L.; KAPP, O.H.; SUZUKI, T.; TROTMAN, C.N.A. Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins. *Comp. Biochem. Physiol.* 106b: 1-26, 1993.

VULETICH, J.L.; OSAWA, Y.; AVIRAM, M. Enhanced lipid oxidation by oxidatively modified myoglobin: role of protein-bound heme. *BBRC* 269: 647-651, 2000.

WAJCMAN, H; KIGER, L.; MARDEN, M.C. Structure and function evolution in the superfamily of globins. *C R Biol.* 332(2-3): 273-282, 2009.

WALLACE, W.J.; HOUTCHENS, R.A.; MAXWELL, J.C.; CAUGHEY, W.S. Mechanism of autoxidation for hemoglobins and myoglobin. *J. Biol. Chem.* 257: 4966-4969, 1982.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. 1941. In: HARRIS, D. A.; BASHFORD, C. L. *Spectrophotometry e spectrofluorimetry a practical approach*, Oxford, Washington, 1987.

WARRIS, P.D.; RHODES, D.N. Haemoglobin concentrations in beef. *J. Sci. Food Agric.* 28: 931-934, 1977.

WEBER, R.E. Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. *Amer. Zool.* 20: 79-101, 1980.

WEBER, R.E.; VINOGRADOV, S.N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* 81(2): 569-628, 2001.

WEBSTER, D.A. Structure and function of bacterial haemoglobin and related proteins. *Adv. Inorg. Biochem.* 7: 245-262, 1987.

WESTERMEIER, R.; POSTEL, W.; GÖRG, A.; TELEK, L. Isoelectric focusing and sodium dodecylsulphate electrophoresis of buffer soluble seed proteins of twelve varieties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus L.*) *J. Sci. Food Agric.* 36(3): 135-141, 1985.

WILKS, A.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 267: 8827-8833, 1992.

WILSON, M.T.; REEDER, B.J. Oxygen-binding haem proteins. *Exp Physiol* 93: 128-132, 2008.

WINNEPENNICKX, B.; BACKELJAU T.; DE WACHTERT, R. Investigation of Molluscan Phylogeny on the Basis of 18s rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 13(10):1306-1317. 1996.

WITTENBERG, J.B. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol. Rev.* 50: 559-636, 1970.

WITTENBERG, J.B.; WITTENBERG, B.A. Mechanisms of cytoplasmic haemoglobin and myoglobin function. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19: 217-241, 1990.

WITTENBERG, J.B.; WITTENBERG, B.A. Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* 206: 2011-2020, 2003.

ZHU, H.; RIGGS, A.F. Yeast flavohaemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5015-5019, 1992.

APÊNDICE



9. APÊNDICE

Protein: Bgl
Length = 150 amino acids

| Amino Acid | Number | Mol% |
|------------|--------|-------|
| Ala A | 21 | 14,00 |
| Cys C | 0 | 0,00 |
| Asp D | 10 | 6,67 |
| Glu E | 5 | 3,33 |
| Phe F | 8 | 5,33 |
| Gly G | 12 | 8,00 |
| His H | 2 | 1,33 |
| Ile I | 7 | 4,67 |
| Lys K | 15 | 10,00 |
| Leu L | 18 | 12,00 |
| Met M | 2 | 1,33 |
| Asn N | 14 | 9,33 |
| Pro P | 4 | 2,67 |
| Gln Q | 8 | 5,33 |
| Arg R | 1 | 0,67 |
| Ser S | 10 | 6,67 |
| Thr T | 2 | 1,33 |
| Val V | 8 | 5,33 |
| Trp W | 3 | 2,00 |
| Tyr Y | 0 | 0,00 |

Protein: Bten
Length = 150 amino acids

| Amino Acid | Number | Mol% |
|------------|--------|-------|
| Ala A | 21 | 14,00 |
| Cys C | 0 | 0,00 |
| Asp D | 11 | 7,33 |
| Glu E | 4 | 2,67 |
| Phe F | 8 | 5,33 |
| Gly G | 11 | 7,33 |
| His H | 2 | 1,33 |
| Ile I | 6 | 4,00 |
| Lys K | 14 | 9,33 |
| Leu L | 18 | 12,00 |
| Met M | 2 | 1,33 |
| Asn N | 14 | 9,33 |
| Pro P | 4 | 2,67 |
| Gln Q | 8 | 5,33 |
| Arg R | 2 | 1,33 |
| Ser S | 11 | 7,33 |
| Thr T | 2 | 1,33 |
| Val V | 9 | 6,00 |
| Trp W | 3 | 2,00 |
| Tyr Y | 0 | 0,00 |

Protein: 1mbn
Length = 153 amino acids

| Amino Acid | Number | Mol% |
|------------|--------|-------|
| Ala A | 17 | 11,11 |
| Cys C | 0 | 0,00 |
| Asp D | 7 | 4,58 |
| Glu E | 14 | 9,15 |
| Phe F | 6 | 3,92 |
| Gly G | 11 | 7,19 |
| His H | 12 | 7,84 |
| Ile I | 9 | 5,88 |
| Lys K | 19 | 12,42 |
| Leu L | 18 | 11,76 |
| Met M | 2 | 1,31 |
| Asn N | 1 | 0,65 |
| Pro P | 4 | 2,61 |
| Gln Q | 5 | 3,27 |
| Arg R | 4 | 2,61 |
| Ser S | 6 | 3,92 |
| Thr T | 5 | 3,27 |
| Val V | 8 | 5,23 |
| Trp W | 2 | 1,31 |
| Tyr Y | 3 | 1,96 |

Protein: lazi
Length = 153 amino acids

| Amino Acid | Number | Mol% |
|------------|--------|-------|
| Ala A | 15 | 9,80 |
| Cys C | 0 | 0,00 |
| Asp D | 8 | 5,23 |
| Glu E | 13 | 8,50 |
| Phe F | 7 | 4,58 |
| Gly G | 15 | 9,80 |
| His H | 11 | 7,19 |
| Ile I | 9 | 5,88 |
| Lys K | 19 | 12,42 |
| Leu L | 17 | 11,11 |
| Met M | 2 | 1,31 |
| Asn N | 2 | 1,31 |
| Pro P | 4 | 2,61 |
| Gln Q | 6 | 3,92 |
| Arg R | 2 | 1,31 |
| Ser S | 5 | 3,27 |
| Thr T | 7 | 4,58 |
| Val V | 7 | 4,58 |
| Trp W | 2 | 1,31 |
| Tyr Y | 2 | 1,31 |

Apêndice 1. Composição de aminoácidos das mioglobinas de *B. glabrata* (Bgl), *B. tenagophila* (Bten), baleia (1mbn) e coração de cavalo (azi).

