Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo candidato Carlos Francisco Bonafé, e aprovada pela comissão julgadora

21/09/88

Estudos Bioquímicos e Físicos de Hemoglobina Extracelular de *Glossoscolex paulistus*(Oligochaeta)

Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Orientadora: Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles
Coorientadora: Profa. Dra. Iris Linares de Torriani

Tese apresentada no Instituto de Biologia no dia 21 de abril de 1988 para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP - Brasil
1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais Mário Bonafé e
Hedonéia Sampaio Bonafé

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles pela orientação dessa tese e, fundamentalmente, todo o apoio e incentivo nesses anos.

À Profa. Dra. Iris Linares de Torriani pela coorientação, cooperação, incentivo, amizade e ainda pela incansável revisão dessa tese.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. por ter-me introduzido à carreira científica, apoio desde o início e sugestões nesse trabalho, e juntamente com a Profa. Dra. Maria S. A. Matsuura e a Profa. Dra. Satie H. Ogo pela possibilidade de utilização dos equipamentos de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck e a Maria Célia Pires Costa pelo auxílio na determinação de $S_{20,w}$ da eritrocruorina.

A Christina Franco de Souza pela colaboração nas medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo e interpretação dos resultados.

À Profa. Dra. Neusa Maria Barbosa pelo apoio durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Anibal Vercesi e ao Prof. Dr. Hiroshi Ayohama pelas sugestões para essa tese.

Ao Prof. Dr. Augusto Abe pelo fornecimento de espécimes utilizadas no início do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Jerson Lima da Silva e a Mauro Villas Boas pela utilização de HPLC para controle da pureza da eritrocruorina.

Ao meu pai Mário Bonafé por todo incentivo, assim como pela manufatura dos agitadores de tonômetro.

A Silvano Lopes Gomes pelos desenhos da presente tese.

A José Alfredo Fraymann pela confecção dos slides.

Aos docentes, funcionários e alunos da Pós Graduação do Depto. de Bioquímica

deste Instituto pelo apoio e amizade nesses anos de convivência.

Ao Instituto de Matemática e Ciências de Computação da UNICAMP, e a Reinaldo, Conceição, Jonas, Cláudio e Gilson pelo auxílio na impressão dessa tese.

À CPqD - TELEBRÁs e a José Pedro Jr. pela impressão da presente tese.

À Universidade Estadual de Campinas pelo apoio e parte do financiamento do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por parte do auxílio financeiro do presente trabalho.

A todos meus amigos, irmãos, à Tiana, a meus pais, ao Jorge Luís e à Fátima pelo apoio indispensável.

RESUMO

Glossoscolex paulistus (Oligochaeta, Glossoscolecidae) é um anelídeo que vive no solo em regiões calcáreas no Estado de São Paulo, e tem uma hemeproteína gigante extracelular que ocorre dissolvida no sangue. Esse tipo de pigmento respiratório é denominado eritrocruorina, e é observado à microscopia eletrônica como dois discos hexagonais sobrepostos, cada um contendo seis subunidades, com uma cavidade central. No presente trabalho estudou-se afinidade da eritrocruorina pelo oxigênio em presença do cátion bivalente magnésio, observando-se aumento de afinidade e cooperatividade. Determinou-se o coeficiente de sedimentação de 58 S, e estimou-se o peso molecular de 3,23 x 10^6 Da. Encontrou-se peso molecular mínimo de 25250 Da, alto comparativamente ao das hemoglobinas tetraméricas e mioglobinas, sugerindo a presença de subunidades que não carreiam o heme, a exemplo de outras eritrocruorinas. A abordagem com espalhamento de raios X a baixo ângulo levou a parâmetros estruturais de baixa resolução com: raio de giro de cerca de 11,4 nm e dimensão máxima da molécula de 27 nm.

SUMMARY

Glossoscolex paulistus (Oligochaeta, Glossoscolecidae) is an earthworm which dwells in limestone regions in São Paulo State, and has a giant extracellular hemeprotein that occurs in the blood. This type of respiratory pigment is called erythrocruorin, and is examined with the aid of electronic microscopy as two hexagonal superimposed disks, each one having six subunits and a central cavity.

This thesis studies the affinity of erythrocruorin with oxygen in the presence of the divalent cation magnesium: an increase of affinity and cooperativity is observed.

The sedimentation coefficient was found to be 58 S, and the molecular weight approximately 3.23 x 10^6 Da. The minimum molecular weight determined, 25,250 Da, was relatively high compared with those of tetrameric hemoglobins and mioglobins, thus suggesting the presence of subunits not carrying a heme group as is the case with other erithrocruorins. Small angle X-ray scattering experiments led to the determination of low resolution dimensional parameters such as the radius of giration (11.4 nm) and maximum molecular dimension (27 nm).

Conteúdo

INTRODUÇÃO 1

MATERIAL E MÉTODOS 14

Purificação da Eritrocruorina 14

Equilíbrio da Eritrocruorina com Oxigênio - Efeito de Magnésio 15

Descrição do Método 16

Efeito de cátions bivalentes 17

Determinação do Coeficiente de Sedimentação 21

Determinação do Peso Molecular Mínimo 26

Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo 27

RESULTADOS 35

Pureza da Eritrocruorina 35

Equilíbrio da Eritrocruorina com Oxigênio: Efeito de Magnésio 37

Determinação do Coeficiente de Sedimentação 39

Determinação do Peso Molecular Mínimo 42

Parâmetros Estruturais por Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo . 43

DISCUSSÃO 48

BIBLIOGRAFIA 56

APÊNDICE 61

Lista de Figuras

1 Hemoglobinas extracelulares de invertebrados 2
2 Microscopia eletrônica de eritrocruorinas 5
3 Modelo espacial para eritrocruorina 6
4 Modelo para subunidade principal de eritrocruorina 9
5 Eletroforese da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* 10
6 Tonômetro empregado para o estudo do equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio 18
7 Curvas experimentais de equilíbrio de eritrocruorina com oxigênio . 19
8 Cela de osmocentrifugação 24
9 Gradiente de densidade autogerado por osmocentrifugação 25
10 Espalhamento de raios X de partículas 29
11 Curvas de espalhamento de raios X 30
12 Câmara de baixo ângulo 33
13 Cromatografia (HPLC) de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* 36
14 Efeito de Mg^{2+} sobre a afinidade da eritrocruorina por O_2 em função de log PO_2 38
15 Experimento de sedimentação da eritrocruorina 40
16 Coeficiente de sedimentação da eritrocruorina em diferentes concentrações 41
17 Curvas de espalhamento de raios X de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* 44
18 Gráfico de Guinier para as medidas de espalhamento de raios X da eritrocruorina 45
19 Raio de Giro em função da concentração de eritrocruorina 46
20 Curva de distribuição de distâncias $p(r)$ para eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* 47
21 Peso molecular e coeficiente de sedimentação de eritrocruorinas de diversas espécies 52
22 Peso molecular mínimo de eritrocruorinas de diversas espécies . . . 53
23 Modelo preliminar para eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* . 55

Lista de Tabelas

1 Cálculo para equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio 20

2 Efeito de magnésio sobre a afinidade da eritrocruorina por O_2 e cooperatividade 37

3 Parâmetros estruturais de eritrocruorinas de anelídeos utilizando espalhamento de raios X a baixo ângulo 50

INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína com função de transporte de oxigênio que se encontra ao longo de todo filo dos vertebrados na forma tetramérica intracelular, com raras exceções. Em contraste, não se observam proteínas com essa função em vários grupos de invertebrados, ocorrendo no entanto, em algumas classes desse filo, um ou mais dos seguintes pigmentos respiratórios: hemoglobina intracelular, extracelular, hemocianina intracelular, extracelular e hemeritrina (Vinogradov, S. N., 1985).

Observa-se uma imensa variação em estrutura e propriedades funcionais em hemoglobinas dos invertebrados, comparadas aos vertebrados. Fisiologicamente essa variabilidade representa adaptações às amplas condições ambientais às quais esses invertebrados são submetidos na natureza. Ao mesmo tempo essa maior complexidade estrutural e funcional parece compensar a menor organização ao nível de órgãos, com maior atividade regulatória a nível molecular (Weber, R. E., 1980).

Dentre as hemoglobinas dos invertebrados, destacam-se as extracelulares, que estão presentes entre os Platelmintos, Nematóides, Moluscos, Crustáceos, Insetos, Anelídeos e Pogonóforos. Essas hemoglobinas são também chamadas de eritrocruorinas, independente do peso molecular ou localização tissular.

O conhecimento da estrutura quaternária das eritrocruorinas permite classificá-las em quatro grupos distintos de acordo com o tipo de subunidade que contem os domínios ligados ao heme (o termo "domínio" se refere à cadeia polipeptídica que possui peso molecular de cerca de 16 kDa (ou 16000 Daltons), funcional caso contenha heme e ligue oxigênio reversivelmente), conforme esquematizou-se na Figura 1: 1) hemoglobinas que consistem de uma única cadeia polipeptídica (um domínio) funcional, com PM de (16 ± 2) kDa; 2) hemoglobinas com várias subunidades principais diméricas (dois domínios funcionais por subunidade); 3) hemoglobinas com várias subunidades principais poliméricas (8 a 20 domínios funcionais por subunidade) ; 4) hemoglobinas com subunidade principal consistindo de agregados monoméricos, diméricos, triméricos e tetraméricos de domínios com ou sem heme (Vinogradov, S. N., 1985).

Este último tipo de eritrocruorina, que será objeto de estudo a partir deste ponto, é encontrado extensivamente entre as três classes de anelídeos (Poliqueta, Oligoqueta e Hirundínea). Deve ser incluído nesse grupo o pigmento respiratório verde denominado clorocruorina, que apresenta o grupo heme alterado (com grupo formila no lugar de vinila na posição 2), presente em quatro famílias de poliquetas. As propriedades físico-químicas das poucas clorocruorinas estudadas são muito similares às propriedades das eritrocruorinas.

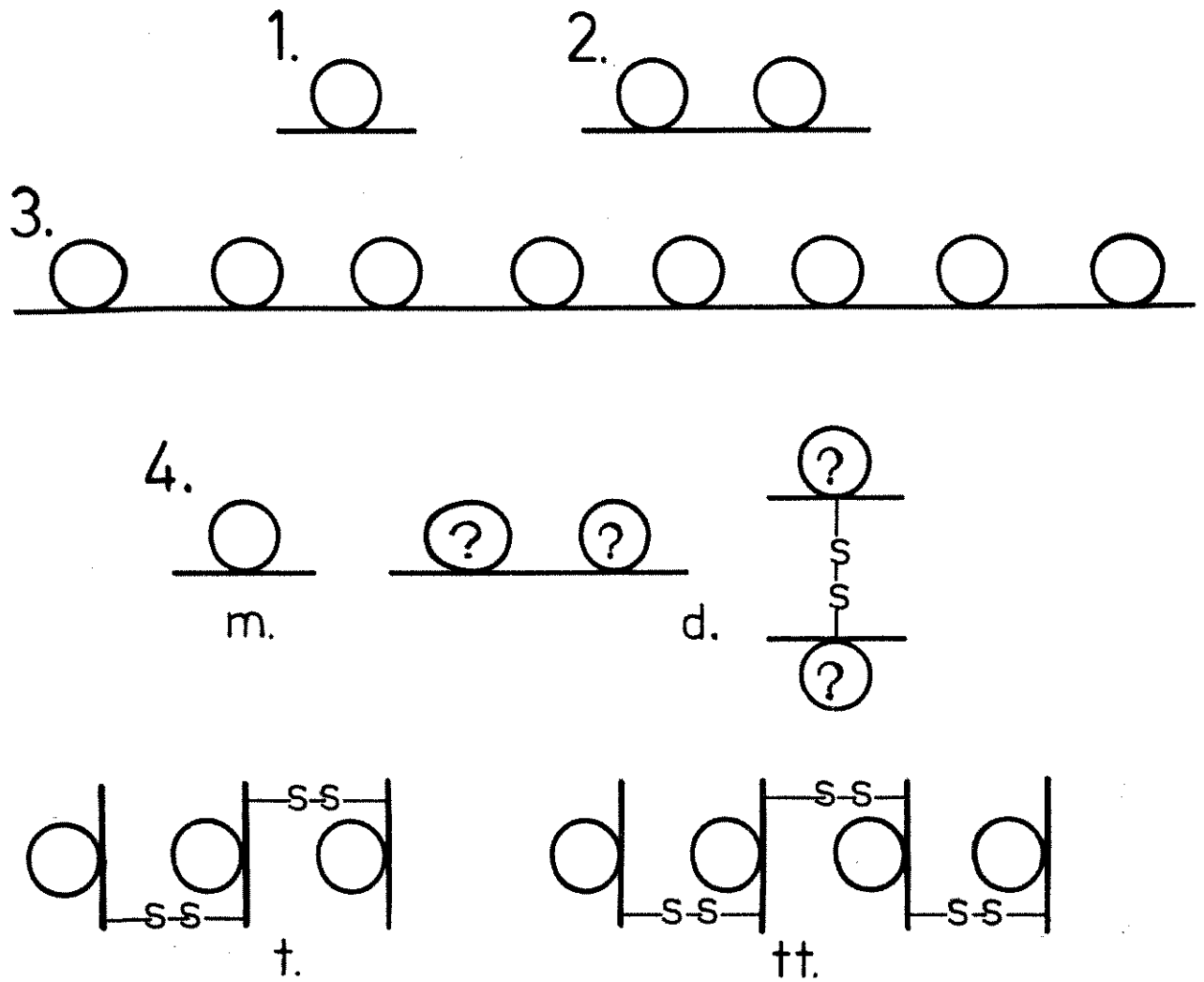


Figura 1: Hemoglobinas extracelulares de invertebrados

Representação esquemática das subunidades das quatro classes de hemoglobinas extracelulares de invertebrados. (1) hemoglobinas que consistem de uma única cadeia polipeptídica (um domínio) funcional, com PM de (16 ± 2) kDa; (2) hemoglobinas com várias subunidades principais diméricas (dois domínios funcionais por subunidade); (3) hemoglobinas com várias subunidades principais poliméricas (8 a 20 domínios funcionais por subunidade) ; (4) hemoglobinas com subunidade principal consistindo de agregados monoméricos, diméricos, triméricos e tetraméricos de domínios com ou sem heme. Os círculos em branco representam domínios ligados a heme. Os círculos com pontos de interrogação indicam que a presença do heme é incerta. Na última classe ocorre presença de pontes de dissulfeto (-S-S-) (Vinogradov, S. N., 1985).

Uma característica interessante das eritrocruorinas é o conteúdo relativamente baixo de heme e ferro, 2,0 a 3,5 % e 0,2 a 0,3 % respectivamente, com peso molecular mínimo (em relação ao heme) de 20 a 30 kDa. Ainda em contraste com hemoglobinas de vertebrados, cujo ponto isoelétrico situa-se entre pH 6,5 e 7,5, em eritrocruorinas são observados valores entre 4,5 e 5,5. Isso se deve ao alto conteúdo relativo de ácido aspártico e glutâmico. Estudos de composição de aminoácidos mostram ainda um conteúdo relativamente menor de histidina e lisina, maior de arginina e bem maior de cisteína em comparação às hemoglobinas de vertebrados (Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979).

O estudo e caracterização das eritrocruorinas vem sendo feito há décadas. Os valores de coeficiente de sedimentação e peso molecular, determinados pioneiramente por Svedberg, situam-se entre 56 e 60 S e 2300 a 3800 kDa, respectivamente. Dados mais recentes, incluindo análise utilizando espalhamento de raios X a baixo ângulo tendem a valores mais altos, entre 3500 e 4000 kDa (Kapp, O. H. & Crewe, A. V., 1984; Vinogradov, S. N., 1985).

Como vemos, essa hemeproteína se destaca pelo peso molecular muito elevado, surgindo uma interessante pergunta : como é a estrutura quaternária dessa proteína gigante, ou como é a sua organização a nível de subunidades? Na verdade um aspecto notável dessas hemoglobinas é a sua arquitetura: consistem em dois discos hexagonais sobrepostos, cada um composto de seis subunidades denominadas subunidades A, ou subunidades principais, com uma cavidade no centro desse duodecâmero. Esse arranjo, observado por microscopia eletrônica de transmissão convencional, sugere não só uma uniformidade aparente entre as eritrocruorinas de diversas espécies, como também dimensões similares, entre 24 e 27 nm de diâmetro vértice a vértice (D), e 15 a 18 nm de altura (H). Estudos de microscopia eletrônica de transmissão-varredura (MET-V), entretanto, tem revelado aspectos inesperados: enquanto a dimensão de eritrocruorinas de diversas espécies (*Lumbricus terrestris*, *Arenicola marina*, *Nephtys incisa*, *Tubifex tubifex*, *Macrobdella decora*) é de 30 x 20 nm (D x H), a clorocruorina de *Mixycola infundibulum* tem dimensão 29 x 19 nm, e a eritrocruorina de *Amphitrite ornata*, 26 x 16 nm. Essas diferenças nas dimensões podem ser observadas na Figura 2 (Vinogradov, S. N., 1985). Não há explicação satisfatória quanto a esses maiores valores encontrados por MET-V em relação aos observados por microscopia eletrônica de transmissão convencional. Naturalmente os resultados obtidos por MET-V são mais acurados. Esse tipo de microscopia, além disso, por utilizar técnica de processamento digital de imagem ("soma" dezenas de imagens de eritrocruorina, diminuindo muito o ruído que cada imagem individual apresenta), permite obter informações comparativas sobre a morfologia da molécula, caracterizando pequenas diferenças entre duas espécies. Os valores são ainda

concordantes com obtidos por difração de raios X de cristais de eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* (Kapp, O. H. & Crewe, A. V., 1984).

A microscopia eletrônica tem demonstrado também um detalhe estrutural interessante, que é a presença de densidade proteica na cavidade central de certas eritrocruorinas, supostamente uma 13ª subunidade, como em *Oenone fulgida* (Van Bruggen, E. F. J. & Weber, R. E., 1974) e *Nephtys incisa* (Messerschmidt, U. *et al.*, 1983). Estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo confirmam a presença dessa subunidade nessa última espécie, assim como a sugerem em *Arenicola marina* (Wilhelm, P. *et al.*, 1980) e *Lumbricus terrestris* (Pilz, I. *et al.*, 1980), sugerindo que essa 13ª subunidade pode estar presente de modo generalizado, e com diferentes quantidades de proteína, geralmente insuficientes para boa detecção por microscopia eletrônica, mesmo com processamento digital de imagem, como fica claro para essa última espécie (Figura 2).

A utilização de espalhamento de raios X a baixo ângulo, como vimos, é uma técnica que tem levado a informações, além do peso molecular, sobre a forma da macromolécula em solução. Outros parâmetros estruturais importantes que essa técnica tem revelado são volume da molécula, raio de giro e dimensões internas máximas. A obtenção da forma da macromolécula exige um tratamento mais elaborados dos dados experimentais, e é primeiramente baseada em um modelo aproximado prévio, obtido por exemplo a partir da microscopia eletrônica, e então vários outros modelos derivados do primeiro são testados. Em estudos com *Nephtys incisa*, Messerschmidt *et al* (1983), analizando diferentes modelos derivados do já conhecido, concluíram que o modelo a melhor se ajustar à curva de espalhamento experimental era composto pelas 12 subunidades com o arranjo mencionado anteriormente, e cada uma composta por 14 pequenas esferas de 1,9 nm de diâmetro cada, dispostos em 3 camadas de 4, 6 e 4 esferas. Na cavidade central da molécula se encontra uma 13ª subunidade composta de 6 pequenas esferas (também de diâmetro de 1,9 nm) arranjadas em 3 camadas de 1, 4 e 1 esfera. Existem ainda 12 pequenas esferas adicionais ligando as subunidades periféricas à central, conforme pode ser observado na Figura 3 (Messerschmidt, U. *et al.*, 1983).

Detalhes estruturais a nível de cadeias polipeptídicas nas eritrocruorinas têm sido estudados por diversas técnicas, como dicroismo circular na região de espectro ultravioleta e visível, que leva a informações sobre a estrutura secundária da proteína. Assim estima-se o conteúdo de α-hélice em *Lumbricus terrestris* (Ascoli, F. *et al.*, 1976), *Eunice aphroditois* (Bannister, J. V. *et al.*, 1976) e *Tubifex tubifex* (Polidori, G. *et al.*, 1984) de (40 ± 5) %, menor que em hemoglobinas e mioglobinas de vertebrados. Em *Amphitrite ornata* e *Nephtys incisa* encontra-

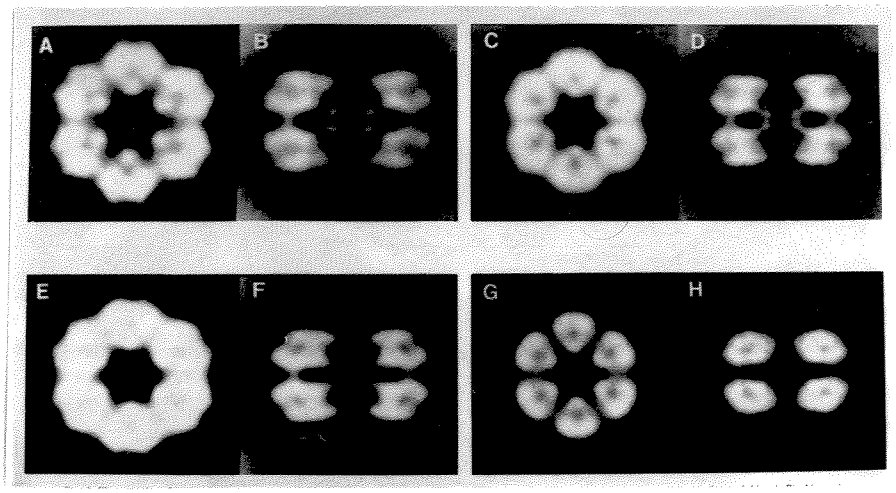


Figura 2: Microscopia eletrônica de eritrocruorinas

Fotografias de microscopia eletrônica de transmissão-varredura. Vistas de topo e lateral de eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* (A e B), clorocruorina de *Mixycola infundibulum* (C e D), eritrocruorina de *Macrobdella decora* (E e F) e de *Amphitrite ornata* (G e H). As moléculas foram coradas negativamente e as fotografias processadas por computador (Vinogradov, S. N., 1985).

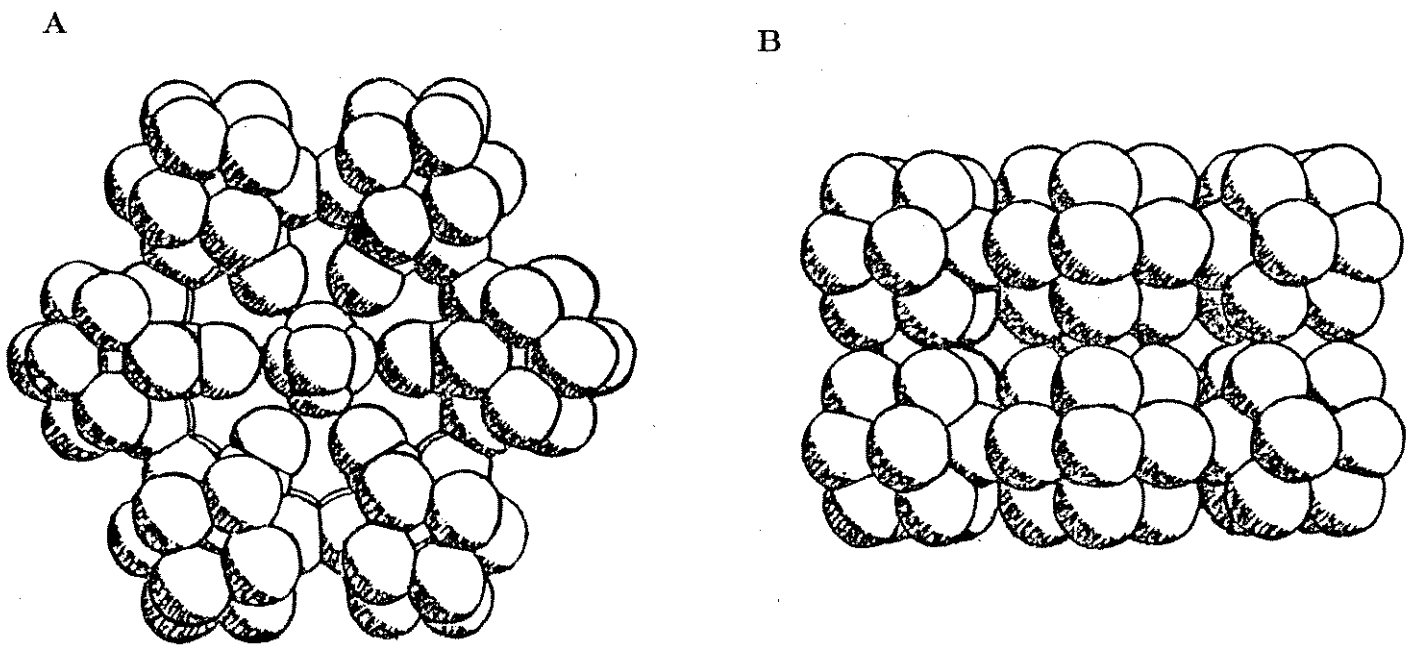


Figura 3: Modelo espacial para eritrocruorina

Modelo baseado em espalhamento de raios X a baixo ângulo para a eritrocruorina de *Nephtys incisa*. (A) Vista de topo e (B) lateral (Messerschmidt, U. *et al.*, 1983).

se 60 % e 50 a 60 %, respectivamente, e em *Haemopsis sanguisuga*, 56 a 63 % (Wood, E. J. *et al.*, 1976; Messerschmidt, U. *et al.*, 1983).

Outro aspecto estrutural que o dicroismo circular mostra é a concordância com dados de cristalografia de raios X de hemoglobinas e mioglobinas, referentes a distâncias interatômicas nessas moléculas. A evidência do efeito Cotton na região Soret, devido a resíduos aromáticos na cadeia polipeptídica à distância de até 1,2 nm do heme, e informações em relação ao par de momentos de transição no plano do heme são obtidas por dicroismo circular. Qualquer mudança na direção de polarização desses momentos altera a curva do efeito Cotton-Soret. A presença de um efeito Cotton-Soret duplo em todos os derivados de eritrocruorina assim como a diminuição da força rotacional em contraste com derivados de hemoglobinas e mioglobinas na mesma região pode indicar uma distribuição distinta das cadeias laterais que podem intragir com o cromóforo heme (Ascoli, F. *et al.*, 1976).

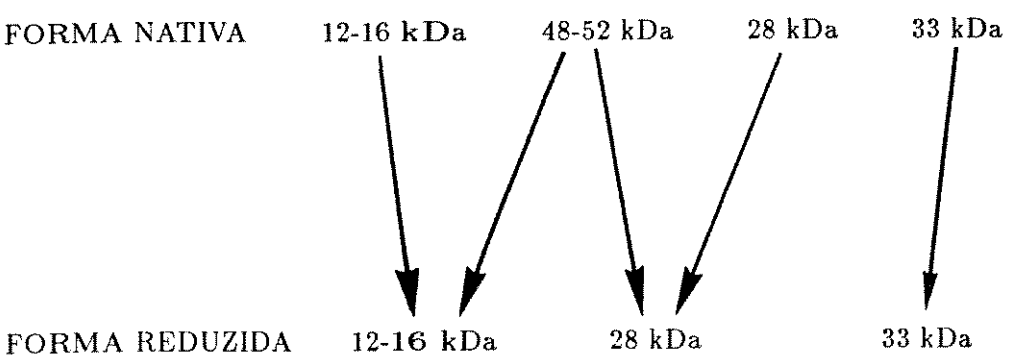
Para maior detalhamento da estrutura das subunidades 1/12 das eritrocruorinas (subunidade principal), várias abordagens têm sido utilizadas. Em pHs acima de oito as eritrocruorinas se dissociam em produtos com coeficiente de sedimentação 9 a 10 S, que têm sido considerados a subunidade principal. Cátions divalentes parecem estabilizar a molécula na forma não dissociada (Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979; Frossard, P., 1982b). Estudos detalhados mostram o fenômeno da dissociação também em pH ácido. O estudo da dissociação e reassociação das subunidades tem auxiliado a obtenção de modelos da estrutura da subunidade principal (Mainwaring, M. G. *et al.*, 1986).

Uma valiosa técnica para o estudo da composição das subunidades das eritrocruorinas e clorocruorinas é eletroforese em gel de poliacrilamina na presença de detergente duodecil sulfato de sódio (SDS PAGE). Podem-se observar, dependendo das eritrocruorinas, tetrâmeros e trímeros ligados por ponte dissulfeto, dímeros de 33 a 37 kDa que contêm heme, e monômeros de 16 a 17 kDa. Tratando-se com o agente redutor ditiotreitol (DTT), com rompimento das pontes S-S, observam-se apenas dímeros e monômeros, os primeiros demonstrando, portanto, ligações covalentes de outra natureza. Há heterogeneidade quanto aos padrões apresentados pelas diversas eritrocruorinas (Vinogradov, S. N., 1985).

Um interessante trabalho com eritrocruorina de *Eisenia fetida* utiliza essa técnica para obtenção de um modelo da disposição das subunidades. Dados de equilíbrio de sedimentação de eritrocruorina dessa espécie levam a um peso molecular de cerca de 3,8 x 10^6 Da,e a análise do conteúdo de heme indica 144 hemes por molécula. Experimentos utilizando SDS PAGE incluindo eletroforese em duas dimensões (eritrocruorina não reduzida, e então tratada com 2-mercaptoetanol) mostram a presença de 6 subunidades distintas e de determinadas subunidades

unidas por ponte de dissulfeto. As subunidades apresentam PM de 14,9 kDa (subunidade I), 15,3 kDa (II), 17,2 kDa (III), 19,7 kDa (IV), 31,6 kDa (V) e 40 kDa (VI). Análise de varredura densitométrica após eletroforese revelam a proporção de, respectivamente, 3 : 6 : 3 : 3 : 1 : 1 entre as subunidades. Estudos com filtração em gel Sephacril S-200 confirmam a presença de heme na subunidade I. Esses achados e a comparação com modelos para outras espécies levaram a uma possível modelo da molécula, como se observa na Figura 4 (Frossard, P., 1982a).

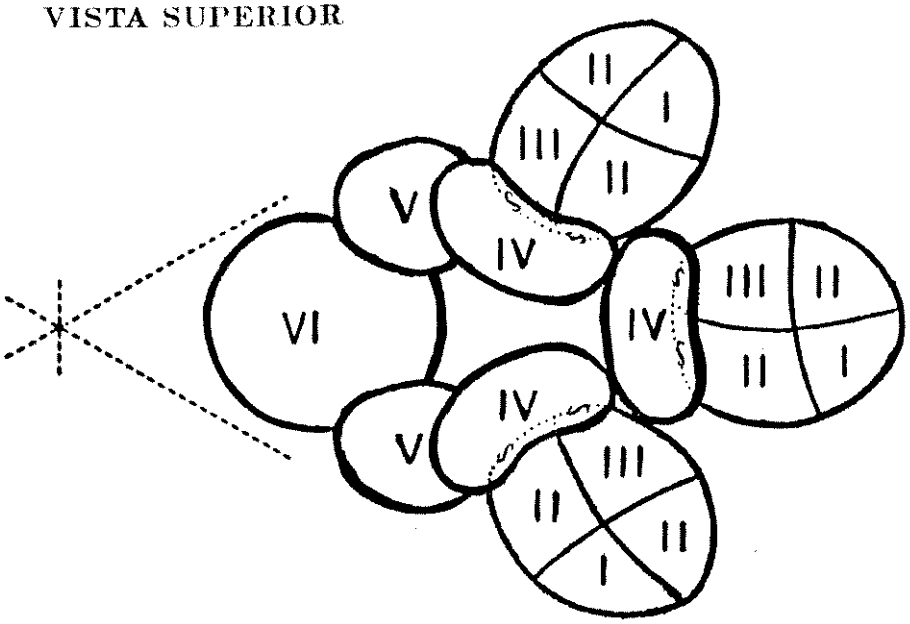
Glossoscolex paulistus (Oligochaeta, Glossoscolecidae), espécie utilizada neste trabalho, é um anelídeo gigante que vive superficialmente no solo em regiões calcáreas do Estado de São Paulo. Observam-se na eritrocruorina dessa espécie, na forma não reduzida, monômeros de 12 a 16 kDa, dímeros de 28 a 33 kDa, trímeros ou tetrâmeros (dados inconclusivos) de 48 a 52 kDa. Na forma reduzida com DTT encontrou-se subunidades de 12 a 16 kDa, 28 kDa e 33 kDa (Figura 5). Descreveu-se a partir desses resultados um possível modelo das relações entre as subunidades (Meirelles, N. C. *et al.*, 1985) :



Imagens de microscopia eletrônica da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* revelam uma arquitetura semelhante às outras eritrocruorinas, e uma estrutura central com baixa densidade relativa de proteína, sendo inconclusivo se se trata de uma 13ª subunidade. Em pH 8,6 essa organização estrutural não é observada, provavelmente devido à dissociação da hemoglobina (Meirelles, N. C. *et al.*, 1987).

Até aqui discutimos basicamente parâmetros estruturais dessa hemeproteína gigante. Analisemos agora o outro aspecto fundamental para o estudo das

VISTA SUPERIOR



VISTA LATERAL

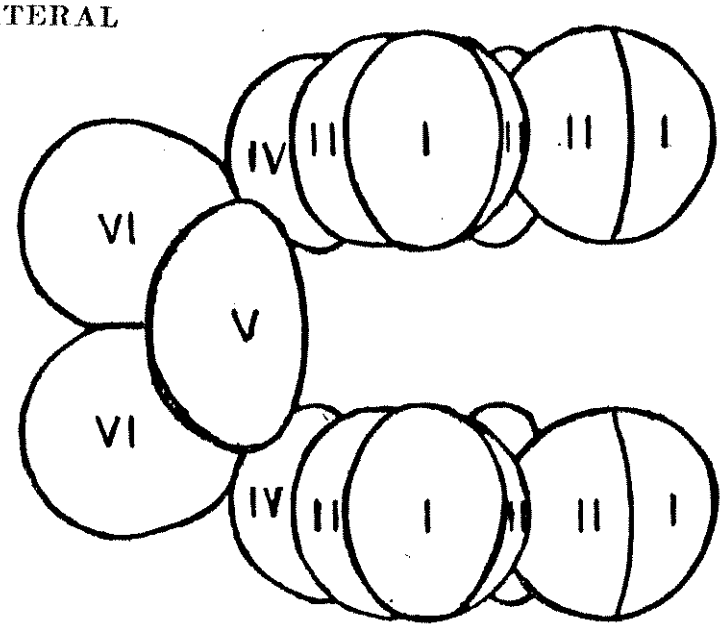


Figura 4: Modelo para subunidade principal de eritrocruorina

Modelo proposto para a subunidade principal da eritrocruorina de *Eisenia fetida*. Assumiu-se nesse modelo que somente subunidades I, II e III contêm heme, sendo as demais subunidades "estruturais". Na imagem lateral observa-se duas subunidades, dos dois hexâmeros justapostos. ···~··· = ponte de dissulfeto. Peso molecular das subunidades: (I): 14,9 kDa; (II): 15,3 kDa; (III): 17,2 kDa; (IV): 19,7 kDa; (V): 31,6 kDa; (VI): 40 kDa (Frossard, P., 1982a).

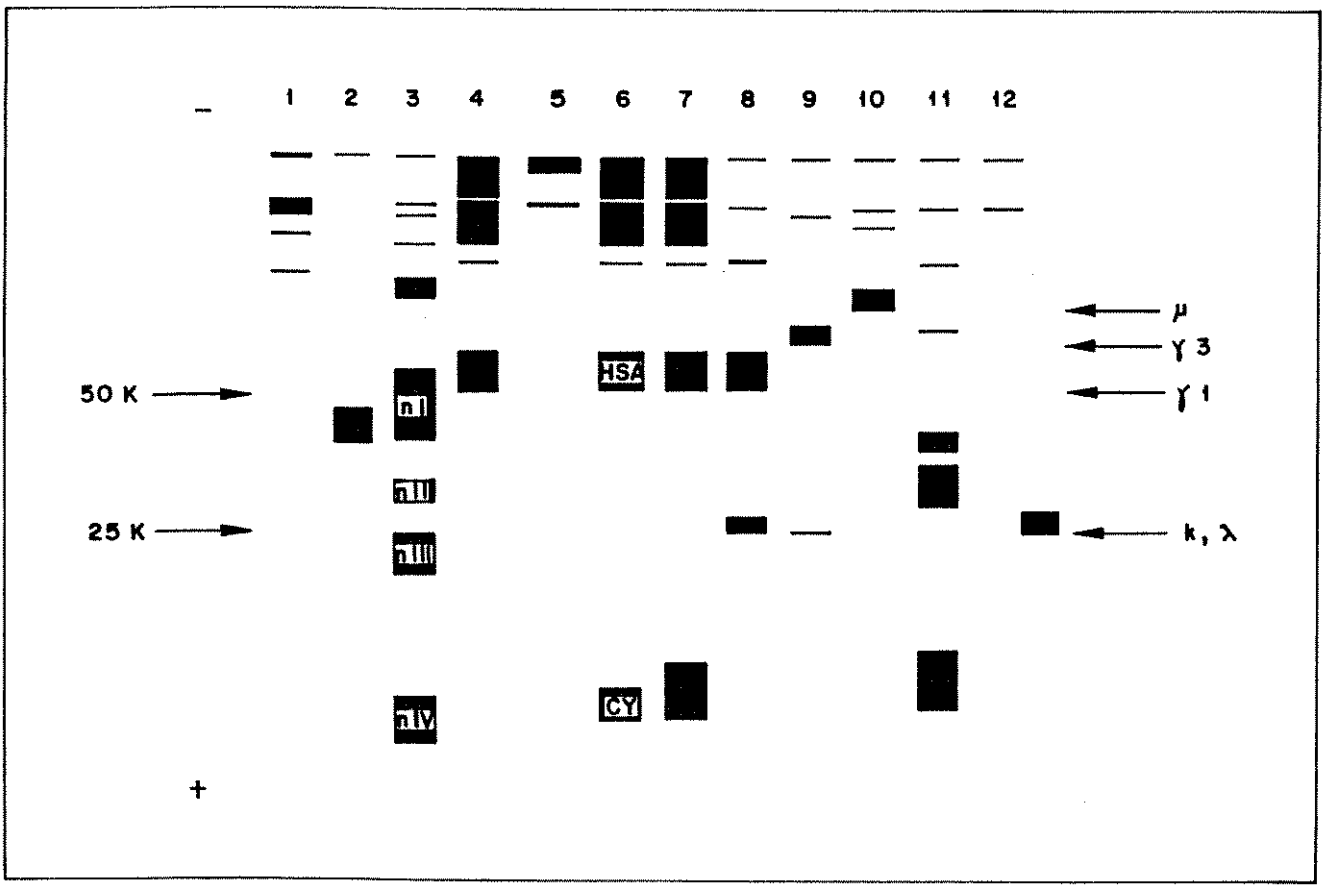


Figura 5: Eletroforese da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*

Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*, forma nativa (3º ponto de aplicação) e reduzida (11º). Como referência utilizou-se proteína de Bence Jones JJO forma nativa (2º) e reduzida (12º), paraproteína IgG1 (JJO) λ nativa (1º) e reduzida (8º), macroglobulina de mieloma IgG3 (FKW) κ reduzida (9º). As subunidades nativas de eritrocruorina estão indicadas, assim como proteínas de Bence Jones e as cadeias γ 1, γ 2, γ 3, μ, κ e λ, e marcadores de peso molecular (albumina de soro humano (HSA) e citocromo (CY). k indica 1000 Daltons (Meirelles, N. C. *et al.*, 1985).

moléculas biológicas: as propriedades funcionais, nesse caso as propriedades de oxigenação da eritrocruorina e agentes modificadores dessas propriedades. Observa-se que a afinidade por oxigênio e a sensibilidade a pH e temperatura tem ampla variação entre as eritrocruorinas e as outras hemoglobinas dos invertebrados, sugerindo que a filogenia, o sítio histológico e o estado de agregação do pigmento pouca influência tem em suas propriedades funcionais principais. A cooperatividade, no entanto, tende a ser mais pronunciada em hemoglobinas poliméricas.

A eritrocruorina de *Eupolymnia crescentes* tem uma afinidade por oxigênio extremamente baixa, não apresenta efeito Bohr (diminuição da afinidade por oxigênio com o aumento da concentração hidrogeniônica) e nem cooperatividade (interacão heme-heme). Por outro lado, *Arenicola marina* e *Lumbrinereis tetrausa* apresentam eritrocruorina com afinidade por oxigênio relativamente alta, efeito Bohr pronunciado e alta cooperatividade. Existem muitas eritrocruorinas com propriedades de ligação a oxigênio entre esses extremos. Observa-se clára correlação entre ambiente com baixos níveis de oxigênio e espécies que apresentam hemoglobinas com alta afinidade pelo gás, sugerindo uma pressão seletiva para essa propriedade dos pigmentos respiratórios. O poliqueta *Arenicola marina* habita tocas consolidadas de região entre marés, com aberturas que permitem boa ventilação, tendo portanto um ambiente com altos níveis de O_2. No entanto a PO_2 sangüínea é bem baixa devido a características do sistema circulatório. Como *Arenicola marina* possui eritrocruorina com alta afinidade por oxigênio e alta cooperatividade, conforme mencionou-se, ocorre eficiente suprimento de oxigênio aos tecidos (Weber, R. E., 1980).

Clorocruorinas de anelídeos geralmente apresentam afinidade por O_2 muito baixa, assim como grande efeito Bohr, sugerindo que esses pigmentos não estão totalmente saturados *in natura*.

A interação heme-heme nas eritrocruorinas apresenta um comportamento complexo, com coeficiente de Hill (n) heterogêneo e pH dependente, ao contrário das hemoglobinas dos mamíferos, com n homogêneo e constante entre pH 4,75 e 10,5. Em *Arenicola marina* por exemplo, é difásica e com baixa cooperatividade a baixos níveis de O_2 (n_1), e apresenta forte interação heme-heme a altas concentrações do ligante (n_2), respectivamente 2,2 a 2,8 e 3,5 a 5,0 em sangue total. Enquanto n_1 não varia com pH, n_2 atinge um máximo em pH 7,5 a 7,6. Várias eritrocruorinas se comportam dessa maneira, porém outras, como em *Lumbricus terrestris* apresentam n homogêneo e pH dependente (Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979).

O efeito Bohr de modo geral está presente apenas em pigmentos vasculares, particularmente em eritrocruorinas e clorocruorinas, e ausentes em hemoglobi-

nas teciduais, de hemolinfa e celômicas, e representa uma vantagem fisiológica quando ocorre um gradiente interno efetivo de pH. Entretanto o efeito Bohr pode variar largamente entre os pigmentos vasculares. Em poliquetas é pronunciado em espécies com tocas bem definidas e ventiladas, sendo insignificante em espécies com tocas transientes, ou com apenas uma abertura (ou ausência desta) na superfície da lama. Provavelmente nesse último caso o efeito Bohr prejudicaria a captação de O_2 pela hemeproteína (Weber, R. E., 1980).

Em contraste com hemoglobinas de vertebrados, as eritrocruorinas e clorocruorinas são insensíveis a fosfatos orgânicos, como 2,3-difosfoglicerato (DPG), ou trifosfato de adenosina (ATP), cujos níveis seriam difíceis de serem finamente regulados pela falta de um microambiente por exemplo intraeritrocitário. Sais inorgânicos, no entanto, aumentam a afinidade por oxigênio, sendo esse efeito mais marcante no caso de cátions divalentes em comparação a monovalentes (Everaarts, J. M. & Weber, R. E., 1974; Frossard, P., 1982b; Weber, R. E. & Baldwin, J., 1985). O efeito da salinidade pode ter papel ecofisiológico significativo em animais de região entre marés na manutenção do metabolismo aeróbico. Em maré baixa, na espécie *Arenicola marina* ocorre aumento da salinidade intersticial pela alta salinidade mantida no meio externo, com conseqüente aumento da afinidade da hemoglobina por oxigênio no período em que a sua diponibilidade é mais crítica (Weber, R. E., 1980). Recentemente demonstrou-se que os cátions Na^+ e Mg^{2+} aumentam a cooperatividade e a afinidade da eritrocruorina dessa espécie pelo oxigênio por associação à hemeproteína em altos níveis de oxigenação. Observou-se também que prótons diminuem a afinidade por oxigênio ligando-se preferencialmente à hemoglobina em altos níveis de saturação (Weber, R. E., 1981). O mecanismo da interação de cátions e prótons deve ser diferente do observado em hemoglobina humana A, na qual prótons e ânions levam à diminuição da afinidade por oxigênio por associação principalmente a moléculas no estado de baixa afinidade (Imai, K. & Yonetani, T., 1975; Imaizumi, K. *et al.*, 1979).

A oxigenação da hemoglobina é uma reação exotérmica, levando o aumento de temperatura a uma diminuição da afinidade por oxigênio. Em ambientes de hipóxia e calor essa diminuição de afinidade poderia comprometer a captação de oxigênio. Estudos com *Planorbis corneus* e *Anadara senilis* mostram insensibilidade a esse efeito de temperatura acima de 20° C na primeira, e até aumento de afinidade por O_2 na última. Resultados mais recentes, porém, contradizem esses achados, mostrando sensibilidade linear à temperatura, pelo menos até 30° C. Em *Arenicola marina* demonstrou-se *in vitro* um efeito bem menor de temperatura em relação às outras hemoglobinas, apresentando entalpia de oxigenação (ΔH), da equação de Van't Hoff, de cerca de -22,2 kJ/mol, em contraste com -42 a -59 kJ/mol normalmente encontrada para hemeproteínas (Weber, R. E.,

1980). O efeito da temperatura sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, considerando habitats variáveis onde ocorrem grandes mudanças na temperatura ambiente, está sujeito a forte pressão seletiva para adaptação (Mangun, C. P. *et al.*, 1975).

Recentemente observou-se a entalpia de oxigenação para a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* a espécie do presente estudo, de -39,7 kJ/mol em pH 7,4. Descontando a entalpia de dissociação de H^+ concomitante à oxigenação da hemeproteína (0,737 mol H^+/mol heme), e a neutralização do íon pelo tampão utilizado, o calor de reação corrigido é -56,4 kJ/mol, equivalente ao valor encontrado para mioglobinas (às quais não apresentam essa dissociação, ou seja, efeito Bohr) e equivalente à entalpia das hemoglobinas em pHs acima de 8, que apresentam o íon H^+ dissociado mesmo na forma deoxihemoglobina.

A afinidade da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* por oxigênio em pHs 7,0 e 8,0 em $P50$ (ou pressão parcial de oxigênio que satura 50 % dos sítios ligantes da proteína) é respectivamente 5,8 e 22,4 mmHg, consideravelmente menor que a espécie congênere *Glossoscolex giganteus*. Além disso a eritrocruorina da primeira apresenta alto efeito Bohr, ausente na última. Encontrou-se ainda cooperatividade (n) entre 2,0 e 2,8. *Glossoscolex paulistus* cava galerias em forma de U em um solo relativamente seco e bem aerado. O pronunciado efeito Bohr favorece o despreendimento de oxigênio mesmo em pequenas diferenças de pH. Estudos mostram que geralmente a oxigenação no solo varia de 16 a 19 %, e apesar desse anelídeo habitar um solo bem oxigenado, às vezes é submetido a baixas tensões de O_2 por curtos períodos, quando ocorre muita chuva e o solo permanece encharcado. Nessas ocasiões *Glossoscolex paulistus* é encontrado na superfície, ou parcialmente exposto (Abe, A. S. & Meirelles, N. C., 1985).

Nosso interesse nesse tipo de hemeproteína se deve ao relativamente alto grau de organização molecular, o qual pode ser detalhado pela utilização de métodos físicos tais como espalhamento de raios X a baixo ângulo, microscopia eletrônica e determinação do coeficiente de sedimentação por velocidade de sedimentação. A correlação estrutura-função, evidente particularmente em hemeproteínas, nos levou a estudar parâmetros funcionais da eritrocruorina com ênfase no efeito de cátions divalentes, que poderiam levar a alterações estruturais observáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação da Eritrocruorina

Exemplares de *Glossoscolex paulistus* foram obtidos em Rio Claro, São Paulo, e mantidos em solo do local de coleta por um período não superior a 10 dias. Os animais foram anestesiados em álcool 10 %, e o sangue foi coletado do vaso dorsal utilizando-se tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, com EDTA 10^{-3} M, e solução de heparina 2000 U/ml. Centrifugou-se a solução a 16000 rev./min (Eppendorf), dialisando-se por oito horas o sobrenadante contra o mesmo tampão. Em seguida submeteu-se o dialisado a ultracentrifugação a 250000 g por 2 horas (Beckman). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato, sendo submetido a baixa centrifugação a 11500 g por 10 minutos. Centrifugou-se novamente o sobrenadante a 250000 g, ressuspendendo-se nas mesmas condições. A eritrocruorina foi mantida estocada a 4° C (Bonaventura, J. & Bonaventura, C., 1981; Abe, A. S. & Meirelles, N. C., 1985).

Como critério de pureza da hemeproteína utilizou-se cromatografia em HPLC, coluna GPC-300. Foram aplicadas amostras de eritrocruorina nativa e submetida a tratamento que induz a dissociação (mantida a pressão de 25000 psi durante 10 minutos). A concentração das amostras foi 0,5 g/ml, para um volume de aplicação de 50 μl. Outros métodos que evidenciam qualitativamente a pureza da amostras serão discutidos posteriormente (página 35).

Equilíbrio da Eritrocruorina com Oxigênio - Efeito de Magnésio

O estudo do equilíbrio de hemeproteínas com oxigênio pode ser descrito utilizando-se a equação de Hill. Na ausência de um conhecimento preciso quanto ao peso molecular da hemoglobina, em 1910 Hill propôs que soluções de hemoglobina continham moléculas poliméricas com mais de um sítio de ligação com oxigênio, e o grau de polimerização médio foi considerado "n" (Antonini, E. & Brunori, M., 1971, cap. 7 e 14). O equilíbrio da hemoglobina com oxigênio poderia ser descrito, portanto, como

$$Hb_n + nO_2 \rightleftharpoons (HbO_2)_n \tag{1}$$

e a reação poderia ser tratada como de enésima ordem. Aplicando a lei de ação das massas, temos:

$$K = \frac{[(HbO_2)_n]}{[Hb_n](PO_2)^n} \tag{2}$$

ou

$$K(PO_2)^n = \frac{Y}{1-Y} \tag{3}$$

onde Y é a fração da forma oxigenada da hemoglobina, ou

$$Y = \frac{[(HbO_2)_n]}{[Hb_n] + [(HbO_2)_n]} \tag{4}$$

Colocando sob forma logarítmica, de 3 temos

$$log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = logK(PO_2)^n = n\,logPO_2 + logK \tag{5}$$

Colocando-se em gráfico $log\,(Y/(1-Y)$ contra $logPO_2$, temos uma reta com inclinação n, a ordem de reação aparente. O valor experimental encontrado para n (hemoglobina humana) foi 2,8. A hipótese de Hill como formulada originalmente não tinha significado físico direto, pois foi mostrado que a reação da hemoglobina com ligantes não representa uma reação de enésima ordem verdadeira. Além disso, por determinação de peso molecular, observou-se que a hemoglobina é tetramérica sob várias condições experimentais.

Após um período de esquecimento, a equação de Hill passou a ser amplamente utilizada para o estudo da associação da hemoglobina com ligantes, pois as curvas de equilíbrio geralmente levam a uma reta quando $log(Y/(1-Y)$ é colocado em

gráfico contra $logPO_2$ para os valores de Y facilmente acessíveis a medidas, ou seja, entre 0,10 e 0,90.

A possibilidade de ajustar empiricamente os dados experimentais através da equação de Hill é de grande utilidade na descrição das curvas de dissociação. O uso da equação de Hill simplifica a comparação entre diferentes curvas de dissociação, e fornece uma descrição imediata sobre a interação com ligantes.

Para $n = 1$, a curva de dissociação é hiperbólica, e pode significar uma independência entre os sítios ligantes. Valores de $n > 1$ corresponde a uma curva sigmóide, e presença de interação heme-heme positiva. O valor de n para equilíbrios de hemoglobinas de mamíferos com oxigênio sob condições usuais é 2,8 a 3,0. Valores de $n < 1$ indicam presença de sítios independentes com diferentes afinidades pelo ligante, ou então interações heme-heme negativas (Antonini, E. & Brunori, M., 1971, cap. 7 e 14).

Nas eritrocruorinas, como já foi discutido anteriormente, o coeficiente de Hill n é heterogêneo e dependente de pH (Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979). A curva de equilíbrio com oxigênio de várias espécies é bifásica, com menor interação heme-heme (n_1) em níveis baixos de oxigênio, e maior interação heme-heme (n_2) em maiores concentrações do ligante.

Descrição do Método

Em estudos com ligantes gasosos utiliza-se a pressão parcial do gás em solução, pois a atividade de um gás em solução é proporcional à sua pressão parcial na fase gasosa.

A saturação fracional Y é determinada diretamente medindo-se a quantidade de ligante combinado com a proteína por método gasométrico, ou usando-se alguma propriedade que dependa diretamente da presença de ligante no ferro-heme, como a absorção de luz, por exemplo. O método espectrofotométrico baseia-se nas diferenças espectrais entre oxi e deoxihemoglobina em determinados comprimentos de onda. Nessa metodologia podem-se utilizar pequenas quantidades de material, como 1 ml de solução de hemoglobina, o que é importante quando existe restrição na quantidade de material biológico, limitação frequentemente presente. Além disso podem-se utilizar concentrações em ampla faixa, de 100 a 0,1 mg de proteína por ml (Antonini, E. & Brunori, M., 1971, cap. 7; Giardina, B. & Amiconi, G., 1981).

Para as medidas utilizou-se um tonômetro constituído de um tubo Thumberg modificado, provido de uma cubeta óptica de vidro pyrex de capacidade para 4 ml, com 1 cm de caminho óptico, selado a uma câmara dupla de vidro com capacidade gasosa de aproximadamente 250 ml, com uma entrada na câmara

menor, na qual se faz as adições de oxigênio, e uma torneira com três saídas na câmara maior (Figura 6).

Fez-se calibração do tonômetro para obtenção da capacidade gasosa, denominada constante tonométrica. Para isso pesa-se o tonômetro totalmente cheio de água e com somente 3 ml de água a temperatura conhecida, determinando-se então o volume da fase gasosa.

Uma alíquota de solução de oxihemoglobina devidamente diluída em tampão adequado de acordo com a finalidade experimental foi introduzida no tonômetro, passando-se durante vários minutos corrente de nitrogênio para obtenção da forma deoxihemoglobina. Foram feitas adições de volumes conhecidos de ar por meio de uma seringa, obtendo-se diferentes pressões de oxigênio. A cada adição submeteu-se o tonômetro a um banho de 20° C sob agitação por 10 minutos, registrando-se o espectro de 450 a 380 nm, na região Soret, em espectrofotômetro Varian modelo 634 acoplado a um registrador potenciométrico. A Figura 7 mostra a variação de absorbância da eritrocruorina em função do comprimento de onda à medida que aumenta a porcentagem da forma oxieritrocruorina.

Para construção do gráfico de Hill foram calculados para os valores de Y (% de saturação de HbO_2), em função das pressões parciais de oxigênio (PO_2), seguindo os procedimentos matemáticos exemplificados na Tabela 1. Para o cálculo de PO_2 no tonômetro era aplicada a equação de Boyle-Mariotti para transformações isotérmicas:

$$P_1 V_1 = P_2 V_2 \tag{6}$$

onde P_1 = pressão parcial de O_2 no ar atmosférico, 156 mmHg, V_1 = volume de ar injetado, P_2 = pressão parcial de O_2 no tonômetro e V_2 = volume da fase gasosa do tonômetro (constante tonométrica). O gráfico de Hill pode ser, então, traçado (Meirelles, N. C., 1975).

Efeito de cátions bivalentes

Fez-se equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio em presença do cátion bivalente magnésio. Dialisou-se a hemeproteína contra água destilada durante doze horas, trocando-se várias vezes a água de diálise e, posteriormente, em tampão Tris HCl 0,05 M, pH 7,0. Foram utilizadas concentrações da proteína entre 7 e 8 x 10^{-3} M de heme, em diferentes concentrações de Mg^{2+} a partir de solução estoque de sulfato de magnésio 2 M. Manteve-se o pH durante o experimento entre 7,1 e 7,2, tampão Tris HCl 0,05 M.

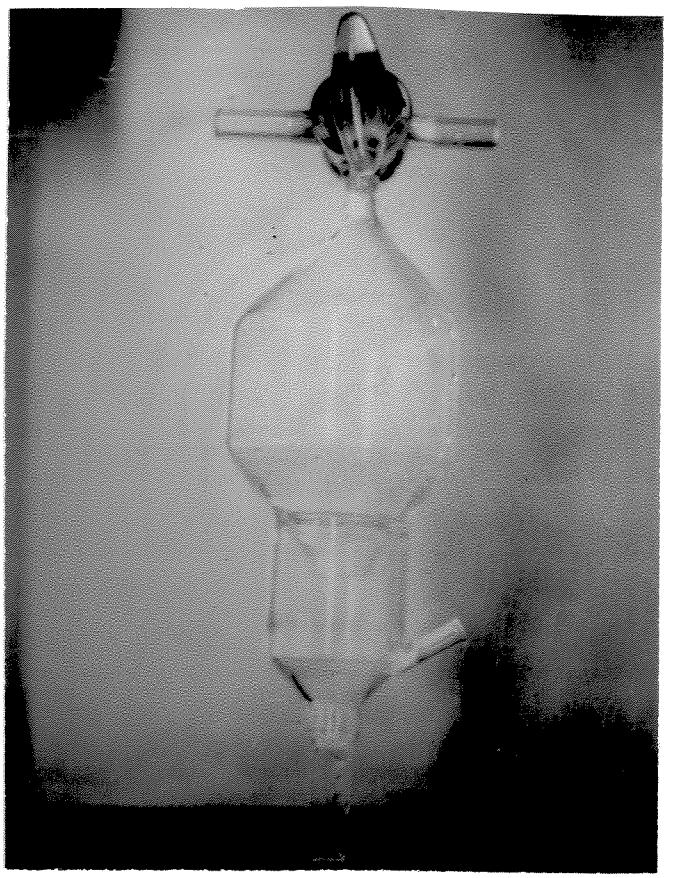


Figura 6: Tonômetro empregado para o estudo do equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio

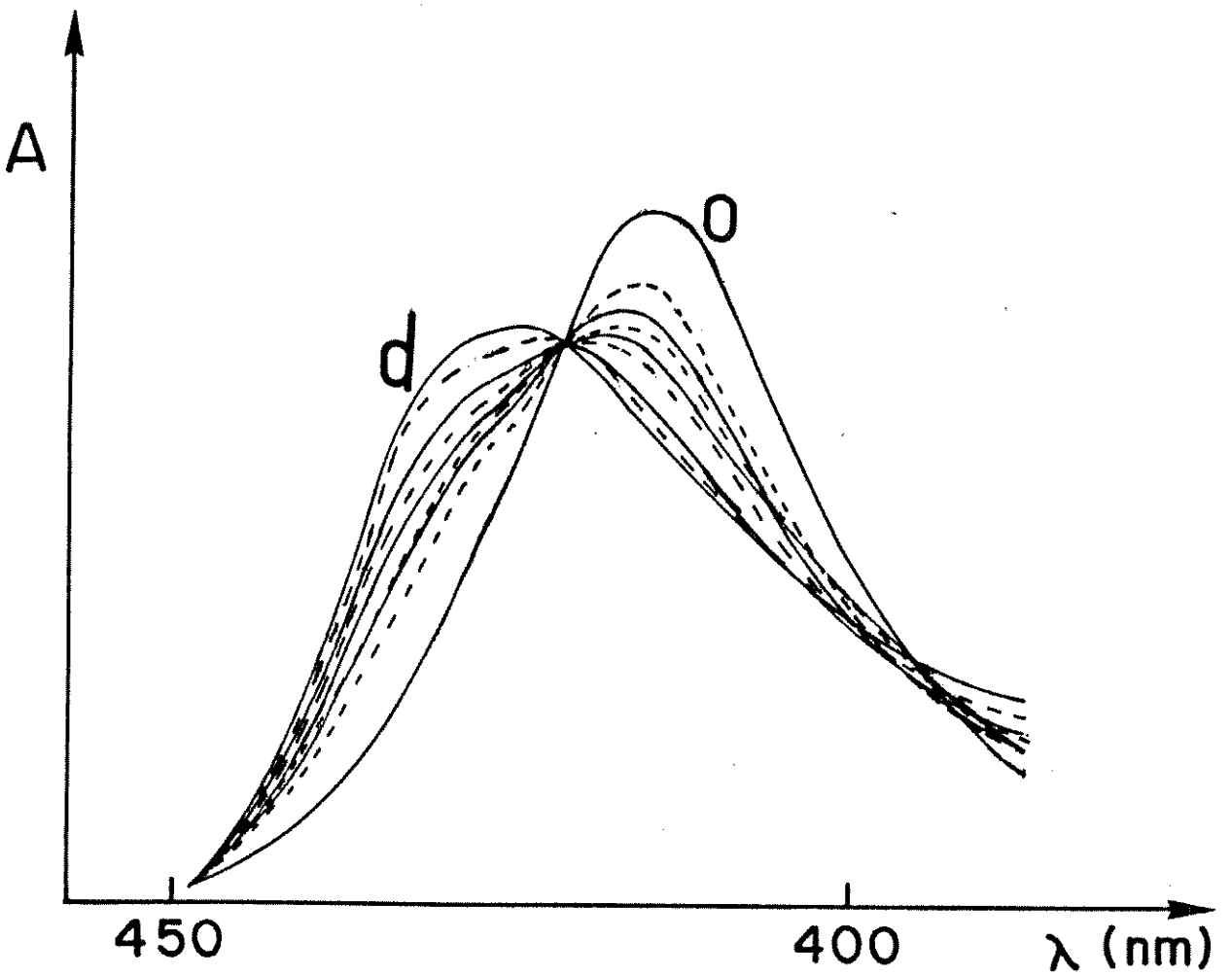


Figura 7: Curvas experimentais de equilíbrio de eritrocruorina com oxigênio

Curvas experimentais de equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio pelo método espectrofotométrico. A variação da absorbância em função do comprimento de onda pode ser observada de 450 a 380 nm. A curva mais à direita corresponde a forma Oxi e à esquerda Deoxihemoglobina. Os comprimentos de onda de máxima absorbância para essas formas são, respectivamente, 419 e 428 nm.

Tabela 1: Cálculo para equilíbrio da eritrocruorina com oxigênio

Nesse experimento foram feitas 7 adições de ar. Constante tonométrica = 0,47755. $|\Delta A|_\lambda$ é o módulo da diferença entre A_λ medido a cada adição e A_λ da forma deoxi. % HbO_2 x 10^{-2} é calculado como $\sum A/0,292$ (o denominador correspondente a 100% da forma oxieritrocruorina).

Vol. ar (ml)	Log PO_2	A_{419} e A_{428}	$\|\Delta A_{419}\|$ e $\|\Delta A_{428}\|$	$\sum \|A\|$	%HbO_2 x 10^{-2} (=Y)	$\frac{Y}{1-Y}$	$log\frac{Y}{1-Y}$
OXI	OXI	0,645 0,384	0,095 0,197	0,292	1		
DEOXI	DEOXI	0,550 0,581	0 0	0	0		
2	-0,022	0,558 0,555	0,008 0,026	0,034	0,166	0,132	-0,022
4	0,279	0,566 0,523	0,016 0,058	0,074	0,253	0,339	0,279
6	0,455	0,583 0,513	0,033 0,068	0,101	0,346	0,529	0,455
8	0,580	0,584 0,488	0,034	0,127	0,435	0,770	0,580
10,5	0,698	0,591 0,479	0,041 0,102	0,143	0,490	0,960	0,698
13,5	0,807	0,600 0,469	0,050 0,112	0,162	0,555	1,246	0,807
18,5	0,944	0,609 0,436	0,059 0,145	0,204	0,699	2,318	0,944

Determinação do Coeficiente de Sedimentação

A definição da constante de sedimentação $S_{t,m}$ em um meio m a temperatura t é dada por:

$$S_{t,m} = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \tag{7}$$

onde ω é a velocidade angular do rotor em radianos por segundo, r é a distância do centro do rotor à partícula, e dr/dt é a velocidade radial da partícula (Hsu, H. W., 1975). A constante de sedimentação é geralmente convertida para um estado padrão cujo meio é água a 20^o C. Para isso deve-se considerar a mudança em dois parâmetros: viscosidade do meio e diferença de densidade entre a partícula e o meio:

$$S_{20,w} = S_{t,m} \frac{\eta_{t,m}(\rho_p - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}(\rho_p - \rho_{t,m})} \tag{8}$$

onde η se refere à viscosidade, ρ à densidade, o índice p à partícula, e $20, w$ à água a 20^o C.

Assim, combinando (7) e (8) temos:

$$S_{20,w} = \frac{dr\eta_{t,m}(\rho_p - \rho_{20,w})}{dt\,\omega^2 r\,\eta_{20,w}(\rho_p - \rho_{t,m})} \tag{9}$$

O volume parcial específico, ou recíproco da densidade da proteína em solução, pode ser considerado constante, uma vez que para a maioria das proteínas pouco varia com a temperatura (Martin, R. G. & Ames, B. N., 1960). Assim ocorre que

$$A = \frac{\rho_p - \rho_{20,w}}{\eta_{20,w}} = CONSTANTE \tag{10}$$

Temos então:

$$S_{20,w}\,dt = A\frac{dr\,\eta_{t,m}}{r\,\omega^2(\rho_p - \rho_{t,m})} \tag{11}$$

integrando ambos os membros para tempo de corrida de *zero* a t, temos

$$\int_0^t S_{20,w}\,dt = \frac{A}{\omega^2}\int_i^r \frac{\eta_{t,m}}{(\rho_p - \rho_{t,m})}\,dr \tag{12}$$

onde i é a distância inicial da partícula ao eixo do rotor. Assim

$$S_{20,w}\,t = \frac{A}{\omega^2}\int_i^r \frac{\eta_{t,m}}{(\rho_p - \rho_{t,m})}\,dr \tag{13}$$

ou

$$S_{20,w} = \frac{A}{\omega^2 t} \int_i^r \frac{\eta_{t,m}}{(\rho_p - \rho_{t,m})} dr \tag{14}$$

Podemos aproximar a integral à seguinte somatória (Bishop, B. S., 1966):

$$S_{20,w} = \frac{A}{\omega^2 t} \sum_{i=1}^{n} \frac{\eta_{t,m,f_i} (r_i - r_{i-1})}{(\rho_p - \rho_{t,m,i}) \left(\frac{r_i + r_{i+1}}{2}\right)} \tag{15}$$

nesse caso f_i se refere à fração número i do meio. Temos agora

$$S_{20,w} = \frac{\rho_p - \rho_{20,w}}{\omega^2 t \eta_{20,w}} \sum_{i=1}^{n} \frac{\eta_{t,m,f_i} (r_i - r_{i-1})}{(\rho_p - \rho_{t,m,f_i}) \left(\frac{r_i + r_{i+1}}{2}\right)} \tag{16}$$

Se tivéssemos uma função matemática definida e integrável que representasse $\eta_{t,m}/(\rho_p - \rho_{t,m})r$, $S_{20,w}$ seria facilmente calculável através da equação (14). O exemplo mais simples seria um conjunto de partículas migrando em um meio homogêneo, portanto sem gradiente de densidade. Assim a função seria k/r, facilmente integrável. Nesse caso, as partículas da parte inferior da banda tem r maior que as demais partículas. A viscosidade no interior da banda, por outro lado, é maior devido à interação partícula-partícula, provocando um atraso adicional nessa parte da banda em relação à inferior (Price, C. A., 1982, cap. 3). Observa-se conseqüentemente um alargamento ao longo da corrida.

A grande vantagem dos gradientes de densidade é a possibilidade de um controle mais efetivo na velocidade de sedimentação. Na verdade existem vários tipos de gradientes para separação de partículas e/ou determinação do coeficiente de sedimentação: gradiente isocinético, gradiente indutor de estreitamento de banda, e outros (Price, C. A., 1982, cap. 3).

Para escolha do material para gradiente várias propriedades desejáveis devem ser consideradas, como solubilidade em água, densidade alta, viscosidade baixa, pressão osmótica baixa, inatividade física e química, transparência em luz visível e UV, e ser de baixo custo. No presente caso utilizou-se Ficoll 400 (Pharmacia, Sweden), um polímero sintético de sacarose muito utilizado para gradiente de densidade, e com peso molecular de 400 kDa (Price, C. A., 1982, cap. 5). Para obtenção do gradiente utilizou-se osmossedimentação, como veremos a seguir.

Galembeck e colaboradores observaram que gradientes de densidade são obtidos rapidamente por centrifugação quando soluções macromoleculares são mantidas em contato com o solvente através de uma membrana semipermeável, em celas de diálise (a Figura 8 mostra o esquema da cela de diálise utilizada no presente trabalho). Ocorre uma aceleração da sedimentação devido ao acoplamento entre

os fluxos de massa osmóticos e de sedimentação, ou osmocentrifugação (Nunes, S. P. & Galembeck, F., 1985).

Fez-se a centrifugação de Ficoll 8% (m/m) em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, contendo EDTA 10^{-3} M em um compartimento da cela de diálise. No outro compartimento colocou-se apenas a solução tampão em presença de EDTA. Utilizou-se membranas de acetato de celulose preparadas a partir de solução contendo 10 g de acetato de celulose, 19 ml de acetona, 63 ml de ácido acético e 88 g de água.

A centrifugação foi então feita em uma centrífuga RC3B Sorvall a 4000 rpm, 4° C, por 2 h 15 min. Cada gradiente de densidade auto-gerado foi transferido para tubos de centrífuga utilizando-se uma bomba peristáltica.

Três intervalos de densidade foram então obtidos: A (1,0325 a 1,0550), B (1,0100 a 1,0300) e C (1,0013 a 1,0090). A Figura 9 mostra a densidade da solução de Ficoll obtida em função da altura da cela. Observa-se que na parte média da cela (B) ocorre um gradiente mais acentuado que nas extremidades superior e inferior. Os intervalos de viscosidades obtidos são de 11,2 a 22,6 Poise (seção A), 2,8 a 9,4 Poise (seção B) e 1,6 a 2,6 Poise (seção C).

Colocou-se cuidadosamente, com auxílio de uma microsseringa, alíquota de 50 μl de eritrocruorina no topo do tubo de cada gradiente, acompanhando-se visualmente o deslocamento, medindo-se com uma régua. Foram utilizadas várias concentrações de eritrocruorina entre 2,5 e 12,5 mg/cm^3. Após completar a corrida, o conteúdo do tubo de centrífuga foi retirado com uma seringa com longa agulha e dividido em alíquotas para medidas de densidade em um densímetro PAAR DMA 600/602. A viscosidade das alíquotas de Ficoll baseadas na densidade foram medidas em trabalho anterior (Pretlow, T.G. *et al.*, 1969).

O coeficiente de sedimentação foi calculado segundo a equação 16 utilizando-se um programa na linguagem BASIC em microcomputador ITAUTEC. O programa foi listado no apêndice A.

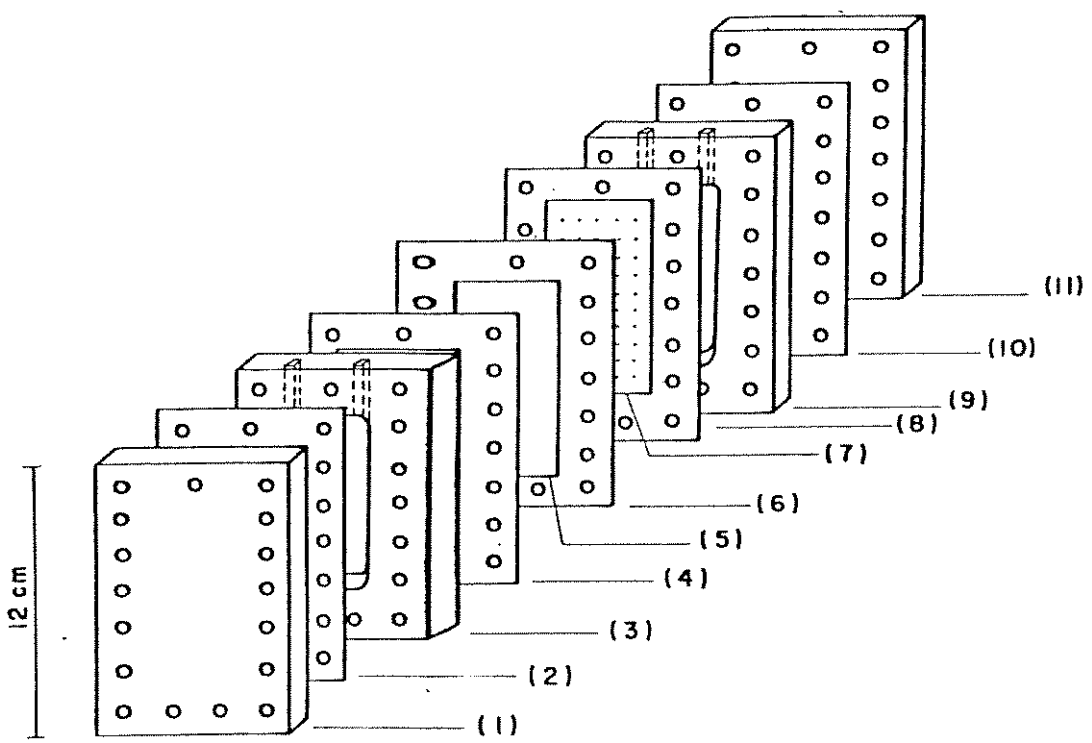


Figura 8: Cela de osmocentrifugação

Cela de osmocentrifugação utilizada para gerar gradiente de densidade (página 22), composta de placas de acrílico (partes 1, 3, 9 e 11), folhas de polietileno (partes 2, 4, 6, 8 e 10), membrana semi-permeável (5) e tela de níquel como suporte físico da membrana (parte 7).

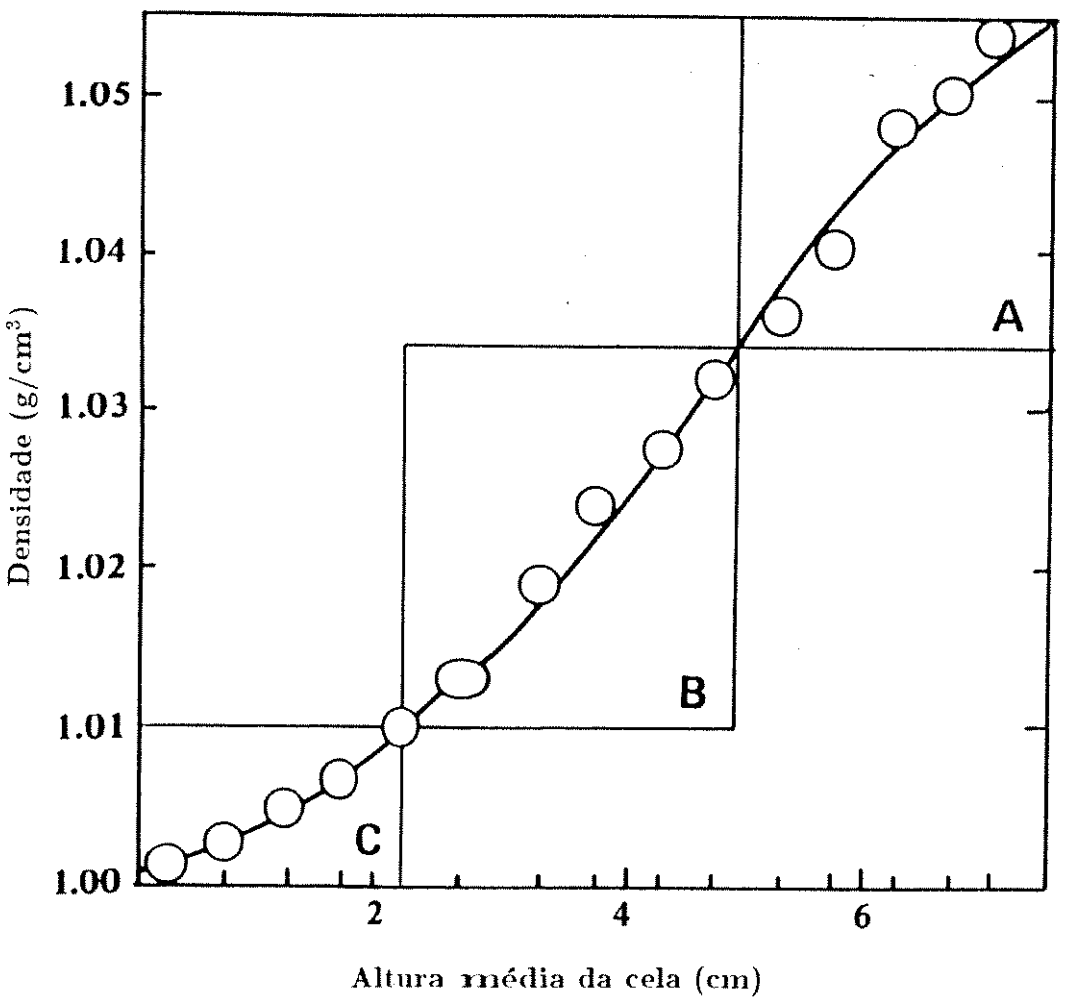


Figura 9: Gradiente de densidade autogerado por osmocentrifugação

Utilizou-se como solução de partida Ficoll 8% em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, e EDTA 10^{-3} M. Condições de osmocentrifugação: 4000 rpm, 2 h 15 min, temperatura de 4° C.

Determinação do Peso Molecular Mínimo

O peso molecular mínimo da eritrocruorina, ou massa de hemeproteína que contem um mol de heme, é determinada a partir do peso seco da proteína com número de moles conhecido.

Inicialmente é necessário a determinação do conteúdo de heme em solução de eritrocruorina adequadamente purificada e isenta de sais. A determinação é feita segundo o método piridina-hemecromogênio (Antonini, E. & Brunori, M., 1971, cap. 1). Todo heme presente deve ser convertido em complexo misturando-se solução de hemoglobina com piridina em álcali. Uma vez tendo a concentração molar de heme estabelecida, faz-se a secagem e pesagem da proteína a partir de volume conhecido de solução.

A purificação da eritrocruorina foi feita segundo descrito na página 14, porém a última ressuspensão foi feita com água bidestilada. Dialisou-se exaustivamente contra água bidestilada, determinando-se em seguida a concentração de heme.

Diluiu-se a solução de hemoglobina de modo que a absorbância máxima em qualquer comprimento de onda na região do visível (650 a 450 nm) ficasse entre 0,3 e 0,9. Foram adicionados então 3 ml de solução de piridina em NaOH (100 ml de piridina, 30 ml de NaOH 1 N, completando-se o volume a 300 ml com água destilada). Ocorre formação de piridina-hemecromogênio oxidado, que é um composto estável. Após cerca de 6 horas, adicionou-se a 1 ml da solução ditionito de sódio sólido ($Na_2S_2O_4$), que leva à formação de um composto relativamente instável de piridina-hemecromogênio, registrando-se o espectro de 600 a 500 nm (Espectrofotômetro DMS 100, Intralab). A transferência completa de heme da proteína à piridina foi verificada pela relação entre a absorbância máxima (λ = 557 nm) e a mínima (λ = 540 nm), que deve ser próximo de 3,5. O coeficiente de extinção molar para piridina-hemecromogênio reduzido é ϵ_{557}^{mM} = 32,2 e ϵ_{525}^{mM} = 16,0.

A solução com concentração molar de heme conhecida foi dividida em 2 alíquotas e cada uma colocada em um pesa-filtro com massa conhecida. Colocou-se em um dissecador até evaporação completa da solução, e a seguir em estufa a 105° C. Foram feitas diversas pesagens da proteína seca até peso constante (balança analítica Mettler H54AR, d = 0,01 mg). O peso de cada amostra foi determinado em diversos tempos, observando-se hidratação da amostra, que inicialmente foi cerca de 1,5 % por minuto. Considerou-se para cada amostra a estimativa da massa no tempo zero.

Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

O conhecimento de detalhes da estrutura tridimensional de macromoléculas é fundamental na compreenção da função biológica. Até hoje a difração de raios X de cristais de proteína é o único método pelo qual se obtem informação estrutural detalhada a nível de resolução atômica apresentando, porém, certas limitações e desvantagens. A obtenção de cristais da proteína e a preparação de derivados com átomos pesados para a resolução da estrutura apresentam sérias dificuldades. As condições nas quais as proteínas são analisadas, como solvente, força iônica, pH e outras, são determinadas pelo processo de cristalização, normalmente distintas das condições biológicas. Apesar da estrutura cristalina das proteínas apresentarem geralmente muita semelhança em relação à forma nativa, as moléculas do cristal estão mantidas por forças que não estão presentes em solução (Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 8).

O espalhamento de raios X a baixo ângulo, ou espalhamento central difuso, apesar de não levar a detalhes estruturais com a resolução obtida a partir de monocristais (até 0,2 nm), tem a grande vantagem de permitir o estudo da macromolécula em solução, em condições mais próximas à forma nativa. Além disso essa técnica permite um estudo dinâmico, detectando mudanças conformacionais, tão freqüentes em processos biológicos. Entre essas mudanças detectáveis relacionadas com a forma ou tamanho da macromolécula podem ser mencionadas processos de dissociação em subunidades ou associação em estruturas supramoleculares, e alterações relativamente pequenas, como a passagem da forma oxi para deoxihemoglobina, mencionadas adiante (Conrad, H. *et al.*, 1969).

Qualquer processo de espalhamento é caracterizado por uma lei de reciprocidade que relaciona inversamente as dimensões da partícula e o ângulo de espalhamento. No caso dos raios X, a fonte mais freqüentemente utilizada é Cu K_α de comprimento de onda de 0,154 nm, muito menor que as macromoléculas ou partículas coloidais, confinando o efeito de espalhamento observável a pequenos ângulos. Como os raios X são espalhados por elétrons, o fenômeno depende de um contraste de densidade eletrônica entre o solvente e a partícula observada. Para partículas em solução, somente a diferença de densidade eletrônica $\rho_2 - \rho_1$ (onde ρ_2 é a densidade de elétrons do soluto e ρ_1 a densidade de elétrons no solvente) é efetiva na produção do espalhamento central difuso.

Quando os raios X atravessam um meio material, os elétrons dos átomos constituintes são induzidos a oscilar na freqüência da onda incidente, ocorrendo emissão de ondas secundárias e interferência entre as mesmas. Para uma partícula com dimensões similares ao comprimento de onda utilizado (Figura 10 A), o espalhamento a qualquer ângulo de observação leva, para dois pontos arbitrariamente

escolhidos, a uma diferença de fase de δ nas duas ondas espalhadas, sempre pequena quando comparada com o comprimento de onda. Isso ocorre para todos os pares de pontos da partícula, observando-se uma superposição quase em fase das ondas emitidas no ângulo escolhido. Considerando todas as possíveis posições de pares de pontos (elétrons) dentro da partícula, ocorre esta mesma superposição em fase, e a amplitude da radiação de espalhamento pouco se altera com o ângulo de espalhamento. Portanto não se observa espalhamento difuso significativo fora do ângulo zero.

Consideremos então uma partícula bem maior que o comprimento de onda (Figura 10 B e C), e qualquer par de pontos dentro da partícula. As ondas secundárias produzidas a partir desses pontos em um ângulo de observação 2θ pode levar a uma diferença de fase entre as ondas correspondente a um número inteiro de comprimentos de onda λ da radiação incidente.

No entanto, como as ondas secundárias de cada ponto (elétron) da partícula são emitidas ao acaso (incoerentemente), a superposição das mesmas leva a um espalhamento praticamente nulo numa direção 2θ arbitrária, como resultado da interferência destrutiva. Em ângulos de espalhamento menores, entretanto, as diferenças de fase diminuem, e as ondas começam a apresentar interferência construtiva. O espalhamento máximo irá ocorrer, obviamente, no ângulo zero, pois todas as ondas estarão então exatamente em fase.

Observa-se ainda que, para o mesmo comprimento de onda, numa esfera bem maior (Figura 10 C) a diferença de fase de 1λ é atingida em um ângulo muito menor de espalhamento que numa esfera menor (Figura 10 B), e a curva experimental fica, então, confinada a um intervalo angular mais estreito (Figura 11, curva 4).

O espalhamento de raios X a baixo ângulo de uma partícula isolada pode ser extendido para o caso de muitas partículas iguais sem interação mútua (solução homodispersa e suficientemente diluída), obtendo-se uma soma das intensidades de espalhamento das partículas individuais (Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1; Kratky, O., 1983).

O problema da análise do espalhamento de raios X a baixo ângulo consiste em deduzir tamanho, forma, massa e mesmo distribuição de densidade de elétrons a partir da curva de espalhamento "intensidade versus ângulo 2θ"). Nem todos os parâmetros, no entanto, podem ser obtidos diretamente. O raio de giro R é um dos mais importantes, e corresponde por definição à raiz quadrada da distância quadrada média de todos os elétrons ao centro de gravidade da partícula. Para uma esfera homogênea de raio a, o raio de giro é $\sqrt{3/5}a$.

A partir dos dados experimentais Guinier observou que as curvas de espalha-

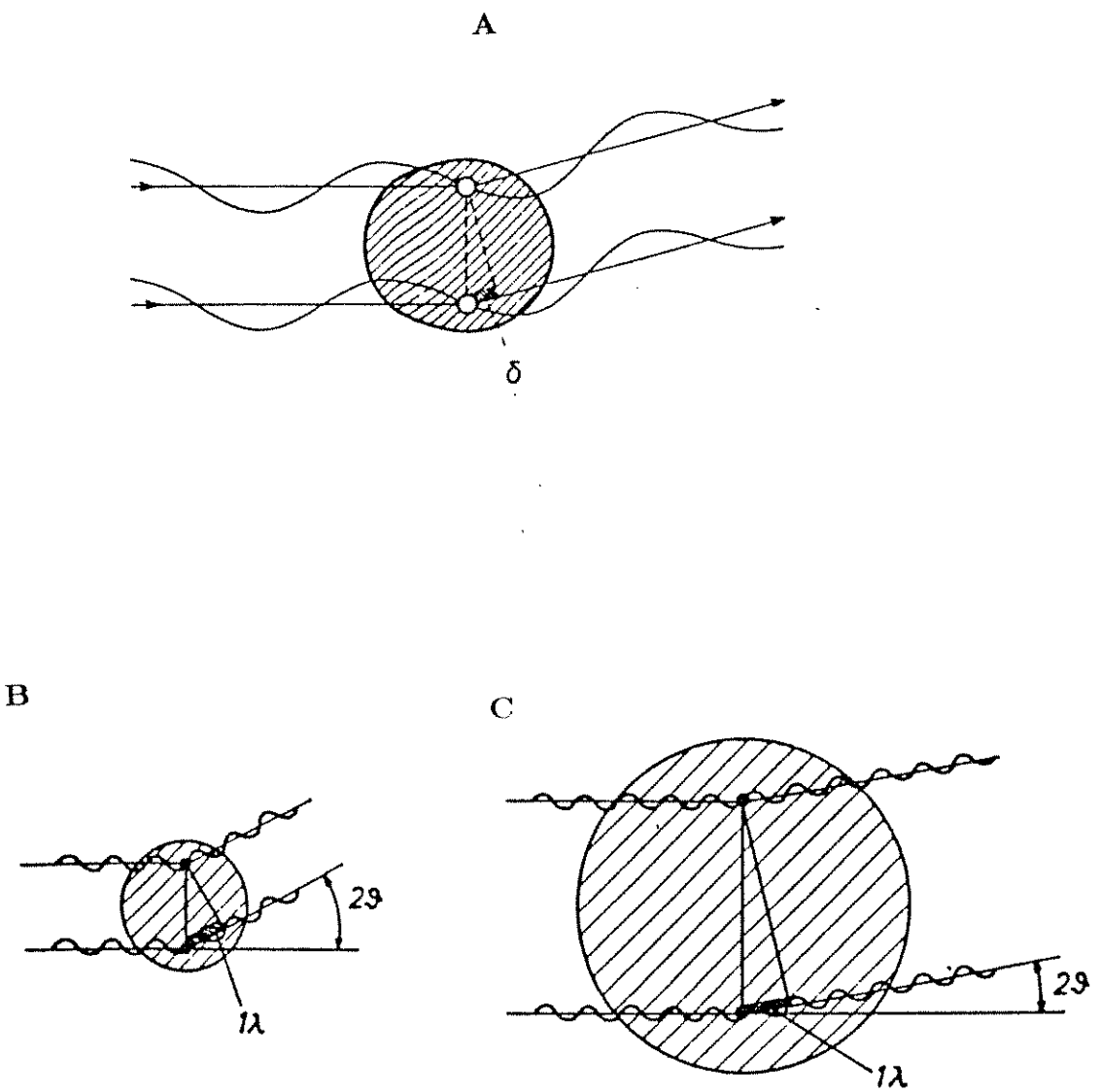


Figura 10: Espalhamento de raios X de partículas

Espalhamento de raios X de partículas (A) com dimensões similares ao comprimento de onda e (B) e (C) com dimensões bem maiores que o comprimento de onda (Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1 ; Kratky, O., 1983).

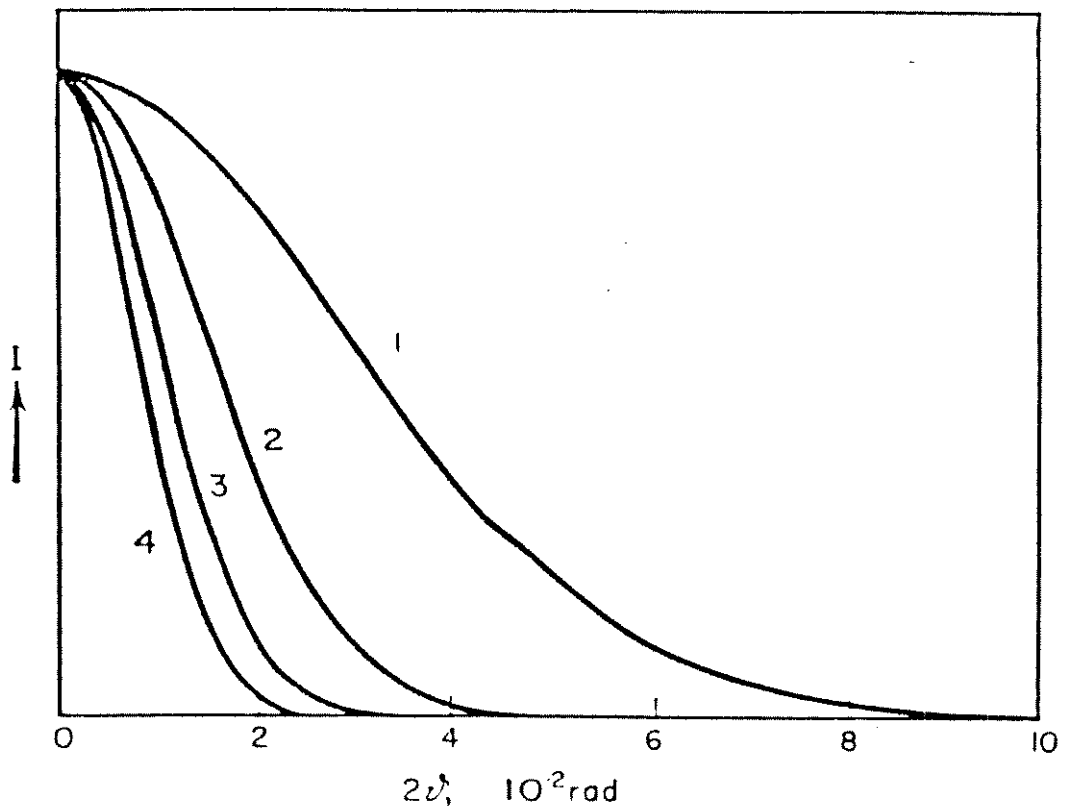


Figura 11: Curvas de espalhamento de raios X

Curvas experimentais de espalhamento de raios X. As curvas 1, 2, 3 e 4 correspondem a partículas de raios 1, 2, 3 e 4 unidades, respectivamente (Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1; Kratky, O., 1983).

mento seguem uma lei Gaussiana de acordo com

$$I(2\theta) = I(0)\, e^{-kR^2(2\theta)^2}, \quad k = \frac{1}{3}\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \tag{17}$$

onde $I(0)$ é a intensidade de espalhamento no ângulo $2\theta = zero$, e λ o comprimento de onda utilizado (Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1).

Em forma logarítmica temos:

$$ln\, I(2\theta) = ln\, I(0) - kR^2(2\theta)^2 \tag{18}$$

O gráfico de Guinier é construído colocando-se $ln\, I(2\theta)$ contra $(2\theta)^2$, obtendo-se uma curva com inclinação $-kR^2$, encontrando-se, então, o valor de R. A interação partícula-partícula produz distorções nos gráficos de Guinier às quais são eliminadas fazendo curvas de espalhamento em várias concentrações, e extrapolando o raio de giro para a concentração zero. O parâmetro R é importante e freqüentemente utilizado como indicador de várias mudanças estruturais de certas moléculas, como associação e dissociação, mudanças conformacionais por desnaturação, ligação de coenzimas, efeitos de temperatura, entre outros. A deoxihemoglobina tem um raio de giro significativamente maior que a oxihemoglobina, sendo o fenômeno observado completamente reversível (Conrad, H. *et al.*, 1969).

Para partículas em solução homogênea no aspecto densidade de elétrons, o volume da partícula pode ser calculado de acordo com Porod, através da relação (Pilz, I. *et al.*, 1979; Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 2):

$$V = \frac{\lambda^3 I(0)}{4\pi Q} \tag{19}$$

onde Q é a denominada invariante, integral de toda curva de espalhamento, ou seja

$$Q = \int_0^\infty I(2\theta)^2\, d(2\theta) \tag{20}$$

Q é independente do grau de dispersão para uma dada concentração de massa constante, e portanto, independente do volume das partículas individuais. Entretanto a intensidade de espalhamento extrapolada a ângulo zero $I(0)$ é proporcional ao volume da partícula, sendo plausível (19).

Comparando o raio de giro e o volume encontrado, pode-se obter uma medida da anisotropia da partícula, similar ao fator de assimetria em ultracentrifugação. Para um mesmo volume, o raio de giro aumenta com o aumento da anisotropia.

A função $p(r)$, obtida a partir da curva de espalhamento, descreve a distribuição de distâncias r entre todos os possíveis pares de pontos (elétrons) dentro da partícula. Essa função pode ser obtida através dos dados experimentais, expressando a curva de intensidade em função da variável $h = 4\pi \sin(\theta/\lambda)$ (Pilz, I. *et al.*, 1979; Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1):

$$I(h) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin hr}{hr} dr \tag{21}$$

A inversão de Fourier nos permite, então, calcular $p(r)$:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I(h)\, h\, r \sin hr\, dh \tag{22}$$

Imediatamente se obtém um parâmetro molecular muito importante. A distância máxima r_{max} na partícula pode ser observada diretamente no valor da abcissa onde a função $p(r)$ se anula.

A função distribuição de distâncias também oferece um meio independente para a determinação do raio de giro, definindo como (Pilz, I. *et al.*, 1979; Glatter, O. & Kratky, O., 1982, cap. 1):

$$R^2 = \frac{\int_0^\infty p(r)\, r^2\, dr}{2 \int_0^\infty p(r)\, dr} \tag{23}$$

Na determinação do raio de giro pelo gráfico de Guinier encontra-se freqüentemente a dificuldade de se decidir se a curva atingiu sua inclinação final de acordo com (17), dentro do intervalo experimentalmente coberto pelos menores ângulos de espalhamento, ou se uma mudança na inclinação, mais provavelmente um aumento, poderia ocorrer em ângulos ainda menores. Nesse caso, o valor determinado de acordo com a equação (23) é um controle adicional, pois a relação inclui toda a curva de espalhamento.

Experimentalmente as curvas de espalhamento de raios X foram obtidas utilizando-se um gerador de anodo rotatório (Rigaku RU-200) com alvo de cobre, que opera a 50 kV e 100 mA. Utilizou-se uma câmara de baixo ângulo com um sistema de colimação Kratky e um monocromador de feixe difratado com um cristal de grafite, esquematizado na Figura 12. A solução de proteína foi colocada em um porta-amostra com janelas de "mylar", e mantida em uma espessura de 1,5 mm à temperatura de 4 a 6° C durante a exposição aos raios X.

As intensidades de espalhamento foram medidas por varredura entre 0,08° e 1,00° (0,0014 rad e 0,0175 rad), com 0,02° de passo. O tempo de contagem foi de 400 segundos por ângulo. Foram utilizadas soluções de eritrocruorina com concentrações (em relação ao heme) de 5,26 mM, e as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e

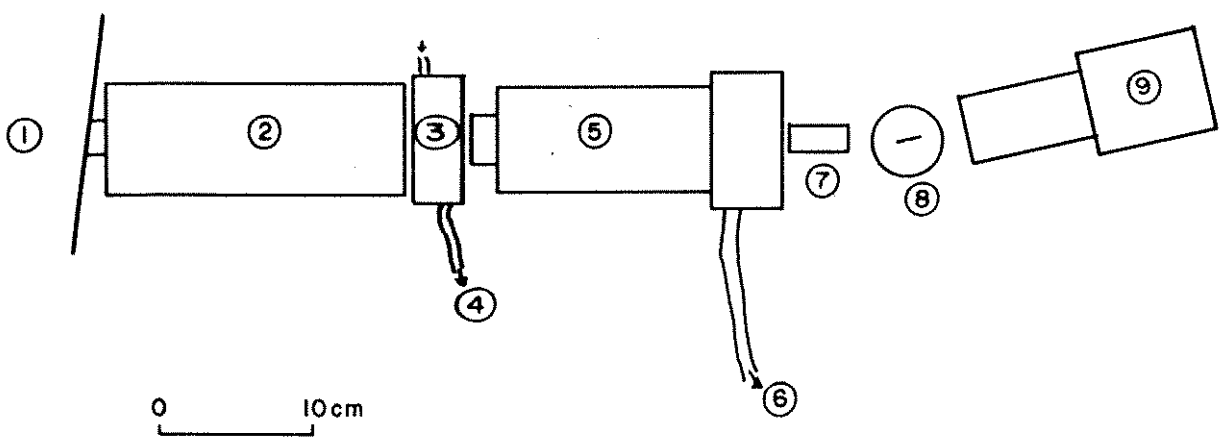


Figura 12: Câmara de baixo ângulo

Esquema da câmara de baixo ângulo utilizada para obtenção das curvas de espalhamento. (1) gerador de raios X, alvo de cobre. (2) sistema colimação tipo Kratky. (3) suporte para porta-amostra com refrigeração por circulação de água. (4) circulação de água refrigerada. (5) caminho de vácuo. (6) bomba de vácuo. (7) fenda para monocromador. (8) monocromador de grafite. (9) detector de cintilação.

1:16. Foram realizadas entre quatro e seis varreduras em cada concentração, corrigindo-se os efeitos de espalhamento do solvente e do porta-amostra.

RESULTADOS

Pureza da Eritrocruorina

A análise do cromatograma (HPLC) mostrou a presença de dois picos: um pico principal (84,4 %) e outro secundário (15,6 %) correspondente a um peso molecular menor (Figura 13 A). Submetendo-se a eritrocruorina previamente a tratamento que leva à dissociação (no caso, submetida à pressão de 25000 psi durante 30 minutos) ocorre aumento do pico secundário (Figura 13 B), sugerindo que esse pico corresponda a um produto de dissociação da eritrocruorina, talvez em parte ocorrido durante o processo de separação na própria coluna. Não se avaliou o peso molecular correspondente a cada fração.

Mais adiante será visto na parte referente à determinação do coeficiente de sedimentação da proteína por velocidade de sedimentação que não se observa na amostra purificada produtos de dissociação da eritrocruorina, por exemplo, a subunidade principal (1/12 da molécula): há formação de uma única banda de migração correspondente à proteína não dissociada.

Resultados de espalhamento de raios X a baixo ângulo, por outro lado, corroboram que a amostra purificada não contem contaminante em quantidade apreciável, pois a curva de espalhamento é compatível com apenas uma população homogênea (quanto ao tamanho) de partículas.

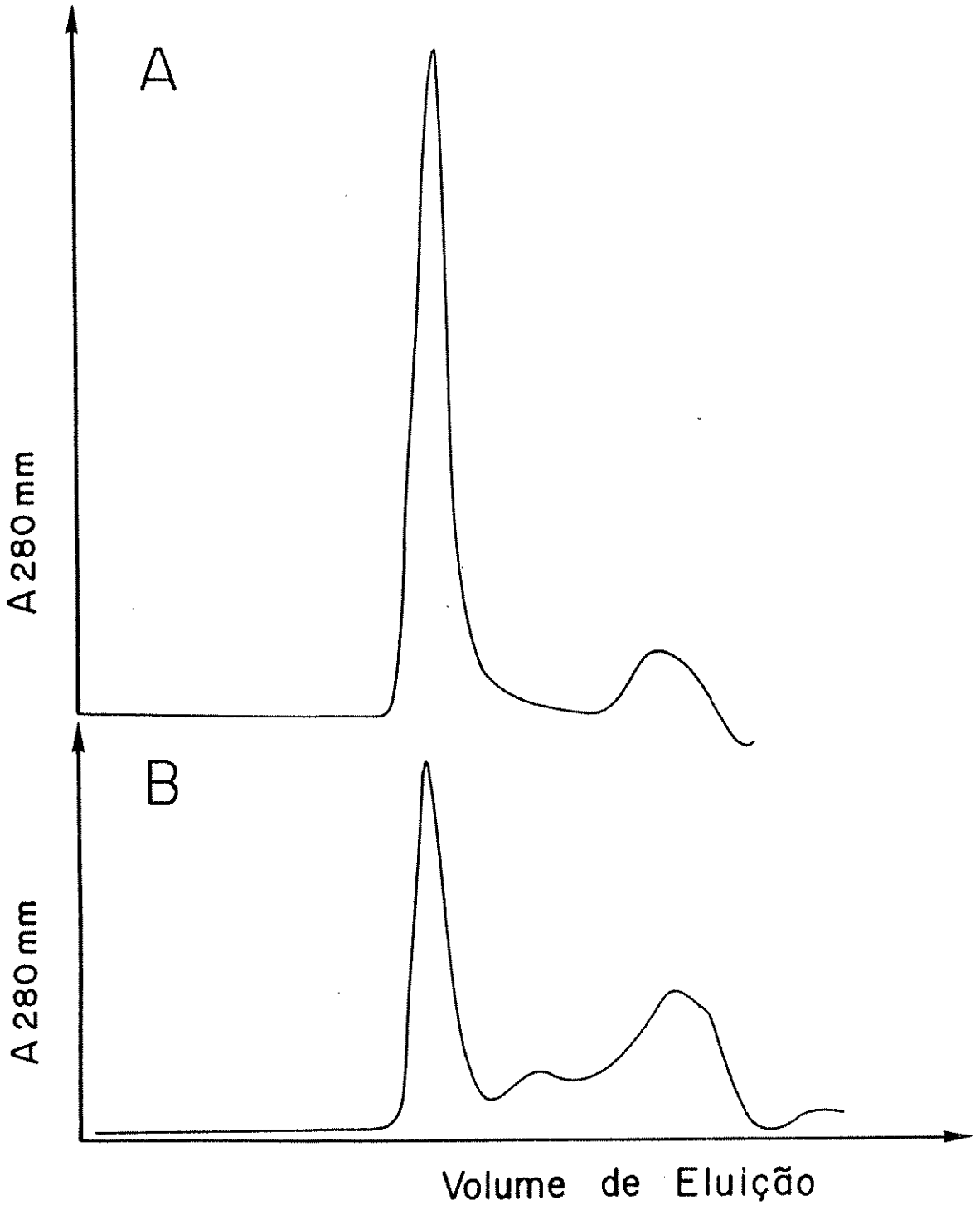


Figura 13: Cromatografia (HPLC) de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*

Cromatografia em HPLC de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*, 0,5 mg/ml. (A) controle e (B) submetida previamente a alta pressão (25 kpsi por 30 minutos). Observa-se um aumento de 15,6 % a 57,7 % no pico secundário.

Tabela 2: Efeito de magnésio sobre a afinidade da eritrocruorina por O_2 e cooperatividade

Equilíbrio de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* em diferentes concentrações de magnésio. A Figura 14 se refere a esses valores.

Concentração de Mg^{2+} (M)	$LogP50$	$P50$	n
0	0,570	3,72	1,16
0	0,686	4,85	1,23
0,10	0,381	2,40	1,17
0,10	0,296	1,98	1,41
0,20	0,312	2,05	1,78
0,25	0,270	1,86	1,44
0,50	0,168	1,47	1,65
0,50	-0,180	0,66	1,92

Equilíbrio da Eritrocruorina com Oxigênio: Efeito de Magnésio

Os resultados dos equilíbrios da eritrocruorina com oxigênio são mostrados na Figura 14. Observa-se um aumento de afinidade em concentrações crescentes de magnésio, assim como um aumento na cooperatividade n (coeficiente angular) em maiores concentrações do cátion. Os equilíbrios relativos às concentrações 0,5 M, 0,1 M e controle foram feitos em duplicata.

Os valores de $logP50$, $P50$ e n encontrados foram colocados na Tabela 2.

UNICAMP

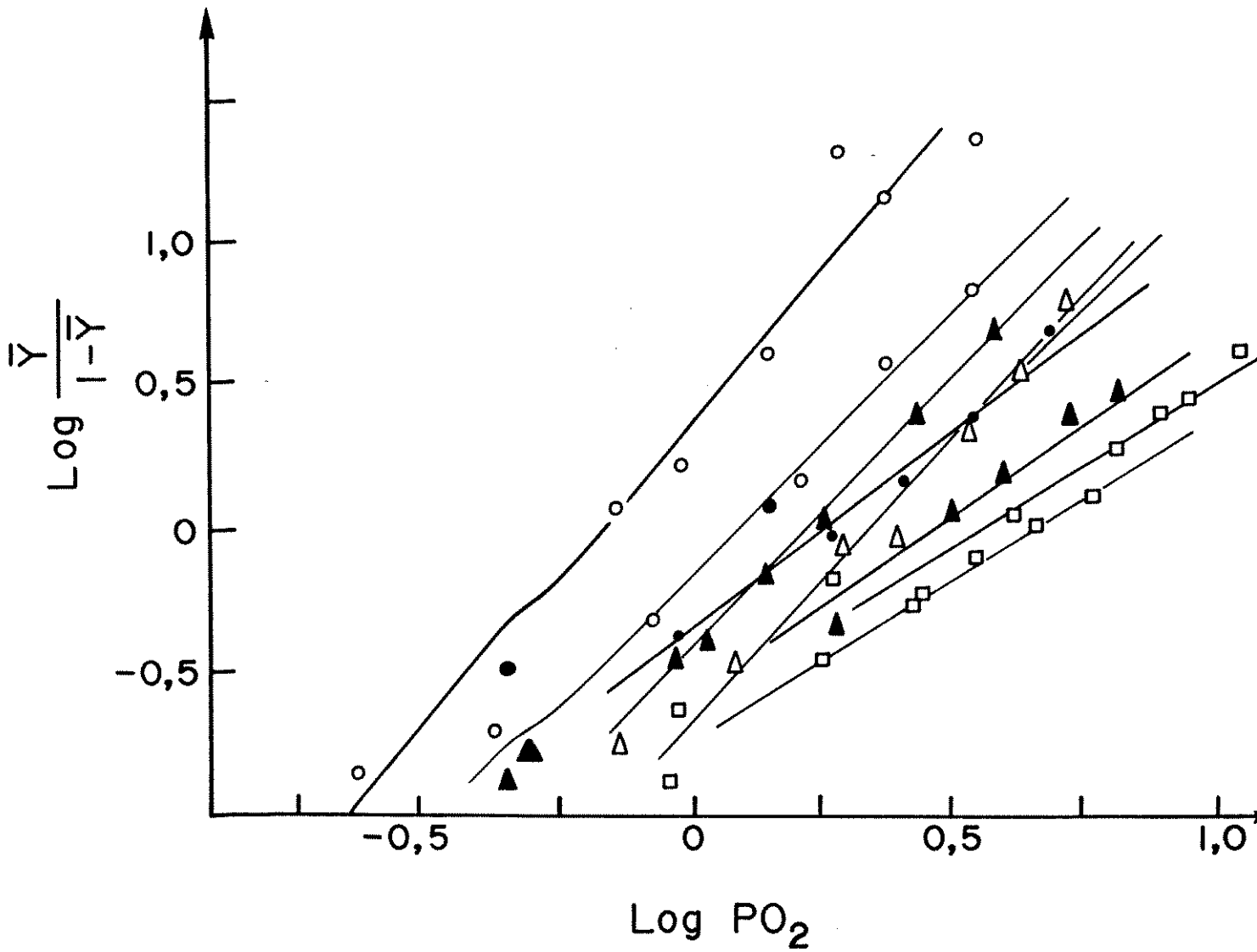


Figura 14: Efeito de Mg^{2+} sobre a afinidade da eritrocruorina por O_2 em função de log PO_2

Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 0,05 M, pH final de 7,1 a 7,2. □ controle, ▲ 0,10 M, Δ 0,20 M, • 0,25 M, ○ 0,50 M de $MgSO_4$.

Determinação do Coeficiente de Sedimentação

A Figura 15 mostra o experimento de sedimentação da eritrocruorina em tubo de centrífuga. A Figura 16 mostra o coeficiente de sedimentação da eritrocruorina em função da concentração de proteína inicial. O valor obtido por extrapolação à concentração zero foi 58 S. Observa-se um aumento do coeficiente de sedimentação com a concentração de hemeproteína.

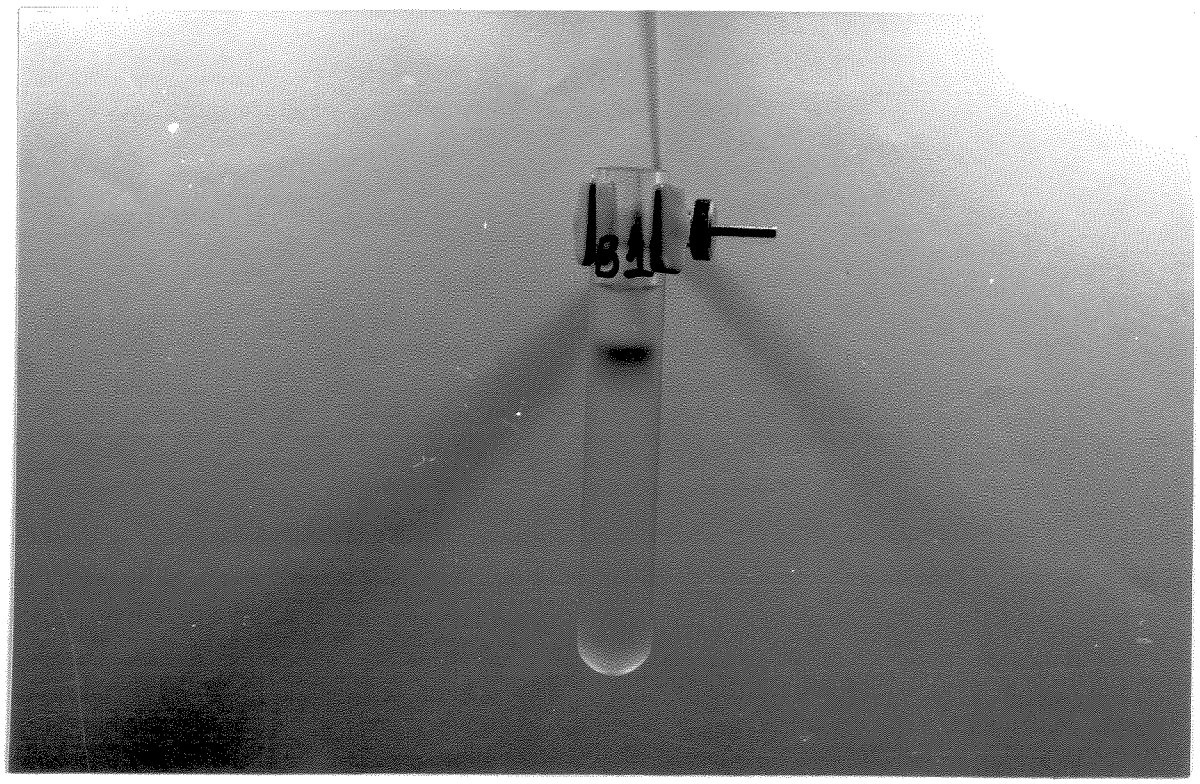


Figura 15: Experimento de sedimentação da eritrocruorina

Observar a presença de uma única banda correspondente à eritrocruorina.

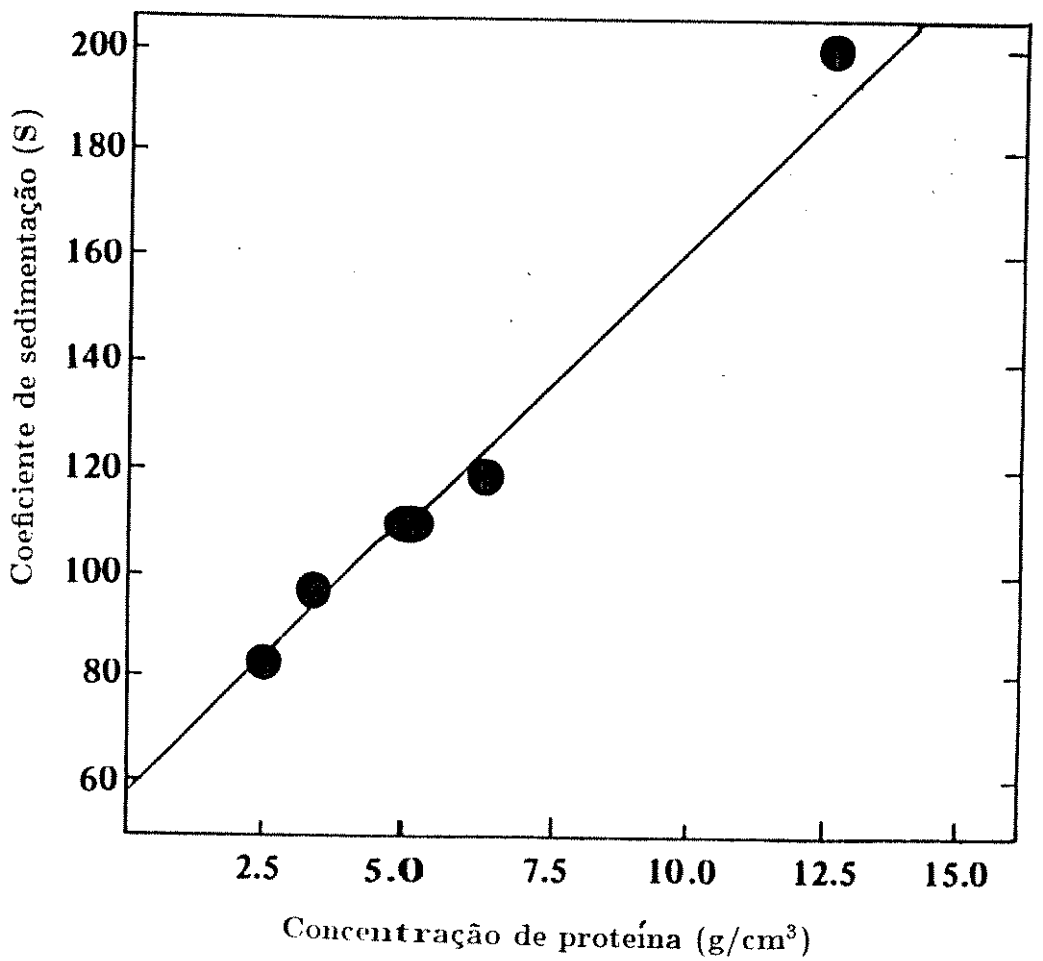


Figura 16: Coeficiente de sedimentação da eritrocruorina em diferentes concentrações

Coeficiente de sedimentação de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* em função da concentração inicial da hemeproteína. Observa-se que a extrapolação à concentração zero o coeficiente de sedimentação é 58 S.

Determinação do Peso Molecular Mínimo

Pelo método piridina-hemecromogênio foram feitas duas medidas em diferentes dias, obtendo-se A_{557}/A_{525} de 3,49 e 3,62. A concentração de heme encontrada nesses experimentos foi, respectivamente, 2,797 e 2,885 mM. Considerou-se, assim, a média das concentrações, 2,841 mM. Por determinação do peso seco das soluções de hemoglobina, o peso molecular mínimo encontrado foi de 26314 e 24214 g. O peso molecular mínimo foi considerado como a média desses valores, ou 25250 gramas.

Parâmetros Estruturais por Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

As curvas experimentais de espalhamento para diversas concentrações de eritrocruorina são mostradas na Figura 17. Observa-se intensidade de espalhamento "I" decrescente com a concentração e com o ângulo de espalhamento 2θ. Em concentração de 5,26 mM observa-se uma diminuição de espalhamento perto do ângulo zero devido ao efeito de concentração. O gráfico de Guinier é mostrado na Figura 18, na qual temos $\ln I$ em função de $(2\theta)^2$. A região de ângulo menor na qual se obteve linearidade foi utilizada para o cálculo do raio de giro, por meio da equação 17. Os resultados foram colocados na Tabela 3.

Na Figura 19 temos o raio de giro em função da concentração. Observa-se uma diminuição do raio de giro em concentrações crescentes de eritrocruorina. A extrapolação à concentração zero por regressão linear é 11,4 nm.

A curva de distribuição de distância $p(r)$ foi calculada pelo método da transformada indireta de Fourier utilizando os dados correspondentes à solução mais concentrada. O número de pontos de espalhamento foi maior para essa curva, assim como a dispersão dos dados foi menor. Os efeitos de concentração, indesejáveis, levaram à omissão de nove pontos iniciais para o cálculo. Foram introduzidas correções quanto à largura e a altura do feixe utilizado. A Figura 20 mostra a função $p(r)$ obtida após optimização. Os valores de R e D_{max} (dimensão máxima da partícula) determinados foram 11,5 nm e 27,0 nm respectivamente.

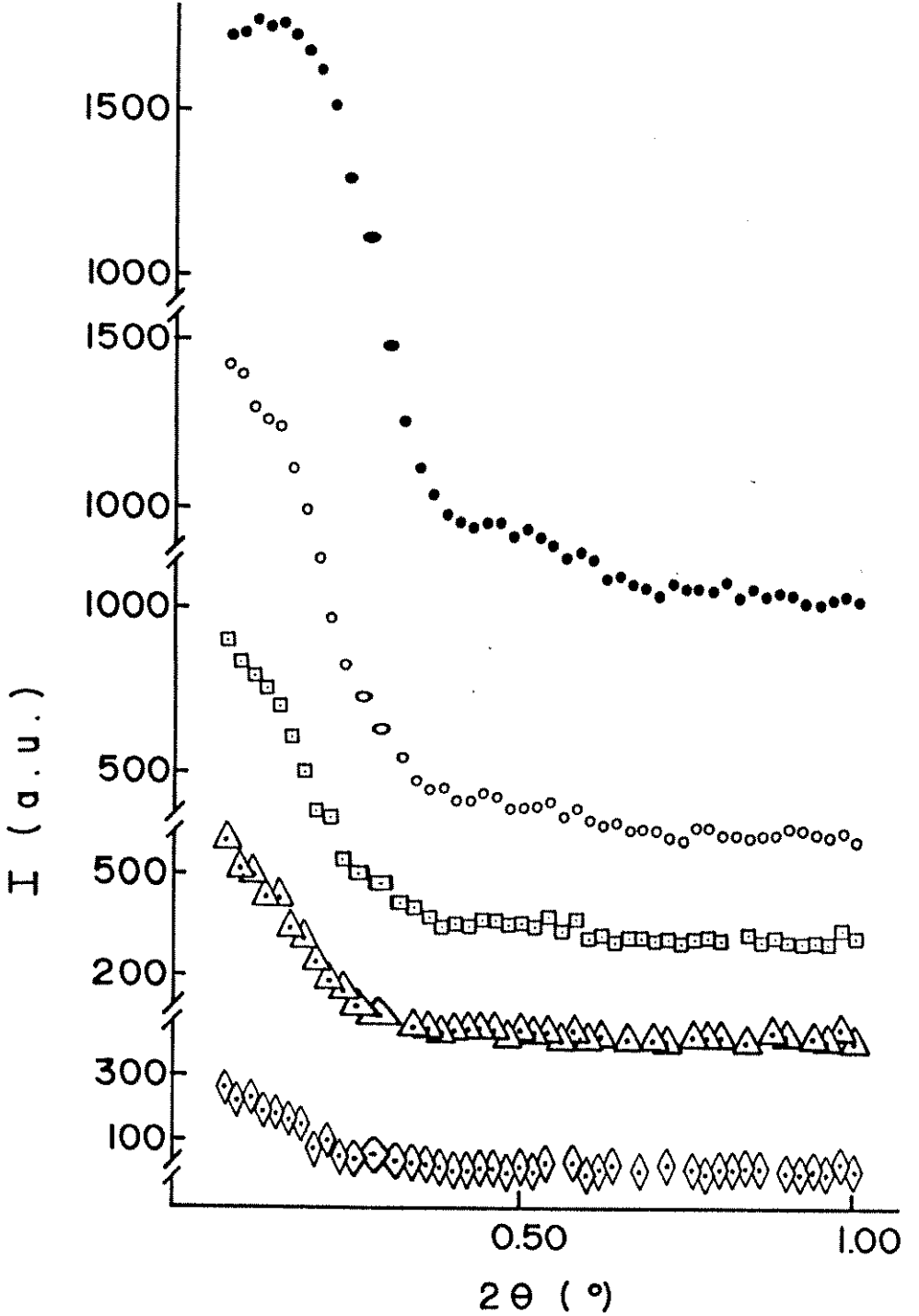


Figura 17: Curvas de espalhamento de raios X de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*

Em ordenadas tem-se os valores do ângulo de espalhamento 2θ e em abcissas a intensidade de espalhamento de raios X. As concentrações de proteína (em relação ao heme) são: • 5,26 mM, ○ 2,63 mM, □ 1,32 mM, △ 0,66 mM e ◇ 0,33 mM (relação de 1 : 1/2 : 1/4 : 1/8 : 1/16). Os efeitos de concentração são evidentes na solução 5,26 mM

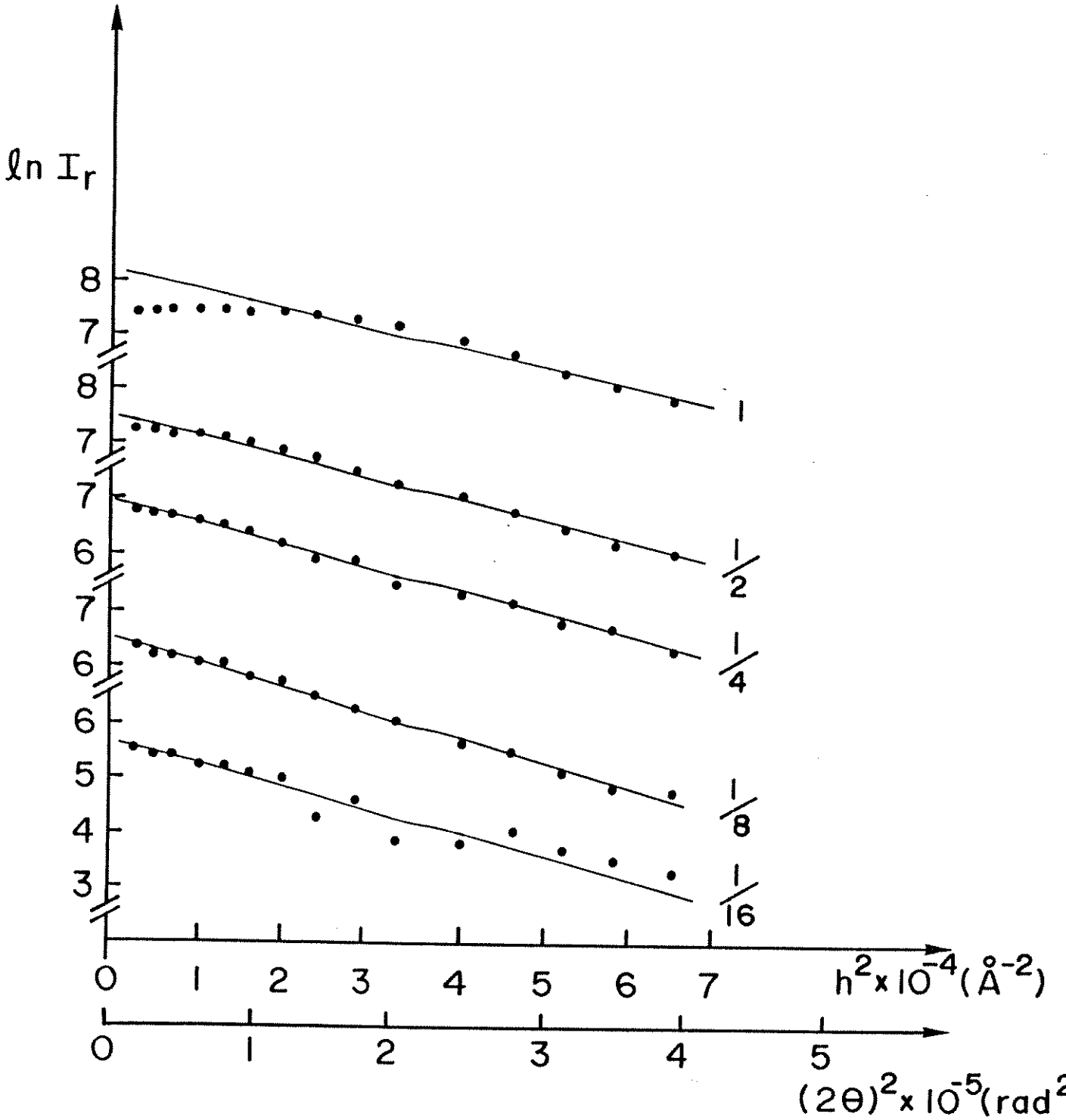


Figura 18: Gráfico de Guinier para as medidas de espalhamento de raios X da eritrocruorina

Em ordenadas tem-se $(2\theta)^2$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento, e em abcissas logarítmo da intensidade de espalhamento de raios X. Os raios de giro calculados a partir da inclinação das curvas estão na Tabela 3.

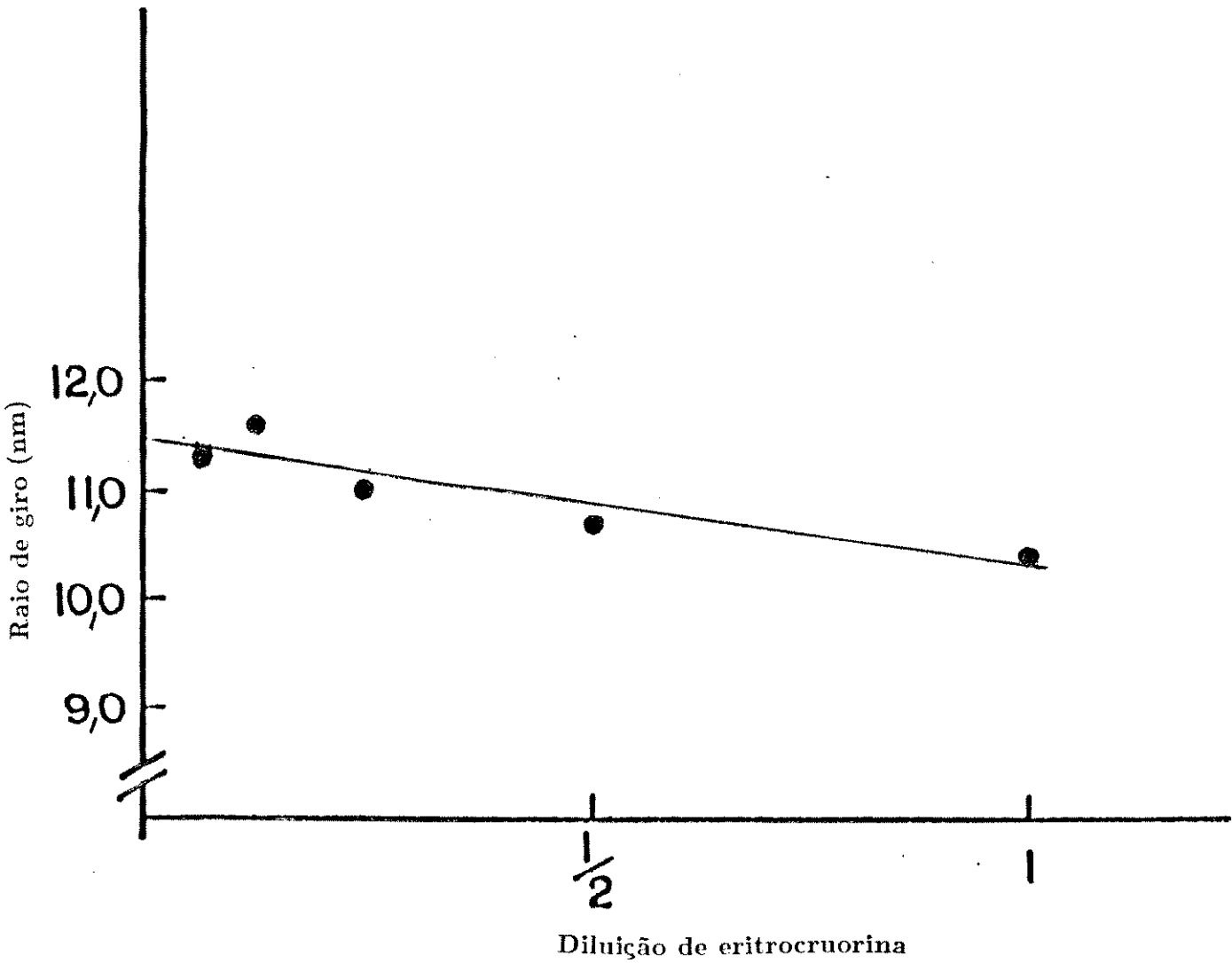


Figura 19: Raio de Giro em função da concentração de eritrocruorina

A extrapolação à concentração zero por regressão linear é 11,4 nm.

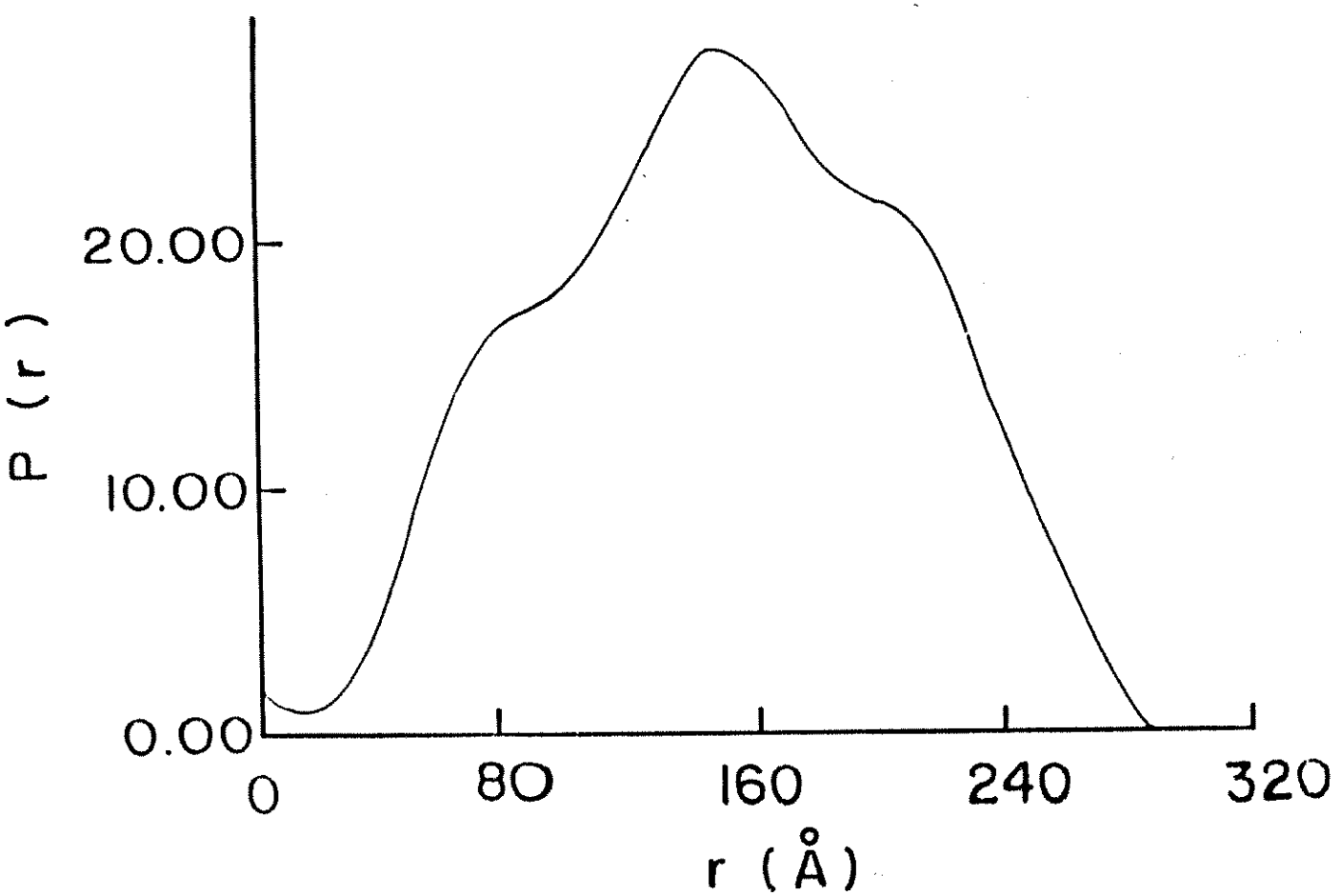


Figura 20: Curva de distribuição de distâncias $p(r)$ para eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*

DISCUSSÃO

A eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* apresenta evidente aumento da afinidade por oxigênio em presença de magnésio, com $P50$ cerca de 4,3 mmHg em ausência e presença de Mg^{2+} 0,5 M (Figura 14). Esse comportamento é observado em eritrocruorinas de diversas espécies (Everaarts, J. M. & Weber, R. E., 1974; Chiancone, E. *et al.*, 1981; Frossard, P., 1982a; Weber, R. E. & Baldwin, J., 1985; Fushitani, K. *et al.*, 1986). O possível efeito do ânion sulfato no experimento é improvável, pois a afinidade por O_2 das eritrocruorinas de outras espécies é predominantemente determinada pela carga dos componentes catiônicos, e a natureza ou valência dos ânions exercem pouca ou nenhuma influência detectável (Everaarts, J. M. & Weber, R. E., 1974; Fushitani, K. *et al.*, 1986). A ausência de efeito do ânion cloreto na eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* é explicada por experimentos de relaxação de quadrupolo por ressonância magnética nuclear, que mostra que a forma associada com o ligante apresenta a mesma afinidade por cloreto que a forma não associada (Chiancone, E. *et al.*, 1976).

A eritrocruorina apresenta também um aumento de cooperatividade em presença de $MgSO_4$: n de cerca de 1,2 no controle e 1,8 em presença de 0,5 M do sal. A cooperatividade n, nesse caso, se refere a n_2, pois não foram medidos os pontos iniciais da curva, correspondentes a níveis de PO_2 mais baixos. Na verdade esses valores de cooperatividade estão baixos, considerando que as eritrocruorinas apresentam usualmente cooperatividade maior que as hemoglobinas tetraméricas, às vezes maior que 4. Nesse intervalo de pH utilizado, 7,1 a 7,2, a eritrocruorina da espécie utilizada apresenta realmente valores baixos de cooperatividade, ocorrendo em pHs mais elevados aumento consideravel de n (Abe, A. S. & Meirelles, N. C., 1985).

Em eritrocruorinas de outras espécies observam-se também aumento de cooperatividade com a concentração de cátions. Na espécie *Arenicola marina* n aumenta de 2,2 a 3,9 em presença de concentrações de $MgSO_4$ (zero e 0,5 M, respectivamente). Em presença de Ca^{2+}, no entanto, ocorre um significativo aumento de cooperatividade atingindo um valor máximo em concentração 0,3 M, ocorrendo diminuição de cooperatividade em concentrações mais elevadas de Ca^{2+} (Everaarts, J. M. & Weber, R. E., 1974). Uma interpretação sugerida é que em concentrações mais baixas do sal, os cátions se ligam mais fortemente à hemoglobina combinada com o ligante do que à não ligada, promovendo um deslocamento da assíntota superior do gráfico de Hill para a esquerda, com conseqüente aumento de n. Em concentrações maiores do sal, entretanto, ocorre desvio à esquerda em ambas as assíntotas, superior e inferior, levando a uma diminuição no valor de n (Fushitani, K. *et al.*, 1986). No presente trabalho, assim como em *Arenicola*

marina, o sulfato de magnésio até concentração 0,5 M apresentou apenas aumento de n, indicando uma ligação do cátion predominantemente em estágios mais tardios de oxigenação.

Em concentrações molares mais elevadas, os cátions Na^+ e K^+ apresentam efeito similar aos cátions bivalentes em relação à cooperatividade e à afinidade da eritrocruorina por O_2 (Everaarts, J. M. & Weber, R. E., 1974; Fushitani, K. *et al.*, 1986). Experimentos de relaxação de quadrupolo por ressonância magnética nuclear sugerem que Na^+ pode competir com Ca^+ para o mesmo sítio de ligação em eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* (Chiancone, E. *et al.*, 1976).

Weber e Olsen (1984), utilizando eritrocruorina de *Arenicola marina*, consideraram o baixo ponto isoelétrico dessas hemeproteínas e a grande dimensão das mesmas. Ocorreria, assim, uma competição de prótons e outros cátions pelas cargas negativas da proteína, formando uma dupla camada elétrica, como ocorre em partícula coloidal. O pH de superfície, uniforme, poderia nesse modelo alterar a associação dos cátions com a molécula. Esses autores fizeram medidas do deslocamento de prótons por cátions e estimativas do pH de superfície da molécula utilizando a teoria clássica de Gouy-Chapman. Foi excluída a associação a sítios específicos, pois os cátions Na^+ e colina, a despeito da grande diferença de tamanho entre si, apresentam o mesmo efeito sobre a eritrocruorina utilizada por esses autores. Assim a afinidade da eritrocruorina por oxigênio seria dependente do pH de superfície, e os diferentes cátions levariam a mudanças no mesmo, alterando a afinidade por O_2 via efeito Bohr. Fushitani *et al.* (1986), entretanto, discordam desse ponto de vista, mencionando dados sobre a seqüência e composição de aminoácidos que indicam que a carga líquida negativa resulta de uma pequena diferença entre um grande número de grupos negativa e positivamente carregados, nas quais se distribuem de maneira bastante heterogênea. Isso sugere que qualquer efeito eletrostático na distribuição de íons deve ser extremamente local. Dados nesse trabalho indicam que efeitos de cátions bivalentes (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+} e Mg^{2+}) dependem, ao menos em parte, do raio iônico, ocorrendo o mesmo para monovalentes (Li^+, Na^+ e K^+), em contraste com o efeito semelhante entre Na^+ e colina. Em parte pode haver um componente de especificidade (Fushitani, K. *et al.*, 1986).

Através de espalhamento de raios X a baixo ângulo obtivemos dois parâmetros estruturais: raio de giro e dimensão máxima da molécula em solução. A Tabela 3 mostra os resultados encontrados por essa técnica para eritrocruorinas de diferentes espécies, comparando com *Glossoscolex paulistus*.

Observam-se valores próximos aos das outras eritrocruorinas estudadas, porém a incerteza é relativamente alta. Obtivemos o raio de giro de (11,4 ± 0,9) nm por regressão linear das curvas do gráfico de Guinier (Figura 18), considerando

Tabela 3: Parâmetros estruturais de eritrocruorinas de anelídeos utilizando espalhamento de raios X a baixo ângulo

Espécie	Raio de giro (nm)	D_{max} (nm)	Vol. (nm^3)	Referência
L. terrestris	11,2±0,1	29±1	7700±300	Pilz, I. *et al.*, 1980
N. incisa	10,62±0,15	28±1	6500±300	Messerschmidt, U. *et al.*, 1983
A. marina	11,3±0,1	29±1	7400±300	Weber, R. E. & Olsen, L. F., 1984
T. tubifex	10,7	30		Terwilliger, R. *et al.*, 1985
G. paulistus	11,4±0,9	27		Esse trabalho

as curvas com o mesmo desvio da curva na qual este é maior, obtendo-se uma superestimativa do erro. Podemos atribuir esses resultados à considerável oscilação na curva de espalhamento. Esses resultados preliminares foram apresentados no Congresso Mundial de Cristalografia realizado em 1987 (Souza, C. F. de *et al.*, 1987). Esperamos obter melhores resultados intervindo tanto na espessura da amostra quanto no sistema de detecção (por exemplo utilizando um detector de posição, que faz contagem de raios X em todos ângulos ao mesmo tempo). Isso possibilitará comparação mais direta não apenas com eritrocruorinas de outras espécies, como diferentes estados da eritrocruorina da espécie em estudo.

O coeficiente de sedimentação da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*, segundo nossos resultados, é 58 S. Esse valor se encontra dentro do intervalo encontrado para as diversas eritrocruorinas. O aumento do coeficiente de sedimentação em soluções mais concentradas sugere uma tendência de associação entre as moléculas de eritrocruorina, provavelmente um equilíbrio dinâmico, no meio utilizado (Ficoll 8%, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, EDTA 10^{-3} M, temperatura de 4° C).

Por outro lado, não observamos a forma dissociada 1/12 da eritrocruorina, pois verificou-se a presença no tubo de centrífuga de apenas uma banda em cada experimento, correspondente ao coeficiente de sedimentação para a respectiva concentração inicial da hemeproteína, sempre acima de 58 S.

A partir do coeficiente de sedimentação é possível estimar o peso molecular utilizando a seguinte relação (Martin, R. G. & Ames, B. N., 1960):

$$\frac{S_1}{S_2} = \left[\frac{PM_1}{PM_2}\right]^{2/3} \qquad (24)$$

para o caso de duas proteínas globulares com o mesmo volume parcial específico. Utilizando-se dados de coeficiente de sedimentação e peso molecular das diversas eritrocruorinas já estudadas e assumindo que a variação do volume parcial específico seja desprezível, podemos construir um gráfico colocando o peso molecular em função de $S_{20,w}$.

Na Figura 21 colocamos os diversos valores encontrados na literatura (Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979; Chiancone, E. *et al.*, 1981), assim como a regressão linear, e obtivemos uma alta correlação ($p < 0,01$). O peso molecular correspondente a 58 S é 3,23 x 10^6 Da. O monômero (ou subunidade principal, 1/12) tem o peso molecular de 269 kDa.

O peso molecular mínimo encontrado no presente trabalho (25250 Da) é alto comparativamente às hemoglobinas tetraméricas, a exemplo de eritrocruorinas de outras espécies, muito provavelmente devido à presença de subunidades que não contêm heme, chamadas de subunidades estruturais. A Figura 22 mostra a distribuição de peso molecular mínimo entre eritrocruorinas de diversas espécies estudadas (Stockel, P. *et al.*, 1973; Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D., 1979; Frossard, P., 1982a; Mezzasalma, V. *et al.*, 1985). A presença desse tipo de subunidade explica os altos valores quase que invariavelmente encontrados e sugere participação efetiva na estabilização do estado nativo dessas hemeproteínas gigantes. Nossos resultados quanto ao coeficiente de sedimentação e peso molecular mínimo foram recentemente publicados (Costa, M. C. P. *et al.*, 1987).

O número de hemes por molécula é próximo de 3,23 x 10^6 dividido por 25250, ou 136 hemes, entre 10 e 11 por monômero.

Com os resultados de eletroforese em SDS PAGE (Meirelles, N. C. *et al.*, 1985) citados na introdução, página 8, é inviável propor um modelo para o arranjo estrutural do monômero, pois faltam informações a respeito das porcentagens das diversas subunidades fracionadas no método. Além disso a resolução obtida não discrimina o peso molecular de algumas subunidades. Pode-se especular, no entanto, que parece mais provável a presença de 12 hemes por monômero, pois isso imediatamente sugere que estão dispostos em três tetrâmeros, a exemplo do modelo proposto para *Eisenia fetida* (Frossard, P., 1982a), descrito na introdução, página 7.

Provavelmente pelo menos a maior parte das subunidades que carreiam o heme (subunidades funcionais) deve ter peso molecular entre 12 e 16 kDa, de acordo com a eletroforese da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* tratada com agente redutor. Admitindo um peso molecular médio de 14 kDa para a subunidade funcional, três tetrâmeros corresponderiam a 168 kDa do total de 269 KDa do monômero. Os 101 kDa restantes seriam, então, devidos às subunidades estrutu-

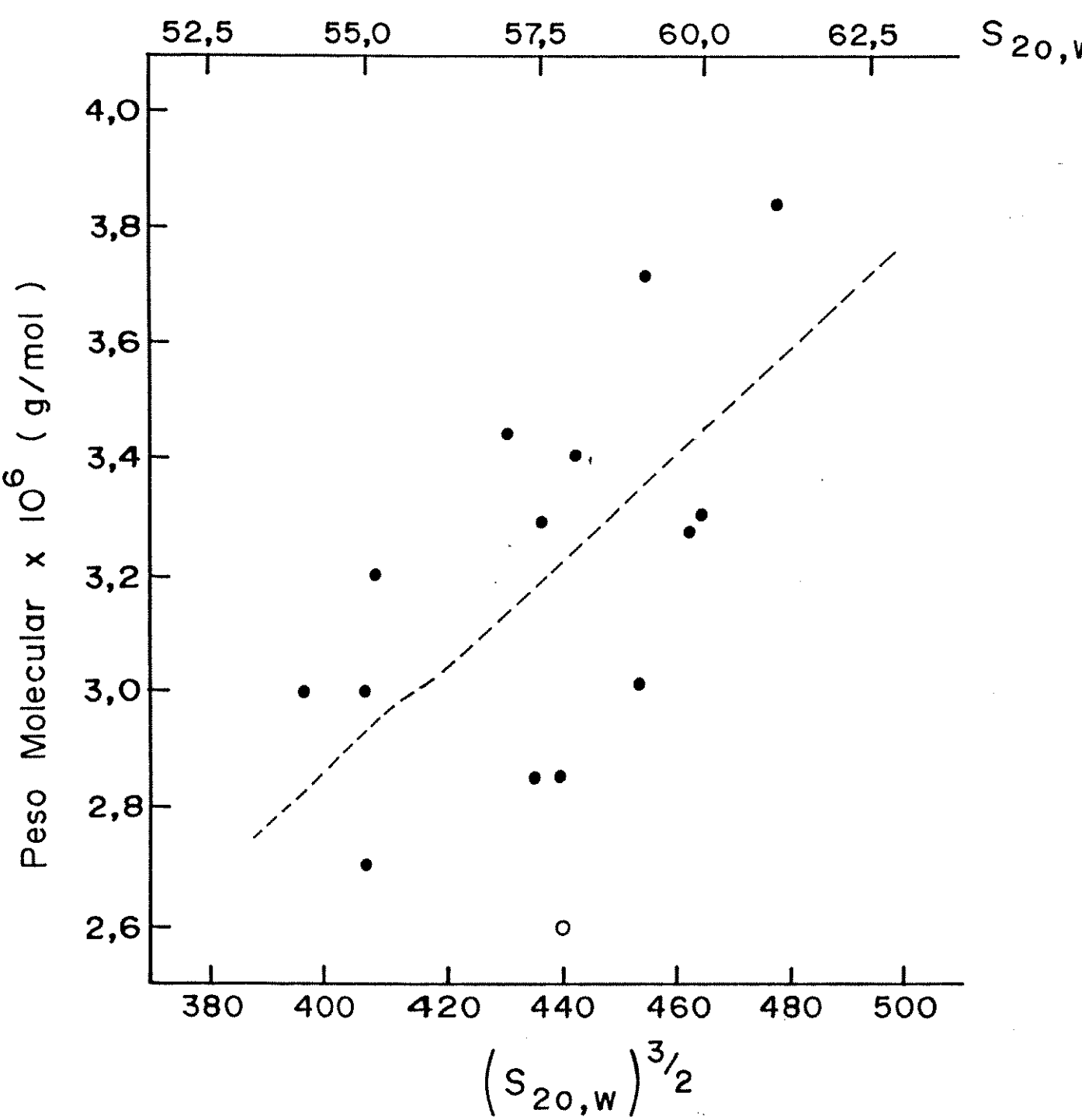


Figura 21: Peso molecular e coeficiente de sedimentação de eritrocruorinas de diversas espécies

Peso molecular de eritrocruorinas de diversas espécies em função de $(S_{20,w})^{3/2}$. Obteve-se por regressão linear PM = 8908 x $(S_{20,w})^{3/2}$ - 701640 ($p < 0,01$). O peso molecular para a espécie *Glossoscolex paulistus* ($S_{20,w} = 58$) corresponde nessa relação a 3,23 x 10^6 Da. O círculo aberto se refere a uma das espécies, e não foi considerado devido ao alto desvio em relação à curva.

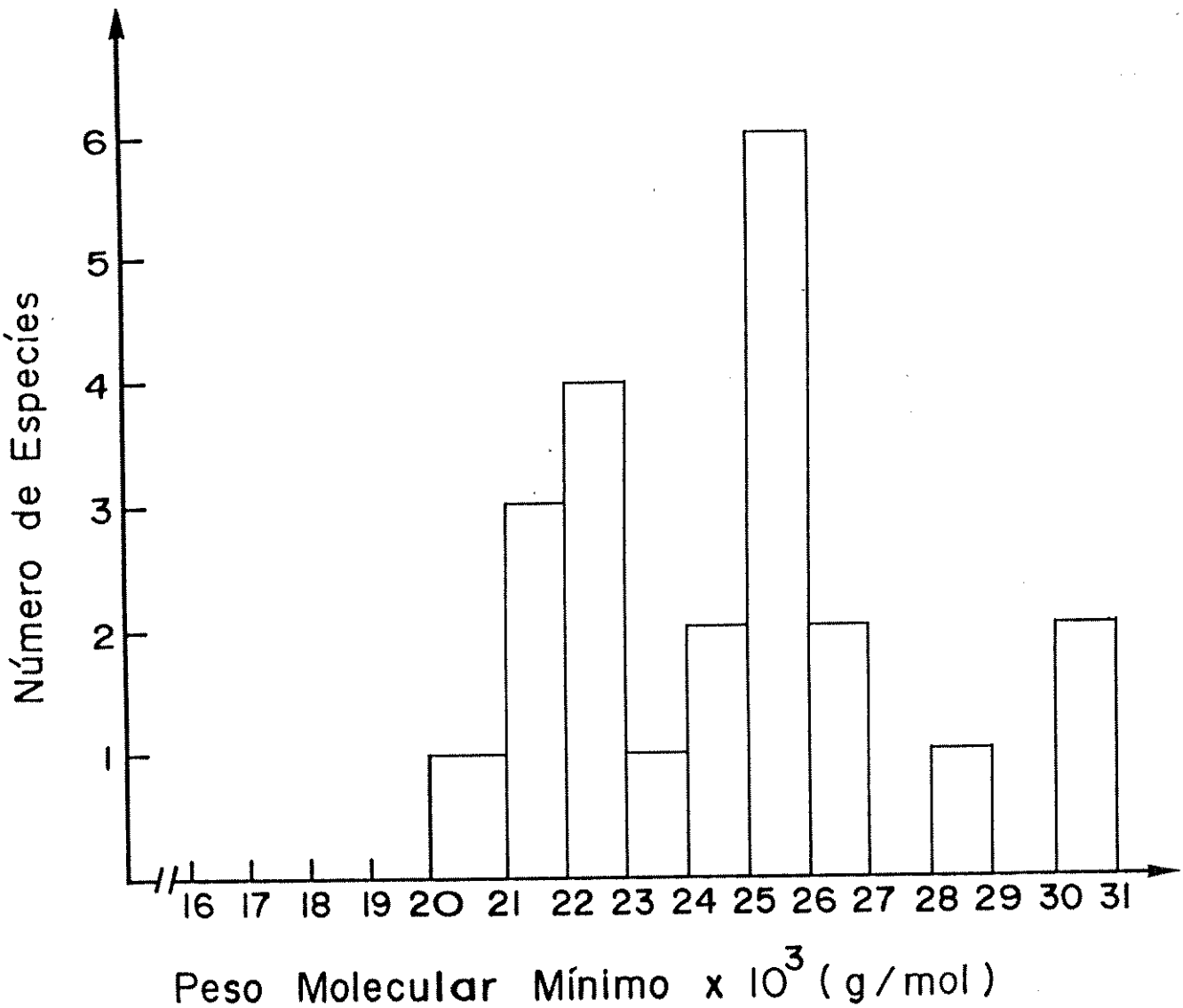


Figura 22: Peso molecular mínimo de eritrocruorinas de diversas espécies

Distribuição de valores de peso molecular mínimo (em relação ao heme ou ao ferro) de eritrocruorinas de diversas espécies (referências no texto). Incluiu-se a espécie *Glossoscolex paulistus*, 25250 Da/heme. As hemoglobinas tetraméricas e mioglobinas têm peso molecular mínimo perto de 16000 Da.

rais, talvez as frações 28 kDa, 33 kDa e 50 kDa. Caso essas hipóteses correspondam a realidade, teríamos talvez essas 3 subunidades estruturais por monômero, que totalizam 111 kDa. Contudo convém salientar que podem ocorrer outros arranjos de subunidades funcionais no monômero, como por exemplo dois trímeros e um tetrâmero, ou três trímeros (a presença de trímero com subunidades que carreiam o heme pode ocorrer em *Lumbricus terrestris* (Mainwaring, M. G. *et al.*, 1986). De qualquer forma, a média do peso molecular das subunidades funcionais não deve ser muito diferente de 14 kDa. A Figura 23 mostra uma sugestão para o arranjo em subunidades para o monômero de eritrocruorina de acordo com os dados disponíveis, ainda que sejam relativamente escassos.

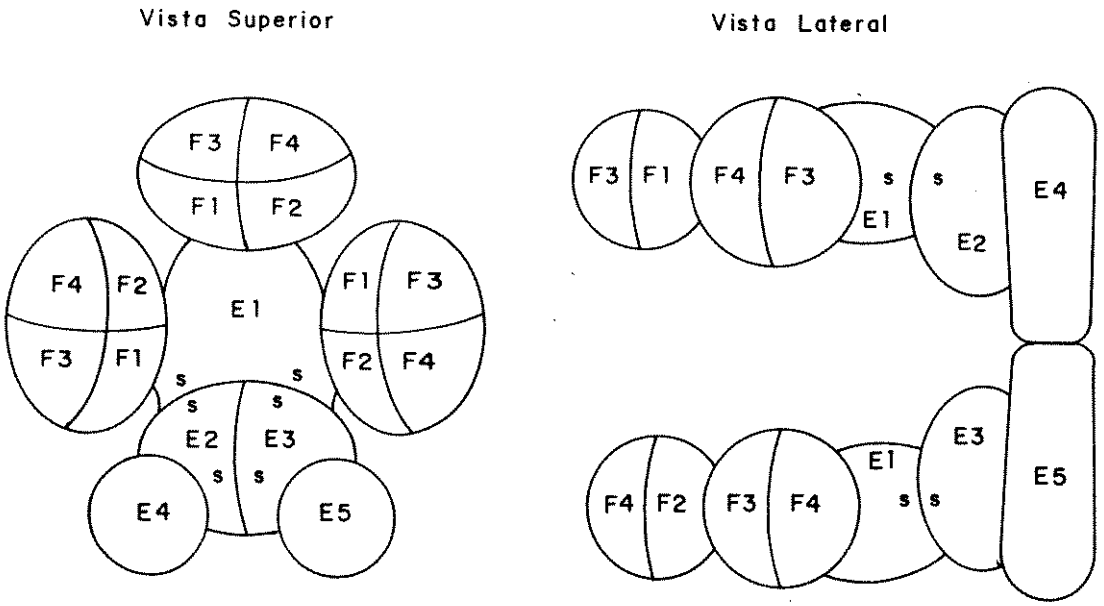


Figura 23: Modelo preliminar para eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*
Sugestão para um possível arranjo de cadeias para o monômero (1/12) de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*. F: subunidades funcionais. E: subunidades estruturais. F1, F2, F3 e F4 têm em média 14 kDa. Trímero E1-E2-E3: cerca de 48-52 kDa (E1: 28 kDa, E2: 12 kDa, E3: 12 kDa), E4: 28 kDa e E5: 33 kDa. Na vista lateral podem ser observados duas subunidades 1/12 dos hexâmeros opostos da molécula.

BIBLIOGRAFIA

Abe, A. S. & Meirelles, N. C. (1985) Oxygen binding properties of erythrocruorin solution and blood pH of the giant earthworm *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **80A**, 53-55.

Antonini, E. & Brunori, M. (1971) In *Haemoglobin and Myoglobin in their Reaction with Ligands*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London. .

Ascoli, F., Chiancone, E. & Antonini, E. (1976) Studies on erythrocruorin VI. Circular dichroism of earthworm erythrocruorin. *J. Mol. Biol.* **105**, 343-351.

Bannister, J. V., Bannister, W. H., Anastasi, A. & Wood, E. J. (1976) Isolation, characterization and oxygen equilibrium of an extracellular haemoglobin from *Eunice aphroditois* (Pallas). *Biochem. J.* **159**, 35-42.

Bishop, B. S. (1966) Digital computation of sedimentation coefficients in zonal centrifuges. *Nat. Cancer Institute Monograph* **21**, 175-188.

Bonaventura, J. & Bonaventura, C. (1981) Preparation of high molecular weight invertebrate hemoglobins. *Methods Enzymol.* **76** [3], 43-54.

Chiancone, E., Bull, T. E., Norne, J. E., Forsen, S. & Antonini, E. (1976) Studies on erythrocruorin. V. Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation study of sodium, calcium and chloride binding. *J. Mol. Biol.* **107**, 25-34.

Chiancone, E., Ferruzzi, G., Bonaventura, C. & Bonaventura, J. (1981) *Amphitrite ornata* erythrocruorin II. Molecular controls of function. *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 84-92.

Chung, M. C. M. & Ellerton, H. D. (1979) The physico-chemical and functional properties of extracellular respiratory haemoglobins and chlorocruorins. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **35**, 53-102.

Conrad, H., Mayer, A. , Thomas, H. P & Vogel, H. (1969) X-ray small-angle scattering from aqueous of oxy and deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **41**, 255-229.

Costa, M. C. P. , Bonafé, C. F. S. , Meirelles, N. C. & Galembeck, F. (1988) Sedi-

mentation coefficient and minimum molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Brasilian J. Med. Biol. Res.* **21:01**, 115-118.

Everaarts, J. M. & Weber, R. E. (1974) Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* **48A**, 507-520.

Frossard, P. (1982) The erythrocruorin of *Eisenia fetida* I. Properties and subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta* **704**, 524-534.

Frossard, P. (1982) The erythrocruorin of *Eisenia fetida* II. Properties of the principal subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **704**, 535-541.

Fushitani, K., Imai, K. & Riggs, A. F. (1986) Oxygenation properties of hemoglobin from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Effects of pH, salts, and temperature. *J. Biol. Chem.* **261**, 8414-8423.

Giardina, B. & Amiconi, G. (1981) Measurement of binding of gaseous and non-gaseous ligands to hemoglobins by conventional spectrophotometric procedures. *Methods Enzymol.* **76** [23], 417-427.

Glatter, O. & Kratky, O. (1982) In *Small Angle X-Ray Scattering* Academic Press Inc. London. Ltd.

Hsu, H. W. (1975) Transport phenomena in zonal centrifuge rotors: X. Optimal gradient solution for velocity sedimentation. *Math. Biosci.* **23**, 179-189.

Imai, K. & Yonetani, T. (1975) pH dependence of the Adair constants of human hemoglobin. Nonuniform contribution of successive oxygen bindings to the alkaline Bohr effect. *J. Biol. Chem.* **250**, 2227-2231.

Imaizumi, K., Imai, K. & Tyuma, I. (1979) The linkage between the four-step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin. *J. Biochem.* (Tokyo) **86**, 1829-1840.

Kapp, O. H. & Crewe, A. V. (1984) Comparison of the molecular size and shape of the extracellular hemoglobins of *Tubifex tubifex*. *Biochim. Biophys. Acta* **789**, 294-301.

Kratky, O. (1983) In *The World of Neglected Dimensions, Small-Angle Scattering of X-Rays and Neutrons of Biological Macromoleculas.* pp.1-23,translation of *Nova Acta Leopoldina* **55**, 256, published by Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, DDR-4010 Halle.

Mainwaring, M. G., Lugo, S. D., Fingal, R. A., Kapp, O. H. & Vinogradov, S. N. (1986) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris* at acid pH and its reassociation at neutral pH. A new model of its quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **261**, 10899-10908.

Mangun, C. P., Lykkeboe, G. & Johansen, K. (1975) Oxygen uptake and the role of hemoglobin in the East African swampworm *Alma emini.* *Comp. Biochem. Physiol.* **52A**, 477-482.

Martin, R. G. & Ames, B. N. (1960) A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: aplication to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**, 1372-1379.

Meirelles, N. C. (1975) Estudos sobre hemoglobinas de *Pipa carvalhoi.* Tese de doutoramento. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

Meirelles, N. C., Oliveira, B., Oliveira, A. R., Paula, E., Marangoni, S. & Rennebeck, G. M. (1987) Erythrocruorin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae):dissociation at alkaline pH and its ligand properties as reveales by chemical, imunochemical and electron microscopy studies. *Comp. Biochem. Physiol.* **88A(2)**, 377-379.

Meirelles, N. C., Oliveira, B., Paula, E., Marangoni, S. & Marques, M. R. F. (1985) Erythrocruorin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae): presence of disulfide bonds and their relation to ligand properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 203-205.

Messerschmidt, U., Wilhelm, P., Pilz, I., Kapp, O. H. & Vinogradov, S. N. (1983) The molecular size and shape of the extracellular hemoglobin of *Nephtys incisa* *Biochim. Biophys. Acta* **744**, 366-373.

Mezzasalma, V., Di Stefano, L., Piazzese, S., Zagra, M., Salvato, B., Tognon, G. &

Ghiretti-Magaldi, A. (1985) Physicochemical and structural properties of the extracellular haemoglobin of *Ophelia bicornis*. *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 135-143.

Nunes, S. P. & Galembeck, F. (1985) Percoll and Ficoll self-generated density gradients by low-speed osmocentrifugation. *Anal. Biochem.* **146**, 48-51.

Pilz, I., Glatter, O. & Kratky, O. (1979) *Methods Enzymol.* **61** [11], 148-249.

Pilz, I., Schwarz, E. & Vinogradov, S. N. (1980) Small-angle X-ray studies of *Lumbricus terrestris* haemoglobin. *Int. J. Macromol.* **2**, 279-283.

Polidori, G., Mainwaring, M., Kosinski, T., Schwarz, C., Fingal, R. & Vinogradov, S. N. (1984) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Tubifex tubifex* at extremes of pH and its reassociation upon return to neutrality. *Archs. Biochem. Biophys.* **233**, 800-814.

Pretlow, T.G., Boone, C. W., Shrager, R. I. & Weiss, G. H. (1969) Rate zonal centrifugation in a Ficoll gradient. *Anal. Biochem.* **29**, 230-237.

Price, C. A. (1982) In *Centrifugation in density gradients*. Academic Press, Inc. (London) LTD.

Terwilliger, R., Terwilliger, N., Bonaventura, C., Bonaventura, J. & Schabtach, E. (1985) Structural and funcional properties of hemoglobin from the vestimentiferan Pogonophora, *Lamellibrachia*. *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 27-33.

Souza, C. F. de, Torriani, I. L., Bonafé, C. F. S. & Meirelles, N. C. (1987) Small angle X-ray scattering from annelid hemoglobin in solution. *Acta Crystallographica* (suppl.) **A 43**, C-27.

Stockel, P., Mayer, A. & Keller, R. (1973) X-ray small-angle-scattering investigation of a giant respiratory protein: hemoglobin *Tubifex tubifex*. *Eur. J. Biochem.* **37**, 193-200.

Van Bruggen, E. F. J. & Weber, R. E. (1974) Erythrocruorin with anomalous quaternary structure from the polychaete *Oenone fulgida*. *Biochim. Biophys. Acta* **359**, 210-214.

Vinogradov, S. N. (1985) The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 1-15.

Weber, R. E. (1980) Funtions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. *Amer. Zool.* **20**, 79-101.

Weber, R. E. (1981) Cationic control of O_2 affinity in lugworm erythrocruorin. *Nature* **292**, 386-387.

Weber, R. E. & Baldwin, J. (1985) Blood and erythrocruorin of the giant earthworm *Megascolides australis* : respiratory characteristics and evidence for CO_2 facilitation O_2 binding. *Mol. Physiol.* **7**, 93-105.

Weber, R. E. & Olsen, L. F. (1984) Does macromolecular surface pH explain the cation dependence of erythrocruorin oxygen affinity? *Mol. Physiol.* **6**, 1-8.

Wilhelm, P., Pilz, I. & Vinogradov, S. N. (1980) Comparison of *Arenicola marina* and *Lumbricus terrestris* haemoglobins by small-angle X-ray scattering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 383-384.

Wood, E. J., Mosby, L. J. & Robinson, M. S. (1976) Characterization of the extracellular haemoglobin of *Haemopsis sanguisuga* (L.). *Biochem. J.* **153**, 589-596.

APÊNDICE

Programa utilizado para cálculo do coeficiente de sedimentação da eritrocruorina (página 23). Utilizou-se a linguagem BASIC.

```
10 INPUT " digite o numero do experimento",EXPERIMENTO
20 INPUT " digite o valor de y",Y
30 DIM R(Y),V(Y);D(Y);S(Y);DIAM(Y)"
40 FOR I=1 TO Y
50 INPUT " digite a altura do meio",R(I)
60 INPUT " digite a viscosidade do meio",V(I)
70 INPUT " digite a densidade do meio"D(I)
80 NEXT I
90 INPUT " digite a densidade da particula",DP
100 INPUT " digite a densidade da agua"DA
110 INPUT " digite a velocidade da centrifuga",W
120 INPUT " digite a viscosidade da agua"VA
130 INPUT " digite o valor de R0",R(0)
140 INPUT " digite o valor do tempo",T
150 FOR I=0 TO Y
160 SOMA=0
170 FOR N=1 TO I
180 M=N-1
190 SOMA=SOMA+(V(N)*(R(N)-R(M)))/((DP-D(N))*((R(N)+R(M))))
200 NEXT N
210 A=((2*(DP-DA))/(W^2*T*VA))*SOMA
220 S(I)=A*13^10
230 B=SQR((A*18*V(I))/(DP-D(I)))
240 DIAM(I)=B*10^4
250 NEXT I
260 OPEN " O",# 1,"EXP13
270 PRINT # 1,EXPERIMENTO
280 PRINT # 1,DP,DA,W
290 PRINT # 1,R(0),VA
300 FOR I=1 TO Y
310 PRINT # 1,R(I),V(I),D(I),T,S(I),DIAM(I)
320 NEXT I
330 PRINT "EXPERIMENTO=";EXPERIMENTO
340 PRINT " dp=";DP, " da=";DA, " w=";w
350 PRINT " R(0)=";R(0), " VA=";VA
```

```
360 FOR I=1 TO Y
370 PRINT " R(I)=";R(I), " V(I)=" V(I), " D(I)=";D(I), " t=";T, " S(I)=";S(I),
" DIAM(I)=";DIAM(I)
380 NEXT I
390 END
```