

Impl.

HÉLIO FROTA VIEIRA *rt*

ESTUDOS DE ALTERAÇÕES CONFORMACIONAIS EM HEMOGLOBINAS DE ANFÍBIOS.

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador

Prof. Dr. ALDO FOCESI Jr.

Campinas

1978

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A minha mãe

Laise

Cássio e Daniel

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior, pelo incentivo, oportunidades e ensinamentos proporcionados durante a realização deste trabalho em que nos orientou, nossos sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Plínio Alves de Moraes, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas e ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento.

Aos Profs. Drs. Nilce C. Meirelles, Antonio Ari Gonçalves, Hebe M.L. de Souza e Tomhiko Sekino, pelas correções e sugestões dadas ao presente trabalho.

A todos os Professores e colegas do Departamento de Bioquímica, em especial à Nilce C. Meirelles e Maria Laise C. Vieira, que muito contribuíram na execução deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pedro Barroso e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na pessoa dos Prof. Dr. Eurico Litton de Freitas e Prof. Dr. José Borges Sales que nos permitiram a realização da presente tese.

A Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda na concessão de Bolsa de Estudos.

A todos os funcionários do Departamento de Bio-
química que de diversas maneiras nos ajudaram.

A Srta. Maria Luiza de Souza, pelo esmero e de-
dicação no trabalho datilográfico.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Caracterização do material biológico.....	10
Preparo do hemolisado.....	10
Preparação de hemoglobina isenta de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular.....	11
Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	11
Cromatografia de troca iônica.....	13
Curva de dissociação de hemoglobina.....	14
Determinação do efeito Bohr.....	16
Determinação do número de grupos tióis tituláveis.....	17
Cinética de reação de grupos tióis com 4-4'-dipiridil na dissulfato.....	18
Desnaturação pelo benzoato de sódio.....	20
Equipamentos e reagentes.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	39
RESUMO.....	53
SUMMARY.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
APÊNDICE	

INTRODUÇÃO

A elucidação da estrutura tridimensional da hemoglobina tem sido feita nos últimos anos através de métodos cristalográficos e pelo conhecimento da proteína a níveis atômicos (PERUTZ, 1968) os quais tem permitido a interpretação de propriedades funcionais e físico-químicas em termos estruturais de hemoglobina humana. Por estes estudos foi possível propor modelos como por exemplo aquele que pressupõe ser a hemoglobina composta de 4 sub-unidades polipeptídicas com 2 tipos de cadeias α e β que delimitam uma cavidade central que contém diversos resíduos polares pertencentes a 4 sub-unidades. Serina e treonina são os aminoácidos mais comuns que participam desta cavidade (PERUTZ, 1965). A cavidade central poderia ser visualizada como constituída por 2 caixas de 20\AA de comprimento por $8-10\text{\AA}$ de largura e 25\AA de profundidade separando as 2 cadeias uma da outra. Talvez o aspecto mais interessante desse modelo seja a proposição de que os pontos de contacto entre cadeias diferentes (α e β) sejam essencialmente hidrofóbicos, enquanto que os entre cadeias semelhantes (α e α ou β e β) sejam polares (PERUTZ, 1970).

Outro ponto de interesse fundamental é a existência de 4 grupos hemes (protoporfirinas que contêm Fe^{++}) por mol de hemoglobina (CULLIS, 1962), cuja função, conhecida de longa data é o transporte de oxigênio no sangue. Na hemoglobina ligada ao oxigênio o átomo de ferro está coordenado octohedricamen-

te, estando 4 ligações de coordenação ligadas aos quatro grupos pirrólicos da porfirina, a 5a. ligação ao grupo imidazol da histidina ligada covalentemente ao heme, e a 6a. à molécula de O_2 . A hemoglobina na forma deoxigenada apresenta a 6a. ligação livre (NOBBS, 1966).

A reação da hemoglobina com o oxigênio é reversível. Funcionalmente ela se combina com esse ligante quando a tensão é alta e libera-o em condições de tensões parciais de oxigênio baixas, sendo, portanto, uma proteína respiratória. O equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio é influenciado pela presença de íons e moléculas que possuem diferentes constantes de ligação com as formas de oxi e deoxi da hemoglobina. Esses efeitos são conhecidos como interações heterotrópicas (BENESCH, 1960). Tanto a oxi como a deoxihemoglobina ligam íons hidrogênio, mas em pH fisiológico a deoxihemoglobina tem maior afinidade por esses íons. Assim os H^+ são ligados quando a oxihemoglobina perde o O_2 e são liberados no processo de oxigenação da desoxihemoglobina.

O equilíbrio termodinâmico entre as formas oxi e desoxi é portanto, influenciado pela concentração de íons H^+ da solução (ANTONINI, 1963). A interação entre a ligação do O_2 e a do íon H^+ é conhecida como efeito Bohr. Esse efeito é um caso típico de interação heterotrópica envolvendo a ligação do oxigênio (PERUTZ, 1969). Isso ocorre por causa de mudança conformacional em pontos da molécula distantes do grupo heme. Efeito Bohr

e interação heme-heme são fenômenos distintos apesar de ambos serem consequência de mudança conformacional da proteína (BINOTTI 1971). Dada a importância do efeito Bohr nos estudos que levou a presente tese trataremo-lo com maiores detalhes.

O modelo proposto por PERUTZ (1970) para explicar o efeito Bohr mostra que mudanças conformacionais na molécula ocorrem quando o O_2 é ligado ao ferro pois a distância do anel porfirínico da histidina proximal é alterada (MUIRHEAD, 1967). Na cadeia β , por exemplo, o acesso do ligante na deoxihemoglobina é dificultado pelo grupo metil da valina 67, isso obriga, durante a oxigenação, uma modificação na estrutura intercadeia induzindo um movimento da hélice F sobre a H com a expulsão da Tyr $_{\beta}$ 145 da cavidade formada pelas duas hélices e movimentando o aminoácido carboxila terminal. Com esse movimento do C terminal há quebra da sua ponte salina e os grupos responsáveis pelo efeito Bohr mudam o pK devido a mudança das interações eletrostáticas que envolvem o C terminal, e prótons são liberados.

O mecanismo físico responsável pela mudança do pK de um grupo ionizável é relativamente fácil de se visualizar mas a identificação desses ou desses grupos é muito difícil. Admite-se contudo, que o número de grupos responsáveis pelo efeito Bohr podem ser deduzidos através do número de prótons dissociados envolvidos no processo. Esse número corresponde a 0,6 prótons/heme na região alcalina e 0,25/heme na região ácida (WYMAN, 1964). Estudos realizados para identificação desses grupos mostram que o

grupo imidazol da His_β146 (PERUTZ, 1969) o grupo amino da Val_α1 (KILMARTIN, 1969), o grupo imidazol da His_β122 (PERUTZ, 1970 ; BRUNORI, 1975) e o grupo tiol da Cis_β93 (RIGGS, 1959) devem participar no efeito Bohr. Assim através da retirada ou bloqueio do α amino grupo da cadeia α observa-se que o efeito diminui em 20% (KILMARTIN, 1970) o que não acontece quando se bloqueia o α amino grupo de cadeia β. O bloqueio do grupo SH de Cis_β193 por vários reagentes específicos para grupos tióis mostram, também, uma redução do efeito em 20% ou mais (RIGGS, 1961; TAYLOR, 1966). Isso indica que os grupos α-amino e tiol participam do efeito Bohr mas não são os responsáveis exclusivos por esse efeito. O grupo imidazol da His_β146 também pode ser um dos responsáveis pelo efeito pois o mesmo é reduzido em 50% quando a hemoglobina é tratada com carboxipeptidase A. (ZITO, 1964; BONAVENTURA, 1974), e o grupo imidazol da His_α122 também pode ser responsabilizado pois mostra um pK baixo na oxihemoglobina e alto na forma deoxi. Essa alteração do pK segundo PERUTZ (1970) é consequência da interação da Arg_β30/His_α122 na forma oxigenada o que não ocorre na deoxihemoglobina pois a His_α122 está próximo da Asp_α126. Os grupos imidazol das histidinas proximal e distal já foram apontados como responsáveis pelo efeito Bohr por causa da diferença dos pK das formas oxi e deoxi, mas algumas evidências afastam essa hipótese pois a mioglobina possui esses grupos apesar de não apresentar o efeito e a hemoglobina Zurich (α₂ B₂ His → Arg) que não tem a histidina distal (substituída pela arginina) possui

efeito Bohr (WINTERHALTER, 1969).

A distribuição dos "grupos" Bohr nas duas cadeias é outra questão problemática. Trabalhando com hemoglobinas artificiais $\alpha \beta^{+CN}$ e $\alpha^{+CN} \beta$, BRUNORI (1970) observou que o efeito Bohr de ambas era igual a da hemoglobina normal α - β na região alcalina mas que o efeito Bohr ácido era apresentado apenas pela $\alpha^{+CN} \beta$ o que implica em dizer que os grupos responsáveis pelo efeito Bohr ácido se encontram na cadeia β .

O equilíbrio entre a hemoglobina e o oxigênio é alterado por modificações na sequência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Essas modificações podem alterar a relação heme/proteína, alterando suas propriedades de ligação com ligantes bem como as estruturas terciárias de suas sub-unidades. Os estudos comparativos das hemoglobinas de diferentes animais tem se mostrado particularmente úteis para a elucidação de propriedades funcionais relacionados a mudanças conformacionais. Assim as hemoglobinas de anfíbios, por exemplo, podem conter informações filogenéticas codificadas pela sua estrutura primária que poderiam ser dados importantes sob o ponto de vista taxonômico e demonstrativo da plasticidade da arquitetura molecular em condições adaptativas do meio ambiente. Exemplo ilustrativo foram os achados de MC CUTCHEAN (1936) em relação a diferentes propriedades funcionais do ligante oxigênio nas hemoglobinas de anfíbios na fase adulta e larval.

A sequência de aminoácidos de sub-unidades α e β

tem sido determinadas em muitas espécies e tem mostrado um número grande de resíduos invariáveis, inclusive alguns resíduos próximos ao heme que são pontos de contacto essenciais para a função normal da hemoglobina tetramérica. Nas hemoglobinas de anfíbios, alguns estudos tem sido feito quanto a sequência de aminoácidos. Assim as cadeias β do componente mais concentrado das hemoglobinas de Rana esculenta foi sequenciada por CHAUVET e ACHER (1972). Ao compara-la com cadeia β de hemoglobina humana nota-se que a cadeia β da Rana esculenta contém 61 substituições e é 6 resíduos mais curta. Esses resíduos que faltam são os primeiros 6 resíduos do N terminal. Torna-se bastante difícil a interpretação exata de muitas dessas substituições mas há 2 importantes mudanças nas cadeias β de Rana: a acetilação do grupo α amino, o que poderá reduzir o efeito Bohr desde que esse resíduo colabore com 20% dos prótons desse efeito; outro aspecto seria a substituição do resíduo Asp $_{\beta 94}$ por Asn ou Gly pois o resíduo Asp forma ponte salina com a His $_{\beta 146}$ o que ocasiona a desprotonação da histidina na forma deoxi.

Apesar dos estudos sobre o mecanismo do efeito Bohr serem muitos e cada dia mais complexos foi nosso pensamento inicial a participação de grupos tióis acessíveis neste efeito, uma vez que a hipótese inicial de RIGGS (1959) hoje abandonada, responsabilizava estes grupos como altamente comprometidos neste efeito por ocasião de seus estudos com hemoglobina de Rana catesbeiana. Vale dizer também que nossa hipótese estava

baseada em estudos iniciados com um anuro aquático Pipa carvalhoi (MEIRELLES, 1978b). Para nos situarmos melhor no problema abordaremos a seguir alguns aspectos do tema efeito Bohr e grupos tióis acessíveis.

Os grupos SH de proteínas são geralmente descritos como grupos SH reativos e grupos SH não reativos. Os grupos reativos são aqueles rapidamente tituláveis com reagentes de metais pesados e tem as propriedades da cisteína. Os grupos não reativos são aqueles que reagem muito lentamente com os metais pesados, isto é, reativos são aqueles que são acessíveis aos reativos SH específicos e não reativos, aqueles que se encontram em uma posição mais oculta, no interior da molécula. Em estudos comparativos de hemoglobina de várias espécies de mamíferos, RIGGS (1959,1960) encontrou que o número de íons Hg^{2+} que se ligava a deoxihemoglobina era aproximadamente igual ao número de prótons liberados durante a oxigenação da mesma e sugeriu que os grupos SH reativos poderiam ser os doadores de prótons. Além disto o mesmo autor sugeriu que o número de prótons liberados na oxigenação era inversamente proporcional ao peso corpóreo do animal, e diretamente proporcional ao efeito Bohr baseado na afirmação de WYMAN (1948) que o efeito Bohr é igual ao número de prótons dissociados por molécula de oxigênio ligada. Outro dado que melhor evidencia essa hipótese é mostrado também por RIGGS (1960) que a Hb de Rana catesbeiana apresenta efeito Bohr e grupos SH tituláveis enquanto que o girino dessa mesma

espécie não apresenta efeito Bohr nem grupos SH tituláveis. Entretanto BENESCH (1960) observou que a adição de íons de metais pesados em hemoglobina humana não impede a liberação de prótons durante a oxigenação, mostrando pelo bloqueio dos grupos SH reativos, que os grupos tióis não podem ser representados pelo efeito Bohr. Esse fato foi contestado por SNOW (1962). AMPULSKY (1969) trabalhando com hemoglobina humana mostrou que a reatividade dos grupos SH era maior na presença de íons fosfato e que essa reatividade aumentava conforme se aumentava o pH do meio. MORELL (1972) mostrou que a reatividade do SH da oxihemoglobina humana é maior que da deoxi. Estudando as alterações da reatividade do SH da hemoglobina humana TAKETA (1969) observou que essa reatividade é maior na oxihemoglobina e que os diferentes fosfatos orgânicos induzem diferentes mudanças conformacionais na molécula expondo o radical do resíduo β 93. A correlação entre mudança da reatividade do grupo SH e mudanças no valor de P_{50} na hemoglobina humana e em hemoglobina de gato induzida por DGP e IHP foi mostrado por MAUK (1972) que são diretamente relacionados.

Por estes estudos pode-se concluir quão complexo é o problema e como há controvérsias no assunto. Desta forma resolvemos voltar a estes estudos e para isto utilizamos um reagente específico dos grupos tióis o (4PDS) 4-4'dipiridina-dissulfito que tem propriedades estéricas tais que a acessibilidade ao grupo tiol se faz lentamente, dando oportunidade de se estudar cineticamente a reação: $Hb-SH + 4PDS$ e inferir resultados que

poderiam ser úteis para o esclarecimento da participação dos grupos tióis da hemoglobina no efeito Bohr.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do material biológico

Os animais utilizados neste trabalho foram exemplares de Pipa carvalhoi, anuro de vida aquática oriundos do sul da Bahia e adaptado a vida de cativeiro em nossos laboratórios; exemplares adultos de Bufo paracnemis, anuro de vida terrestre nesta fase e capturados na região de Campinas, SP; exemplares adultos e de girinos de Rana catesbeiana, anuro de vida terrestre quando adulto e de vida aquática quando na forma larval, criados em cativeiro em ranário comercial de Jundiá, SP.

Preparação do hemolisado

Os animais foram anestesiados em banho de gelo e por uma incisão no tórax o coração foi retirado. O sangue foi colhido do fundo da cavidade torácica previamente heparinizada. Após centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm o sobrenadante foi separado do sangue total e as hemácias precipitadas foram lavadas em solução de NaCl 0,15M por 3 vezes. A hemólise foi procedida por choque osmótico tratando-se as hemácias por 2 volumes de água destilada, com agitação por 1 hora aproximadamente, em banho de gelo a 0°C. Após a hemólise, a solução de hemoglobina foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada, para se retirar os restos celulares. A solução de hemoglobina foi então sistematicamente passada através de coluna de

Sephadex G-25 de 10-15cm de altura por 1-1,5cm de diâmetro, pré-equilibrada com água destilada, de modo a separar a hemoglobina de possíveis contaminantes de baixo peso molecular.

Preparação de hemoglobina isenta de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular

Para se retirar os íons existentes na preparação de hemoglobina, utilizou-se de um sistema de 3 colunas de cromatografia de troca iônica de 10-15cm de altura por 1-1,5cm de diâmetro cada uma. A primeira coluna continha Dowex 1-X₈ (acetato⁻), e a segunda de Dowex 50W-X₄ (NH₄⁺) e a terceira foi Amberlite IRC-50 (H⁺)/Amberlite IR-4B (OH⁻) todos pré-equilibrados com água bidestilada. A solução de hemoglobina foi então passada por esse sistema de colunas conectadas entre si sendo eluída com água destilada. O material colhido foi utilizado para os estudos de propriedades funcionais da hemoglobina.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em discos de poliacrilamida foi feita utilizando-se tubos de vidro de 10cm de comprimento por 0,3cm de diâmetro. O gel foi preparado a partir de 4 soluções (A, B, D e E) e uma solução recém-preparada (C). O preparo de 100ml de cada uma dessas soluções obedeceu o seguinte critério: 30g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida para a solução A; 24ml de solução de ácido clorídrico 1N; 18,15g de Tris e 0,4ml de TEMED

para a solução B: 0,1g de persulfato de amônia para a solução C; 5g de acrilamida e 1,25g de bisacrilamida para a solução D e 12,8ml de solução de ácido fosfórico 1M, 2,85g de Tris e 0,1ml de TEMED para a solução E.

Nos tubos de vidro sobre um suporte foi colocado 1ml do gel de resolução que foi preparado usando-se as seguintes soluções: 1ml de solução A; 1ml de solução B e 2ml de solução C. Deixou-se polimerizar na ausência de luz por aproximadamente 1 hora. Em seguida adicionou-se 0,2ml do gel de concentração que foi preparado na proporção de 2ml de solução D, para 1ml de solução E e 2ml de solução C. Deixou-se polimerizar por cerca de 45 minutos nas mesmas condições do anterior.

Os tubos foram em seguida montados entre duas cubas eletródicas, cubas que continham, na inferior tampão tris HCl 0,1M, pH 8,1 (tris 12,1g; solução de HCl 1N, 50ml e água 1000ml) e tampão Tris-glicina 0,05M pH 8,9 (6,22g de Tris, 3,94g de glicina e 1000ml de água). Os eletrodos foram conectados sendo o polo positivo da fonte de alimentação à cuba inferior e o negativo à superior. A fonte foi acionada usando-se corrente de 1mA por tubo durante 10 horas para promover a retirada do catalizador utilizado (persulfato de amônia). Após a pré-eletroforese despresou-se o tampão utilizado e colocou-se as amostras recentemente preparadas contendo uma parte de hemoglobina (na forma carboxihemoglobina), uma parte de glicerol e duas partes do tampão tris-glicina 0,05M pH 8,9. Procedeu-se a eletroforese utili

zando-se as mesmas condições da pré-eletroforese sendo que a corrente elétrica foi mantida entre 2,5-3mA por tubo, por 1 hora.

Os geles, após a eletroforese, foram retirados dos tubos e corados para hemoglobina e para proteína. A solução corante para proteína foi uma solução de Comassie blue a 0,5%, deixando-se corar por 10 minutos e depois descorando com solução de ácido acético a 7%. O corante para hemoglobina foi usado uma solução recém preparada que continha 1g de benzidina, 75ml de metanol, 25 gotas de ácido acético, 4 gotas de água oxigenada 130 volumes e cristais de nitroprussiato de sódio. Deixou-se corar por 10-20 minutos e descorou-se com uma solução que continha 5ml de água oxigenada 130 volumes, 25ml de metanol, 50ml de éter sulfúrico. O tempo para descorar foi de 30 minutos.

Cromatografia de troca iônica

A resina utilizada foi o CM-celulose (carboximetil-celulose) montada em uma coluna de vidro de 30cm de altura por 2cm de diâmetro, equilibrada com tampão fosfato 0,01M, pH 6,4. Essa resina foi inicialmente lavada em água com várias trocas por um período de 24 horas para se retirar as granulações mais finas de resina. A ativação foi feita utilizando-se solução de NaOH 0,5M por 2 horas, lavando-se depois a resina com água destilada até pH próximo a 7. Essa lavagem foi feita com auxílio de um funil Buchner adaptado a uma bomba de vácuo. Em seguida colocou-se a resina em uma solução de ácido fosfórico 0,5M dei-

xando-se agitar por 2 horas e repetiu-se a lavagem até pH próximo a neutralidade. Finalmente equilibrou-se a resina com o tampão fosfato 0,01M pH 6,4 e montou-se a coluna até uma altura de 25cm, aproximadamente, mantendo-se a 4°C. Isso foi conseguido através da circulação de água refrigerada pela jaqueta da coluna de vidro.

O material a ser usado foi dialisado por 1 hora contra tampão fosfato 0,01M pH 6,4 contendo β -mercaptoetanol na concentração final de 10^{-3} M e aplicado à coluna. A eluição foi feita com o mesmo tampão utilizando-se gradiente linear de pH (variando de 6,4 a 8,5).

A diálise e a cromatografia foram executadas a 4°C. O material eluído foi recolhido em tubos (3ml por tubo) com auxílio de um coletor de frações. A absorbância a 540nm foi determinada em cada tubo e colocada em gráfico, (absorbância em ordenadas contra volume de eluição em abscissas). O pH dos tubos também foi medido e lançado no mesmo gráfico.

Curva de dissociação da hemoglobina

Os estudos de equilíbrio da hemoglobina com seu ligante oxigênio foi feito por método espectrofotométrico onde se calculou o valor de \underline{n} (coeficiente de Hill) e o P_{50} (pressão de oxigênio onde metade das moléculas de hemoglobinas estão na forma oxigenada e metade desoxigenada) através das diferenças entre as absorbâncias das formas oxihemoglobina e desoxihemoglo

bina em 3 comprimentos de ondas diferentes: 560, 577 e 540nm e em função do volume de ar adicionado.

Para êsse estudo utilizou-se tonômetros de vidro previamente aferido onde se colocou 1 ou 3ml (dependendo do tonômetro) de hemoglobina que foi convertida na forma deoxi através da passagem de corrente de nitrogênio ou por esvaziamento através de bomba de vácuo (de acordo com o tonômetro utilizado). O tonômetro foi hermeticamente fechado e equilibrado em banho-maria a 27°C por 10 minutos com agitação constante. Após o equilíbrio térmico as absorbâncias foram registradas com auxílio de um espectrofotômetro modelo DMR-21 Zeiss dotado de sistema de registro, no intervalo de 600 a 500nm. Após o registro do espectro sw absorção de deoxihemoglobina, injetou-se no tonômetro um volume conhecido de ar e novamente se processou o equilíbrio do sistema na mesma temperatura e registrou-se o espectro de absorção. Após 4 adições sucessivas de ar obteve-se a forma totalmente oxigenada por abertura do tonômetro permitindo pois a saturação da hemoglobina pelo O₂ a pressão atmosférica. Após o equilíbrio o espectro de absorção da forma oxi foi registrado.

O valor log k (logaritmo da porcentagem de saturação pelo O₂) foi determinado em uma calculadora Sharp modelo Compet-364P programada para receber os valores das absorbâncias de 3 diferentes comprimentos de onda das formas oxi, desoxi e após cada adição de ar. Pela somatória das diferenças entre

a forma deoxi e cada uma das formas parcialmente oxigenadas e totalmente oxigenada em cada comprimento de onda, calculava-se a porcentagem de saturação de cada forma, considerando 100% e 0% as formas oxi e desoxi, respectivamente, bem como o logaritmo dessas porcentagens. Em seguida foram fornecidos \bar{a} calculado ra os valores de $\log PO_2$ (logaritmo da pressão parcial de oxigênio) para se calcular os valores de \bar{n} e $\log P_{50}$. Com os valores $\log k$ e $\log PO_2$ foi processada a regressão linear onde \bar{b} (coeficiente angular da reta) corresponde ao valor de \bar{n} e o $\log P_{50}$ é igual a $\frac{-\bar{b}}{\bar{a}}$, (\bar{a} corresponde ao valor de $\log PO_2$ onde a reta corta a abscissa) isto é, quando esta cruza a abscissa o $\log k$ toma o valor de zero ou seja, $\frac{Y}{100-Y} = 1$.

Determinação do efeito Bohr

O efeito Bohr definido como a mudança de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em função da alteração do pH do meio, pode ser descrito como ácido ou alcalino, dependendo da faixa de pH onde ocorre a alteração da afinidade e positivo ou negativo, dependendo de como a afinidade é alterada. Se a afinidade do Hb pelo O_2 aumentar conforme se aumenta o pH, temos o efeito Bohr negativo e se a afinidade diminuir com a elevação do pH, temos o efeito Bohr positivo.

Para estimar o valor do efeito Bohr pode-se calculá-lo em função do pH e do $\log P_{50}$, ou seja, $H^+ = \frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta pH}$

onde o $\log P_{50}$ exprime o inverso da função afinidade da hemoglobina pelo ligante.

A determinação do efeito Bohr foi feita através do gráfico, onde se colocou em ordenadas $\log P_{50}$ e nas abscissas os valores de pH. O coeficiente angular da reta determinada corresponde ao efeito Bohr.

Determinação do número de grupos tióis tituláveis

A determinação foi feita pelo método de GRASSETTI (1965) que consiste na reação de 4-4'-dipiridina-dissulfito (4-PDS) com grupos SH de proteína formando um complexo proteína/tiopiridina mais 4-tiopiridona (4-TP). O número de grupos tióis reativos da proteína é calculado em função da concentração de 4-TP formado após a reação proteína/4-PDS.

A reação da hemoglobina com esse reagente foi feita utilizando-se 1,2ml de uma solução de hemoglobina de concentração da ordem de 10^{-6} M em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 em duas cubetas de quartzo de 1,5ml de volume. Após se estabelecer o ponto zero a 324nm no espectrofotômetro adicionou-se a cubeta em "branco" 0,2ml de solução de NaCl 0,15M e a cubeta de reação 0,2ml de solução de 4-PDS 10^{-3} M em solução de NaCl 0,15M.

Após a estabilização da reação que ocorria desde 20-30 minutos até algumas horas após a adição dos reagentes, determinou-se a absorvância a 324nm para se calcular a concentração do 4-TP formado. A concentração de hemoglobina foi calcula-

da pela absorvância obtida da cubeta "em branco" em 540nm e a do 4-PDS através da absorvância a 324nm de uma solução contendo 1,2ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e 0,2ml da solução de 4-PDS 10^{-3} M.

O cálculo da concentração da hemoglobina foi feita utilizando o coeficiente de extinção milimolar da ordem de 13,8 por heme. Calculada a concentração por heme, dividiu-se por quatro e se obteve a molaridade do tetrâmero. A concentração do 4-TP foi calculada descontando-se a leitura do excesso de 4-PDS e utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,98 \times 10^4$.

O número de SH por molécula de hemoglobina foi determinado pelo quociente da concentração da hemoglobina pela do 4-TP.

Cinética de reação de grupos tióis com 4-4'-dipiridina-dissulfito

Os estudos cinéticos da reação dos grupos tióis da solução de hemoglobina com o reagente 4-4'-dipiridina-dissulfito (4-PDS) em concentração 10 vezes maior foram feitos assumindo-se ser a reação de primeira ordem. O 4-PDS reage lentamente com grupos SH livres de uma proteína formando um complexo, proteína/tiopiridina, mais 4-TP (4-tiopiridona) (AMPULSKI, 1969).

A cinética de reação foi seguida com o auxílio de espectrofotômetro DMR-21 Zeiss, utilizando-se cubetas de quartzo de 1,5ml de volume com caminho óptico de 0,5cm. Os reagentes utilizados foram: tampão fosfato 0,1M pH 7,0; solução de 4-PDS

10^{-3} M em solução de NaCl 0,15M e solução de NaCl 0,15M. A amostra de hemoglobina foi diluída no tampão fosfato de modo que apresentasse uma concentração na ordem de 10^{-6} M. A reação foi iniciada pela adição de 1,2ml de solução de hemoglobina em 2 cubetas as quais foram colocadas no espectrofotômetro para estabelecer o ponto zero do aparelho em 324nm. Em seguida, adicionou-se à cubeta em "branco", 0,2ml de solução de NaCl e na cubeta de reação 0,2ml de solução de 4-PDS. Agitou-se rapidamente as cubetas e registrou-se a absorvância durante 10-15 minutos com velocidade do registrador estabelecida em 10mm/min. ou 1mm/min. dependendo da velocidade da reação (Fig.IV).

Para se fazer o estudo cinético da reação, calculou-se primeiro a absorvância final (A_{∞}). Isso foi feito em gráfico onde se colocou nas ordenadas o logaritmo das absorvâncias lidas em unidades de tempo e nas abscissas, o inverso das unidades de tempo. A A_{∞} foi determinada como sendo o antilogaritmo do ponto de intersecção da reta com as ordenadas (tempo infinito). Depois de estabelecido em gráfico o ponto A_{∞} calculou-se

$$\text{Ln } \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_{324}}$$

onde A_{324} = densidade óptica num determinado tempo. Esses dados foram colocados em gráfico sendo $\text{Ln } \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_{324}}$ nas ordenadas e o tempo nas abscissas. Nesse gráfico foram utilizados apenas os pontos que estavam alinhados para se determinar uma reta e a constante cinética da reação (K') foi calculada

pelo coeficiente angular dessa reta.

Os cálculos da função $\text{Ln} \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_{324}}$ e da regressão linear foram feitos utilizando-se a calculadora Sharp modelo Compet 364P programada para receber os dados referentes a A_{∞} , A_{324} e unidade de tempo.

Desnaturação pelo benzoato de sódio

A uma solução de hemoglobina de aproximadamente 10^{-6} M diluída em tampão fosfato 0,01M pH 7,0, foi adicionado benzoato de sódio de modo que a concentração final desse sal na solução fosse de 1M. Com auxílio de espectrofotômetro foi determinada a absorvância em 577nm no momento em que se adicionou o benzoato de sódio e novas leituras da absorvância foram feitas em intervalos de tempo que variavam de 5 a 15 minutos, dependendo da amostra, até se obter leitura constante. Após se obter esses valores determinou-se a absorvância da forma desnaturada (isso foi conseguido por desnaturação pelo calor) e se calculou as porcentagens de desnaturação em cada unidade de tempo. Esse cálculo foi feito utilizando a absorvância do tempo "zero" da reação como 100% de forma nativa e a absorvância após o aquecimento como 0% de forma nativa. O complemento aritmético desses valores correspondia a porcentagem de desnaturação da molécula.

O cálculo da constante da cinética de desnaturação da Hb foi feito na calculadora Sharp modelo Compet 364-P on

de se calculava a função $\text{Ln} \frac{100}{100-x}$, onde x = porcentagem desnaturação no tempo t' bem como o coeficiente angular da reta determinada por esses valores em cada intervalo de tempo. A constante cinética da reação (k') correspondia ao coeficiente angular da reta.

Equipamentos e reagentes

As determinações espectrofotométricas foram feitas utilizando-se espectrofotômetro Zeiss modelo DMR-21 acoplado a um registrador ou espectrofotômetro Zeiss modelo PMQ 11.

Para as determinações potenciométricas utilizou-se o potenciômetro PH-Meter E 366B.

As centrifugações foram feitas em centrífuga Sorval modelo RC-2B e em centrífuga Eppendorff 3200.

Dois tonômetros foram utilizados, sendo um construído de acordo com o modelo de ROSSI-FANELLI (1958) e o outro, conforme o modelo de RIGGS (1951).

Todos os cálculos do presente trabalho foram feitos na calculadora Sharp modelo Compet 364 P 111.

Utilizou-se, ainda, coletor de frações Buchler, balança Mettler tipo SS, balança Sartorius tipo 2443 e fonte de eletroforese Electrophoresis Power Supply modelo 21.

Os reagentes utilizados foram produtos Pro-análise obtidos da Sigma, Merck, Backer ou equivalentes.

RESULTADOS

Os hemolisados dos diferentes anfíbios objeto da presente tese foram caracterizados eletroforetica e cromatograficamente com finalidade de estabelecer o número e as proporções de componentes de hemoglobinas. Assim o hemolisado total de Bufo paracnemis dialisado contra tampão fosfato 0,01M pH 6,4 contendo β -mercaptoetanol a concentração final 10^{-3} M foi cromatografado em coluna de CM-celulose e eluido com tampão fosfato 0,01M através de um sistema de gradiente linear de pH. Esse tratamento permitiu a separação de dois componentes de hemoglobinas. O primeiro foi eluido em pH 6,8 e representava 30% do hemolisado total, enquanto que o segundo componente, representando 70% do hemolisado total foi eluido quando o pH atingia 7,7. A figura I mostra os resultados de componentes de hemoglobinas deste anfíbio.

O hemolisado total de Pipa carvalhoi foi também submetido a cromatografia em CM-celulose e a presença de 4 componentes foi verificada, confirmando os trabalhos de Meirelles (1977a). O primeiro componente representou 1% do hemolisado total e foi eluido em pH 6,4. O segundo, eluido em tampão pH 7,0 representava 2% do total. O terceiro, eluido com tampão pH 7,6, representava 80% e o quarto, representando 10%, era eluido quando o tampão atingia pH 8,3. A figura II mostra o perfil da cromatografia do hemolisado total de Pipa carvalhoi. A análise do he

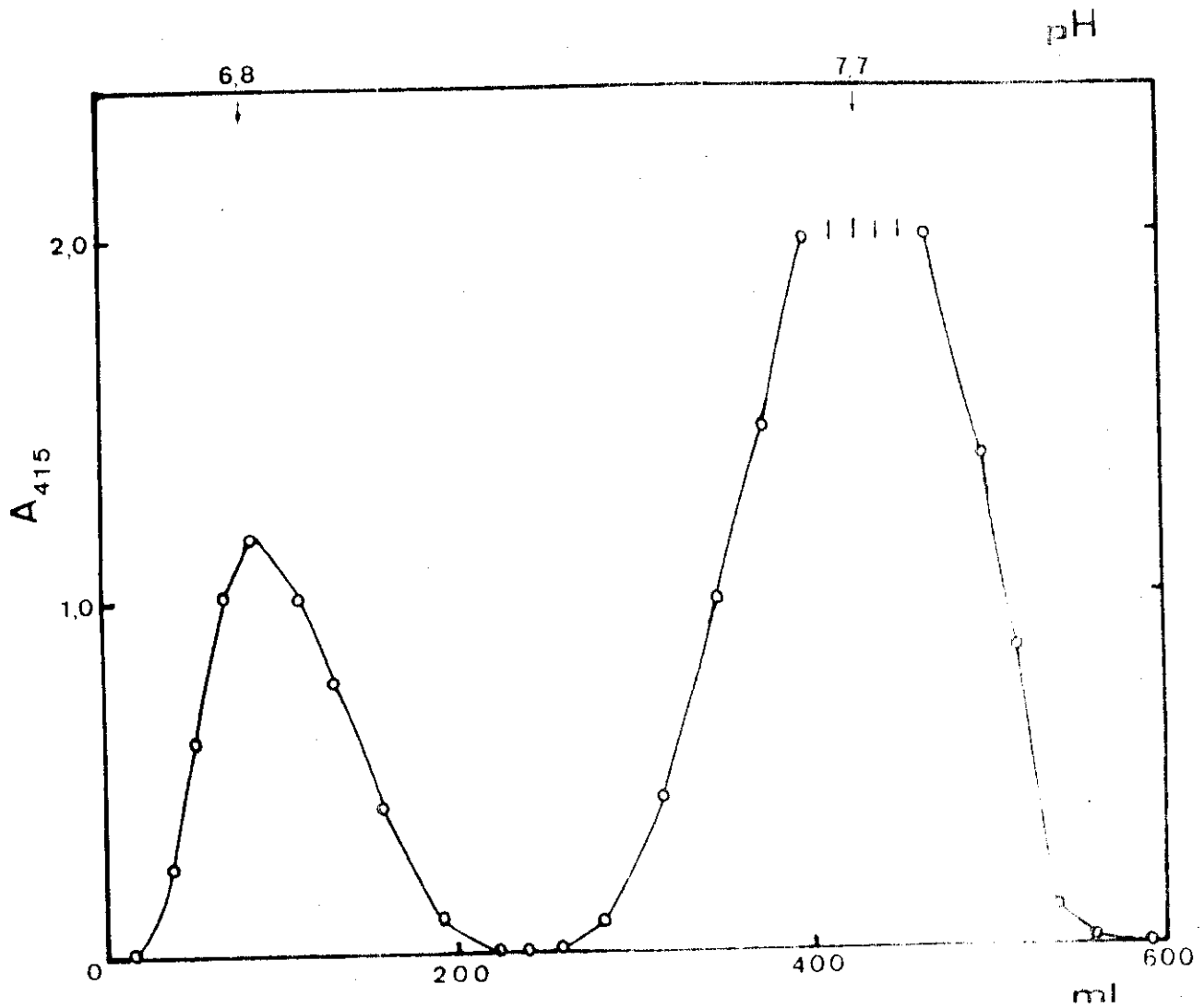


FIGURA I - Perfil cromatográfico do hemolisado total de eritrócitos de Bufo paracnemis em CM-celulose eluida com tampão fosfato 0,01M em gradiente linear de pH.

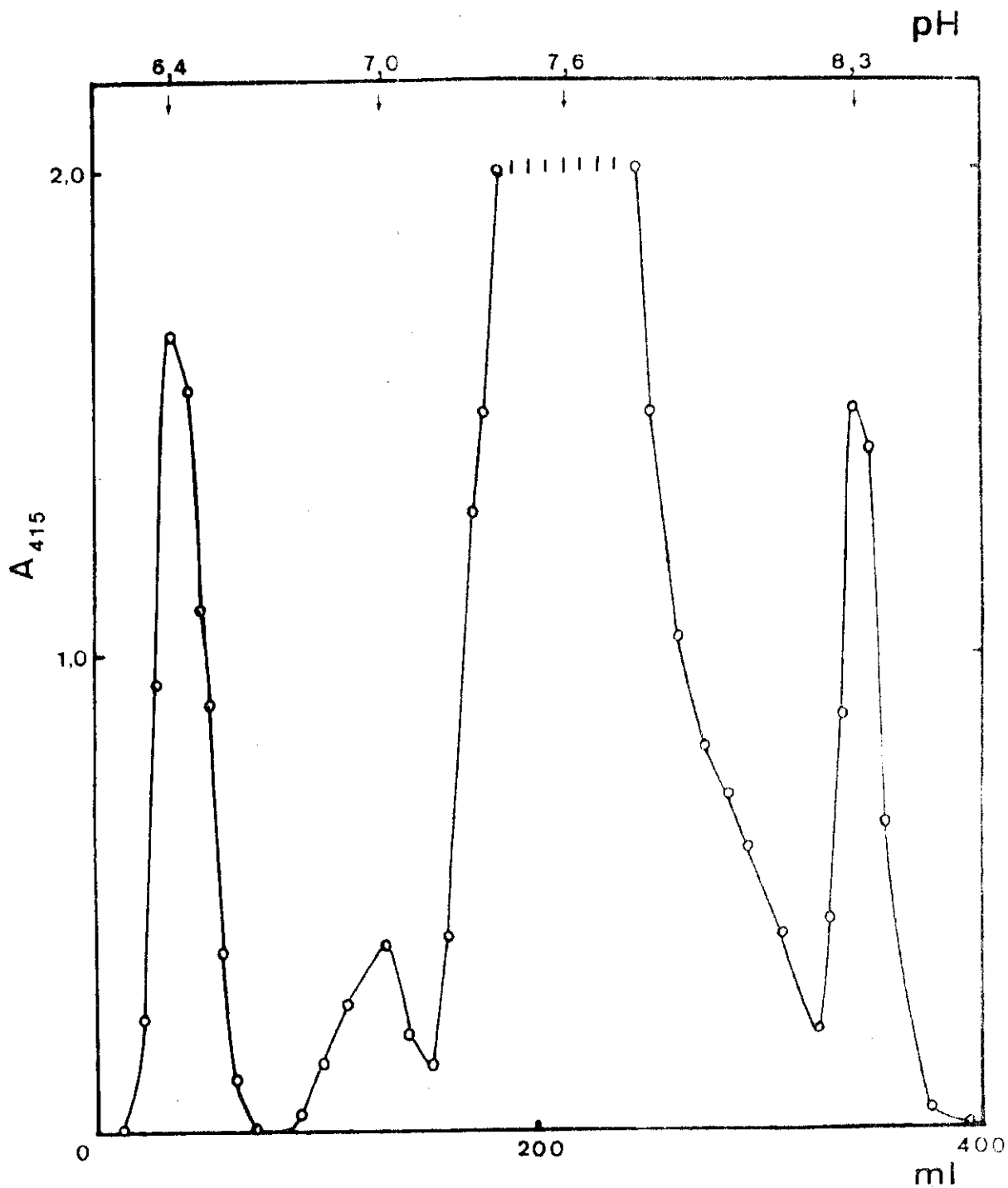


FIGURA II - Perfil cromatográfico do hemolisado total de eritrócitos de *Pipa carvalhoi* em CM-celulose eluída com tampão fosfato 0,01M em gradiente linear de pH.

molisado desse anfíbio foi necessária para avaliar possíveis alterações no número e proporções de componentes de hemoglobina deste animal que foi mantido longo tempo no laboratório. Portanto, esse foi o critério de homogeneidade do material biológico utilizado.

As propriedades funcionais das hemoglobinas de Bufo paracnemis com relação ao oxigênio foram a seguir determinadas. Assim o efeito Bohr foi analisado através da curva de variação da constante de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ($\log P_{50}$) em diferentes pH e foi expressa pela equação:

$$\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \text{pH}} = H^+$$

como descrito. A figura III mostra que os valores do efeito Bohr numa faixa de pH entre 6,0 e 8,0. Tanto no hemolisado total como naquele isento de íons e pequenas moléculas foi encontrado -0,08 valor muito próximo de zero. Na mesma figura estão representadas as curvas de variação de $\log P_{50}$ com variação de pH para hemolisado de Pipa carvalhoi que mostrou efeito Bohr ao redor de -0,06 como descrito (MEIRELLES, 1977b). Além disso a figura III reporta os valores do efeito Bohr para Rana catesbeiana nas fases adulta e larval: -0,29 e zero respectivamente, de acordo com os resultados de RIGGS (1951). Quando as diferentes hemoglobinas foram tratadas pelo efector heterotrópico, ATP, houve incremento desse efeito nos casos de hemoglobinas de Pipa carvalhoi e da de girino de Rana catesbeiana (ARAKI, 1973). Nenhuma

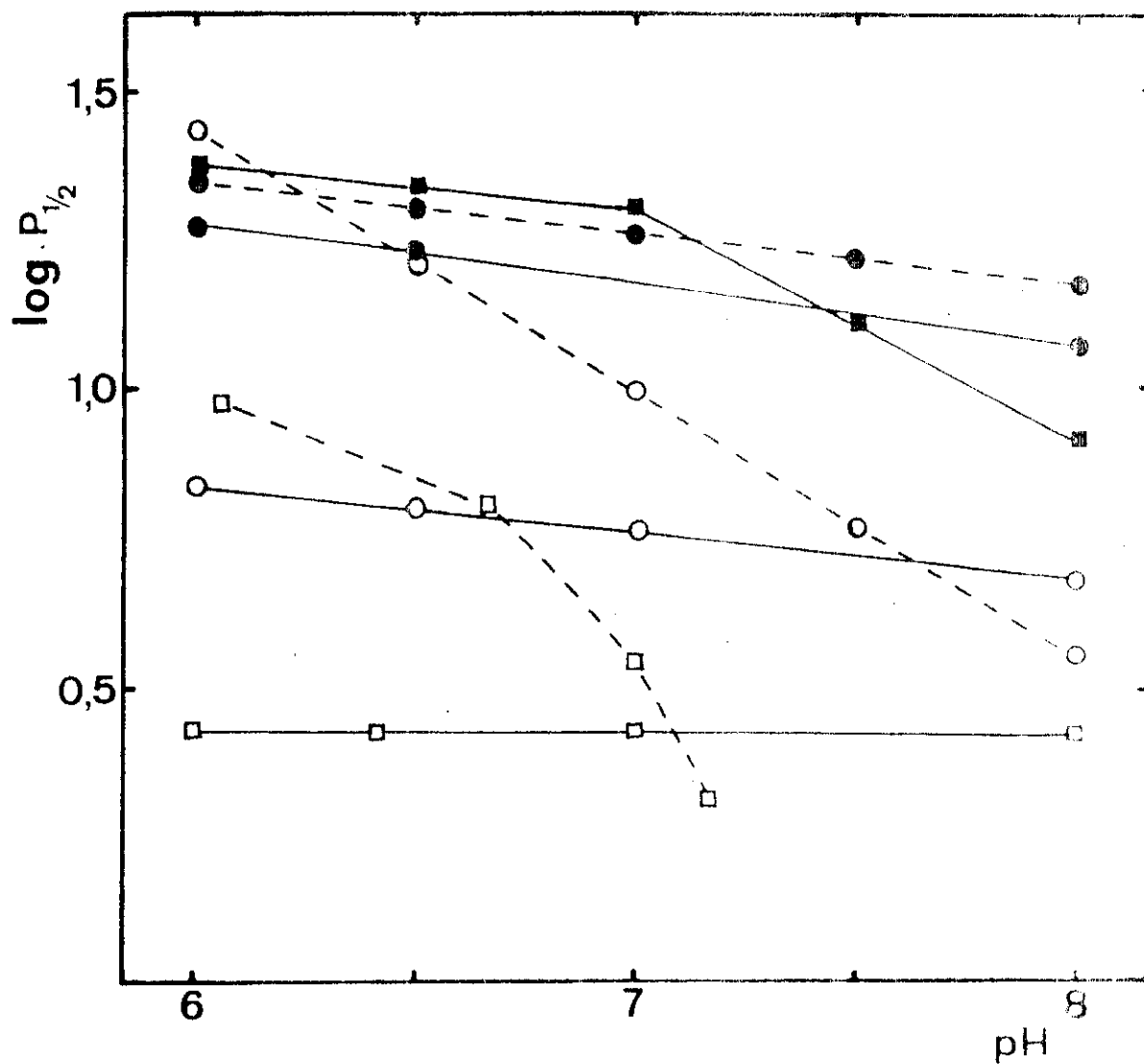


FIGURA III - Efeito Bohr das hemoglobinas "stripped" (—) e com ATP 10^{-3} M (-----) de *Bufo paracnemis* (●); *Pipa carvalhoi* (○); *Rana catesbeiana* adulto (■) e *Rana catesbeiana*, girino (□) em tampão Bis-Tris 0,05M entre pH 6,0 e 8,0.

alteração foi notada nos anfíbios terrestres como de Bufo paracnemis e de Rana catesbeiana adulta. Esses valores estão na Tabela I.

A cinética da reação da hemoglobina com o 4-PDS foi registrada com velocidade do registrador estabelecida em 1 ou 10 mm/min., dependendo da velocidade da reação. As hemoglobinas usadas tinham como critério de pureza eletroforese em gel de poliacrilamida cujas bandas de proteínas foram coradas pelo método da benzidina e comassie blue para avaliar a correspondência, isto é, para se certificar que todas as proteínas das amostras analisadas eram hemoproteínas.

Nos registros cinéticos, qualquer que fosse a amostra observava-se no início da reação um considerável aumento de absorbância, isto é, no instante em que se colocava a amostra a absorbância atingia 0,200-0,300 e depois ia aumentando lentamente. Isso poderia indicar reação rápida do 4-PDS com possíveis grupos tióis expostos na molécula ou em algum contaminante não proteico. Para se comprovar se essa reação inicial se dava com a hemoglobina ou com algum contaminante, tomou-se uma amostra isenta de proteínas e processou-se a reação. O preparo dessa amostra isenta de proteínas foi feito em banho-maria a 90°C por 5 minutos, centrifugando-se depois a 5000 rpm por 5 minutos e tomando-se o sobrenadante. A figura IV mostra o registro de uma reação onde aparece um aumento da absorbância no instante inicial da reação, indicando a existência de contaminantes que rea

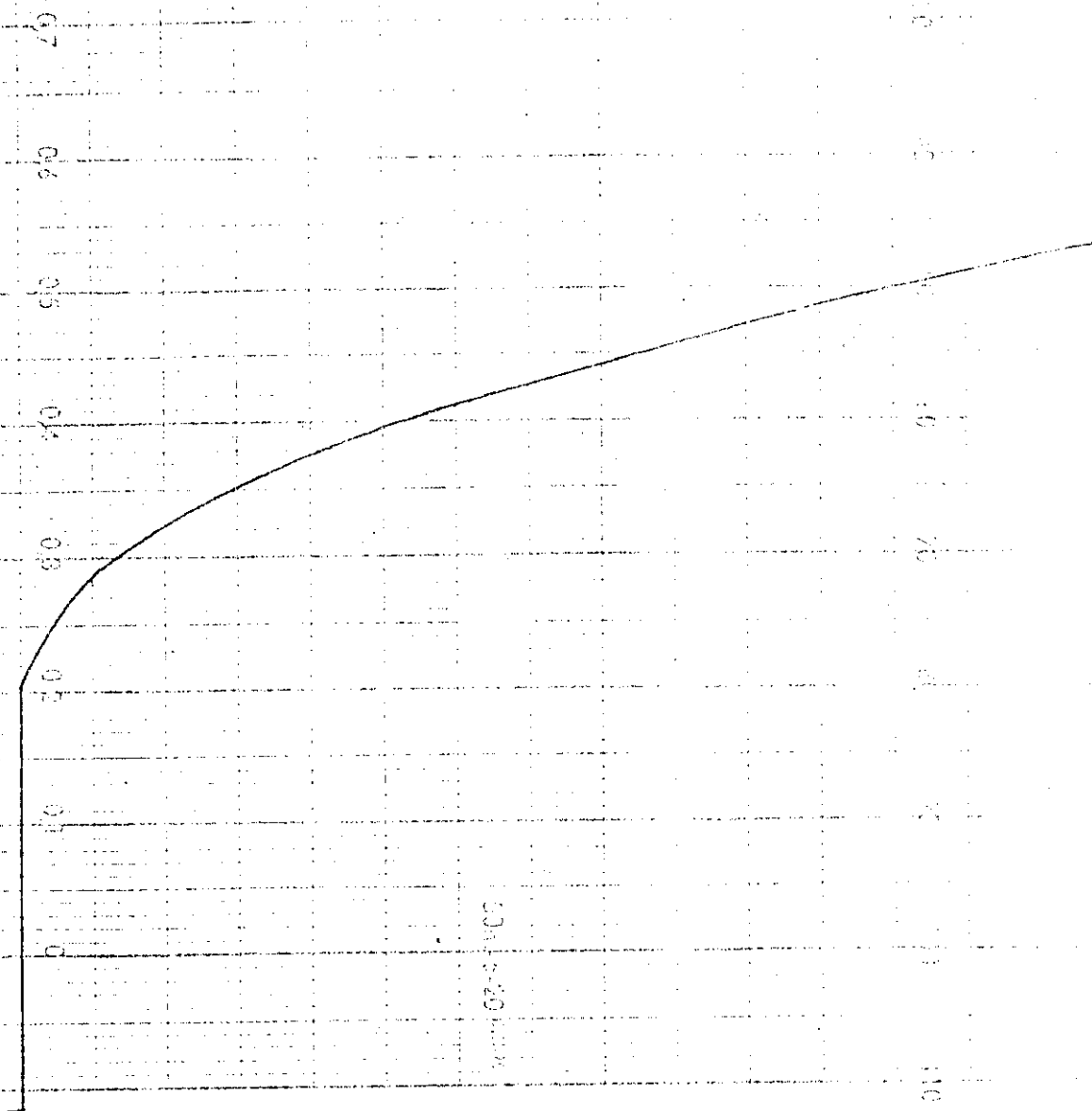


FIGURA IV - Modelo de um experimentos de reação da hemoglobina com 4-PDS mostrando o registro da absorbância em 324nm com a velocidade do registrador em 10mm/min.

gem rapidamente com o 4-PDS. Por isso, na reação 4-PDS/Hb, considerou-se apenas a fase lenta da reação e o início dessa fase foi pois considerado o ponto zero da reação. Esse achado foi definitivamente configurado quando se realizou reação do 4-PDS com hemoglobina de girino de Rana catesbeiana que reconhecidamente não apresenta grupos SH tituláveis (RIGGS, 1951).

Depois de registrados as absorvâncias em intervalos de tempo que variava entre 0,5 minutos ou 30 minutos, dependendo da velocidade da reação, calculou-se as constantes cinéticas conforme descrito em materiais e métodos. Os valores dessas constantes estão na tabela II, O número de SH tituláveis pelo 4-PDS foi calculado em função da absorvância máxima a 324nm devidamente diminuída da absorvância inicial. A absorvância máxima era obtida após leitura constante no final da reação e a absorvância inicial era considerada a absorvância máxima da fase rápida da reação.

A Tabela III mostra a relação entre o efeito Bohr e os valores das constantes de pseudo-primeira ordem para a reação das hemoglobinas dos diferentes anfíbios com 4-PDS. Pela comparação desses números é possível estabelecer dentro de cada espécie estudada uma certa correlação entre as constantes de pseudo-primeira ordem e o efeito Bohr. Assim no caso das hemoglobinas de Pipa carvalhoi o ATP aumenta o efeito Bohr alcalino que passa de -0,06 (MEIRELLES, 1977b) para -0,46 (MEIRELLES, 1978a) e a constante de velocidade de reação de grupos tióis com 4-PDS

TABELA II.

Velocidade de pseudo-primeira ordem da reação de hemoglobinas de diferentes famílias de anfíbios com 4-PDS. A reação foi estudada a 24°C.

Animal	Tratamento	(k) Reatividade
<u>Pipa carvalhoi</u>	"stripped"	0,0028
<u>Pipa carvalhoi</u>	+ ATP 10^{-3} M	0,014
<u>Bufo paracnemis</u>	"stripped"	0,46
<u>Bufo paracnemis</u>	+ ATP 10^{-3} M	0,38
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	"stripped"	0,084
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	+ ATP 10^{-3} M	0,096
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	"stripped"	-
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	+ ATP 10^{-3} M	-

TABELA III

Comparação entre o efeito Bohr e as constantes de pseudo-primeira ordem entre as hemoglobinas de diferentes famílias de anfíbios com 4-PDS. Os dados foram transpostos das tabelas I e II.

Animal	Tratamento	k' (min.^{-1})	$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$
<u>Pipa carvalhoi</u>	"stripped"	0,0028	-0,06
<u>Pipa carvalhoi</u>	+ ATP 10^{-3}M	0,014	-0,46
<u>Bufo paracnemis</u>	"stripped"	0,46	-0,08
<u>Bufo paracnemis</u>	+ ATP 10^{-3}M	0,38	-0,07
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	"stripped"	0,084	-0,29
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	+ ATP 10^{-3}M	0,096	-0,29
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	"stripped"	-	nulo
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	+ ATP 10^{-3}M	-	-0,25

também aumenta, passando de $2,8 \times 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$ para $14 \times 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$. Já no Bufo paracnemis a reação parece ser menos evidente e de modo inverso uma vez que o ATP tem, ou nenhuma influencia na grandeza do efeito Bohr ou influencia negativa e causa uma diminuição na velocidade de reação dos grupos tióis. No caso das hemoglobinas de Rana catesbeiana adulta, o tratamento com ATP não altera o efeito Bohr e a velocidade de reação dos grupos tióis com 4-PDS aumenta muito pouco, enquanto que nos girinos destes animais o conhecido aumento de efeito Bohr causado pelo ATP (ARAKI, 1973) não é acompanhado evidentemente por variação na acessibilidade dos grupos tióis o que é esperado dado tal hemoglobina não apresentar tais grupos.

Pelos resultados indicados na tabela III pode-se assumir que na realidade a acessibilidade de grupos SH e o grau de efeito Bohr alcalino estão de alguma forma correlacionados como discutiremos. Alterações conformacionais causadas pela presença do efetor alostérico, ATP pode ser a causa da maior ou menor velocidade de acesso do 4-PDS aos grupos tióis das hemoglobinas.

Outras experiências para explicar os achados acima foram realizadas. Entre elas aquelas de cinética de desnaturação de hemoglobinas de anfíbios.

Considerando a absorbância do tempo zero como 100% de forma nativa e a absorbância da forma totalmente desnaturada aquela obtida após desnaturação pelo calor, calculou-se porcen-

tagem de forma nativa para cada intervalo de tempo. O complemento aritmético desses valores correspondia à porcentagem de desnaturação e com elas calculou-se $k' = \frac{1}{t} \ln \frac{100}{100-x}$ onde x é a porcentagem de desnaturação no tempo t . A inclinação da reta determinada por esses valores em função do tempo foi calculada e correspondia a constante cinética de desnaturação (k), considerando a mesma como cinética de primeira ordem como é usual (TANFORD, 1969).

A tabela IV mostra que a velocidade de desnaturação, da mesma forma que a velocidade de acessibilidade de grupos tióis, guarda certa relação com o efeito Bohr. Assim, com exclusão do girino de Rana catesbeiana, hemoglobinas com efeito Bohr mais acentuado são mais sujeitas a desnaturação ou menos estáveis quando tratadas por agentes desnaturantes como benzoato de sódio. A figura V mostra as curvas cinéticas obtidas.

Finalmente a tabela V mostra os valores do coeficiente de Hill (n) encontrados para as diferentes hemoglobinas de anfíbios estudadas em diferentes pH. Pelo exame da tabela pode-se inferir que as hemoglobinas de Bufo paracnemis tratadas ou não com ATP apresentam aumento destes valores com o pH demonstrando claro aumento da cooperatividade da hemoglobina com o pH. Já a hemoglobina de Pipa carvalhoi revela um fato interessante, isto é, os valores de n pouco se alteram com o pH na proteína isenta de íons enquanto que quando tratada com ATP a cooperatividade aumenta, isto é, de um valor menor que 1 em pH 6,0

TABELA IV

Constante de pseudo-primeira ordem da reação de desnaturação das hemoglobinas por benzoato de sódio efeito Bohr de diferentes famílias de anfíbios.

Animal	Tratamento	k' (min. ⁻¹)	H^+ Efeito Bohr
<u>Bufo paracnemis</u>	"stripped"	0,033	-0,08
<u>Bufo paracnemis</u>	+ ATP	0,029	-0,07
<u>Pipa carvalhoi</u>	"stripped"	0,033	-0,06
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	"stripped"	0,179	-0,29
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	+ ATP	0,196	-0,29
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	"stripped"	0,085	nulo
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	+ ATP	0,078	-0,25

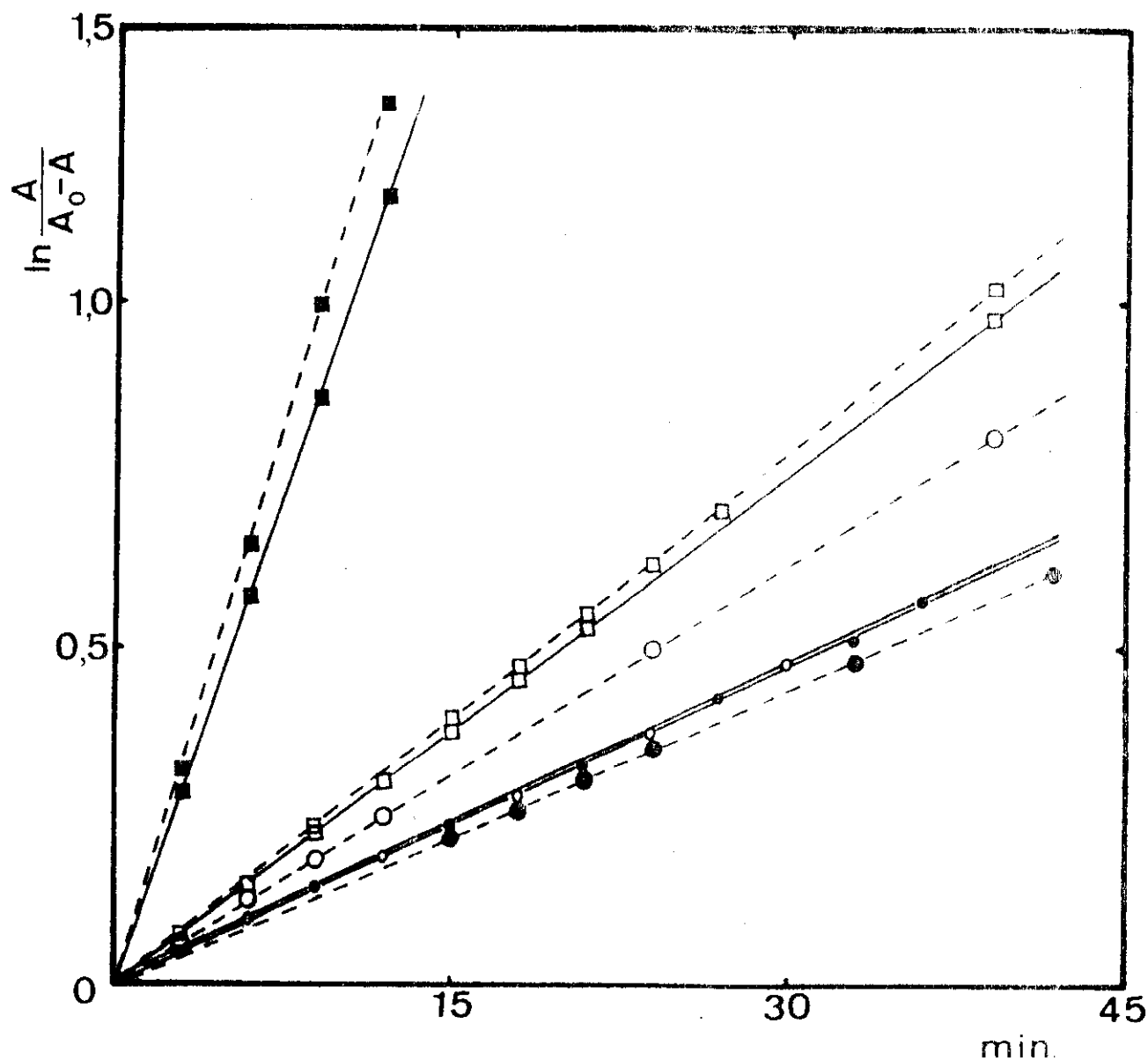


FIGURA V - Cinética de desnaturação por benzoato de Na 1M em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 das hemoglobinas "stripped" (—) e com ATP $1 \times 10^{-3} M$ (-----) de *Bufo paracnemis* (●); *Pipa carvalhoi* (○); *Rana catesbeiana* adulto (■) e *Rana catesbeiana*, girino (□) em tampão Bis-Tris 0,05M entre os pH 6,0 e 8,0

TABELA V

Valores de n (coeficiente de Hill) das hemoglobinas de diferentes anfíbios em diferentes pH.

Animal	Tratamento	pH				
		6,0	6,4	7,0	7,5	7,9
<u>Bufo paracnemis</u>	"stripped"	1,879	1,744	1,945	2,050	2,229
<u>Bufo paracnemis</u>	+ ATP	1,696	1,790	1,985	2,153	2,186
<u>Pipa carvalhoi</u>	"stripped"	1,644	1,959	2,238	1,968	2,179
<u>Pipa carvalhoi</u>	+ ATP	0,799	1,422	1,627	2,269	2,178

para um valor maior que 2 em pH alcalino.

A determinação do número de grupos tióis acessíveis ao reagente utilizado (4-PDS) em hemoglobina de Bufo paracnemis mostrou a existencia de 2 grupos por molécula ou seja, 2 grupos SH livres em cada tetramero.

DISCUSSÃO

O objetivo inicial da presente tese foi estabelecer a possível relação entre a intensidade do efeito Bohr das hemoglobinas de diferentes anfíbios e a acessibilidade dos grupos tióis das mesmas. O interesse no tema nasceu de resultados parciais obtidos com Pipa carvalhoi um anfíbio que vive na água mesmo na fase adulta. Esse animal tem hemoglobinas com baixo efeito Bohr (-0,06), com 8 grupos tióis tituláveis por técnica de reagentes de tióis como o p-hidroxi-mercúrio-benzoato e a acessibilidade destes grupos dificultada de acordo com a análise da cinética de reação dos grupos tióis de sua hemoglobina com 4-PDS ($k' = 0,0028 \text{ min}^{-1}$). Além disso foi interessante observar que na presença do efector heterotrópico ATP o efeito Bohr aumenta (-0,46) e os grupos SH ficam mais acessíveis e a constante de velocidade desses grupos com o 4-PDS também aumenta ($k' = 0,014$). De posse desses dados iniciais resolvemos estender esses estudos para outros anfíbios e avaliar globalmente o processo. Para isto escolhemos Rana catesbeiana, anuro muito estudado, como modelo, tanto na fase adulta como na larval e Bufo paracnemis cuja frequência é alta em nosso meio e que contudo não tinha sido ainda estudado. Desta forma poderemos dividir o presente trabalho em dois capítulos, isto é, um em que se estudou hemoglobinas de Bufo paracnemis e o outro em que o efeito Bohr das hemoglobinas de vários anfíbios foram relacionados com grupos tióis e desnaturação.

Bufo paracnemis um anfíbio "terrestre" tal como a Rana catesbeiana de volume corpóreo adequado dos quais se pode obter sangue em quantidades razoáveis permitindo estudos quase individuais num só animal, foi sangrado e suas hemoglobinas preparadas como descrito. A análise eletroforética em gel de poliacrilamida permitiu a separação de suas hemoglobinas em dois componentes, HbI e HbII, sendo o HbI o de menor mobilidade anódica. Os resultados da eletroforese foram repetitivos para diferentes amostras de hemolisados individuais, mostrando a inexistência de polimorfismo nas hemoglobinas desses anfíbios.

Com finalidade comparativa estudamos outro processo de fracionamento qual seja o de cromatografia de troca iônica sendo utilizada a resina CM-celulose equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 6,4 em um sistema de gradiente linear de pH para eluição. Obtivemos por esse procedimento analítico duas frações que denominamos HbI e HbII em correspondência ao perfil eletroforético. As proporções desses componentes no hemolisado total foram de 30% para a HbI e 70% para HbII.

A variabilidade em número de componentes nos hemolisados de diferentes animais tem sido discutida em termos de maior ou menor grau de polimerização, hidridização de cadeias e recombinação diferentes entre os tipos de cadeia α e β ou ainda a níveis de "loci" de síntese destes componentes (MCLEAN E JURD, 1972). Em qualquer dos casos a existência de dois componentes no hemolisado de Bufo paracnemis contrastam com a existência de

três em Rana catesbeiana (HAMADA, 1964) e quatro em Pipa carvalhoi (MEIRELLES, 1977a).

Avaliação da afinidade das hemoglobinas pelo ligante oxigênio no hemolisado total "stripped" por técnica espectrofotométrica, mostrou valor de P_{50} de 18,5mm de Hg a 27°C em pH 7,4. Ao se comparar esse valor com os de outros anfíbios como a Rana catesbeiana, 13,4mm de Hg (RIGGS, 1951) e Pipa carvalhoi, 6,6mm de Hg (MEIRELLES, 1977b) verifica-se uma menor afinidade pelo ligante O_2 nas hemoglobinas do anfíbio em estudo. Esses achados podem ser explicados pelo fato de o Bufo paracnemis ser de vida estritamente terrestre onde a pressão de oxigênio é bastante alta, ao contrario da Pipa carvalhoi que vive em baixa tensão de O_2 (vida aquática) ou da Rana catesbeiana que apesar de hábitos terrestres, passa longo tempo submersa. Comparando esses resultados com outro anfíbio da mesma família Bufonidae observamos que a baixa afinidade pelo oxigênio deve ser comum na família pois o Bufo marinus tem valores de P_{50} muito alto da ordem de 42mm de Hg (PROSSER, 1968). A afinidade da hemoglobina de Bufo paracnemis pelo oxigênio quando em presença de concentração saturante de ATP mostrou uma pequena diminuição do P_{50} (17,8mm de Hg) fato esse já conhecido em hemoglobinas (CHANUTIN, 1967; BENECH, 1967) porém os valores do coeficiente de Hill (n) (HILL, 1910) pouco são alterados com ATP, isto é, continuam aumentando com o pH mostrando um claro aumento de cooperatividade destas hemoglobinas em relação a prótons (tabela V).

Relativamente ao efeito Bohr (número de prótons liberados por oxigênio ligado) encontramos para o hemolisado total de Bufo paracnemis "stripped" um valor de $\Delta H^+ = -0,08$ no intervalo de pH de 6,4 a 8,0. Esse baixo valor para efeito Bohr encontrado difere de outra espécie da família Bufonidae onde o Bufo marinus, por exemplo, apresenta valores de -0,28 (HALL, 1966).

Quanto a influencia do modulador heterotrópico ATP em relação ao efeito Bohr, tem sido discutida em termos de existência de um sítio de ligação para fosfato orgânico no eixo axial do tetramero entre os dois grupos NH_2 das cadeias β_1 e β_2 (PERUTZ, 1970), discutidos na introdução. Nas hemoglobinas onde há este sítio de ligação que parece ser de natureza eletrostática o fosfato orgânico estabelece uma ponte salina entre $Val_{\beta 1}$, $His_{\beta 2}$ e $His_{\beta 143}$ da cadeia I com a $Lys_{\beta 82}$ da outra cadeia induzindo alteração conformacionais (ARLONE, 1972) que implicaria numa menor afinidade pelo ligante. Evidentemente hemoglobinas que diferem entre si na estrutura primária na região dos resíduos de amino ácidos descritos não apresentam efeito de ATP, Assim alguns anfíbios adultos não devem possuir esse sítio enquanto que as hemoglobinas de girinos nas quais o ATP exerce um grande efeito heterotrópico os possuem e conseqüentemente há o aparecimento de um efeito Bohr denominado latente (ARAKI, 1973). Na hemoglobina de Bufo paracnemis o ATP não possui pois efeito heterotrópico, em nada alterando o valor do efeito Bohr, fato comum em anfíbios adultos de habitat terrestre como a Rana catesbeiana em

que o nucleotídeo também não se apresenta como efeto heterotr^opico. (Tabela I).

Afim de se conhecer melhor outras propriedades das hemoglobinas de Bufo paracnemis que pudessem contribuir de alguma forma para os estudos comparativos propostos na presente tese, determinamos a presença de grupos tióis livres na molécula de hemoglobina. Para tal escolhemos o 4-PDS por ser um reativo cujo grupo cromóforo, piridona, que se forma após a reação com SH tem pico de absorção a 324nm não coincidente portanto com região de espectro da hemoglobina e em contraposição a outros métodos usuais de titulação de SH como o DTNB(ELLMAN,1959) e NEM (ALEXANDER,1958) e portanto mais conveniente para hemoproteínas. O reagente 4-PDS também não apresenta modificações em função da presença de EDTA (usualmente utilizado para prevenção de auto-oxidação de hemoglobinas) enquanto que quando se utiliza PCMB (BOYER, 1954) a presença de EDTA induz a erros de aproximadamente 30% no número de grupos SH tituláveis. A formação de piridona pode ser útil não só para a titulação como também para o estudo cinético da reação de grupos tióis tituláveis como justificamos. A determinação dos grupos SH tituláveis da hemoglobina de Bufo paracnemis pelo 4-PDS mostrou a existência de dois grupos por molécula ou por 64.000g.

O número de grupos tióis/mol em hemoglobinas de anfíbios é bastante variável o que proporcionou a RIGGS (1951) correlacionar esse número com a grandeza do efeito Bohr já que

nas espécies por êle estudadas havia uma correlação positiva entre número de grupos tióis tituláveis e efeito Bohr. Outras evidências dessa correlação estavam ligadas ao fato de hemoglobinas de girino não possuírem efeito Bohr nem grupos SH, porém essa correlação já não é mais aceita, admitindo-se como doador de prótons para o efeito Bohr outros grupos que não o SH. Porém pela sua alta reatividade e existência de número variáveis destes grupos na molécula devem condicionar comportamentos fisiológicos da proteína ainda não esclarecidos. Assim podemos citar que dentro dos anfíbios existe uma variação bastante grande no número de grupos tióis tituláveis como acontece na Rana catesbeiana que possui 4 grupos (RIGGS, 1951), a Pipa carvalhoi que possui 8 (MEIRELLES, 1978b) a Rana grylio, 6; Rana pipiens, 7 e a Leptodactylus pentadactylus que possui 8 (TRADER, 1966).

Neste ponto de nossa discussão, de posse de alguns parametros estruturais e funcionais de hemoglobinas de Bufo paracnemis poderemos examinar os dados obtidos em comparação com outros anfíbios relativos à efeito Bohr, constante cinética de reação 4-PDS/Hb e de desnaturação, isto é, passaremos a discutir o segundo capítulo proposto anteriormente, A tabela VI mostra uma sùmula dos resultados obtidos. Do exame da tabela VI podemos concluir que a acessibilidade dos grupos tióis das diferentes hemoglobinas estudadas dentro de uma mesma espécie é maior quanto mais pronunciado for o efeito Bohr, o que pode ser evidenciado na hemoglobina de Pipa carvalhoi tratada ou não com

TABELA VI

Comparação entre efeito Bohr, constantes de pseudo-primeira ordem de desnaturação por benzoato de sódio e constantes de pseudo-primeira ordem da reação com 4-PDS de hemoglobinas de diferentes espécies de anfíbio.

Animal	Tratamento	Efeito Bohr	k' (PDS) (min ⁻¹)	k' (desn.) (min ⁻¹)
<u>Bufo paracnemis</u>	"stripped"	-0,08	0,46	0,033
<u>Bufo paracnemis</u>	+ ATP	-0,07	0,38	0,029
<u>Pipa carvalhoi</u>	"stripped"	-0,06	0,0028	0,033
<u>Pipa carvalhoi</u>	+ ATP	-0,46	0,014	0,046
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	"stripped"	-0,29	0,084	0,179
<u>Rana catesbeiana</u> (adulto)	+ ATP	-0,29	0,096	0,196
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	"stripped"	nulo	nulo	0,085
<u>Rana catesbeiana</u> (girino)	+ ATP	-0,25	nulo	0,078

o ATP. Já as proteínas que não apresentavam efeito de ATP, como o Bufo paracnemis, a constante de velocidade de reação com o 4-PDS não se altera. Assim poderíamos assumir que as regiões da hemoglobina de Pipa carvalhoi responsáveis pelo efeito Bohr possuem grupos SH tituláveis que se tornam mais acessíveis por tratamento com ATP que reconhecidamente induz alterações conformacionais nas hemoglobinas. Contudo, tais grupos não parecem estar obrigatoriamente envolvidos no efeito Bohr pois no caso da hemoglobina de girino de Rana catesbeiana há ausência de tais grupos e há um aumento de efeito Bohr na presença de ATP. Os grupos tióis da hemoglobina da Pipa carvalhoi estariam indicando somente alterações em regiões responsáveis pelo efeito do ATP que circunstancialmente estão localizados "próximo" daquela região. Quanto as hemoglobinas de outros anfíbios podemos supor que os grupos tióis acessíveis ou estariam afastados dos sítios comprometidos pelo efeito do ATP ou estariam próximos e neste caso a não variação da velocidade de reação desses grupos com o 4-PDS seria um índice da ineficácia do nucleotídeo como efetor alostérico dessas proteínas. Como, com exceção de girino de Rana catesbeiana, a variação ou não do efeito heterotrópico do ATP segue passo a passo a reatividade de grupos tióis é possível sugerir certa semelhança das regiões moleculares responsáveis por esse efeito nas hemoglobinas de animais adultos.

No caso de girino a ausência de grupos tióis e a presença de efeito do ATP sugerem mudanças profundas em estrutu

ra primária das hemoglobinas mesmo em comparação com a fase adulta da mesma espécie.

Outros resultados desta tese em relação a estabilidade das hemoglobinas podem também ser discutidos. Assim, um exame da tabela VI mostra que a constante de velocidade de desnaturação das hemoglobinas de diferentes espécies que foram tratadas por benzoato de sódio guardam uma certa relação com o efeito Bohr, aproximadamente no mesmo sentido da acessibilidade de grupos tióis, quando observada dentro da mesma espécie. Aqui, também, hemoglobinas de girino fazem exceção. Assim, hemoglobinas de baixo efeito Bohr desnatura mais lentamente na presença de benzoato.

Tanto os resultados da velocidade de acesso a grupos tióis como de desnaturação das hemoglobinas parecem sugerir fatos comuns, isto é, de acordo com nossos resultados, quanto menor o valor do efeito Bohr de uma dada hemoglobinas, menor é a acessibilidade dos grupos tióis e maior é a estabilidade da molécula frente a agentes desnaturantes. Partindo-se da premissa que grupos SH não devem participar dos sítios responsáveis pelo efeito heterotrópico de prótons, como dissemos, é possível pressupor que a sua maior acessibilidade seria circunstancial, coincidente com o maior efeito Bohr das proteínas. As experiências de desnaturação por outro lado mostram uma certa correlação entre esse fenômeno e o efeito Bohr que pode ser também coincidente. Contudo, uma outra correlação pode ser feita entre grupos tióis e des

naturação. De longa data é conhecida tal correlação (TANFORD, 1968) isto é a maior exposição destes grupos em proteínas facilmente desnaturáveis. Talvez isto seja o que realmente acontece com nossos resultados. Fica contudo a incógnita porque proteínas com baixo efeito Bohr são mais resistentes a ação de agentes desnaturantes.

Nas condições descritas é possível imaginar um modelo que explicasse nossos achados: sendo os efeitos heterotrópicos de prótons ou nucleotídeos, efeitos que envolvem a estrutura quaternária da hemoglobina, as proteínas com efeito Bohr teriam estruturas mais "frouxas" permitindo mudanças conformacionais mais profundas. Já aquelas que não apresentam tal efeito teriam estrutura quaternária mais "rígida", dificilmente desnaturáveis ou sujeitas ao efeito dos prótons ou mesmo de nucleotídeos. As constantes cinéticas de acessibilidade aos grupos tióis por 4-PDS e aquelas de desnaturação parecem indicar essa possibilidade.

Um outro ponto a ser analisado é a reação heme-heme que é uma interação heterotrópica que pode ser avaliada pelo coeficiente de Hill (n). Quando esse valor é maior que 1 dizemos que a molécula possui cooperatividade positiva e quando esse coeficiente assume valores menores que 1 dizemos que a cooperatividade é negativa. A variação no valor de n em função da variação do pH geralmente não ocorre em mamíferos mas já é observada em Hb de peixes e anfíbios. Essa alteração do valor de n quando varia o pH pode ser explicada como diferença nas propriedades in

trínsecas das duas diferentes cadeias que não guardam uma relação linear entre o número de prótons ligados e a oxidação fracional (\bar{y}) (BRUNORI, 1965) ou a problemas de oxidação - redução da hemoglobina. Em peixes a variação de \bar{n} com a variação do pH é grande, variando de 2,7 em pH 9 a 0,5 em pH 6,5 (ROSSI-FANELLI, 1960). Em pH 6,5 o coeficiente de Hill é igual a 0,5 como se em baixo pH somente metade das moléculas reagissem com o ligante. Esse efeito (ROOT, 1931) mostra um caso extremo de heterogeneidade de intra molecular sob ação do pH ou uma cooperatividade negativa. O equilíbrio "redox" de hemoglobina mostra que em pH 8 as cadeias α e β da hemoglobina humana tem o mesmo potencial de oxi-redução enquanto que em pH 6,0 a cadeia β tem esse potencial 6,0mV mais positivo que a α (BRUNORI, 1968), o que provoca uma variação do valor de \bar{n} nesses pH por causa da heterogeneidade funcional e da interação homotrópica entre os 2 tipos de cadeia (BRUNORI, 1965, 1968). Os valores de \bar{n} na hemoglobina humana variam de 2,5 em pH 9 a 1,2 em pH 6,0 (ANTONINI, 1964). A concentração salina também pode alterar o valor de \bar{n} . Segundo Brunori (1969) o valor de \bar{n} na hemoglobina humana em pH 8 varia de 2,5 quando em alta concentração de NaCl, para 2,0 quando em baixa concentração desse mesmo sal.

Os nossos resultados quanto as determinações do coeficiente de Hill parecem interessantes. Assim a análise da tabela V mostra que em todos os anfíbios estudados há cooperatividade positiva, isto é, o valor de \bar{n} é maior que 1. Observamos

também que o efeito do ATP no coeficiente de Hill é mais acentuado em pH ácido enquanto que em pH acima de 7 a variação de n é desprezível. Isto se deve, talvez ao fato de o ATP ser mais atuante como efetuator de alterações heterotrópicas em meio ácido, induzindo uma maior afinidade da molécula pelo oxigênio nos pH onde o valor de P_{50} de Bufo paracnemis varia de 11,5 a 17,3 mm de Hg e da Pipa carvalhoi varia de 9,7 a 21,3 mm de Hg quando isento de íons e quando tratados por ATP. Mas pelo exame desses resultados, que estão expressos na tabela V, dois fatos nos chamaram atenção, aquele do aumento dos valores de n com o pH ser evidente na hemoglobina de Bufo paracnemis tratadas ou não com ATP e a mudança brusca nestes valores nas hemoglobinas de Pipa carvalhoi, isto é, na ausência de ATP os valores de n acima de pH 6,4 permanecem constantes com o pH na proteína "stripped" enquanto que quando a proteína é tratada pelo ATP estes valores (n) aumentam claramente com o pH. A título de simplificação poderíamos dizer que hemoglobinas em que o ATP não tem efeito, as interações heme-heme em diferentes pH são aproximadamente constantes, isto é, nenhuma variação do comportamento na curva é notado (figura VI) enquanto que as proteínas nas quais o ATP tem efeito este comportamento se modifica como se nota na curva (figura VI). Desta observação poderia-se inferir que proteína com baixo efeito Bohr (Pipa carvalhoi sem ATP) e que não apresentam grande variação de cooperatividade com o pH passam a apresentá-la quando um efector alostérico, ATP, atua sobre elas.

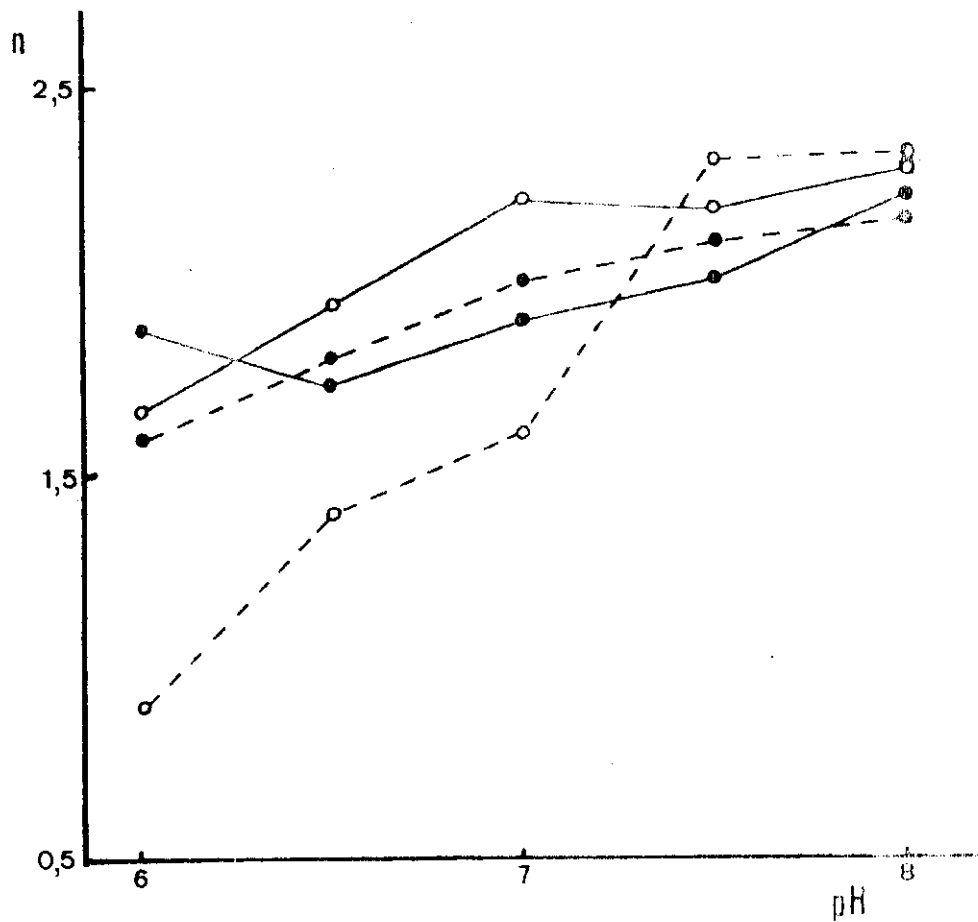


FIGURA VI - Valor de n (plot. de Hill) das hemoglobinas "stripped" (—) e com $ATP\ 10^{-3}M$ (-----) de *Bufo paracnemis* (●) e *Pipa carvalhoi* (○) em tampão Bis-Tris 0,05M em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0.

De nossos resultados tiramos algumas sugestões:

1) hemoglobinas de baixo efeito Bohr acentuado por ATP (Pipa carvalhoi) apresentam estrutura com grupamentos de amino ácidos que interagem na molécula por ligações mais estáveis não permitindo fácil acesso a tais grupos, como pode ser verificado com 4-PDS em relação a grupos tióis e mesmo pelo íon H^+ (efeito Bohr) tais moléculas são menos sujeitas a ação de desnaturantes. Na presença de polifosfatos (ATP) ou efetores heterotrópicos como o hidrogênio, mudanças conformacionais ocorrem provavelmente porque os sítios para polifosfatos são independentes e suficientemente afastados daqueles para prótons. A variação de cooperatividade (n) em relação ao pH sofre mudanças significativas. ii) hemoglobinas com efeito Bohr considerados normais (Rana catesbeiana e Bufo paracnemis, por exemplo) apresentam estruturas cujos grupamentos de amino ácidos interagem por ligações menos estáveis, atestado pela maior acessibilidade de grupos tióis além das constantes cinéticas de desnaturação frente a agentes como benzoato de sódio. Já os polifosfatos não tem ação evidente na cooperatividade ou melhor sua variação com o pH é também independente de polifosfatos o que é de se esperar já que estes não são efetores alostéricos das proteínas.

Evidentemente estes resultados são preliminares e outras hemoglobinas deverão ser estudadas para confirmar ou não os achados. Contudo, acreditamos que elas oferecem os primeiros passos nos estudos do intrincado problema do mecanismo do efeito Bohr

RESUMO

A caracterização das hemoglobinas do anuro Bufo paracnemis mostrou a existência de dois componentes que por cromatografia em CM-celulose são eluídos em pH 6,8 e 7,7 usando-se, para a eluição, tampão fosfato 0,01M. Esses componentes, correspondem a 30 e 70% do hemolisado total, respectivamente.

O efeito Bohr encontrado para o hemolisado total dessas hemoglobinas foi de -0,08 para a isenta de íons e -0,07 quando na presença de ATP 10^{-3} M.

O estudo da cinética de reação de hemoglobinas de Pipa carvalhoi, Rana catesbeiana e Bufo paracnemis com 4-PDS (reagente específico para grupos SH) mostrou maior reatividade aos grupos tíóis nas moléculas que apresentam maior efeito Bohr. A constante cinética dessa reação também é maior na presença de ATP nas hemoglobinas que tem o efeito Bohr aumentado na presença desse efetor. Hemoglobinas de Pipa carvalhoi apresentam $H^+ = -0,06$ e $k' = 0,0028 \text{ mim}^{-1}$ e $H^+ = -0,46$ e $k' = 0,014 \text{ mim}^{-1}$ quando na presença de ATP; de Bufo paracnemis apresenta $H^+ = -0,08$ e $k' = 0,46 \text{ mim}^{-1}$ e $H^+ = -0,07$ e $k' = 0,38 \text{ mim}^{-1}$ com ATP e de Rana catesbeiana $H^+ = -0,29$ e $k' = 0,084 \text{ mim}^{-1}$ e $H^+ = -0,29$ e $k' = 0,096 \text{ mim}^{-1}$ com ATP.

A cinética da reação de desnaturação dessas hemoglobinas por benzoato de sódio 1M mostrou correlações semelhantes pois a constante de desnaturação das hemoglobinas de Rana

catesbeiana varia de 0,179 a 0,196 min^{-1} quando na presença de ATP, de Bufo paracnemis varia de 0,033 a 0,029 min^{-1} e de Pipa carvalhoi de 0,03 a 0,046 min^{-1} .

Esses resultados indicam que as moléculas mais acessíveis ao 4-PDS são também mais acessíveis a prótons e mais resistentes a desnaturação.

Trabalhando com girino de Rana catesbeiana observou-se que os resultados foram discordantes com os resultados do animal adulto uma vez que esses animais possuem hemoglobinas sem efeito Bohr e com efeito de ATP e ainda não possuem grupos SH tituláveis pelo 4-PDS.

SUMMARY

Bufo paracnemis haemoglobins analysed by CM-cellulose chromatography presented two components which were eluted in pH 6.0 and 7.7 in the proportion of 30% and 70% of the total haemolysate respectively.

The Bohr effect expressed as $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ of the unfractionated stripped haemoglobins was -0.08 and in the presence of ATP -0.07.

Kinetic studies for determination of sulfhydryl groups reactivity in Bufo paracnemis, Pipa carvalhoi and Rana catesbeiana performed with 4-4 dipyridine disulfite showed higher pseudo-first order velocity constants to the both haemoglobins with present Bohr effect and for those with the ATP have heterotropic effect.

The haemoglobin denaturation kinetics studies of different amphibians are consistent with higher velocity constants for those with more reactive SH groups.

The results suggested that the haemoglobins with groups more reactive to 4-PDS are also more subjected to proton action and more resistant to the denaturing agents.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, N.M. Spectrophotometric assay for sulfhydryl groups using N-ethylmaleimide. Anal.Chem. 30:1292-1294, 1958.
- AMPULSKI, R.S.; AYERS, V.E.; MORELL, S.A. Determination of the reactive sulphhydryl groups in heme proteins with 4,4'-dipyridinedisulfite. Anal.Biochem. 32:163-169, 1969.
- ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 1971.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; ROSSI-FANELLI, A.; Studies on the relation between molecular and functional properties of hemoglobin. J.Biol.Chem. 238:2950-2957, 1963.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; TAYLOR, J.F.; CAPUTO, A.; ROSSI-FANELLI, A. Studies on the oxidation-reduction potential of heme proteins. J.Biol.Chem. 239:907-912, 1964.
- ARAKI, T.; KAJITA, A.; SHUKUYA, R. Latent Bohr effect in the tadpole haemoglobin of Rana catesbeiana: Nature New Biology 242(121):254-256, 1973.

- ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature. 237:146-149, 1972.
- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. (1962) citado por Antonini, E.; Brunori, M. 1971.
- BENESCH, R.; BENESCH, R.E. The effect of organic phosphates from the human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Comm. 26:162-167, 1967.
- BENESCH, R.; BENESCH, R.E.; YU, C.I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.US. 59:526-532, 1968.
- BINOTTI, I.S.; GIOVENCO, B.; GIARDINA, E.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M.; WYMAN, J. Studies on the functional properties of the fish hemoglobin. II. The oxygen equilibrium of the isolated hemoglobin components from trout blood. Arch.Bioch.Biophys. 142:274-280, 1971.
- BOAVENTURA, J.; BOAVENTURA, C.; BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BOSSA, F. and WYMAN, J. Functional properties of carboxypeptidase digested hemoglobins. J.Mol.Biol. 82:499-511, 1974.

- BOYER, P.D. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. J.Amer.Chem.Soc. 76, 4331-4337, 1954.
- BRUNORI, M. Molecular adaptation to physiological requirements: The hemoglobin system of trout. in: Current topics in cellular regulation. vol.9. Acad.Press San Francisco, 1975 p.1-39.
- BRUNORI, M.; AMICONI, G.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.; WINTERHALTER, K.H. Artificial intermediates in reaction of haemoglobin. Functional and conformational properties of the cyanmet intermediates. J.Mol.Biol. 49:461-471, 1970.
- BRUNORI, M.; ALFSEN, A.; SAGGESE, U.; ANTONINI, E.; WYMAN, J. Studies on the the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J.Biol.Chem. 243:2950-2954, 1968.
- BRUNORI, M.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.; TENTORI, L.; VIVALDI, G; CARTA, S. The hemoglobin of amphybis. VII. Equilibria and kinetics of the reaction of frog hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. Comp.Biochem.Physiol. 24:519-526, 1968
- BRUNORI, M.; TAYLOR, J.F.; ANTONINI, E.; WYMAN, J. Oxidation-reduction equilibrium of human hemoglobin in concentrated sodium chloride solution. Consistency with the (α β) dimer model. Biochemistry 8:2880-2883, 1969.

- BRUNORI, M.; WYMAN, J.; ANTONINI, E.; ROSSI-FANELLI, A.
Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J.Biol.Chem. 240:3317-3324, 1965.
- CHANUTIN, A.; CURNISH, R. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch.Bioch.Biophys. 121:96-102, 1967.
- CHAUVET, J.P.; ACHER, R. Phylogeny of hemoglobins chain of frog (Rana esculenta) hemoglobins. Biochemistry 11: 916-927, 1972.
- CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; PERUTZ, M.F.; ROSSMAN, G.K.
Three dimensional Fourier synthesis at 5,5⁰ resolution. Description of the structure. Proc.Roy Soc. 265:161-166, 1962.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch.Bioch.Biophys. 82:70-72, 1959.
- GRASSETTI, D.R.; BROKKE, M.E.; MURRAY, Jr., J.F. (1965) Cited by Ampulsky, R.S.; Ayers, V.E.; Morell, S.A. 1969.
- HALL, F.G. Hemoglobin function in blood of Bufo marinus. J.Cell.Physiol. 68:69-74, 1966.
- HAMADA, K.; SAKAY, Y.; SHUKUYA, R.; KAZIRO, K. Biochemical metamorphosis of hemoglobin in Rana catesbeiana. J.Biol.Chem. 55:636-642, 1964.

- HILL, A.V. (1910) Citado por Antonini, E e Brunori, M. 1971.
- KILMARTIN, J.V.; ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO₂ combination and reduction of the Bohr effect in haemoglobin chemically modified at its α amino groups. Nature 222:1243-1246, 1969.
- KILMARTIN, J.V.; WOOTTO, N.J.F. Inhibition of Bohr effect after removal of C-terminal histidines from haemoglobin β chain. Nature 228:766-767, 1970.
- MAUK, A.G.; TAKETA, F. Effects of organic phosphates on oxygen equilibria and kinetics of S.A reaction in feline hemoglobins. Arch.Bioch.Biophys. 150:376-381, 1972.
- MC CUCHEAN, F.H. (1936) Citado por Hamada, K.; Sakay, Y.; Shukuya, R e Kaziro, K. 1964.
- Mc LEAN, N.; JURD, R.D. The control of haemoglobin synthesis Biol.Rev. 47:393-437, 1972.
- MEIRELLES, N.C.; FOCESI, Jr. A. Pipa carvalhoi hemoglobins. I. Electrophoretic and chromatographic analysis of the blood hemolysate. IRCS Med.Sci. 5:91, 1977a.
- MEIRELLES, N.C.; FOCESI, Jr. A. Pipa carvalhoi hemoglobins II. Bohr effect of the blood hemolysate. IRCS Med.Sci. 5:92, 1977b.

MEIRELLES, N.C.; VIEIRA, M.L.C., FOCESI, Jr. A. Pipa carvalhoi haemoglobins. III. Influence of organic phosphates on the Bohr effect. IRCS Med.Sci. 6:226, 1978a.

MEIRELLES, N.C.; VIEIRA, M.L.C.; AIROLDI, L.P.S.; FOCESI, Jr. A. Some larval properties of Pipa carvalhoi adult hemoglobins. Comp.Bioch.Physiol. (in press) 1978b.

MORELL, S.A.; HOFFMAN, P.; AYERS, V.E.; TAKETA, F. Reversible changes in the NEM-reactive SH groups of hemoglobin on oxygenation-deoxygenation. Proc.Nat.Sci.US 48: 1057-1061, 1962.

MUIRHEAD, H.; COX, J.; MAZZARELLA, L.; PERUTZ, M. Structure and function of haemoglobin. III. A three dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at $5,5\text{\AA}$ resolution. J.Mol.Biol. 28:117-150, 1967.

NOBBS, C.L.; WATSON, H.C.; KENDREW, J.C. Structure of deoxymyoglobin a crystallographic study. Nature 209: 339-341, 1966.

PERUTZ, M.F. Structure and function of haemoglobin. I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. J.Mol.Biol. 13: 646-658, 1965.

- PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Haem-Haem interaction and the problem of allostery. The Bohr effect and combination with organic phosphates. Nature 228: 726-739, 1970.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, C.C.G.; MATHEWS, F.S.; MCGANDY, E.L. and WEBB, L.E. Tree-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2,8^oÅ resolution: (1) X-ray analysis. Nature 219:29-32, 1968.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; MAZZARELLA, L.; CROWTHER, R.A.; GREER, J.; KILMARTIN, J.V. Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin. Nature 222:1240-1243, 1969.
- PROSSER, C.L.; BROWN, F.A. Fr. Fisiologia comparada Editorial Interamericana 2a. edição, 1968.
- RIGGS, A. The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog. J.Gen.Physiol. 35(1): 23-40, 1951.
- RIGGS, A. Molecular adaptation in hemoglobins: Nature of the Bohr effect. Nature 183: 1037-1038, 1959.
- RIGGS, A. The nature and significance of the Bohr effect in mammalian hemoglobins. J.Gen.Physiol. 43(4):737-752, 1960.

- RIGGS, A. The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect upon the oxygen equilibrium. J.Biol.Chem. 236:1948-1954, 1961.
- ROOT, R.W. The respiratory function of the blood of marine fishes. Bull.Bull Mar. Biol.Cab.Woods Hole 61:427-431, 1931.
- ROSSI-FANELLI, A.; ANTONINI, E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Arch.Biochem.Biophys. 77:478-492, 1958.
- ROSSI-FANELLI, A.; ANTONINI, E. Oxygen equilibrium of haemoglobin from Thunnus thynnus. Nature 186:895-896, 1960.
- SNOW, N.S. Some observation on the reactive sulfhydryl groups in haemoglobin. Biochem.J. 84:360-364, 1962.
- TAKETA, F.; MORELL, S.A. Changes in the 4-PDS reactive SH groups of hemoglobin associated with the binding phosphates. Anal.Bioch. 32:169-174, 1969.
- TANFORD, C. Protein denaturation in advances protein chemistry. Academic Press, New-York, London, 1968 pg.121.
- TAYLOR, J.F.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M.; WYMAN, J.; Studies on human hemoglobin treated with various sulfhydryl reagents. J.Biol.Chem. 241: 241-248, 1966.

- TRADER, C.D.; FRIEDEN, E. Dimerization and other chemical changes in amphibian hemoglobins during metamorphosis. J.Biol.Chem. 241:357-366, 1966.
- WINTERHALTER, K.H.; ANDERSON, N.M.; AMICONI, C.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Functional properties of hemoglobin. European J.Bioch. 11: 435-440, 1969.
- WYMAN, J.Jr. Heme proteins. In: Advances in Protein Chemistry, vol.IV, Acad.Press, New York, 1948, p.410-531.
- WYMAN, J.Jr. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: A second look. In: Advances in Protein Chemistry, vol.XIX, Acad.Press, New York, 1964, p.223-286.
- WYMAN, J.Jr.; ALLEN, D.W. (1951) Citado por Antonini, E e Brunori, M. 1971.
- ZITO, R.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.Jr. The effect of oxygenation on the rate of digestion of the human hemoglobins by carboxypeptidases. J.Biol.Chem. 239:1804-1808, 1964.

APÊNDICE

Cálculo de log K, n (coeficiente de Hill) e log P₅₀

Programa utilizado para calcular log K, log P₅₀ e n(coeficiente de Hill) de um experimento que tenha as absorvâncias das formas oxigenadas, deoxigenadas e de quatro diferentes adições de ar, na calculadora Sharp modelo Compet 364 P III. Para isso fornece-se a calculadora a absorvância (A₅₇₇) de forma deoxigenada e no visor aparecerá H

Então,

H ——— absorvância oxi
 H ——— absorvância 1a adição
 H ——— absorvância 2a adição
 H ——— absorvância 3a adição
 H ——— absorvância 4a adição
 H ——— 0

que recomeça os mesmos cálculos com as absorvâncias dos outros comprimentos de onda (A₅₆₀ e A₅₄₀).

H ——— 1

que calcula log K de cada adição e os imprime

H ——— log PO₂ da 1a adição
 H ——— log PO₂ da 2a adição
 H ——— log PO₂ da 3a adição
 H ——— log PO₂ da 4a adição

e os cálculos de n(coef. de Hill) e do log P₅₀ são executados, imprimindo os resultados.

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
1	x → M	deoxi	33	sub	
2	1		34	2	
3	C		35	x → M	log Y ₁
4	sub		36	4	
5	1		37	MR	
6	M+	deoxi-oxi	38	5	
7	3		39	sub	
8	sub		40	2	
9	1		41	x → M	log Y ₂
10	M+	deoxi-1 _a adição	42	5	
11	4		43	MR	
12	sub		44	6	
13	1		45	sub	
14	M+	deoxi-2 _a adição	46	2	
15	5		47	x → M	log Y ₃
16	sub		48	6	
17	1		49	MR	
18	M+	deoxi-3 _a adição	50	7	
19	6		51	sub	
20	sub		52	2	
21	1		53	x → M	log Y ₄
22	M+	deoxi-4 _a adição	54	7	
23	7		55	CM	
24	H	0 = volta 1 = continua	56	1	
25	x ≠ 0		57	CM	
26	5		58	2	
27	E		59	CM	
28	E		60	3	
29	→JR		61	CM	
30	5		62	9	
31	MR		63	CM	
32	4		64	0	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
65	MR		97	±	
66	4		98	x → M	numerador
67	sub		99	8	
68	3		100	4	
69	MR		101	X	
70	5		102	MR	
71	sub		103	0	
72	3		104	=	
73	MR		105	x → M	$n \sum x^2$
74	6		106	0	
75	sub		107	MR	
76	3		108	2	
77	MR		109	X	
78	7		110	=	$(\sum x)^2$
79	sub		111	MR	
80	3		112	0	
81	4		113	-	
82	X		114	±	
83	MR		115	=	denominador
84	9		116	÷	
85	=		117	MR	
86	x → M	$n \times \sum xy$	118	8	
87	8		119	RC	
88	MR		120	=	
89	2		121	F	
90	X		122	P	$n(\text{coef. Hill})$
91	MR		123	x → M	
92	1		124	0	
93	=	$\sum x \times \sum y$	125	X	
94	MR		126	MR	
95	8		127	2	
96	-		128	=	$b \times \sum x$

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
129	MR		16	0	
130	1		17	→JR	
131	-		18	3	
132	RC		19	±	
133	=		20	J→	
134	÷		21	0	
135	4	-a	22	→JR	Δ
136	=		23	0	
137	÷		24	E	
138	MR	b	25	E	
139	0			SUB-2	
140	=		26	x ≠ 0	
141	sub		27	.	
142	4		28	J→	
143	E		29	8	
144	E		30	→JR	
	SUB-1		31	.	
1	C		32	÷	
2	MR		33	MR	
3	1		34	3	
4	=		35	=	
5	H	oxi + adições	36	x → M	\bar{Y}
6	x ≠ 0		37	8	
7	2		38	C	
8	J→		39	MR	
9	0		40	8	
10	→JR		41	=	
11	2		42	1	
12	-		43	-	
13	x < 0		44	±	
14	3		45	÷	
15	J→		46	MR	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
47	8		79	.	
48	RC		80	8	
49	=	K	81	9	
50	CM		82	7	
51	.		83	M+	
52	CM		84	.	
53	±		85	RC	
54	CM		86	X	
55	0		87	MR	
56	÷		88	±	
57	=		89	X	
58	÷		90	4	
59	=		91	.	
60	÷		92	6	
61	=		93	3	
62	÷		94	2	
63	M+		95	M+	
64	0		96	.	
65	1		97	RC	
66	M+		98	X	
67	0		99	MR	
68	-		100	±	
69	÷		101	X	
70	MR		102	2	
71	0		103	.	
72	X		104	7	
73	M+		105	9	
74	±		106	7	
75	RC		107	M+	
76	X		108	.	
77	1		109	MR	
78	3		110	.	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
111	P	$\log K$	128	=	
112	→JR		129	M+	Σxy
113	8		130	9	
114	E		131	MR	
115	E		132	8	
	SUB-3		133	X	
116	M+		134	=	
117	1		135	M+	Σx^2
118	x → M	Y	136	0	
119	±		137	E	
120	H	$\log PO_2$	138	E	
121	x → M			SUB-4	
122	8		139	P	$\log P_{50}$
123	M+	Σx	140	F	
124	2		141	CM	
125	X		142	C	
126	MR		143	E	
127	±		144	E	

Cálculo da constante cinética (k') de primeira ordem

Programa utilizado para o cálculo da constante cinética de primeira ordem na calculadora Sharp modelo Compet 364 P III. Para isso forneceu-se o valor da absorbância do final da reação (A_{∞}) e,

H ——— intervalo de tempo utilizado

H ——— absorbância no tempo t_1

H ——— absorbância no tempo t_2

depois de ter sido fornecido todos os dados,

H ——— 0

que calcula e imprime $\text{Ln} \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A}$ de cada intervalo de tempo, $\log k'$ e $\text{Ln} k'$

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
1	M+	A_{∞}	15	2	
2	1		16	÷	
3	H	A_t	17	MR	
4	M+		18	1	
5	2		19	RC	$\frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_t}$
6	C		20	=	
7	→JR		21	sub	
8	1		22	1	$\log \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_t}$
9	H	A_t	23	M+	
10	J X ≠ 0		24	4	Σy
11	2		25	x → M	
12	J→		26	3	y
13	3		27	C	
14	→JR		28	MR	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
29	5		61	MR	
30	=		62	6	
31	MR		63	=	
32	2		64	x → M	
33	=		65	.	
34	x → M	x	66	MR	
35	5		67	9	
36	M+		68	×	
37	6	Σx	69	MR	
38	×		70	7	
39	MR		71	=	
40	3		72	MR	
41	=		73	.	
42	M+		74	-	
43	7	Σxy	75	x → M	
44	MR		76	.	
45	5		77	MR	
46	×		78	6	
47	=		79	×	
48	M+		80	=	
49	8	Σx^2	81	±	
50	1		82	x → M	
51	M+	n	83	±	$(\Sigma x)^2$
52	9		84	MR	
53	C		85	9	
54	J→		86	×	
55	1		87	MR	
56	→JR		88	8	
57	3		89	=	
58	MR		90	MR	
59	4		91	±	
60	×		92	=	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
93		÷	11		÷
94	MR		12		=
95	.		13		÷
96	RC		14	M+	$\sqrt[16]{x}$
97	=		15	0	
98	F		16	1	
99	P	$\log \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_t}$	17	M+	$\sqrt[16]{x} - 1$
100	×		18	0	
101	2		19	-	
102	.		20	÷	
103	3		21	MR	
104	0		22	0	
105	3		23	×	$\frac{\sqrt[16]{x} - 1}{\sqrt[16]{x} + 1} = w$
106	=	$\text{Ln} \frac{A_{\infty}}{A_{\infty} - A_t}$	24	M+	
107	P		25	±	
108	F		26	RC	
109	F		27	×	
110	CM		28	1	
111	C		29	3	
112	E		30	.	
113	E		31	8	
	SUB-1		32	9	
1	CM		33	7	
2	.		34	M+	$C_1 W$
3	CM		35	.	
4	±		36	RC	
5	CM		37	×	
6	0		38	MR	
7	÷		39	±	
8	=		40	×	
9	÷		41	4	
10	=		42	.	

PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO	PASSOS	PROGRAMA	OPERAÇÃO
43	6		56	9	
44	3		57	7	
45	2		58	M+	
46	M+	$C_1W + C_3W^3$	59	.	$C_1W + C_3W^3 + C_5W^5$
47	.		60	MR	
48	RC		61	.	
49	×		62	P	$\sim \log x$
50	MR		63	C	
51	±		64	CM	
52	×		65	C	
53	2		66	E	
54	.		67	E	
55	7				