

LUCIA PEREIRA DA SILVA AIROLDI

HEMOCIANINA DE *Megalobulimulus ovatus*: ASPECTOS ESTRUTURAIS E  
FUNCIONAIS

Tese de Livre Docência apresent  
tada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de  
Campinas.

CAMPINAS

1983

UNICAMP

*A meu pai,*

*Claudio,*

*Flavia, Giovana, Renata e Rogério.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. José Aristodemo Pinotti, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, ao Prof.Dr. Crodowaldo Pavan, DD.Diretor do Instituto de Biologia e ao Prof.Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, Chefe do Departamento de Bioquímica, pelo apoio ao desenvolvimento de pesquisas neste Departamento.

Ao Prof.Dr. Aldo Focesi Júnior, que nos iniciou na carreira científica, pelo incentivo e amizade sempre demonstrados.

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica, em especial ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira por nos facilitar o uso de seu laboratório, ao Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Dra. Maria Edwiges Hoffmann pelo auxílio na obtenção de parte da bibliografia e às Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, Nilce Correa Meirelles e Satie Matsushika Ogo, pelas críticas e discussões no decorrer deste trabalho.

Ao Sr. José Osmar Gaspar da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas por possibilitar a obtenção das fotomicrografias eletrônicas.

Ao Dr. Raphael Faro Netto, do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia de São Paulo, pela permissão de uso da ultracentrífuga analítica, e à Srta. Rosa Sadoyama pelo desempenho técnico.

Ao Dr. Pierre Charles Georges Montouchet do Departamento de Zoologia, e o Dr. José Luiz Moreira Leme do Museu de Zoologia de São Paulo, pelas informações a respeito do animal utilizado.

Ao Dr. Washington Brasil Pereira da Silva, Sra Dora Célia Sancho Pereira da Silva, Sr. Antonio Carlos G. Gianconi e Sr. Luiz Augusto C. Passos pela coleta dos animais.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e em especial à Srta Regina Célia Rossetto pelo cuidado dispensado na manutenção dos animais no laboratório e à Srta Maria Luiza de Souza, pelo esmero e dedicação no trabalho de datilografia.

## ABREVIATURAS

Bis-tris	Bis(2-hidroxietyl)imino-tris(hidroxietyl)metano
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	ácido etilenoglicol bis( $\beta$ -aminoetyl éter)-N-N'-tetracético
EXAFS	"extended X-ray absorption fine structure"
PBS	"phosphate buffered saline"
PMB	p-hidroxi mercuribenzoato
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	Tris(hidroxietyl)-amino metano.

## Í N D I C E

	pág.
CONSIDERAÇÕES INICIAIS E OBJETIVOS.....	1
INTRODUÇÃO .....	3
PARTE EXPERIMENTAL .....	23
Obtenção do material biológico .....	23
Determinação do pH da hemolinfa .....	23
Purificação da hemocianina .....	25
Separação de $\alpha$ e $\beta$ hemocianinas .....	26
Análise por ultracentrifugação .....	26
Obtenção de hemocianina desionizada.....	27
Determinação do coeficiente de extinção .....	27
Determinação da concentração de proteína.....	28
Preparação da apo-hemocianina.....	28
Efeito da concentração hidrogeniônica e de cations divalentes na dissociação de hemo- cianina .....	29
Determinação do conteúdo de carboidratos.....	29
Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	30
Determinação de grupos tióis livres.....	31
Análise por microscopia eletrônica .....	31
Preparo de antissoros.....	32
Testes serológicos.....	33
Titulação com cianeto.....	33
Remoção de cobre por cianeto.....	33
Estudo de equilíbrio da $\beta$ hemocianina com oxigê- nio.....	34
Efeito da concentração hidrogeniônica no equilí- brio da $\beta$ hemocianina com oxigênio.....	37
Efeito da concentração de cálcio no equilíbrio da $\beta$ hemocianina com oxigênio.....	37
RESULTADOS .....	38

	pág.
Caracterização do material biológico .....	38
Análise das preparações de $\alpha$ e $\beta$ hemocianinas..	39
Efeito do pH e de íons $Ca^{2+}$ na dissociação da $\beta$ hemocianina.....	44
Determinação do conteúdo de carboidratos.....	48
Análise por eletroforese em gel de poliacrilami- da.....	48
Determinação de grupos tióis livres.....	52
Análise por microscopia eletrônica.....	52
Testes serológicos.....	56
Efeito de adição de cianeto à oxihemocianina.....	56
Cinética da remoção de cobre por cianeto.....	66
Conteúdo de cobre e capacidade de ligação de oxigênio.....	66
Equilíbrio da hemocianina com oxigênio.....	70
DISCUSSÃO .....	74
RESUMO.....	93
SUMMARY.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS E OBJETIVOS

O nosso interesse por hemocianinas foi uma decorrência dos trabalhos sobre a relação estrutura-função de hemoglobinas, desenvolvidos em colaboração com o Dr. Aldo Focesi Jr., a Dra. Nilce Correa Meirelles, a Dra. Satie Hatsushika Ogo além de alguns estudantes de pós-graduação que desenvolveram seus trabalhos de tese neste laboratório.

Sendo as hemocianinas também transportadores de oxigênio, mas com estrutura e composição totalmente diferentes das hemoglobinas, decidimos estudar mais detalhadamente esse tipo de proteína respiratória. Nossos trabalhos iniciais desenvolveram-se na Universidade de Roma, em colaboração com o Dr. Maurizio Brunori e o Dr. Lello Zolla, quando tivemos a oportunidade de estudar a influência de vários ligantes sobre a remoção de cobre por cianeto em hemocianinas de diversas espécies de moluscos e artrópodos.

Retornando ao Brasil, entramos em contacto com o Dr. Pierre Charles Georges Montouchet, do Departamento de Zoologia deste Instituto, que nos forneceu várias informações sobre o molusco *Megalobulimus ovatus*, conhecido popularmente como "berador", devido ao ruído produzido pela rádula ao se alimentar de folhas verdes. Esse animal apresenta inúmeras vantagens como material de estudo científico, ou seja, existe em nichos ecológicos restritos e de fácil acesso, é bastante resistente e de fácil manutenção em laboratório, e apresenta dimensões que facilitam a coleta e alto rendimento em hemolinfa.



Assim, iniciamos um trabalho de purificação e caracterização da hemocianina proveniente desse gastrópodo, bem como o estudo de algumas propriedades funcionais e estruturais com a finalidade de relacioná-las entre si. Esperamos com o presente trabalho de tese, acrescentar à literatura existente esses dados relativos à hemocianina de um gastrópodo pulmonado de habitat terrestre, pois embora hemocianinas de um grande número de espécies marinhas e de água doce tenham sido estudadas, entre os gastrópodos terrestres somente as hemocianinas de *Helix pomatia* e *Levantina hierosolima* foram até hoje descritas detalhadamente.

## INTRODUÇÃO

Hemocianinas são proteínas de alto peso molecular que ocorrem dissolvidas livremente na hemolinfa de alguns invertebrados pertencentes aos filos Mollusca e Arthropoda. São encontradas em espécies terrestres e de água doce, mas principalmente em espécies marinhas. Sua função fisiológica é semelhante à da hemoglobina, agem no transporte de oxigênio ao qual também se ligam reversivelmente, embora suas propriedades funcionais e estruturais sejam ainda bem menos conhecidas e estudadas que as de hemoglobinas. Na realidade, à parte a semelhança funcional, as hemocianinas parecem ter muito pouco em comum com outras proteínas respiratórias. Apresentam peso molecular bastante elevado, cerca de  $1 \times 10^7$  daltons para as de alguns moluscos e  $4,5 \times 10^5$  daltons no caso das de alguns artrópodos (BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980). Contêm cobre ao invés de ferro, o que lhes confere uma cor azul característica, e não possuem porfirina, apresentando entre tanto em alguns casos, cadeias de carboidratos contendo glicosamina, galactosamina, fucose, manose, galactose, glicose, xilose e outros resíduos ainda não identificados (TORENSMA et alii, 1981a; Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971; DIJK et alii, 1970 e ALBERGONI et alii, 1972).

A cor azul da hemolinfa de moluscos havia chamado a atenção de naturalistas há muito tempo, tendo já sido descrita por SWAMMERDAM em 1669. Outros autores também descreveram a ocorrência de sangue azul em caramujos, caranguejos e polvos (KOBERT, 1903). O reconhecimento de sua função como proteína respiratória deve-se a BERT em 1867. FRÉDÉRICQ em 1878, utilizou pela primei-

ra vez os termos "oxihemocianina" e "hemocianina", referindo-se a essa proteína respiratória quando ligada ou não ao oxigênio.

A maioria dos estudos de hemocianinas de moluscos foi realizada com espécimens pertencentes às classes Gastropoda (principalmente Pulmonata e Prosobranchia) e Cephalopoda (especialmente Decapoda e Octopoda) ( HEIRWEGH et alii, 1961; De PHILLIPS et alii, 1970; Er - el et alii, 1972, WOOD & PEACOCKE , 1973; HALL et alii, 1975; BRIDGES et alii, 1979; BRIX et alii, 1979 e BONAVENTURA et alii, 1981). Também foi descrita a hemocianina de quitons (REDMOND, 1962a), pertencentes à subclasse Polyplacophora da classe Amphineura. Em espécimens das classes Monoplacophora, Scaphopoda e Bivalvia e da subclasse Opisthobranchia da classe Gastropoda, não foi ainda descrita a presença de hemocianina (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). Nos moluscos, quase toda a proteína encontrada na hemolinfa é hemocianina, cerca de 95% em *Helix pomatia* e 98% em *Octopus vulgaris* ( LUSTIG et alii, 1937). A concentração da hemocianina frequentemente varia com a idade e a estação do ano, sendo de 15 a 50 mg/ml em *H.pomatia* e de 60 a 114 mg/ml em *O.vulgaris* ( PILSON, 1964).

No filo Arthropoda, encontra-se hemocianina nas espécies da ordem Decapoda, pertencente à subclasse Malacostraca, e nas espécies da classe Crustacea ( JOHNSTON et alii, 1967 ; MOORE et alii, 1968; FIELDER et alii, 1971; CARPENTER & Van HOLDE, 1973; CHANTLER et alii, 1973; KUIPER et alii, 1975; HAMLIN & FISH, 1977; BROUWER et alii, 1978a; CHAIX et alii, 1981 e HERKOVITS et alii, 1981). É também encontrada nas ordens Araneida e Scorpionida, ambas da classe Arachnida (LOEWE & LINZEN, 1975; JOLLÈS et alii, 1979; KLARMAN & DANIEL, 1980 e Van BRUGGEN et alii, 1980), e em *Limulus polyphemus*, uma das quatro espécies remanescentes

da ordem Xiphosura, da quase extinta subclasse Merostomata (SULLIVAN et alii, 1974). Há também descrição da existência de hemocianina nas ordens Isopoda, Amphipoda e Euphausiacea pertencentes à subclasse Malacostraca (TERWILLIGER et alii, 1979 e Van HOLDE & BRENOWITZ, 1981). Ainda não foi detectada hemocianina nas classes Progoneata, Chilopoda, Hexapoda e na subclasse Entomostraca dos crustáceos (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). Além da hemocianina, em geral a hemolinfa dos artrópodos contém uma proteína responsável por coagulação, em concentração aproximada de 2 mg/ml, e pequenas quantidades de outras proteínas de baixo peso molecular (DUCHATEAU & FLORKIN, 1954; PILSON, 1965 e DECLEIR, 1968). A variação da concentração da hemocianina na hemolinfa de artrópodos é bem grande, ocorrendo na faixa de 0,3 a 100 mg/ml (GHIRETTI, 1962).

As hemocianinas apresentam-se em uma grande variedade de estados de agregação que dependem da força iônica, especialmente da concentração de cátions divalentes como  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , e do pH (LONTIE & WITTERS, 1973 e BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980). Estudos de microscopia eletrônica e a determinação de coeficientes de sedimentação revelaram padrões completamente diferentes para as hemocianinas de artrópodos e de moluscos (Van BRUGGEN & FERNÁNDEZ-MORÁN, 1966; FERNÁNDEZ-MORÁN et alii, 1966; Van BRUGGEN, 1968; WOOD et alii, 1971; MELLEMA & KLUG, 1972; ENGELBORGHES & LONTIE, 1973; SIEZEN, 1974; SIEZEN & Van DRIEL, 1974; SIEZEN & Van BRUGGEN, 1974 e BROUWER et alii, 1976), refletindo profundas diferenças em sua estrutura quaternária, embora suas propriedades funcionais exibam bastante similaridade, pois cooperatividade na ligação de oxigênio, efeito alostérico de prótons, de íons cloreto e de íons de metais divalentes como cálcio e magnésio,

são comuns às hemocianinas de espécies de ambos os filos ( BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980). Dentro de cada uma das duas classes de hemocianinas, há uma relativa uniformidade nos valores dos coeficientes de sedimentação observados, embora não haja nenhum componente com um determinado valor de coeficiente de sedimentação comum às hemocianinas dos dois filos. Assim, tanto em moluscos quanto em artrópodos as hemocianinas apresentam mais de um estado de agregação, sem que haja evidências até agora de uma subunidade monomérica comum a ambas (BRUNORI et alii, 1982b).

As hemocianinas de artrópodos existem principalmente em estruturas quaternárias que apresentam coeficientes de sedimentação 5, 16 e 25 S, embora em alguns casos tenham sido obtidos valores de 34 e 60 S para hemocianinas de *Limulus polyphemus*, *Cancer pagurus*, e de alguns espécimens da classe Arachnida (Van BRUGGEN, 1968; Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). A partir desses valores obtêm-se um peso molecular de cerca de  $4,5 \times 10^5$  daltons para a maioria das moléculas nativas de hemocianinas de artrópodos, correspondentes ao componente 16 S, que seria o hexâmero da unidade 5 S. Em alguns casos, a molécula nativa é o próprio hexâmero, como a hemocianina de *Panulirus interruptus* (KUIPER et alii, 1975), a de *Penaeus setiferus* (BROUWER et alii, 1978a) e a do isópodo *Bathynomus giganteus* (Van HOLDE & BRENOWITZ, 1981). Já em outros casos, como na hemocianina de *Limulus polyphemus*, a molécula nativa compõe-se de 48 subunidades (48-mero) (JOHNSON & YPHANTIS, 1978). A existência da molécula em hexâmeros, dodecâmeros, 24-meros ou 48-meros, é, no caso dos artrópodos, dependente da espécie. Além disso, parece haver uma relação entre o peso molecular da molécula de hemocianina e a existência de subunidades heterogêneas ou homogêneas. Assim, *Limulus poly-*

*phemus* e *Tachypleus tridentatus* possuem hemocianinas altamente polimerizadas (48-meros) e apresentam uma extensa diversidade de subunidades (LANY et alii, 1979), enquanto que recentemente foram caracterizadas duas hemocianinas hexaméricas, uma do isópodo *Liga exotica* (TERWILLIGER et alii, 1979) e outro do camarão *Penaeus setiferus* ( BROUWER et alii, 1978a), que aparentemente não apresentam subunidades heterogêneas.

No filo Mollusca, as duas classes principais parecem apresentar hemocianinas diferentes. Nos gastrópodos, a hemocianina existe na forma de grandes partículas cilíndricas, de cerca de 30 nm de diâmetro e 36 nm de altura, com peso molecular de aproximadamente  $1 \times 10^7$  daltons (FERNÁNDEZ-MORÁN et alii, 1966 e MELLEMA & KLUG, 1972). Nos cefalópodos, a hemocianina também apresenta forma cilíndrica, e o mesmo diâmetro de 30 nm, mas a altura corresponde à metade daquela observada para os gastrópodos ( Van HOLDE & COHEN, 1964; TALLANDINI & SALVATO, 1981 e BONAVENTURA et alii, 1981). Além dessa diferença estrutural na molécula nativa, alguns gastrópodos, principalmente os de habitat terrestre possuem hemocianinas que apresentam dois componentes distintos,  $\alpha$  e  $\beta$  hemocianina. Esses componentes apresentam o mesmo peso molecular e coeficiente de sedimentação, mas diferem quanto à dissociação:  $\alpha$  hemocianina dissocia-se de partículas 100 S para 60 S (metades) em presença de NaCl 1 M em pH 5,7, enquanto  $\beta$  hemocianina é estável nessas condições (HEIRWEGH et alii, 1961). A relação desses dois componentes varia nas várias espécies descritas. Enquanto *Helix arbustorum* apresenta 100% de  $\alpha$  hemocianina, *Pila leopoldvillensis*, *Cymbium neptuni* e *Buccinum undatum* apresentam somente  $\beta$  hemocianina. Já *Helix hortensis*, *Strophocheilus terrestris* e *Helix aspersa* apresentam cerca de 25 a 30%

de  $\alpha$  e 75-70% de  $\beta$  hemocianina e *Helix pomatia*, sem dúvida até hoje a melhor estudada, 75% de  $\alpha$  e 25% de  $\beta$  hemocianina ( Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971).

A menor unidade descrita na hemocianina de moluscos possui um coeficiente de sedimentação de 11 a 14 S, correspondendo a um peso molecular de aproximadamente  $4 \times 10^5$  daltons. Essa unidade porém, seria já um polímero (octâmero) da subunidade funcional mínima teórica, calculada a partir da determinação de cobre (Van BRUGGEN et alii, 1962; GHIRETTI, 1966; GHIRETTI-MAGALDI et alii, 1966 e Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). A hemocianina de moluscos aparece na hemolinfa principalmente como componentes 20, 60 e 100 S (BROHULT, 1947; OMURA et alii, 1961; Van HOLDE & COHEN, 1964; ELLIOT & Van BAELEN, 1965 e LONTIE & WITTERS, 1966), embora componentes de coeficientes de sedimentação 135, 155 e 175 S tenham sido encontrados na hemocianina de *Busycon canaliculatum* (ERIKSSON-QUENSEL & SVEDBERG, 1936). Um maior grau de organização foi observado para o gastrópodo *Kelletia kelletia* onde micrografias eletrônicas mostram polímeros lineares formados pela agregação das moléculas (CONDIE & LANDER, 1964). Semelhante fenômeno foi encontrado por GHIRETTI-MAGALDI et alii, 1979, que descreveram estruturas tubulares resultantes da agregação espontânea da hemocianina de *Aplysia limacina*.

Uma diferença fundamental no que diz respeito à dissociação das hemocianinas de artrópodos e moluscos é que, no caso de artrópodos, a dissociação ocorre até a subunidade funcional mínima, 5 S, de peso molecular aproximado  $7,5 \times 10^4$  daltons, que é a unidade que contém um sítio de ligação cobre - oxigênio (BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980). Essa dissociação é alcançada em condições brandas, pelo aumento do pH e emprego de agentes

quelantes como EDTA ou EGTA, ou pela remoção dos cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  por diálise em pH alcalino, acima de 9 (SULLIVAN et alii, 1974; LOEWE & LINZEN, 1975; ROCHU et alii, 1978 e LARSON et alii, 1981). Já as hemocianinas de moluscos apresentam um sítio de ligação por cadeia peptídica de  $5 \times 10^4$  daltons (BROWER & KUIPER, 1973 e QUITTNER et alii, 1978), embora não se dissociem além de um polímero 11 a 14 S, nas mesmas condições acima descritas para as hemocianinas de artrópodos. Mesmo empregando agentes como uréia, cloreto de guanidina e dodecilsulfato de sódio, não ocorre dissociação além desse estágio. Somente em condições mais enérgicas, como o uso de ácido fórmico 70%, há dissociação em subunidades de cerca de  $5 \times 10^4$  daltons de peso molecular (aproximadamente 3 S), além de pequena quantidade de material com  $2,5 \times 10^4$  daltons de peso molecular (DIJK et alii, 1970). Mais recentemente foram isoladas essas subunidades através de clivagem proteolítica da molécula proteica (LONTIE et alii, 1973; GIELENS et alii, 1975; BONAVENTURA et alii, 1977 e GIELENS et alii, 1980) e apesar de manterem as características de ligação com oxigênio, perdem a capacidade de reassociação entre si para formarem a molécula nativa (BONAVENTURA et alii, 1977a).

As subunidades isoladas mostram-se heterogêneas em suas propriedades espectrais e funcionais (BROUWER et alii, 1976; BROUWER et alii, 1979 e GIELENS et alii, 1980), contudo não está ainda claro se essa heterogeneidade é resultado da fragmentação proteolítica ou uma propriedade intrínseca, resultante de diferenças estruturais em cada cadeia polipeptídica. É interessante notar que em apenas dois casos, a hemocianina de *Helix pomatia* e hemocianina de *Murex trunculus* foi demonstrada a existência de cadeias polipeptídicas diferentes (BROUWER et alii, 1978b e BROUWER et alii, 1979).



O desenvolvimento de técnicas eletroforéticas e imunológicas bastante sensíveis tornou possível a determinação de relações antigênicas entre hemocianinas da mesma ou de diferentes espécies. A hemolinfa de *Helix pomatia* contém  $\alpha$  hemocianina e duas formas de  $\beta$  hemocianina, uma fração que se cristaliza ( $\beta_c$ ) e uma fração solúvel ( $\beta_s$ );  $\beta_s$  e  $\alpha$  são imunologicamente idênticas e ambas diferentes de  $\beta_c$  (GIELENS et alii, 1973; GIELENS et alii, 1979; PRÉAUX et alii, 1979 e LONTIE, 1982).

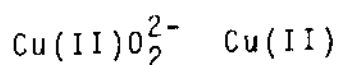
Essas mesmas técnicas foram também empregadas para determinar a orientação relativa entre as várias subunidades, como no caso da hemocianina de *Androctonus australis*, onde duas subunidades idênticas estão localizadas internamente à subunidade 34 S, enquanto outras quatro também idênticas entre si ocupam posições externas (LAMY et alii, 1980). As homologias observadas entre várias hemocianinas, de acordo com resultados de técnicas imunoeletroforéticas, são de grande valor no estabelecimento de relações filogenéticas entre as hemocianinas. Assim, em hemocianinas de crustáceos, ROCHU & FINE, 1978 e SEVILLA & LAGARRIGUE, 1979, encontraram relações antigênicas entre várias subunidades, enquanto nenhuma correspondência foi observada entre queliceros e crustáceos (PARISI et alii, 1962 e MALLEY et alii, 1965).

Aparentemente as hemocianinas pertencem ao tipo 3 de proteínas azuis que contêm cobre, caracterizadas por apresentarem uma banda de absorção intensa no ultravioleta próximo, em 335 a 350 nm (DOOLEY et alii, 1981), além da absorção em 278 nm e de outro pico de menor intensidade na região de 550 a 650 nm. Em ambos os filos as propriedades espectrais se assemelham embora claras diferenças sejam descritas, como a absorbância máxima em 336 nm para as hemocianinas de artrópodos e em 346 nm para as

de moluscos, além de variações na atividade ótica ( BRUNORI et alii, 1981). A ligação do cobre à proteína é bastante forte, tendo sido obtidos valores de  $10^{17}$  a  $10^{19}$  para a constante de ligação (STRICKS & KOLTHOFF, 1951; FESENFELD, 1954). O conteúdo de cobre difere nos dois filos, embora em todos os casos estudados até agora, haja sempre dois átomos de cobre para cada molécula de oxigênio ligada. O cobre não é removido da proteína, mesmo desnaturalada, por agentes complexantes como EDTA ou o-fenantrolina. A remoção de cobre pode ser feita por  $\text{CN}^-$  por cianeto, que remove cerca de 85 a 100% do cobre, produzindo a apo-hemocianina, cujas propriedades físicas não parecem diferir muito das da proteína nativa (BAYER & FIEDLER, 1962; GHIRETTI-MAGALDI et alii, 1966 e FERNÁNDEZ-MORÁN et alii, 1966), embora estudos recentes demonstraram modificações antigênicas causadas pela remoção desse metal (AIROLDI et alii, 1982). Esse processo é reversível, tendo sido descritos na literatura rendimentos de 65 até 100%, desde que seja usado cobre monovalente para a obtenção da hemocianina a partir da apoproteína (GHIRETTI-MAGALDI & NARDI, 1963; LONTIE et alii, 1965 e ZATTA & SALVATO, 1980).

A estrutura do centro ativo das hemocianinas, isto é, a natureza dos grupos que se ligam ao par de átomos de cobre, ainda não se encontra totalmente esclarecida. Evidências indiretas de que grupos sulfidrilas poderiam estar ligados ao cobre (KLOTZ & KLOTZ, 1955) foram descartadas pelos resultados obtidos por GHIRETTI-MAGALDI & NARDI, 1963; LONTIE, 1958 e THOMSON et alii, 1959, que mostraram que a remoção de cobre causa no máximo a exposição de um grupo sulfidrilas por quatro átomos de cobre removidos e que o bloqueio desses grupos na apo-hemocianina por reagentes específicos para grupos -SH, não impede a reconstitui-

ção da proteína pela adição de sal de Cu(I). Uma outra hipótese seria a ligação dos átomos de cobre a resíduos de histidina, o que tem sido confirmado por uma série de evidências químicas e espectroscópicas: as curvas de titulação de hemocianina e apo-hemocianina indicam a liberação de um grupo com pK de valor semelhante ao da histidina por átomo de cobre removido (LONTIE, 1958 e KONINGS, 1969); a fotoxidação da histidina está relacionada com a perda das características de absorção do cobre (WOOD & BANNISTER, 1968 e ENGELBORGHES et alii, 1968); espectros de dicroísmo circular de hemocianinas se assemelham a certos complexos de cobre com peptídeos onde a ligação se dá através de resíduos de histidina (McKEE et alii, 1981). Os estudos de oxihemocianinas feitos por FREEDMAN et alii, 1976, através de Raman ressonante, demonstraram que a vibração de estiramento para o dióxigênio ligado é característica de uma ponte peróxido, sendo proposta a transferência de um elétron de cada um dos Cu(I) ao  $O_2$  na ligação da molécula de oxigênio, formando



Mais recentemente, as evidências sugeridas por estudos do espectro vibracional (FREEDMAN et alii, 1976 e LARRABEE & SPIRO, 1980), propriedades magnéticas (DOOLEY et alii, 1978), químicas (EICKMAN et alii, 1979) e eletrônicas (FREEDMAN et alii, 1976; EICKMAN et alii, 1979 e HIMMELWRIGHT et alii, 1980) de oximetá-hemocianinas, levaram à proposição de um sítio com dois átomos de cobre(II), mantidos por ligantes endógenos e exógenos formando pontes, resultando em um complexo diamagnético, onde  $J > 550 \text{ Gm}^{-1}$  (McKEE et alii, 1981). No caso de oxihemocianina, o ligante exógeno seria  $O_2^{2-}$ , enquanto que o átomo responsável pela ponte endógena permanece desconhecido, embora haja frequentes su

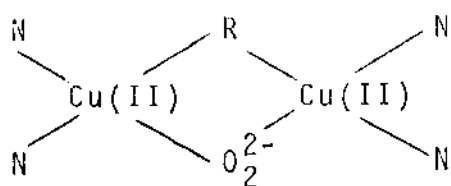
gestões de que seja um resíduo de tirosina o doador de oxigênio fenólico, devido à absorção em 425 nm do espectro visível (EICKMAN et alii, 1979). Os estudos de BROWN et alii, 1980, com hemocianina de *Busycon canaliculatum* na forma oxigenada utilizando análise por absorção de Raios-X (EXAFS), mostram a coordenação de quatro a cinco átomos de baixo número atômico (provavelmente oxigênio e/ou nitrogênio) a cada cobre com uma distância de 3,67 Å entre os dois átomos de cobre. Os mesmos autores consideram que cada Cu(II) esteja ligado a três nitrogênios imidazólicos, uma ponte peróxido e um ligante endógeno. Já os trabalhos de CO et alii, 1981 e de CO & HODGSON, 1981, sugerem não três, mas apenas dois grupos imidazólicos ligados por átomo de cobre, mantendo entre si uma distância de 3,55 Å na oxihemocianina, enquanto que na deoxihemocianina a distância Cu-N seria de 1,95 Å, sem evidências de interação entre os dois átomos de cobre numa distância de até 4 Å. Com a oxigenação, estes sofreriam uma aproximação causada pelo ligante, conforme esperado numa ligação por ponte peróxido. Esses autores sugerem uma geometria aproximadamente quadrada planar para o sítio binuclear de cobre. HIMMELWRIGHT et alii, 1980, trabalhando com uma série de derivados de hemocianinas de moluscos e de artrópodos, descreveram o sítio binuclear de cobre na oxihemocianina como contendo um ligante endógeno formando ponte juntamente com a ponte peróxido entre os planos equatoriais dos dois Cu em geometria de pirâmide quadrada, cada qual coordenado a dois imidazóis e uma molécula de água como ligante axial. Esses autores apontaram também a semelhança entre esse sítio de cobre e o da tirosinase de *Neurospora crassa*, e através de reações de deslocamento de ligante em vários derivados das hemocianinas quimicamente modificadas, concluíram que enquan

to a estrutura geral do sítio ativo é bastante semelhante em diferentes hemocianinas, o acesso a esses sítios difere consideravelmente nos dois filos.

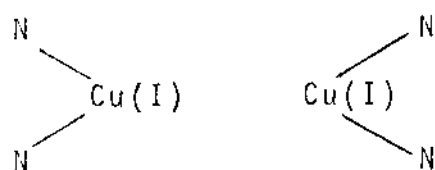
Recentemente, SUZUKI et alii, 1982, propuseram um terceiro modelo, baseando-se nos estudos com apo-hemocianinas reconstituídas com Co(II). Essa substituição de Cu por Co favorece a elucidação estrutural do sítio de ligação do metal, através da absorção visível característica e dos espectros de dicroísmo circular magnético exibidos pelos complexos de Co(II) devido a transições d-d. Esses autores propõe que o sítio ativo da oxihemocianina nativa consista de um par de íons Cu(II) com número de coordenação 5, ligados por pontes por íon peróxido e um ligante putativo. Esses dois íons Cu(II) teriam uma simetria muito baixa (MORI et alii, 1975) com geometria de coordenação não equivalentes. E, embora a existência de um ligante na proteína como um resíduo fenólico de tirosina tenha sido proposto por diversos pesquisadores (SALVATO et alii, 1974; TALLANDINI et alii, 1975 ; AMUNDSEN et alii, 1977 e EICKMAN et alii, 1979), não tem havido evidências diretas para a presença do resíduo fenolato e parece ser mais provável que óxido ( $O^{2-}$ ) ou hidróxido ( $OH^-$ ) sejam os ligantes endógenos que formam a segunda ponte no sítio binuclear de cobre na oxihemocianina (KINO et alii, 1981).

Na deoxihemocianina o sítio binuclear parece apresentar diferenças significativas, tanto estereoquímicas quanto de coordenação, sendo que alguns autores sugerem inclusive a quebra da ponte endógena nas condições de ausência do ligante  $O_2$  (BROWN et alii, 1980 e HIMMELWRIGHT et alii, 1980).

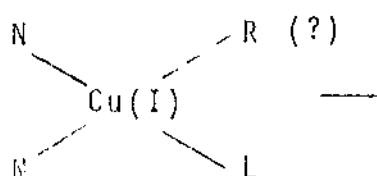
Modelos propostos para o sítio de ligação de oxigênio na hemocianina e alguns derivados:



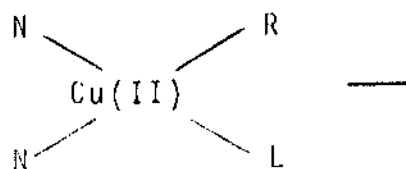
A - oxihemocianina



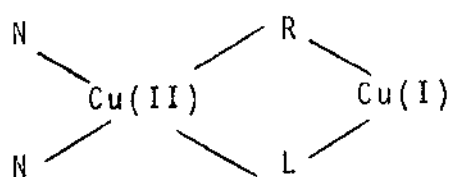
B - deoxihemocianina



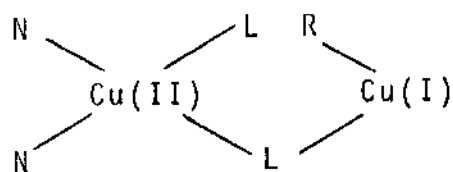
C - semi apoHc



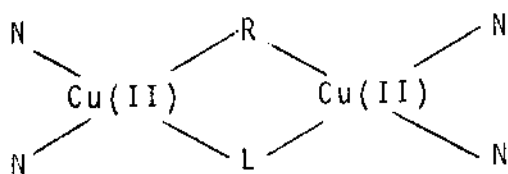
D - meta apoHc



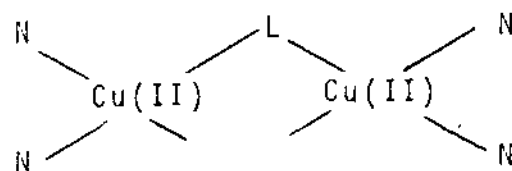
E - semimetaHc tipo I



F - semi metaHc tipo II



G - metaHc (EPR não detectável)



H - metaHc (EPR detectável)

(EICKMAN et alii, 1979 e HIMMELWRIGHT et alii, 1980).

N - nitrogênio imidazólico de resíduos de histidina

R - ligante endógeno, pertencente a resíduo de amino ácido (?) da proteína.

L - ligante exógeno, que pode ou não formar ponte.

Em relação ao aspecto da composição química das hemocianinas, tem-se na literatura inúmeros dados sobre a composição de amino ácidos tanto em artrópodos quanto em moluscos, que não apresentaram diferenças marcantes entre si. Assim, essas proteínas se caracterizam por uma proporção relativamente elevada

de amino ácidos com cadeias laterais ácidas como Glu e Asp, que chegam a compor até 26% da proteína, e um conteúdo razoavelmente elevado de amino ácidos não polares ( GHIRETTI-MAGALDI et alii, 1966; GRUBER, 1968 e WITTERS & LONTIE, 1968). O elevado peso molecular e a heterogeneidade das cadeias polipeptídicas, torna difícil o estudo da sequência de amino ácidos das hemocianinas. Estudos desse tipo tem sido feitos após fragmentação da molécula com enzimas proteolíticas e isolamento dos fragmentos obtidos. Certas subunidades de hemocianina de uma mesma espécie e mesmo algumas de espécies diferentes, tem apresentado algumas sequências homólogas, como quatro das oito subunidades da hemocianina de *Androctonus australis* e a subunidade IV de *Limulus polyphemus* (JOLLES et alii, 1979). Essas semelhanças ocorrem na região N-terminal das subunidades e podem sugerir relações filogenéticas, ou um papel estrutural específico que por isso tenha preservado algumas sequências durante a evolução (Van der LAAN et alii, 1981).

Do ponto de vista funcional, embora sejam descritos na literatura inúmeros trabalhos sobre o equilíbrio entre hemocianinas e oxigênio, ainda não há possibilidade de proposição de um modelo comum às hemocianinas dos dois filos, e nem sequer às hemocianinas de uma mesma ordem, com exceção talvez dos crustáceos. De modo geral, nem todos os resultados descritos na literatura foram obtidos em condições fisiológicas, em muitos casos a temperatura ou o pH fisiológicos não eram estritamente observados, porém, mais comumente, o meio em que grande parte das experiências foi realizada, não possuía a mesma força iônica ou era deficiente em íons inorgânicos específicos, o que torna muito difícil sua comparação.

Investigando as propriedades moleculares da hemoglobina humana, outra proteína respiratória de estrutura quater-

nãria bem mais simples que a de hemocianinas, IMAIZUMI et alii, 1979 mostraram que a ligação de cada efetor heterotrôpico estava relacionada não sô com a oxigenação, mas também com a ligação de outros ligantes heterotrôpicos, alguns dos quais competindo pelo mesmo sítio na molécula ( KILMARTIN & ROSSI-BERNARDI, 1973 e ROLLEMA et alii, 1975). Assim, considerando a estrutura quaternãria complexa das hemocianinas quer de moluscos quer de artrôpodos, os íons que participam na manutenção dessa estrutura e as modificações induzidas nas propriedades funcionais quando essa estrutura é alterada(VANOPPEN-Ver EECKE & LONTIE, 1973), podemos extrapolar a importãncia do conhecimento do efeito dos componentes da hemolinfa "in toto" e nas proporções adequadas. De qualquer modo, experiências em uma faixa de condições mais ampla que aquelas fisiolôgicas são essenciais para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na interação da proteĩna com ligantes e efetores alostêricos, e quando realizadas em condições experimentais semelhantes, podem levar ã proposição de modelos para as relações entre estrutura e função dessas proteĩnas respiratôrias.

Alguns livros texto atribuem aos transportadores de oxigênio encontrados no sangue de invertebrados uma alta afinidade por esse ligante. Pelo menos em relação às hemocianinas essa generalização não é vãlida, pois alêm de termos exemplos como o da hemocianina de *Loligo pealei* que apresenta  $P_{50}$  de 159 mm Hg em pH fisiolôgico e a 27°C (REDFIELD & GOODKING, 1929), hã somente um grupo taxonômico, o dos crustãceos decãpodos, em que a quantidade de exemplares estudados pode levar a uma razoãvel caracterização do equilĩbrio entre hemocianina e oxigênio (MANGUM, 1980). Nos outros grupos uma generalização pode levar a resultados distorcidos em virtude do pequeno nũmero de espêcies



estudadas. Tendo essa restrição em mente, porém, parece que as hemocianinas apresentam tendências conservativas dentro de um grupo bem definido. Por outro lado, a estrutura química dos sítios de ligação cobre-oxigênio parece ser bastante semelhante em ambos os filos (FREEDMAN et alii, 1976 e HEPP et alii, 1979), sugerindo que as grandes diferenças descritas para as propriedades funcionais das hemocianinas das diversas espécies estudadas sejam atribuídas a diferenças conformacionais causadas por modificações em outras regiões que não o sítio ativo.

Para as hemocianinas da classe Amphineura, os dados apresentados na literatura mostram uma afinidade bastante baixa e um efeito Bohr muito pequeno, que pode ser normal ou reverso (REDMOND, 1962a ). Nos gastrópodos não há um padrão de efeito Bohr para as diferentes espécies, tendo sido descrito, principalmente para espécies de água doce e marinhas, efeito Bohr normal ou reverso e de magnitude variável como no caso de *Busycon canaliculatum*, onde o efeito Bohr reverso é extenso,  $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$  atinge o valor de 1,4 para uma variação de pH na região de 7,5 a 7,9 (MANGUM, 1980). Para gastrópodos pulmonatas o efeito Bohr é menor (SPOEK et alii, 1964), mas em alguns casos normal como em *H. pomatia* (MANGUM, 1980) e em outros reverso, como em *M. ovatus* (AIROLDI, 1982), objeto da presente tese. Nos cefalópodos as hemocianinas estudadas são bastante semelhantes, apresentando todas uma baixa afinidade pelo oxigênio (JOHANSEN & LENFANT, 1966 e JOHANSEN et alii, 1978). O efeito Bohr é normal e em algumas espécies, como *L. pealei* e *O. vulgaris*, bastante extenso, sendo que sua importância fisiológica, já demonstrada claramente por REDFIELD & GOODKIND em 1929, excede a da hemoglobina humana em termos de liberação adicional de oxigênio.

Entre as hemocianinas de crustáceos, a quantidade de informações leva a um exemplo de como esse transportador de oxigênio se conserva com as mesmas características, numa classe onde a heterogeneidade morfológica e ecológica deveria levar a modificações adaptativas. Porém, apesar das diferenças em temperatura ambiente, de diversos modos de troca gasosa e diferentes características do modo de vida, as propriedades apresentadas são consideravelmente semelhantes: a afinidade pelo oxigênio é moderadamente baixa, o efeito Bohr é normal e intenso, assim como a cooperatividade que é bem elevada, especialmente na faixa fisiológica de pH (REDMOND, 1962b; YOUNG, 1972; TRUCHOT, 1975; McMAHON & WILKENS, 1977 e McMAHON et alii, 1978). Os dados sobre hemocianinas de queliceratos são poucos para caracterizar a classe. A afinidade da hemocianina de *Limulus polyphemus* pelo oxigênio é relativamente alta, a cooperatividade é moderada e o efeito Bohr reverso persiste na faixa fisiológica de pH (SULLIVAN et alii, 1974 e JOHANSEN & PETERSEN, 1975). Nos aracnídeos as medidas de pH sanguíneo são ainda incertas, mas em pH 8,1 a afinidade do sangue não diluído é altamente variável (ANGERSBACH, 1978) e na faixa de pH de 7,0 a 7,5, o efeito Bohr é normal sendo  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,26$  (ANGERSBACH, 1975 a,b). Em alguns casos recentemente descritos a cooperatividade é extremamente elevada, como na hemocianina de *Eurypelma californicum*, onde o coeficiente de Hill  $n_{50} = 7$  (ANGERSBACH, 1978 e BRUNORI et alii, 1982a).

O fenômeno da cooperatividade na ligação com oxigênio parece ser um denominador comum a todas as hemocianinas até hoje descritas, embora a extensão do fenômeno seja bastante variável. Encontram-se espécies como *Fasciolaria* e *Fusitron* que apresentam uma cooperatividade extremamente baixa, com valores

de  $n_{50} = 1,0-1,2$  (REDMOND, 1964 e MANGUM, 1976) o que constitui certamente uma exceção, visto que os dados para todas as outras espécies são mais elevados. No outro extremo, encontram-se espécies como *Cupiennius salci*, *Androctonus australis* e *Eurypelma californicum*, que apresentam valores de 7 a 9 para o coeficiente de Hill (Van der LAAN et alii, 1981 e ZOLLA et alii, 1978). No caso de elevada cooperatividade, a transição de estado conformacional causada pela ligação do ligante ocorre numa faixa muito estreita de concentração do ligante, obtendo-se gráficos de Hill para as curvas de ligação de oxigênio caracterizados por uma brusca transição de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade da proteína pelo oxigênio. Este fenômeno é bastante peculiar aos sistemas alostéricos que possuem um grande número de sítios de ligação, conforme indicado por estudos teóricos (CHANGEUX et alii, 1967; WYMAN, 1969 e COLOSIMO et alii, 1974). Os efeitos heterotrópicos na ligação de  $O_2$  às hemocianinas são de interpretação complexa, devido aos múltiplos sítios de ligação tanto para os efetores quanto para o ligante. Foram descritos para diversas hemocianinas os efeitos causados por prótons, cátions como  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , e ânions como  $Cl^-$  (SHAKLAI et alii, 1975; ZOLLA et alii, 1978; BROUWER et alii, 1978a; KUIPER et alii, 1979; ARISAKA & Van HOLDE, 1979; NORNE et alii, 1979 e KUIPER et alii, 1980a). Em geral, o número de sítios de ligação de  $O_2$  é menor que o número total de sítios de ligação de íons, e no caso de prótons, parece haver sítios independentes de efeito Bohr (BRUNORI et alii, 1982b).

Outro ligante relativamente bem estudado é o monóxido de carbono, CO, que também se liga reversivelmente à deoxi-hemocianina, embora a apenas um dos átomos de cobre, conforme in

dicado em estudos de espectro infravermelho (ALBEN et alii, 1970; FAGER & ALBEN, 1972; Van der DEEN & HOVING, 1979). Essa diferença no modo de ligação tem sido usada para explicar a ausência de cooperatividade observada nas curvas de associação das hemocianinas com CO, onde  $n \leq 1$ , e as interações heterotrópicas inexistentes ou bastante reduzidas se comparadas com as observadas no caso em que o ligante é o  $O_2$  (BONAVENTURA et alii, 1974; KUIPER et alii, 1976 e BRUNORI et alii, 1981).

A formação do complexo CO-hemocianina está associada a uma absorção no infravermelho em 2000 a 2100  $cm^{-1}$  (FAGER & ALBEN, 1972; Van der DEEN & HOVING, 1979), a uma banda de absorção fraca em aproximadamente 320 nm (BONAVENTURA et alii, 1974 e KUIPER et alii, 1976) e a uma emissão distinta na região visível quando o complexo é excitado na região do ultravioleta próximo em 310 a 330 nm (KUIPER et alii, 1980b). Assim, quando ligadas ao CO, todas as hemocianinas exibem um máximo de emissão entre 550 e 560 nm, ao serem excitadas em 280 ou 310 nm. Essa luminescência está associada a um decréscimo de 30 a 40% na fluorescência intrínseca da proteína, e enquanto esta é afetada pelo pH, o rendimento quântico da emissão visível é independente da concentração hidrogeniônica (BRUNORI et alii, 1982b).

As afinidades de diferentes hemocianinas pelo CO são bastante semelhantes, sendo baixas nas de artrópodos se comparadas com as afinidades destas por  $O_2$  e elevadas nas de moluscos, onde o inverso ocorre. Isso reforça a conclusão de que o modo de ligação dos dois ligantes, CO e  $O_2$ , para hemocianinas de uma mesma espécie difere bastante, indicando que a estrutura do sítio ativo é capaz de discriminar CO de modo específico.

É interessante ressaltar que, por analogia com o

que ocorre em hemoglobinas onde a ligação de CO é fortemente afetada pela natureza dos resíduos de amino ácidos no lado distal (BRUNORI et alii, 1981) as hemocianinas de moluscos e de artrópodos apresentam efeitos distais possivelmente bastante distintos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtenção do material biológico

Gastrópodos terrestres *Megalobulimus ovatus* (LEME, 1973) eram capturados em plantações de bananeira da região de Praia Grande, S.P. No laboratório eram mantidos em caixas de madeira forradas com uma camada de terra úmida e alimentados com folhas de alface. Animais adultos (Fig.1), pesando de 100 a 170 g eram utilizados na obtenção da hemolinfa, após permanecerem 2 dias em jejum, o que evitava a contaminação da hemolinfa por líquidos do trato digestivo (HEIRWEGH et alii, 1961). Os animais eram cuidadosamente lavados, secos e pesados e a hemolinfa era retirada através de punção cardíaca, ou por um corte feito na região posterior do pé, junto à concha. Cada animal fornecia em média 12 a 15 ml de hemolinfa, as amostras que apresentavam-se avermelhadas eram descartadas e as demais, azuis, eram reunidas e utilizadas na purificação da hemocianina. Devido à sua estabilidade térmica, a obtenção da hemolinfa era feita em temperatura ambiente.

### Determinação do pH da hemolinfa

Imediatamente após a obtenção de volume suficiente de hemolinfa, a medida do pH era feita em pHmetro TOA modelo HM 7A, ou pHmetro digital Ambriex, equipados com um eletrodo de vidro conjugado. Um total de quinze amostras foram analisadas individualmente.



Figura 1 - Animais adultos *Megalobulimulus ovatus*  
(redução 4:1).

### Purificação da hemocianina

A purificação da hemocianina de *M.ovatus* era feita basicamente segundo o método descrito por HEIRWEGH et alii, 1961, com algumas modificações. Trabalhava-se sempre em temperatura ambiente e as centrifugações eram feitas entre 5 a 10°C.

A hemolinfa era inicialmente centrifugada a 5.800 x g por 20 minutos, em centrífuga refrigerada Sorwall RC 2-B, para a remoção de qualquer material coagulado. O sobrenadante era então diluído com a adição de igual volume de tampão acetato de potássio 0,4 M, pH 5,3. A solução resultante era levada a 50% de saturação com sulfato de amônio, pela adição de solução saturada desse sal nesse mesmo tampão, e novamente centrifugada a 5.800 x g por 15 minutos. O sobrenadante era desprezado e o precipitado azul era dissolvido em tampão acetato de potássio 0,1M, pH 5,7 e dialisado contra várias trocas do mesmo tampão, durante 24 horas em câmara fria, para a remoção do sulfato de amônio. O dialisado era então centrifugado a 78.400 x g por 6 horas, em uma ultracentrífuga Beckman L5-65. O sedimento era redissolvido no mesmo tampão acetato e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sedimento era então dissolvido em tampão tris-HCl 0,05M, pH 7,8, contendo  $Ca^{2+}$  20 mM, correspondendo à hemocianina total purificada, uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  hemocianinas, utilizada diretamente em algumas experiências, ou para a separação dos dois componentes.



### Separação de $\alpha$ e $\beta$ hemocianinas

Várias tentativas foram feitas no sentido de se conseguir a separação dos dois tipos de hemocianinas, usando o procedimento descrito por HEIRWEGH et alii, 1961, para  $\alpha$  e  $\beta$  hemocianinas de *Helix pomatia*, porém, havia sempre contaminação dos componentes um pelo outro, a julgar pela análise em ultracentrifuga analítica.

Preparou-se  $\beta$  hemocianina pura a partir de hemocianina total dissolvida em tampão acetato de potássio 0,1 M, pH 5,7, contendo NaCl 1 M. Amostras de 1 ml dessa solução eram cuidadosamente colocadas sobre 12 ml de uma solução de sacarose 1 M no mesmo tampão acima e centrifugadas a 47.000 x g por 45 minutos. A camada superior de cerca de 0,5 cm, a camada intermediária e o sedimento eram sifonados cuidadosamente e analisados em ultracentrifuga analítica, após 12 horas de diálise em câmara fria contra tampão acetato 0,1 M pH 5,7 contendo NaCl 1 M.

### Análise por ultracentrifugação

Hemocianina total e as frações contendo  $\alpha$  ou  $\beta$  hemocianina eram dialisadas em câmara fria por 12 horas contra tampão acetato 0,1 M, pH 5,7, contendo NaCl 1 M. Nessas condições sabe-se que  $\alpha$  hemocianina dissocia-se em moléculas com metade do peso molecular original, enquanto que  $\beta$  hemocianina permanece associada (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). Amostras de hemocianina de concentração 2 a 3 mg/ml eram submetidas a 52.640 r.p.m em ultracentrifuga analítica Spinco modelo E. As fotografias eram tiradas nos tempos 5, 11, 17, 27 e 36 minutos após o rotor atin-

gi: a rotação desejada. A relação de áreas sob os picos observados era tomada como indicativa da proporção entre  $\alpha$  e  $\beta$  hemocianinas em cada amostra. Igual procedimento era utilizado para o estudo da dissociação da  $\beta$  hemocianina em soluções onde se variava o pH utilizando-se tampão Bis-tris, Tris-HCl ou etanolamina 0,05 M na ausência e na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM. Todas as corridas eram efetuadas com o rotor a uma temperatura de 20°C.

#### Obtenção de hemocianina desionizada

Amostras contendo hemocianina total ou  $\beta$  hemocianina eram passadas através de coluna com Sephadex G-25 (1,5x30 cm) e eluídas com água bidestilada. Em seguida eram submetidas à passagem em uma coluna contendo resina de troca iônica mista, Amberlite MB-50 (1,0 x 12 cm).

#### Determinação do coeficiente de extinção

Para a remoção de quaisquer íons ou moléculas de baixo peso molecular, hemocianina total e  $\beta$  hemocianina eram dialisadas exaustivamente contra água bidestilada em câmara fria e em seguida desionizadas. Volumes de 0,5 a 2,0 ml eram cuidadosamente colocados em vidro de relógio e levados à estufa a 110°C até peso constante. Amostras das mesmas soluções eram convenientemente diluídas em tampão borato 0,1 M pH 9,2 e a absorvância em 278 nm era determinada. Nessas condições a hemocianina encontra-se totalmente dissociada, evitando-se erros devido ao fenômeno de "light scattering" causado pelas moléculas associadas devido ao tamanho das partículas (HEIRWEGH et alii, 1961). Como o

coeficiente de extinção  $\epsilon$  pode ser desdobrado em dois componentes, o coeficiente de absorvidade  $\alpha$  e a contribuição devida ao espalhamento de luz  $\epsilon_s$ , de tal forma que

$$\epsilon = \alpha + \epsilon_s$$

em condições em que  $\epsilon_s$  é muito menor que  $\epsilon_\alpha$ , tem-se que

$$\epsilon = \epsilon_\alpha$$

e pode-se usar a lei de Beer para o cálculo do coeficiente de extinção num dado comprimento de onda:

$$\epsilon_{278} = \frac{A_{278}}{l \times c}$$

onde  $A_{278}$  é a absorvância da solução em 278 nm;  $l$  é o caminho ótico (1 cm);  $c$  é a concentração da hemocianina em mg/ml, determinada através do peso seco.

#### Determinação da concentração de proteína

Na hemolinfa a determinação de proteína era feita através do método de LOWRY et alii, 1951, e nas amostras de hemocianinas purificadas, a concentração era determinada sempre diluindo-se convenientemente uma alíquota da amostra em tampão borato 0,1 M pH 9,2 e utilizando-se o coeficiente de extinção obtido conforme descrito acima para o cálculo da concentração da hemocianina.

#### Preparação de apo-hemocianina

Amostras de  $\beta$  hemocianina de concentração entre 25 a 30 mg/ml eram dialisadas a temperatura ambiente contra tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2 contendo EDTA 10 mM e KCN 0,1 M, du-

rante 48 horas, com pelo menos 3 trocas diárias do tampão. Em seguida continuava-se a diálise em câmara fria por mais 24 horas contra o mesmo tampão no qual KCN fora substituído por metahemoglobina, que devido à sua alta afinidade por cianeto assegurava a completa remoção desse ânion. Finalmente, a apo-hemocianina era dialisada por mais 12 horas em câmara fria contra água bidestilada.

#### Efeito da concentração hidrogeniônica e de cátions divalentes na dissociação da hemocianina

Amostras de hemocianina total e  $\beta$  hemocianina eram submetidas a variação de pH na região entre 6,0 e 10,0, na presença ou na ausência de cátions  $\text{Ca}^{2+}$  em concentração final 20 mM. O efeito de dissociação era estudado através de análise em ultracentrífuga ou pelos padrões revelados por microscopia eletrônica.

#### Determinação do conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos na  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* era determinado pelo método do reagente fenol-sulfúrico (DUBOIS et alii, 1956) geralmente empregado para glicoproteínas por não sofrer interferência de hexosaminas, aminoácidos ou proteínas. Amostras de hemocianina em diferentes concentrações eram utilizadas e as absorvâncias a 490 nm comparadas com as apresentadas por uma curva padrão obtida a partir de uma solução contendo uma mistura de glicose, galactose e sacarose de concentração conhecida. Os açúcares aminados eram determinados diretamente

através da reação com p-dimetilaminobenzaldeído, segundo ELSON & MORGAN, 1955. Tentativas de determinação do conteúdo total de carboidratos pela reação com o reagente fenol-sulfúrico após a desaminação dos açúcares aminados (LEE & MONTGOMERY, 1961) foram abandonadas devido à interferência de lisina, que na hemocianina de *H. pomatia* se encontra em concentração de 420  $\mu$ moles/g de proteína (GRUBER, 1968).

### Eletroforese em gel de poliacrilamida

Amostras de hemocianina total e  $\beta$ hemocianina eram submetidas a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS), segundo o procedimento descrito por WEBER et alii, 1973, ligeiramente modificado. Amostras de aproximadamente 5  $\mu$ l contendo de 5 a 25  $\mu$ g de hemocianina eram incubadas em 50  $\mu$ l de tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 contendo SDS 1% e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. Após serem aquecidas a 100°C por 2 minutos as amostras eram aplicadas aos géis de concentração de acrilamida 5%, e uma relação acrilamida: N,N'-metilenobisacrilamida de 37:1 (em peso). O tampão usado era o mesmo da incubação suprimindo-se o  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol era usado como marcador e aplicava-se uma corrente de 10 mA por gel. Após a corrida os géis eram normalmente corados com Coomassie brilliant blue 0,25% em uma mistura de ácido acético glacial, metanol e água (1:5:5) por 2 horas e descorados vários dias com uma solução de ácido acético 7,5% e metanol 5% em água.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% era realizada também com ambas as amostras, de acordo com SULLIVAN et alii, 1976.

### Determinação de grupos tióis livres

A determinação quantitativa de grupos tióis livres na  $\beta$  hemocianina e apo-hemocianina foi realizada de acordo com o método descrito por BOYER, 1954, titulando-se espectrofotometricamente uma solução de hemocianina desionizada, de concentração 0,7 mg/ml, com p-hidroximercuribenzoato (PMB). A mesma titulação foi repetida após a adição de 5  $\mu$ l de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% à solução de hemocianina para a determinação de grupos sulfidrila não expostos. A formação do complexo proteína-PMB através dos grupos tióis reativos foi determinada pelo aumento da absorvância em 255 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção milimolar  $6,2 \times 10^3$  para o complexo (BOYER, 1954).

### Análise por microscopia eletrônica

Amostras de hemocianina total, apo-hemocianina e dos componentes purificados, tanto nas formas associada quanto dissociada e ainda na presença de NaCl 1 M, eram analisadas em um microscópio eletrônico Siemens Elmiskop - I. Utilizou-se a técnica descrita por FERNÁNDEZ-MORÁN et alii, 1966, onde uma gota da solução de hemocianina diluída no tampão adequado até uma concentração aproximada de 60  $\mu$ g/ml, era colocada sobre uma tela de cobre revestida com carbono. O excesso era removido cuidadosamente mergulhando-se a tela rapidamente no tampão e as amostras eram então coradas com acetato de uranila 1 a 2% por cerca de 5 minutos a uma temperatura de 4°C. As amostras assim preparadas eram examinadas ao microscópio eletrônico e então fotografadas.

### Preparo de antissoros

Foram utilizados como antígenos  $\beta$  hemocianina nas formas dissociada e associada e apo-hemocianina. Em cada caso 0,2 ml da solução contendo 10 mg/ml de proteína eram emulsificados em 0,5 ml de adjuvante completo de Freund (FREUND, 1956) e injetados em coelhos Nova Zelândia, pesando aproximadamente 2,5 a 3,0 Kg cada um. As injeções eram feitas segundo a técnica descrita por OLIVEIRA, 1975, via linfonódulo, e repetidas num intervalo de 15 dias.

Os antissoros eram obtidos por sangria da veia marginal da orelha do animal, durante um período de 30 dias. Após a sangria, deixava-se o sangue coagular em câmara fria por 24 horas quando era então centrifugado, recolhendo-se o soro que era mantido até o uso a  $-20^{\circ}\text{C}$ , após adição de azida sódica 0,05%.

### Testes serológicos

Os testes de imunodifusão dupla para análise comparativa eram realizados de acordo com OUCHTERLONY, 1958. Lâminas de vidro de 7,5 x 2,5 cm eram recobertas por 3 ml de solução de agar 1% em solução salina tamponada com tampão fosfato 0,15 M pH 7,2 (PBS), o que dava uma espessura de cerca de 3 mm de gel. Os orifícios eram então feitos de acordo com diferentes padrões em aparelho apropriado (LEITE & OLIVEIRA, 1975) e neles eram colocados os antissoros e antígenos a serem analisados. As lâminas eram então mantidas em câmara úmida por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida o gel era lavado com solução fisiológica de NaCl, secado à temperatura ambiente e então corado com solução

de negro de amido 2% e lavado várias vezes com uma mistura de 90 ml de metanol e 10 ml de ácido acético glacial, para remoção do excesso de corante.

#### Titulação com cianeto

$\beta$  hemocianina na forma oxigenada em concentração aproximada de 1 mg/ml em tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,2 era tratada com volumes crescentes de uma solução de KCN 10 mM, registrando-se o espectro de 300 a 400 nm após cada adição. Os valores de absorbância eram corrigidos para o efeito de diluição e calculava-se a percentagem do pico remanescente em função da relação  $CN^-:Cu$  correspondente.

#### Remoção de cobre por cianeto

$\beta$  hemocianina em concentração aproximada de 10 mg/ml era incubada com KCN em banho a 25°C, em solução tamponada por tris-HCl 0,1 M pH 8,2. A concentração de cianeto era calculada com base no conteúdo de cobre, de forma a se obter no final uma proporção de 50:1 na relação  $CN^-:Cu$ . A proteína era mantida em frascos vedados na forma oxigenada ou desoxigenada sob atmosfera de oxigênio ou nitrogênio respectivamente, adicionando-se através de seringa calibrada a solução de KCN também sob oxigênio ou nitrogênio.

Em determinados intervalos de tempo, até 3 horas de incubação, retiravam-se amostras de 0,5 ml que eram imediatamente passadas através de colunas de Sephadex G-25 (1 x 10 cm), previamente equilibradas com o tampão de incubação, a fim de pa-



rar a reação e remover o excesso de  $CN^-$  e Cu desligado da proteína. Recolhia-se um volume de 5 ml por amostra e obtinha-se o espectro de 300 a 450 nm. As amostras eram então dialisadas por 18 a 24 horas em câmara fria contra o mesmo tampão e obtinha-se novo espectro após a diálise. A concentração de proteína em cada amostra era determinada pela leitura da absorbância em 278 nm conforme descrito anteriormente.

O conteúdo de cobre era determinado por absorção atômica em espectrofotômetro de chama Perkin Elmer 603. A percentagem de cobre remanescente era calculada e corrigida em relação à concentração de hemocianina de cada amostra.

#### Estudo do equilíbrio da $\beta$ hemocianina com oxigênio

As curvas de saturação da  $\beta$  hemocianina com o ligante oxigênio eram obtidas espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958, utilizando-se um tonômetro de grande capacidade gasosa, que consistia num tubo de Thunberg modificado, soldado a uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A concentração de proteína nas amostras era cerca de 1 mg/ml e inicialmente era obtido o espectro da oxihemocianina na região de 300 a 400 nm, em um espectrofotômetro digital Varian 634, acoplado a um registrador X - Y Hewlett-Packard 7044 A. Em seguida o oxigênio era removido por arraste com nitrogênio purificado, borbulhando através de uma solução alcalina de ditionito de sódio para assegurar a total ausência de oxigênio. O espectro da deoxihemocianina era então obtido, verificando-se o desaparecimento do pico característico em 344 nm. As adições de ar eram efetuadas através de seringa cali-

brada, incubava-se o tonômetro por 10 minutos em banho a temperatura desejada e novo espectro era obtido e assim sucessivamente, até a saturação completa da amostra, quando se alcançava em 344 nm a mesma leitura de absorbância inicial obtida para a oxihemocianina.

As curvas de saturação com oxigênio eram representadas graficamente de acordo com a equação de Hill:

$$K(P)^n = \frac{Y}{1-Y}$$

onde

K é a constante de equilíbrio

P é a pressão parcial de oxigênio

Y é a saturação parcial da hemocianina pelo ligante

n é a constante de interação empírica de Hill

(WYMAN, 1948 e 1964).

O gráfico  $\log (Y/1-Y)$  em função de  $\log PO_2$  apresentava-se em geral como uma sigmóide (Fig.2), onde as porções iniciais e finais da curva forneciam as afinidades respectivamente das formas T (tensa, de baixa afinidade) e R (relaxada, de alta afinidade) da molécula e a tangente da reta intermediária correspondia ao coeficiente de Hill,  $n_{50}$ , que indica a cooperatividade da hemocianina nas condições de cada equilíbrio. O valor de  $P_{50}$ , isto é, da pressão parcial de oxigênio necessária para se atingir 50% de saturação da hemocianina era determinado pela intersecção da melhor reta obtida por regressão linear com o eixo das abscissas, conforme indicado na figura 2 e representa a afinidade da hemocianina pelo ligante.

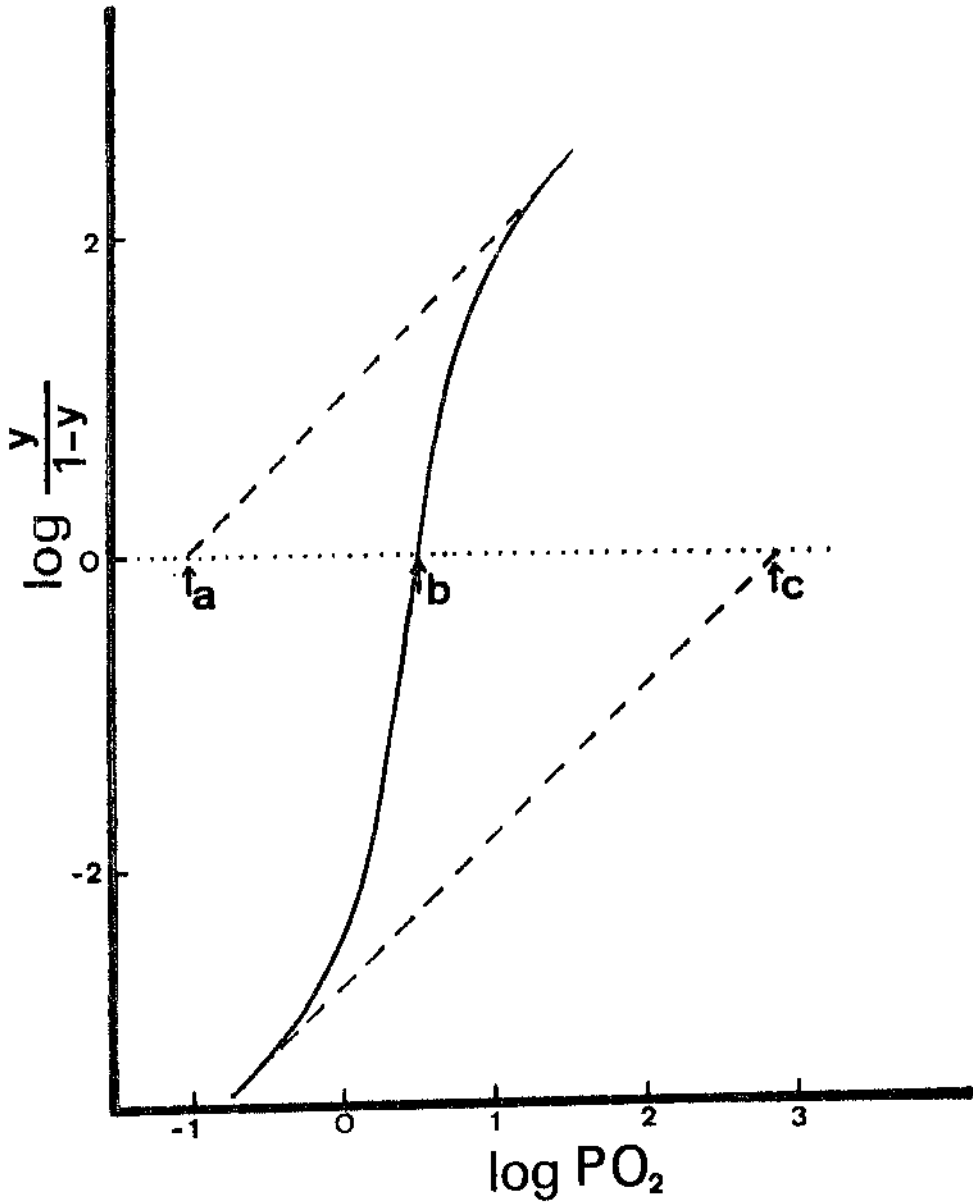


Figura 2 - Gráfico de Hill teórico para a ligação de oxigênio a uma hemocianina em condições de  $n_{50} = 6$ , utilizando o modelo M.W.C. (WYMAN, 1964)

- a -  $\log P_{50}$  para forma R
- b -  $\log P_{50}$  para a amostra
- c -  $\log P_{50}$  para a forma T

Efeito da concentração hidrogeniônica no equilíbrio da  $\beta$  hemocianina com oxigênio

As curvas de saturação com oxigênio eram obtidas conforme descrito anteriormente em amostras de  $\beta$  hemocianina em tampão bis-tris HCl ou Tris-HCl 0,01 M no intervalo de pH 6,0 a 10,0, partindo-se a amostra dissociada por adição de EDTA em uma concentração final de 1 mM ou na forma associada em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM. Através do gráfico de  $\log P_{50}$  em função do pH, obtinha-se o efeito Bohr apresentado pela  $\beta$  hemocianina em cada uma de suas formas, representado pela relação  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ . Essas experiências de equilíbrio eram realizadas a uma mesma temperatura,  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  e o pH das soluções era medido antes e após cada experiência.

Efeito da concentração de cálcio no equilíbrio da  $\beta$  hemocianina com oxigênio

Obtinham-se as curvas de saturação com oxigênio conforme descrito acima, na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  10 ou 20 mM e através dos gráficos de Hill verificava-se a influência da concentração desses íons sobre a afinidade da hemocianina pelo oxigênio e a cooperatividade por ela apresentada.

## RESULTADOS

Caracterização do material biológico

A hemolinfa obtida de cada animal era analisada com respeito ao pH, concentração proteica e volume total obtido, estando os resultados expressos na tabela I.

TABELA I

peso do animal (g)	volume de hemolinfa (ml)	pH da hemolinfa	concentração de proteína (mg/ml)	concentração da hemolinfa (mg/ml) *
146	14	8,13	34,3	32,3
109	12	8,16	32,3	29,7
150	15	8,21	40,4	37,2
92,5	8,5	8,12	39,1	37,5
145	16	8,15	48,2	43,7
168,8	16	8,13	42,8	39,8
159,5	11	8,13	36,6	33,4
138,8	10	8,17	45,8	43,6
138,3	12	8,15	28,3	26,1
170	15,5	8,12	32,8	30,5
105	10,5	8,17	33,1	29,7
123	13	8,13	50,2	47,2
113,8	12,5	8,19	45,4	43,8
132,5	14,5	8,12	51,7	48,1
128,4	13	8,15	48,3	45,9

\* para a obtenção desses valores utilizou-se o coeficiente de extinção  $\epsilon_{278}$  (1%, 1 cm) = 13,81, obtido conforme descrito anterior

O espectro visível e ultravioleta na região de 260 a 380 nm foi obtido para as formas oxi e deoxi da hemocianina de *M.ovatus*, verificando-se um máximo em 278 nm correspondente ao pico característico de proteínas no U.V. e dois outros picos de menor intensidade, um a 344 nm que desaparece na ausência do ligante (figura 3) e outro em 570 nm, que não aparece no espectro devido à sua intensidade muito baixa.

#### Análise das preparações de $\alpha$ e $\beta$ hemocianinas

$\alpha$  e  $\beta$  hemocianinas foram separadas através de ultracentrifugação em gradiente de sacarose e analisadas em ultracentrifuga analítica quanto à sua pureza, obtendo-se os resultados mostrados nas figuras 4 e 5. Pode-se verificar que embora  $\beta$  hemocianina tenha aparecido como um único pico, o mesmo não ocorre com  $\alpha$  hemocianina, onde nota-se um segundo pico indicando contaminação pelo outro componente. Os valores dos coeficientes de sedimentação, obtidos para os dois componentes em tampão acetato 0,1 M pH 5,7 contendo NaCl 1 M são 65,5 S para  $\alpha$  hemocianina e 109 S para  $\beta$  hemocianina. Comparando esses valores com os obtidos por WOOD et alii, 1971 para as hemocianinas de *H.pomatia*, podemos considerar um peso molecular aproximado de  $9 \times 10^6$  daltons para  $\beta$  hemocianina e de  $4,5 \times 10^6$  daltons para  $\alpha$  hemocianina dissociada na presença de NaCl 1 M.

Da análise por ultracentrifugação da hemocianina total nas condições em que o componente  $\alpha$  encontra-se dissociado (figura 6) obtiveram-se as proporções de 28,5% de  $\beta$  hemocianina e 71,5% de  $\alpha$  hemocianina.

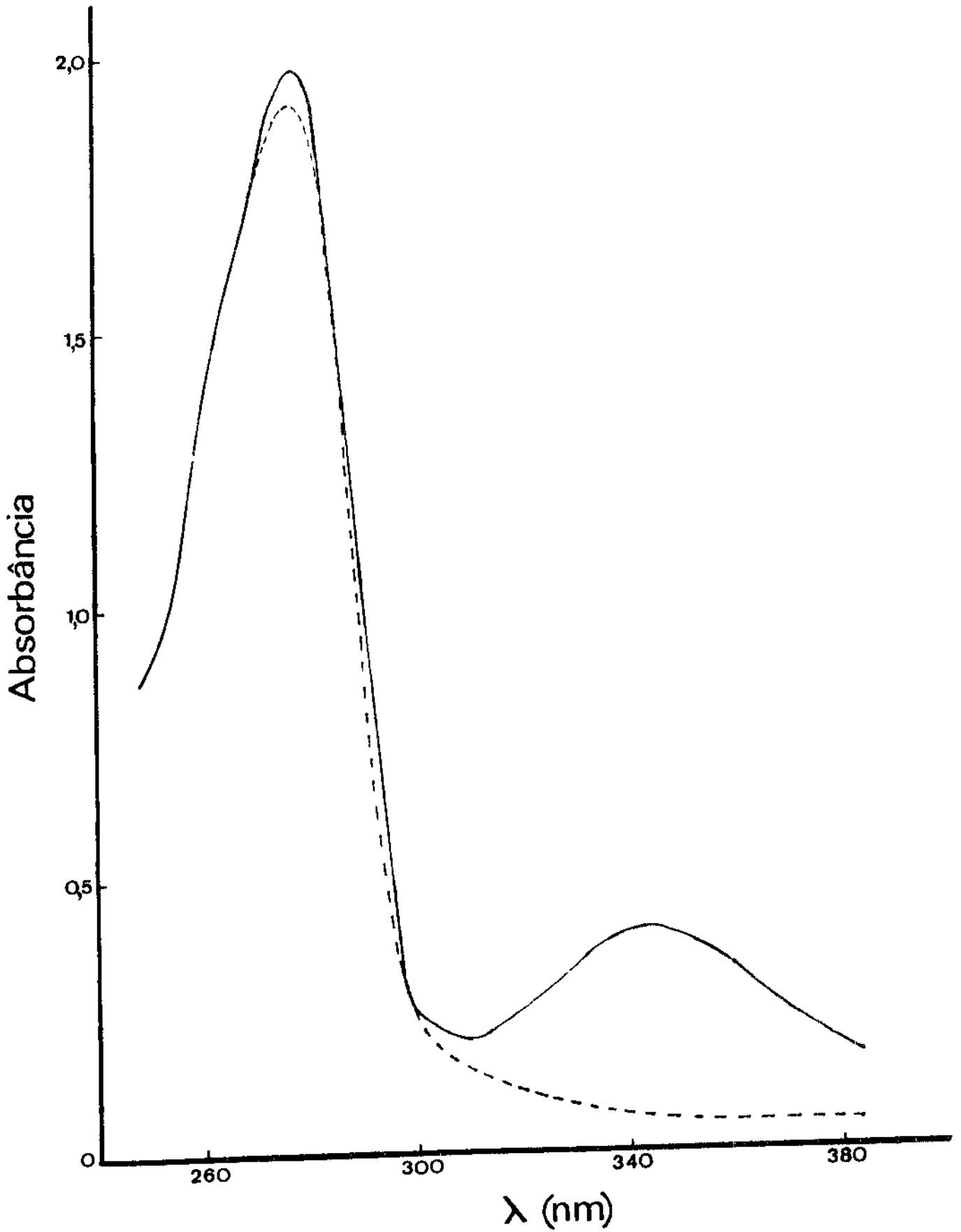


Figura 3 - Espectro de absorção das formas oxi (—) e desoxi (-----) da hemocianina de *M. ovatus*.

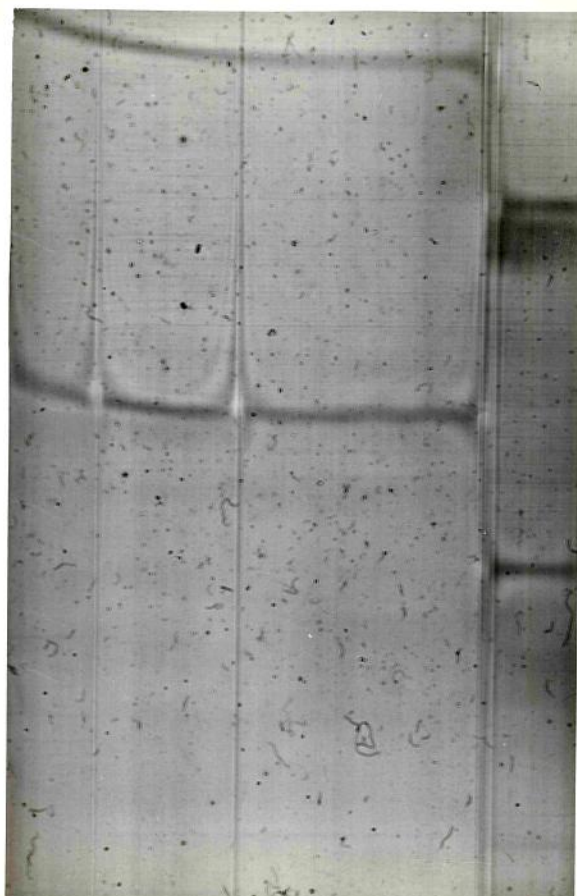


Figura 4 - Análise por ultracentrifugação de uma solução de  $\alpha$  hemocianina de *M.ovatus*(3 mg/ml) em tampão acetato 0,1 M, pH 5,7, contendo NaCl 1 M.



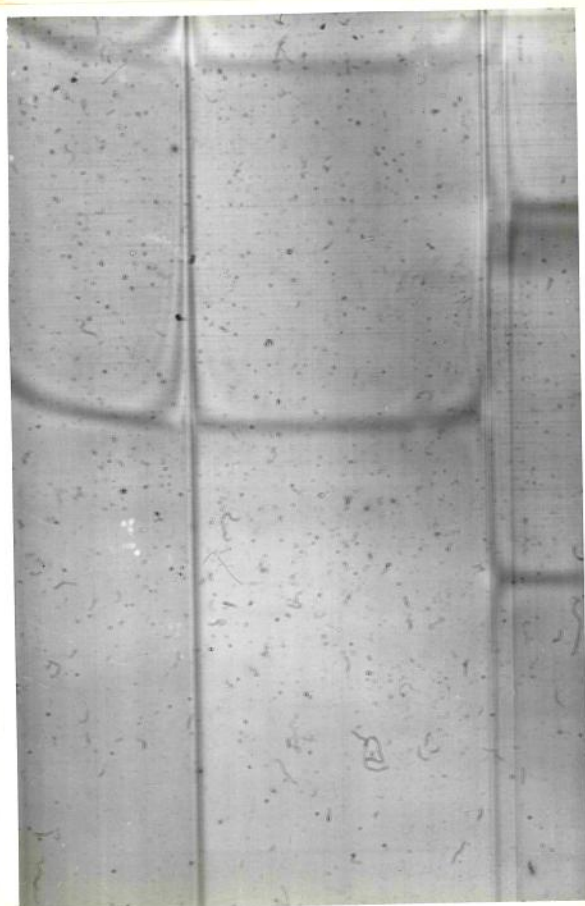


Figura 5 - Análise por ultracentrifugação de uma solução de  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus* (3,5 mg/ml) em tampão acetato 0,1 M pH 5,7, contendo NaCl 1 M.

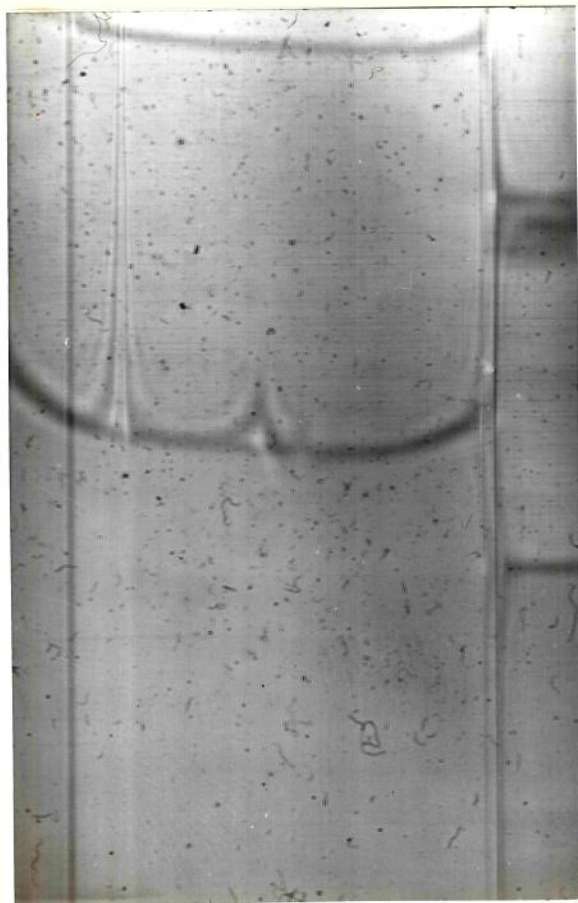


Figura 6 - Análise por ultracentrifugação de uma solução de hemocianina total de *M.ovatus* (2,5 mg/ml) em tampão acetato 0,1 M, pH 5,7, contendo NaCl 1 M.

Efeito do pH e de Íons  $\text{Ca}^{2+}$  na dissociação da  $\beta$  hemocianina

Dependendo do pH da solução e da presença de Íons divalentes, no caso  $\text{Ca}^{2+}$ , verificou-se que  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* apresenta-se em diferentes estados de agregação, conforme indica o diagrama de sedimentação da figura 7. Nota-se que na ausência de Íons  $\text{Ca}^{2+}$ , há predominância da espécie 109 S na região de pH 6 a 8, quando então começa a haver dissociação, obtendo-se dois tipos de moléculas, inicialmente predominando a espécie 22 S, que teria um peso molecular aproximado de  $1 \times 10^5$  daltons, valor obtido por comparação com o descrito por LONTIE & WITTERS, 1966, para hemocianina de *H. pomatia*. À medida que o pH aproxima-se de 10, passa-se a ter quase que somente espécies 13 S. Assim, observando-se a figura 8, pode-se concluir que na região de pH 6 a 7,0 tem-se 100% de moléculas na forma associada e em pH acima de 9,5 obtém-se elevada porcentagem de dissociação em moléculas que correspondem a aproximadamente 1/20 do peso molecular inicial. A reassociação mostrou ser reversível apenas para as espécies 22 S e 65,5 S, por diminuição do pH e adição de Íons  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio.

Na figura 9 observa-se o efeito de Íons  $\text{Ca}^{2+}$  em concentração de 20 mM sobre a dissociação da proteína. Pode-se notar que a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM previne efetivamente a formação de espécies dissociadas, pois mesmo em pH 9,0 ainda predomina claramente a forma associada da hemocianina, além da dissociação não ir além de espécies 65,5 S, pelo menos até pH 10.

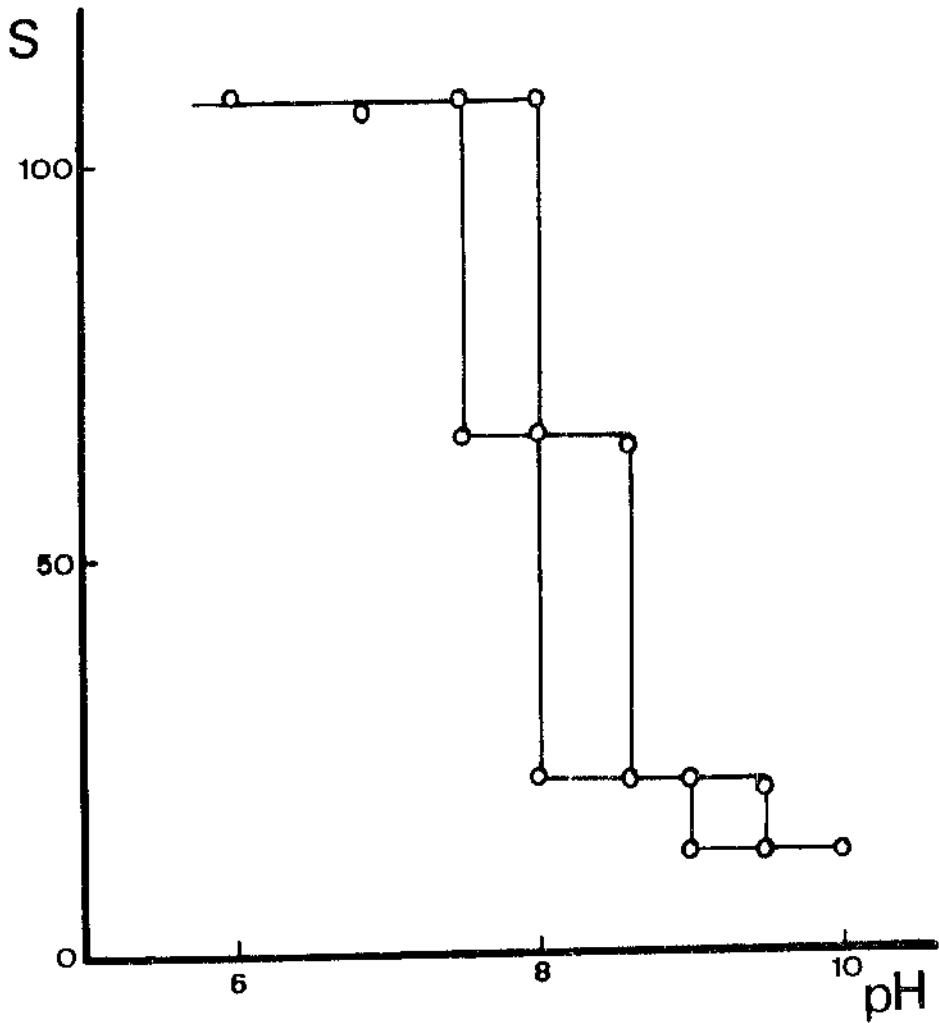


Figura 7 - Diagrama das espécies obtidas por ultracentrifugação da  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus* em diferentes concentrações hidrogeniônicas e na ausência de  $Ca^{2+}$ , calculando-se aproximadamente os valores de S em cada caso.

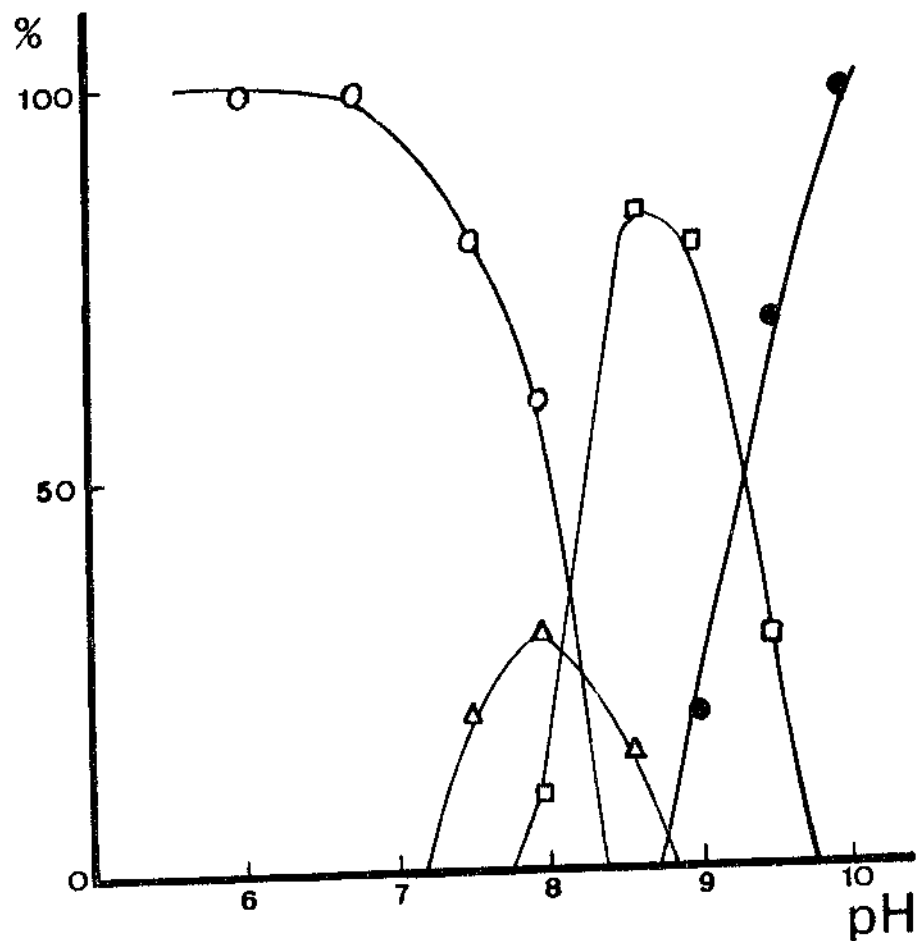


Figura 8 - Percentagem das espécies presentes na  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* em diferentes concentrações hidrogeniônicas e na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ : 109 S (O), 65,5 S ( $\Delta$ ) 22 S ( $\square$ ) e 13 S ( $\bullet$ ).

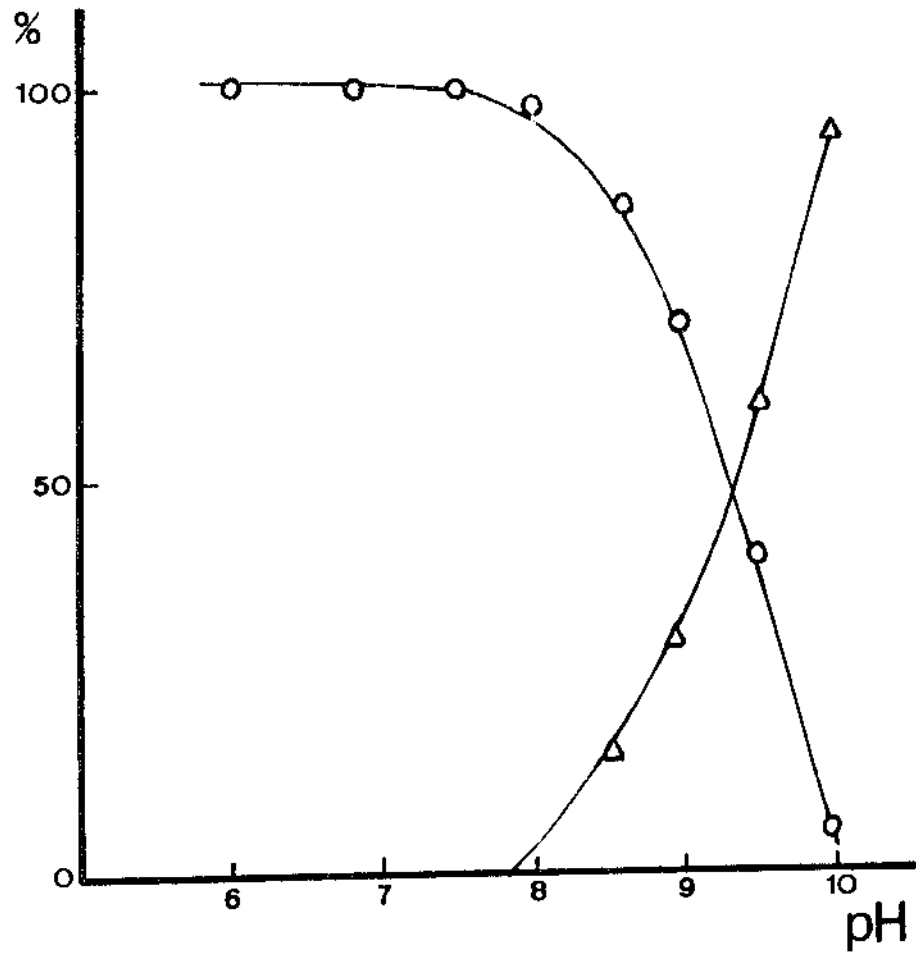


Figura 9 - Percentagens das espécies presentes na  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* em diferentes concentrações hidrogeniônicas, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM: 109 S ( O ) e 65,5 S (  $\Delta$  ).

### Determinação do conteúdo de carboidratos

Na faixa de concentração de 0,05 a 0,35 mg/ml de hemocianina, a reação com fenol em ácido sulfúrico obedeceu à lei de Beer apresentando linearidade, conforme mostra a figura 10. Por comparação com uma curva padrão, chegou-se ao valor de  $42,00 \pm 3,84$   $\mu$ g de carboidrato por mg de hemocianina.

Pela reação com p-dimetilaminobenzaldeído, determinam-se somente os açúcares aminados, como glicosamina e galactosamina, e obteve-se como resultado o valor de  $24,82 \pm 2,04$   $\mu$ g de açúcar aminado por mg de hemocianina, o que nos leva a um conteúdo de aproximadamente 7% em carboidratos para essa hemocianina.

### Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida

A hemocianina total apresentou pelo menos 5 bandas distintas na eletroforese em gel de poliacrilamida sendo que a terceira banda poderia provavelmente ser resolvida em outras, pois mostrou ser muito larga. Nas mesmas condições, a  $\beta$  hemocianina apresentou somente uma banda larga, correspondendo à terceira banda apresentada pela hemocianina total (figura 11). Em presença de SDS a hemocianina total apresentou pelo menos 7 bandas, enquanto que a  $\beta$  hemocianina mostrou 3 bandas distintas, duas intensas muito próximas, e a terceira de maior mobilidade anódica, menos intensa que as anteriores, indicando a presença de uma espécie de peso molecular inferior (figura 12).

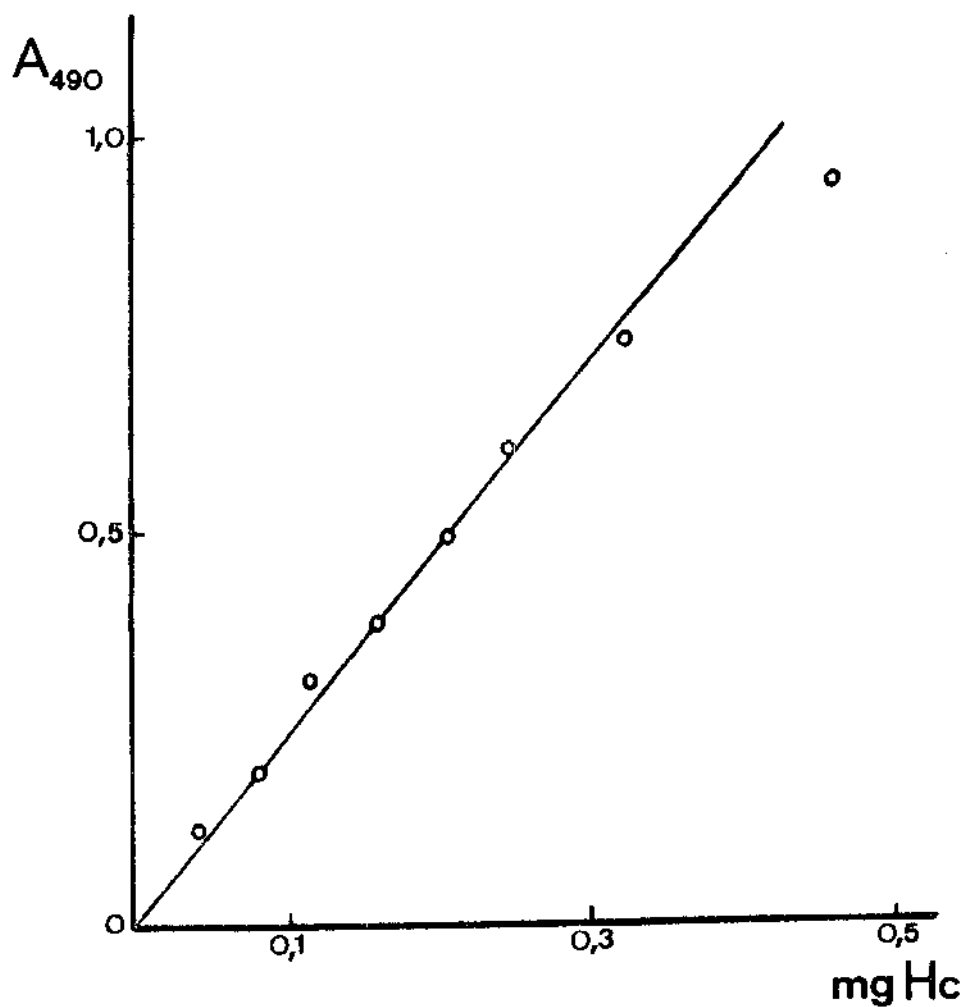


Figura 10 - Gráfico de absorvância em 490 nm em função da concentração de hemocianina de *M.ovatus*, após reação com fenol em ácido sulfúrico.



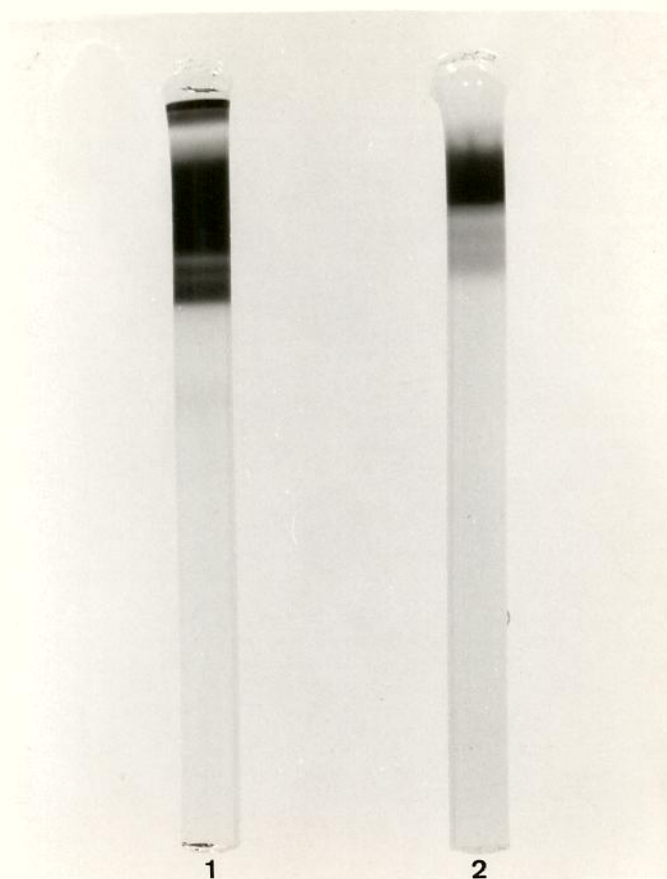


Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da hemocianina total ( 1 ) e  $\beta$  hemocianina ( 2 ) de *M.ovatus*.

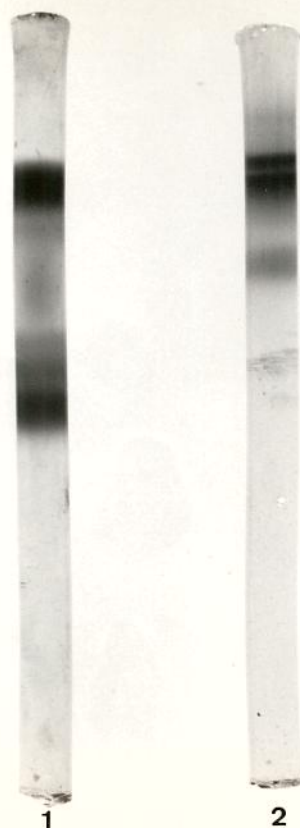


Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, da hemocianina total ( 1 ) e  $\beta$  hemocianina ( 2 ) de *M.ovatus*.

### Determinação de grupos tióis livres

A titulação dos grupos -SH da  $\beta$  hemocianina e apo hemocianina, na presença e ausência de SDS, forneceram os resultados que se encontram na tabela II.

TABELA II

Amostra	grupos -SH/sítio binuclear de Cu*
$\beta$ hemocianina	1,2
$\beta$ hemocianina + SDS	2,9
apo-hemocianina	1,7
apo-hemocianina + SDS	3,1

\* Foi assumido um valor de 50.000 daltons como peso molecular para a subunidade funcional mínima (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971).

### Análise por microscopia eletrônica

Conforme mostra a figura 13, a hemocianina total de *M. ovatus* apresenta-se como um cilindro, com uma base de aproximadamente 30 nm de diâmetro e 35 nm de altura. Na fotomicrografia eletrônica pode-se distinguir portanto círculos e retângulos com essas dimensões. Esse elevado grau de organização é perdido após diálise por 12 horas contra tampão borato 0,1 M pH 9,2, contendo EDTA 1 mM, de acordo com o que se observa na figura 14.

Em presença de NaCl 1 M, o componente  $\alpha$  dissocia-se em moléculas com metade do peso molecular da hemocianina nativa, como pode ser visto na figura 15, onde há cilindros inteiros ( $\beta$  hemocianina) e cilindros com metade do comprimento origi-

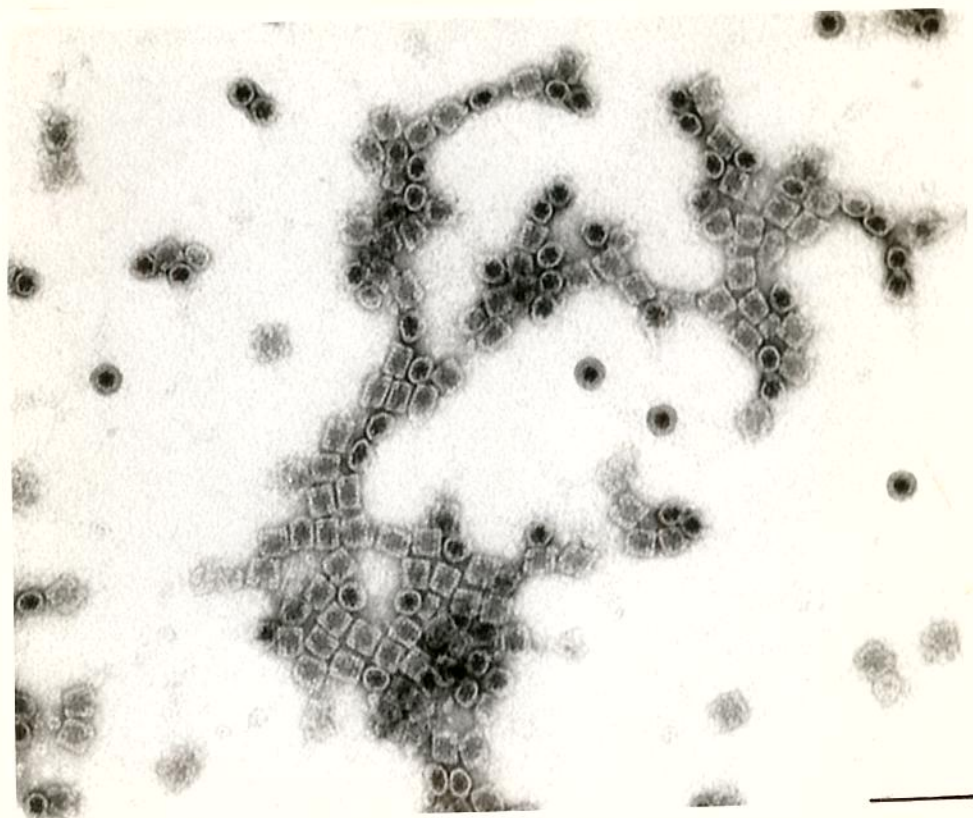


Figura 13 - Fotomicrografia eletrônica da hemocianina total de *M. ovatus* na forma associada (x 97.000). A barra representa 100 nm.

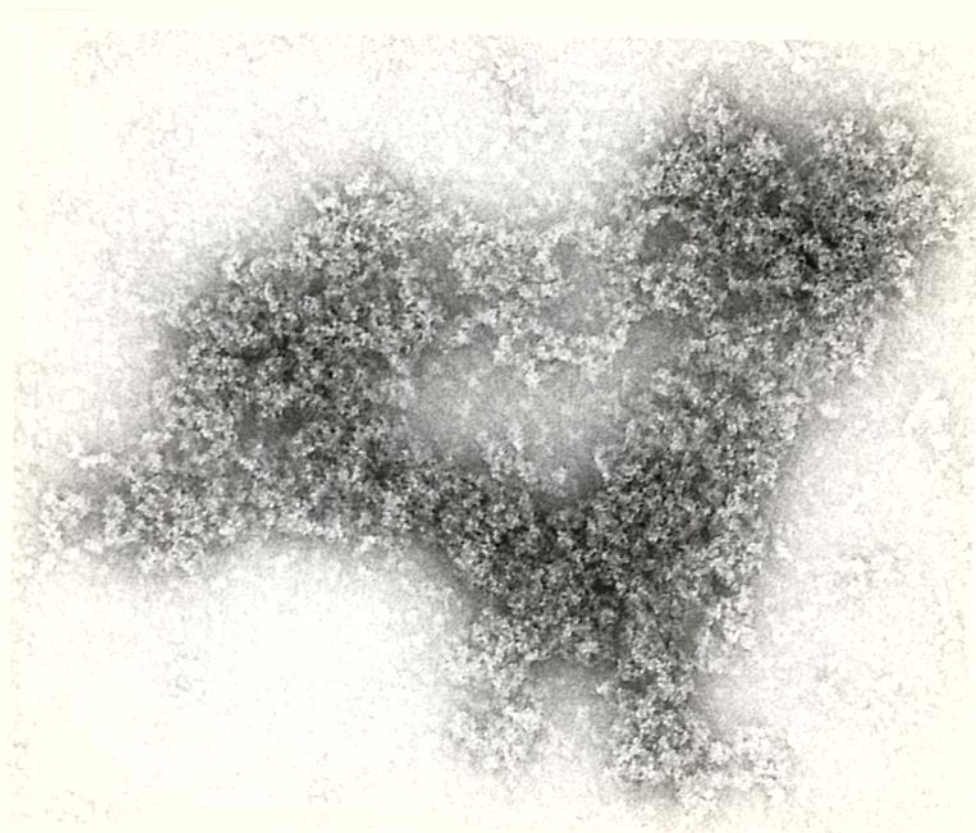


Figura 14 - Fotomicrografia eletrônica da hemocianina total de *M.ovatus* na forma dissociada (x 134.000).

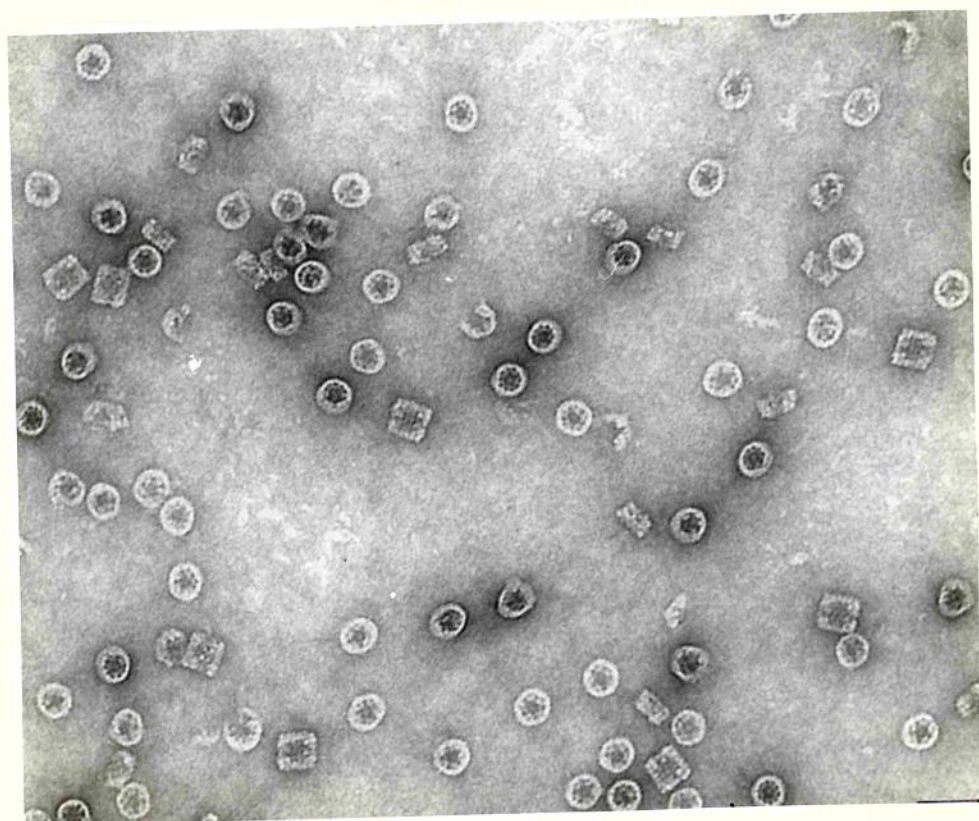


Figura 15 - Fotomicrografia eletrônica da hemocianina total de *M.ovatus* na presença de NaCl 1 M (x 134.000). A barra corresponde a 50 nm.

nal, conservando entretanto o mesmo diâmetro ( $\alpha$  hemocianina). As figuras 16 e 17 mostram preparações purificadas de  $\alpha$  e  $\beta$  hemocianina respectivamente, ambas em NaCl 1 M. Nota-se que aparecem cilindros inteiros na fotomicrografia eletrônica da  $\beta$  hemocianina, enquanto que na da  $\alpha$  hemocianina estes correspondem à metade dos originais.

### Testes serológicos

A molécula de hemocianina revelou-se um excelente antígeno, tendo o soro apresentado já reação após 5 dias da primeira imunização. Foram utilizados os antissoros específicos para hemocianina associada (AS-HcA) para hemocianina dissociada em subunidades (AS-HcD). Nos testes serológicos de dupla difusão em ágar observamos perfeita identidade entre HcA e HcD (figuras 18 a 21). Testes feitos com apo-hemocianina permitiram observar identidade parcial entre os grupamentos de HcA e/ou HcD e apo-hemocianina conforme mostra a figura 22.

### Efeito da adição de cianeto à oxihemocianina

A adição de cianeto à oxihemocianina causa um rápido decréscimo no pico a 344 nm, conforme mostra a figura 23. Pode-se notar que o aspecto do espectro é semelhante ao dos obtidos por sucessivas adições de ar à deoxihemocianina, nas experiências de equilíbrio com oxigênio (figura 24). O decréscimo no valor de absorvância causado pela adição de cianeto, não é diretamente proporcional à relação  $CN^-: Cu$ , pois enquanto uma proporção de 2:1 causa 15% de redução desse valor, numa relação de 20:1 mantêm-se ainda um valor de 56% da absorvância original.



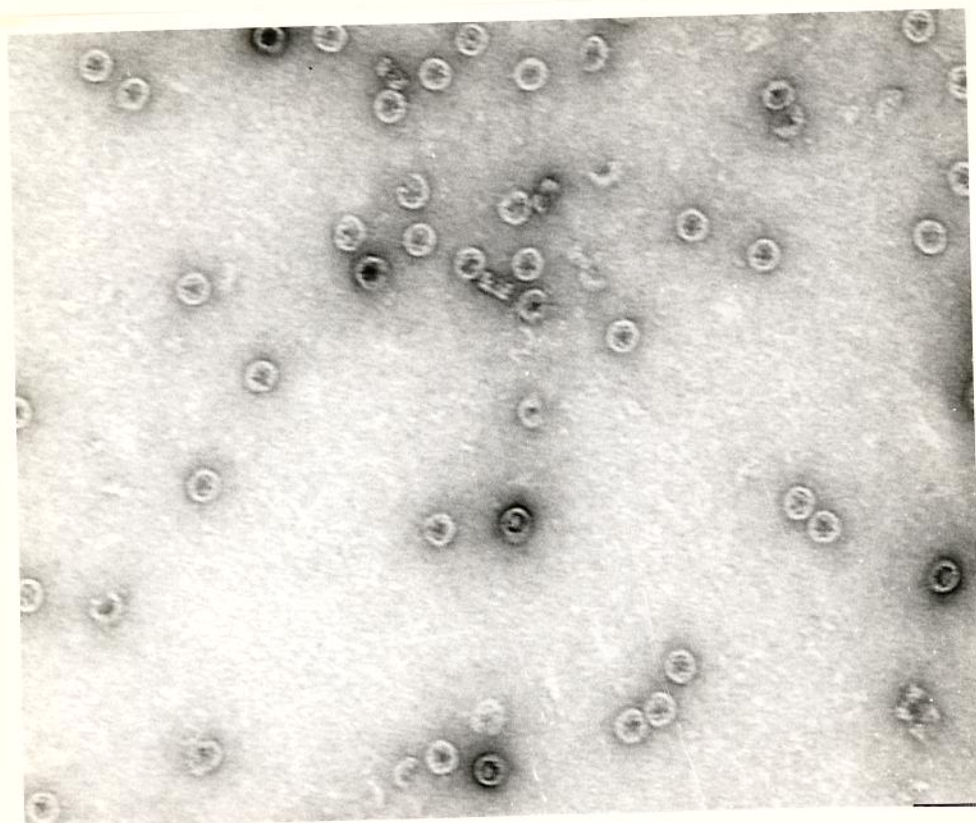


Figura 16 - Fotomicrografia eletrônica da  $\alpha$  hemocianina de *M.ovatus* em NaCl 1 M (x 134.000). A barra representa 50 nm.



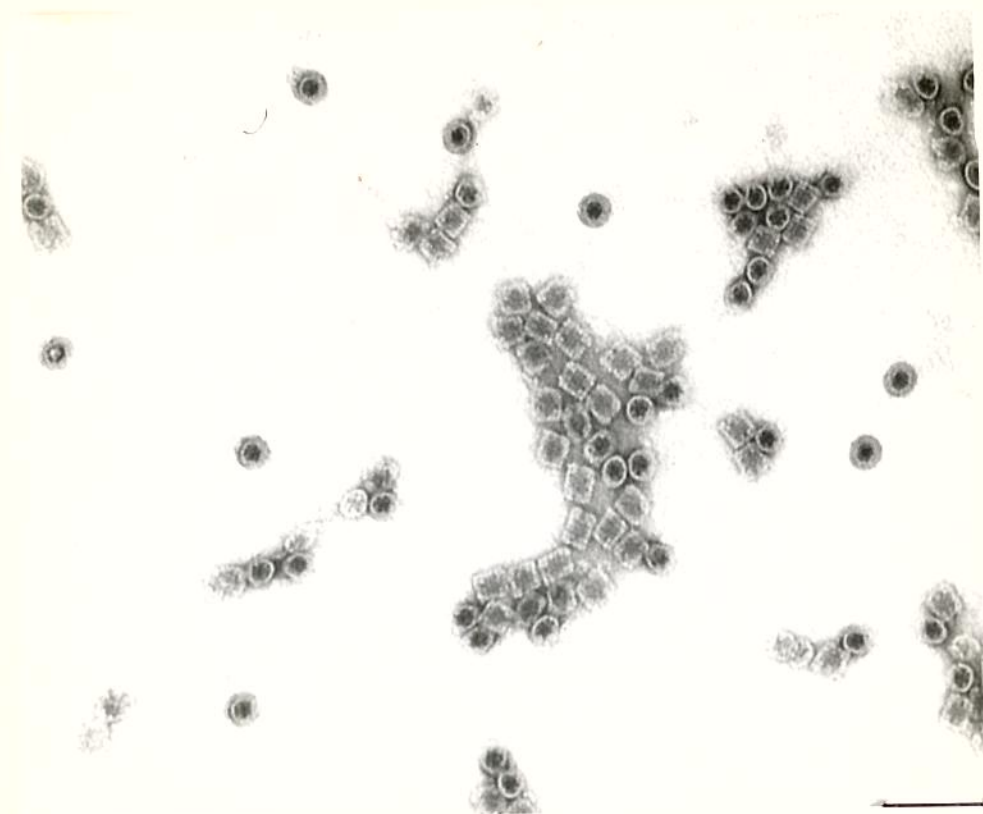


Figura 17 - Fotomicrografia eletrônica da  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* em NaCl 1 M (x 97.000) A barra corresponde a 100 nm.

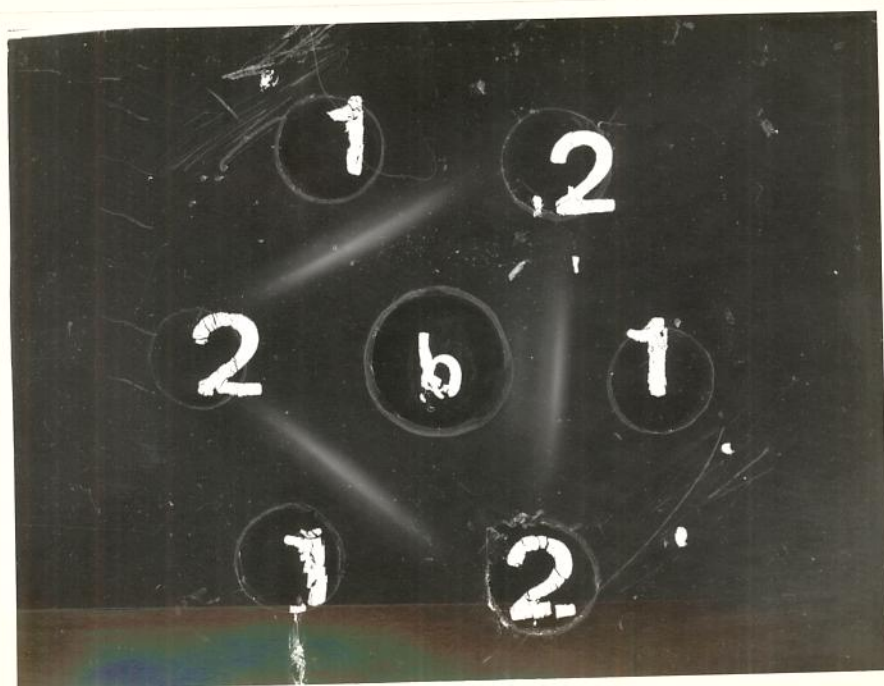


Figura 18 - Linhas de precipitação obtidas em testes de imunodifusão em agar.

- (1) AS-HcA
- (2) soro normal
- (b) HcA

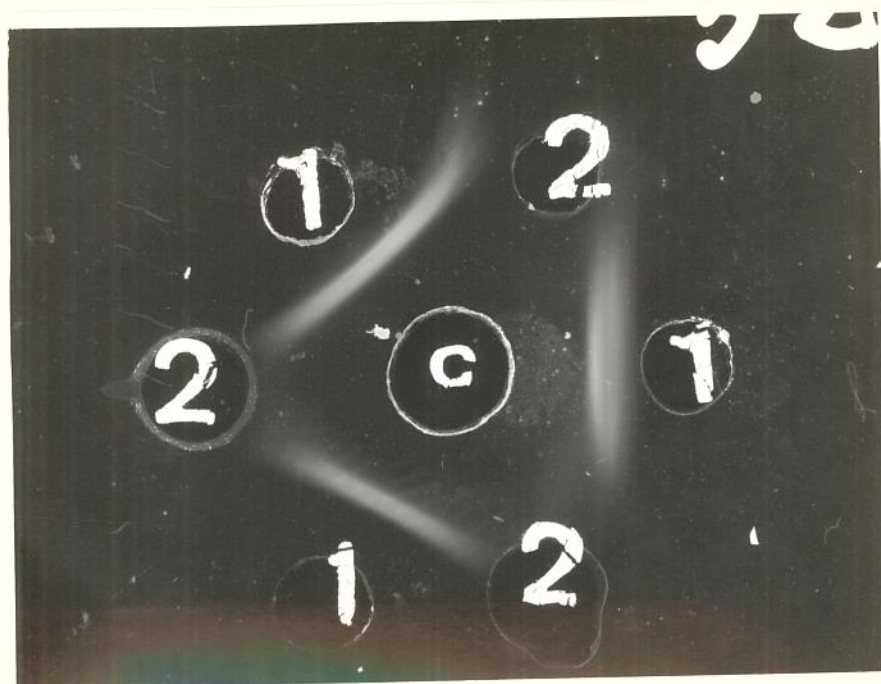


Figura 19 - Linhas de precipitação obtidas em testes de dupla difusão em agar.

- (1) AsHcA
- (2) soro normal
- (c) HcD

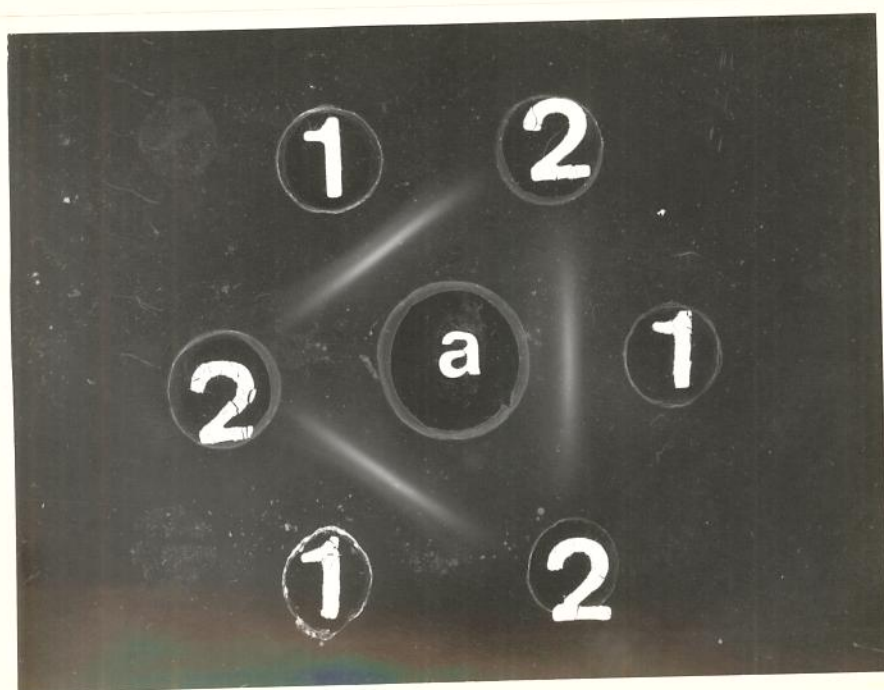


Figura 20 - Linhas de precipitação obtidas em testes de imunodifusão em agar.

- (1) AS-HcD
- (2) soro normal
- (a) HcD

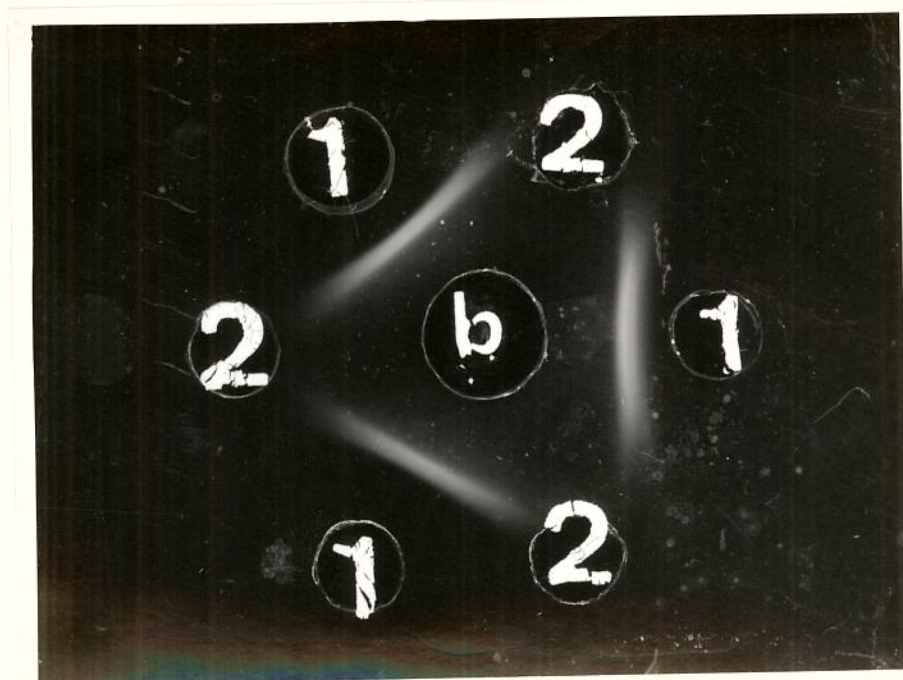


Figura 21 - Linhas de precipitação obtidas em testes de imunodifusão em agar.

- (1) As-HcD
- (2) soro normal
- (b) HcA

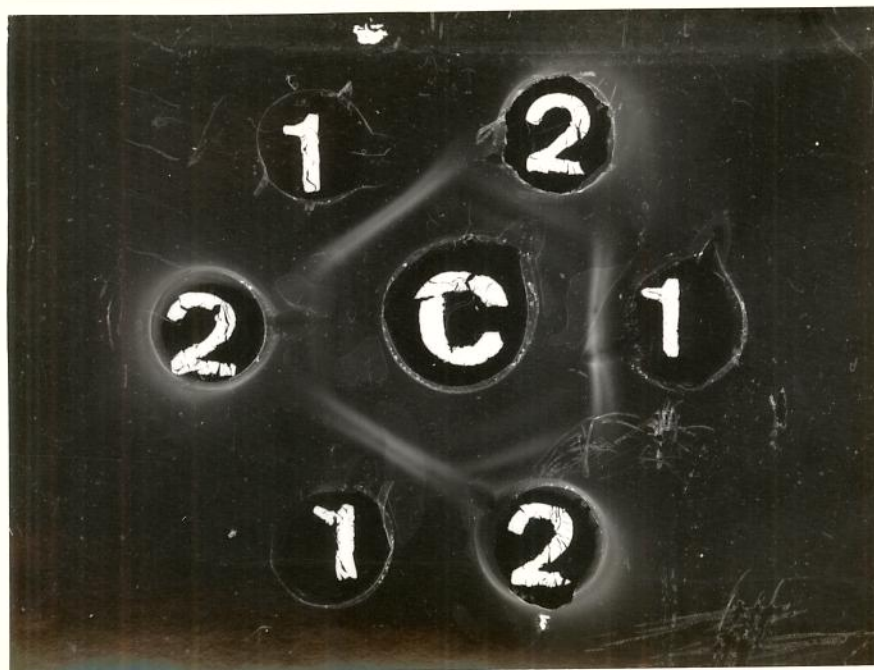


Figura 22 - Linhas de precipitação obtidas em testes de imunodifusão em agar.

- (1) HcA
- (2) apo-hemocianina
- (C) AS-HcA

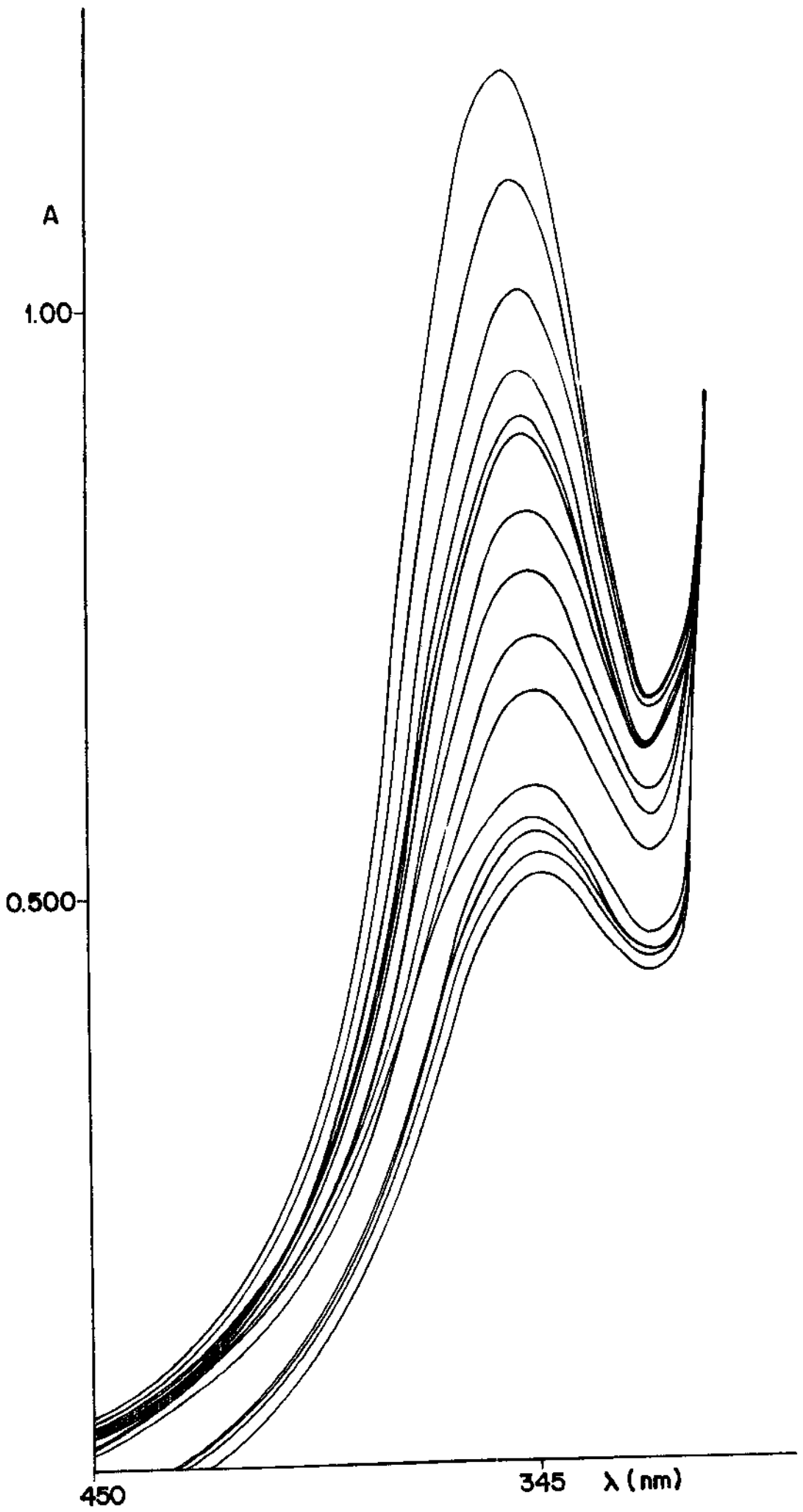


Figura 23 - Desaparecimento do pico a 344 nm por adições sucessivas de cianeto à hemocianina de *M.ovatus*.

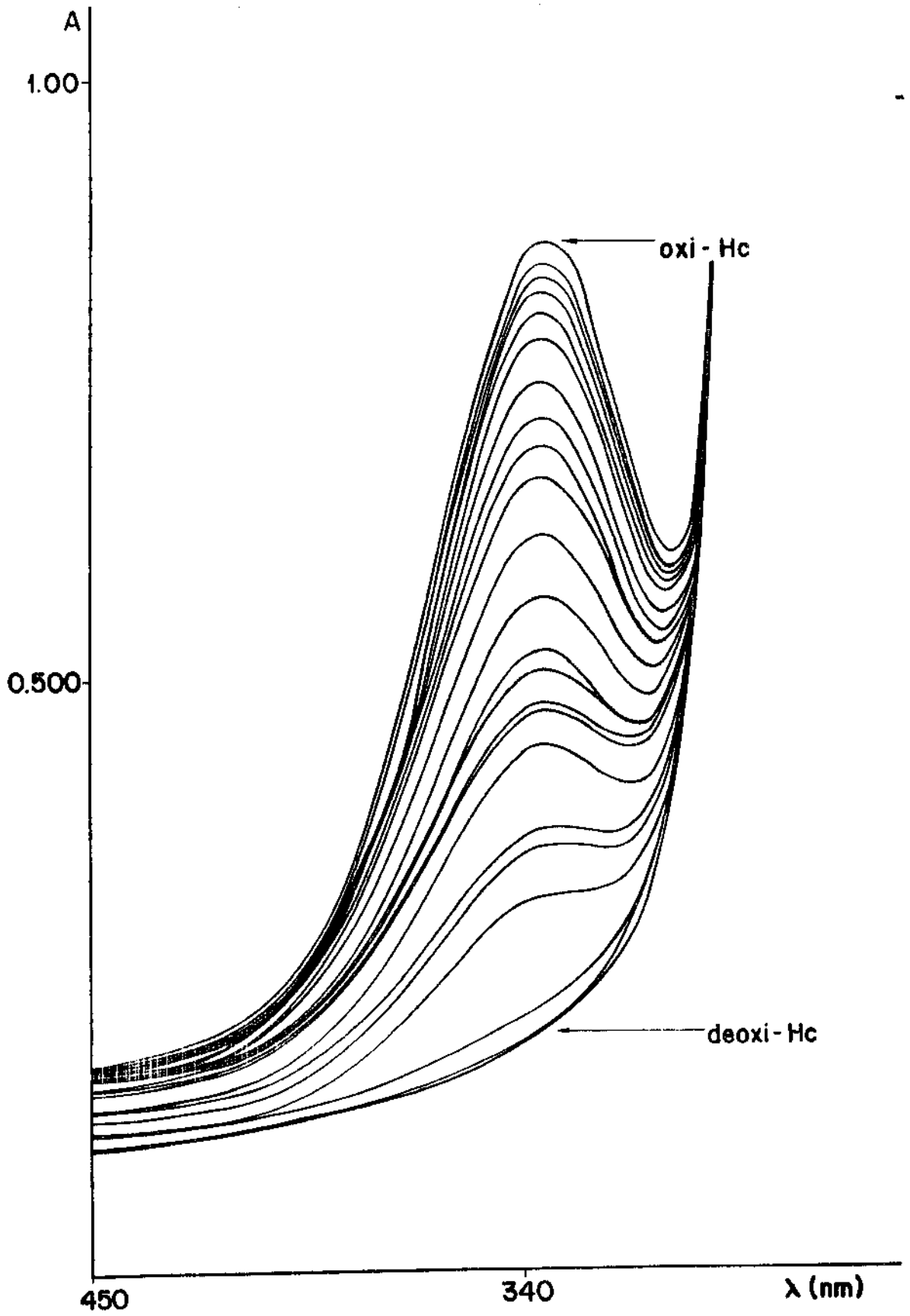


Figura 24 - Curva de equilíbrio da hemolinfa total de *M. ovatus* com oxigênio.



### Cinética da remoção de cobre por cianeto

A figura 25 mostra a cinética da remoção de cobre das formas oxigenada e desoxigenada da  $\beta$  hemocianina durante as três primeiras horas após a adição de cianeto à proteína. A constante cinética de pseudo 1ª ordem para a reação inicial é de  $0,0461 \text{ min}^{-1}$  para a oxi e de  $0,0066 \text{ min}^{-1}$  para a deoxihemocianina, o que sugere uma apreciável influência da presença do ligante. Esse efeito torna-se ainda mais evidente ao considerarmos que enquanto 50% do cobre ligado à desoxihemocianina é removido em cerca de 30 minutos, a forma oxi ainda retém 53% do cobre após 3 horas de incubação (figura 26). A capacidade de ligação com oxigênio das amostras nas quais o cobre foi parcialmente removido, foi determinada pela absorbância em 344 nm e a figura 27 mostra a percentagem do pico de oxihemocianina em função do tempo de reação com cianeto.

### Conteúdo de cobre e capacidade de ligação de oxigênio

A análise de cobre em amostras de hemocianina total e de  $\beta$  hemocianina levaram a um resultado de 2,65 e 2,81  $\mu\text{g}$  de cobre por mg de proteína respectivamente. Nossas preparações de apo-hemocianina retiveram sempre cerca de 8% a 10% do cobre original.

A capacidade de ligação de oxigênio, expressa como a diferença total na absorbância em 344 nm entre as formas oxigenada e desoxigenada por mg de proteína, também se mostrou ligeiramente superior na  $\beta$  hemocianina onde  $\Delta A_{344}/\text{mg} = 0,385$ , do que na hemocianina total onde  $\Delta A_{344}/\text{mg} = 0,361$ .

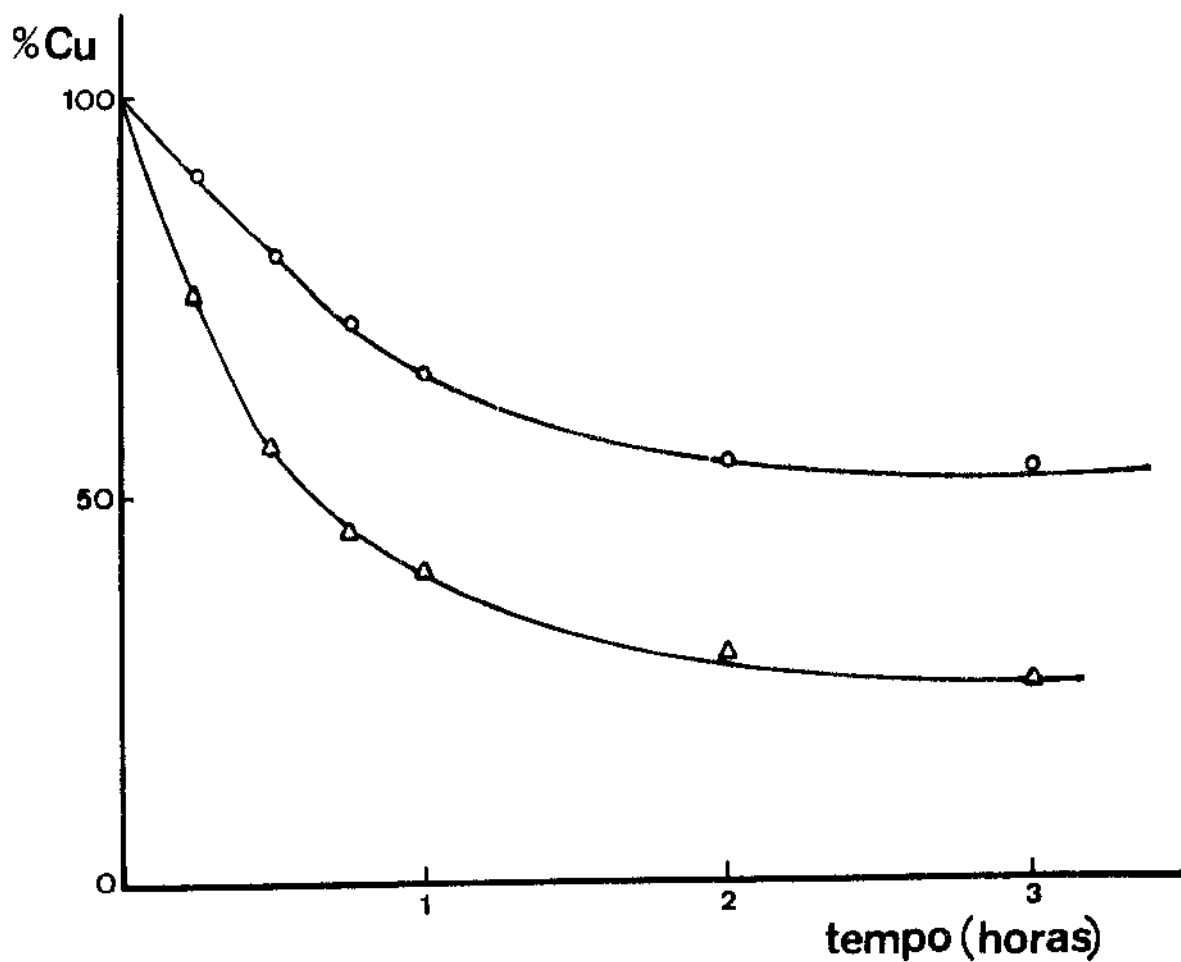


Figura 26 - Percentagem de cobre remanescente nas amostras de oxi ( O ) e deoxi ( Δ )  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* após incubação com cianeto em diferentes intervalos de tempo.

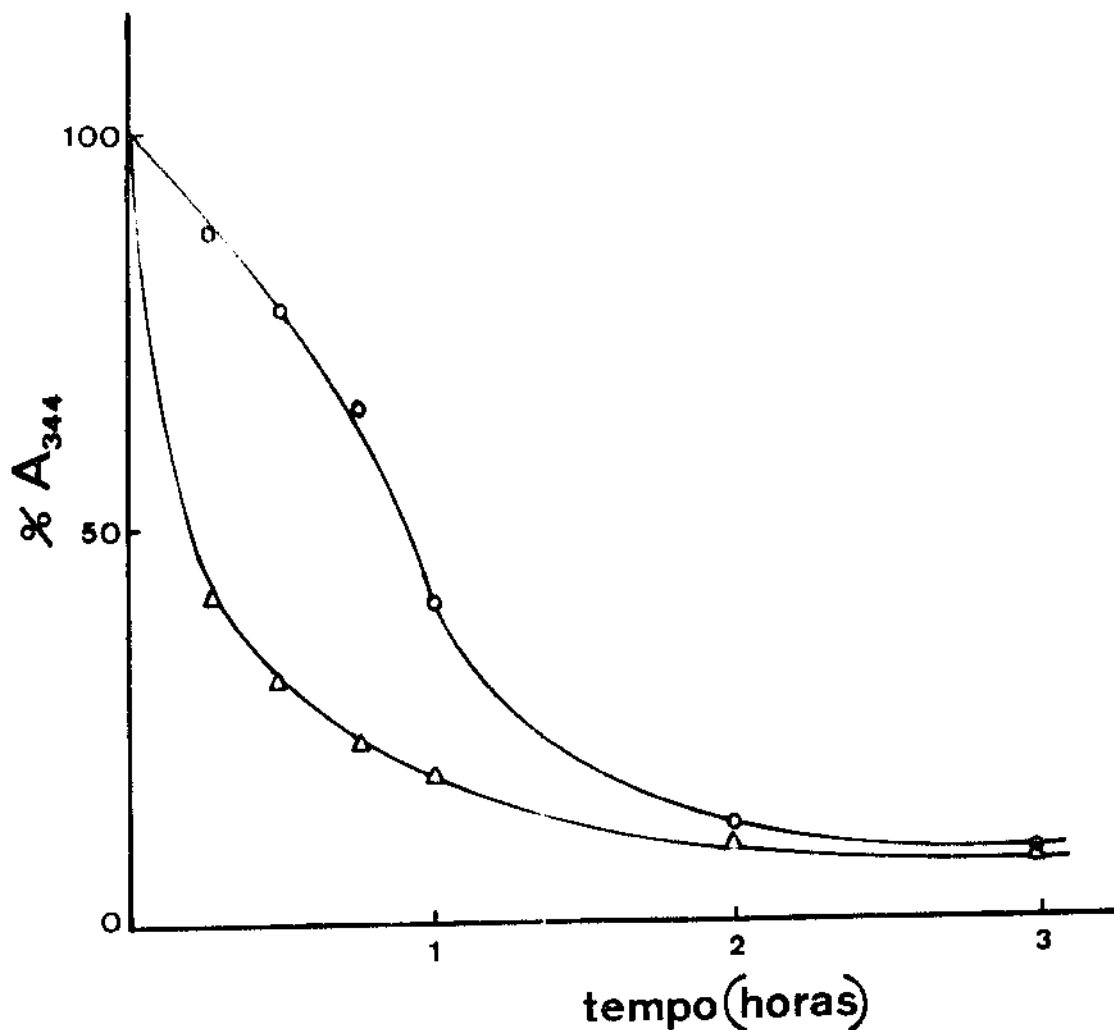


Figura 27 - Percentagem da absorvância em 344 nm apresentada por amostras de oxi ( O ) e deoxi ( Δ ) β hemocianina de *M.ovatus*, após incubação com cianeto em diferentes intervalos de tempo.

### Equilíbrio da hemocianina com oxigênio

A figura 24 mostra a curva de oxigenação obtida diretamente com a hemolinfa recém coletada, sem nenhuma purificação posterior. Verifica-se que nessas condições,  $P_{50} = 8,2$  mmHg e o coeficiente de Hill  $n_{50} = 2,1$ .

A afinidade da  $\beta$  hemocianina pelo oxigênio mostrou forte dependência da presença de  $10^3$  ions  $Ca^{2+}$ , como pode-se verificar através da figura 28, onde o pH foi mantido igual ao obtido para a hemolinfa recém coletada.

A figura 29 mostra o efeito de prótons sobre a afinidade pelo oxigênio da  $\beta$  hemocianina nas formas associada e dissociada. Pode-se verificar que ambas as formas apresentam efeito Bohr reverso, embora muito mais acentuado no caso da hemocianina associada. Os valores de  $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$  obtidos na região de pH de 7,5 a 8,5 foram, respectivamente, 0,18 para a forma associada e 0,03 para a forma dissociada.

Os valores de  $n_{50}$  em ambos os casos não apresentaram diferenças significativas com a variação do pH. A hemocianina dissociada mostrou-se não cooperativa, com valores de  $n_{50}$  aproximando-se da unidade, enquanto que para a hemocianina associada os valores de  $n_{50}$  variaram entre 1,5 e 2,0, apresentando portanto o fenômeno da cooperatividade. Nota-se também que em toda a faixa de pH estudada, a molécula dissociada apresenta maior afinidade pelo oxigênio do que a molécula associada. Esses resultados encontram-se dispostos na tabela III.

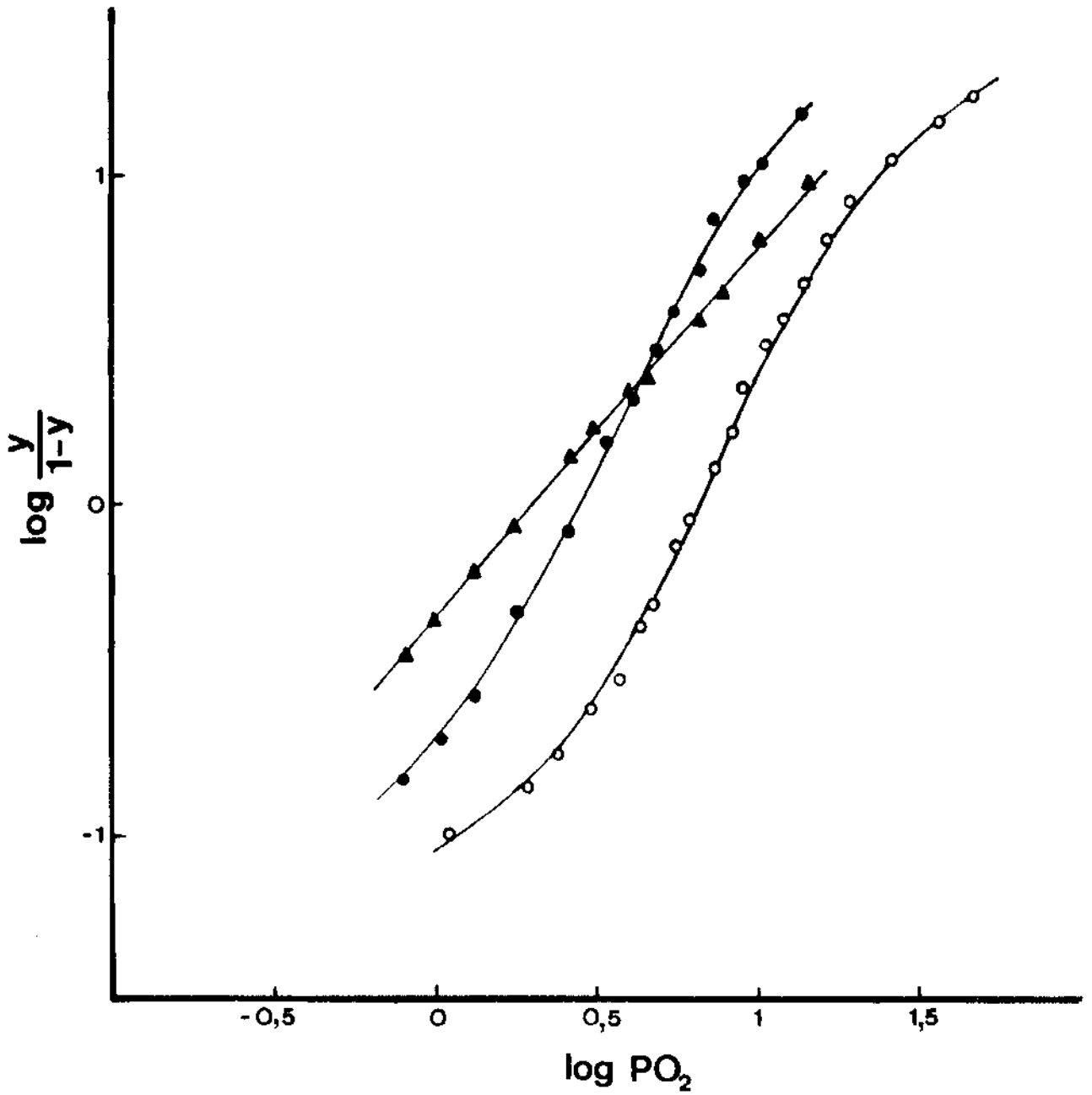


Figura 23 - Gráfico de Hill para  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* na ausência de íons  $Ca^{2+}$  ( $\blacktriangle$ ) e na presença de íons  $Ca^{2+}$  10 mM ( $\bullet$ ) e 20 mM ( $\circ$ ).

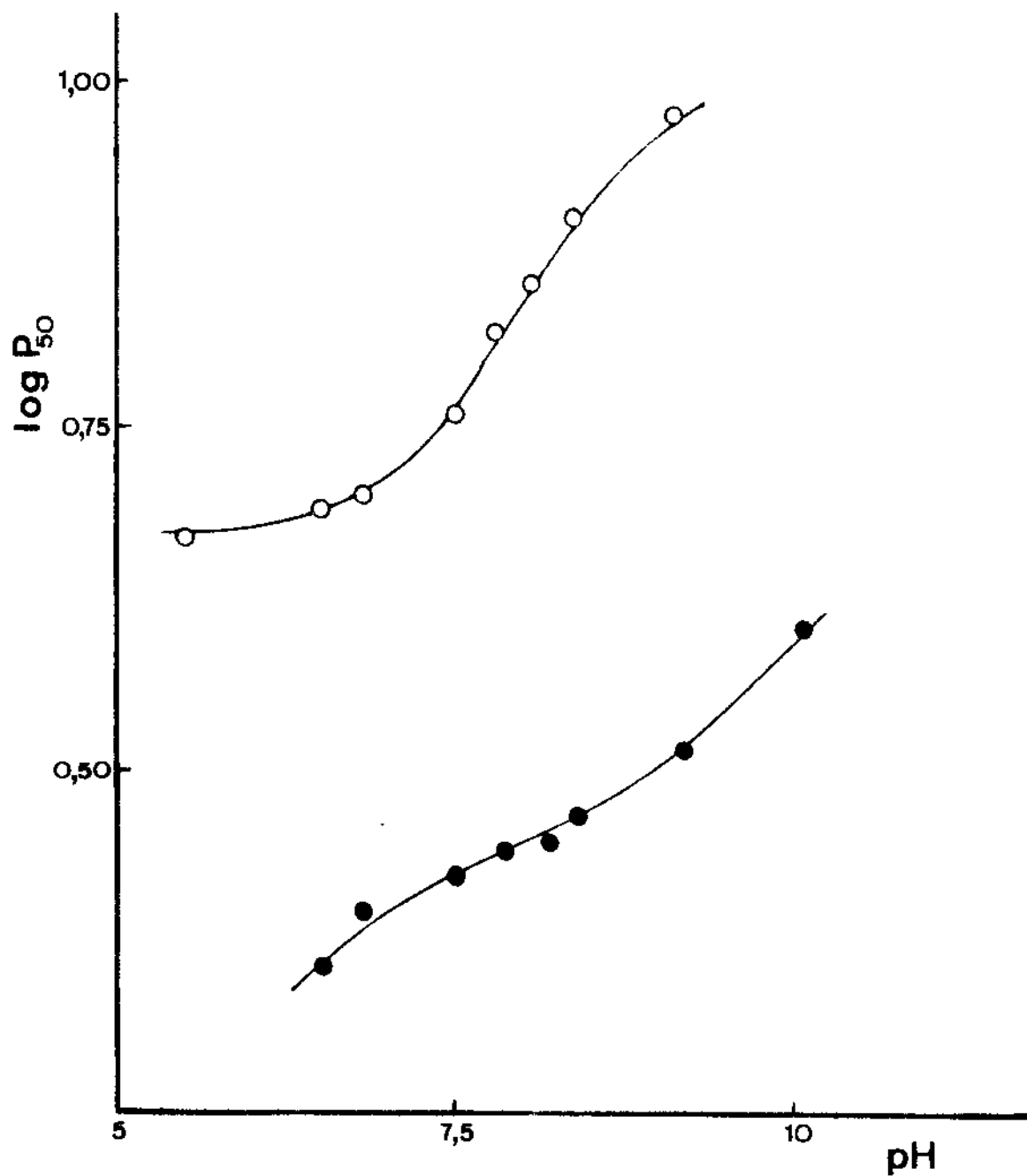


Figura 29 - Influência da concentração hidrogeniônica na afinidade das formas associada ( O ) e dissociada ( ● ) da  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* pelo ligante oxigênio.

TABELA III

β hemocianina	parâmetro	pH								
		5,5	6,5	6,8	7,5	7,8	8,2	8,4	9,2	10,1
associada (Ca <sup>2+</sup> 20 mM)	P <sub>50</sub> (mmHg)	4,51	4,91	5,03	5,75	6,61	7,02	8,12	9,66	-
	n <sub>50</sub>	2,0	2,0	1,6	1,65	1,6	1,7	1,5	1,5	-
dissociada (EDTA 1 mM)	P <sub>50</sub> (mmHg)	-	2,29	2,52	2,62	2,74	2,80	2,98	3,31	4,07
	n <sub>50</sub>	-	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,85	0,9

## DISCUSSÃO

Em animais invertebrados pode-se observar a existência de diferentes tipos de proteínas respiratórias, algumas contendo ferro ligado ou não ao heme, outras contendo cobre em seus sítios de ligação com oxigênio. O que todas possuem em comum, além da função de transporte de oxigênio é um elevado peso molecular o que as torna moléculas complexas que apresentam problemas interessantes quando comparadas às hemoglobinas mais simples encontradas nos vertebrados. Assim, as hemoglobinas extracelulares, eritrocruorinas e clorocruorinas, as hemeritrinas e as hemocianinas são as proteínas respiratórias encontradas em um grande número de espécies de invertebrados e exibem uma grande variedade de comportamento funcional, diversidade quanto à estrutura de suas subunidades, relacionada com o número e tipo de monômeros e com a geometria das moléculas íntegras (ANTONINI & CHIANCONE, 1977).

As hemocianinas pertencem a esse grupo de proteínas poliméricas, e embora sendo a proteína respiratória de grande parte de moluscos e artrópodos, já apresentam diferenças estruturais e funcionais distintas em cada um desses filos. Mesmo dentro de uma classe como a dos gastrópodos, embora não existam diferenças estruturais acentuadas, as diferenças funcionais observadas podem ser atribuídas a microheterogeneidade de cadeias, sítios ativos ou subunidades (BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980). Neste trabalho sobre a hemocianina do gastrópodo terrestre *Megalobulimulus ovatus*, tentamos caracterizar funcional e estruturalmente essa proteína e compará-la com os dados existentes na literatura para hemocianinas de outras espécies da mesma classe.



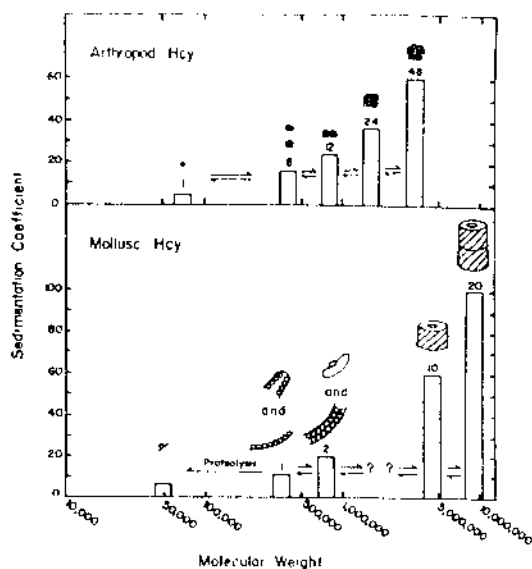
Analisando a hemolinfa obtida de cada animal, podemos constatar, pelos resultados obtidos, que o pH do material recém coletado é razoavelmente constante, apresentando um valor médio de  $8,15 \pm 0,05$ . Já em relação à concentração total de proteína ou mesmo de hemocianina, há maiores variações, provavelmente relacionadas com o próprio ciclo de vida animal, que passa por períodos de maior atividade na época de chuvas, e períodos de baixa atividade, quase ibernando na época mais seca (LEME, 1973). Verificou-se que a concentração proteica na hemolinfa era independente do peso corpóreo do animal, e variava de 30 a 50 mg/ml, sendo que 90 a 95% desse valor corresponde à concentração em hemocianina, o que está de acordo com os valores descritos em literatura para *H. pomatia* (LUSTIG et alii, 1937 e PILSON, 1965). A elevada concentração da hemocianina na hemolinfa e seu alto peso molecular favorecem sua purificação baseada principalmente em sedimentação por ultracentrifugação. A partir da hemocianina total purificada, diluída em tampão acetato 0,10 M pH 5,7 contendo NaCl 1 M, pode-se observar que cerca de 70% das moléculas dissociam-se em partículas com metade do tamanho original, o que foi comprovado pela análise de sedimentação em ultracentrifuga analítica e através de fotomicrografias eletrônicas das soluções de hemocianina. Esse fenômeno de dissociação parcial das moléculas quando em presença de NaCl 1 M, tem sido observado para hemocianinas de outras espécies de gastrópodos, como *Helix pomatia* (HEIRWEGH et alii, 1961), onde 75% das moléculas sofrem essa dissociação, *Helix hortensis*, *Strophocheilus terrestres* e *Helix aspersa* (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971) onde apenas 25 a 30% das moléculas se dissociam, e o caso extremo de 100% de dissociação apresentando pela hemocianina de *Helix arbustorum* (KONINGS, 1969).

Denominou-se  $\alpha$  hemocianina a proteína que se dissocia nessas condições e  $\beta$  hemocianina àquela que permanece não dissociada. Aparentemente os gastrópodos marinhos só possuem  $\beta$  hemocianina enquanto os terrestres possuem os dois tipos de hemocianina, embora *Helix arbustorum* (100% de  $\alpha$  hemocianina) e *Pila leopoldvillensis* (100% de  $\beta$  hemocianina) apresentem somente um dos dois componentes (Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971). Assim, a hemocianina de *M.ovatus*, com 70% de  $\alpha$  hemocianina e 30% de  $\beta$  hemocianina, assemelha-se bastante em composição à hemocianina de *H.pomatia*.

A molécula de hemocianina ainda pode sofrer dissociação em partículas menores, dependendo do pH do meio e da concentração em cátions divalentes, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Assim, estudou-se a região de estabilidade das várias espécies moleculares provenientes de diferentes graus de dissociação da hemocianina de *M.ovatus*, chegando-se a um grau máximo de dissociação em pH 10 na ausência de cátions divalentes. A espécie então formada apresentou um coeficiente de sedimentação 13 S, correspondendo a aproximadamente 1/20 da molécula original. Dissociação além desse ponto não foi observada, e elevando-se o pH acima de 11 ocorre denaturação irreversível da proteína.

Nessa hemocianina também pode ser constatado o papel dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$  na manutenção da molécula agregada, ao compararmos os resultados expostos nas figuras 8 e 9. Verificamos que na presença desse íon, a dissociação da hemocianina de *M.ovatus* não vai além de moléculas com 1/2 do peso molecular original na faixa de pH estudado, embora na hemocianina de *H.pomatia* mesmo em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  25 mM, ocorra dissociação também em moléculas com 1/10 do tamanho original, a partir de pH 9,2 (SIEZEN

& Van DRIEL, 1974). Tentativas de reassociação da espécie 13 S por diminuição gradativa do pH ou pela adição de íons  $Ca^{2+}$  até uma concentração de 20 mM, não tiveram sucesso, mesmo incubando-se a solução por até 24 horas, somente traços de material de maior peso molecular foram detectados por análise em ultracentrifugação. Já a reassociação a partir das espécies 22 S e 65,5 S foi conseguida, embora no caso da espécie 22 S houvesse sempre cerca de 20% das moléculas ainda dissociadas. Esse fenômeno de dissociação e reassociação está aparentemente de acordo com o esquema proposto por BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980, para hemocianinas de moluscos, embora nem todas as espécies de moluscos apresentem todas as subunidades por eles descritas.



Interrelação das hemocianinas de artrópodos e de moluscos e suas subunidades (BONAVENTURA et alii, 1977b).

A hemocianina do gastrópodo marinho *Buccinum undatum*, por exemplo, não se dissocia até 1/20, mas somente até 1/10 da molécula original (WOOD, 1973) e a do cefalópodo *Nautilus pompilius*, apresenta apenas os componentes 58 S e 11 S, sem nenhum outro estágio intermediário de dissociação (BONAVENTURA et alii, 1981). Já os gastrópodos terrestres, como *Helix pomatia* e *Levantina hierosolima*, apresentam todos esses estágios de dissociação (DIJK et alii, 1970 e KLARMAN et alii, 1975), acima descritos.

Assim, com exceção da reassociação reversível de partículas de  $4,5 \times 10^5$  daltons de peso molecular para as de  $9 \times 10^5$  daltons, a hemocianina de *M. ovatus* apresenta as mesmas etapas de dissociação e subunidades comuns às hemocianinas de outros moluscos terrestres, não tendo sido nela evidenciada também nenhuma espécie intermediária entre  $5 \times 10^6$  e  $9 \times 10^5$  daltons de peso molecular.

Na hemocianina de *H. pomatia* todas as partículas dissociadas podem sofrer reassociação, embora esta seja mais rápida a partir de moléculas com 1/2 ou 1/10 do peso molecular original, do que a partir daquelas com 1/20 do tamanho da molécula associada. Neste caso, além da reassociação ser lenta, é também incompleta como na hemocianina por nós estudada e SIEZEN, em 1974, propôs para *H. pomatia* a existência de dois tipos de moléculas dissociadas, um que se associa rapidamente e outro de lenta reassociação, que seria responsável pela percentagem observada de material não reassociado. No caso da hemocianina de *M. ovatus*, poderia ocorrer a formação preferencial do tipo de partículas de associação lenta, o que levaria ao baixo grau de reassociação por nós obtido. Em alguns casos, como na hemocianina de *N. pompi-*

lius, a reassociação causa o aparecimento de espécies inexistentes quando da dissociação da molécula nativa, algumas vezes de peso molecular superior à da molécula original (BONAVENTURA et alii, 1981). Esse comportamento não foi observado para a hemocianina de *M.ovatus*, e parece que as condições para obtenção de agregados de maior peso molecular nas hemocianinas de gastrópodos envolvem a remoção proteolítica do "colar", quando então ocorre a formação de polímeros tubulares (Van BREEMEN et alii, 1977).

Esse fenômeno de dissociação em subunidades não se trata de uma propriedade apresentada somente "in vitro", sob ação de certos íons, mas possui também significado fisiológico, uma vez que a oxigenação parece causar uma abrupta dissociação de moléculas com  $4,5 \times 10^6$  daltons para moléculas com  $9 \times 10^5$  daltons de peso molecular, como foi descrito para a hemocianina de *H.pomatia* submetida a análise em ultracentrífuga em condições de diferentes pressões de oxigênio (Van DRIEL & Van BRUGGEN, 1974) e para a hemocianina de *Limulus polyphemus* em que a forma oxigenada dissocia-se mais rapidamente que a forma desoxigenada por remoção de íons  $Ca^{2+}$  em meio alcalino (BROUWER et alii, 1981).

A análise da estrutura da molécula de hemocianina de *M.ovatus* através de microscopia eletrônica, mostra que a hemocianina total, não dissociada, apresenta uma estrutura semelhante às obtidas para outros gastrópodos, consistindo de um cilindro com cerca de 30 nm de diâmetro e 35 nm de altura, fechado parcialmente nas bases. Esses resultados são bastante semelhantes aos descritos por MELLEMA & KLUG, 1972, para as hemocianinas de *Kelletia kelletia*, *Busycon canaliculatum* e *Helix pomatia*. A molécula associada apresenta um plano de simetria, que pode ser

constatado quando em presença de NaCl 1 M, condições em que o componente  $\alpha$ , quando presente como em *M.ovatus*, dissocia-se em metades, aparecendo então partículas que correspondem à metade dos cilindros originais. Nos cefalópodos, a molécula associada parece chegar a apenas esse estágio de agregação, assemelhando-se às partículas observadas para a  $\alpha$  hemocianina de gastrópodos quando dissociada em metades (Van BRUGGEN, 1968). Fica então a questão do porquê de um maior grau de organização nas hemocianinas de gastrópodos que nas de cefalópodos, uma vez que aparentemente tanto as moléculas inteiras quanto as metades exibem propriedades funcionais semelhantes (VANNOPPEN-ver EECKE et alii, 1973). Quando a hemocianina total de *M.ovatus* é examinada em presença de NaCl 1 M, nota-se a presença dos dois componentes,  $\alpha$  e  $\beta$ , como ocorre com a hemocianina de *H.pomatia* (ENGELBORGHES & LONTIE, 1973) e em pH alcalino e ausência de cátions divalentes, observa-se a perda da estrutura tridimensional original, indicando a completa dissociação da molécula, provavelmente em subunidades de  $4,5 \times 10^5$  daltons de peso molecular, de acordo com os resultados obtidos pelas experiências de sedimentação em ultracentrífuga.

Ainda analisando a molécula de hemocianina de *M.ovatus* do ponto de vista de composição, verificou-se que se trata de uma glicoproteína, apresentando um conteúdo total de carboidratos de aproximadamente 7%, dos quais praticamente 1/3 corresponde a açúcares aminados. Embora em algumas hemocianinas tenha sido detectada a presença de carboidratos, a hemocianina de moluscos como *Murex fulvescens* apresenta 5,5% de carboidratos (BROUWER et alii, 1978b), a de *Helix pomatia* cerca de 8,2% (DIJK et alii, 1970) e a de *Octopus vulgaris* 4% (ALBERGONI et alii, 1972), não há evidências de que essa porção de carboidratos esteja envolvida na ligação de cobre ao sítio ativo.

Aparentemente a função dos carboidratos na molécula de hemocianina permanece desconhecida, e foi sugerido que os açúcares presentes não constituíssem apenas uma cadeia polissacarídica. De fato, ALBERGONI et alii, em 1972, obtiveram glicopeptídeos distintos, provenientes da digestão da hemocianina de *O. vulgaris* com pronase, submetendo-os à separação por eletroforese de alta voltagem. Estudos preliminares com  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus*, indicaram a presença de pelo menos quatro glicopeptídeos de migração eletroforética distinta.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou a presença de várias bandas para a hemocianina total, que podem ser provenientes dos componentes  $\alpha$  e  $\beta$  em diferentes graus de dissociação. Mesmo a  $\beta$  hemocianina purificada, que na análise por ultracentrifugação apresentou um só pico de sedimentação, apesar de mostrar uma banda larga e intensa, apresenta também traços de duas outras bandas de maior mobilidade anódica, provavelmente produtos de dissociação das moléculas nas condições da corrida eletroforética. Já em presença de SDS, o número de bandas é maior em ambas as amostras. Isso provavelmente se deve a uma hidrólise parcial de porções da molécula de menor peso molecular, como o "colar" que limita as extremidades dos cilindros. As duas bandas de igual intensidade e bastante próximas na amostra de  $\beta$  hemocianina poderiam ser provenientes da parede dos cilindros e a diferença de migração eletroforética seria uma indicação de heterogeneidade das subunidades. Esse tipo de comportamento em relação à eletroforese em gel de poliacrilamida ocorre também em várias hemocianinas já descritas (GULLICK et alii, 1979 e TORENSMA et alii, 1981b).

Uma outra possibilidade seria a existência de um terceiro componente,  $\beta_c$ , uma fração da  $\beta$  hemocianina que cristaliza em tampão acetato 10 mM pH 5,3, presente na hemocianina de *H.pomatia*, correspondendo a aproximadamente 1/3 de sua  $\beta$  hemocianina (GIELENS et alii, 1981). Até o presente, somente nessa hemocianina foi detectada a presença de tal componente, que inclusive diferencia-se imunologicamente da outra fração  $\beta$ , solúvel (LONTIE, 1982). No caso da  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus*, inúmeras tentativas foram feitas no sentido de se obter uma fração cristalizada, variando-se tanto o pH na região do ponto isoelétrico das hemocianinas (5,0 a 6,0) quanto a força iônica dos tampões utilizados e a concentração proteica das amostras. Foram feitas tentativas através de diálise e mantendo-se as amostras em diferentes soluções em tubos cônicos de cristalização em geladeira, mas não se conseguiu obter hemocianina cristalizada. Dessa forma, embora possa haver uma fração  $\beta_c$  na hemocianina de *M.ovatus*, ainda não possuímos provas conclusivas de sua existência.

Um dos aspectos mais interessantes e ainda não completamente elucidado é a questão do centro binuclear de cobre nas hemocianinas, local de ligação de oxigênio, monóxido de carbono e outros ligantes. Conhece-se a relação Cu:O<sub>2</sub> e Cu:CO, 2:1 em ambos os casos (BRUNORI et alii, 1982b), já foi demonstrado que O<sub>2</sub> se liga como peróxido (LOEHR et alii, 1974) e que nesse caso os átomos de cobre se encontram no estado de oxidação + 2, mas não exibem sinal de E.P.R. (LONTIE & VANQUICKENBORNE, 1974), o que tem sido associado a um acoplamento antiferromagnético entre os átomos de cobre (SOLOMON et alii, 1976). Sabe-se que vários ligantes podem substituir o oxigênio no sítio ativo, como NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup> e CN<sup>-</sup>, embora somente este último seja efetivamente capaz de remover os átomos de cobre do sítio ( HIMMEL



WRIGHT et alii, 1980). Na hemocianina de *M. ovatus*, observamos que a adição de pequenas quantidades de  $\text{CN}^-$ , a partir de quantidades menores que as estequiométricas, provoca o desaparecimento gradativo da banda característica da oxihemocianina em 344 nm, embora na presença de oxigênio pareça não haver remoção de cobre dos centros de ligação, pelo menos durante a realização da experiência, pois embora o pico de absorção característico diminua gradativamente, o aspecto do espectro se mantém inalterado, e se melhora àquele obtido quando, a partir da deoxihemocianina, efetuam-se adições sucessivas de pequenos volumes de ar. Uma outra hipótese é a de que se os átomos de cobre estão sendo removidos, essa remoção teria que ser simultânea, ou seja, cada par de átomos de cobre seria removido concomitantemente de um dado sítio de ligação. Isso porém, não está de acordo com o observado por HIMMELWRIGHT et alii, 1980, que obtiveram a remoção seletiva de um sítio de cobre por sítio na hemocianina de *Busycon canaliculatum*. Nesse caso, quando houvesse 50% de cobre removido, já não poderíamos observar o pico de absorção em 344 nm. Para elucidar esse ponto, fizemos a remoção de cobre da hemocianina de *M. ovatus* nas formas oxi e deoxi, na suposição de que a presença de um ligante, no caso  $\text{O}_2$ , poderia de certa forma proteger o centro binuclear de cobre do ataque de cianeto. Realmente, analisando os resultados obtidos, verificamos que há uma diferença significativa na velocidade de remoção de cobre das formas oxi e deoxi, pelo menos nos primeiros 30 minutos de reação. As constantes de velocidade da reação de pseudo 1ª ordem apresentaram valores de  $0,0461 \text{ min}^{-1}$  e  $0,0066 \text{ min}^{-1}$  para as formas oxi e deoxi respectivamente observando-se uma razão de 7:1 aproximadamente na velocidade de remoção do cobre do sítio livre da deoxihemocianina em relação ao

sítio ligado ao  $O_2$  da oxihemocianina. Da mesma forma, analisando -se o desenvolvimento da reação apresentado na figura 26, podemos notar que enquanto na forma desoxi ocorre remoção de cerca de 50% do cobre em aproximadamente 30 minutos de incubação, esse valor só é alcançado para a forma oxí após três horas de reação. Aparentemente, após a etapa inicial de remoção, que termina em cerca de 30 minutos para a deoxihemocianina e em cerca de 50 minutos para a oxihemocianina, segue-se uma segunda fase de reação, bem mais lenta e que não mostra influência da presença do ligante, conforme indica a figura 25. Nesse caso, poderíamos propor a existência de dois tipos de cobre nos sítios, ou de dois tipos de sítios, um contendo cobre mais acessível ao cianeto ou mais lábil, e outro contendo cobre mais firmemente ligado ou melhor protegido do ataque de cianeto. Considerando os valores de absorvância em 344 nm obtidos para as amostras de oxí e deoxihemocianina após remoção parcial de cobre (figura 27) e lembrando-se que quando a percentagem de cobre remanescente é igual à da banda de oxigênio temos ainda os dois átomos de cobre presentes no mesmo sítio, visto que  $O_2$  se liga formando uma ponte entre eles (BONAVENTURA & BONAVENTURA, 1980), enquanto que quando aquela é o dobro da obtida para a banda de oxigênio há somente um cobre no sítio, podemos propor que no caso da forma desoxi ocorra a remoção preferencial de um átomo de cobre do sítio, enquanto que no caso da forma oxí, inicialmente parece haver uma certa competição, mantendo-se iguais as percentagens de Cu remanescente e da banda de oxigênio observada, para, após cerca de 1 hora de incubação, a remoção passar a ocorrer como na forma desoxi. Esse fato também pode estar relacionado com o grau de oxidação dos átomos de cobre, uma vez que na deoxihemocianina temos Cu(I), que

forma complexos mais estáveis com cianeto do que Cu(II) que é o que se encontra na oxihemocianina (HIMMELWRIGHT et alii, 1978). Uma outra possibilidade seria a ligação simultânea de  $\text{CN}^-$  e oxigênio ao sítio binuclear de cobre, e que essa ligação modificasse o espectro de absorção na região de 340-350 nm, interferindo na transferência de carga  $\text{Cu} \rightarrow \text{O}_2$  que foi proposta como responsável pelos picos em 340 e 570 nm, originando-se de dois orbitais  $\pi^*$  diferentes do  $\text{O}_2^{2-}$  (EICKMAN et alii, 1979 e LARRABEE & SPIRO, 1980). Os resultados aqui descritos mostram claramente que tanto a cinética quanto a extensão da remoção de cobre da hemocianina pela ação de cianeto depende da presença ou ausência de ligante no sítio ativo, e confirmam os resultados anteriormente obtidos com o estudo cinético da remoção de cobre das formas oxi, desoxi e carbomoxi de hemocianinas de diferentes espécies (ZOLLA et alii, 1982). Por outro lado, se compararmos a afinidade dessas hemocianinas estudadas pelos ligantes utilizados, verificamos que hemocianinas com afinidades diferentes por um mesmo ligante comportam-se de modo semelhante em relação à cinética de remoção dos átomos de cobre, sugerindo mais uma diferença na acessibilidade ao sítio do que propriamente um efeito protetor que seria esperado se quanto maior fosse a afinidade de uma dada hemocianina por um determinado ligante, mais lenta fosse a remoção de cobre de seus sítios. Assim,  $\beta$  hemocianina de *H. pomatia* ( $P_{50} = 4$  mmHg), hemocianina de *O. vulgaris* ( $P_{50} = 156$  mmHg) e  $\beta$  hemocianina de *M. ovatus* ( $P_{50} = 7,02$  mmHg) apresentam comportamento bastante semelhante em relação à remoção de cobre em suas formas oxigenadas, apesar da diferença de afinidades pelo ligante (MANGUM, 1980 e ZOLLA et alii, 1982).

O conteúdo de cobre na hemocianina total e na  $\beta$  hemocianina revelaram-se ligeiramente diferentes, assim como a capacidade de ligação de oxigênio das duas amostras, embora, como seria esperado, em ambos os casos  $\Delta A_{344 \text{ nm}}/\mu\text{g Cu}$  fosse igual a aproximadamente 0,137, valor bastante próximo ao encontrado por KONINGS et alii, 1969, para a hemocianina de *H. pomatia* (0,140). Como já discutimos anteriormente, esses átomos de cobre devem possuir diferentes labilidades ou os sítios não são todos equivalentes, uma vez que também na apo-hemocianina existe sempre uma percentagem do cobre original (8 a 10%) que não é removida, porém não são átomos acoplados, pois desaparece totalmente o pico em 344 nm.

De acordo com os resultados dos testes serológicos, podemos verificar que a dissociação da hemocianina não provoca o aparecimento de novos grupamentos antigênicos em relação aos existentes na hemocianina não dissociada, nem modificações nesses últimos, uma vez que há identidade total nos testes efetuados com ambas as formas, tanto com antissoros específicos para a hemocianina associada quanto para a dissociada. Já no caso da remoção de cobre, aparece apenas identidade parcial nos testes com os antissoros contra ambas as formas da holoproteína. Esses resultados sugerem a participação dos átomos de cobre na manutenção de determinadas características estruturais na molécula intacta, uma vez que sua remoção causa modificações nos grupamentos antigênicos originais. Esses resultados diferem dos descritos por WOOD et alii, 1968, para a hemocianina do molusco *Murex trunculus*, que apresenta comportamento idêntico ao da apo-hemocianina tanto nos testes de dupla difusão quanto nos de imunoelektroforese. Já os trabalhos de PARISI et alii, 1962, com hemocia

nina de outro molusco, *Octopus vulgaris*, descrevem ligeira diferença nas reações de dupla difusão entre a proteína nativa e a tratada com cianeto para a remoção de cobre. Isto sugere que talvez um papel estrutural dos átomos de cobre não seja genérico para as hemocianinas dentro de um mesmo filo, mas cause em algumas espécies modificações conformacionais suficientes para afetar os sítios antigênicos, como ficou provado para a hemocianina de *M. ovatus* e *O. vulgaris*.

A dissociação da molécula de hemocianina de *M. ovatus*, embora não cause mudanças conformacionais que se evidenciem pelo aparecimento de grupamentos antigênicos adicionais, acarreta a exposição de pelo menos um grupo sulfidríla por unidade contendo um sítio ativo, a julgar pelos resultados obtidos pela titulação da hemocianina com PMB na presença e ausência de SDS (tabela II). Já a apo-hemocianina não mostra um aumento significativo de grupos tióis livres em relação à holo-proteína, o que indica, como já fora proposto por GHIRETTI-MAGALDI & NUZZOLO, 1965, que provavelmente não há resíduos de cisteína próximos ao centro ativo, capazes de participar na manutenção do cobre com ligações do tipo Cu-S. Uma outra hipótese para o papel dos grupos sulfidríla livres seria um efeito protetor dos átomos Cu(I) na deoxihemocianina e sua participação no fenômeno reversível de oxido-redução quando a desoxihemocianina, onde está presente Cu(I) passa a oxihemocianina, onde tem-se Cu(II) e vice-versa.

β hemocianina de *M. ovatus* foi utilizada no estudo das propriedades funcionais, uma vez que suas preparações mostravam-se aparentemente não contaminadas com o componente α. Com a hemolinfa total, recém coletada, foram feitas experiências de equilíbrio com oxigênio diretamente, sem modificação do pH ou adição de cátions divalentes, obtendo-se um valor de  $P_{50} = 8,2 \text{ mmHg}$

e  $n_{50} = 2,1$  em pH 8,15 aproximadamente. Esse valor de  $P_{50}$  é relativamente próximo ao obtido por KONINGS et alii, em 1969, para a hemolinfa de *H.pomatia*, onde  $P_{50} = 9,6$  mmHg em pH 8,1, embora o coeficiente de Hill nesse caso seja o dobro daquele encontrado para a hemolinfa de *M.ovatus*. Assim, ambas apresentam uma afinidade moderada pelo oxigênio nessas condições, o que aliás parece ser uma propriedade comum às hemocianinas de moluscos em geral (MANGUM, 1980). Já a cooperatividade varia bastante nas hemocianinas de diferentes classes de moluscos e mesmo entre várias espécies de gastrópodos há variações significativas. Em geral, hemocianinas de gastrópodos terrestres, quando associadas, apresentam maior cooperatividade que aquela por nós obtida para a  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus*, que se encontra mais próxima de valores encontrados para hemocianinas de cefalópodos onde  $n_{50} \approx 2$  (BONAVENTURA et alii, 1981).

Estudando-se o componente  $\beta$  purificado, verificou-se que este apresenta propriedades funcionais bastante distintas, caso esteja na forma agregada, caso se apresente dissociado. O que se observa de modo geral é que a forma dissociada não apresenta cooperatividade,  $n_{50} = 1$ . Se formos interpretar o fenômeno da cooperatividade em termos de interação homotrópica entre os sítios ligantes, deveria existir cooperatividade mesmo na molécula dissociada, pois essa dissociação não vai além de espécies contendo cerca de 8 unidades monoméricas, e portanto estão ainda presentes 8 a 9 sítios de ligação de oxigênio (BROUWER et alii, 1979). Assim, podemos supor que as interações entre esses sítios sejam negativas, ou que o fenômeno da cooperatividade esteja relacionado a uma forma de maior organização desses sítios. Se analisarmos a cooperatividade encontrada na forma associada da hemocianina de *M.ovatus*, verificamos que os valores de  $n_{50}$  sempre

próximos a 2, são bem inferiores aos descritos para hemocianinas de outras espécies da mesma classe (MANGUM, 1980). Por outro lado, a  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus* apresenta uma afinidade pelo oxigênio maior do que as demais hemocianinas de gastrópodos (KONINGS et alii, 1969; KLARMAN et alii, 1975 e WOOD et alii, 1977), o que sugere a necessidade de um estado de baixa afinidade como condição para a existência de cooperatividade. Assim, hemocianinas que se encontram na forma T segundo o modelo M.W.C. (WYMAN, 1964), apresentam cooperatividade somente ao passar para a forma R e condições não favoráveis à forma T, tenderiam a provocar uma diminuição na intensidade desse fenômeno. Uma outra hipótese seria considerar a cooperatividade independente da interação entre os sítios de ligação mesmo nas formas moleculares mais organizadas, mas dependente do fenômeno da dissociação em sítios. Assim, como foi descrito que a oxigenação de várias hemocianinas leva à dissociação da molécula (Van DRIEL & Van BRUGGEN, 1974 e KLARMAN et alii, 1975) e as formas dissociadas apresentam maior afinidade pelo oxigênio do que as formas não dissociadas, como ocorre na  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus*, poderíamos supor que as moléculas associadas estivessem na forma T, enquanto que à medida em que ocorresse a oxigenação e concomitantemente a dissociação, essas passassem à forma R. Esse fenômeno então seria tão mais evidente quanto maior fosse a diferença de afinidade entre ambas as formas, associada e dissociada e estaria relacionado intimamente às condições experimentais que levando à estabilização de uma ou de outra forma, induziriam mudanças na cooperatividade. Como as condições em que realizamos o estudo de equilíbrio com oxigênio em cada uma das formas, associada ou dissociada, foram sempre constantes, não houve possibilidade de demonstrar essa hipótese,

embora os resultados obtidos possam sugerir tal possibilidade.

Um outro aspecto interessante é a diferença encontrada quanto à influência da concentração hidrogeniônica na afinidade pelo oxigênio das formas associada e dissociada da  $\beta$  hemocianina de *M.ovatus*. Os valores do efeito Bohr, calculados pela relação  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ , foram 0,18 para a forma associada e 0,03 para a forma dissociada na região fisiológica de pH 7,5 a 8,5. Verificamos que embora ambas as formas apresentem efeito Bohr reverso, este é quase desprezível na forma dissociada. Se realmente ocorre com a hemocianina de *M.ovatus* o mesmo fenômeno de dissociação decorrente da oxigenação conforme discutido anteriormente, o efeito Bohr para essa hemocianina não possui significado fisiológico, isto é, mesmo com a variação do pH da hemolinfa, a capacidade de liberação de oxigênio da hemocianina permanece inalterada. Como esses animais hibernam retraídos em suas conchas, em condições em que diminui a aeração e a pressão de  $\text{CO}_2$  aumenta com concomitante aumento na concentração hidrogeniônica, somados os dois efeitos verificamos que pode-se tratar de um mecanismo de adaptação fisiológica. A representação gráfica do efeito Bohr reverso apresenta uma tangente positiva, indicando uma diminuição no valor de  $P_{50}$  com o decréscimo em pH. Desta forma a curva de dissociação sofrerá um desvio para a esquerda, favorecendo a ligação de oxigênio à hemocianina. Como consequência, o conteúdo de oxigênio do sangue arterial, pode permanecer constante quando  $\text{PO}_2$  do sangue cai, desde que haja um decréscimo simultâneo no pH. O significado fisiológico da hemocianina apresentar um efeito Bohr reverso é pouco explicado, tendo sido descrito na hemocianina de *L. polyphemus* (HOGBEN & PINHEY, 1927 e REDFIELD & INGALLS, 1933), na de *B. canaliculatum* (REDFIELD et alii, 1929 e REDFIELD &



INGALLS, 1932) e na de *H.pomatia* (HOGBEN & PINHEY, 1927 e WOLVE KAMP & KERSTEN, 1934). Já em 1934, FLORKIN sugeria que o efeito Bohr em gastrópodos estava relacionado ao fato do animal recolher-se em sua concha e então ainda ser possível uma extração adicional de oxigênio a partir de água retida na cavidade do manto. Isso porém só se aplicaria a gastrópodos aquáticos, e não aos terrestres como *M.ovatus*.

Uma outra tentativa mais recente de explicação da utilidade do efeito Bohr, foi proposta por JOHANSEN & PETERSEN, 1975 e MANGUM et alii, 1975, a partir de experiências com *Limulus polyphemus*. Quando o animal se enterra, demonstrou-se que a ventilação era reduzida resultando em uma acidose respiratória, deslocando a curva de dissociação do oxigênio para a esquerda. Esse deslocamento, melhoraria a oxigenação da hemocianina em maior grau do que reduziria a liberação de oxigênio, causando um rendimento positivo no transporte de oxigênio.

Na hemocianina de *M.ovatus* entretando, não estamos considerando as propriedades da  $\alpha$  hemocianina presente, que pode diferir funcionalmente do componente  $\beta$ , como é o caso da hemocianina de *H.pomatia* (KONINGS et alii, 1969) e uma discussão mais ampla só será possível quando esses dados forem obtidos. Também a influência que íons normalmente presentes na hemolinfa de *M.ovatus* possam ter sobre as propriedades funcionais de sua hemocianina, deve ser considerada, embora no caso de gastrópodos terrestres a variação da concentração desses íons não deva ser tão intensa quanto a que ocorre em espécies marinhas e de água doce (MANGUM, 1980) onde sua influência não pode ser desprezada. De qualquer forma, dados de literatura para a hemolinfa de *H.pomatia* mostram uma concentração em íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  de aproximada-

mente 12 mM e 7 mM respectivamente, e portanto trabalhando em concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM, estaríamos dentro das condições de força iônica promovidas pela presença desses cátions divalentes.

Os resultados aqui descritos para a hemocianina de *M.ovatus* mostraram que do ponto de vista estrutural esta se assemelha às hemocianinas descritas para outras espécies de gastrópodos e a eletroforese em poliacrilamida na presença de SDS sugere a existência de três componentes, fato até hoje só descrito para a hemocianina de *H.pomatia* (GIELENS et alii, 1981), embora não tenha sido possível a obtenção ou caracterização de uma fração  $\beta\text{c}$ . Em relação às propriedades funcionais, ambas as formas, associada e dissociada, apresentam maior afinidade pelo oxigênio na faixa de pH estudada, do que as hemocianinas de outros dois gastrópodos terrestres, *H.pomatia* e *L.hierosolima* (KONINGS et alii, 1969 e Er-EL et alii, 1972), enquanto os valores obtidos para o coeficiente de Hill assemelham-se mais aos descritos para hemocianinas de cefalópodos que para as de gastrópodos.

Assim, além do interesse intrínseco que as hemocianinas representam para zoologistas e bioquímicos e fisiologistas comparativos, podemos tomá-las como base para a proposição de modelos no estudo da relação estrutura-função de outros sistemas que apresentem várias subunidades, propriedades alostéricas e fenômenos de agregação e dissociação.

## RESUMO

A hemocianina do gastrópodo terrestre *Megalobulimus ovatus* foi purificada e determinou-se a existência de pelo menos dois componentes distintos,  $\alpha$  hemocianina (71,5% da hemocianina total) que se dissocia em presença de NaCl 1 M e  $\beta$  hemocianina (28,5% da hemocianina total) que permanece associada nessas mesmas condições.

O componente  $\beta$  foi purificado por sedimentação em ultracentrífuga em solução de sacarose 1 M contendo NaCl 1 M e algumas das suas propriedades funcionais e estruturais foram estudadas. Verificou-se que essa hemocianina é uma glicoproteína que possui cerca de 7% em carboidratos, apresenta apenas um grupo sulfidril por unidade funcional, e este número não se modifica com a remoção de cobre do sítio ativo.

A análise por microscopia eletrônica mostrou um padrão semelhante às hemocianinas de outros gastrópodos, apresentando moléculas cilíndricas com 30 nm de diâmetro e 35 nm de altura. Estudou-se a região de estabilidade da molécula associada e a influência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  na dissociação da proteína, verificando-se a existência de quatro espécies, uma associada (109 S), uma segunda correspondendo a 1/2 (65,5 S) da espécie anterior, outra sendo 1/10 (22 S) da forma associada e a última, 1/20 (13 S) da molécula original. Verificou-se que a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  20 mM, previne a dissociação além da espécie 65,5 S em pH até 9,5.

Foram preparados antissoros contra as formas associada (109 S) e dissociada (13 S), não tendo sido observada modificações nos grupamentos antigênicos. Já a apo-hemocianina apresenta apenas identidade parcial com a holo-proteína a julgar pelos testes de imuno-difusão em agar, indicando um possível papel estrutural desempenhado pelos átomos de cobre. O efeito da presença do ligante  $O_2$  no sítio de ligação em relação à velocidade de remoção dos átomos de cobre por cianeto foi estudado, verificando-se uma proteção contra essa remoção nos primeiros 30 minutos de incubação das formas oxí e desoxihemocianina. Do ponto de vista funcional, a hemolinfa total apresentou  $P_{50} = 8,2$  mm Hg e  $n_{50} = 2,1$  em pH 8,1. As formas associada e dissociada da  $\beta$  hemocianina purificada, nesse mesmo pH, apresentaram  $P_{50} = 7,02$  mmHg  $n_{50} = 1,7$  e  $P_{50} = 2,80$  mmHg;  $n_{50} = 0,9$  respectivamente. Em toda a faixa de pH estudada, a forma dissociada apresentou-se não cooperativa ( $n_{50} \approx 1$ ) e com afinidade pelo oxigênio sempre maior que a de forma associada, apresentando efeito Bohr reverso muito maior no caso da molécula associada (0,18) que no da dissociada (0,03) na região de pH 7,5 a 8,5.

## SUMMARY

The hemocyanin from *Megalobulimus ovatus*, gastropod of terrestrial habitat, was purified. It was shown the presence of at least two components,  $\alpha$  hemocyanin (71.5% of total hemocyanin), which dissociates in 1 M NaCl solution and  $\beta$  hemocyanin (28.5% of total hemocyanin) which remains intact in the same conditions.

$\beta$  hemocyanin was isolated by preparative ultracentrifugation in 1M sucrose solution containing 1 M NaCl, and some of its functional and structural properties were analysed. This hemocyanin was a glycoprotein containing about 7% in carbohydrates, showed only one sulphhydryl group per functional subunit and this number remains after the copper removal.

Electron microscopy revealed a pattern quite similar to the hemocyanins from other gastropods, presenting cylindrical molecules with a diameter of 30 nm and 35 nm high. The stability region of the undissociated molecule was determined, and the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^{+}$  ions on the protein dissociation was studied. Four different species were found; 109 S, corresponding to the undissociated molecule; 65.5 S, corresponding to dissociation into halves; 22 S, corresponding to 1/10 molecules, and 13 S, the last degree of dissociation achieved, corresponding to 1/20 of the original molecule. The presence of 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  prevents the dissociation beyond the 65.5 S species up to pH 9.5.

Antisera against the whole (109 S) and the dissociated (13 S) species were obtained, double immunodiffusion tests were performed, and no antigenic difference could be observed. The apo-hemocyanin, however, showed only partial identity with the holo-protein, suggesting a possible structural role played by the copper atoms. The presence of oxygen in the binding site showed a protection effect on copper removal by cyanide, at the beginning of the reaction, when comparing oxy and deoxy-hemocyanins. The total hemolymph presented  $P_{50}=8.2$  mmHg and  $n_{50}= 2.1$  at pH 8.1. The undissociated and dissociated purified  $\beta$  hemocyanin, at this same pH, presented  $P_{50}=7.02$  mmHg,  $n_{50}= 1.7$  and  $P_{50}= 2.80$  mmHg,  $n_{50}= 0.9$  respectively. Throughout the studied pH, the dissociated hemocyanin showed to be non cooperative ( $n_{50}=1$ ) and its oxygen affinity was always higher than the whole hemocyanin. This showed a reverse Bohr effect of 0.18, six times greater than that found for the dissociated molecule in the pH region 7.5 to 8.5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, LUCIA P.S. Propriedades funcionais das formas associada e dissociada da hemocianina de *Megalobulimulus ovatus*. Resumos da 34a Reunião Anual da SBPC - 34: 867, 1982.
- AIROLDI, LUCIA P.S., BERIAM, L.O.S., OLIVEIRA, A.R. & GASPAR, J.O. Hemocyanin of the brazilian snail *Megalobulimulus ovatus*: functional and structural aspects. Life Chemistry Reports, em impressão, 1982.
- ALBEN, J.O., YEN, F.L. & FARRIER, N.J. Infrared studies of carbon monoxide bound to hemocyanin and to simple copper complexes. J.Am.Chem.Soc., 92: 4475-4476, 1970.
- ALBERGONI, V., CASSINI, A. & SALVATO, B. The carbohydrate portions of hemocyanin from *Octopus vulgaris*. Comp.Biochem. Physiol., 41B: 445-451, 1972.
- AMUNDSEN, A.R., WHELAN, J. & BOSNICH, B. Biological analogues. On the nature of the binding sites of copper-containing proteins. J.Am.Chem.Soc., 99: 6730-6739, 1977.
- ANGERSBACH, D. Oxygen pressures in haemolymph and various tissues of the tarantula, *Eurypelma helluo*. J.Comp. Physiol., 98: 133-145, 1975a.
- ANGERSBACH, D. Die sauerstoffversorgung der Gewebe zweier Spinnen. *Eurypelma helluo* und *Cupennius salei*: lokale  $pO_2$  Messungen in der Hämolymphe und verschiedenen Muskeln. Verh.Deutsch.Zool. Ges., 67: 277-280, 1975b.
- ANGERSBACH, D. Oxygen transport in the blood of the tarantula *Eurypelma californicum*:  $pO_2$  and pH during rest, activity and recovery. J.Comp.Physiol., 123: 113-125, 1978.

- ANTONINI E. & CHIANCONE EMILIA. Assembly of multisubunit respiratory proteins. Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 6: 239-271, 1977.
- ARISAKA, F. & Van HOLDE, K.E. Allosteric properties and the association equilibria of hemocyanin from *Callinassa californiensis*. J.Mol.Biol., 134: 41-73, 1979.
- BAYER, E. & FIEDLER, H. Aufbau und Spezifität des Hämocyanins. Annalen., 653: 149-156, 1962.
- BERT, P. Sur le physiologie de la Seiche (*Sepia officinalis L.*) C.r.hebd.Séanc.Acad.Sci. Paris, 65: 300-303, 1867.
- BONAVENTURA CELIA, SULLIVAN, B., BONAVENTURA, J. & BOURNE, S. CO binding by hemocyanins of *Limulus polyphemus*, *Busycon carica* and *Callinectes sapidus*. Biochemistry, 13: 4784-4789, 1974.
- BONAVENTURA, J., BONAVENTURA CELIA & SULLIVAN, B. Properties of oxygen-binding domains isolated from subtilisin digests of six molluscan hemocyanins. Em J.V.Bannister (ed.), Structure and Function of Haemocyanins. Springer-Verlag, Berlin, p.206-216. 1977a.
- BONAVENTURA, J., BONAVENTURA CELIA & SULLIVAN, B. Non-heme oxygen transport. Em F.Jobsis (ed.) Oxygen and physiological function. Professional Information Library, Dallas, Texas, p.177-220, 1977b.
- BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA CELIA. Hemocyanins: Relationships in Their Structure, Function and Assembly. Amer.Zool., 20: 7-17, 1980.
- BONAVENTURA CELIA, BONAVENTURA, J. MILLER, K.I. & Van HOLDE, K.E. Hemocyanin of the Chambered nautilus: Structure-function relationships. Arch.Biochem.Biophys., 211:589-598, 1981.



- BOYER, P.D. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulphhydryl groups with organic mercurials. J. Am. Chem. Soc., 76: 4331-4337, 1954.
- BRIDGES, C.R., BICUDO, J.E.P.W. & LYKKBOE, G. Oxygen content measurement in blood containing haemocyanin. Comp. Biochem. Physiol., 62A: 457-462, 1979.
- BRIX, O., LYKKBOE, G. & JOHANSEN, K. Reversed Bohr and Root shifts in hemocyanin of the marine prosobranch *Buccinum undatum*: Adaptations to periodically hypoxic habitat. J. Comp. Physiol., 129: 97-103, 1979.
- BROHULT, S. Hemocyanins of the gastropods. J. Phys. Colloid Chem., 51: 206-217, 1947.
- BROUWER, M. & KUIPER, H.A. Molecular weight analysis of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin in guanidine hydrochloride, urea and SDS. Eur. J. Biochem., 35: 408-435, 1973.
- BROUWER, M., WOLTERS, M. & Van BRUGGEN, F.J. Proteolytic fragmentation of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin structural domains in the polypeptide chain. Biochemistry, 15: 2618-2623, 1976.
- BROUWER, M., BONAVENTURA CELIA & BONAVENTURA, J. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin the shrimp, *Penaeus setiferus*. Biochemistry, 17: 2148-2154, 1978a.
- BROUWER, M., RYAN MARGARET, BONAVENTURA J. & BONAVENTURA CELIA. Functional and structural properties of *Murex fulvescens* hemocyanin: Isolation of two different subunits required for reassociation of a molluscan hemocyanin. Biochemistry, 17: 2810-2815, 1978b.
- BROUWER, M., WOLTERS, M. & Van BRUGGEN, E.F.J. Proteolytic fragmentation of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin: Isolation of a functionally active chemically pure domain and evidence for subunit heterogeneity. Arch. Biochem. Biophys., 193: 487-495, 1979.

BROUWER, M., BONAVENTURA CELIA & BONAVENTURA, J. Effect of oxygen and allosteric effectors on structural stability of oligomeric hemocyanins of the arthropod *Limulus polyphemus* and the mollusc *Helix pomatia*. Biochemistry, 20, 1842-1848 1981.

BROWN, J.M., POWERS, L., KINCAID, B., LARRABEE, J.A. & SPIRO; T.G. Structural studies of the hemocyanin active site. 1. Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) analysis. J.Am.Chem.Soc., 102: 4210-4216, 1980.

BRUNORI, M., ZOLLA, L., KUIPER, H.A. & FINAZZI-AGRÒ. Reaction of carbon monoxide with hemocyanin: stereochemical effects of a non-bridging ligand. J.Mol.Biol., 153: 1111-1123, 1981.

BRUNORI, M., ZOLLA, L., DECKER, H. & LINZEN, B. Reaction of *Eurypelma californicum* haemocyanins with oxygen and carbon monoxide: kinetic aspects. Life Chemistry Reports. em impressão, 1982a.

BRUNORI, M., GIARDINA, B. & KUIPER, H.A. Oxygen-transport proteins. Em Inorganic Biochemistry, vol.3. Specialist Periodical Reports of the Royal Society of Chemistry, London, p.166-182, 1982b.

CARPENTER, D.E. & Van HOLDE, K.E. Amino acid composition, amino-terminal analysis and subunits structure of *Cancer magister* hemocyanin. Biochemistry, 12: 2231-2238, 1973.

CHAIX, J.C., MARVALDI, J. & SECCHI, J. Variations of ecdysone titer and hemolymph major proteins during the molt cycle of the spider crab *Acanthonyx lunulatus*. Comp.Biochem.Physiol. 69B: 709-714, 1981.

CHANGEUX, J.P., THIÉRY, J., TUNG, Y. & KITTEL, C. On the cooperativity of biological membranes. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 57: 335-341, 1967.

5519

- CHANTLER, E.N., HARRIS, R.R. & BANNISTER, W.H. Oxygenation and aggregation properties of haemocyanin from *Carcinus mediterraneus* and *Potamon edulis*. Comp.Biochem.Physiol., 46A: 333-343, 1973.
- CO, M.S. & HODGSON, K.O. Copper site of deoxyhemocyanin. Structural evidence from X-ray absorption spectroscopy. J.Am.Chem.Soc., 103: 3200-3201, 1981.
- CO, M.S., HODGSON, K.O., ECLES, T.K. & LONTIE, R. Copper site of molluscan oxyhemocyanins. Structural evidence from X-ray absorption spectroscopy. J.Am.Chem.Soc., 103: 984-986, 1981.
- COLOSIMO, A., BRUNORI, M. & WYMAN, J. Concerted changes in an allosteric macromolecule. Biophys.Chem., 2: 338-344, 1974.
- CONDIE, R.M. & LANGER, R.B. Linear polymerization of a gastropod hemocyanin. Science, 144: 1138-1140, 1964.
- DECLAIR, W. Studie von de eiwitten uit het bloed van *Cancer pagurus*. Arch.Intern.Physiol.Biochim., 76: 368-373, 1968.
- De PHILLIPS, H.A.Jr., NICKERSON, K.W. & Van HOLDE, K.E. Oxygen binding and subunit equilibria of *Busycon* hemocyanin. J.Mol.Biol., 50: 471-479, 1970.
- DIJK, J., BROUWER, M., COERT, A. & GRUBER, M. Structure and function of hemocyanins. VII. The smallest subunit of  $\alpha$  and  $\beta$ -hemocyanin of *Helix pomatia*: Size, composition, N- and C-terminal amino acids. Biochim.Biophys.Acta, 221: 467-479, 1970.
- DOOLEY, D.M., SCOTT, R.A., ELLINGHAUS, J., SOLOMON, E.J. & GRAY, H.B. Magnetic susceptibility studies of laccase and oxyhemocyanin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75: 3019-3022, 1978.
- DOOLEY, D.M., DAWSON, J.H. STEPHENS, P.J. & GRAY, H.B. Spectroscopic studies of ascorbate oxidase. Electronic structure of the blue copper sites. Biochemistry, 20: 2024-2028, 1981.

- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28: 350-356, 1956.
- DUCHATEAU, G. & FLORKIN, M. La coagulation du sang des arthropodes IV- Sur le fibrinogène et sur la "coaguline" musculaire du homard. Bull.Soc.Chim.Biol., 36: 295-305, 1954.
- EICKMAN, NANCY, HIMMELWRIGHT, R.S. & SOLOMON, F.I. Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: Spectral and chemical correlations to met, apo, half met, met, and dimer active sites. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 76: 2094-2098, 1979.
- ELLIOT, J.E. & Van BAELEN, H. Poids moléculaires et zone de stabilité de l'hémocyanine de *Pila leopoldvillensis*. Bull.Soc.Chim.Biol., 47: 1979-1986, 1965.
- ELSON, L.A. & MORGAN, W.T.J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem.J., 61: 586-591, 1955.
- ENGELBORGHES, Y., WITTERS, R. & LONTIE, R. Photooxidation of *Helix pomatia* haemocyanin. Arch.Intern.Physiol.Biochem., 76: 372-373, 1968.
- ENGELBORGHES, Y. & LONTIE, R. Dissociation of *Helix pomatia* haemocyanin under the influence of alkali salts. J.Mol. Biol., 77: 577-587, 1973.
- ER-EL, Z., SHAKLAI, N. & DANIEL, E. Oxygen binding properties of haemocyanin from *Levantina hierosolima*. J.Mol.Biol., 64: 341-352, 1972.
- ERIKSSON-QUENSEL, J.B. & SVEDBERG, T. The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. Biol.Bull., 71: 498-547, 1936.
- FAGER, L.Y. & ALBEN, J.O. Structure of the carbon monoxide binding site of hemocyanins studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry, 11: 4786-4792, 1972.

- FEE, J.A. Copper proteins - Systems containing the "Blue" copper center. Em Structure and Bonding, vol.23 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p.1-60, 1975.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H., Van BRUGGEN, E.F.J. & OHTSUKI, M. Macromolecular organization of hemocyanins and apohemocyanins as revealed by electron microscopy. J.Mol.Biol.,16: 191-207, 1966.
- FESENFELD, G. The binding of copper by hemocyanin. J.Cell. Comp.Physiol.,43: 23-38, 1954.
- FIELDER, D.R., RANGA RAO, K. & FINGERMAN, M. A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis. Comp.Biochem.Physiol. 39B, 291-297, 1971.
- FLORKIN, M. La fonction respiratoire du "milieu intérieur" dans la série animale. Ann.Physiol.Physiochim.Biol.,10: 599-694, 1934.
- FRÉDÉRICQ, L. Sur l'hémocyanine, substance nouvelle due sang de Poulpe (*Octopus vulgaris*). C.R.Acad.Sci. Paris, 87: 996-998, 1878.
- FREEDMAN, I.B., LOEHR, J.S. & LOEHER, T.M. A resonance Raman study of the copper protein, hemocyanin. New evidence for the structure of the oxygen-binding site. J.Am.Chem.Soc., 98: 2809-2815, 1976.
- FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv.Fortschr.Tuberkforsch, 7: 130-147, 1956.
- FRIEDEN, E., OSAKI, S. & KOBAYASHI, H. Copper proteins and oxygen. Correlations between structure and function of the copper oxidases. J.Gen.Physiol.,49: 213-252, 1965.

- GHIRETTI, F. Hemerythrin and hemocyanin. Em O.Hayaishi (ed.) The Oxygenases. Academic Press, New York, p.517-553, 1962.
- GHIRETTI, F. Molluscan hemocyanins. Em K.M.Wilbur & C.M.Yonge (eds.) Physiology of Mollusca, vol.II, Academic Press, New York, p.233-248, 1966.
- GHIRETTI-MAGALDI ANNA & NARDI, G. Preparation of copper-free hemocyanin and its reconstitution in *Octopus vulgaris*. Em H.Peeters (ed.) Protides in Biological Fluids. Elsevier, Amsterdam, p.507-509, 1964.
- GHIRETTI-MAGALDI ANNA & NUZZOLO, C. Thiol groups in hemocyanins. Comp.Biochem.Physiol.,16: 249-252, 1965.
- GHIRETTI-MAGALDI ANNA, NUZZOLO, C. & GHIRETTI, F. Chemical studies on hemocyanins - I. Amino acid composition. Biochemistry, 5: 1943-1951, 1966.
- GHIRETTI-MAGALDI ANNA, SALVATO, B., TALLANDINI, L. & BELTRAMINI, M. The hemocyanin of *Aplysia limacina*: Chemical and functional characterization. Comp.Biochem.Physiol.,62A: 579-584, 1979.
- GIELENS, C., PRÉAUX GISELE & LONTIE, R. Isolation of the smallest functional subunit of *Helix pomatia* haemocyanin. Arch.Int.Physiol.Biochim.,81: 182-183, 1973.
- GIELENS, C., PREAUX GISELE & LONTIE, R. Limited trypsinolysis of  $\beta$ -hemocyanin of *Helix pomatia*. Eur.J.Biochem., 60: 271-280, 1975.
- GIELENS, C., PRÉAUX GISELE & LONTIE, R. Immunological and electrophoretic comparison of the haemocyanins of *Helix pomatia*. Arch.Int.Physiol.Biochim.,87: 412-414, 1979.

- GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PRÉAUX GISELE & LONTIE, R.  
Fragmentation of crystalline  $\beta$ -haemocyanin of *Helix pomatia*  
with plasmin and trypsin. Location of the fragments in the  
polypeptide chain. Eur.J.Biochem., 103: 463-470, 1980.
- GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PRÉAUX GISELE & LONTIE, R.  
Gel chromatographic separation of the haemocyanins of  
*Helix pomatia*. Further electrophoretic and immunological  
characterization of the components. Comp.Biochem.Physiol.,  
69B: 455-462, 1981.
- GRUBER, M. Structure and function of *Helix pomatia* haemocyanin.  
Em. F.Ghiretti (ed.) Physiology and Biochemistry of Haemocyanins.  
Academic Press, New York, p.49-59, 1968.
- GULLICK, W.J., HERRIES, D.G. & WOOD, E.J. Characterization of  
domains obtained from a mollusc haemocyanin by limited  
proteolytic digestion. Biochem.J., 179: 593-602, 1979.
- HALL, R.L., PEARSON, J.S. & WOOD, E.J. The hemocyanin of  
*Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda. Pulmonata). Comp.Biochem.  
Physiol., 52B: 211-218, 1975.
- HAMLIN, L.M. & FISH, W.W. The subunit characterization of  
*Callinectes sapidus* hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta,  
491: 46-52, 1977.
- HEIRWEGH, K., BORGINON, H. & LONTIE, R. Separation and  
absorption spectra of  $\alpha$ - and  $\beta$ -hemocyanin of *Helix pomatia*.  
Biochim.Biophys.Acta, 48: 517-526, 1961.
- HEPP, A.F., HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN NANCY & SOLOMON, E.I.  
Ligand displacement reactions of oxyhemocyanin: Comparison  
of reactivities of arthropods and molluscs. Biochem.Biophys.  
-Res.Commun., 89: 1050-1057, 1979.
- HERSKOVITS, T.T., SAN GEORGE, R.C. & ERKUNMWUNSEE, L.J.  
Light-Scattering investigation of the subunit dissociation  
of *Homarus americanus* hemocyanin. Effects of salts and ureas.  
Biochemistry, 20: 2580-2587, 1981.

- HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN NANCY C. & SOLOMON, E.I. Preparation and characterization of met apo hemocynin: a single copper(II) active site. Biochem.Biophys.Res.Comm. 81:243-247, 1978.
- HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN NANCY C., LUBIEN CYNTHIA D. & SOLOMON, E.I. Chemical and spectroscopic comparison of the binuclear copper active site of mollusc and arthropod hemocyanins. J.Am.Chem.Soc.,102: 5378-5388, 1980.
- HOGBEN, L.I. & PINHEY, K.F. Some observations on the hemocyanin of *Limulus*. J.Exp.Biol.Lond.,5:55-66, 1927.
- IMAIZUMI, K., IMAI, K. & TYUMA, I. The linkage between the four-step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin. J.Biochem.,86: 1829-1840, 1979.
- JOHANSEN, K. & LENFANT, C. Gas exchange in the cephalopod *Octopus dofleini*. Amer.J.Physiol.,210: 901-918, 1966.
- JOHANSEN, K., REDMOND, J.R. & BOURNE, G.B. Respiratory exchange and transport of oxygen in *Nautilus pompilius*. J.Exp.Zool.,205: 27-36, 1978.
- JOHANSEN, K. & PETERSEN, J.A. Respiratory adaptations in *Limulus polyphemus* (L.). Em F.J.Vernberg (ed.) Physiological ecology of estuarine organisms. Univ.of South Carolina Press, Columbia, SC, p.129-145, 1975.
- JOHNSON, M. & YPHANTIS, D. Subunit association and heterogeneity of *Limulus polyphemus* hemocyanin. Biochemistry,17: 1448-1455, 1978.
- JOHNSTON, E., JAMES, T.W. & BARBER, A.A. Oxygen binding characteristics of lobster hemocyanin and its subunits. Comp.Biochem.Physiol.,22: 261-271, 1967.



- JOLLÈS, J., JOLLÈS, P., LAMY JOSETTE & LAMY, J. Structural characterization of seven different subunits in *Androctonus australis* haemocyanin. FEBS Letters, 106: 289-291, 1979.
- KILMARTIN, J.V. & ROSSI-BERNARDI, L. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates. Physiol.Rev., 53: 836-890, 1973.
- KINO, J., SUZUKI, S., MORI, W. & NAKAHARA, A. Is phenolate oxygen of a tyrosine residue the bridging ligand at the binuclear copper site in oxyhemocyanin ? Inorg.Chim.Acta, 56: L 33-34, 1981.
- KLARMAN, A., SHAKLAI, N. & DANIEL E. Oxygen binding by hemocyanin from *Levantina hierosolima* I. Exclusion of subunit interactions as a basis for cooperativity. Biochemistry, 14:102-104, 1975.
- KLARMAN, A. & DANIEL, E. Oxygen binding properties of stripped (calcium ion and magnesium ion free) hemocyanin from the scorpion *Leirus quinquestriatus*. Biochemistry, 19:5176-5180, 1980.
- KLOTZ, I.M. & KLOTZ, T.A. Oxygen-carrying proteins:a comparison of the oxygenation reaction in hemocyanin and hemerythrin with that in hemoglobin. Science, 121:477-480, 1955.
- KOBERT, R. Über Hemocyanin nebst einigen Notizen über Hamerythrin. Plüger's Arch., 98: 411-427, 1903.
- KONINGS, W.N., Van DRIEL, R., Van BRUGGEN, E.F.J. & GRUBER, M. Structure and properties of hemocyanins V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta, 194: 55-66, 1969.
- KONINGS, W.N. Ph.D. thesis, Groningen, 1969. Citado por Van HOLDE & Van BRUGGEN, 1971.

- KUIPER, H.A., GAASTRA, W., BEINTEMA, J.J., Van BRUGGEN, E.F.J. SHEPMAN, A.M.H. & DRENTH, J. Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of *Panulirus interruptus* hemocyanin. J.Mol.Biol., 99:619-629, 1975.
- KUIPER, H.A., TORENSMA, R. & Van BRUGGEN, E.F.J. Binding of carbon monoxide to  $\alpha$ -hemocyanin and  $\beta$ -hemocyanin from *Helix pomatia*. Eur.J.Biochem., 68: 425-430, 1976.
- KUIPER, H.A., FORLANI, L., CHIANCONE EMILIA, ANTONINI, E., BRUNORI, M. & WYMAN, J. Multiple linkage in *Panulirus interruptus* hemocyanin. Biochemistry, 18:5849-5855, 1979.
- KUIPER, H.A., COLETTA, M., ZOLLA, L., CHIANCONE EMILIA & BRUNORI, M. Root effect of *Panulirus interruptus* hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta, 626:412-416, 1980a.
- KUIPER, H.A., ZOLLA, L., BRUNORI, M. & FINAZZI-AGRÒ, A. Luminescence of carbon monoxide hemocyanins. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77: 2387-2389, 1980b.
- LAMY JOSETTE, LAMY, J., WEILL, J., BONAVENTURA CELIA, BONAVENTURA, J. & BRENOWRITZ, M. Immunological correlates between the multiple hemocyanin subunits of *Limulus polyphemus* and *Tachypleus tridentatus*. Arch.Biochem.Biophys, 196: 324-339, 1979.
- LAMY JOSETTE, LAMY, J., LECLERC, M., SIZARET, P.Y. & WEILL, J. Intramolecular location of the subunits of *Androctonus australis* hemocyanin. FEBS Letters, 112: 45-47, 1980.
- LARRABEE, J.A. & SPIRO, T.G. Structural studies of the hemocyanin active site. . Resonance Raman Spectroscopy. J.Am.Chem.Soc., 102: 4217-4223, 1980.

- LARSON, B.A., TERWILLIGER NORA & TERWILLIGER, R.C. Subunit heterogeneity of cancer magister hemocyanin. Biochim. Biophys. Acta, 667: 294-302, 1981.
- LEE, Y.C. & MONTGOMERY, R. Determination of hexosamines. Arch. Biochem. Biophys., 93: 292-296, 1961.
- LEITE, A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. Summa Phytopathologica, 1: 143-146, 1975.
- LEME, J.L.M. Anatomy and systematics of the neotropical-Strophocheiloidea (Gastropoda, Pultomata) with the description of a new family. Arq. Zool., São Paulo, 23:295-337, 1973.
- LOEHR; J.S., FREEDMAN TERESA, B. & LOEHR, T.M. Oxygen binding to hemocyanin: a resonance Raman spectroscopic study. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56:510-515, 1974.
- LOEWE, R. & LINZEN, B. Haemocyanins in spiders. II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of  $Mg^{2+}$  on  $O_2$  affinity, cooperativity, and subunit association of *Cupiennius salei* haemocyanin. J. Comp. Physiol., 98:147-156, 1975.
- LONTIE, R. The binding of copper in haemocyanin. Clin. Chim. Acta, 3: 68-71, 1958.
- LONTIE, R., BLATON, V., ALBERT, M. & PEETERS, B. Reconstitution of *Helix pomatia* haemocyanin with the copper(I) acetonitrile complex. Arch. Intern. Physiol. Biochim., 73:150-157, 1965.
- LONTIE, R. & WITTERS, R. *Helix pomatia* hemocyanins. Em J. Peisach P. Aisen and W.E. Blumberg (eds.) The Biochemistry of Copper. Academic Press, New York, p.455-463, 1966.
- LONTIE, R., DELEY, M., ROBBERECHT, H. & WITTERS, R. Isolation of small functional subunits of *Helix pomatia* hemocyanin after subtilisin treatment. Nature, 242:180-182, 1973.

- LONTIE, R. & WITTERS, R. Hemocyanin. Em G.L.Eichorn (ed.) Inorganic Biochemistry. vol.I Elsevier, Amsterdam p.344-358, 1973.
- LONTIE, R. & VANQUICKENBORNE, L. Em H.Sigel (ed.) Metal Ions in Biological Systems. vol.3, Marcel Dekker, Inc. New York p.185-200, 1974.
- LONTIE, R. Components, functional units and active sites of *Helix pomatia* haemocyanin. Life Chemistry Reports, em impressão, 1982.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-275, 1951.
- LUSTIG, B., ERNST, T. & REUSS, E. Die Zusammensetzung des Blutes von *Helix pomatia* bei Sommer-und Winter-Tieren. Bioch.Z., 290: 95-98, 1937.
- MALLEY, A., SAHA, A. & HALLIDAY, W.J. Immunochemical studies of haemocyanins from the giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*) and the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). J.Immunol., 95:141-147, 1965.
- MANGUM CHARLOTTE.P.The function of respiratory pigments in estuarine animals. Em M.L.Wiley(ed.) Estuarine processes. vol.I, Academic Press, New York, p.356-380, 1976.
- MANGUM CHARLOTTE P. Respiratory function of the hemocyanins. Amer.Zool., 20: 19-38, 1980.
- MANGUM CHARLOITE, P., FREADMAN, M.A. & JOHANSEN, K. The quantitative role of hemocyanin in aerobic respiration of *Limulus polyphemus*. J.Exp.Zool., 191: 279-285, 1975.
- McKEE, V., DAGDIGIAN, J.V., BAU, R. & REED, C.A. Copper(II) hemocyanin models. J.Am.Chem.Soc., 103: 7000-7001, 1981.

- McMAHON, B.R. & WILKENS, J.L. Periodic respiratory and circulatory performance in the red rock crab, *Cancer productus*. J.Exp.Zool., 202, 363-374, 1977.
- McMAHON, B.R., BUTLER, P.G. & TAYLOR, E.W. Acid-base changes during recovery from disturbance and during long term hypoxic exposure in the lobster *Homarus vulgaris*. J.Exp.Zool., 205: 361-370, 1978.
- MELLEMA, J.E. & KLUG, A. Quaternary structure of gastropod haemocyanin. Nature, 239: 146-150, 1972.
- MOORE, C.H., HENDERSON, R.W. & NICHOL, L.W. An examination of the polymerization behavior of *Jasus lalandii* haemocyanin and its reaction to the allosteric binding of oxygen. Biochemistry, 7: 4075-4085, 1968.
- MORI, W., YAMAUCHI, O., NAKAO, Y. & NAKAHARA, A. Spectroscopic studies on the active site of *Sepioteuthis lessoniana* hemocyanin. Biochem.Biophys.Res.Commun., 66: 725-730, 1975.
- NAKAMURA, T. & MASON, H.S. An electron spin resonance study of copper valence in oxyhemocyanin. Biochem.Biophys.Res. Commun., 3: 297-299, 1960.
- NORNE, J.E., GUSTAVSSON, H., FORSÉN, S., CHIANCONE EMILIA, KUIPER, H.A. & ANTONINI, E. Sodium and calcium binding to *Panulirus interruptus* hemocyanin as studied by <sup>23</sup>Na nuclear magnetic resonance. Eur.J.Biochem., 98:591-595, 1979.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre o preparo de anti-soros pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. Summa Phytopatologica, 1: 61-64, 1975.
- OMURA, T., FUJITA, T., YAMADA, F. & YAMAMOTO, S. Hemocyanin of *Ommatostrephes sloani pacificus*. J.Biochem. (Tokyo), 50: 400-404, 1961.

- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog.Allerg., 5: 1-78, 1958.
- PARISI, V., NARDI, G., GHIRETTI, F. & GHIRETTI-MAGALDI ANNA. Recherche sulle emocianine. III. Proprietà immunologiche. Boll.Soc.Ital.Biol.Sper., 38: 1848-1851, 1962.
- PILSON, M.E.Q. Variation of hemocyanin concentration in the blood of four species of *faliotis*. Biol.Bull., 128: 459-472, 1965.
- PRÉAUX GISELE, GIELLENS, C. & LONTIE, R. Immunological comparison of molluscan haemocyanins. Em U.Weser (ed.) Metalloproteins: Structure, Molecular Function and Clinical Aspects. Georg Thieme Verlag, Stuttgart e New York. p.73-80, 1979.
- QUITTNER, S.L., WATTS, L.A., CROSBY, C. & ROXBY, R. Molecular weights of aggregation products of *Busycon* hemocyanin. J.Biol.Chem., 253: 525-530, 1978.
- REDFIELD, A.C., COOLIDGE, T. & HURD, A.L. The transport of oxygen and carbon dioxide by some bloods containing haemocyanin. J.Biol.Chem., 69: 475-508, 1929.
- REDFIELD, A.C. & GOODKIND, R. The significance of the Bohr effect in the respiration and asphixiation of the squid, *Loligo pealei*. J.Exp.Biol., 6: 340-349, 1929.
- REDFIELD, A.C. & INGALLS, E.N. The effect of salts and hydrogen-ion concentration upon the oxygen dissociation constant of the hemocyanin of *Busycon canaliculatum*. J.Cell.Comp.Physiol., 1: 253-275, 1932.
- REDFIELD, A.C. & INGALLS, E.N. The oxygen dissociation curves of some bloods containing hemocyanin. J.Cell.Comp.Physiol., 3: 169-202, 1933.
- REDMOND, J.R. The respiratory characteristics of chiton hemocyanins. Physiol.Zool., 35: 304-313, 1962a.

- REDMOND, J.R. The oxygen-hemocyanin relationships in the land crab, *Cardisoma guanhumi* Biol.Bull., 122:252-262, 1962b.
- REDMOND; J.R. The role of blood pigments in the delivery of oxygen to tissues. Helgol.Wiss.Meeresunters, 9: 303-311, 1964.
- ROCHU, D. & FINE, J.M. Antigenic structure of the hemocyanin in six species of decapod crustacea. Comp.Biochem.Physiol., 59A, 145-150, 1978.
- ROCHU, D., LAMBIN, P. GHIDALIA, W. & FINE, J.M. Hemocyanin subunits and their polymeric forms in some decapod crustacea. Comp.Biochem.Physiol., 59B: 117-122, 1978.
- ROLLEMA, H.S., de BRUIN, S.H., JANSSEN, L.M.H. & Van OS, G.A.G. The effect of potassium chloride on the Bohr effect of human hemoglobin. J.Biol.Chem., 250: 1333-1339, 1975.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Arch.Biochem. Biophys., 77: 428-492, 1958.
- SALVATO, B., GHIRETTI-MAGALDI ANNA & GHIRETTI, F. Acid-Base titration of hemocyanin from *Octopus vulgaris*. Biochemistry, 13: 4778-4783, 1974.
- SEVILLA, C. & LAGARRIGUE, J.G. Immunochemical study of Oniscoidea hemocyanins (Crustacea, terrestrial isopods). Comp.Biochem.Physiol. 62A: 539-544, 1979.
- SHAKLAI, N., KLARMAN, A. & DANIEL, E. Oxygen binding by hemocyanin from *Levantina hierosolima* II. Interpretation of cooperativity in terms of ligand-ligand linkage. Biochemistry, 14: 105-108, 1975.
- SIEZEN, R.J. Structure and properties of hemocyanins XIV. Reassociation of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin. J.Mol.Biol., 90:103-113, 1974.

- SIEZEN, R.J. & Van BRUGGEN, E.F.J. Structure and properties of hemocyanins XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin: Quaternary structure. J.Mol.Biol.,90: 77-89, 1974.
- SIEZEN, R.J. & Van DRIEL, R. Structure and properties of hemocyanins XIII. Dissociation of *Helix pomatia*  $\alpha$ -hemocyanin at alkaline pH. J.Mol.Biol.,90: 91-102, 1974.
- SOLOMON, E.I., DOOLEY, D.M., WANG, R.H., GRAY, H.B., CERDONIO.M., MOGNO, F. & ROMANI, G.L. Susceptibility studies of laccase and oxyhemocyanin using an ultrasensitive magnetometer. Antiferromagnetic behavior of the type 3 copper in *Rhus* laccase. J.Am.Chem.Soc.,98: 1029-1031, 1976.
- SPOEK, G.L., BABBER, H. & WOLVEKAMP, H.P. Experiments on the haemocyanin-oxygen equilibrium of the blood of the edible snail (*Helix pomatia* L.). Comp.Biochem.Physiol.,12: 209-221, 1964.
- STRICKS, W. & KOLTHOFF, I.M. Polarographic investigations of reactions in Aqueous solutions containing copper and cysteine (cystine) I. Cuprous copper and cysteine in ammoniacal medium. The dissociation constant of cuprous cysteinate. J.Am.Chem.Soc.,73: 1723-1733, 1951.
- SULLIVAN, B., BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA CELIA. Functional differences in the multiple hemocyanins of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* L. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 71: 2558-2562, 1974.
- SUZUKI, S., KINO, J., KIMURA, M., MORI, W. & NAKAHARA, A. Structure of the active site of hemocyanin. Cobalt(II)-substituted squid hemocyanin. Inorg.Chim.Acta, 66: 41-47, 1982.
- SWAMMERDAM, J. Historia Insectorum Generalis ofte Algemene Verhandeling van de Bloedloose Dierkens, M. van Dreunen(ed.) Utrecht, 1669.



- TALLANDINI, L., SALVATO, B. & JORI, G. Photochemical effects associated with the copper absorption bands of the native hemocyanin from *Octopus vulgaris*. FEBS Letters, 54: 283-285, 1975.
- TALLANDINI, L. & SALVATO, B. Em Invertebrate oxygen binding proteins, structure, active sites and function. (Lamy, J. and Lamy J.(eds.) Dekker, New York, p.727-738, 1981.
- TERWILLIGER NORA, TERWILLIGER, R.C., APPLESTEIN, M. BONAVENTURA CELIA & BONAVENTURA, J. Subunit structure and oxygen binding by hemocyanin of the isopod *Lygia exotica*. Biochemistry, 18: 102-108, 1979.
- THOMSON, L.C.G., HINES, M. & MASON, H.S. On the binding of copper by hemocyanin. Arch.Biochem.Biophys.,83:88-95,1959.
- TORENSMA, R., Van der LAAN, J.M., ZANTIGE, A.G. & Van BRUGGEN, E.F.J. Reassembly of wall domain of Roman-snail (*Helix pomatia*)  $\beta$ -hemocyanin. Biochem.J.,195:119-122, 1981a.
- TORENSMA, R. Van der LAAN, J.M. & Van BRUGGEN, E.F.J. Structural and functional aspects of collar domains of *Helix pomatia*  $\beta$ -hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta, 668: 268-276, 1981b.
- TRUCHOT, J.P. Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L). Resp.Physiol.,24: 173-189, 1975.
- VANOPPEN-ver EECKE Th. & LONTIE, R. The effect of alkaline earth ions on the cooperativity of the oxygenation of *Helix pomatia* hemocyanin. Comp.Biochem.Physiol.,45B: 945-954, 1973.
- Van BREEMEN, J.F.L., SCHUURUIS, G.J. & Van BRUGGEN, E.F.J. Morphology of *Helix pomatia* hemocyanin and its subunits. Em J.V.Bannister (ed.) Structure and Function of Haemocyanins. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, p.122-127, 1977.

- Van BRUGGEN, E.F.J., WIEBENGA, E.H.J. & GRUBER, M. Structure and properties of hemocyanins. I. Electron micrographs of hemocyanin and apo-hemocyanin from *Helix pomatia* at different pH values. J.Mol.Biol.,4: 1-7, 1962.
- Van BRUGGEN, E.F.J. & FERNÁNDEZ-MORÁN, H. Re-association of hemocyanins from subunits mixtures. J.Mol.Biol.,16: 208-211, 1966.
- Van BRUGGEN, E.F.J. Electron microscopy of haemocyanin. Em F.Ghiretti (ed.) Physiology and Biochemistry of Hemocyanins. Academic Press, New York, p.37-48, 1968.
- Van BRUGGEN, E.F.J., BIJHOLT, M.M.C., SCHUTTER, W.G., WICHERTJES, T., BONAVENTURA, J., BONAVENTURA CELIA, LAMY JOSETTE, LAMY, J., LECLERC, M., SCHNEIDER, H.J., MARKL, J. & LINZEN, B. The role of structurally diverse subunits in the assembly of three cheliceratan hemocyanins. FEBS Letters,116:207-210,1980.
- Van der DEEN, H. & HOVING, H. An infrared study of carbon monoxide complexes of hemocyanins. Evidence for the structure of the CO-binding site from vibrational analysis. Biophys. Chem.,9: 169-179, 1979.
- Van der LAAN, J.M., TORENSMA, R. & Van BRUGGEN, E.F.J. Em Lamy J.e Lamy J.(eds.) Invertebrate Oxygen-binding Proteins. Marcel Dekker, New York, p.739-741, 1981.
- Van DRIEL, R. & Van BRUGGEN, E.F.J. Oxygen-linked association -dissociation of *Helix pomatia* hemocyanin. Biochemistry,J., 13:4079-4083, 1974.
- Van HOLDE, K.E.& COHEN, L.B. Physical studies of hemocyanins I. Characterization and subunit structure of *Loligo pealei* hemocyanin. Biochemistry,3: 1803-1808, 1964.
- Van HOLDE, K.E. & Van BRUGGEN, E.F.J. The hemocyanins. Em Timasheff, S.H. and Fasman, G.D.(eds.) Biological Macromolecule Series. vol.5, Marcel Dekker, New York, p.1-53, 1971.

- VAN HOLDE, K.F. & BRENOWITZ, M. Subunit structure and physical properties of the hemocyanin of the giant isopod *Bathynomus giganteus*. Biochemistry, 20: 5232-5239, 1981.
- WEBER, K. PRINGLE, J.R. & OSBORN, M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. Methods Enzymol., 26: 3-27, 1973.
- WITTERS, R. & LONTIE, R. Stability regions and amino acid-composition of gastropod haemocyanins. Em F.Ghiretti(ed.) Physiology and Biochemistry of Haemocyanins Academic Press, New York, p.61-73, 1968.
- WOLVEKAMP, H.P. & KERSIEN, H.J. Über die Sauerstoffdissoziationskurve vom Blute der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*). Z. Vergl.Physiol., 20: 702-713, 1934.
- WOOD, E.J. & BANNISTER, W.H. The effect of photooxidation and histidine reagents on *Murex trunculus* hemocyanin. Biochim.Biophys.Acta, 154: 10-16, 1968.
- WOOD, E.J., SALISBURY CATHERINE, M., FORMOSA, N. & BANNISTER, W.H. An electrophoretic and immunologic study of *Murex trunculus* haemocyanin. Comp.Biochem.Physiol., 26: 345-351, 1968.
- WOOD, E.J., BANNISTER, W.H., OLIVER, C.J., LONTIE & WITTERS, R. Diffusion coefficients, sedimentation coefficients and molecular weights of some gastropod hemocyanins. Comp. Biochem.Physiol., 40B: 19-24, 1971.
- WOOD, E.J. Gastropod hemocyanins: Dissociation of haemocyanins from *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua* and *Colus gracilis* in the region pH 7,5-9,2. Biochim.Biophys.Acta, 328: 101-106, 1973.
- WOOD, E.J. & PEACOCKE, A.R. *Murex trunculus* haemocyanin I. Physical properties and pH-induced dissociation. Eur.J. Biochem., 35: 410-420, 1973.

- WOOD, E.J., CAYLEY, G.R. & PEARSON, J.S. Oxygen binding by the haemocyanin from *Buccinum undatum*. J.Mol.Biol., 109: 1-11, 1977.
- WYMAN, J. Hemeproteins. Adv.Protein.Chem., 4: 410-531, 1948.
- WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: a second look. Adv.Protein.Chem., 9: 223-286, 1964.
- WYMAN, J. Possible allosteric effects in extended biological systems. J.Mol.Biol., 39: 523-537, 1969.
- YEN, F.L. & ALBEN, J.O. Structure of the carbon monoxide binding site of hemocyanins studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry, 11, 4786-4792, 1972.
- YOUNG, R.E. The physiological ecology of haemocyanin in some selected crabs. II. The characteristics of haemocyanins in relation to terrestriality. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 10: 193-206, 1972.
- ZATTA, P. and SALVATO, B. Reconstitution of *Carcinus maenas* hemocyanin in presence of Triton X-100. Ciênc.Biol. (Portugal) 5: 111-112, 1980.
- ZOLLA, L., KUIPER, H.A., VECCHINI PAOLA, ANTONINI, E. & BRUNORI, M. Dissociation and oxygen-binding behaviour of  $\beta$ -hemocyanin from *Helix pomatia*. Eur.J.Biochem., 87: 467-473, 1978.
- ZOLLA, L., AIROLDI LUCIA, P.S., KUIPER, H.A., CONSTANTINI, S. & BRUNORI, M. Copper removal from hemocyanins by cyanide in presence or absence of gaseous ligands. Life Chemistry Reports, em impressão, 1982.