

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela candidata Gabriela
Maria Rennebeck e aprovada pela Comissão
Julgadora

OK


Gabriela Maria Rennebeck



BC/12303
IB/80663

80003

ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA HEMOGLOBINA DE

Glossoscolex paulistus
(oligochaeta - glossoscolecidae)

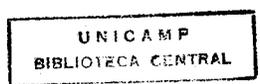
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Genética.

Orientador: Dr. Benedito Oliveira

Campinas - SP
1990

T/UNICAMP

R294_e



CLASSIF.	T
AUTOR.	R 2942
V.	EX.
TOMBO	BCI 168333
	FR 1014

CM-00010809-8

Este trabalho foi realizado no laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Auxílios foram concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (830146/88 - 1)

Dedico aos meus pais,
Maria José e Jurgen
por me apoiarem com tanto
carinho e dedicação durant
te todos os momentos de
minha vida.

Às minhas irmãs,
Alessandra e Helga
por participarem de mo-
mentos de grande mudan-
ça.

" two roads diverged in the woods and I,
I took the less traveled by and that
made all the difference "

R.F.

Ao Marcos,
meu companheiro e amigo,
pelo carinho nos momen -
tos difíceis.

Agradecimentos

Ao Prof.Dr. Antonio Celso Magalhães, Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo permanente incentivo às atividades de pesquisa desenvolvidas.

Ao Prof.Dr. Benedito Oliveira pela orientação firme e incentivo nos momentos difíceis. Ajuda primordial no desenvolvimento da minha conduta científica.

À Profs.Dra. Nilce Correa Meirelles pela ajuda na elaboração dos experimentos de atividade biológica da hemoglobina. Pela leitura crítica do trabalho desenvolvido.

Ao Prof.Dr. José Roberto Giglio pela discussão do trabalho desenvolvido e pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof.Dr. Austen F. Riggs do Departamento de Zoologia da Universidade do Texas, pela discussão dos resultados obtidos e sugestões sobre a estrutura molecular da hemoglobina de Glossoscolex paulistus.

Ao Prof.Dr. Sérgio Marangoni pela ajuda na elaboração dos protocolos e discussão do trabalho.

Ao Prof.Dr. Avelino Rodrigues Oliveira pelo incentivo na minha iniciação científica, como meu primeiro orientador.

À Profa. Eneida de Paula pelo auxílio na elaboração dos experimentos de oxigenação da hemoglobina.

Ao Prof.Dr. José Osmar Gaspar pelo auxílio na elaboração dos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos meus colegas de laboratório: Edmyr R. Reis, Elen C. Teizen Landucci, Fabíola Cardillo, Fátima Lovo Farah, José Camilo Novello, Maria Risoleta F.Marques, Maria Vitória P.L. de Castro e Marcos H. Toyama pela convivência durante todos esses anos.

Aos funcionários Isaías J. Correa, Geralda Aparecida de Freitas e Jedida N. de Souza que de alguma maneira contribuíram para o progresso do trabalho desenvolvido.

À Dna. Ana Gagliardi e as funcionárias da biblioteca pela ajuda indispensável.

INDICE

1 - Introdução	1
2 - Materiais e métodos	
2.1 - Animais utilizados	14
2.2 - Purificação da hemoglobina de <u>G.paulistus</u>	16
2.3 - Imunização	
2.3.1 - Preparo do antígeno	16
2.3.2 - Esquema de imunização	18
2.4 - Dupla difusão radial em gel de ágar	18
2.5 - Imunoeletroforese em gel de ágar	20
2.6 - Dissociação da hemoglobina em pH alcalino	21
2.7 - Microscopia eletrônica de transmissão	21
2.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	21
2.9 - Filtração em gel de Sephadex	23
2.10 - Dosagem de proteínas	24
2.11 - Curvas de equilíbrio com o oxigênio da he- moglobina nativa, dissociada e da unidade mo- nomérica	24
2.10.1 - Calibração do tonômetro	24
2.10.2 - Preparo da amostra	26
2.10.3 - Deoxigenação e reoxigenação da hemoglobina	26
2.10.4 - Plot de Hill	27
3.0 - Resultados	
3.1 - Estrutura da hemoglobina de <u>G.paulistus</u>	30
3.2 - Análise sorológica da hemoglobina	30
3.3 - Complexo molecular hemoglobina evidenciado por PAGE/SDS	35
3.4 - Análise imunoeletroforética da hemoglobina nativa e dissociada	35
3.5 - Fracionamento da hemoglobina dissociada em gel de Sephadex	40

3.6 - Análise antigênica das frações obtidas através da técnica de Ouchterlony e determinação do peso molecular e grau de pureza por PAGE/SDS	40
3.7 - Afinidade pelo oxigênio da hemoglobina nativa, dissociada e da unidade monomérica	44
4.0 - Discussão	54
5.0 - Conclusões	66
6.0 - Resumo	69
7.0 - Referências bibliográficas	73

INTRODUÇÃO

As hemoglobinas constituem uma das famílias de proteínas mais bem estudadas até o presente. Seu principal papel é o transporte de moléculas de oxigênio entre os tecidos dos mais diversificados organismos (Riggs et al., 1986; Ochiai e Enoki, 1981; Vinogradov, 1985; Bogusz et al., 1988). As hemoglobinas são versáteis para ligar e liberar moléculas de oxigênio de acordo com a tensão de oxigênio nos tecidos em que se encontra. O oxigênio liberado pela hemoglobina é utilizado na respiração celular ou armazenado pela mioglobina nos músculos.

A região responsável pela ligação das moléculas de O_2 , é o grupamento prostético, o heme - um anel tetrapirrólico ligado a um átomo de ferro (Fig 1 - a). O Fe^{+2} se liga de maneira coordenada a um resíduo histidina (His) da cadeia polipeptídica que o envolve combinando-se reversivelmente com as moléculas de O_2 e outras moléculas gasosas, definindo a sua função de transportadora (Perutz, 1979). A ligação covalente entre o Fe^{+2} e a cadeia polipeptídica foi evidenciada para a hemoglobina de Chromatium - (Gaul et al., 1973). As características químicas e estruturais da cadeia polipeptídica que envolve o grupamento heme refletem a sua função de "proteger" o Fe^{+2} não deixando que ele sofra oxidação e passe a Fe^{+3} cuja propriedade de ligar o oxigênio é nula. Algumas hemoglobinas são formadas por uma única cadeia polipeptídica com o respectivo grupamento heme ligado, enquanto outras as cadeias sofrem agregação formando hemoglobinas diméricas, triméricas, tetraméricas (humana) e hemoglobinas extracelulares que apresentam número elevado de cadeias (>100) (Vinogradov, 1985).

A maioria das moléculas de hemoglobina é encontrada no estado oxigenado ou deoxigenado. Estados intermediários de oxigenação raramente são encontrados (Dickerson e Geis, 1983). A atividade biológica como afinidade pelo oxigênio, cooperatividade, o efeito Bohr e comportamento frente à substâncias como difosfoglicerato (DPG), é bem diversificada dentre as diferentes hemoglobinas.

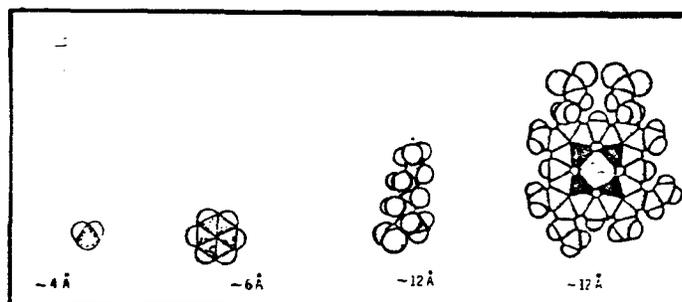
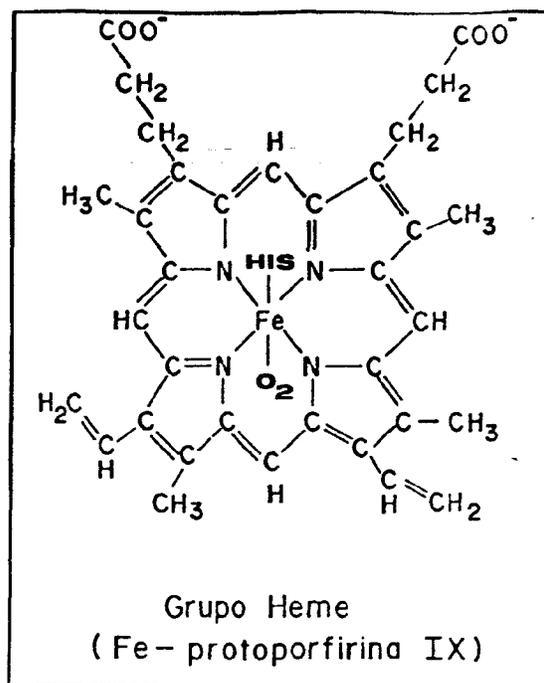


Fig 1 - Estrutura molecular do grupamento heme das hemoglobinas
A- grupamento heme - cinco ligações: 4 com o nitrogênio do anel porfirínico, 1 com a cadeia polipeptídica e a última com o oxigênio.
B- comparação da dimensão do grupamento heme com a água, benzeno e lisina.

O 2,3 difosfo-glicerato (DPG) se liga à hemoglobina (Benesh e Benesh, 1969) deslocando o equilíbrio para a forma deoxi-hemoglobina, diminuindo a afinidade da molécula pelo oxigênio. A afinidade pelo O_2 também é afetada pela ligação de íons hidrogênio aos grupos laterais dos aminoácidos da cadeia polipeptídica. A variação da afinidade pelo oxigênio em diferentes pHs é conhecida como efeito Bohr (Riggs, 1988). As hemoglobinas podem apresentar cooperatividade entre os diferentes grupamentos heme que as compõem. Este processo envolve a ligação da primeira molécula de oxigênio gerando modificações estruturais facilitando a ligação de outras moléculas nos grupamentos heme restantes.

Os organismos podem ser classificados em cinco reinos, um procariótico e quatro eucarióticos (Whitaker, 1969) e todos apresentam hemoglobina ou uma proteína semelhante à hemoglobina ("hemoglobin-like"). As hemoglobinas descritas dentro do grupo dos vertebrados são invariavelmente intracelulares e tetraméricas. Algumas exceções são encontradas em espécies de peixes da família Chaenichthyidae (Ruud et al., 1954), os quais não possuem hemoglobina e os ciclostomados (Agnatha) cuja hemoglobina monomérica é capaz de sofrer agregação dependendo das adversidades do ambiente (Andersen e Gibson, 1971)

Uma parte intrigante do estudo das hemoglobinas envolve a origem e evolução desta família de proteínas (Dickerson e Geis, 1983). Duas décadas a partir das primeiras sequências primárias das cadeias de hemoglobina humana, foram identificadas mais de sessenta tipos diferentes de cadeias da família α (α , ζ). Sessenta e seis sequências diferentes dentro da família β (β , γ , δ) e sessenta tipos de mioglobinas (Dayhoff, 1972). Além destas variações, foram descritas hemoglobinas de cadeia única em lampréia, moluscos, vermes marinhos, várias hemoglobinas extracelulares em larvas de insetos e anelídeos, hemoglobinas provinentes de plantas - leghemoglobinas (Dickerson e Geis, 1983; Ghiretti-Magaldi et al., 1985; Jensen et al., 1981; Ochiai e Enoki, 1981; Bogusz et al., 1988; Chiancone et al., 1980 e Vinogradov, 1985).

Este conjunto de sequências constitui um grande número de informações para comparação e estudos de filogenia molecular, como os desenvolvidos para a família do anticorpo (Kabat, 1982) e a família do citocromo tipo c.

Os estudos sobre hemoglobinas encontradas dentro do grupo dos fungos e das bactérias abrem perspectivas no sentido de que estas proteínas possam ser interpretadas como possuindo origens remotas e que o seu papel nestes organismos não deva restringir ao transporte de oxigênio.

A hemoglobina de Saccharomyces cerevisiae aumenta em concentração quando o sistema de transporte de elétrons é bloqueado por antimicina A (Keilin, 1956). Mutantes de Saccharomyces que apresentam deleções nas subunidades V_a e V_b da citocromo oxidase, apresentam aumento na produção de hemoglobina (Chance et al., 1989). Hansenula (levedura) sintetiza uma proteína de 36kDa quando submetida ao tratamento com antimicina A (Yoshimoto et al., 1989). Estes dados demonstram que a biossíntese de hemoglobina em fungos e bactérias é estimulada por alguma interferência no funcionamento do transporte de elétrons, sugerindo a ocorrência de um sistema de regulação gênica.

A bactéria Alcaligenes entrophus e a levedura Candida mycoderma apresentam uma flavo-heme proteína que cataliza a redução do citocromo c por NADH. Essa proteína apresenta homologia com o citocromo b_5 . A presença de dois domínios, um flavina e outro heme, indica uma possível fusão entre os dois genes (Xia e Matthews, 1989). Runnegar (1984) propôs que as hemoglobinas derivariam parcialmente de uma proteína semelhante ao citocromo b_5 - "cytochrome-like". Os genes globina poderiam ter evoluído repetidamente e independentemente em diferentes invertebrados a partir de um gene que codificaria uma proteína diferente, mas relacionada à hemoglobina e que todos possuísem. O citocromo tipo a tem sido sugerido como ancestral comum por apresentar o mesmo tipo de grupamento heme. Estudos tridimensionais não demonstraram o -

corre semelhante, sugerindo que a ocorrência de homologia estrutural poderia não ser evidente no caso de que o tempo de divergência entre as duas famílias tenha ocorrido há mais de 2.10^9 anos.

As hemoglobinas também são encontradas em vários filos de invertebrados e apresentam similaridades com as hemoglobinas de vertebrados e mioglobinas, mas arranjam-se de maneira totalmente diferente. Sua ocorrência nos diferentes invertebrados é irregular e não se correlacionam com nenhuma árvore filogenética simples. Os genes que as codificam tendem a ocorrer em cópias múltiplas e serem polimórficos. Elas podem ser intracelulares ou extracelulares, sendo que em alguns organismos ocorrem as duas formas - Amphitrite ornata (Terwilliger et al., 1985).

Hemoglobinas intracelulares

monoméricas, diméricas, triméricas, poliméricas.

Hemoglobinas extracelulares

Platelmintos, Nematoda, Molusca, Crustácea, Insecta, Anelida e Pogonofora.

As hemoglobinas de invertebrados podem ser classificadas de acordo com as características das unidades que apresentam, segundo Vinogradov (1985): (1) domínio simples e uma cadeia polipeptídica - 16kDa (2) dois domínios por cadeia polipeptídica de 30-40kDa formando uma hemoglobina de 250-800kDa (3) vários domínios, 2 a 18, por cadeia formando uma hemoglobina de 240-8000kDa (4) um domínio por cadeia polipeptídica de 12-17 kDa, algumas ligadas por pontes dissulfeto formando hemoglobinas de 3000 a 8000 kDa. O fato de se tratar de uma hemoglobina extracelular ou intracelular deve ser levado em consideração devido à biossíntese da molécula com ou sem peptídeo sinal para secreção (Fushitani et al., 1988).

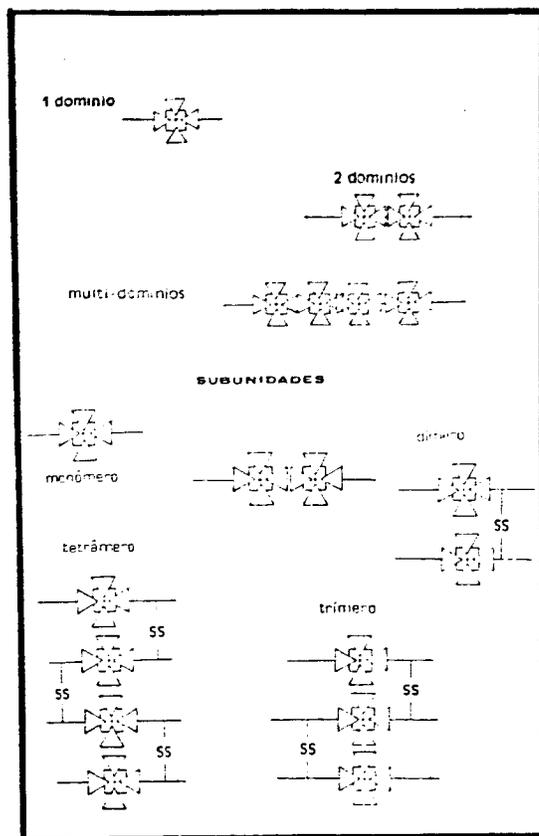


Fig 2 - Classificação das hemoglobinas de invertebrados (Vinogradov, 1985).

1 domínio = uma cadeia polipeptídica com um grupamento heme ligado, 2 domínios = uma cadeia polipeptídica com 2 grupamentos heme ligados, multidomínio = uma cadeia polipeptídica com vários grupamentos heme ligados.

monômero = 1 domínio

dímero = 2 domínios ou dois monômeros ligados por pontes dissulfeto

trímero = 3 monômeros (de 1 domínio) ligados por pontes dissulfeto

tetrâmero = 4 monômeros (de 1 domínio) ligados por pontes dissulfeto

Nas imunoglobulinas, a cadeia pesada (HC) é resultado da expressão gênica de quatro exons. Cada região da cadeia polipeptídica, produto gênico de um exon, é denominada domínio. A partir deste modelo, um domínio pode ser reconhecido como sendo uma parte da proteína que forma uma região compacta e globular separada do resto da molécula. No caso da hemoglobina, não é observada a estrutura que caracterizaria um domínio nos segmentos codificados por exons (Go, 1984). Desta maneira, a terminologia domínio empregada na classificação das hemoglobinas de invertebrados está relacionada com uma unidade mioglobina ("myoglobin-fold"), uma cadeia polipeptídica com um grupamento heme ligado, unidade responsável pela ligação da molécula de oxigênio.

As hemoglobinas de anelídeos apresentam uma considerável variação em tipos de hemoglobinas. Algumas são intracelulares, como em Glycera, outras extracelulares - Lumbriccus terrestris e Tylorinchus heterochaetus e em algumas espécies de anelídeos encontramos as duas formas - Amphitrite ornata. Essas hemoglobinas são moléculas formadas de agregados de várias unidades pequenas, sendo que algumas apresentam pontes dissulfeto formando dímeros, trímeros e tetrâmeros. Elas são encontradas nas três classes de anelídeos: oligochaeta, polichaeta e hirudinea. O baixo teor de ferro (2/3 da hemoglobina humana) distingue as hemoglobinas de anelídeos de qualquer outra hemoglobina de vertebrado, invertebrado, tanto extracelular como intracelular (Vinogradov, 1985).

Estudos convencionais de microscopia eletrônica de transmissão sugerem que a maioria das hemoglobinas de anelídeos apresentam um padrão uniforme - dois discos hexagonais sobrepostos (Fig 3) e as dimensões são similares: distância entre os lados paralelos 24 a 26nm, e altura 15 a 18nm (Mangun, 1976; Vigradov, 1980). Estudos de ultracentrifugação analítica e de difração de raio X a baixo ângulo sugerem que o peso molecular das hemoglobinas de anelídeos varia de 2.300.000 a 4.000.000 (Wood et al., 1976; Pilz et al., 1980). Apesar de compartilharem uma estrutura semelhante, as características fisiológicas são bem variáveis.

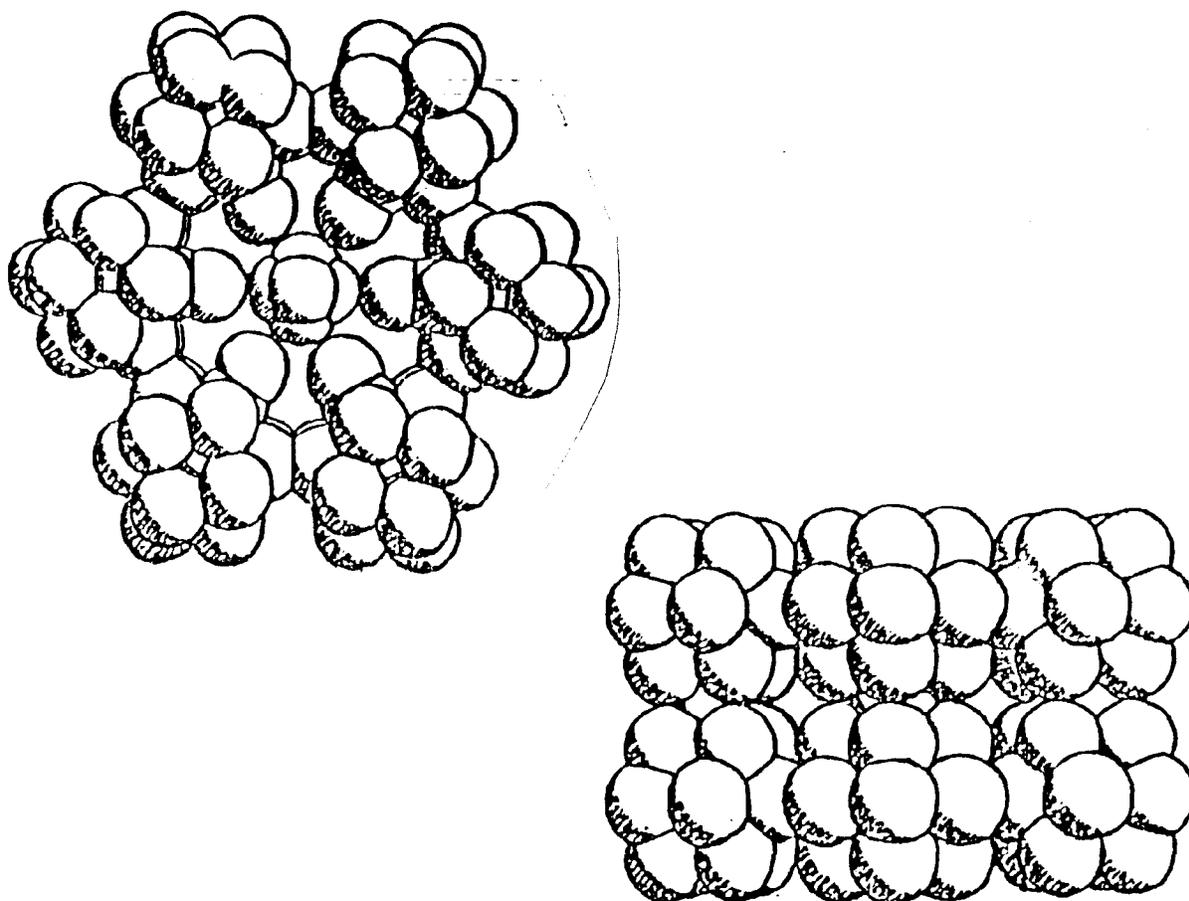


Fig 3 - Arranjo molecular característico das hemoglobinas de invertebrados (Messerschmidt et al., 1983)

- A - vista frontal evidencia a estrutura de hexágono com uma unidade central (13ª)**
- B - vista lateral evidencia a ocorrência de dois discos sobrepostos**

A hemoglobina extracelular de L. terrestris (oligochaeta) é a mais bem estudada dentre as hemoglobinas de anelídeos e serve de modelo de comparação com as outras hemoglobinas descritas e estudos de evolução da família das globinas. Esta hemoglobina apresenta um arranjo hexagonal característico (Fig 3) e seu peso molecular é de 3.000.000 (Kapp et al., 1982). Sete tipos de polipeptídeos compõem o complexo final e estão arranjados na forma de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros. As quatro cadeias principais a, b, c, e d tiveram sua sequência primária definida (Fushitani et al., 1986) e são responsáveis pela formação de uma unidade funcional: trímero (a+b+c) + monômero (d), resultando na captação de oxigênio. A atividade biológica, afinidade pelo oxigênio é modulada por íons cálcio (Ca^{+2}) e a ligação entre as cadeias a e c formam o sítio de ligação do cálcio (Fushitani et al., 1986).

A estrutura do gene que codifica a cadeia c de L. terrestris foi recentemente caracterizada e apresenta uma organização de 3 exons, 2 introns (Fig 4). Esta organização é semelhante à encontrada para as hemoglobinas de vertebrados e mioglobinas. Os introns da cadeia polipeptídica c são maiores do que os encontrados para as hemoglobinas de vertebrados e menores que os da mioglobina (Jiang et al., 1988). Esse tamanho intermediário sugere uma relação evolutiva entre hemoglobinas de invertebrados e mioglobina e que possivelmente a divergência entre a origem de anelídeos e a ocorrência de mioglobina estejam próximas. As regiões que separam os introns dos exons tendem a mapear a superfície da molécula de hemoglobina e qualquer mutação nesta região não provocaria danos estruturais que comprometessem o funcionamento da molécula (Craick et al., 1982). As regiões de contato entre as subunidades da hemoglobina são conservadas à nível de gene e apresentam baixo número de variações, pois qualquer mutação nesta região acarretaria o rompimento de hélices envolvidas no contato, desestruturando a molécula. O segundo exon é responsável pela formação da cavidade molecular para o acoplamento do grupamento heme (Fig 4).

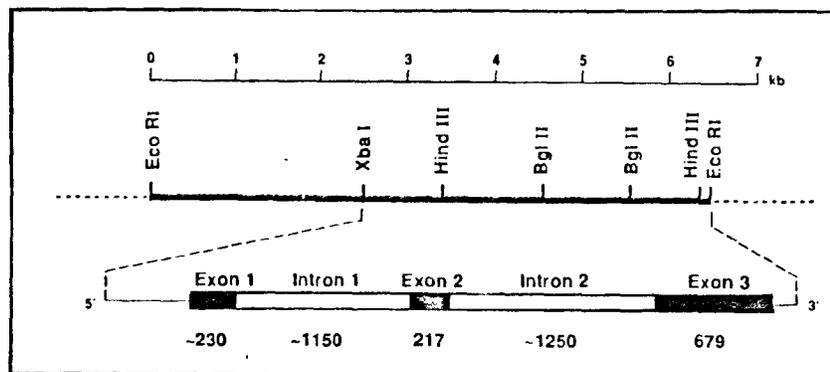


Fig 4 - Estrutura do gene da cadeia polipeptídica c da hemoglobina de Lumbricus terrestris (Jhiang et al., 1988)

exon 1 = 230 pares de bases

exon 2 = 217 pares de bases

exon 3 = 679 pares de bases

intron 1 = 1150 pares de bases

intron 2 = 1250 pares de bases

exon

intron

enzimas de restrição: Eco RI, Xba I, Hind III, Bgl II.

A leg emoglobina é uma proteína respiratória encontrada em leguminosas que apresentam ou não processo de associação com a bactéria Rhizobium (Appleby, 1984; Appleby et al., 1983; Fleming et al., 1987). Três leghemoglobinas foram sequenciadas (α , c_1 e c_2) e a estrutura do gene foi caracterizada (Fig 5) apresentando uma organização de 4 exons, 3 introns. Estudos de alinhamento de sequência primária de todas as hemoglobinas descritas mostram o primeiro e o terceiro intron do gene leghemoglobina na mesma posição encontrada em todas as hemoglobinas, sugerindo uma origem evolucionária comum (Landsman et al., 1986).

Monômeros, leghemoglobinas e mioglobinas poderiam ter evoluído de um gene ancestral comum. O intron encontrado dividindo o 2º exon estaria presente no gene ancestral e posteriormente se perdeu durante a evolução animal. Outra hipótese sugere que este tipo de estrutura poderia ser um avanço na evolução das leg hemoglobinas.

Glossoscolex paulistus é um oligochaeta da família Glossoscolecidae encontrado somente na região de Rio Claro, Araras e Piracicaba (Righi, 1972). Suas características morfológicas, comprimento (40cm) e diâmetro (1cm) diferem da maioria dos outros oligochaetas descritos.

O presente estudo tem como objetivo analisar a hemoglobina de G.paulistus, caracterizando sua estrutura quaternária e definindo as subunidades principais. Além do estudo estrutural, analisar a atividade biológica desta hemoglobina na forma nativa, dissociada (pH alcalino) e da sua unidade monomérica 12kDa, sugerindo um possível modelo de evolução destas proteínas respiratórias.

Estudos moleculares abrangendo a maioria das hemoglobinas de invertebrados visam o estabelecimento da possível etapa da evolução animal na qual o terceiro intron se perdeu e o que isso acarretaria em termos de eficiência no transporte de oxigênio.

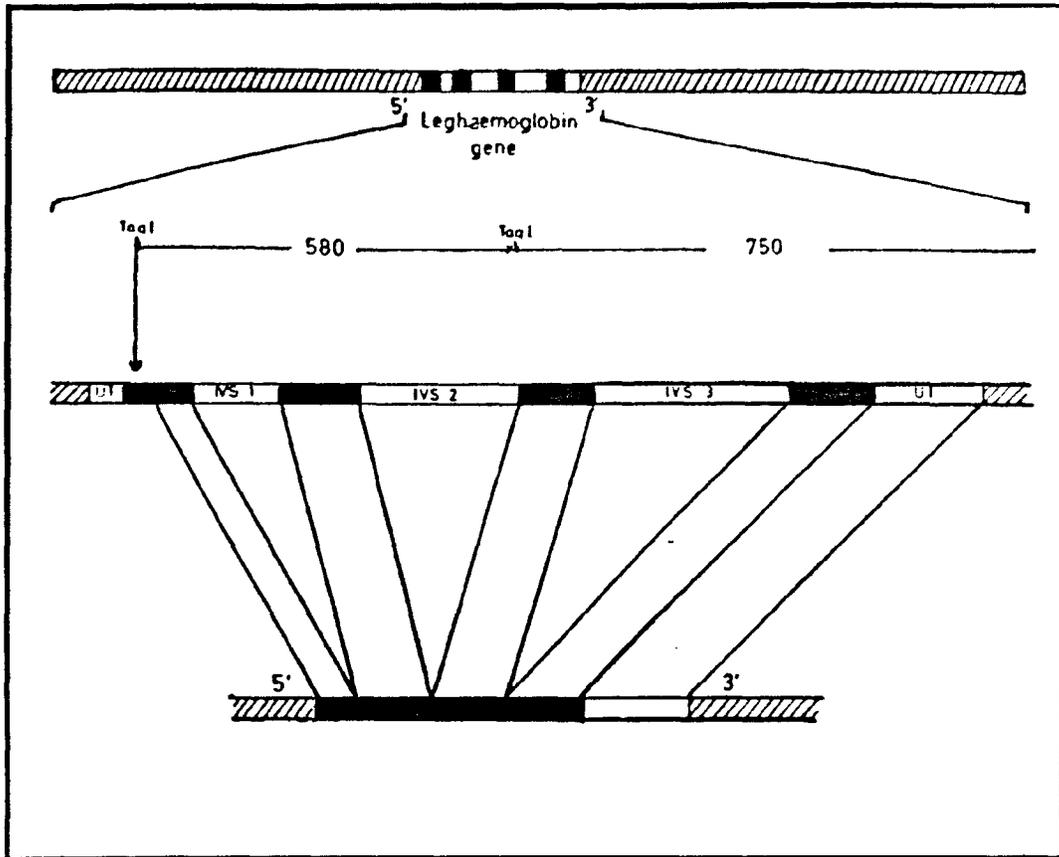


Fig 5 - Estrutura do gene leghemoglobina de soja
(Ostergaard et al., 1981)

exon

intron

leghemoglobina	1º intron	2º intron	3º intron
posição	32	68-69	104-105

2.1 - Animais utilizados

A hemoglobina utilizada foi purificada a partir do oligochaeta, Glossoscolex paulistus, abundante em solos calcáreos na região de Rio Claro - Estado de São Paulo. Estes espécimens apresentam comprimento aproximado de 40 cm por 1 cm de diâmetro, pesando por volta de 15g cada. Esses animais foram coletados e mantidos no mesmo solo a 25°C por no máximo 10 dias. O sangue foi coletado antes deste período.

Para imunização foram utilizados coelhos de linhagem não definida ("outbred").

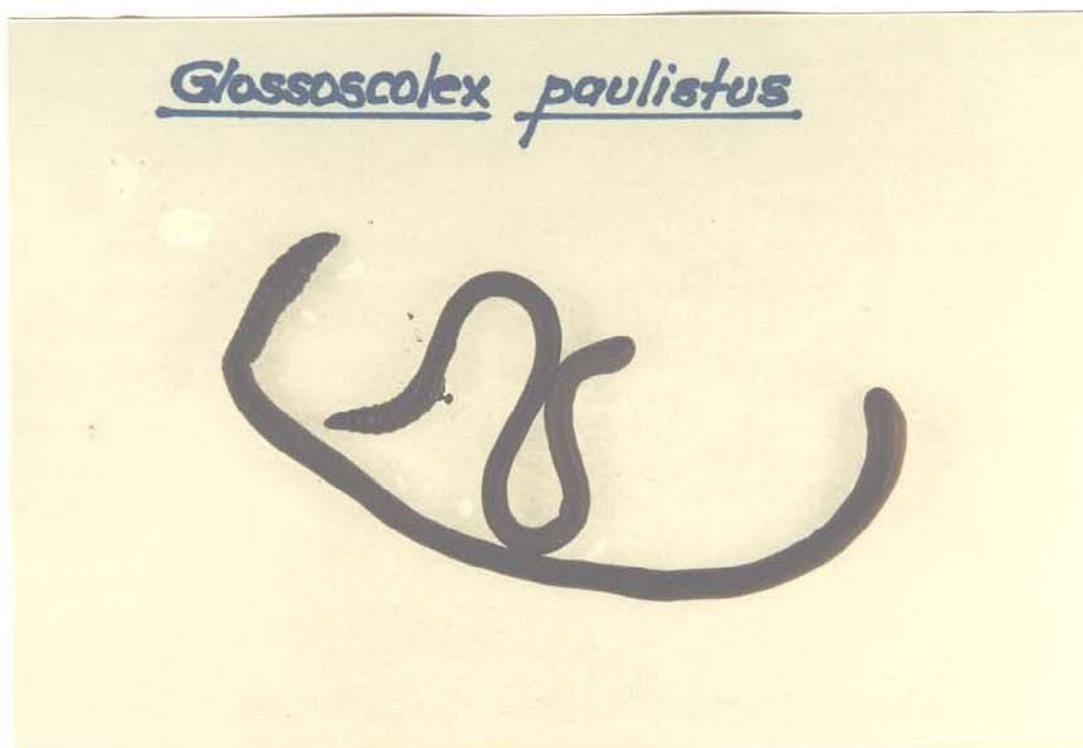


Fig 6 - Glossoscolex paulistus - Família Glossoscolecidae
Comprimento médio - 40 cm
Diâmetro médio - 1 cm

2.2 - Purificação da hemoglobina de G.paulistus

Primeiramente os animais foram anestesiados em álcool a 10%. Foi feita uma incisão na veia dorsal, na região correspondente ao 12º seguimento (Fig 7). O sangue foi coletado utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 com EDTA 10^{-3} M (agente quelante - Ca^{+2}) e uma solução de heparina 2000 U/ml como anticoagulante. A solução de sangue foi centrifugada a 2.500xg (Centrífuga Eppendorf) por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise contra o mesmo tampão de coleta por 18 horas a 4°C. Em seguida, submeteu-se o dialisado à ultracentrifugação de 250.000xg por duas horas a 4°C (Centrífuga Beckman). O "pellet" foi ressuscitado com o mesmo tampão fosfato com cuidado para não formar partículas de hemoglobina não dissolvidas, e foi novamente submetido à ultracentrifugação sob as mesmas condições. O precipitado resultante desta segunda centrifugação, a hemoglobina, foi ressuscitado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 com EDTA 10^{-3} M e estocado a 4°C, sendo posteriormente utilizado para estudos de microscopia eletrônica de transmissão, estudos imunológicos e de dissociação.

2.3 - Imunização

2.3.1 - Preparo do antígeno

O adjuvant foi preparado segundo Freund (1965). Em um graal foram emulsificados 15g de lanolina em 85 ml de nujol. À esta mistura, sem BCG (adjuvante) incompleto), foi adicionada a hemoglobina diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 com EDTA 10^{-3} M. A mistura foi homogeneizada em almofariz. O cálculo da concentração final da hemoglobina foi fei

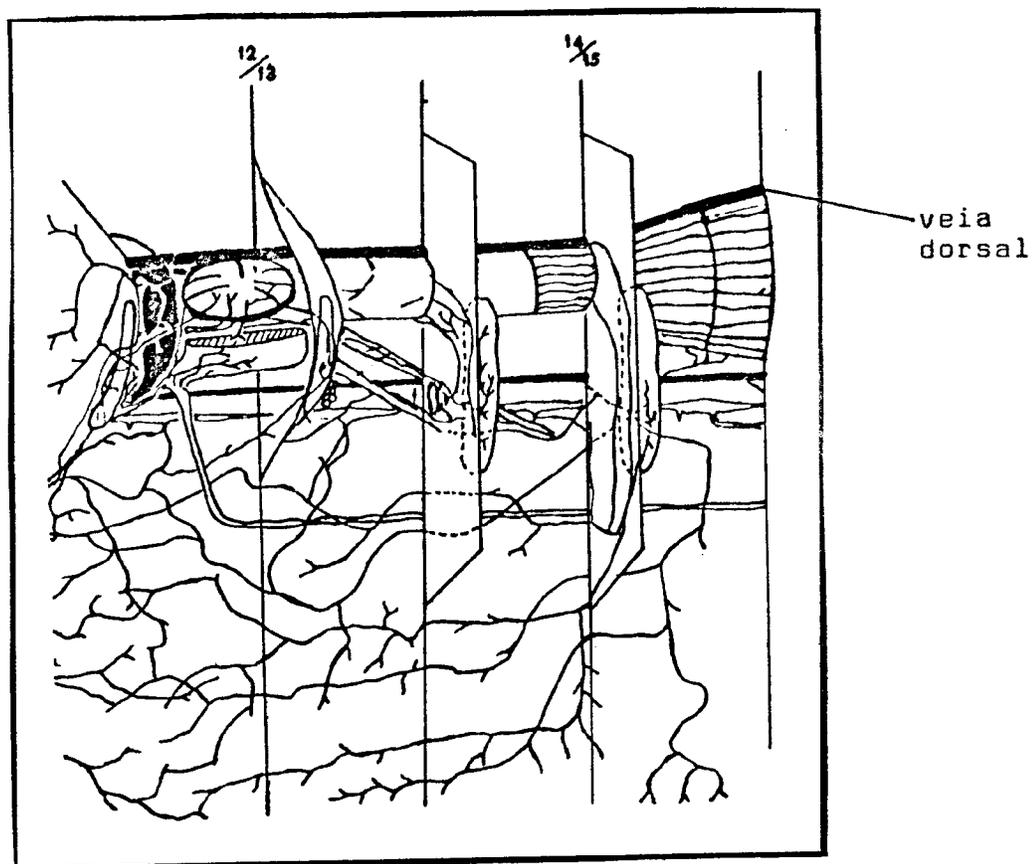


Fig 7 - Sistema circulatório da oligochaeta *Glossoscolex paulistus* (Righi, 1972)

Seguimentos 12 a 15

Incisão feita na veia dorsal

to segundo método descrito por Anonini e Brunori (1971), de maneira que a concentração final de proteína fosse de 1mg/ ml de adjuvante.

2.3.2 - Esquema de imunização

Coelhos de linhagem não definida foram inoculados com hemoglobina purificada de *G. paulistus* segundo esquema abaixo:

A 1ª inoculação foi de 0,5ml de solução antígeno aplicada via intramuscular em cada uma das patas posteriores, próximo ao linfonóculo. O mesmo método foi utilizado para a 2ª e 3ª inoculação, 15 e 30 dias após a primeira inoculação, respectivamente. A partir da 3ª inoculação, a hemoglobina purificada foi diluída em solução salina fisiológica - NaCl 0,15M - e uma amostra de 2ml foi administrada via intradérmica em quatro locais diferentes no dorso depilado do animal (0,5ml/local). Este procedimento repetiu-se até que fosse detectada uma reação inflamatória do tipo Arthus.

As sangrias foram feitas diariamente a partir do 3º dia após a primeira injeção por um período de 3 semanas e após esse período as sangrias foram semanais. O soro obtido foi estocado a -4°C.

2.4 - Dupla difusão radial em gel de ágar

As análises por dupla difusão em ágar foram realizadas segundo Guchterlony (1958).

Lâminas de microscópio limpas (25x75 mm) foram recobertas com uma solução quente de íon ágar (Ion-ágar oxóide nº 02 Oxoid Ltd London) a 1% em solução salina fisiológica (NaCl - 0,15M). Depois do ágar solidificado foram escavados os poços

utilizando-se um esquema padrão (Grafar Gel Michigan - Assembly Grafar Auto Gel Corporation Detroit - Michigan USA). O antissoro foi aplicado no poço central e nos poços periféricos, a hemoglobina a ser identificada. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente em câmara úmida por 24 horas para revelação. Após esse período, foram lavadas por no mínimo 72 horas em solução salina (0,15M) com várias trocas e no final em água deionizada por 24 horas. Após a lavagem, as lâminas foram cobertas com papel filtro e postas a secar à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com solução corante de amido Black a 0,5% (Oliveira Lima e Dias Silva, 1970). O excesso de corante foi retirado com uma solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada (1:2:1).

2.5 - Imunoeletroforese

A análise imunoeletroforética da hemoglobina foi realizada segundo Grabar e Williams (1953).

Lâminas limpas de microscópio (25x75 mm) foram cobertas com uma solução quente de íon ágar oxóide nº 02 a 1% em tampão veronal 0,05M pH 8,6. Após a solidificação, os poços foram escavados segundo padrão Gelman Electrophoresis Punch Set - Gelman Instrument Co. Ann. Harbor - Michigan USA. Os poços foram preenchidos com uma solução de hemoglobina a ser analisada. As lâminas foram colocadas em uma cuba eletroforética preenchida com tampão veronal 0,05M pH 8,6 e as extremidades das lâminas foram conectadas com o tampão através de tiras de papel de filtro Whatman nº 3MM umedecidas com o mesmo tampão. A corrente elétrica de 15mA por lâmina foi aplicada durante 60 minutos. Finda a eletroforese, o ágar da canaleta foi removido e a mesma foi preenchida com antissoro obtido segundo esquema de imunização descrito em 2.3.2. As lâminas foram deixadas em câmara úmida por 24 horas para revelação à temperatu

ra ambiente. Os procedimentos de lavagem, secagem e coloração foram os mesmos descritos para imunodifusão em 2.4 .

2.6 - Dissociação da hemoglobina em pH alcalino

A dissociação da hemoglobina de *G. paulistus* foi obtida nas condições descritas por Vinogradov (1977). Amostras de 1ml de hemoglobina purificada foram submetidas à diálise contra tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,0 mais EDTA 10^{-3} M por 24 horas. Após esse tempo, a hemoglobina resultante foi submetida à análise em microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia em Sephadex C-200 sob condições dissociantes (pH alcalino).

2.7 - Microscopia eletrônica de transmissão

Tela de cobre para microscopia eletrônica foram cobertas com um filme de Parlodio a 0,4% e depois recobertas com carbono (Gaspar et al., 1983). As telas foram colocadas flutuando sobre gotas de soluções de hemoglobina diluídas (1:1000) em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,8 por 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, elas foram lavadas em 5 gotas do mesmo tampão, 5 gotas de água deionizada e posteriormente foram secadas com papel de filtro. Finalmente foram coradas utilizando-se solução de acetato de uranila 2% e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Siemens Elmiskop Modelo I.

2.8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os métodos utilizados foram de Shapiro (1967) e de Weber e Osborn (1969) com modificações.

A placa de poliacrilamida foi feita de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração a 5% e um gel de corrida a 10%. Os dois géis foram preparados utilizando-se uma solução estoque de acrilamida (Bio Rad Labs, Richmond, Cal.) a 30% e N'N' - metileno- bis acrilamida (Bio Rad Labs, Richmond Cal.) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada e posteriormente essa solução estoque foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 01 e mantida a 4°C em frasco âmbar. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl 0,125M pH 6,8 e o gel de separação a 10% com tampão Tris-HCl 0,3M pH 8,6. Em ambos os géis foi acrescentado 0,1 ml de SDS a 20% e foram polimerizados com 0,025 ml de N'N'NN-tetrametil etilenodiamina (TEMED) e 0,025 ml de persulfato de amônio a 10%.

Um sistema de duas placas de vidro (16x14,5cm) foi montado utilizando-se separadores de 2mm de espessura. O gel de corrida foi colocado entre as placas até uma altura de 10 centímetros e após a sua polimerização, foi adicionado o gel de concentração. Encheu-se a placa até a altura de 14,5 cm com o gel de concentração e um pente de acrílico foi colocado para a formação dos locais de aplicação das amostras (5mm) antes da polimerização do gel.

As amostras a serem aplicadas foram padronizadas para conter 20 a 50 µg de proteína. As proteínas utilizadas foram dissolvidas no tampão da amostra ("sample buffer") constituído de tampão Tris-HCl 0,08M pH 6,8 contendo SDS (2%), 10 % de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol. Para amostras reduzidas foi adicionado ditionitrosol (DTT) em concentração final de 0,1M. Todas as amostras foram aquecidas em água fervente por 1 minuto.

Os marcadores utilizados foram: Proteína de Bence Jones na forma dimérica (50kDa), imunoglobulina monoclonal do tipo FKW isotipo IgG₃ (170kDa) e mioglobina (17kDa) - Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo tipo II.

A eletroforese foi realizada em tampão Tris - HCl 0,025M, glicina 0,192M com SDS a 0,1%, a 100V durante 6 horas. O gel foi retirado do sistema de placas e corado com uma solução de Comassie Blue a 0,1% em ácido acético - metanol (1:8 v/v) durante 18 horas. O excesso de corante foi retirado com uma solução descorante de ácido acético, metanol e água deionizada (1:1:2).

2.9 - Filtração em gel de Sephadex G-200

Uma coluna de vidro 0,9 x 100 cm foi preenchida com Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), previamente entumescido em tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,0 + EDTA 10^{-3} M (volume total= 300 ml). Foram aplicados 2 ml de hemoglobina de G.paulistus dissociada de acordo com materiais e métodos 2.6, contendo aproximadamente 50mg/ml.

Frações de 3ml foram eluídas com o mesmo tampão em um fluxo constante de 5-6ml/ hora. Leituras a 280nm e 415 nm foram feitas tubo a tubo.

2.10 - Dosagem de proteínas

A dosagem das amostras de hemoglobina foram feitas segundo a razão heme-molar $E_{1M}^{1cm} = 125.000$ a 415 nm como descrito por Antonini e Brunori (1971).

A dosagem de IgG específica anti-hemoglobina baseou-se no método de Dittebrandt (1948) modificado. Esse método envolve a utilização de reativo de biureto: 9,0g de tartarato de sódio e potássio, 3,0g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 5,0g de iodeto de potássio e hidróxido de sódio 10% em um volume final de 1000ml. Este método permite uma maior sensibilidade - 20 a 400 ug. Todas as outras proteínas a serem dosadas foram submetidas a esse método.

2.11 - Curvas de equilíbrio com o oxigênio da hemoglobina nativa, dissociada e da unidade monomérica de 12kDa

2.11.1 - Calibração do tonômetro

Nos experimentos de oxigenação e deoxigenação da hemoglobina de G.paulistus foram utilizados tonômetros formados de tubos de Thurnberg modificados e desenvolvidos a partir do modelo proposto por Rossi-Fanelli e Antonini (1958) e por Benesh (1965). Uma cubeta ótica pirex com aminho ótico de 1 cm foi adaptada ao tubo para a leitura das amostras (Fig 8).

Primeiramente se procedeu a calibração do sistema para se obter o coeficiente tonométrico (capacidade gasosa). Este coeficiente foi obtido a partir da diferença entre o peso do tonômetro totalmente cheio de água e contendo apenas 3ml de água.

2.11.2 - Preparo da amostra de hemoglobina

A hemoglobina purificada foi diluída em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,2 resultando em uma concentração final de aproximadamente $5 \cdot 10^{-6}$ M dosada através de $\epsilon_{1M}^{1cm} = 125.000$ / heme (Antonini e Brunori, 1971).

2.11.3 - Deoxigenação e reoxigenação da hemoglobina

Amostras diluídas de hemoglobina foram colocadas nos tonômetros e submetidas a um fluxo contínuo de nitrogênio (SS - super seco) por no mínimo 5 minutos. A deoxigenação foi evidenciada através do espectro de varredura, mostrando o desvio do pico de absorbância de 415 nm (oxi) para 428 nm (deoxi).

A reoxigenação gradativa da hemoglobina se deu através da adição de volumes crescentes de ar a cada 10 minutos sob agitação para equilíbrio entre as fases gasosa e líquida, a 20°C. Um registrador automático acoplado ao espectrofotômetro Variant 634 registrou as leituras à luz visível entre os comprimentos de onda de 380 a 600 nm conforme metodologia descrita por Rossi-Fanelli e Antonini (1958).

As amostras utilizadas foram: (1) hemoglobina nativa a pH 7,4; (2) hemoglobina dissociada em pH alcalino e (3) unidade monomérica de 12kDa.

O tratamento com ditionito de sódio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ foi utilizado no caso de não ocorrer deoxigenação através do fluxo de nitrogênio. Uma quantidade de aproximadamente 5mg de ditionito foi adicionada à amostra de hemoglobina dissociada e da unidade monomérica de 12kDa.

2.11.4 - Plot de Hill

O gráfico de Hill foi calculado a partir da equação de Hill, visando observar a afinidade da molécula de hemoglobina pelo oxigênio através da quantidade de oxigênio necessária para saturar 50% dos grupamentos heme. O coeficiente de Hill é calculado através da inclinação da reta onde os valores de saturação com o oxigênio são estáveis (Meirelles et al., 1984).

Para construção do gráfico de Hill foram feitos cálculos dos valores de \bar{Y} (% de saturação) e pressões parciais de oxigênio conforme mostrado na Tabela 1.

As pressões parciais de oxigênio foram calculadas a partir da equação:

$$P_1 V_1 = P_2 V_2$$

P_1 = pressão de oxigênio atmosférico - 156 mm de Hg

V_1 = volume de ar injetado

P_2 = pressão parcial de oxigênio

V_2 = volume da fase gasosa do tonômetro - coeficiente tonométrico

Exemplo:

1ª adição

$$P_1 = 156 \text{ torr}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$P_2 = ?$$

$$V_2 = 203 - 3 = 200 \text{ ml}$$

$$156 \text{ torr} \times 1 \text{ ml} = P_2 \times 200 \text{ ml}$$

$$P_2 = 0.75 \text{ torr}$$

Equação de Hill

$$A = \frac{(\text{HbO}_2)}{(\text{Hb})(\text{O}_2)^n}$$

$$y = \frac{A\text{PO}_2^n}{1 + A\text{PO}_2^n}$$

Plot de Hill pode ser representado graficamente plotando os valores de log de $\bar{Y}/1-\bar{Y}$ contra log de PO_2 ou plotando os valores de \bar{Y} (% de saturação) contra PO_2 .

Tabela 1 - Cálculo de P_{50} segundo método descrito por Rossi - Fanelli (1958).

VOL	Abs ₁	Abs ₂	D ₁	D ₂	Y ₁ %	Y ₂ %	\bar{Y} %	$\frac{Y}{100-Y}$	PO_2	$\log \frac{Y}{1-Y}$	$\log \text{PO}_2$
oxi	0,585	0,349	0,057	-0,202	100,000	100,000	-	-	-	-	-
deoxi	0,528	0,551	-	-	0,000	0,000	-	-	-	-	-
2,0 ml	0,542	0,524	0,014	-0,027	24,561	13,366	18,963	0,2339	1,56	-0,6309	0,1931
3,0 ml	0,536	0,502	0,008	-0,049	14,035	18,963	19,143	0,2367	2,34	-0,6258	0,3692
4,0 ml	0,540	0,490	0,012	-0,061	21,052	30,198	25,625	0,3445	3,12	-0,4628	0,4941
5,0 ml	0,522	0,457	0,006	-0,094	10,526	46,534	28,530	0,3835	3,90	-0,4162	0,5910

Vol - volume de ar injetado (acumulado)

Abs 1 - absorvância a 415 nm

Abs 2 - absorvância a 428 nm

D - diferença entre as absorvâncias da hemoglobina oxi e deoxi

Y% - porcentagem de saturação dos grupamentos heme

RESULTADOS

3.1 - Estrutura da hemoglobina de G.paulistus

Quando observada ao microscópio eletrônico de transmissão em pH 7,4 , a molécula de hemoglobina mostra duas formas de estrutura organizada que podem ser interpretadas como vista lateral e vista frontal. As imagens frontais mostram um arranjo hexagonal de seis elementos aparentemente ôcos com uma unidade no centro do hexágono. A distância entre os lados paralelos é de 24 a 26 nm. As vistas laterais mostram quatro unidades que ocupam os vértices de uma forma aproximadamente retangular com um elemento adicional no centro. A altura dos dois discos é de 16 nm. A resolução alcançada não permitiu a definição da forma do elemento central. A cavidade central apresenta 8 nm (Fig 9).

Em pH 8,6 , a hemoglobina apresenta-se com estruturas desordenadas sem indício de ordem molecular (Fig 10).

A hemoglobina nativa em pH 7,4 foi utilizada como antígeno.

3.2 - Análise sorológica da hemoglobina

Após oito dias da primeira inoculação, a hemoglobina de G.paulistus foi reconhecida pelo antissoro de coelhos imunizados, apresentando pela técnica de Ouchterlony, uma linha de precipitação tênue (Fig 11), resultado da interação entre o soro de coelho anti-HGP com o antígeno.

Os antissoros anti-hemoglobina (anti-HGP) obtidos a partir da primeira dose de reforço, revelaram mais de uma linha de precipitação (Fig 12). Os antissoros anti-HGP resultantes de um esquema de hiperimunização chegaram a detectar até quatro linhas de precipitação a,b,c e d , através da técnica de Ouchterlony. Destas quatro linhas, duas se situam junto ao poço do antígeno enquanto que as outras junto ao poço onde foi colocado o antissoro (Fig 12).



Fig 9 - Microscopia eletrônica de transmissão da hemoglobina de Glossoscolex paulistus

A hemoglobina nativa de G.paulistus contrastada com acetato de uranila a 2%, apresenta arranjo hexagonal característico das hemoglobinas de anelídeos. São dois discos hexagonais sobrepostos com uma unidade central. A distância entre os lados paralelos é de 24-26 nm, altura dos discos de 16 nm e cavidade central de 8 nm. Aumento de 120.000 vezes.

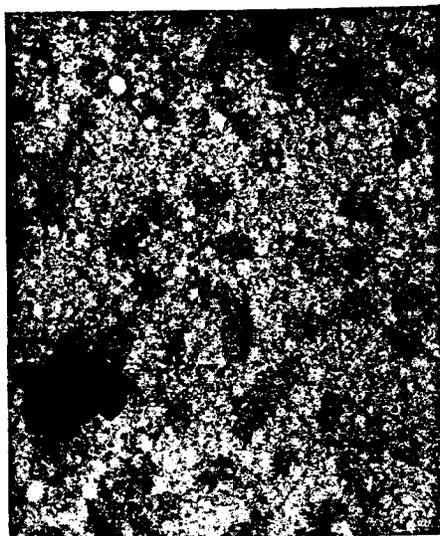


Fig 10 - Microscopia eletrônica de transmissão da hemoglobina de Glossoscolex paulistus dissociada em pH alcalino
A hemoglobina de G.paulistus sofreu tratamento isso
ciante (pH alcalino) apresentando o rompimento da es
trutura hexagonal, formando estruturas desordenadas
sem indício de ordem molecular. Aumento de 120.000x.

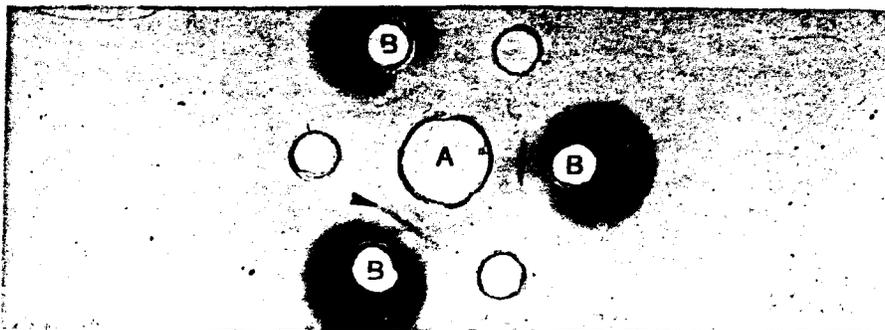


Fig 11 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1%

No poço central (A) foi aplicado o antissoro de coelho anti-HGP obtido no 8º dia após a primeira inoculação. Nos poços periféricos (B) foi aplicada a hemoglobina purificada de G.paulistus diluída em tampão fosfato se sódio 0,1M pH 7.4 mais EDTA 10^{-3} M. Uma linha de precipitação tênue foi evidenciada pelo antissoro (►).

Fig 12 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1%

O antissoro hiperimune de coelho anti-HGP foi aplicado no poço central (A) revelando quatro componentes proteicos da hemoglobina nativa de G.paulistus diluída em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 mais EDTA 10^{-3} M, que foi aplicada nos poços periféricos.

Foi possível evidenciar uma reação inflamatória do tipo Arthus nos locais de inoculação intradérmica, resultado dos "boosters" preconizados no esquema de hiperimunização (Fig 13).

3.3 - Complexo molecular hemoglobina evidenciado por PAGE/SDS

A análise em gel de poliacrilamida a 10% com SDS da hemoglobina nativa e reduzida de G.paulistus apresentou o seguinte padrão:

Na forma nativa, a hemoglobina apresentou cinco componentes principais de 70kDa, 50kDa, 33kDa, 28kDa e 12kDa, quando comparados com os marcadores de peso molecular conhecido (Fig 14).

Na forma reduzida, a hemoglobina apresentou-se com quatro componentes principais de 33kDa, 28kDa, 16kDa e 12kDa (Fig 14).

Na forma dissociada em pH alcalino, a hemoglobina apresentou o mesmo padrão evidenciado para a hemoglobina nativa - cinco bandas, evidenciadas através de eletroforese em poliacrilamida sem SDS (resultados não mostrados).

3.4 - Análise imunoeletroforética da hemoglobina nativa e dissociada

O soro hiperimune de coelho anti-HGP detectou pela técnica de imunoeletroforese em gel de ágar, três arcos de precipitação que correspondem a forma nativa obtida em pH 7,4. Estas linhas de precipitação apresentam mobilidade eletroforética anódica (Fig 15).



Fig 13 - Reação de Arthus

O esquema de hiperimunização resultou na obtenção de uma reação inflamatória do tipo Arthus, indicando uma concentração elevada de anticorpos circulantes anti-hemoglobina de Glossoscolex paulistus.

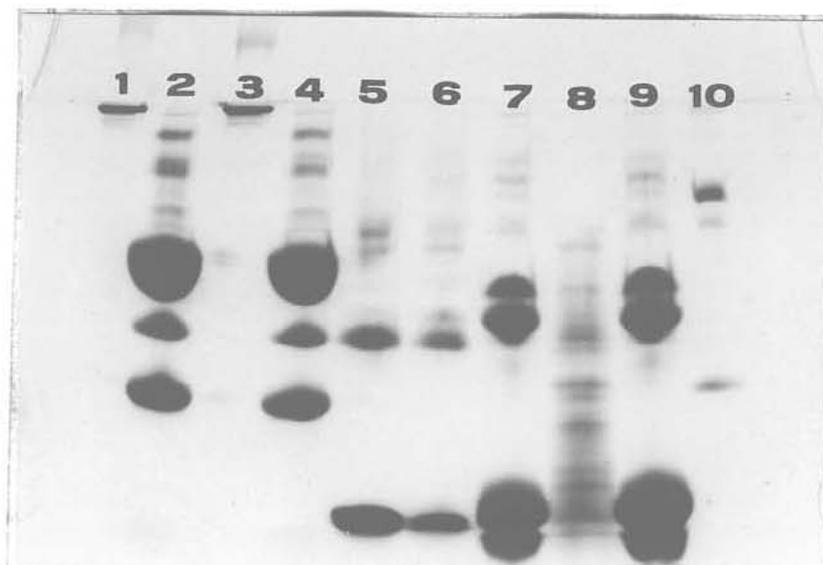


Fig 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS da hemoglobina nativa e reduzida de G.paulistus

Proteínas não reduzidas: (1) imunoglobulina monoclonal FKW isotipo IgG₃ (2) HGP-nativa (3) IgG de coelho (4) HGP nativa (5) mioglobina. Essas proteínas sofreram redução com DTT 0,1M e foram aplicadas respectivamente em (10),(9),(8),(7) e (6). Cinco componentes foram evidenciados para a hemoglobina nativa: 70kDa, 50kDa, 33kDa, 28kDa, 12kDa. Após a redução: 33 kDa, 28kDa, 16kDa e 12kDa.

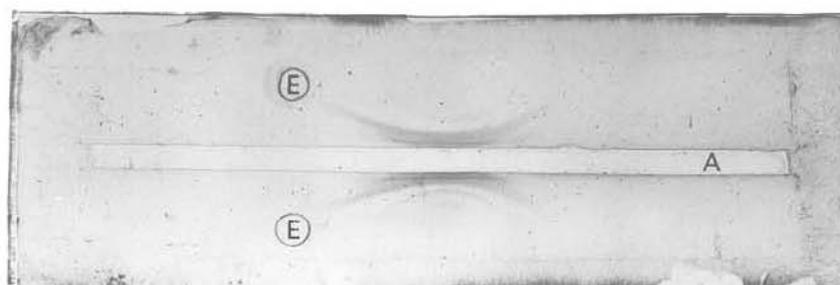


Fig 15 - Controle imunoeletroforético em gel de ágar a 1% da hemoglobina nativa de G.paulistus

Foram evidenciados pelo menos três linhas de precipitação para a proteína nativa em pH 7,4, reveladas por antissoros anti-HGP hiperimunes.

A - antissoro e E - hemoglobina nativa de G.paulistus

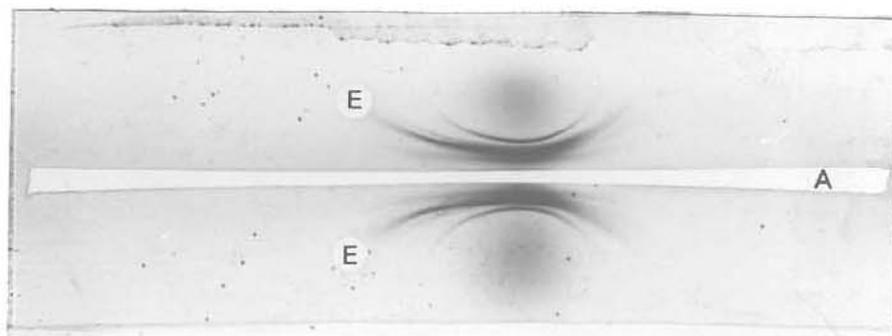


Fig 16 - Controle imunoeletroforético em gel de ágar a 1% da hemoglobina dissociada em pH alcalino

Foram evidenciadas mais de quatro linhas de precipitação para a hemoglobina dissociada em tampão Tris-HCl 0,1M com EDTA 10^{-3} M pH 8,6.

A - antissoros hiperimunes

E - hemoglobina dissociada de G.paulistus

Um padrão de mais de quatro linhas de precipitação foi evidenciado na análise imunoeletroforética da forma dissociada em pH alcalino (pH 8,6). A maioria destas linhas apresentam mobilidade eletroforética nitidamente anódica (Fig 16).

3.5 - Fracionamento da hemoglobina dissociada em gel de Sephadex G-200

A hemoglobina dissociada em pH alcalino apresentou quatro frações cromatográficas quando submetida à filtração em gel de Sephadex G-200 (Fig 17). A discriminação entre as frações cromatográficas II e III foi apenas parcial.

A razão entre as leituras a 280 nm (evidencia proteínas) e em 415 nm (evidencia grupamentos heme) evidenciou os possíveis polipeptídeos estruturais na região descendente da fração cromatográfica III (Fig 18).

3.6 - Análise antigênica das frações obtidas através da técnica de Ouchterlony e determinação do peso molecular e grau de pureza por PAGE/SDS

A fração cromatográfica I (Fig 17) apresenta uma banda de 70kDa quando analisada por PAGE/SDS (resultados não mostrados). Seu reconhecimento imunológico, uma linha de precipitação tênue próxima ao poço do antígeno só foi evidenciada quando a fração estava concentrada - por liofilização (resultados não mostrados).

A fração cromatográfica II apresentou uma banda de aproximadamente 50kDa quando submetida à eletroforese em PAGE/SDS (Fig 19). A análise através da técnica de Ouchterlony evidenciou uma linha de precipitação (Fig 20).

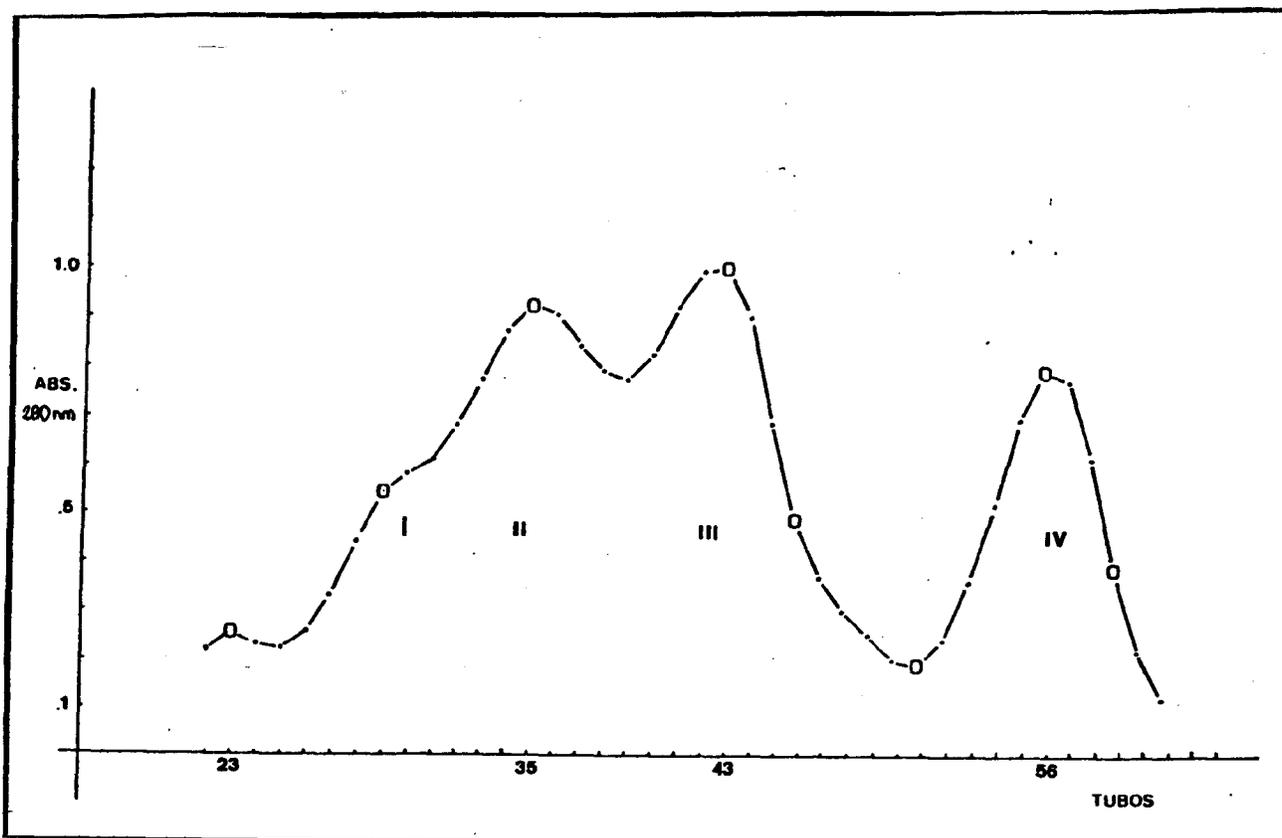


Fig 17 - Filtração em gel de Sephadex G-200 da hemoglobina dissociada de G. paulistus

Cromatografia de exclusão molecular da hemoglobina dissociada em uma coluna de Sephadex G-200 (0,9 x 100 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 9,0 mais EDTA 10^{-3} M (condições dissociantes) a 4° C e com fluxo de 5-6 ml/hora. Das frações cromatográficas foram feitas leituras em diferentes comprimentos de onda (415 e 428 nm). Quatro frações cromatográficas foram evidenciadas para a hemoglobina dissociada.

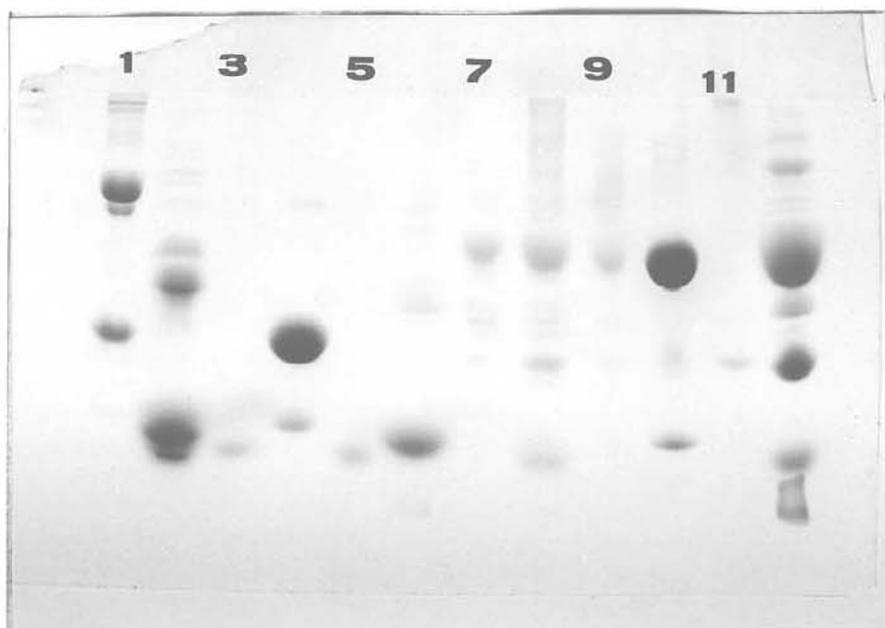


Fig 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS das frações obtidas a partir da filtração da hemoglobina de *G.paulistus* dissociada em Sephadex G-200

Redução (r) com ditiotreitol (DTT) 0,1M

Proteínas: (1) imunoglobulina monoclonal FKW isotipo IgG₃ - r, (2) HGP-r, (3) fração IV-r, (4) proteína de Bence Jones JJ0-r, (5) fração IV nativa, (6) mioglobina, (7) fração III, (8) HGP-nativa, (9) fração II, (10) Bence Jones-nativa (11) ramo descendente da fração III, (12) HGP-nativa.

A análise em PAGE/SDS da fração cromatográfica III apresentou três componentes de 50kDa, 33kDa e 28kDa (Fig 19). Est fração foi reconhecida por antissoros apresentando duas linhas de precipitação (Fig 21).

A fração cromatográfica IV apresentou apenas uma linha de precipitação bem próxima do poço central (antissoro), quando analisada pela técnica de Duchterlony (Fig 22). Por eletroforese em poliacrilamida foi evidenciada apenas uma banda de aproximadamente 12kDa para esta fração cromatográfica.

A análise pela técnica de Duchterlony das frações II e IV evidenciou identidade antigênica parcial entre os dois componentes (Fig 23).

3.7 - Afinidade pelo oxigênio da hemoglobina nativa, dissociada e da unidade monomérica 12kDa

A hemoglobina nativa de G.paulistus apresentou P_{50} igual a 6.3 mm Hg em pH 7.4 (Fig 24). O coeficiente de Hill é da ordem de 2.2. Em pH 8,6, a hemoglobina dissociada apresentou P_{50} de 13 mm Hg e a cooperatividade (coeficiente de Hill) da ordem de 2.0.

A curva de deoxigenação da hemoglobina nativa apresentou desvio do pico de absorvância de 415 nm para 428 nm, denotando ocorrência de deoxigenação (Fig 25).

A curva de deoxigenação da hemoglobina dissociada em pH alcalino não apresentou desvio da forma ξ (415nm) para deoxi (428nm). Somente após o tratamento com ditionito de sódio foi evidenciada a deoxigenação (Fig 26).

A unidade monomérica não apresentou deoxigenação após o tratamento com nitrogênio, sendo necessário o tratamento com ditionito de sódio para que se evidenciasse a deoxigenação da unidade 12kDa (Fig 27).

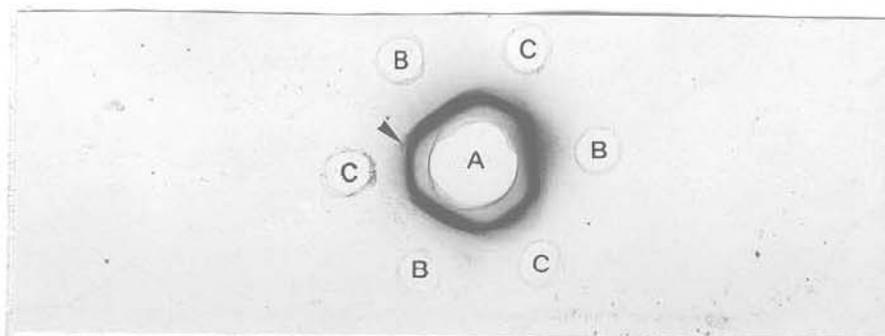


Fig 20 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1% da fração cromatográfica II.

Antissoros hiperimunes anti-HGP reconheceram a fração II obtida a partir da filtração da hemoglobina dissociada em gel de Sephadex G-200, evidenciando uma única linha de precipitação. (A) antissoro, (B) fração cromatográfica II e (C) fração cromatográfica III.

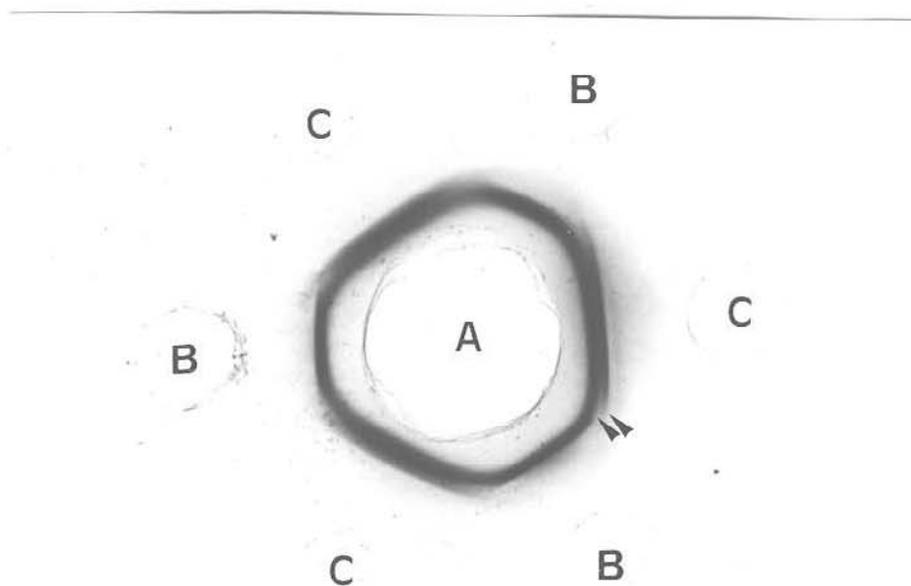


Fig 21 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1% da fração cromatográfica III

Antissoros hiperimunes anti-HGP reconheceram a fração III resultante da filtração em gel de Sephadex G-200 da hemoglobina dissociada, evidenciando duas linhas de precipitação bem próximas. (A) antissoro anti-HGP (B) fração cromatográfica II e (C) fração cromatográfica III.

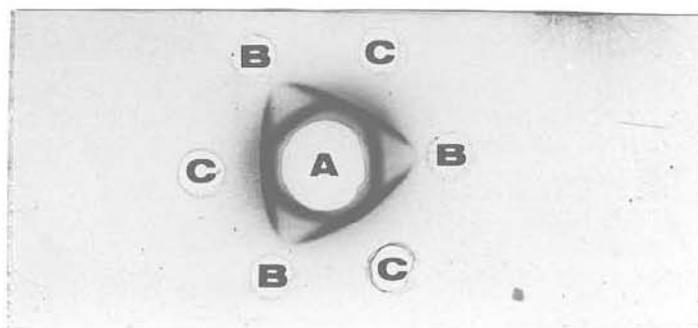


Fig 22 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1% da fração cromatográfica IV

A fração cromatográfica IV foi reconhecida pelos antissoros hiperimunes anti-HGP, evidenciando uma única linha de precipitação bem próxima do poço central. (A) antissoro (B) fração cromatográfica IV e (C) fração cromatográfica II.

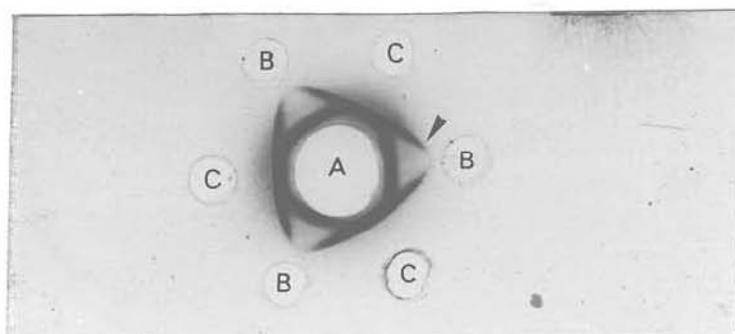


Fig 23 - Imunodifusão radial em gel de ágar a 1% da fração cromatográfica II e da fração cromatográfica IV

O antissoro hiperimune anti-HGP reconheceu as duas frações evidenciando um esporão de identidade antigênica parcial (\blacktriangleright). (A) antissoro , (B) fração cromatográfica IV e (C) fração cromatográfica II.

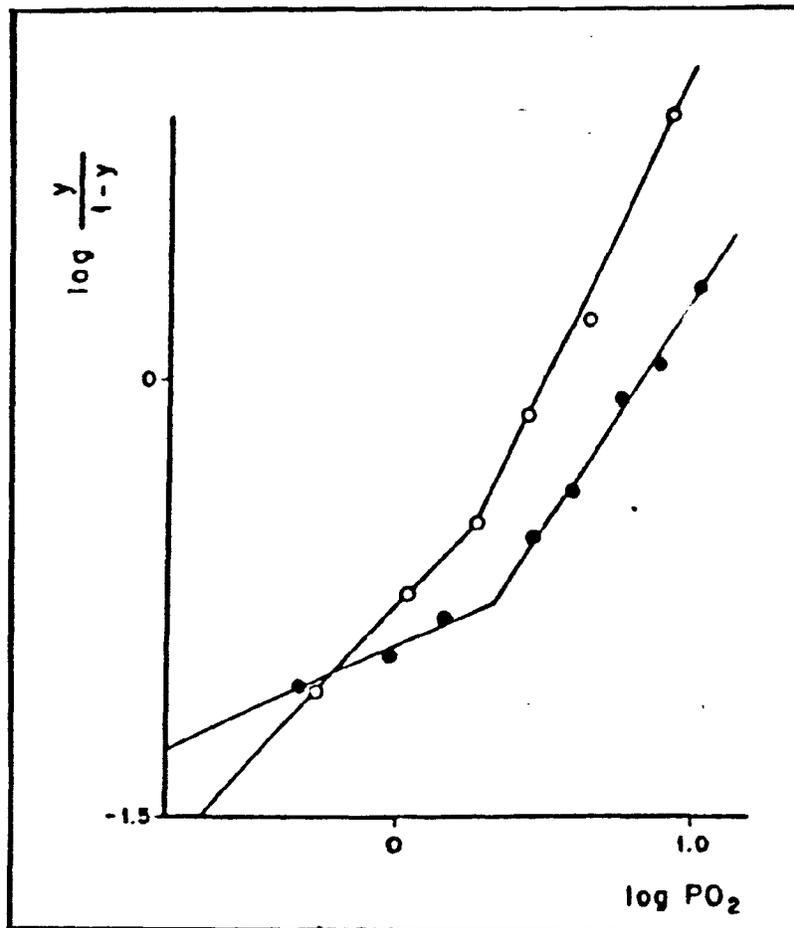


Fig 24 - Plot da curva de equilíbrio com o oxigênio da hemoglobina de Glossoscolex paulistus

A hemoglobina em pH 7.4 apresentou P_{50} de 6.3 torr e coeficiente de Hill de 2.2 . Em pH 8.0, a hemoglobina apresentou P_{50} de 13.0 torr e a cooperatividade (coeficiente de Hill) se manteve ao redor de 2.0.

(○) hemoglobina em pH 7.4

(●) hemoglobina em pH 8.0

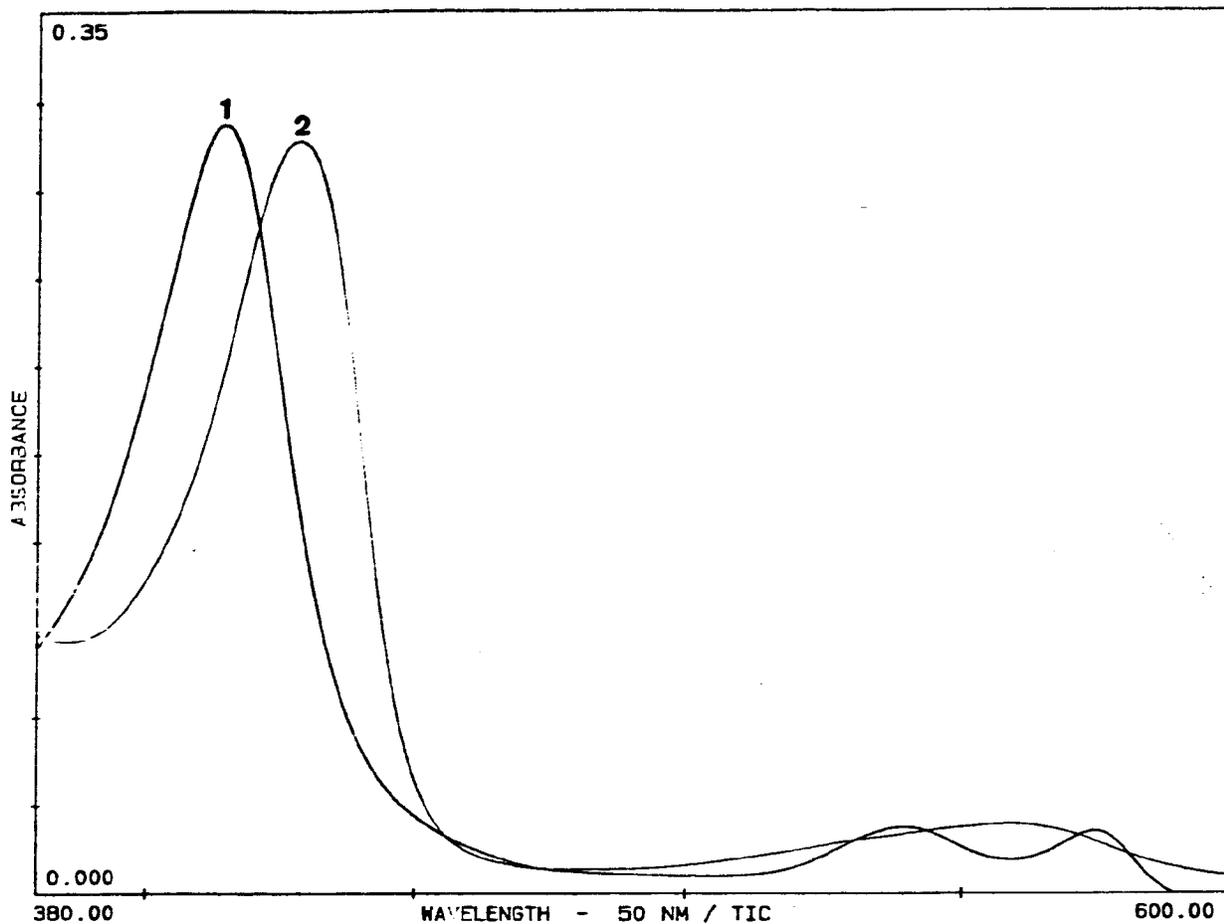


Fig 25 - Curva de deoxigenação da hemoglobina nativa de *Glossos colex paulistus* (pH 7.4)

Após cinco minutos de fluxo contínuo de nitrogênio (SS - super seco), ocorreu deslocamento do pico de absorvância de 415nm para 428nm para a hemoglobina nativa.

- (1) oxy-hemoglobina
- (2) deoxy-hemoglobina

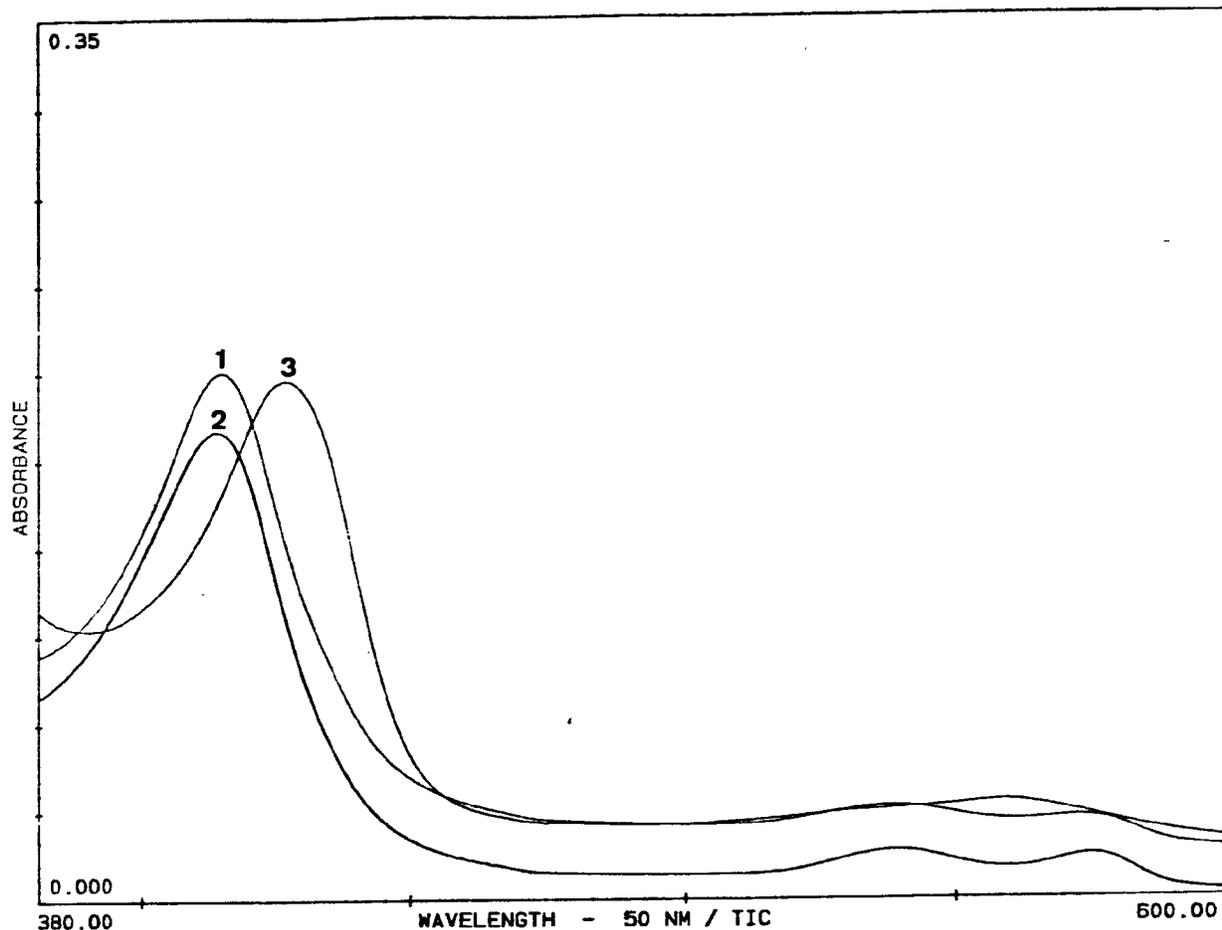


Fig 26 - Curva de deoxigenação da hemoqlobina dissociada de Glossoscolex paulistus (pH 8.6)

A hemoglobina dissociada não apresentou alteração no pico de absorbância após o tratamento com nitrogênio, sendo necessário o tratamento com ditionito de sódio (5mg/ml) para evidenciar a mudança de oxi para deoxi-hemoglobina.

- (1) oxi-hemoglobina
- (2) oxi-hemoglobina após tratamento com N_2
- (3) deoxi-hemoglobina resultante do tratamento com ditionito de sódio

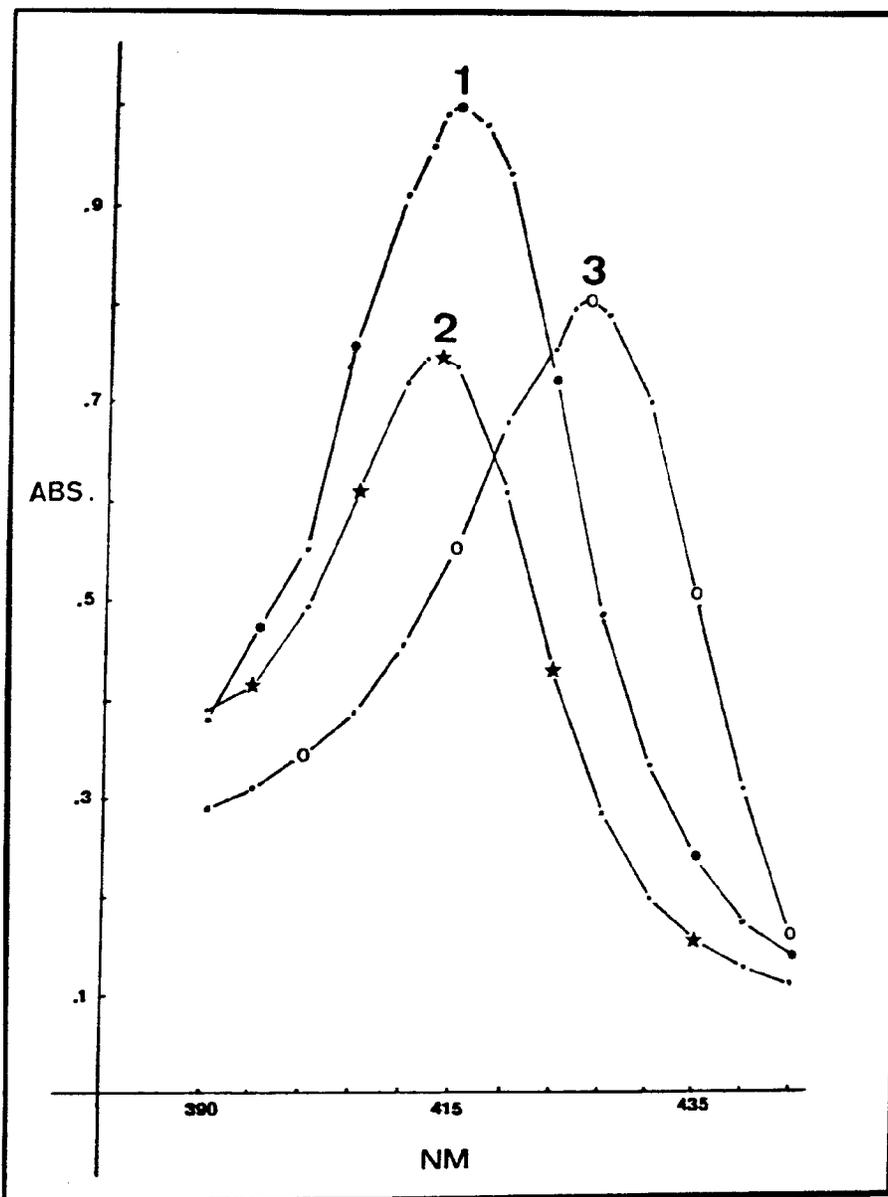


Fig 27 - Curva de deoxigenação da unidade monomérica de 12kDa da hemoglobina de Glossoscolex paulistus

A unidade monomérica não passou da forma oxi para deoxigenada após o tratamento com nitrogênio. Foi necessário o tratamento com ditonito de sódio para deoxigenar a unidade.

- (1) unidade monomérica
- (2) unidade monomérica após tratamento com N_2
- (3) unidade monomérica após o tratamento com ditonito de sódio

DISCUSSÃO

Os resultados de microscopia eletrônica mostram que a hemoglobina extracelular de Glossoscolex paulistus apresenta um arranjo molecular característico dentro do grupo da hemoglobinas de invertebrados (Fig 9). Essa hemoglobina é formada de dois discos hexagonais sobrepostos apresentando distância entre os lados paralelos e altura similares às hemoglobinas descritas (Tabela 2).

Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão da hemoglobina de G.paulistus dissociada em pH alcalino, evidenciaram o rompimento da estrutura hexagonal característica, sem indício de ordem molecular (Fig 10), como evidenciado para diferentes hemoglobinas dissociadas através de tratamento em pH alcalino ou ácido (Ochiai et al.,1981; Chiancone et al., 1972; David et al.,1973; Ochiai et al.,1982).

<u>Lumbriccus terrestris</u>	
<u>Tubifex tubifex</u>	
<u>Arenicola marina</u>	30 x 20 nm
<u>Macrobdela decora</u>	
<u>Myxicola infundibulum</u>	29 x 19 nm
<u>Amphitrite ornata</u>	26 x 16 nm
<u>Nephtys incisa</u>	31 x 19 nm
<u>Haemopsis sanguisuga</u>	24 x 15 nm
<u>Glossoscolex paulistus</u>	25 x 16 nm

Tabela 2 - Comparação entre diferentes hemoglobinas de invertebrados

Dimensões entre os lados paralelos e altura.

(Kapp et al.,1982; Messerschmidt et al.,1983; Vinogradov et al.,1985a; Kapp et al.,1985; Vinogradov, 1985)

O grau de resolução da metodologia empregada permitiu evidenciar nas micrografias da hemoglobina de G.paulistus, algumas moléculas que apresentam material proteico na cavidade central, como evidenciado em algumas hemoglobinas como a de Onchocerca volvulus (Van Bruggen e Weber, 1974) e a de Nephtys incisa (Messerchmidt et al., 1983). Para alguns autores, esse material de natureza proteica sugere ser uma 13ª subunidade. Estudos de difração de raio X a baixo ângulo desenvolvidos por Pilz (1982), sugerem que a maioria das hemoglobinas de invertebrados apresentam essa subunidade, mas devido à sua baixa concentração proteica torna difícil a sua caracterização ao microscópio eletrônico. As hemoglobinas de invertebrados apresentam teor reduzido de ferro (2/3) em relação às hemoglobinas de vertebrados. As variações encontradas nas razões proteína/heme nas diferentes hemoglobinas analisadas poderia estar relacionada com o material proteico da cavidade central (Fushitani et al., 1986).

Os resultados sorológicos obtidos pela técnica de Ouchterlony (Fig 11) indicaram o reconhecimento antigênico da hemoglobina nativa de G.paulistus a partir do 8º dia após a primeira inoculação. Isto sugere que este complexo molecular é bastante antigênico possivelmente devido ao seu elevado peso molecular (Roesel, 1983).

Soros hiperimunes anti-HGP obtidos a partir de um esquema de imunização como descrito em materiais e métodos, foram selecionados por análise quantitativa através da técnica de Ouchterlony (Fig 12) e intensidade da reação de Arthus (Fig 13). Estes antissoros reconheceram quatro componentes proteicos principais a, b, c e d para a hemoglobina nativa.

A análise imunoeletroforética revelou que a hemoglobina de G. paulistus dissociada em pH alcalino apresenta mais de quatro arcos de precipitação (Fig 16) quando comparada com a hemoglobina nativa, sugerindo que estes outros arcos corresponderiam a epitopos, os quais as moléculas de anticorpo não teriam acesso devido à estrutura molecular da hemoglobina original. Somente após o tratamento dissociante estes neo-antígenos ficariam expostos (Meirelles et al., 1987).

A hemoglobina nativa submetida a análise em PAGE/SDS apresentou as bandas eletroforéticas de aproximadamente 12kDa, 28kDa, 33kDa, 50kDa e 70kDa quando comparadas aos marcadores de peso molecular conhecido (Fig 14). Estes cinco componentes principais podem ser interpretados como diferentes tipos de unidade que compõem o complexo final hemoglobina.

A análise da hemoglobina reduzida com DTT pela técnica de PAGE/SDS, apresentou quatro componentes de aproximadamente 12kDa, 16kDa, 28kDa e 33kDa. As unidades 12kDa, 28kDa e a 33kDa são evidenciadas na hemoglobina nativa e reduzida sugerindo que estas unidades são formadas por uma única cadeia polipeptídica cujas pontes dissulfeto apresentam disposição intra-cadeia. O aumento de peso molecular aparente que ocorre com as unidades 28.000 e 33.000 (Fig 14) pode ser interpretado como uma modificação estrutural através do rompimento das pontes dissulfeto, passando a proteína da forma globular à filamentosa, que apresenta maior resistência ao gel (Meirelles et al., 1987).

A unidade 50kDa não foi evidenciada na hemoglobina reduzida com DTT. O aparecimento de uma banda contendo a unidade 16kDa sugere que esta unidade 50kDa poderia ser formada por três cadeias de 16kDa ou uma cadeia de 16kDa e outra de 33kDa cujo peso molecular é idêntico na forma nativa e na for

Os resultados de filtração em gel de Sephadex G-200 da hemoglobina de G.paulistus dissociada em pH alcalino mostram a presença de quatro picos (Fig 17), com perfil cromatográfico semelhante ao descrito para a hemoglobina de L.terrestris (Vinogradov et al.,1977).

A análise em PAGE/SDS da fração cromatográfica I apresentou uma única banda de peso molecular ao redor de 70.000 que corresponderia à unidade tetramérica presente na hemoglobina nativa (resultados não mostrados). Os soros h perimunes não devem ter reconhecido o tetrâmero possivelmente por essa unidade apresentar baixa concentração dentro da hemoglobina nativa utilizada como antígeno para produção de antissoros específicos (Vinogradov,1985).

A fração cromatográfica II apresentou uma única banda de aproximadamente 50kDa e que corresponderia a unidade trimérica formada a partir de três cadeias de 16kDa. A análise por imunodifusão radial em gel de ágar desta unidade 50kDa revelou uma única linha de precipitação intensa, sugerindo que a unidade trimérica apresenta-se em elevada concentração dentro do complexo hemoglobina nativa. Os resultados de literatura indicam ser a unidade trimérica participante em mais de 60% do complexo total, corroborando os resultados obtidos para a hemoglobina de G.paulistus (Vinogradov,1985).

A fração cromatográfica III submetida à eletroforese em PAGE/SDS apresenta as unidades 50kDa, 33kDa e 28kDa, mostrando que a separação entre as frações II e III foi apenas parcial devido a unidade 50kDa estar presente nas duas frações. A análise em PAGE/SDS tubo a tubo mostrou a presença das unidades 28 e 33kDa na região descendente da fração III (resultados não apresentados) e que foram caracterizados através da relação entre as leituras 280 415 nm (Fushitani e Riggs,1986), como polipeptídeos estruturais por apresentarem bai

xa concentração de grupamentos heme (Fig 18) distintos da unidade 50kDa. Estes polipeptídeos estruturais são evidenciados para a hemoglobina de *L. terrestris* (Riggs, 1986) e são importantes na formação do complexo hemoglobina final (Vinogradov, 1985). Antissoros hiperimunes anti-HGP identificaram a fração III através da técnica de Ouchterlony, apresentando duas linhas de precipitação (Fig 21), uma delas correspondente ao trímero 50kDa e a outra às unidades 33 e 28kDa cujos arcos de precipitação se sobrepõem devido possuírem pesos moleculares próximos.

A análise eletroforética em PAGE/SDS da fração cromatográfica IV revelou uma única banda proteica na forma nativa e na forma reduzida de peso molecular 12.000. Esta banda corresponde à unidade monomérica principal de *G. paulistus*. Esta banda foi reconhecida antigenicamente através da técnica de Ouchterlony (Fig 22) apresentando uma única linha de precipitação denotando o grau de pureza e ausência de contaminantes. Este resultado serviu como critério de pureza e homogeneidade molecular para justificar os experimentos de deoxigenação, caracterizando a atividade biológica da unidade monomérica.

Através dos estudos de antigenicidade pela técnica de Ouchterlony foi possível evidenciar identidade antigênica parcial entre a unidade 50kDa e a unidade 12kDa, significando que a unidade 50kDa apresenta semelhança estrutural com a unidade monomérica. Este resultado leva a sugerir que possivelmente as cadeias que constituem a unidade trimérica apresentam homologia parcial a nível de estrutura primária com o monômero.

As curvas de equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio mostram um valor de P_{50} igual a 6.3 torr, determinado em pH 7,4 (nativa - Fig 24). Este valor está dentro das variações encontradas para as outras hemoglobinas de invertebrados (Rossi-

- Fanelli et al.,1970; David e Daniel,1973). O coeficiente de Hill calculado a partir dos resultados obtidos é da ordem de 2.2 (>1.0) para a hemoglobina nativa, refletindo uma interação heme-heme positiva resultado da cooperatividade entre os grupamentos heme que compõem o complexo hemoglobina.

As curvas de equilíbrio da hemoglobina de G.paulistus em pH 8,0 mostram que foi necessário uma maior pressão de oxigênio para que ocorresse a saturação de 50% dos grupamentos heme. O coeficiente de Hill da hemoglobina em pH 8,0 é da ordem de 2.0, refletindo uma alteração suave na cooperatividade da molécula. Neste caso, poderíamos supor que a alteração estrutural provocada pelo tratamento em pH alcalino (pH 8,0), não interferiu de maneira significativa nas unidades funcionais que compõem a molécula de hemoglobina .

Análises repetidas de titulação da molécula de hemoglobina de G.paulistus com o oxigênio mostram que a hemoglobina não apresenta ponto isobéptico nos comprimentos de onda de 360 a 600 nm (Fig 25). A falta de isobesticidade é um possível indicativo da presença de mais de uma espécie espectral que ocorre devido a alteração de resíduos na vizinhança do heme (Peisach et al.,1978).

As variações observadas na atividade biológica das hemoglobinas de invertebrados evidenciam que estas hemoglobinas são complexos moleculares que variam de acordo com o ambiente no qual esses animais vivem (Dickerson e Geis.1983). O oligochaeta Glossoscolex paulistus da família Glossoscolecidae ocorre principalmente em solos calcários cuja composição básica apresenta íons cálcio que interferem na atividade biológica da maioria das hemoglobinas de invertebrados (Fushitani e Riggs,1986).

Os experimentos de deoxigenação da hemoglobina de G. paulistus nativa apresentam uma curva característica dentro das hemoglobinas de invertebrados descritas, evidenciando um pico de absorvância da hemoglobina na forma oxigenada a 415 nm e para a hemoglobina deoxigenada a 428 nm (Fig 25).

A hemoglobina dissociada em pH alcalino apresenta alta afinidade pelo oxigênio, sendo necessário o tratamento com ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) para que ocorresse a deoxigenação (Fig 26). Este resultado sugere que as unidades resultantes da dissociação: polipeptídeos estruturais, dímeros trímeros e monômeros, quando isolados, não são capazes de ligar o oxigênio reversivelmente. Estas unidades se combinam e formam uma unidade funcional que se liga ao oxigênio de maneira reversível efetuando o transporte. A necessidade de formação de uma "unidade funcional" está bem caracterizada para a hemoglobina de L. terrestris (Riggs, 1990).

A unidade monomérica de 12kDa apresenta afinidade pelo oxigênio semelhante àquela encontrada para a hemoglobina dissociada, sendo necessário o tratamento com ditionito de sódio para a liberação do oxigênio (Fig 27). Este resultado é compatível com aqueles apresentados na literatura mostrando que esta unidade isolada não é capaz de ligar o oxigênio reversivelmente, apresentando afinidade pelo O_2 tão elevada quanto à da mioglobina cujo papel é estocar o oxigênio nos músculos (Dickerson e Geis, 1983).

A diversificação das unidades que compõem o complexo molecular hemoglobina poderia ter ocorrido a partir da duplicação gênica originando cópias múltiplas de gene globina. Se pelo menos uma das cópias permaneceu produzindo a proteína original, as outras cópias puderam acumular mutações que permitiram modificações estruturais e/ou funcionais sem comprometer a sobrevivência do organismo (Fig 29).

O monômero, unidade 12kDa, poderia ser considerado o produto do gene que sofreu duplicação. As diferentes cópias formariam cadeias polipeptídicas que possuem peso molecular variando de 12.000 a 19.000, resultantes de modificações ocorridas no processo de corte do DNA devido à mudanças nos sítios de restrição (Gilbert, 1978).

As cópias do gene globina que codificam a unidade de 16kDa devem ter sofrido mutações que permitiriam o estabelecimento de pontes dissulfeto intra-cadeias, formando as unidades 50kDa. Esta unidade 50kDa seria resultado da união de três cadeias polipeptídicas de 16kDa (Fig 29).

Estudos antigênicos feitos através da técnica de Ouchterlony evidenciaram identidade antigênica parcial entre as unidades 50kDa e a unidade monomérica 12kDa (Fig 23) demonstrando uma possível origem comum. A partir do reconhecimento antigênico da unidade monomérica 12kDa, abre-se perspectivas para estudos de relações filogenéticas entre diferentes hemoglobinas, pelo fato de ser essa unidade monomérica encontrada em todas as hemoglobinas.

O trîmero 50kDa deve ter sido selecionado por pressão do ambiente por se associar com o monômero 12kDa (ligação não-covalente) formando uma unidade funcional eficaz no transporte de oxigênio. Esta sugestão é sedimentada pelos experimentos de deoxigenação onde os produtos de dissociação não são capazes de ligar o oxigênio de maneira reversível (Fig 25).

As unidades 28 e 33kDa são resultado da transcrição direta de dois genes globina adjacentes. Esta hipótese já foi evidenciada no caso da hemoglobina dimérica de Glycera (Riggs et al., 1986), onde foram evidenciados apenas 6 nucleotídeos (dois resíduos de aminoácidos) separando os dois genes. Complementando com os resultados de PAGE/SDS (Fig 14), fica evi-

dente que não se trata de suas cadeias monoméricas ligadas por pontes dissulfeto.

Apesar da maioria das hemoglobinas de invertebrados a apresentar dímeros com dois domínios funcionais, os dímeros encontrados na hemoglobina de G.paulistus são considerados polipeptídeos estruturais por apresentarem uma quantidade reduzida de grupamentos heme (Fig 18). Durante a evolução, poderiam ter ocorrido modificações que alterariam o sítio de ligação do grupamento heme. Um processo semelhante foi proposto para a hemoglobina de Lamellibranchia sp (Suzuki et al., 1990) onde ocorre a perda do primeiro exon do primeiro domínio e do último exon do terceiro domínio. O segundo domínio apresenta-se incapaz de ligar o grupamento heme por não apresentar histidina proximal. Apesar de terem perdido "metade" de sua funcionalidade, estes polipeptídeos estruturais permaneceram durante a evolução por agirem como "linkers" entre as unidades funcionais.

O modelo estrutural da hemoglobina de G.paulistus proposto por Souza (1990), definido através da metodologia de difração de raio X a baixo ângulo, propõe que a região das unidades que apresentam grupamentos heme (mais eletrônicas) se localizam no centro da molécula (Fig 30). As unidades consideradas estruturais por possuírem menor quantidade de grupamentos heme (menos eletrônicas) estariam na superfície da molécula e agindo como "linkers" entre as unidades funcionais. Levando em consideração que os grupamentos heme ficam enterrados na proteína, poderíamos supor que as unidades funcionais estariam protegidas pelas unidades estruturais que se localizam na superfície da molécula (Fig 30).

Os resultados obtidos no presente trabalho juntamente com o modelo proposto, permite sugerir uma possível localização das unidades 70kDa, 50kDa, 33kDa, 28kDa e 12kDa (Fig 30).

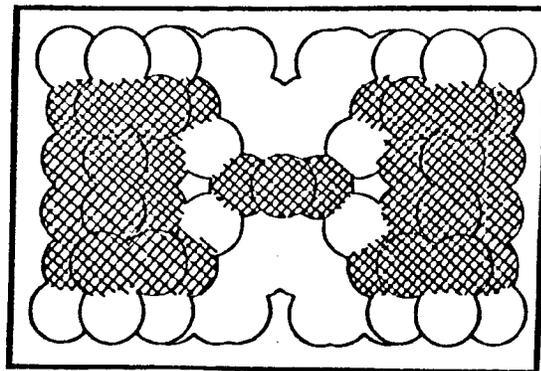
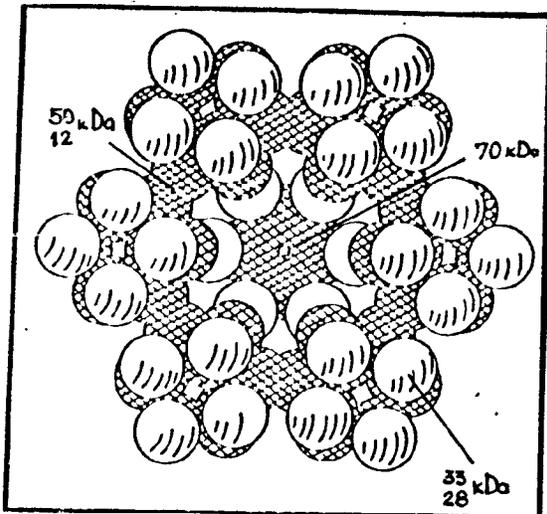


Fig 30 - Modelo de esferas proposto por Souza (1990).

Possível localização das unidades: monômeros, dímeros e trímeros, que compõem o complexo hemoglobina de Glossoscolex paulistus

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem uma possível estrutura molecular para a hemoglobina de Glossoscolex paulistus. Comparações poderão ser feitas entre outras hemoglobinas, pois o oligochaeta G.paulistus ocorre somente na região de Rio Claro, Araras e Piracicaba, podendo apresentar diferenças estruturais e/ou funcionais quando comparado com outros oligochaetas. A caracterização da estrutura primária da unidade monomérica 12kDa de G.paulistus isolada a partir da filtração em Sephadex G-200 (Fig 17) contribuiria para possíveis especulações sobre a estrutura do gene(s) que codificam essa cadeia polipeptídica em particular. Os estudos de homologia sequencial com outros monômeros de outras hemoglobinas contribuiria para esclarecer a evolução da família globina.

- 1 - A hemoglobina de Glossoscolex paulistus é constituída de dois discos hexagonais sobrepostos com uma unidade central.
- 2 - As dimensões da molécula são: distância entre os lados paralelos 24-26 nm, altura 16 nm e cavidade central 8 nm.
- 3 - O complexo hemoglobina é formado por cinco unidades principais de 70kDa, 50kDa, 33kDa, 28kDa e 12kDa. Todas essas unidades foram reconhecidas antígenicamente por antissoros hiperimunes de coelho.
- 4 - A unidade 70kDa é um tetrâmero formado por quatro cadeias polipeptídicas de 16kDa. Sua concentração dentro do complexo total é reduzida.
- 5 - A unidade 50kDa é o trímero formado por três cadeias polipeptídicas de 16kDa. Sua participação no complexo total é de aproximadamente 60%.
- 6 - As unidades 33 e 28kDa são dímeros formados a partir da transcrição direta de dois genes globina adjacentes. Esses dímeros são considerados polipeptídeos estruturais por apresentarem número reduzido de grupamentos heme.
- 7 - A unidade 12kDa é o monômero, a menor unidade encontrada em todas as hemoglobinas de invertebrados.
- 8 - As cadeias polipeptídicas que formam o trímero 50kDa apresentam homologia estrutural com o monômero 12kDa, sugerindo uma possível origem comum.
- 9 - A hemoglobina nativa (pH 7.4) apresenta pico de absorção máximo em 415nm para sua forma oxigenada e outro pico a 428nm para a forma deoxigenada.

- 10 - A hemoglobina dissociada em pH alcalino não é capaz de se ligar de forma reversível ao oxigênio, sendo necessário o tratamento com ditionito de sódio para que ocorresse a deoxigenação.
- 11 - A hemoglobina dissociada em pH 8,6 perde sua estrutura hexagonal característica deixando em evidência neo-antígenos não identificados na hemoglobina nativa.
- 12 - A unidade monomérica de 12kDa não é capaz de liberar o oxigênio sem sofrer o tratamento drástico com ditionito de sódio.
- 13 - Unidade funcional: trímero 50kDa + monômero 12kDa
- 14 - As unidades funcionais se localizam no centro da molécula e seus respectivos grupamentos heme são protegidos da oxidação pelos polipeptídeos estruturais que se encontram na superfície da molécula e ligando as unidades funcionais.

RESUMO

A hemoglobina extracelular de Glossoscolex paulistus (oligochaeta - glossoscolecidae) apresenta peso molecular aproximado de 3.10^6 e é formada por cinco unidades principais de: 70kDa, 50kDa, 33kDa, 28kDa e 12kDa.

Estudos eletroforéticos em poliacrilamida (PAGE/SDS) evidenciaram ser a unidade 70kDa o tetrâmero formado por quatro cadeias polipeptídicas de 16kDa, a unidade 50kDa o trímero formado por três cadeias de 16kDa, as unidades 33 e 28kDa dímeros de cadeia única e a unidade 12kDa o monômero, a menor unidade encontrada nas hemoglobinas de invertebrados.

A hemoglobina nativa (pH 7,4) apresenta afinidade pelo oxigênio ($P_{50} = 6.6$ torr) maior que a hemoglobina humana e menor do que a mioglobina. A hemoglobina dissociada em pH alcalino apresenta menor afinidade pelo oxigênio sendo necessário quantidade de O_2 maiores para saturar 50% dos grupamentos heme. A ligação do oxigênio na hemoglobina dissociada é irreversível sendo necessário o tratamento com ditonito de sódio para que ocorresse a deoxigenação.

Através da filtração da hemoglobina dissociada em gel de Sephadex G-200, foi possível isolar o monômero 12kDa. Esse monômero apresenta homologia com a mioglobina e sua afinidade pelo oxigênio é similar à mioglobina. Estudos imunológicos indicaram a identidade antigênica parcial entre o monômero 12kDa e o trímero 50kDa, sugerindo que possivelmente as cadeias polipeptídicas que formam o trímero são homólogas às cadeias monoméricas a nível de sequência primária. Este resultado sugere que as unidades que formam o complexo final partilham de um gene ancestral comum e que por pressão evolutiva se agregaram a fim de otimizar o transporte do oxigênio.

Um modelo localizando as unidades dentro do complexo total é sugerido indicando que as unidades funcionais se encontram no centro da molécula e são protegidas da oxidação pelos polipeptídeos estruturais que se encontram por toda a superfície da molécula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - Referências bibliográficas

- Antonini, E. and Brunori, M. - Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands. Amsterdam, North Holland, 436, 1971
- Benesh, R. and Benesh, R.E. - Organic phosphatases as regulators of oxygen release by hemoglobin. Nature 221: 618-622, 1969
- Benesh, R.; Macduff, G. and Benesh, R.E. - Determination of oxygen equilibrium with versatile tonometer. Analyt. Biochem. 11: 81-87, 1965
- Bogusz, D.; Appleby, C.A., Landsman, J.; Dennis, E.S.; Trinik, M. and Peacock, W.J. - Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. Nature 331: 178-180, 1988
- Chance, B.; Waterland, R.A., Tanaka, S. and Poyton, R.O. - Mitochondrial function in normal and genetically altered cells and tissues. Ann.N.Y.Acad.Sci. 550: 360-379, 1988
- Chiancone, E.; Brenowitz, M.; Ascoli, F.; Bonaventura, C. and Bonaventura, J. - Amphitrite ornata erythrocytes I- structural properties and characterization of subunit interactions. Biochim. Biophys. Acta. 623: 146-162, 1980
- Dickerson, R.E. and Geis, I. - Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park Calif., 66-115, 1983

Ditterbrandt, M. - Application of Weich Selbaum Biuret reagent to the determination of spinal fluid protein. Am.J.Clin.Path. 18: 439-443, 1948

Freund, J. - The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuber.Res. 7: 130-132, 1965

Fushitani, K.; Matsuura, M.S.A. and Riggs, A.F. - Aminoacid sequences of chains a, b and c that form the trimer subunit of the earthworm extracellular hemoglobin from Lumbriccus terrestris. J.Biol.Chem. 263: 6502-6517, 1988

Gaspar, J.O.; Beriam, L.O.S.; Airoidi, L.P. and Oliveira, A.R. - Detection of snail hemocyanin in the whole hemolymph by serologically specific electron microscopy. Imm.Letters 6: 323-325, 1983

Gaul, D.F.; Gray, G.O. and Knaff, D.B. - Isolation and characterization of two soluble heme c- containing proteins from Chromatium vinosum. Biochem.Biophys.Acta. 723: 333-339, 1983

Ghiretti-Magaldi, A.; Zanotti, G.; Tognon, G. and Mezzalana, V. - The molecular architecture of the extracellular hemoglobin of Ophelia bicornis. Biochim.Biophys.Acta 829: 144-149, 1985

Gilbert, W. - Why genes in pieces? Nature 271: 501, 1978

Go, M. - Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. Nature 291: 90-92, 1981

Grabar, P. and Williams, C.A. - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétique et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. Biochem. Biophys. Acta 10: 193-194, 1953

Hendry, G.A.F. and Jones, O.T.G. - Maemes and chlorophylls - comparison of function and formation. J. Med. Genetics 17: 1-14, 1980

Jensen, E.O.; Paludan, K.; Hyldig-Nielsen, J.J.; Jorgensen, P. and Macker, K.A. - The structure of a chromosomal leghemoglobin gene from soybean. Nature 291: 677-679, 1981

Jhian, S.; Garey, J. and Riggs, A.F. - Exon-intron in genes of earth worm and vertebrate globins. Science 240: 334-336, 1988

Jhian, S. and Riggs, A.F. - The structure of the gene encoding chain c of the earthworm Lumbriculus terrestris hemoglobin. J. Biol. Chem. 264: 19003-19008, 1989

Kapp, D.H.; Ohtsuki, M.; Crewe, A.V. and Vinogradov, S.N. - Scanning transmission electron microscopy of extracellular invertebrate hemoglobins. Biochim. Biophys. Acta. 704: 546-548, 1982

Keilin, D. Occurrence of hemoglobin in yeast and the supposed stabilization of the oxygenated cytochrome oxydase. Nature 172: 390-393, 1953

Keilin, D. and Tissieres, A. - Hemoglobin of moulds: *Neurospora crassa* and *Penicillium notatum*. Nature 102: 393-394, 1956

Killmartin, J.V. - The alkaline Bohr effect of human hemoglobin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 241: 465-471, 1974

Koppenheffer, T.L.; Ginsberg, S. and Terwilliger, R.C. - Serological unrelatedness of two terebellid polychaeta hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol. 58A: 341-342, 1977

Maines, M.D. - Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. Faseb. J. 2 (10): 2557 - 2567, 1988

Mainwaring, M.G.; Lugo, S.D.; Fingal, R.A.; Kapp, O.H. and Vinogradov, S.N. - Dissociation of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris* at acid pH and its reassociation at neutral pH. J. Biol. Chem. 261: 10899-10908, 1986

Meirelles, N.C.; DePaula, E.; Gaspar, J.O. - Propriedades funcionais da hemoglobina extracelular do oligochaeta *Pheretima hawayana*. Anais do II encontro Paulista de Fisiologia Comparada (IV Seminário Regional de Ecologia), São Carlos - SP, 1984

Meirelles, N.C.; Oliveira, B.; Oliveira, A.R.; DePaula, E.; Marangoni, S. and Rennebeck, G.M. - Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (oligochaeta-glossoscolecidae): dissociation at alkaline pH and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron microscopy studies. Comp. Biochem. Physiol. 88A: 377-379, 1987

- Meirelles, N.C.; Oliveira, B.; DePaula, E.; Marangoni, S. and Marques, M.R.F. - Erythrocytorin of Glossoscolex paulistus (oligochaeta - glossoscolecidae): presence of disulfide bonds and their relation to ligand properties. Comp. Biochem. Physiol. 82A 203-205, 1985
- Messerschmidt, U.; Wilhelm, P.; Pilz, I.; Kapp, O.H. and Vinogradov, S.N. - The molecular size and shape of the extracellular hemoglobin of Nephtys incisa. Biochim. Biophys. Acta 742: 366-373, 1983
- Ochiai, T. and Enoki, Y. - The molecular architecture and the subunits of earthworm (Eisenia foetida) hemoglobin. Comp. Biochem. Physiol. 88: 275-279, 1981
- Peisach, J. and Blumberg, W.E. - A comparative EPR studies of hemoglobins A and Kansas: spectral signatures of affinity states. Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities. Academic Press, Ed. W.S. Caughey, 1978
- Perutz, M.F. - Regulation of the oxygen binding affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. Ann. Rev. Biochem. 48: 327-386, 1979
- Riggs, A.F. - The Bohr effect. Ann. Rev. Physiol. 50: 181-204, 1988
- Riggs, A.F.; Riggs, C.K.; Lin, J.R. and Domdey, H. - Cloning of the cDNA for the globin from the clam Barbatia reevena. Invertebrate Oxygen Carriers Ed. by Bernt Linzen Spring-Verlag Berlin Heidelberg 473-476, 1986

- Righi, G. - Topography of circulatory system of Glossoscolex paulistus (Michaesen, 1926) oligochaeta - glossoscolecidae. Monitore Zool. Ital. 6: 19-36, 1972
- Runnegar, G. - Distribution of the globin from type b cytochromes. J. Mol. Evol. 21: 33-41, 1984
- Santucci, R.; Chiancone, E. ; Giardina, B. - Oxygen binding of Octalassium complanatum erythrocyte cytochrome. Modulation of hemo and heterotropic interactions by cations. J. Mol. Biol. 179: 713-727, 1984
- Shapiro, A.L.; Vinuela, E. and Marzel Jr., J.V. - Molecular weight of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrilamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28(5): 815-820, 1967
- Suzuki, T. and Gotoh, T. - The complete amino acid sequence of the giant multisubunit hemoglobin from the polychaete Tylorrichus heterochaetus. J. Biol. Chem. 261: 9257-9267, 1986
- Suzuki, T.; Takagi, T.; and Ohta, S. - Primary structure of a linker subunit of the tube worm 3000kDa hemoglobin. J. Biol. Chem. 1990 "in press"
- Vinogradov, S.N. - The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocytins and chlorocytins). Comp. Biochem. Physiol. 82A: 1-15, 1985

Vinogradov, S.N. and Orii, Y. - Subunits of Potamilla leptochaeta chlorocruorin. Comp.Biochem.Physiol. 67B: 183-185, 1980

Vinogradov, S.N.; Shlom, J.M.; Hall, B.C. Kapp, D.H. and Mizukami, H. The dissociation of Lumbriccus terrestris hemoglobin: a model of its subunits structure. Biochim.Biophys.Acta 192: 137-155, 1977

Weber, K. and Osborn, M. - The reability of molecular weight determination by duodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244(16): 4406-4412, 1969

Xia, Z.X. and Matthews, F.S. - Molecular structure of flavocytochrome b_2 at 2.4 Å resolution. J.Mol.Biol. 1990 "in press"

Yoshimoto, A.; Sakajo, S.; Minagawa, N. and Komiyama, T. - Possible role of a 36kDa protein induced by respiratory inhibitors in cyanide-resistant respiration in Hansenula anomala. J.Biochem. 105: 864-866, 1989