

*Este trabalho corresponde
a rubrica para a
defusão por internet*



MARIZA BOSCACCI MARQUES

*e aprova para com o seguinte
mar*

07/02/92

HEMOGLOBINA GIGANTE DE *Glossoscolex paulistus*
(*Oligochaeta*, *Glossoscolecidae*): EFEITO DE CÁTIONS
DIVALENTES E AGENTES DESNATURANTES

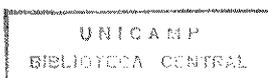
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilce Correa Meirelles†

Tese apresentada à Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Bioquímica.

Universidade Estadual de Campinas

Campinas-SP, Brasil

1992



atc/mc-BC

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Coleta do Material Biológico	17
2.2 Procedimento para Purificação da Amostra	
2.2.1 Por Precipitação Fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	18
2.2.2 Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de cromatografia em Sephadex G-200	19
2.2.3 Ultracentrifugação	19
2.3 Cromatografia da Ec em Condições Dissociantes	20
2.4 Eletroforese em PAGE-SDS	20
2.5 Determinação da Concentração da Ec pelo Método Piridina-Hemecromogênio	21
2.6 Imunodifusão	23
2.7 Preparação da Apoproteína	24
2.8 Reconstituição da Holoproteína	25
2.9 Determinação das Curvas de Equilíbrio de Oxigenação da Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i>	26
2.9.1 Determinação da Constante Tonométrica	27
2.9.2 Gráfico de Hill	29
2.9.3 Efeito Bohr	32

2.9.4	Efeito dos Cátions Divalentes Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} ...	34
2.9.5	Efeito do Período de Incubação com Ca^{++} , Mg^{++} Mn^{++}	34
2.10	Transição Ácido-Alcalina	35
2.11	Desnaturação Térmica	36
2.12	Desnaturação por Uréia	37
2.13	Desnaturação Alcalina	37
3.	RESULTADOS	
3.1	Cromatografia em pH 7,0	38
3.2	Fracionamento da Ec Dissociada em Sephadex G-200	38
3.3	Eletroforese em PAGE-SDS	39
3.4	Imunodifusão Comparada	40
3.5	Reconstituição da Holoproteína	47
3.6	Efeitos dos cátions Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} sobre os fenômenos de afinidade por O_2 e cooperatividade	50
3.7	Efeito do Período de incubação com Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++}	55
3.8	Efeito Bohr	60
3.9	Curva de Transição Ácido-Alcalina	62
3.10	Desnaturação Térmica	62
3.11	Desnaturação por Uréia	67
3.12	Desnaturação Alcalina	70
4.	DISCUSSÃO	72
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMO

A hemoglobina gigante, extracelular de *Glossoscolex paulistus* apresenta uma massa molecular de 3×10^6 . Da que se estrutura como dois discos hexagonais superpostos visualizados por microscopia eletrônica. No presente trabalho, comparamos dois métodos de purificação desta proteína, por ultracentrifugação e por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, optando-se pelo primeiro para a execução dos experimentos. A apoproteína foi obtida e reconstituída na presença de hemina, observando-se estequiometria nesta ligação. Também estudamos o efeito dos íons divalentes Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} sobre a afinidade da proteína pelo oxigênio tendo-se observado aumento de P_{50} - pressão parcial de O_2 para saturar 50 % dos sítios de ligação, dependente da concentração dos cátions e mudança na cooperatividade. Em presença de agentes desnaturantes (temperatura, álcalis e uréia) foram obtidos parâmetros cinéticos como K_d e $t_{1/2}$. Os experimentos de transição ácido-alcalina demonstraram a multiplicidade de populações da proteína na forma férrica.

ABSTRACT

The giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* has a molecular weight of 3×10^6 Da. Visualized by electron microscopy, the *Glossoscolex paulistus* hemoglobin presents two hexagonal superimposed disks.

In the present study, we compared two different methods of purification for this protein: ultracentrifugation and ammonium sulfate precipitation. Using the purified protein obtained by ultracentrifugation, functional and physico-chemical properties were studied. The apoprotein was obtained and reconstituted in the presence of hemin and a stoichiometric relation was observed for this reaction. We also studied the effects of divalent ions such as Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} on the protein-oxygen affinity. An increase in P_{50} and also changes in cooperativity were observed in dependence of the cations concentration.

Kinetic parameters as K_d and $t_{1/2}$ were obtained in the presence of denaturing agents (temperature, alcali and urea). The experiments of the acid-alcali transition showed the multiplicity of the protein-population in its ferric form.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Tonômetro utilizado para medidas de equilíbrio de oxigenação da Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i>	28
Figura 2-	Cromatografia em Sephadex G-200, pH 7,0.....	41
Figura 3-	Curva de Calibração para cromatografia em Sephadex G-200, pH 9,0.....	42
Figura 4-	Cromatografia em Sephadex G-200, pH 9,0.....	43
Figura 5-	Eletroforese em PAGE-SDS.....	44
Figura 6-	Imunodifusão em gel de ágar 1% da purificação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45
Figura 7-	Imunodifusão em gel de ágar 1% das purificações por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografada e ultracentrifugação.....	46
Figura 8-	Curva de Titulação da Globina de <i>Glossoscolex paulistus</i> com Hemina.....	49
Figura 9-	Gráfico de Hill em presença de Ca^{++}	52
Figura 10-	Gráfico de Hill em presença de Mg^{++}	53
Figura 11-	Gráfico de Hill em presença de Mn^{++}	54
Figura 12-	Espectro da Ec controle.....	56

Figura 13- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Ca^{++}	57
Figura 14- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Mg^{++}	58
Figura 15- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Mn^{++}	59
Figura 16- Efeito Bohr da Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i> e n_{50} em função do pH.....	61
Figura 17- Família de Curvas Espectrais da Ec férica em função do pH.....	64
Figura 18- Gráfico $\text{Log } A_{f \ 576 \text{ nm}}$ x Temperatura.....	65
Figura 19- Gráfico de $t_{1/2}$ x Temperatura.....	66
Figura 20- Espectro de Absorção ótica da Ec em uréia.....	68
Figura 21- Decaimento de $A_{574 \text{ nm}}$ da Ec em presença de uréia.....	69
Figura 22- Log % de proteína nativa x tempo por desnaturação alcalina.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados para o cálculo de P_{50} e Gráfico de Hill da Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i>	31
Tabela 2- Titulação da globina de Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i> com hemina.....	48
Tabela 3- Valores de P_{50} e n_{50} da Ec de <i>Glossoscolex paulistus</i> em presença de Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++}	51
Tabela 4- Dados do Efeito Bohr e n_{50} em função do pH.....	60
Tabela 5- Valores de K_d e $t_{1/2}$ em função da Temperatura.....	63
Tabela 6- Valores de K_d e $t_{1/2}$ em presença de uréia.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Ec	eritrocruorina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
TRIS	tris (hidroximetil)-aminometamo
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	dodecil sulfato de sódio
DTT	ditiotreitól

LISTA DE EQUIPAMENTOS

Centrífuga FANEM modelo 212
Centrífuga Refrigerada Beckman J2-21
Ultracentrífuga Beckman L8-80 M
Espectrofotômetro Beckman DU-70
Espectrofotômetro Shimadzu
Espectrofotômetro SIM.Aminco DW-2.000
Balança Metler AT-261 Delta Range
PHmetro TOA HM-7A

1. INTRODUÇÃO

O filo Annelida é encontrado em habitats bastante diferenciados no tocante à disponibilidade de gases que participam do processo respiratório, evidenciando uma gama de adaptações respiratórias nas diversas espécies.

São múltiplos os mecanismos de respiração encontrados nos anelídeos, porém é surpreendente a diversificação de pigmentos respiratórios que eles apresentam. Diferentemente dos vertebrados, estes invertebrados podem apresentar hemoglobinas intracelulares - geralmente celômicas e de baixo P.M., hemoglobinas extracelulares ou eritrocruorinas - geralmente intravasculares e de alto P.M., clorocruorinas, hemoglobinas tissulares, hemeritrinas e hemeritrinas tissulares.

As eritrocruorinas apresentam o mesmo grupo prostético das hemoglobinas de vertebrados, ou seja, um átomo de Fe ligado por coordenação a átomos de N de quatro anéis pirrólicos, constituindo o grupamento protoporfirina IX (Patel & Spencer, 1963). O peso molecular das eritrocruorinas e clorocruorinas varia de 2,7 a 3,8 x

10^6 , os valores de ponto isoeletrico são geralmente ácidos (Messerschmidt et al., 1983); os coeficientes de sedimentação $S_{20,w}$ se aproximam de 60 e o conteúdo de alguns aminoácidos é similar - alto teor de Arginina e baixo de Lisina, por exemplo.

A sua complexidade estrutural tem despertado interesse, desde que dados de microscopia eletrônica mostraram a superposição de dois anéis hexagonais (Waxman, 1965), com ± 25 nm de distância entre os discos, 16 nm de altura cada e um diâmetro interno de 8 nm, como determinado por medidas de espalhamento de RX a baixo ângulo para *Tubifex tubifex* (Stockel et al., 1963). A porção central do hexágono geralmente é vazia, mas uma subunidade adicional é observada para eritrocruorina de *Oenone fulgida* e *Nephtys bombergi* (Vinogradov et al., 1980), *Nephtys incisa* e *Ophelia bicornis* (Mezzasalma et al, 1985).

O esclarecimento da estrutura destes pigmentos depende da determinação, absolutamente correta, do número e tamanho das diversas subunidades. Várias eritrocruorinas e clorocruorinas submetidas a PAGE-SDS, mostraram uma ou duas bandas de 13-19 KDa e outras de peso molecular muito maior que correspondem a aproximadamente 12 vezes o peso molecular das bandas menores, que tendem a desaparecer quando a proteína é tratada com agentes redutores tais como β -mercaptoetanol ou DTT. Alguns dados bastante discrepantes sobre o número e peso das subunidades podem ser decorrentes de alguns fatores como: diferentemente da lise de

hemácias humanas que produz hemoglobina praticamente pura, a coleta de eritrocruorina vascular dos anelídeos não impede a contaminação da amostra com componentes do fluido celômico e proteases, exceto quando são utilizados agentes anti-proteolíticos.

Uma das vantagens plausíveis para a manutenção da estrutura polimerizada seria a sua retenção no sistema vascular, uma vez que moléculas menores permeariam a membrana capilar.

Mesmo mantendo uma certa padronização estrutural, as eritrocruorinas e clorocruorinas apresentam diferenças significativas como as determinadas por microscopia eletrônica e análise química: o $P.M.mfn(M_{protefna}/M_{Fe} \text{ como heme})$ varia de 17.000 a 50.000/mol, o número de sítios de ligação baseado no P.M. de cada subunidade pode variar de 60 para *Tubifex tubifex* (Scheler & Schneiderant, 1959) a 192 para *Lumbricus terrestris* (David & Daniel, 1974).

A oxigenação se dá de forma heterogênea, com pigmentos apresentando alta ou baixa afinidade por O_2 , ausência ou presença de efeito Bohr e o coeficiente de Hill (n_H) variando consideravelmente. Em extremos de saturação n_H tende à unidade; mesmo para valores altos de n_H , as interações heme-heme são menos intensas do que as presentes em hemoglobinas de mamíferos, evidenciando que tais valores representam a mesma intensidade de interações.

Os valores do efeito Bohr podem ser decorrentes de diferentes pressões seletivas exercidas nos anelídeos. Nas espécies aquáticas a insensibilidade ao pH favorece o transporte de O_2 , sem comprometer a captação de O_2 superficial devido ao baixo pH do meio (McCUTCHEON, 1936). As habitantes de tocas frágeis, com pouca ou nenhuma abertura à superfície, apresentam seus pigmentos transportadores intravasculares pouco sensíveis ao pH ou CO_2 , diferenciadamente do pronunciado efeito Bohr apresentado por *Arenicola marina*, moradora de tubulações bastante estáveis que permitem uma ventilação suficiente (Weber, 1962). O efeito Bohr mais pronunciado de algumas espécies marinhas em relação as suas correlatas de mesmo habitat, todavia, sugere uma diminuição da afinidade por O_2 nos períodos de hipóxia quando da maré baixa facilitando a liberação de O_2 aos tecidos (Weber, 1971).

Tomando como exemplo as eritrocruorinas de *Arenicola marina* e *Nephtys bombergii*, temos que *Arenicola* apresenta baixa P_{50} , alto n_H e acentuado efeito Bohr (Mangum, 1976); já o pigmento de *Nephtys borbergii* se caracteriza por baixa P_{50} , reduzida cooperatividade e pequeno efeito Bohr, facilmente explicado pela exposição a baixas tensões de oxigênio quando da queda de suas tocas ao emergir, também um baixo gradiente de difusão foi detectado na sua parede corpórea sugerindo que o pigmento não é funcional em maré baixa. Esta ausência de mecanismo regulatório da captação-liberação de oxigênio a nível molecular e orgânico resulta numa menor dependência da PO_2 tecidual do meio ambiente, se comparada a

Arenicola marina, conduzindo a uma maior resistência à anóxia (Weber, 1971). A relação ausência de mecanismo regulatório-tolerância à anóxia ainda não foi suficientemente esclarecida.

Uma indicação de quais forças mantêm as subunidades associadas é dada pela reatividade dos grupos SH presentes na proteína. Análises de aminoácidos de várias eritrocruorinas forneceram uma média de 5 a 8 grupos SH por subunidade contendo heme. Praticamente nenhuma, ou apenas uma é reativa na molécula associada mesmo em presença de 6 M de Hidroclorato de Guanidínio, entretanto, sob esta condição desnaturante todas tornam-se acessíveis após a redução da proteína (Weber, 1962; Mangum, 1976; Weber, 1971). Novamente, o comportamento de associação difere das hemoglobinas tetraméricas, as subunidades das eritrocruorinas e clorocruorinas podem formar homo ou heterodímeros ligados por pontes S-S.

A disposição estrutural pode variar muito em função do número de hemes e das diversas subunidades que podem se associar diferentemente. Os dados estruturais definidos para algumas eritrocruorinas permitem esta classificação, segundo a subunidade que contém grupo heme ou domínio: a) hemoglobinas que contém apenas um domínio de 16 ± 2 KDa; b) hemoglobinas com 2 domínios por subunidade; c) hemoglobinas poliméricas, que contém de 8 a 20 domínios funcionais por subunidade; d) hemo globinas cujas

subunidades apresentam agregados funcionais e estruturais, ou seja, monômeros, dímeros, trímeros e tetrameros que contêm heme ou não (Vinogradov, 1985).

As propriedades funcionais da *Lumbricus terrestris* têm sido estudadas detalhadamente e exemplificam o comportamento das eritrocruorinas com alta cooperatividade. A proteína purificada exibe uma alta cooperatividade na ligação de oxigênio, $n_H \cong 4$ em pH 7,8. Em valores de pH inferiores e superiores, não somente ocorre uma variação de P_{50} , mas n_H cai irreversivelmente a 2. A modificação da cooperatividade não é correlacionada com o estado de agregação, uma vez que pHs levemente ácidos não dissociam a proteína. Moléculas íntegras obtidas de misturas parcialmente dissociadas em pH alcalino apresentam um valor de $n_H \cong 2$, sendo funcionalmente indistinguíveis das subunidades dissociadas (Vinogradov, 1985). A molécula nativa parece possuir propriedades funcionais transientes que refletem um estado conformacional metaestável; a proteína nativa pode ser convertida em espécies estáveis com propriedades funcionais diferentes e reversíveis apenas pela variação do pH. A clorocruorina de *Spirographis* exibe o mesmo comportamento (Antonini et al., 1962), a eritrocruorina de *Arenicola* também apresenta cooperatividade dependente de pH, mas não existem dados disponíveis sobre a reversibilidade do processo (Weber, 1970). Dados de dicroísmo circular da eritrocruorina de *Lumbricus* indicam que este fenômeno provavelmente reflete alterações mínimas na posição de resíduos aromáticos que interagem com o heme na forma oxigenada (Ascoli et

al., 1976).

Outra característica das eritrocruorinas e clorocruorinas é o controle catiônico de P_{50} por Ca, Mg e outros, contrastando com o controle aniônico dos fosfatos inorgânicos sobre a hemoglobina de vertebrados. Nas polychaetas marinhas *Arenicola* (Weber, 1981; Everaarts & Weber, 1974), *Pista pacifica* (Terwilliger, 1974) e *Amphitrite ornata* (Chiancone et al., 1981) P_{50} é regulado por concentrações catiônicas bastante altas. Por outro lado, algumas oligochaetas terrestres como *Eisenia foetida* (Suzuki & Gotoh, 1986; Igarashi et al., 1986), *Octolasion complanatum* (Santucci et al., 1984) e *Lumbricus terrestris* que apresentam concentrações fisiológica catiônicas inferiores as das espécies marinhas, sofrem uma regulação bem mais fina.

As eritrocruorinas que apresentam baixo n_H muito possivelmente não se comportam de maneira tão complexa. Pode então o pH afetar a afinidade por oxigênio mas pouco influenciar a cooperatividade (David et al., 1971; Garlick & Terwilliger, 1975; Terwilliger, 1974). A hemoglobina de *Amphitrite ornata* na ausência de cátions divalentes se dissocia em subunidades de baixo peso molecular, mesmo em pH neutro, e o valor de n_H fica em torno de 1,5. Na presença de Ca^{++} e Mg^{++} a molécula se reassocia integralmente sob uma ampla faixa de pH, n_H aumenta a $\cong 3,5$ em pH fisiológico; por outro lado, a cooperatividade decresce em pH ácido ou alcalino de maneira reversível, porém da mesma forma que as eritrocruorinas que

apresentam alta cooperatividade.

Proteínas de diferentes espécies manifestam diferentemente a necessidade de íons divalentes para manter a associação de sua super estrutura. Assim, eritrocruorinas de *Lumbricus*, *Arenicola* e *Marphysa*, bem como as clorocruorinas de *Spirographis* e *Eudistylia* são estáveis em pH neutro, mesmo na ausência de cátions divalentes; o efeito estabilizante é aparente no deslocamento da dissociação para valores de pHs maiores.

O efeito de cloretos de cátions mono e divalentes na ligação de O_2 à eritrocruorina de *Lumbricus terrestris*, mostrou que os cátions e não o Cl^- controlam a afinidade por este ligante. Os cátions divalentes apresentam maior efeito sobre a diminuição de P_{50} do que os monovalentes na seguinte ordem decrescente: Mg^{++} , Sr^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , Na^+ , K^+ e Li^+ . Estes efeitos específicos dependem, em parte, do raio iônico e não podem ser explicados apenas pela força iônica. Os dados indicam que a ligação de Ca^{++} à forma oxí ocorre com a liberação de dois prótons, ao passo que a ligação de Na^+ libera apenas um próton. Tais dados indicam que o sítio de ligação de cátions da oxieritrocruorina contém dois grupos ácidos que só dissociam seus prótons quando estes são substituídos por cátions (Fushitani et al., 1986).

A eritrocruorina do anelídeo *Glossoscolex paulistus* é uma hemoproteína gigante de peso molecular em torno de 3×10^6 , com um

coeficiente de sedimentação de 58 S (Costa et al., 1988). É classificada como uma hemoglobina com múltiplas subunidades e um único domínio (Vinogradov, 1985).

Sua conformação estrutural também é composta pela superposição de dois discos hexagonais, com a presença de uma 13^a subunidade na cavidade central, com 24–26 nm de distância entre os lados paralelos, 16 nm de altura para os dois discos e 8 nm de diâmetro interno, como observado por microscopia eletrônica de transmissão em pH 7,4 (Rennebeck, 1990).

Os resultados obtidos de experimentos que promovem a dissociação por pressão hidrostática (Bonafé et al., 1989) desta eritrocruorina, concluíram que ela apresenta independência de concentração para este efeito, bem como a perda da habilidade de reorganização após dissociação completa.

Tratamento com SDS em pHs que variaram de 6,0 a 9,0, mostraram por fluorescência (Perussi et al., 1990) que o processo de desnaturação tende a ser dependente do pH do meio. O comportamento desigual frente à desnaturação poderia estar associado a processos de dissociação–associação e presença de formas conformacionais metaestáveis da proteína.

Este trabalho objetivou:

a) comparar dois métodos de purificação desta heme proteína -

precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ultracentrifugação;

b) determinar parâmetros físico-químicos tais como estabilidade da proteína frente a agentes desnaturantes como uréia, temperatura e álcalis;

c) detalhar o papel dos cátions divalentes Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} nas alterações das propriedades funcionais, bem como o efeito do período de incubação com estes cátions nas curvas de oxigenação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Biológico

Espécimes do anelídeo *Glossoscolex paulistus*, oriundos do município de Piracicaba-SP, foram anestesiados em atmosfera de éter sulfúrico por um período de 30 minutos. Através de uma incisão dorsal e ruptura das veias dorsal e ventral, a amostra foi coletada com o uso de pipeta Pasteur e solução de Alsiver como anticoagulante.

A solução contendo a amostra foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos sendo descartado o precipitado e, novamente centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos.

O sobrenadante resultante foi dialisado durante a noite contra tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1mM, sob suave agitação. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4° C.

Alsiver: ácido cítrico	0,055 g
cloreto de sódio	0,420 g
citrato de sódio	0,800 g
glicose	2,050 g
H ₂ O destilada	100 ml q.s.p.

2.2 Procedimentos para Purificação da Amostra

2.2.1 Por Precipitação Fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Como proposto por Bonaventura & Bonaventura (1981), o dialisado foi primeiramente submetido a uma lenta adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, suficiente para atingir 35-40% de saturação, em banho de gelo sob suave agitação. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos, precipitando as proteínas de baixo peso molecular e produtos de dissociação da eritrocruorina. O sobrenadante foi novamente submetido a uma adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, agora suficiente para atingir 60% de saturação e, centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos permitindo a precipitação desta hemoglobina de alto peso molecular. O sobrenadante límpido foi descartado.

O precipitado foi ressuspensão em um mínimo volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1mM e dialisado contra o mesmo tampão sob suave agitação e a 4°C, sendo a exclusão do sulfato de amônia monitorada qualitativamente por teste de alíquotas do dialisado em presença de BaCl_2 em meio ácido (HCl 2 M).

A eritrocruorina resultante desta purificação apresentou uma concentração de 82,4 mg de proteína/ml, determinada utilizando

$$\epsilon_{280\text{nm}}^{1\%} = 1,0 \text{ cm}^{-1}$$

2.2.2 Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de Cromatografia em Sephadex G-200

Uma alíquota de 2,0 ml da amostra purificada conforme procedimento anterior, foi submetida a uma cromatografia em Sephadex G-200 em uma coluna (0,90 x 100 cm) pré-equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1mM. O fluxo foi de 0,1 ml/min e o volume da coluna de 63,62 ml, 20°C, sendo de 1,0 ml as frações coletadas.

O perfil cromatográfico foi acompanhado em 280 e 415 nm.

2.2.3 Ultracentrifugação

Neste procedimento de purificação utilizado por Abe & Meirelles (1985), a amostra foi coletada da mesma forma, centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante novamente centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos. Os precipitados das duas centrifugações, constituídos de impurezas, foram descartados.

O sobrenadante foi dialisado durante a noite contra tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1 mM, sob agitação, sendo subsequenteiramente ultracentrifugado a 250.000 x g por 150 minutos. O sobrenadante, quando límpido, foi descartado e o precipitado ressuspenso no mesmo tampão foi centrifugado a 16.000 RPM, logo após o sobrenadante foi ultracentrifugado a 250.000 x g por 90 minutos.

Todos os procedimentos foram conduzidos a uma temperatura de 4°C.

O último precipitado foi ressuspenso numa pequena alíquota de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1 mM.

2.3 Cromatografia da Ec em Condições Dissociantes

1,0 ml da amostra de eritrocruorina resultante da cromatografia em pH 7,0 contendo 52,5 mg/ml e concentração 9,5 mM em heme foi dialisada durante a noite contra tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9,0, EDTA 1mM a 4°C, sendo então aplicada a uma coluna de Sephadex G-200 (0,90 x 100 cm) pré-equilibrada com o mesmo tampão, 19°C, com um fluxo de 0,1 ml/minuto.

Frações de 1,0 ml foram coletadas e a absorbância medida em 280 e 415 nm.

2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

A eletroforese da eritrocruorina nativa e tratada com β -mercaptoetanol 1 % foi feita segundo Laemmli (1970), usando sistema descontínuo dissociante de placa vertical (15 cm x 12 cm x 0,15 cm).

Ambas amostras contendo 15 μ g de proteína/ml em água

bidestilada, $\epsilon_{280 \text{ nm}}^{1\%} = 1$, foram fervidas a 100°C por três minutos em banho-maria, na presença de SDS 1 %.

O gel de resolução se constituiu de acrilamida 12 %, TRIS-HCl 0,375 M, pH 8,8 e SDS 0,1 %, sendo a polimerização obtida pela adição de persulfato de amônio 0,075 % e tetrametiletilenodiamina 0,06 %, ambas concentrações finais.

O gel de empacotamento foi de concentração 3,75 % de acrilamida contendo TRIS-HCl 0,125 m, pH 6,8 e SDS 0,1 %, sendo a polimerização induzida de maneira semelhante ao gel de resolução.

A corrida eletroforética foi realizada a 25°C, com uma diferença de potencial de 100 Volts até que o azul de bromofenol atingisse a base do gel (aproximadamente 4 horas).

O padrão de peso molecular utilizado foi LMW Calibration Kit (14.400–94.000)(Sigma Co.).

As amostras foram fixadas no gel com metanol 50 %, ácido acético 12 % e formaldeído 0,02 % por 12 horas a 4°C. Utilizou-se o método descrito por Blum et al. (1987) para coloração do gel de poli-acrilamida por impregnação por prata (método bastante mais sensível).

2.5 Determinação da Concentração de Ec pelo Método

Piridina-hemecromogênio

A determinação da concentração das amostras de

eritrocruorina foi feita segundo critério espectrofotométrico, pelo método da piridina-hemecromogênio de De Duve (1948).

Segundo este método, o heme presente na proteína é convertido num complexo piridina-hemecromogênio pela adição de uma solução de piridina em álcalis (100 ml de piridina, 30 ml de NaOH 1 M, H₂O bidestilada q.s.p. 300 ml) à amostra de eritrocruorina, numa proporção de 3 : 1. A hemeproteína foi diluída em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1 mM.

Uma primeira leitura espectrofotométrica é feita quando o complexo está na forma oxidada, e a segunda é feita logo após a adição de pequenos cristais de Na₂S₂O₄, cuja função é reduzir o ferro presente, sendo as absorvâncias lidas em 557 e 540 nm, respectivamente.

Este procedimento clássico igualmente permite a quantificação da concentração de uma amostra de eritrocruorina, bem como de qualquer outra hemeproteína, pela determinação do coeficiente de extinção nos comprimentos de onda adequados, que neste caso específico são:

$$-\epsilon_{415 \text{ nm}}^{\text{mM}} = 125.000 \text{ cm}^{-1}$$

$$-\epsilon_{576 \text{ nm}}^{\text{M}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$$

segundo Fushitani & Riggs (1986).

Este método também possibilita a identificação do tipo de grupamento heme presente na proteína, pelo cálculo da razão de $A_{557 \text{ nm}} / A_{525 \text{ nm}}$, valores máximo e mínimo de absorção ótica do complexo piridina-hemecromogênio reduzido. A nossa proteína possui o grupamento protoheme, o mesmo presente nas hemoglobinas de vertebrados e outras eritrocruorinas, determinado pelo valor da

razão anterior igual a 3,5. Dados comparativos são fornecidos pelo seguinte conjunto de dados:

Coeficientes de Extinção Milimolar e Absorção Máxima da Piridina-Hemecromogênio, reduzida, de vários hemes.

	Proto	Meso	Deutero	Cloro	Hemato
λ (nm)	557	547	544	584	551
ϵ (nm)	32,2	32,2	26,0	32,0	25,0
λ (nm)	525	518	515	540	520
ϵ (nm)	16,0	19,0	18,0	12,9	17,5

*ANTONINI & BRUNORI, pg 11 (1971).

2.6 Imunodifusão

A imunodifusão em ágar foi feita segundo Ouchterlony (1958).

1,0 g de ágar foi dissolvido em 100,0 ml de solução salina fisiológica (NaCl 0,15 M) em banho fervente por 20 minutos. O material foi autoclavado a 120°C durante 40 minutos.

Sobre uma lâmina de microscópio esterilizada foram vertidos 4,0 ml de ágar fervente, após a solidificação os poços foram construídos com o auxílio de uma matriz de acrílico.

25,0 μ l de antissoro hiperimune foram aplicados na

cavidade central e igual quantidade de amostras de eritrocruorina obtidas por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ultracentrifugação foram aplicadas nos poços periféricos, sempre diluídas no tampão de extração.

O material foi revelado em câmara úmida a 4°C por 72 horas. A seguir as lâminas foram lavadas primeiramente em solução salina fisiológica 0,45 M por 48 horas (para retirada do halo púrpura da eritrocruorina) e, subseqüentemente, na mesma solução agora 0,15 M por mais 48 horas sempre com várias trocas. Finalmente as lâminas foram lavadas em água bidestilada corrente, cobertas com papel filtro e colocadas para secar em estufa a 45°C por 1 hora, após o que foram coradas em solução de Amido Black 0,1%. A lavagem para retirada de excesso de corante foi feita em uma solução de ácido acético: metanol : água bidestilada (1: 2 : 1).

2.7 Preparação da Apoproteína

A apoproteína foi obtida pelo Método da Acetona-Ácida segundo Rossi-Fanelli (1958).

1,0 ml de eritrocruorina 1,01 mM em heme foi adicionada a 30,0 ml de acetona ácida (2,5 ml de HCl 2 M em 1.000 ml de acetona P.A.), sob violenta agitação em banho de gelo.

A solução foi centrifugada a 4.500 x g por 5 minutos a 0°C . O sobrenadante constituído da porção hemínica foi descartado e

o precipitado branco-amarelado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. A globina foi primeiramente dialisada contra uma solução de NaHCO_3 0,1 % por 12 horas e novamente dialisada contra o mesmo tampão de ressuspenso, agora diluído 10 vezes, ambas sob suave agitação e a 4°C.

O heme residual foi determinado pela razão A_{405}/A_{280} , cujos valores normais estão na faixa de 0,1%.

A dosagem da porção proteica constituída de globina foi determinada segundo $\epsilon_{280\text{nm}}^M = 12.400$ de acordo com Chiancone (1978).

2.8 Reconstituição da Holoproteína

A reconstituição da holoproteína foi acompanhada pela titulação da solução de globina com uma solução de hemina.

A solução de hemina foi preparada pela dissolução de 6,52 mg deste composto em 2,0 ml de NaOH 1,0 M, sendo o volume completado até 10,0 ml com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. A concentração da solução estoque foi de 1,0 mM.

A globina de concentração 28 μM , $\epsilon_{280\text{nm}}^M = 12.400$, foi titulada com alíquotas de hemina 10^{-5}M , sendo a ligação acompanhada em 405 nm.

2.9 Determinação das Curvas de Equilíbrio de Oxigenação da *Ec de Glossoscolex paulistus*

O método utilizado foi o espectrofotométrico, e se baseia na saturação gradual dos sítios de ligação de O₂ da eritrocruorina partindo de uma amostra previamente deoxigenada pela passagem de N₂ através de um tubo de Thunberg modificado (Fig. 1), técnica amplamente utilizada a partir de 1958 por Rossi-Fanelli & Antonini.

A saturação fracionada foi obtida pela adição de quantidades crescentes de ar com o auxílio de uma seringa, sendo o equilíbrio entre as fases líquida e gasosa estabelecido em banho com agitação por 10 minutos a 20°C e o espectro de varredura acompanhado na faixa de Soret 350-450 nm. Esta faixa de λ foi escolhida em função da escassez de amostra e da presença de um platô no pico da forma deoxigenada quando o espectro é acompanhado entre 450- 700 nm.

Os valores de absorbância das formas deoxigenada e gradualmente oxigenadas até a oxigenação completa foram anotados com o objetivo de calcular a porcentagem de oxigenação correspondente a cada adição de ar (à pressão atmosférica). A manutenção dos pontos isobésticos (pontos de convergência) nas curvas de oxigenação foi essencial para confirmar o pressuposto da existência de somente uma espécie molecular demonstrando, assim, que o mecanismo de ligação do oxigênio é o único responsável pelas alterações espectrais.

2.9.1 Determinação da Constante Tonométrica

O uso do tonômetro como espaço para oxigenação das amostras de eritrocruorina, requer a quantificação do volume gasoso existente no mesmo, ou seja, o volume gasoso disponível para o equilíbrio eritrocruorina-O₂.

O tonômetro consiste, como já dito, de um tubo de Thunberg modificado, cuja parte superior é composta de um sistema de válvulas que permite o controle da passagem de N₂ ou vácuo para deoxigenação da amostra e a parte inferior de uma cubeta de pirex com 1,0 cm de caminho ótico para as leituras espectrofotométricas.

A constante tonométrica foi determinada pela diferença de peso entre o tonômetro totalmente cheio de água destilada e com apenas 3,005 ml correspondentes ao volume de amostra a ser utilizado para os experimentos. Os dados foram obtidos pela média de três pesagens, resultando num valor de K_t da ordem de 85,1527 ml para o volume gasoso passível de entrar em equilíbrio com a amostra de eritrocruorina.

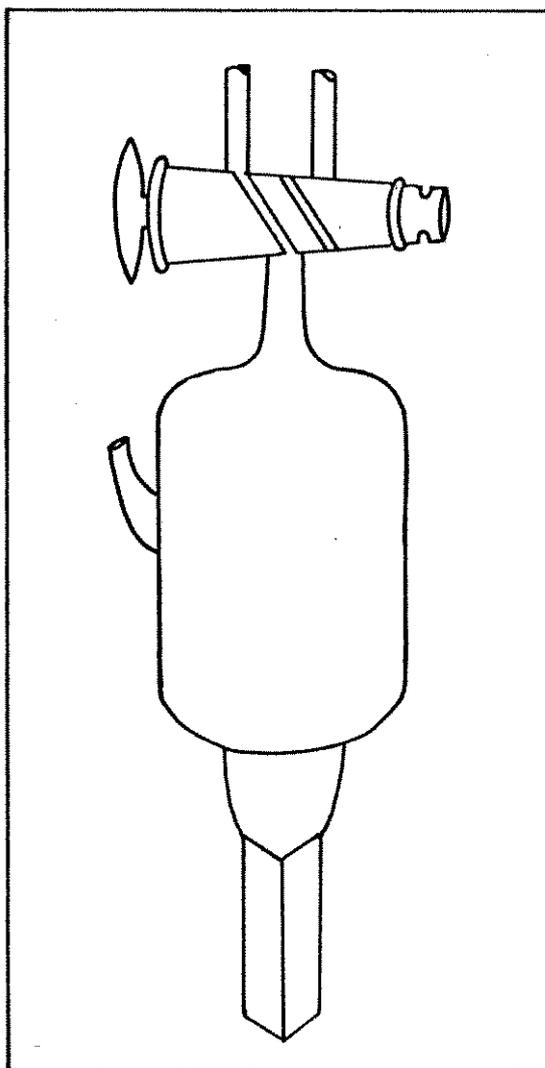
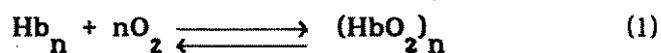


Figura 1-Tonômetro utilizado para medidas de equilíbrio de oxigenação da Ec de *Glossoscolex paulistus*.

$K_t = 85,1527$ ml.

2.9.2 Gráfico de Hill

Hill, em 1910 propôs a hipótese de que a reação de equilíbrio de ligação das moléculas de O_2 à molécula de hemoglobina, nesta época com peso molecular ainda não determinado, ocorresse da seguinte maneira:



Reação à qual aplicou a Lei de Ação das Massas, obtendo uma equação de n -ésima ordem

$$\frac{(HbO_2)_n}{(Hb)_n} = K \cdot p^n \quad (2)$$

que pode ser melhor escrita como:

$$\frac{Y}{(1-Y)} = K \cdot (p)^n \quad (3)$$

Em seguida, aplicando Log em ambos os lados da equação, obteve,

$$\text{Log} \frac{Y}{(1-Y)} = \text{Log} K + n \cdot \text{Log} (p) \quad (4)$$

Ao colocar o lado esquerdo da igualdade no eixo das ordenadas, representando o Log da saturação fracionada e o lado direito no eixo das abscissas representando o Log da pressão parcial de O_2 , a curva resultante seria uma reta cuja declividade n significaria a ordem da reação em qualquer ponto de oxigenação.

Com a descoberta de que a ligação $Hb-O_2$ não ocorre segundo uma reação de ordem n -ésima, o gráfico de Hill passou a ser utilizado para a análise da ligação de oxigênio em valores de saturação medidos por métodos mais simples, pertencentes ao intervalo 10-90%. Assim, valores de $n < 1$ sugerem a existência de interações heme-heme negativas ou ainda a presença de sítios com diferentes afinidades pelo ligante; $n = 1$ representa uma ligação descrita por uma curva hiperbólica característica de monômeros tais como a mioglobina; $n > 1$ representa uma curva de dissociação $Hb-O_2$ sigmóide onde está presente a cooperatividade ou interações heme-heme positivas.

Nas hemoglobinas gigantes, durante o processo de oxigenação ocorre a presença de mais de um valor de n , decorrentes da complexidade estrutural integrada por cadeias heme e não-heme e alto peso molecular. Neste caso consideraremos, como comumente feito nas bibliografias atuais, n_{50} - coeficiente de Hill correspondente a 50 % de oxigenação, como a declividade da reta determinada pelos graus de saturação inferior e superior obtidos pelo método experimental.

A tabela 1 exemplifica a coleta de dados e os cálculos necessários para obtenção dos valores de $\text{Log} \left(\frac{Y}{1-Y} \right)$ e Log PO_2 .

Tabela 1- Dados para o cálculo (*) de P_{50} e Gráfico de Hill da Ec de *Glossoscolex paulistus*

[Ec] = 7 μ M em heme, $\epsilon_{415 \text{ nm}}^M = 125.000 \text{ cm}^{-1}$.

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1mM.

$T_{\text{amb}} = 25^\circ\text{C}$, $T_{\text{banho}} = 20^\circ\text{C}$, $t_{\text{equil}} = 10 \text{ minutos}$.

Ar(ml)	A_{414}	A_{426}	ΔA_{414}	ΔA_{426}	$\Sigma \Delta$	Y(%)	$\text{Log}\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$	PO_2	$\text{Log } PO_2$
Deoxi	.6707	.7995	-	-	-	-	-	-	-
Oxi	.8908	.5271	.2221	.2724	.4925	100.0	-	-	-
0,5	.6977	.7646	.0270	.0349	.0619	12.57	-.8423	.916	-.0381
1,0	.7237	.7320	.0530	.0675	.1205	24.47	-.4895	1.832	.2629
1,5	.7548	.6935	.0841	.1060	.1901	38.60	-.2016	2.748	.4390
2,0	.7896	.6499	.1189	.1496	.2685	54.52	.0787	3.664	.5640
2,5	.8280	.6022	.1573	.1973	.3546	72.00	.4102	4.580	.6609
3,5	.8473	.5788	.1766	.2207	.3973	80.67	.6205	6.412	.8070

(*) segundo ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958).

A_{414} = Absorbância em 414 nm.

A_{426} = Absorbância em 426 nm.

ΔA_{414} = diferença de absorbância entre as formas parcialmente oxigenadas e a forma deoxigenada lidas em 414 nm.

ΔA_{426} = idem em 426 nm.

$\Sigma \Delta$ = somatório das diferenças de absorbâncias.

Y% = porcentagem de saturação dos sítios de ligação de O_2 .

PO_2 = pressão parcial de O_2 correspondente a cada adição de ar.

$\text{Log}\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$ = logaritmo decimal da saturação fracionada dos sítios de O_2 .

$\text{Log } PO_2$ = logaritmo decimal da pressão parcial de O_2 .

A pressão parcial correspondente a cada adição de ar, numa temperatura constante, foi calculada segundo a Lei de Boyle-Mariotte para reações isotérmicas:

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2 \quad (5)$$

onde

P_1 = pressão de O_2 atmosférico (156 mm Hg em Campinas)

V_1 = volume de ar injetado (ml)

P_2 = pressão parcial de oxigênio (mm Hg)

V_2 = volume da fase gasosa do tonômetro = const. tonométrica = K_t (ml)

Para uma adição de 0,5 ml de O_2 à amostra no interior do tonômetro, obteve-se:

$$156 \text{ mm Hg} \times 0,5 \text{ ml} = P_2 \times 85,1527 \text{ ml}$$

$$P_2 = 0,9160 \text{ mm Hg}$$

2.9.3 Efeito Bohr

O efeito Bohr, inicialmente descrito por Bohr, Krogh & Hasselbach (1904) avaliava a atuação do CO_2 nas moléculas de hemoglobina durante a sua saturação por O_2 .

Atualmente, após algumas correções teórico-práticas, o valor fornece a dimensão do efeito da variação dos valores de pH na afinidade da hemoglobina por O_2 e nas interações heme-heme caracterizadas por n_H (segundo ANTONINI & BRUNORI, 1958).

A determinação numérica deste efeito é dada pela equação proposta por Wyman (1964):

$$\frac{(\text{Log } P)}{\text{pH}} \times Y = \frac{(H)}{Y} \times \text{pH} \quad (6)$$

onde

Y= fração de saturação da eritrocruorina.

P= pressão parcial de O_2 .

A equação simplificada e adaptada às leituras das curvas de equilíbrio de oxigenação, fornece o efeito do pH sobre P_{50} :

$$\Delta H^+ = \frac{\Delta \text{Log } P_{50}}{\Delta \text{pH}} \quad (7)$$

O efeito foi medido através de curvas de oxigenação para amostras em tampão TRIS-HCl 0,05 M, EDTA 1 mM, de concentrações da ordem de 6 a 8 μM em heme, em pHs 6,3, 6,7, 7,3 e 7,8.

2.9.4 Efeito dos cátions divalentes Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++}

Amostras de eritrocruorina purificadas por ultracentrifugação com concentrações variando de 5 a 8 μM em tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1mM, $\epsilon_{415\text{nm}}^{\text{M}} = 125.000$, foram submetidas à adição de alíquotas de solução de CaCl_2 0,25 M, MnCl_2 0,20 M e MgCl_2 0,20 M. As concentrações finais dos cátions foram de 20, 10, 5 e 1mM. O tempo padronizado para deoxigenação da amostra foi de 15 minutos, a temperatura do banho foi de 20°C e o tempo de equilíbrio foi de 10 minutos.

O espectro foi acompanhado na região de Soret, entre 350 e 450 nm e os valores de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_{50} obtidos, foram comparados com os da amostra controle em pH 7,3 na ausência dos cátions.

A constatação do fenômeno de deoxigenação foi feita pela observação do deslocamento do pico de absorbância da forma oxi- 414 nm para deoxi- 426 ± 2 nm.

2.9.5 Efeito do período de incubação com Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++}

Amostras de eritrocruorina 5-8 μM em heme, tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 10^{-4} M, foram incubadas 4 horas à temperatura ambiente e 15-20 horas a 4°C, em presença de 20 mM dos cátions divalentes Ca, Mg e Mn. Em seguida, foram conduzidos os experimentos de oxigenação nas mesmas condições dos equilíbrios anteriores com o

objetivo de analisar se a interação cátion-proteína é função do tempo e que efeito eles exercem sobre a estrutura molecular com respeito as propriedades funcionais.

2.10 Curva de Transição Ácido-alkalina

Monômeros de hemeoproteínas tais como mioglobina e leghemoglobina, quando apresentam seu átomo de Fe na forma oxidada Fe^{+++} , se ligam a uma molécula de H_2O quando em pH ácido que por sua vez vai dissociando um de seus prótons à medida que o meio vai sendo alcalinizado, resultando na ligação de uma hidroxila. Tais formas são denominadas aquametahemoglobina e hidroximetahemoglobina e, apresentam diferenças espectrais que permitem o cálculo do pK de transição, ou seja, o pH no qual ocorre de fato a dissociação do íon H^+ . O valor de pK pode ser calculado através de um gráfico que apresenta o grau de dissociação da molécula de H_2O em função da variação do valor de pH (valor não calculado).

Uma alíquota da amostra eluída da coluna de cromatografia de Sephadex G-200 em pH 7,0 foi oxidada pela adição de pequena quantidade de cristais de $K_3[Fe(CN)_6]$. Logo após foi cromatografada numa coluna-tubo de Sephadex G-25 pré-equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, cuja passagem foi acelerada pela centrifugação a 2.500 rpm por 3 minutos, 22°C. O uso da coluna-tubo permite a eliminação de componentes de baixo peso molecular,

praticamente sem diluir a amostra (proteína) e num curto período de eluição.

Amostras de eritrocruorina oxidada tiveram seus espectros de varredura avaliados entre 300 e 700 nm a uma velocidade de 50 nm/minuto em uma faixa de pH que variou da seguinte maneira:

- a) $5,0 \leq \text{pH} \leq 6,5$ tampão acetato de sódio 0,1 M, EDTA 1 mM
- b) $7,0 \leq \text{pH} \leq 8,5$ tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 1 mM
- c) $9,0 \leq \text{pH} \leq 10,5$ tampão borato de sódio 0,1 M, EDTA 1mM.

2.11 Desnaturação Térmica

Amostras de eritrocruorina de concentração 30-50 μM em heme, $\epsilon_{574 \text{ nm}}^{\text{mM}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$ (FUSHITANI & RIGGS, 1986) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1 mM, tiveram seus espectros lidos em 576 nm em temperaturas de 40°, 50°, 60°, 62°, 65°, 70°, 75° e 80°C com o objetivo de avaliar o decaimento da absorbância com o tempo. Dessa forma, foram obtidos K_d - constante de desnaturação e $t_{1/2}$ - tempo de meia-vida.

$t_{1/2}$ é o tempo necessário para que a amostra decaia 50 % em relação ao valor inicial do parâmetro medido; por sua vez, K_d é definida como constante de desnaturação, sendo a tangente do gráfico de $\text{Log } A_{576\text{nm}}$ final x tempo. O valor de absorção óptica final corresponde ao decaimento de três meias-vida (87,5 %) da amostra em relação a forma inicial ou nativa.

2.12 Desnaturação por Uréia

Amostras de eritrocruorina obtidas por ultracentrifugação, com concentração na faixa 40–60 μM , em tampão TRIS-HCl 0,5 M, pH 7,3, EDTA 1 mM, foram submetidas à adição de quantidades de uréia sólida resultando em concentrações finais de 8, 6, 4, 2 e 1 M. A medida do decaimento da absorbância com o tempo, foi feita em 574 nm, sendo determinado o $t_{1/2}$ da mesma forma que no experimento anterior. O valor de K_d será determinado pela tangente do gráfico de $\text{Log } A_{574\text{nm}}$ final x tempo.

2.13 Desnaturação Alcalina

Amostras da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* com concentração de 60–80 μM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 1 mM, pHs 7,3 (a) e 9,0 (b), respectivamente fisiológico e dissociante, como comprovado por eletroforese em PAGE-SDS segundo Meirelles et al.(1987) e microscopia eletrônica de Rennebeck (1990), tiveram seu decaimento cinético de absorbância medido em 576 nm. A amostra (a) foi desnaturada pela adição de 5,0 μl de KOH 10 M, resultando em um valor final de pH igual a 12,0 e (b) foi primeiramente dissociada pela adição de 7,5 μl de KOH 2 M (pH final igual a 9,0) e, subseqüentemente desnaturada pela adição de mesmo volume de KOH 10 M, resultando em pH 12,0.

3.RESULTADOS

3.1 Cromatografia em pH 7,0

O perfil cromatográfico da Figura 2 mostra a Ec de *Glossoscolex paulistus* obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60 %, onde verifica-se a eluição de uma forma não-associada da proteína em um volume de 29-30 ml (A). Como não dispomos de um padrão de peso molecular suficientemente alto e este volume de eluição não corresponde ao volume morto da coluna, podemos sugerir o dito anteriormente. Este pico corresponde a aproximadamente 96 % da proteína.

Também verificou-se a presença de vários outros picos de concentração muito baixa em relação à fração na forma associada, que podem ser impurezas e/ou produtos de dissociação decorrentes do drástico processo de purificação (resultados não mostrados).

3.2 Fracionamento da Ec dissociada em Sephadex G-200

O espectro da cromatografia em Sephadex G-200 da amostra

dissociada em pH 9,0 foi analisada segundo a curva de calibração da Figura 3, na qual foram utilizados os seguintes padrões:

- (A) Albumina bovina PM \cong 66.000 $v_e = 48$ ml,
- (B) Anidrase carbônica (erit. bovino) PM \cong 29.000 $v_e = 60$ ml,
- (C) Lisozima PM \cong 14.300 $v_e = 70$ ml.

As subunidades resultantes da dissociação em pH alcalino foram parcialmente resolvidas nesta gel-filtração, uma vez que além de uma pequena fração da forma não-associada eluída em torno de 31 ml (A), como na cromatografia em pH 7,0, quatro picos aparecem: um com PM em torno de 70.000 (B) correspondente ao provável tetrâmero de quatro cadeias de 16.000 Da; as de PM 33 e 28.000 (C + D) não bem separadas devido a proximidade de peso, eluídas num volume de 56-58 ml e o monômero de 14-16.000 (E) eluído próximo a 71 ml. O perfil é mostrado na Figura 4.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS, tanto da forma nativa como da molécula reduzida com β -mercaptoetanol pode ser feita a partir da Figura 5, onde foram utilizados os seguintes padrões: Fosforilase B (94 KDa), Albumina (67 KDa), Ovoalbumina (43 KDa), Anidrase carbônica (30 KDa), Inibidor de Tripsina (20,1 KDa) e Lactoalbumina (14,3 KDa).

A amostra nativa apresenta seis principais componentes: 50 KDa, 33 Kda, 28 KDa, 18 KDa, 16 KDa e 14 KDa.

A molécula reduzida apresenta apenas quatro subunidades: a subunidade de 33 KDa é mantida, porém em menor concentração, bem como as de 18 KDa, 16 KDa e 14 KDa.

3.4 Imunodifusão comparada

O antissoro hiperimune anti-eritrocruorina reconheceu a amostra obtida por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ através de 4 linhas de precipitação pelo método de Ouchterlony, em suas várias diluições, como mostrado na Figura 6.

Na Figura 7, o antissoro hiperimune reconhece claramente a amostra recém preparada por ultracentrifugação, como pode ser observado pelas linhas de precipitação nos poços A e D; identifica apenas fracamente a amostra obtida por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografada, nos poços B e E e não mais reconhece a amostra somente purificada por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presente nos poços C e F.

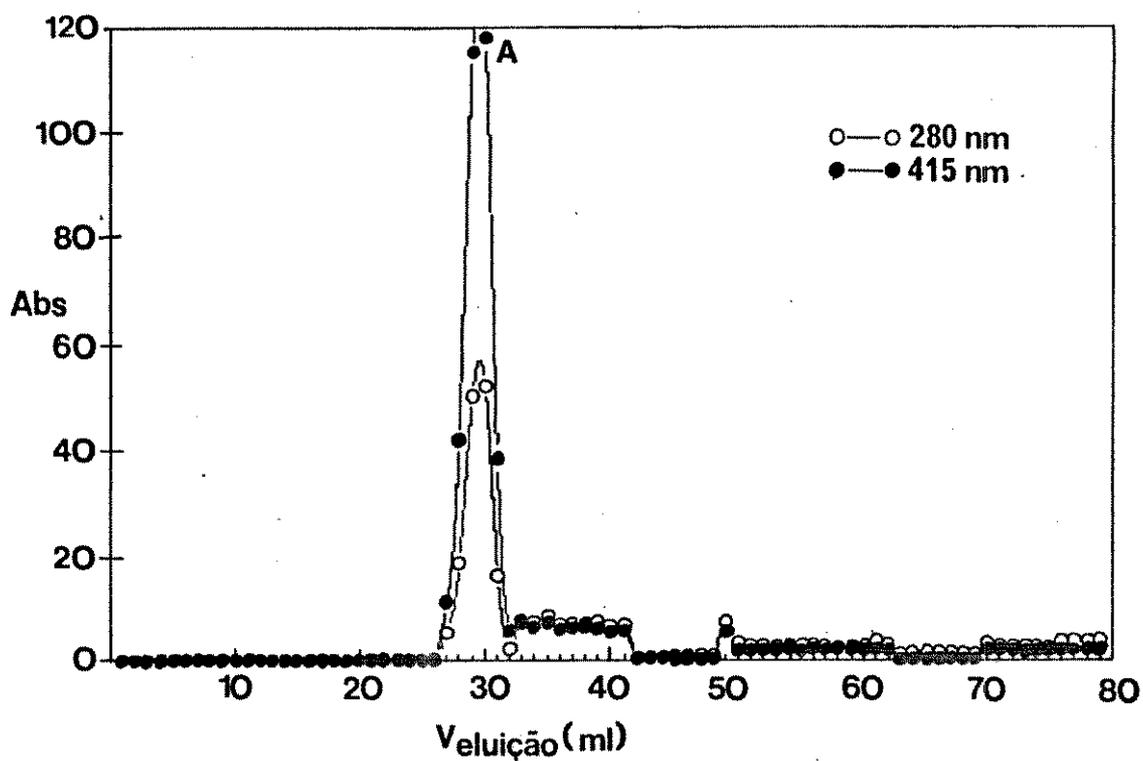


Figura 2- Cromatografia em Sephadex G-200, pH 7,0.

Tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM. Coluna (0,90 x 100 cm), 82,4 mg de proteína/ml, fluxo de 0,1 ml/minuto.

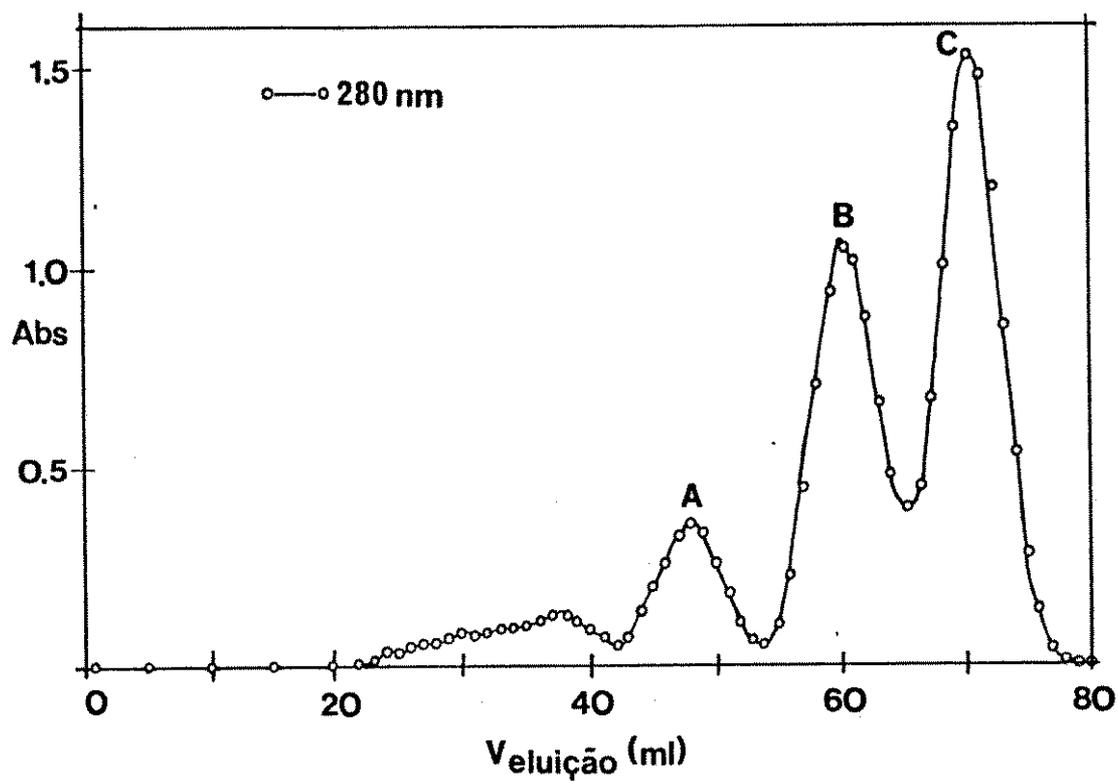


Figura 3- Curva de Calibração para Sephadex G-200, pH 9,0.

Tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9,0, EDTA 1 mM.

Padrões:

(A) Albumina bovina (66 KDa), (B) Anidrase carbônica

(29 KDa), (C) Lisozima (14,3 KDa), fluxo de 0,1 ml/minuto,

coluna (0,90 x 100 cm).

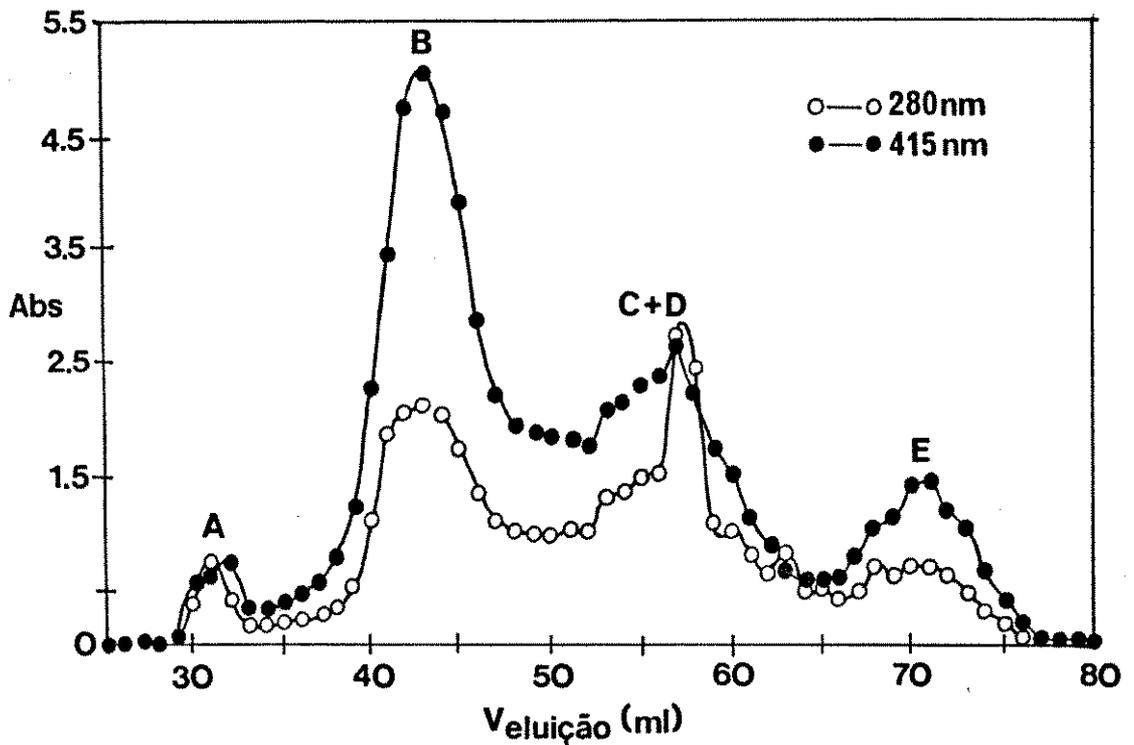


Figura 4- Cromatografia em Sephadex G-200, pH 9,0.

Tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9,0, EDTA 1 mM. Coluna (0,90 x 100 cm), 52,5 mg/ml de proteína, fluxo de 0,1 ml/minuto. (A) forma não-associada, (B) tetrâmero de 70 KDa, (C + D) mistura das subunidades de 33 e 28 KDa e (E) monômero de 16 KDa.

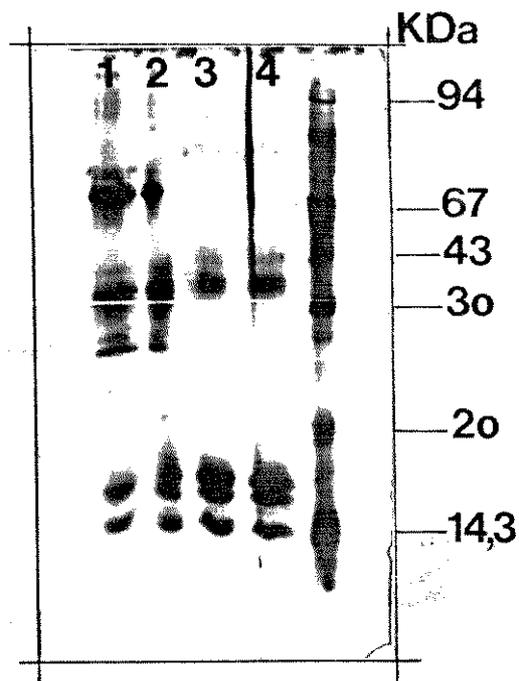


Figura 5- Eletroforese em PAGE-SDS.

15 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, 100 V, 4 horas. Padrões: Fosforilase B^r (94 KDa), Albumina (67 KDa), Ovoalbumina (43 KDa), Anidrase Carbônica (30 KDa), Inibidor de Tripsina (20 KDa) e Lactoalbumina (14,3 KDa). (1) e (2) Ec de *Glossoscolex paulistus* reduzida, (3) e (4) Ec de *Glossoscolex paulistus* nativa.

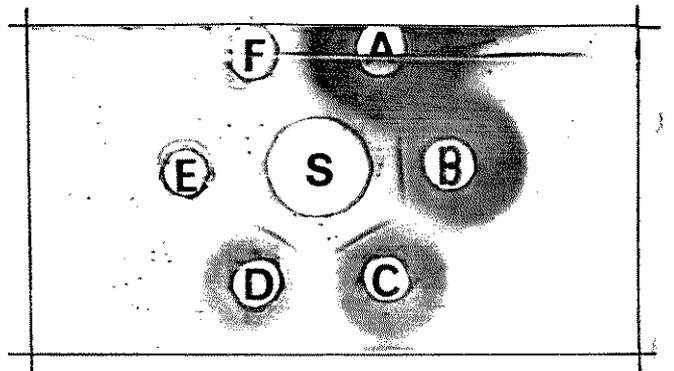


Figura 6- Imunodifusão radial em gel de ágar 1% da Ec
 obtida por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O antissoro S reconhece a amostra nativa A (57 mg/ml) e diluições sucessivas de 1/5 B, 1/10 C, 1/20 D, 1/40 E e 1/80 F, evidenciando um máximo de 4 linhas de precipitação.

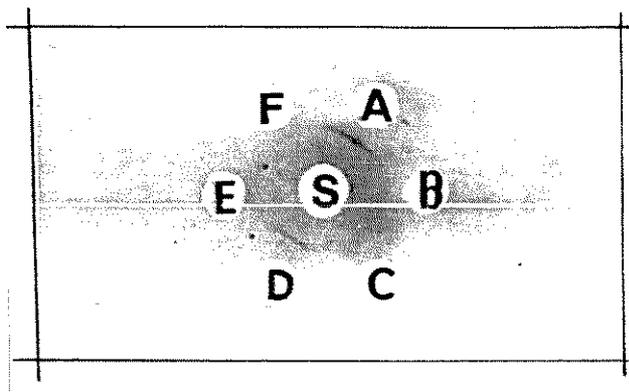


Figura 7- Imunodifusão radial em gel de ágar a 1 % das amostras purificadas por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografada em Sephadex G-200 e por ultracentrifugação.

S contém o antissoro hiperimune anti-Ec, os poços A e D contém amostra purificada por ultracentrifugação (1,40 mg/ml), poços B e E contém amostra obtida por precipitação e cromatografada (1,26 mg/ml) e poços C e F obtidas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,20 mg/ml). É evidenciada uma linha forte de precipitação em A e D e uma linha fraca em B e E.

3.5 Reconstituição da Holoproteína

O perfil da reconstituição da Ec de *Glossoscolex paulistus* através da titulação da globina isolada com hemina é apresentado na Figura 8, de acordo com os dados da Tabela 2. O ponto de equivalência identificado no gráfico fornece uma concentração de aproximadamente 24 μM de hemina ligada a 28 μM de globina, $\epsilon_{280\text{nm}}^{\text{M}} = 12.400 \text{ cm}^{-1}$, confirmando a relação estequiométrica de 1 : 1 presente nas demais hemoglobinas gigantes.

Tabela 2- Titulação da globina de Ec de *Glossoscolex paulistus* com hemina.

[globina]= 28 μM , $\epsilon_{280 \text{ nm}}^{\text{M}} = 12.400 \text{ cm}^{-1}$.
 tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0.

V_h (10^{-5} M)	A_{405a}	A_{405b}	ΔA_{405}	[hemina] _f
	0,091	0,052	0,039	
5,0	0,260	0,140	0,120	
7,5	0,260	0,140	0,120	
17,5	0,400	0,240	0,160	
27,5	0,620	0,410	0,210	
32,5	0,685	0,465	0,220	
37,5	0,780	0,525	0,255	
42,5	0,890	0,600	0,290	
47,5	0,980	0,660	0,320	
52,5	1,075	0,730	0,345	
57,5	1,160	0,780	0,380	
62,5	1,250	0,820	0,430	24,3 μM
67,5	1,325	0,900	0,425	
72,5	1,400	0,960	0,440	
77,5	1,450	1,025	0,425	
82,5	1,500	1,075	0,425	
87,5	1,600	1,150	0,450	

* a = amostra, b = branco.

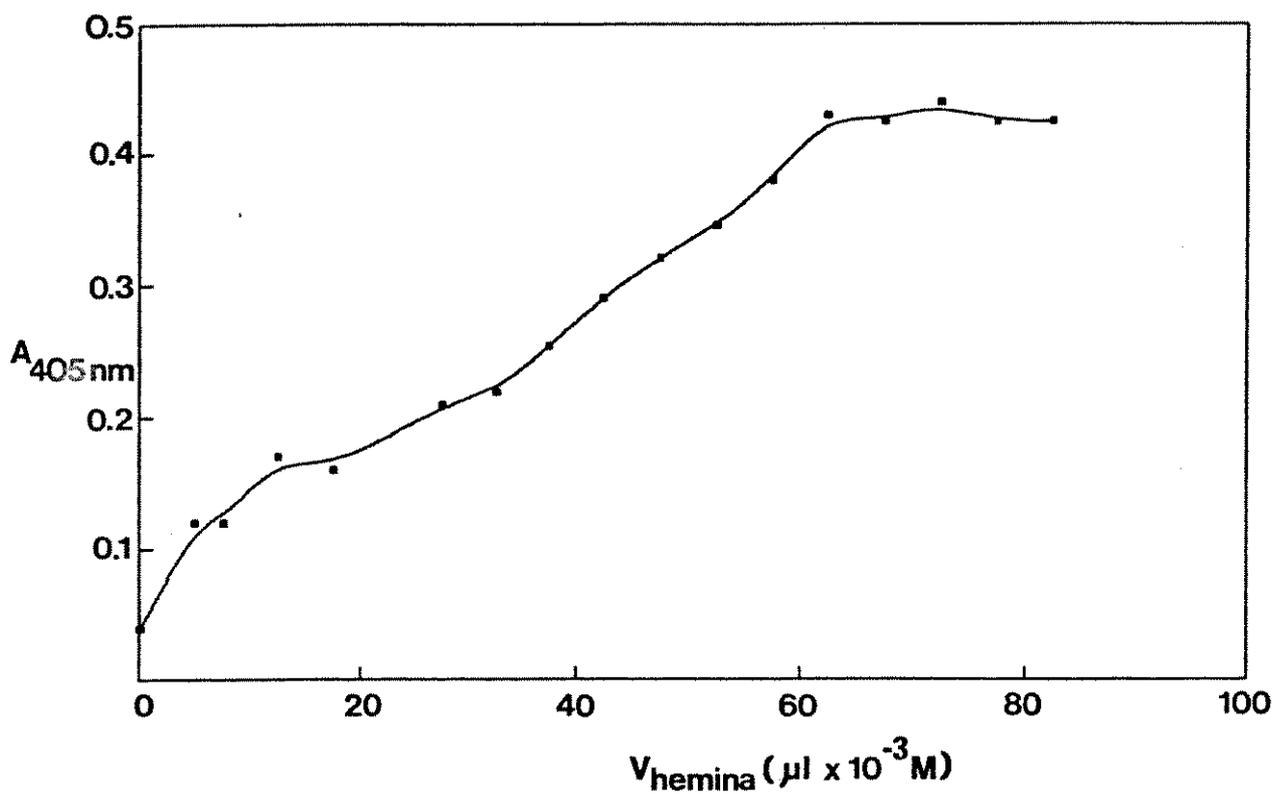


Figura 8- Curva de Titulação da Globina de *Glossoscolex paulistus* com Hemina

Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0.

[globina] = 28 μM , $\epsilon_{280 \text{ nm}}^{\text{M}} = 12.400 \text{ cm}^{-1}$.

3.6 Efeito dos cátions Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} sobre os fenômenos de afinidade por O_2 e cooperatividade

A partir dos dados obtidos com os equilíbrios de oxigenação da Ec de *Glossoscolex paulistus* em TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1 mM, na ausência e na presença de quantidades de CaCl_2 , MgCl_2 e MnCl_2 que resultaram em concentrações finais de 20, 10, 5 e 1 mM, conseguimos avaliar seu efeito alostérico sobre a afinidade por oxigênio, bem como sobre a cooperatividade desta macromolécula. A Tabela 3 fornece os valores dos parâmetros avaliados.

Os efeitos dos cátions sobre a afinidade da Ec por O_2 diferem: em presença de Ca^{++} a afinidade aumenta em 20 mM e 10 mM, enquanto que para Mg^{++} esse aumento é significativo em 20 mM e comparável ao produzido por Mn^{++} em 20 mM e 10 mM. Já em presença de 5 mM dos cátions, o efeito é desprezível para Ca^{++} e Mg^{++} mas ainda significativo para Mn^{++} . Em uma concentração de 1 mM ocorre uma diminuição de P_{50} para todos os três cátions. A presença de 1 mM de EDTA na solução nos permite concluir que baixas concentrações de cátions diminuem a afinidade pelo ligante e altas concentrações aumentam a afinidade.

O valor de n_{50} praticamente não sofre alteração na presença de 20, 10 e 5 mM de Mn^{++} em relação à amostra controle, sendo intensificadas a 2,95 com 1 mM. O mesmo comportamento não se verifica para Ca^{++} e Mg^{++} , onde o grau de cooperatividade na faixa de 50 % de saturação é reduzido atingindo um mínimo de 1,4 na presença de 1 mM.

Tabela 3- Valores de P_{50} e n_{50} da Ec de *Glossoscolex paulistus* em presença de Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} .

	P_{50} (mm Hg)	n_{50}
Ec controle pH 7,3	3,40	2,24
$CaCl_2$ 20 mM	2,12	1,82
10 mM	2,32	1,94
5 mM	3,70	1,33
1 mM	5,82	1,37
$MgCl_2$ 20 mM	1,13	1,74
10 mM	3,30	1,86
5 mM	2,98	1,58
1 mM	4,30	1,34
$MnCl_2$ 20 mM	1,66	2,35
10 mM	1,75	2,05
5 mM	2,60	2,12
1 mM	4,60	2,95

Os gráficos de Hill na presença de cada cátion, são apresentados nas Figuras 9, 10 e 11.

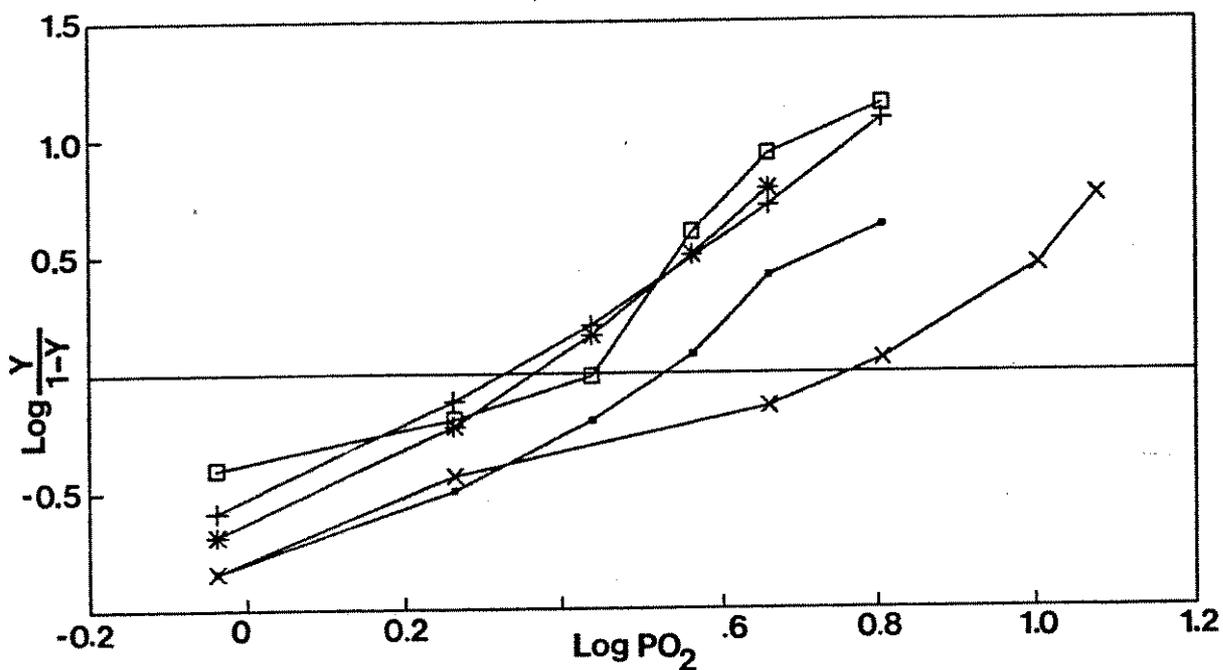


Figura 9- Gráfico de Hill em presença de Ca⁺⁺

[Ec]= 6-8 μ M em heme, $\epsilon_{415 \text{ nm}}^{\text{M}} = 125.000 \text{ cm}^{-1}$. Tampão

TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1 mM. (+) Ca⁺⁺ 20 mM,

(*) Ca⁺⁺ 10 mM, (□) Ca⁺⁺ 5 mM, (x) Ca⁺⁺ 1 mM,

(●) Ec controle.

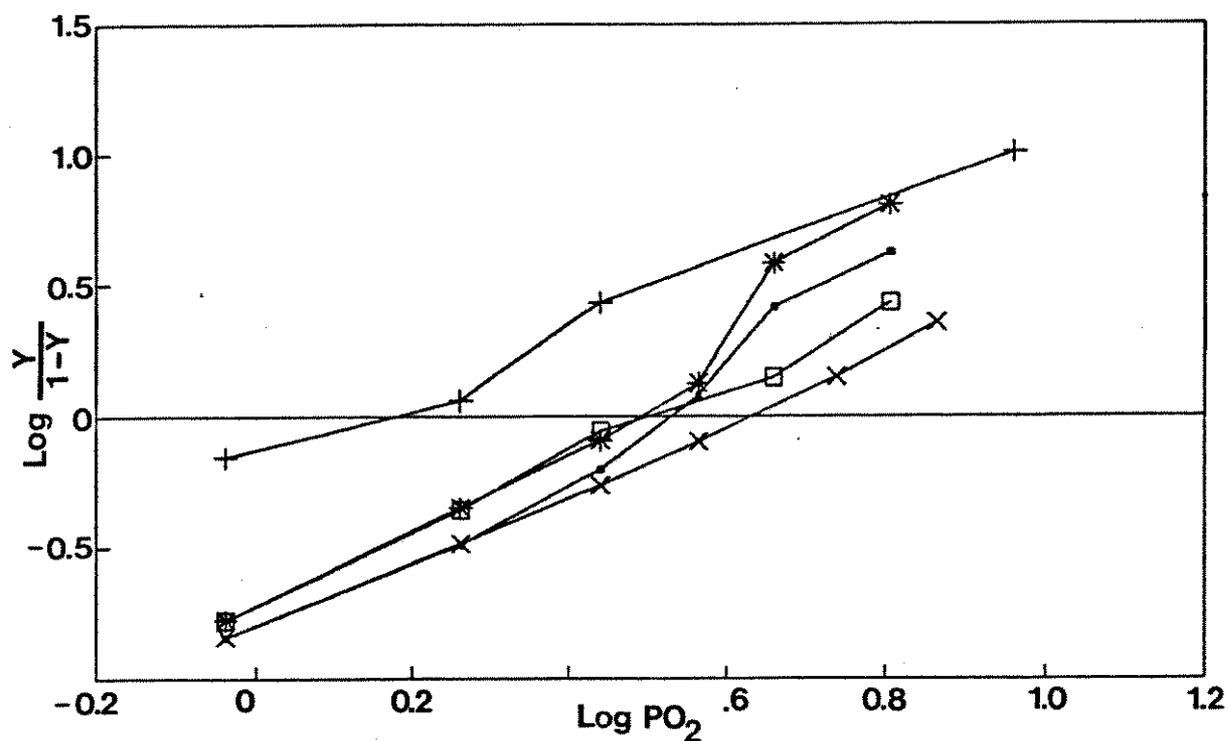


Figura 10- Gráfico de Hill em presença de Mg^{++}

[Ec] = 6-8 μM em heme, $\epsilon_{415nm}^M = 125.000 \text{ cm}^{-1}$. Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1 mM. (+) Mg^{++} 20 mM, (*) Mg^{++} 10 mM, (□) Mg^{++} 5 mM, (x) Mg^{++} 1 mM, (●) Ec controle.

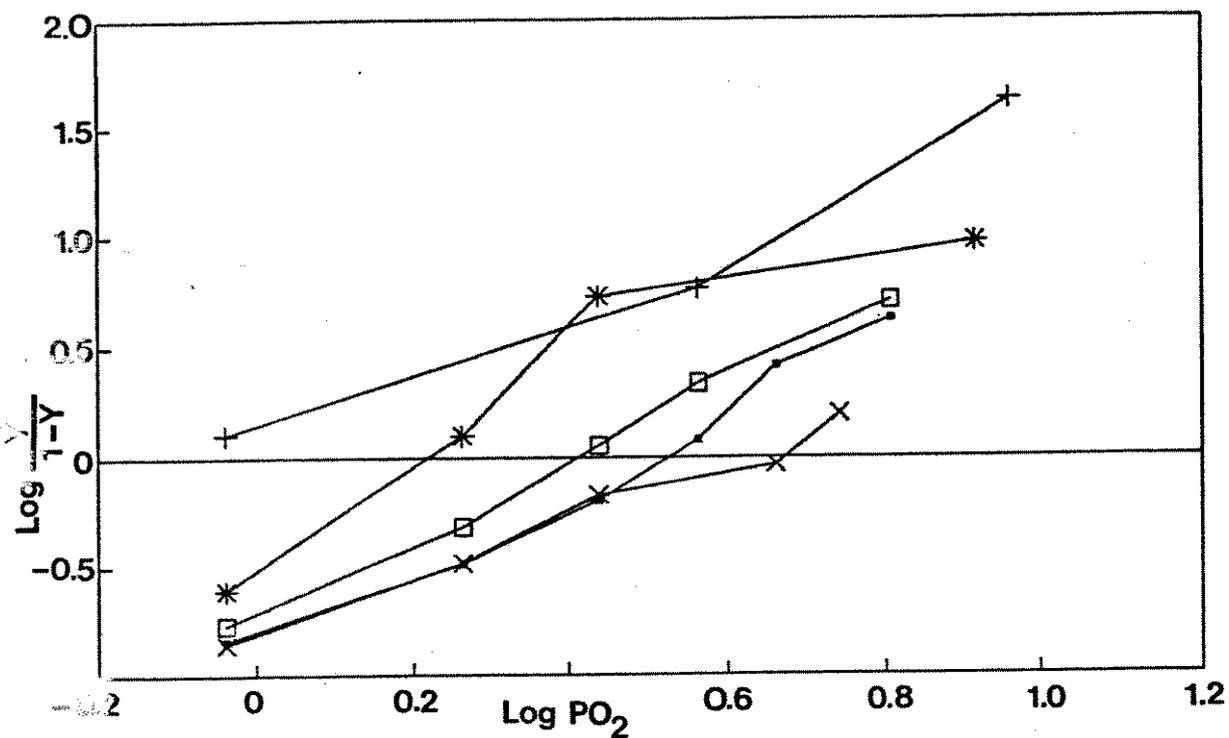


Figura 11- Gráfico de Hill em presença de Mn⁺⁺

[Ec] = 6-8 μ M em heme, $\epsilon_{415\text{nm}}^{\text{M}} = 125.000 \text{ cm}^{-1}$. Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 1 mM. (+) Mn⁺⁺ 20 mM, (*) Mn⁺⁺ 10 mM, (□) Mn⁺⁺ 5 mM, (x) Mn⁺⁺ 1 mM, (●) Ec controle.

3.7 Efeito do período de incubação com Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++}

Pode ser observado nas Figuras 13, 14 e 15 o comportamento diferenciado dos espectros de absorção ótica da Ec quando submetida à incubação por um período de 15-20 horas, em presença de Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} , respectivamente.

A forma deoxigenada (A) é obtida tão facilmente quanto para o controle, porém a oxigenação (B) é dificultada quando incubada em presença de 20 mM de Mn^{++} , para as mesmas quantidades de ar adicionadas e mesma concentração de cátions e proteína. Tal situação não se verifica para 20 mM de Ca^{++} e Mg^{++} , onde a forma oxigenada original (pré-deoxigenação) (C) é praticamente recuperada. Podemos inferir que há uma estabilização da forma T (deoxigenada) ocasionada por Mn^{++} .

Também é possível identificar uma heterogeneidade de populações presentes durante o processo de oxigenação da amostra incubada com Mn^{++} , onde a leitura de absorbância inicial (450 nm) apresenta valores variáveis e ausência de pontos isobésticos.

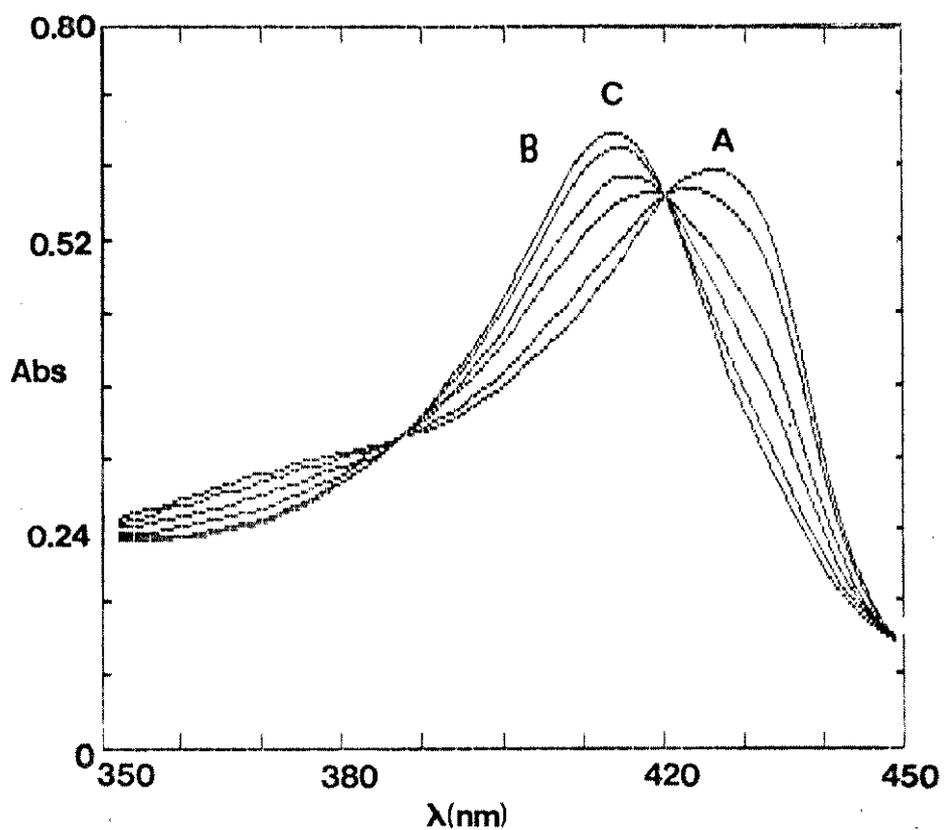


Figura 12- Espectro de Oxigenação da Ec controle

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 10^{-4} M. [Ec] = 4-6 μ M em heme, $t_{\text{incubação}}$ = 15-20 horas, 4° C. (A) forma deoxygenada, (B) forma parcialmente oxygenada e (C) forma oxygenada pré-deoxygenação.

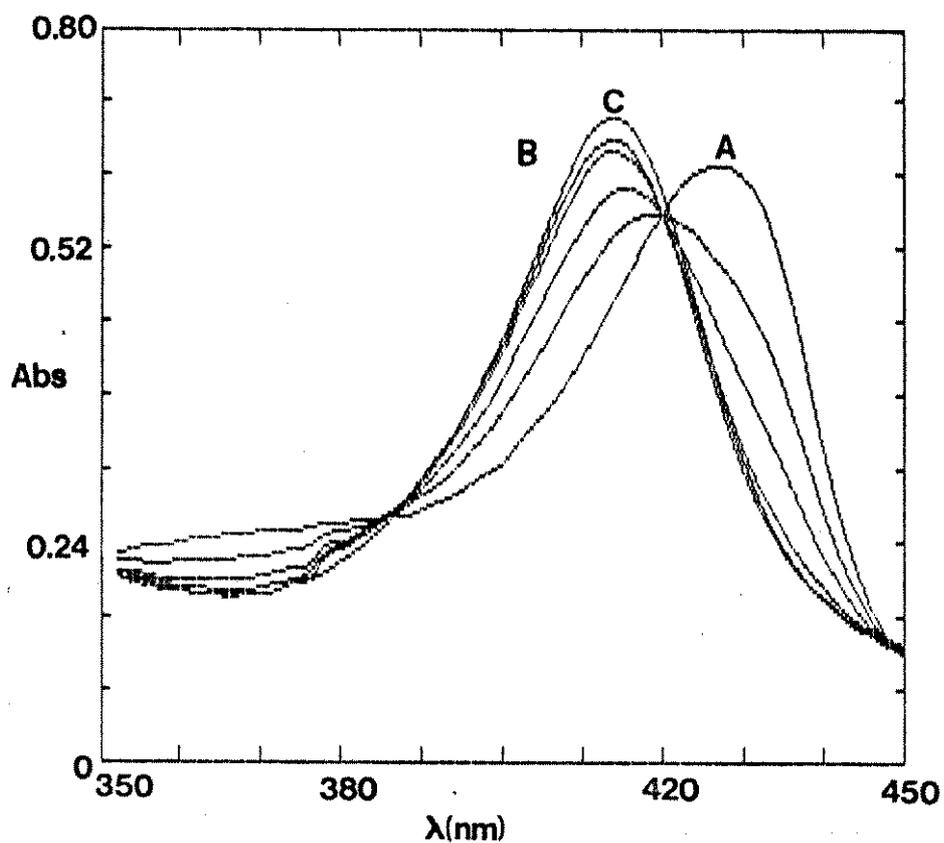


Figura 13- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Ca^{++} 20 mM.

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 10^{-4} M. $[\text{Ec}] = 4-6 \mu\text{M}$ em heme, $t_{\text{incubação}} = 15-20$ horas, -4° C. (A) forma deoxygenada, (B) forma parcialmente oxygenada e (C) forma oxygenada pré-deoxygenação.

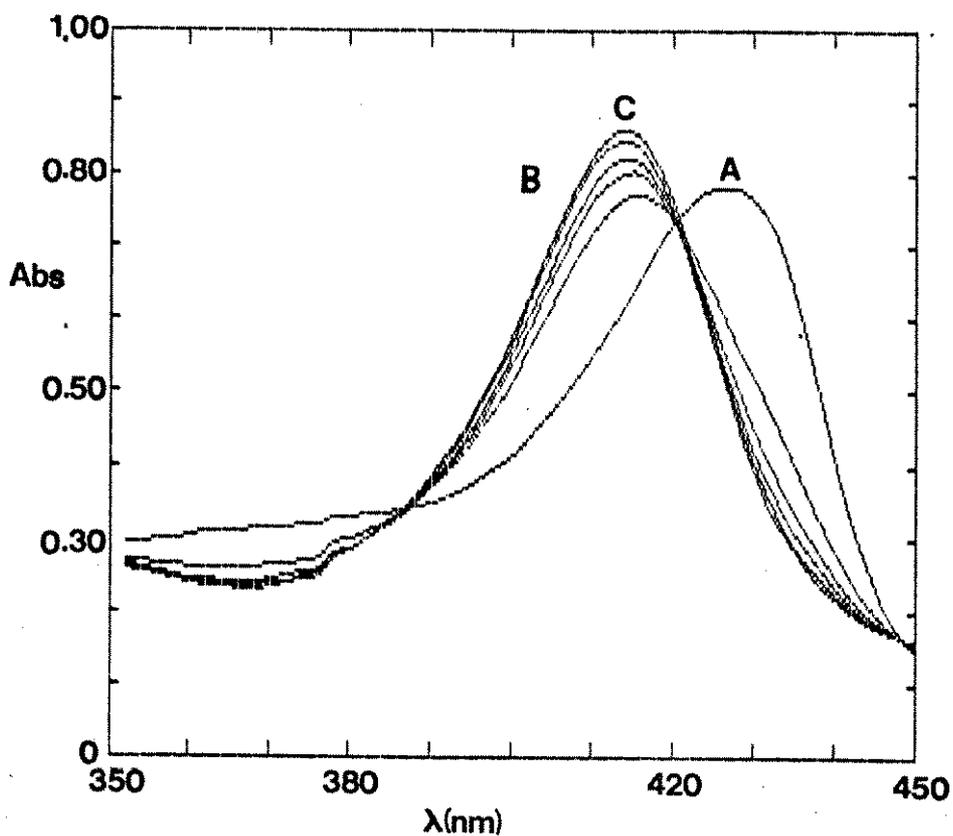


Figura 14- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Mg^{++} 20 mM.

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 10^{-4} M. [Ec] = 4-6 μ M em heme, $t_{\text{incubação}} = 15-20$ horas, -4° C. (A) forma deoxygenada, (B) forma parcialmente oxygenada e (C) forma oxygenada pré-deoxygenação.

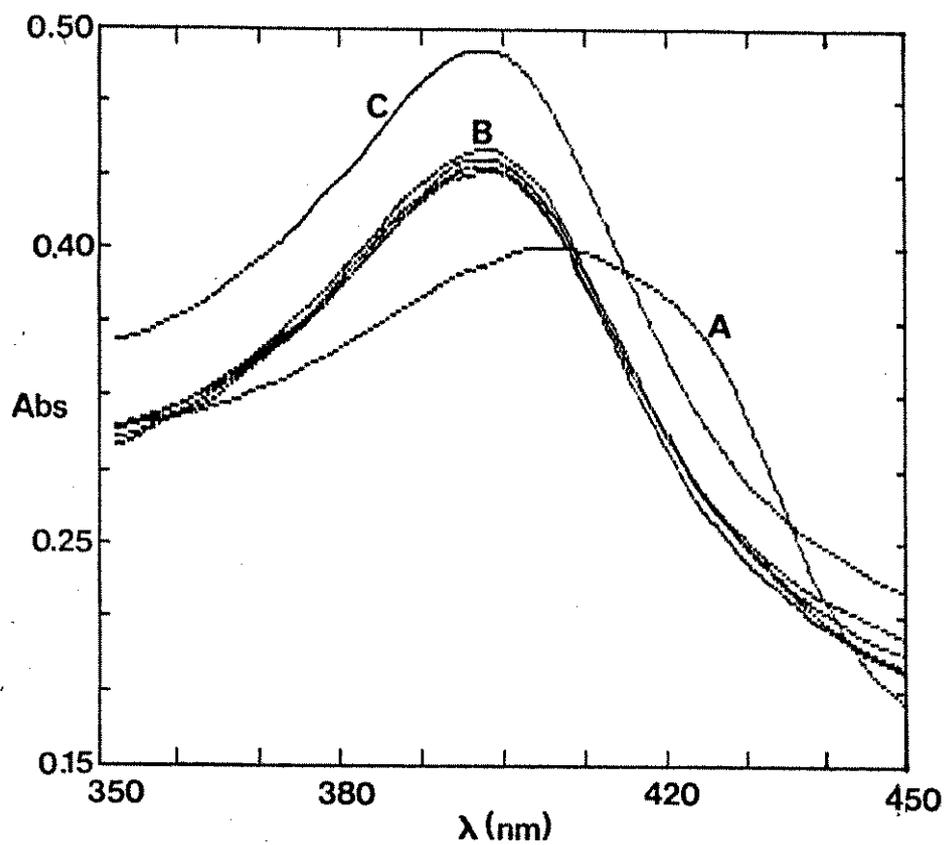


Figura 15- Espectro de Oxigenação da Ec incubada com Mn^{++} 20mM.

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,3, EDTA 10^{-4} M. [Ec] = 4-6 μ M em heme, $t_{incubação}$ = 15-20 horas, -4° C. (A) forma deoxygenada, (B) forma parcialmente oxygenada e (C) forma oxygenada pré-deoxygenação.

3.8 Efeito Bohr

O efeito da variação dos valores de pH na afinidade da Ec de *Glossoscolex paulistus* foram avaliados entre pH 6,3 e 7,8 usando valores vizinhos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Dados do Efeito Bohr e n_{50} em função do pH

[Ec] = 6-8 μM em heme, $\epsilon_{415 \text{ nm}}^{\text{M}} = 125.000 \text{ cm}^{-1}$.

$T_{\text{banho}} = 20^{\circ} \text{C}$, $t_{\text{equi}} = 10 \text{ minutos}$.

pH	Log P_{50}	ΔH	n_{50}
6,3	0,5794	—	1,16
6,7	0,6201	0,10	0,65
7,3	0,5260	-0,06	2,24
7,8	0,3041	-0,40	1,54

O gráfico do efeito Bohr e de n_{50} em função do pH é apresentado na Figura 16.

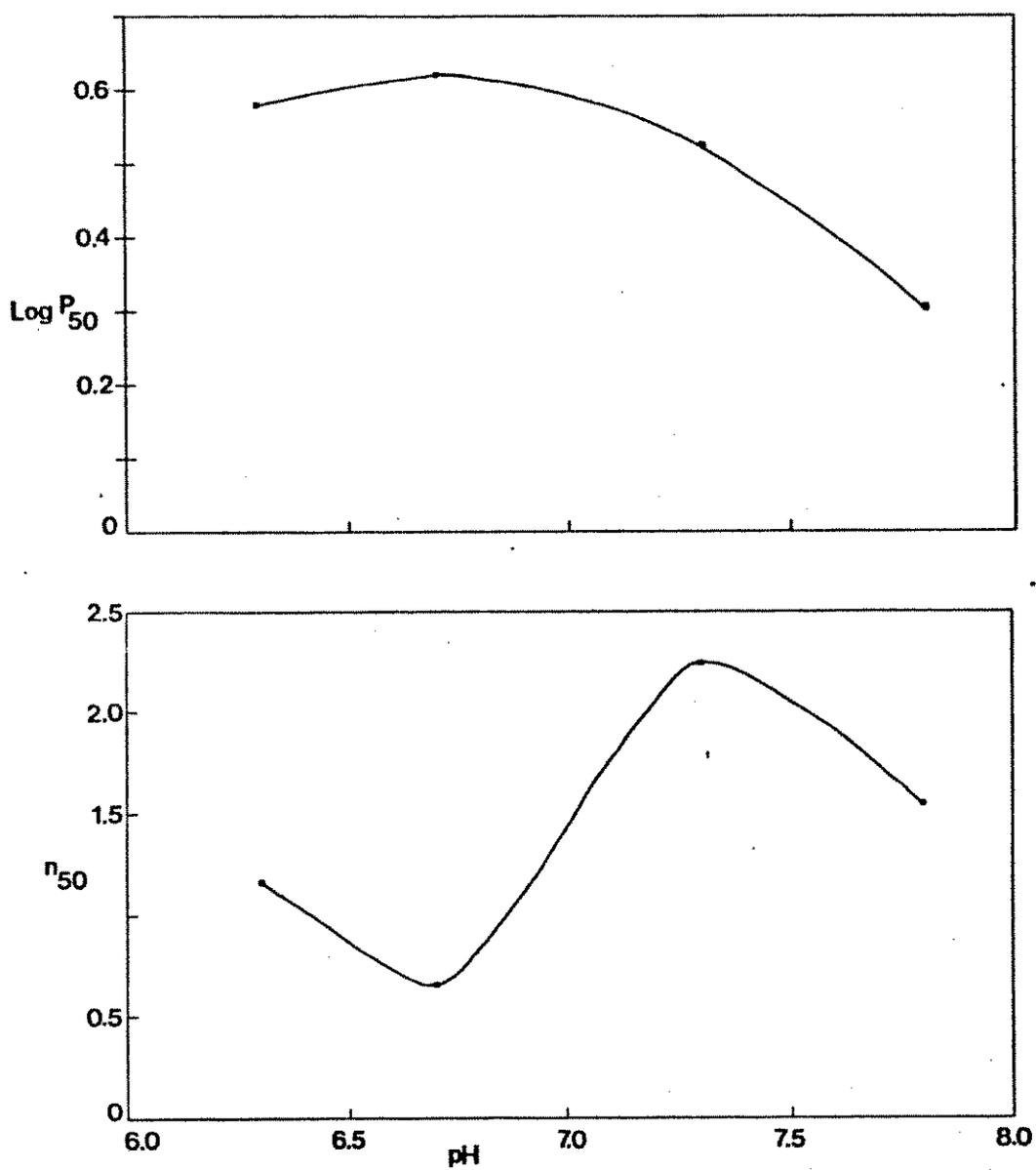


Figura 16- Efeito Bohr da Ec e n_{50} em função de pH

Tampão TRIS-HCl 0,05 M, EDTA 1 mM. [Ec] = 6-8 μM em heme,

$$\epsilon_{415 \text{ nm}}^{\text{M}} = 125.000 \text{ cm}^{-1}$$

3.9 Curva de Transição Ácido-Alcalina

A família de curvas espectrais presentes na Figura 17 representa a proteína oxidada exposta a pHs ácidos (5,0 - 7,5) e alcalinos (8,0 - 10,5), com $460 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$.

A ausência de pontos isobésticos não nos permite caracterizar/diferenciar as formas aquometaeritrocruorina e hidroximetáeritrocruorina como as duas únicas espécies moleculares presentes.

3.10 Desnaturação Térmica

A velocidade de desnaturação térmica para temperaturas de 40° e 50° C não é significativa, uma vez que o decaimento de absorbância em 576 nm praticamente se insere no intervalo do erro experimental espectrofotométrico (0,05).

A Tabela 5 fornece o valor de K_d correspondente às temperaturas de 60° , 62° , 65° , 70° , 75° e 80° C , para três meia-vidas, bem como o $t_{1/2}$.

Pódemos observar que o tempo de meia-vida diminui com o aumento de temperatura, ou seja, a proteína torna-se progressivamente menos resistente ao agente térmico até 80° C , enquanto que a constante de desnaturação aumenta de até cinco vezes nesta variação de 20° C de temperatura, confirmando o

comportamento de perda de resistência à desnaturação.

A Figura 18 relaciona $\text{Log } A_{f 576 \text{ nm}}$ acompanhada durante 15 minutos no intervalo de temperatura acima citado.

Tabela 5- Valores de K_d e $t_{1/2}$ em função da temperatura

T (°C)	K_d ($10^{-2}/\text{min}$)	$t_{1/2}$ (min)
60	1,58	7,80
62	2,46	5,02
65	3,72	3,40
70	4,50	2,90
75	7,60	1,60
80	8,20	1,64

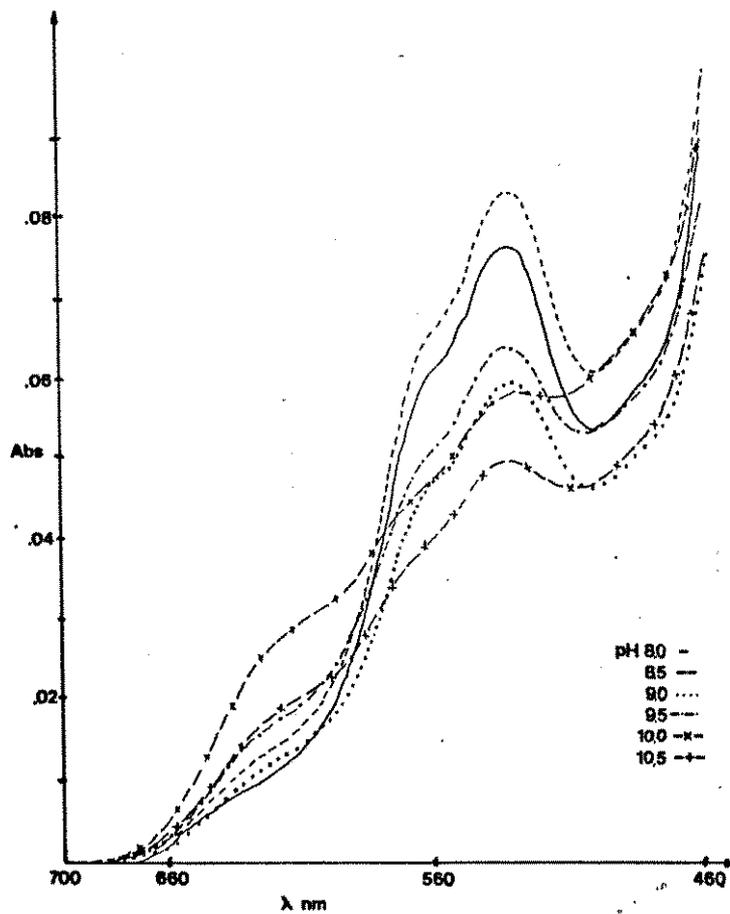
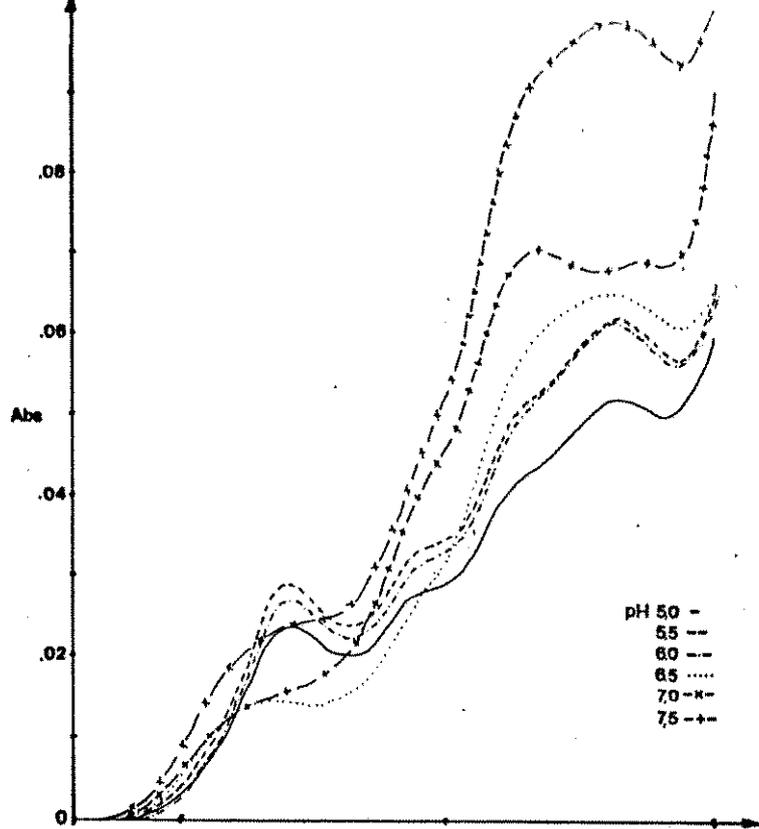


Figura 17- Família de Curvas Espectrais da Ec férrica em função do pH

[Ec] = 40-60 μ M em heme.

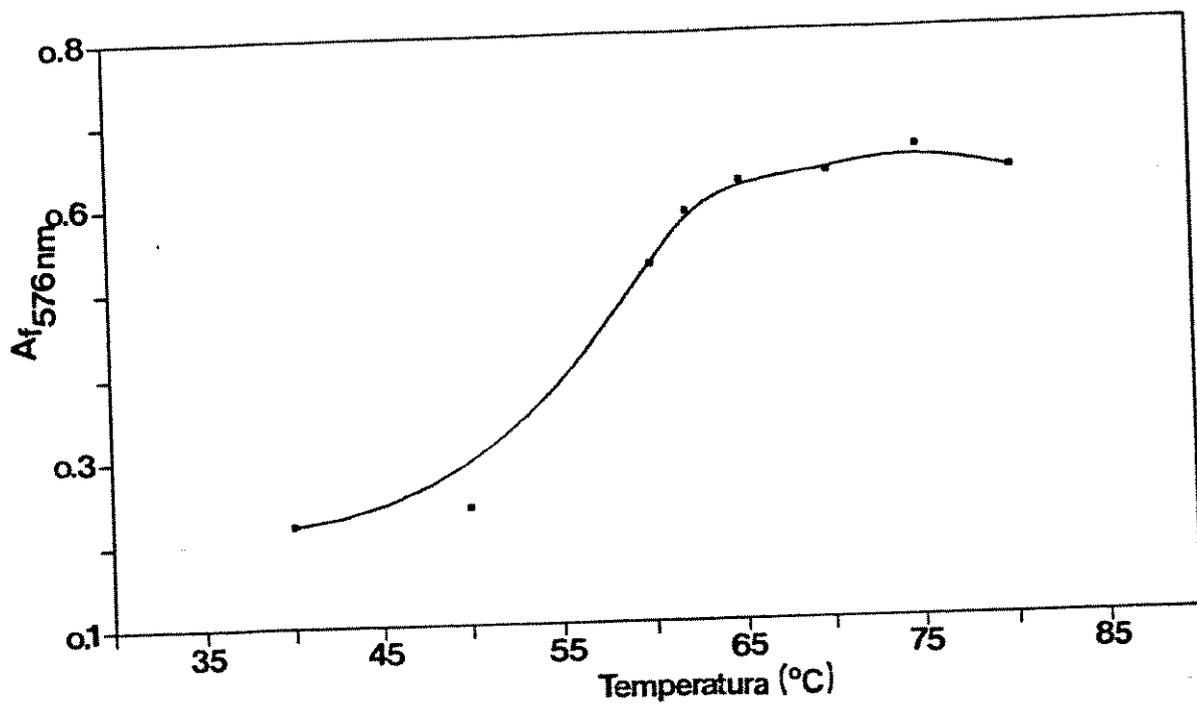


Figura 18- Gráfico Log A_{f 576 nm} x Temperatura

Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM,

[Ec] = 40 μM em heme, $\epsilon_{576 \text{ nm}}^{\text{M}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$.

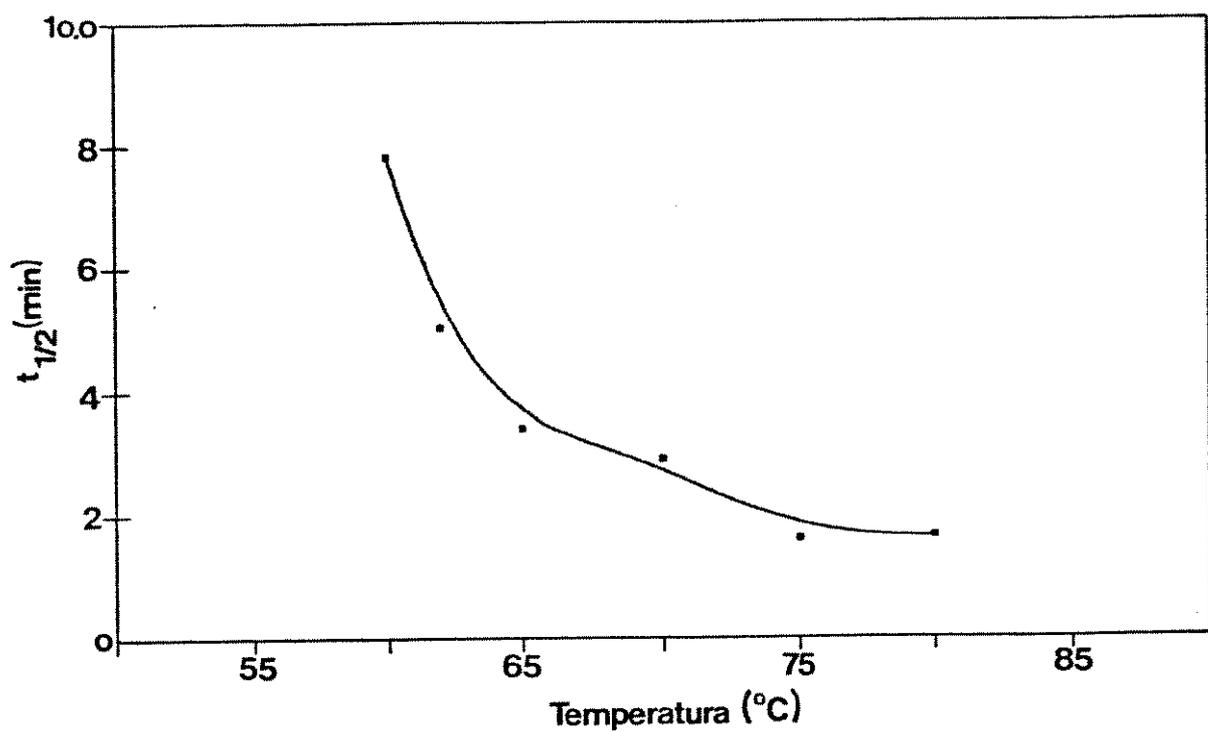


Figura 19- Gráfico $t_{1/2}$ x Temperatura

Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, $t = 15$ minutos, $[\text{Ec}] = 40 \mu\text{M}$ em heme, $\epsilon_{576 \text{ nm}}^{\text{M}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$.

3.11 Desnaturação por Uréia

Na Figura 20 podemos observar que praticamente não ocorre mudança no espectro de absorção da Ec quando submetida à adição de 1 M, 2 M e 4 M de uréia. Há alteração da concentração proteica em relação ao controle, como pode ser visualizado pela diminuição do pico de absorbância em 574 e 538 nm, provavelmente ocasionando precipitação de certa quantidade de proteína.

No entanto, quando a amostra é submetida à 6 M e 8 M de uréia, há formação da forma espectral de hemicromo identificada pelo aparecimento do pico em 536 nm.

No tangente aos valores de K_d e $t_{1/2}$, eles foram calculados apenas para as concentrações passíveis de acompanhamento cinético por espectrofotometria, ou seja, em 4 M, 6 M e 8 M. Os valores são apresentados na Tabela 6, e o decaimento de absorbância durante 30 minutos é mostrado na Figura 21.

Tabela 6- Valores de K_d e $t_{1/2}$ em presença de uréia

Uréia (M)	K_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
4,0	0,13	<0,28
6,0	$2,58 \times 10^{-2}$	1,67
8,0	$7,60 \times 10^{-2}$	0,87

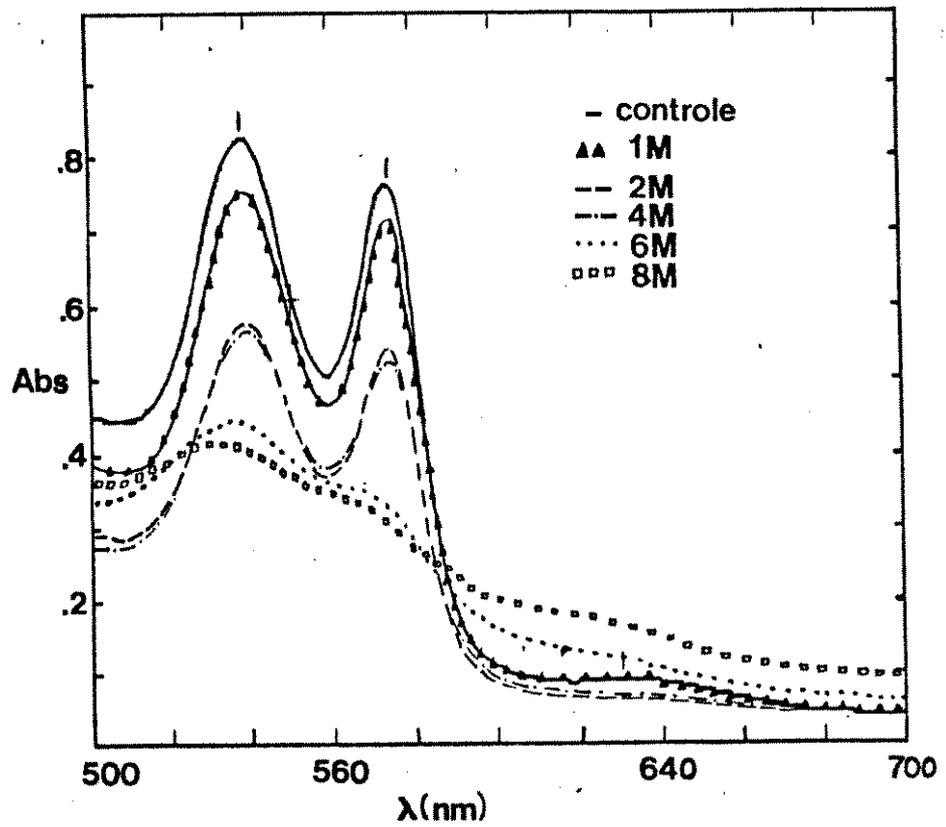


Figura 20- Espectro de Absorção ótica da Ec em uréia

Tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1mM. [Ec] = 40-60 μM

em heme, $\epsilon_{576 \text{ nm}}^{\text{M}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$.

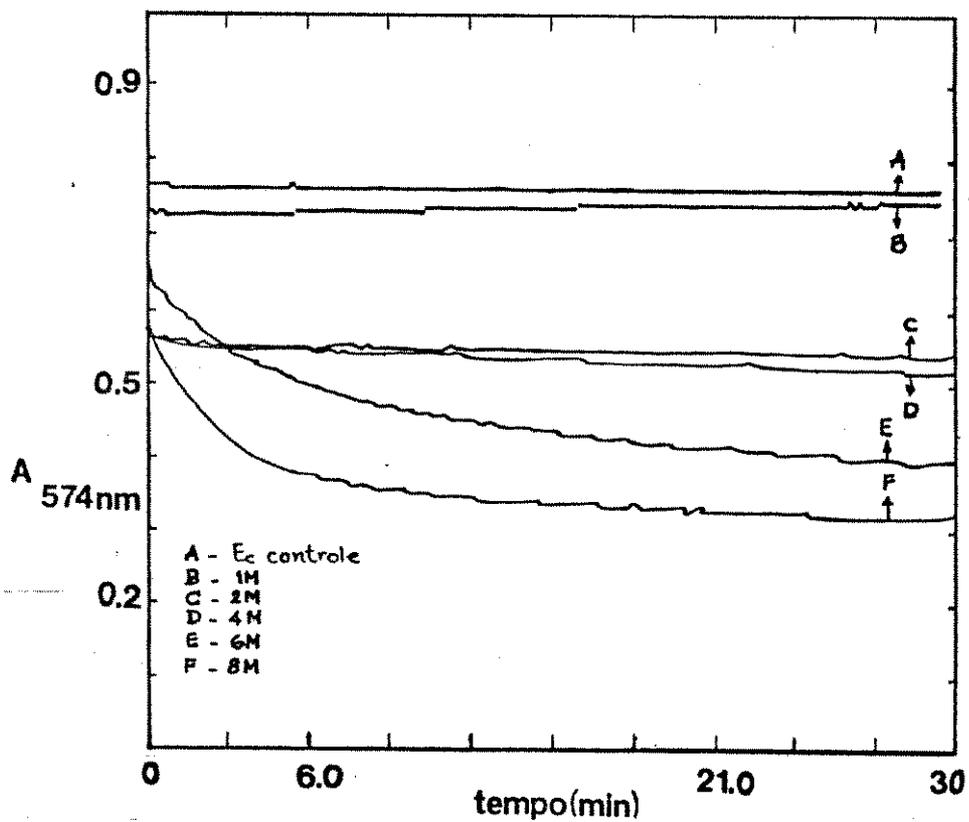


Figura 21- Decaimento de $A_{574\text{nm}}$ da Ec em presença de uréia

Tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,3, EDTA 1mM. [Ec] = 40-60 μM
 em heme, $\epsilon_{576\text{nm}}^{\text{M}} = 16,4 \text{ cm}^{-1}$, tempo = 30 minutos.

3.12 Desnaturação Alcalina

Como pode ser visualizado na Figura 22, a amostra na forma nativa (●) (pH 7,3) oferece maior resistência ao processo de desnaturação alcalina (pH final 12,0) do que a amostra já dissociada (+) (pH 9,0).

O processo de desnaturação é bifásico em ambos os casos, apresentando uma cinética rápida inicialmente e, uma cinética lenta a partir de 5 minutos aproximadamente. Os valores da constante de velocidade de desnaturação rápida para a amostra nativa e dissociada são $0,47 \text{ min}^{-1}$ e $0,23 \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

O tempo de meia-vida para a amostra nativa é da ordem de 2,5 minutos, superior ao da amostra dissociada - 1,5 minutos.

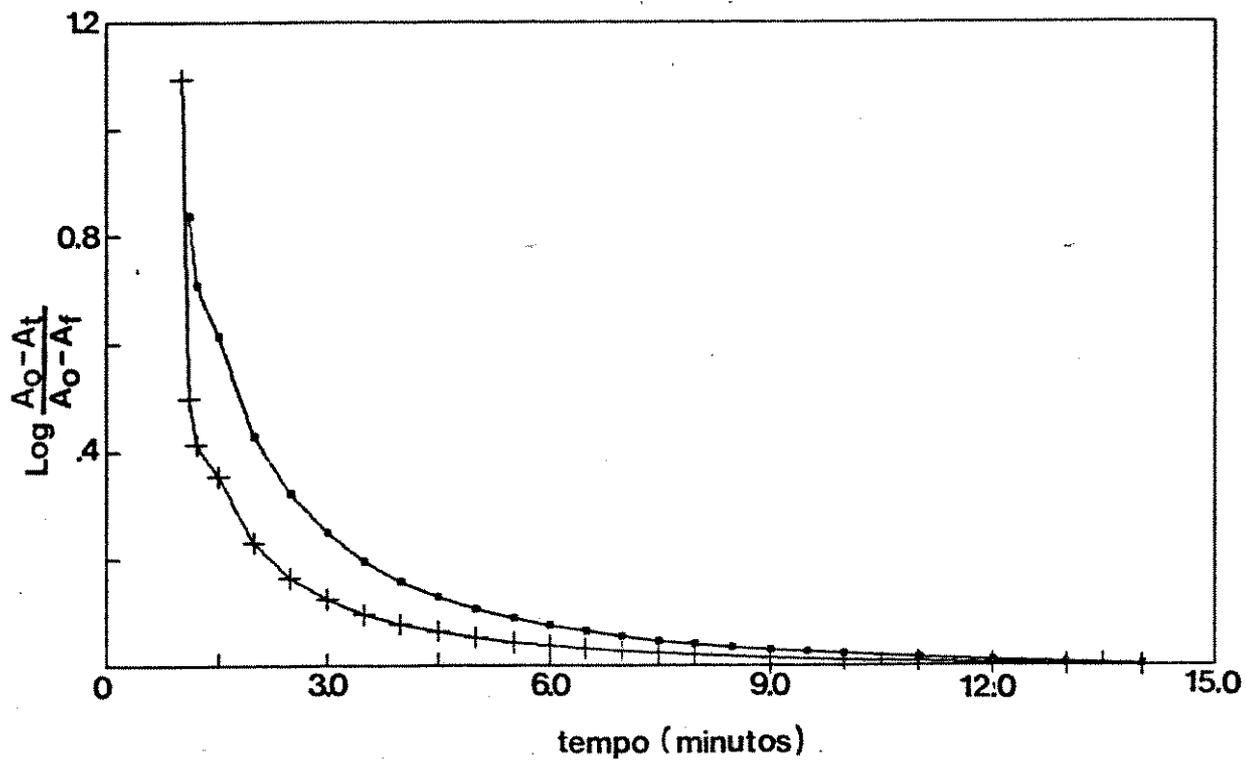


Figura 22- Log da % de proteína nativa x tempo por desnaturação alcalina

Tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 1 mM, (●) pH 7,3,

(+) pH 9,0. [Ec] = 40-60 μ M em heme, tempo = 15' minutos.

4. DISCUSSÃO

A obtenção de eritrocruorina de hemolinfa de invertebrados têm sido proposta pela utilização de dois métodos distintos: ultracentrifugação e precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os resultados obtidos nos levaram a optar pelo método de ultracentrifugação por conferir maior estabilidade à amostra, que se manteve na forma espectral original (HbO_2) com pequena porcentagem de dissociação.

Estudos recentes das curvas de equilíbrio de subunidades obtidas por dissociação em pH alcalino mostraram a variabilidade que pode ser apresentada na sigmoicidade da curva (Kapp et al., 1980).

O fato de se pressupor que estas hemoglobinas gigantes apresentam uma forma de equilíbrio entre espécies ditas estáveis e metaestáveis (David & Daniel, 1973; Ascoli et al., 1976; Kapp & Vinogradov, 1979; Frossard, 1979) implicitamente relacionadas ao grau de dissociação da molécula reforçou a escolha do método de ultracentrifugação.

A identificação da proteína purificada por precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 6) pelo antissoro-Ec hiperimune é visualizada pelo aparecimento de até quatro linhas de precipitação, sugerindo a

existência de, no mínimo, quatro diferentes populações conformacionais proteicas, confirmando os resultados obtidos por Rennebeck (1990).

As amostras preparadas por ultracentrifugação (A e D) e precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de cromatografia (B e E) foram reconhecidas pelo antissoro hiperimune e apresentam identidade total entre si. O longo período de estocagem a frio deve ter contribuído para um processo de desnaturação da amostra preparada por precipitação por sal não cromatografada, uma vez que o antissoro não reconheceu a proteína (B e F) (Figura 7) estocada mas reconheceu a mesma proteína recém-preparada (Figura 6). O método de precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é extremamente drástico, somente garantindo estabilidade da amostra por poucos dias, ao passo que o método de ultracentrifugação permite que a proteína purificada mantenha sua forma espectral e propriedades funcionais por períodos mais longos.

Estudos imunológicos recentes mostraram que apesar do alto grau de correspondência entre a composição de aminoácidos de *Pista pacifica* e *Thelepus crispus* (Terwilliger et al., 1976), estas duas hemoproteínas apresentam imunidade cruzada (Koppenheffer et al., 1979), ou seja, a diferença na seqüência dos aminoácidos estabelece estruturas conformacionais distintas o suficiente para que um mesmo antissoro hiperimune reconheça ambas. Pouca identidade antigênica foi observada entre as hemoglobinas de *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) e *Haemopsis marmorata* (Achaeta) (Koppenheffer &

Ginsberg, 1978). Quando a proteína é exposta a tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C e F na Figura 7), por exemplo, que conduz à oxidação, dissociação e alteração conformacional, isto implicaria numa modificação tridimensional dos epitopos comprovando o que ocorre com a identidade imunológica observada entre as subunidades de 50 e 16 KDa, obtidas por dissociação em pH 9,0 (Rennebeck, 1990). A forma dissociada obtida por tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pode ser observada na cromatografia em Sephadex G-200 em pH 7,0, que por si só não é condição dissociante (Figura 2).

A eletroforese da proteína em PAGE-SDS na sua forma nativa (1 e 2) e na ausência de agente redutor (Figura 5) evidenciou um perfil de cinco bandas com peso molecular de 70 KDa, 50 KDa, 33 KDa, 28 KDa e 14-16 KDa, modificado em presença de agente redutor (3 e 4) (β -mercaptoetanol) com desaparecimento das bandas de 50 e 28 KDa e aumento de intensidade das bandas de peso molecular de 14 e 16 KDa. Estes resultados estão de acordo com os observados por Meirelles et al. (1986) onde foi proposto o modelo de arranjo de subunidades através da manutenção das subunidades de 50 e 28 KDa por pontes dissulfeto. Este perfil eletroforético é exibido por todas as hemoglobinas de *Polychaetas* e *Oligochaetas* estudadas: *Lumbricus terrestris* (Shlom & Vinogradov, 1973), *Limnodrilus gotoi* (Vinogradov et al., 1975), *Tubifex tubifex* (Vinogradov et al., 1979 b), *Abarenicola affinis affinis* (Chung & Ellerton, 1979), *Arenicola marina* (Vinogradov et al., 1979 a), *Eisenia foetida* (Frossard, 1979).

O perfil eletroforético da hemoglobina na sua forma reduzida apresenta grande variabilidade. Uma única banda de 13-15 KDa é observada para *Tillemus crispus* (Garlick & Terwilliger, 1975) e *Abarenicola pacifica* (Garlick & Terwilliger, 1977). O perfil eletroforético da forma reduzida de *Lumbricus terrestris* (Shlom & Vinogradov, 1973) é o mais complexo, assemelhando-se ao perfil por nós obtido para a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* que mostra a dissociação da subunidade de 50 KDa em subunidades de peso molecular menores. A dissociação de hemoglobinas extracelulares de anelídeos em PAGE-SDS sugere que estas hemoglobinas gigantes são constituídas por três principais subunidades primárias: um monômero de peso molecular 16.000, um dímero de peso molecular 31.000 e um trímero de 50.000. A subunidade de 31 KDa pode ser uma única cadeia polipeptídica ou ainda a união de dois monômeros, enquanto o trímero consiste de três monômeros ligados por pontes S-S. A proposta de Vinogradov (1977) é de que essas hemoglobinas de anelídeos sejam constituídas de cadeias polipeptídicas pequenas, de peso molecular da ordem de 12-15.000 que formam agregados de 4 a 6 cadeias estabilizadas por pontes dissulfeto.

Cromatografia da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* na condição dissociante de pH 9,0 (Figura 4) apresenta um perfil semelhante ao obtido para *Lumbricus terrestris* (Vinogradov, 1977). A dissociação em pH alcalino segue um processo irreversível através da formação de agregados que não se constituem exclusivamente do

produto de dissociação 1/12 (Vinogradov, 1977). Todavia, Kapp et al. (1984) demonstraram a possibilidade de reassociação da eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* através de dois mecanismos: um que conduz à reconstituição da molécula nativa e outro que reconstitui a fração 1/12 da molécula nativa. A resolução das frações dissociadas por cromatografia em Sephadex G-200 ou Sephacryl S-200 demonstraram a existência de dois picos, também por nós obtidos, que corresponderiam à fração da molécula não-dissociada em pH alcalino e uma fração que equivaleria ao produto de reassociação. O processo de dissociação observado para *Lumbricus terrestris*, não é visto para *Arenicola* (Vinogradov et al., 1980), *Eisenia foetida* (Frossard, 1982), *Abarenicola* (Chung et al., 1982) e *Tylorrhynchus* (Gotoh & Kamada, 1980).

Quanto à preparação da globina, os resultados por nós obtidos confirmam a reconstituição da proteína na sua forma nativa e a obtenção de estequiometria (1 : 1) (Figura 8) de acordo com os experimentos de reconstituição da eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* (Chiancone et al., 1978). Todavia, este procedimento experimental não permite a quantificação real de globina não-heme presente na molécula, existência já demonstrada para a mesma *Lumbricus terrestris* (Fushitani et al., 1988), que apresenta 192 cadeias contendo grupamento heme e 12 cadeias não-heme. Experimentos conduzidos por Vinogradov et al. (1991) com *Lumbricus terrestris* consideram que a razão A_{415}/A_{280} situada entre 2,5 e 3,5 determina a presença de subunidades contendo heme, de onde se pode deduzir que

fora deste intervalo tem-se subunidades não-heme. Nossos experimentos de gel-filtração em Sephadex G-200 em condições dissociantes para a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* (Figura 4) apresenta razões A_{415}/A_{280} fora e dentro deste intervalo, o que nos permite pressupor a presença de subunidades heme e não-heme nesta proteína.

A natureza multifásica das curvas de equilíbrio de oxigenação da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* é indicativa da diferenciação das interações inter-hemes das unidades funcionais efetivas. Sendo a estrutura molecular desta hemoglobina gigante similar às demais como um todo, mas resguardando suas características, temos observado valores de P_{50} , n_{50} e efeito Bohr próprios.

Em pH fisiológico, 20°C, foram encontrados valores médios de P_{50} da ordem de 3,4 mm de Hg, compatíveis com os determinados por Bonafé (1988) e um tanto inferior aos encontrados por Meirelles et al. (1987) e Rennebeck (1990). No entanto, este valor também apresenta similaridade com os encontrados para *Lumbricus terrestris* (Vinogradov et al., 1977), *Octolasion complanatum* (Giardina et al., 1975) e *Eisenia foetida* (Ochiai, 1984), enquanto que a hemoglobina do anelídeo *Pheretima hilgendorfi* (Ochiai, 1983) apresenta uma afinidade muito maior, algo em torno de 1,2-1,7 mm Hg; em contraposição tem-se *Perinereis aibuhitensis* (Grube) (Tsuneshige, 1989) que possui uma P_{50} que varia de 8,0 a 27 mm Hg.

A presença de cátions divalentes na forma de cloreto de Ca^{++} , de Mg^{++} e Mn^{++} exerce um efeito modulador sobre a afinidade por oxigênio e sobre o grau de cooperatividade em relação à eritrocruorina controle. Foi comprovada a ausência de efeito alostérico do ânion Cl^- , não só por comparação de dados de equilíbrio onde ocorre superposição de curvas de oxigenação, mas também por experimentos de relaxação nuclear magnética quadrupolar onde pode ser observado que o Cl^- liga-se à proteína tanto na sua forma oxigenada como na deoxigenada com a mesma afinidade (Chiancone et al., 1976). Nos valores de concentração fisiológica de cátions determinados para o gênero *Glossoscolecidae* (Haeser et al., 1965), de fato Ca^{++} e Mg^{++} atuam aumentando a afinidade da Ec de *Glossoscolex paulistus* por oxigênio em até praticamente 50 % : 3,4 mm Hg para a proteína na ausência de cátions e 1,2 mm Hg na presença de 5 mM de Mg^{++} .

Em uma concentração de 1 mM destes cátions ocorre uma abrupta mudança de comportamento com P_{50} atingindo 5,8 mm Hg para Ca^{++} , 4,3 mm Hg para Mg^{++} e 4,0 mm Hg para Mn^{++} ou seja, há uma diminuição da afinidade por O_2 . É bastante provável que essa redução de P_{50} seja consequência da complexação preferencial dos cátions com EDTA 1 mM presente no tampão, em detrimento da interação cátion-proteína, possivelmente decorrente de outro tipo de interação molecular com a proteína..

Ca^{++} e Mg^{++} também atuam estabilizando a estrutura quaternária destas oligoproteínas, mantendo-as na forma nativa e garantindo sua funcionalidade (David & Daniel, 1974; Swaney & Klotz, 1971; Chiancone et al., 1980). Outro efeito descrito é o de proteção à dissociação alcalina, onde estes cátions divalentes deslocam o pH onde se inicia o processo de dissociação das cadeias polipeptídicas (Kapp et al., 1984).

Experimentos por nós conduzidos no estudo do efeito de Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} 20 mM sobre a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus*, apresentam espectros de oxigenação na região de Soret que sugerem a ocorrência de um mecanismo de estabilização da forma T (tensa) da proteína quando em presença de Mn^{++} (Figura 15) após longo período de incubação, 4° C, quando então o íon divalente poderia estar deslocando o equilíbrio de ligação O_2 -proteína. Tal efeito não foi verificado para os cátions Ca^{++} (Figura 13) e Mg^{++} (Figura 14), o que nos sugere que os sítios de ligação na proteína nativa possam ser não-equivalentes.

O interesse em estudar o efeito de Mn^{++} se baseou no pressuposto anterior. Estudos da ligação de cátions divalentes com a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* por ressonância paramagnética eletrônica, demonstram a existência de dezesseis sítios de ligação para manganês com alta afinidade ($K_a = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) e 10 sítios de menor afinidade ($K_a = 3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) para uma concentração proteica da ordem de 30-200 μM em heme. Quinze átomos de Mn^{++} se ligam à proteína na ausência dos outros dois íons, sendo

este número reduzido para doze na presença de Mg^{++} e para quatro na presença de Ca^{++} . O número de sítios de ligação, bem como o valor das constantes de associação são função da concentração proteica (Tabak et al., 1988).

O grau de cooperatividade (n_{50}) na ligação proteína- O_2 só é significativamente ampliado para 2,95 na presença de 1 mM de Mn^{++} , mantendo-se praticamente inalterado nas concentrações de 10 e 20 mM de Ca e Mg , reduzindo-se no entanto a 1,4 em 1 mM destes cátions. Tal comportamento diferencia-se um pouco do apresentado pela maioria das eritrocruorinas de anelídeos, tais como *Eisenia foetida* onde há um aumento de n de 5,3 na ausência de Ca^{++} para 9,8 na sua presença, ou ainda *Cirraformia grandis* que apresenta uma cooperatividade nula, com n na vizinhança da unidade (Igarashi et al., 1986). Assim, podemos deduzir que Mn^{++} atua como efetor alostérico positivo intensificando interações heme-heme, mesmo estando complexado com EDTA.

Lumbricus terrestris, anelídeo que apresenta estrutura e função bastante similares à *Glossoscolex paulistus*, exibe n_{50} entre 3,6 e 5,0 para pH em torno de 7,0, que se amplia para 7,0 quando em presença de 25 mM de $CaCl_2$ (0,1 M de $NaCl$) (Fushitani et al., 1986).

Acentuado efeito Bohr está geralmente presente em pigmentos vasculares e ausente em hemoglobinas celômicas e

hemolinfa, indicando que a vantagem do aumento de liberação de O_2 em tecidos ácidos só pode ser explorada onde estão presentes gradientes de pH internos diferenciados. O efeito Bohr varia bastante nos fluidos vasculares, como por exemplo nas polychaetas, onde parece ser pronunciado nas espécies que vivem em buracos bem delimitados e arejados; insignificante nas que habitam tocas transientes ou mal ventiladas como *Marphysa sp.* Tal generalização ilustra o fato de que a liberação de O_2 tecidual pH-induzida é uma opção viável somente quando o fornecimento de O_2 aos pulmões é suficiente (Weber, 1980).

O efeito Bohr observado para a eritrocruorina do anelídeo por nós estudado é da ordem de $-0,40$ entre pH 6,3 e 7,8. Hemoglobinas de algumas espécies não apresentam este efeito, entre elas as polychaetas *Eupolymnia crescentis* e *Arenicola cristata* (Tsuneshige et al., 1989); por outro lado *Cirraformia grandis* apresenta um ΔH^+ tão intenso quanto $-1,5$ (Tsuneshige et al., 1989). *Lumbricus terrestris* (Fushitani et al., 1986) e *Abarenicola affinis affinis* (Chung et al., 1982) mostram um efeito Bohr semelhante ao de *Glossoscolex paulistus*.

Dentre as propriedades físico-químicas estudadas para as hemeoproteínas monoméricas como mioglobina, um dos parâmetros que permite identificar a presença de histidina na posição distal ou a não-homogeneidade de populações é a determinação do pK de transição ácido-alcalina. É de extrema importância a identificação da posição da histidina na estrutura oligomérica, uma vez que em hemoglobinas

de vertebrados ela desempenha papéis fundamentais nas alterações conformacionais dinâmicas que ocorrem quando da ligação de ligantes tais como oxigênio.

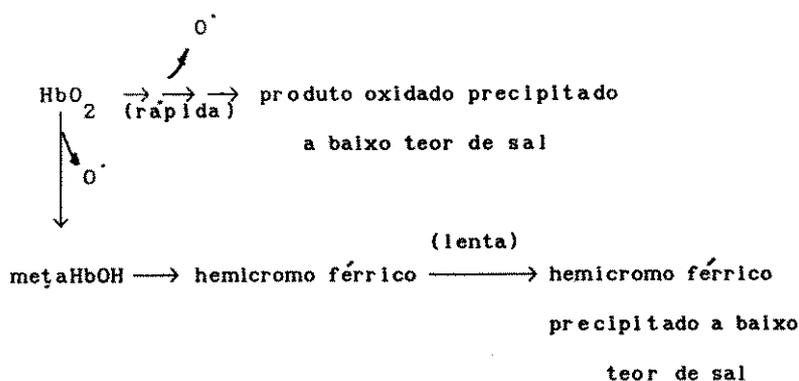
Em se tratando de hemeproteínas oligoméricas gigantes, o que observamos para a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* foi a transição espectral com o aumento de pH e a não-isosbesticidade da família de curvas, o que indica a existência de mais de um tipo de população da hemoglobina na sua forma férrica. A presença de mais de um tipo de população pode estar correlacionada a diferentes tipos de microambientes heme que coexistem nas hemoglobinas gigantes (Desideri et al., 1982). O aparecimento de duas diferentes populações para a eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* já havia sido descrito para a hemoglobina na forma nitrosilada submetida à variação de temperatura em pH 7,0 (Caracelli et al., 1988).

Um comportamento semelhante é verificado para a hemoglobina de *Perinereis aibuhitensis* em valores de pH altos onde o espectro de absorção da metaeritrocruorina é típico de espécies heme alto spin; aumentando o pH de 6,8 para 7,8 o espectro mostra uma não-isosbesticidade próxima a 545 nm com concomitante decréscimo de absorbância em 503 e 640 nm. Em valores de pH superiores a 8,0, um típico espectro de hemoglobina férrica baixo spin aparece e indica a formação de hemicromo. Também o aparecimento de uma nova banda em 625 nm indica a formação de outras espécies de hemoglobina férrica alto spin, embora no caso destas hemeproteínas só exista uma espécie

de hemoglobina interligada na forma Fe^{++} (Tsuneshige et al., 1989).

Outro método que pode estabelecer as diferenças entre hemoglobinas de distintas espécies, diz respeito à desnaturação alcalina. O tempo necessário para que a amostra de eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* seja praticamente desnaturada por agente alcalinizante é da ordem de 11,0 minutos para a forma nativa e 8,0 minutos para a forma dissociada, e o primeiro valor pode ser comparado com os obtidos para *Lumbricus rubellus* 2,5 minutos, *Eisenia foetida* 5,0 minutos, *Allolobophora terrestris* 6,0 minutos e *Lumbricus terrestris* 23 minutos (Haughton et al., 1958).

O mecanismo envolvido no processo de desnaturação alcalina tem sido descrito para hemoglobina humana (Wilson & Burr, 1985) com a proposta de que este fenômeno ocorre via reações paralelas seqüenciais:



Para a hemoglobina humana, a formação de uma espécie

oxidante é indicada pela perda de grupos sulfidrilas tituláveis e formação de pontes S-S. O oxidante é uma espécie reativa de oxigênio gerada pela interação com ferroheme.

Outra propriedade físico-química por nós estudada foi a estabilidade da hemeproteína gigante de *Glossoscolex paulistus* frente a temperaturas crescentes (40°- 80° C). A temperatura crítica experimentalmente obtida foi de 60° C (Figura 18), que não diferencia esta hemeproteína de outras proteínas submetidas à desnaturação térmica (Tanford, 1968).

Como se sabe, hidrocloreto de guanidínio e uréia (desnaturantes considerados fortes) são amplamente utilizados e promovem uma diminuição na estabilidade da proteína, proporcional a sua concentração (Shortle & Gerring, 1989). Embora a química da interação entre a proteína e a solução aquosa de uréia ou hidrocloreto de guanidínio não esteja totalmente esclarecida, as evidências passíveis de avaliação pressupõem que estes compostos transformam a água em um melhor solvente para os aminoácidos não-polares ao enfraquecerem as interações hidrofóbicas. Evidências experimentais suportam a conclusão de que em altas concentrações de uréia as proteínas desnaturadas são grandemente desenoveladas mas, ainda assim mantêm uma pequena parte de estrutura residual. Os estudos experimentais dos estados de desnaturação de proteínas têm se deparado com dois fortes obstáculos práticos, sendo o mais sério

aquele em que as condições experimentais de desnaturação são as mesmas que conduzem a um extremo de solubilidade. Este fato torna extremamente difícil a distinção entre estado proteico desnaturado e precipitado. Os métodos aplicados para detecção da estrutura desenovelada provêm informações com baixo nível de resolução tais como viscosidade intrínseca, gel-filtração e espalhamento de luz, que podem determinar o raio de giro da proteína (Shortle, 1989), enquanto que vários tipos de espectroscopia podem monitorar a estrutura secundária e o ambiente que circunda triptofano e tirosina (Kronman et al., 1974).

Os nossos resultados com eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* exposta a diferentes concentrações de uréia, demonstram que as modificações iniciais com precipitação da amostra se dão a concentrações de uréia da ordem de 2 M, apresentando uma evolução de alterações nos intervalos de 4 a 8 M do mesmo agente. A taxa de decaimento para 8 M é de $7,6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. A modificação espectral mais marcante na proteína acontece em concentrações de 4 - 8 M de uréia onde há formação de hemicromo, também visualizada nos experimentos de desnaturação alcalina. Experimentos correlatos com hidrocloreto de guanidínio 6 M (Perussi et al., 1991) demonstraram que existe uma maior exposição de resíduos de triptofano com possíveis alterações no microambiente durante este processo de desnaturação.

Estudos anteriores com eritrocruorina de *Lumbricus*

terrestris mostraram modificação espectral da heme proteína em concentrações crescentes de uréia com decaimento do pico de Soret em 417 nm, cujo $\epsilon \times 10^{-5}$ M em uréia 1 M correspondente a 1,15 decai a 1,12 para 5 M, tornando-se 0,47 para 8 M (Herskovits & Harrington, 1975). Pesquisa recente (Vinogradov, 1991) sobre desnaturação com uréia 4 M em eritrocruorina de *Lumbricus terrestris*, sugere a dissociação do dodecâmero em subunidades contendo heme que mantêm atividade funcional com queda acentuada na cooperatividade, podendo ser reconstituídas à forma nativa quando o agente desnaturante é eliminado por diálise.

Estudos detalhados de alterações estruturais da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* submetida a agentes desnaturantes como, por exemplo temperatura, podem trazer dados essenciais para o esclarecimento da dinâmica conformacional de resistência às situações de "stress" as quais uma oligoproteína está sujeita. Técnicas experimentais avançadas como espectroscopia de NMR ou dicroísmo circular, em especial, poderiam fornecer as perdas de estrutura secundária decorrentes de desnaturação ou mesmo as modificações causadas pela interação com cátions tais como Mn^{++} , complementando os resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos e analisados neste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A.S. & MEIRELLES, N.C. Oxygen binding properties of erythrocrucorin and blood pH of the giant earthworm *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80:53-55, 1985.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. In Haemoglobin and Myoglobin in their reaction with Ligands. North-Holland Publishing Company, Amsterdam and London, 1971.
- ANTONINI, E.; ROSSI-FANELLI, A. & CAPUTO, A. Studies on chlorocruorin. I. The Oxygen Equilibrium of *Spirographis* Chlorocruorin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97: 336-42, 1962.
- ASCOLI, F.; ROSSI-FANELLI, M.R.; CHIANCONE, E.; VECCHINI, P. & ANTONINI, E. Studies in Erythrocrucorin. VI. Ferric Derivatives of Earthworm Erythrocrucorin. *J. Molec. Biol.*, 119: 191-202, 1978.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99, 1987.
- BONAFÉ, C.F.S. Estudos Bioquímicos e Físicos de Hemoglobina Extracelular de *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas-SP*, 1980.
- BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. Preparation of high molecular weight invertebrate hemoglobins. *Meth. Enzymol.*, 76:43-54, 1981.

- CARACELLI, I., MEIRELLES, N.C., TABAK, M., BAFFA FILHO, O. & NASCIMENTO, O. An ESR Study of nitrosyl - *Apolysia brasilliana* myoglobin and nitrosyl annelidae *Glossoscolex paulistus* erythrocrurin. *Biochim. Biophys. Acta*, 955: 315-20, 1988.
- CHIANCONE, E.; BULL, T.E.; NORNE, J.E.; FORSÉN, S. & ANTONINI, E. Studies on Erythrocrurin. V. Nuclear Magnetic Resonance Quadropole Relaxation Study of Sodium, Calcium and Chloride Binding. *J. Molec. Biol.*, 107: 25-34, 1976.
- CHIANCONE, E.; ASCOLI, F.; GIARDINA, B.; VECCHINI, P.; ANTONINI, E.; MUSMECI, M.T.; CINÁ, R.; ZAGRA, M.; D'AMELIO, V. & DE LEO, G. Physicochemical and Functional Properties of *Perinereis cultrifera* (Grube) Erythrocrurin. *Biochim. Biophys. Acta*, 494: 1-8, 1977.
- CHIANCONE, E.; ROSSI-FANELLI, M.R.; ASCOLI, F.; VECCHINI, P. & ANTONINI, E. Studies in Erythrocrurin. VII. Reconstitution of Earthworm Erythrocrurin from the Apoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 535: 150-59, 1978.
- CHIANCONE, E.; BRENOWITZ, M.; ASCOLI, F.; BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. *Amphitrite ornata* Erythrocrurin. I. Structural Properties and Characterization of Subunits Interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 623: 146-62, 1980.
- CHIANCONE, E.; VECCHINI, P. & VERZILI, D. Assembly of Erythrocrurin from the Earthworm *Octolasmus complanatum*. *J. Molec. Biol.*, 172: 545-58, 1984.
- CHUNG, M.C.M. & ELLERTON, D.H. The physicochemical and functional properties of *Abarenicola affinis affinis* (ashworth) extracellular haemoglobin (erythrocrurin). *Biochim. Biophys. Acta*, 702: 6-16, 1982.
- COSTA, M.C.P.; BONAFÉ, C.F.S.; MEIRELLES, N.C. & GALEMBECK, F. Sedimentation coefficient and minimum molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta). *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 21: 115-18, 1988.
- DAVID, M.M. & DANIEL, E. *FEBS Lett.*, 32: 292-95, 1973.

- DAVID, M.M. & DANIEL, E. Subunit structure of earthworm erythrocrucorin. *J. Molec. Biol.*, **87**: 89-101, 1974.
- DE DUVE, C. A spectrophotometric method for the simultaneous determination of myoglobin and hemoglobin in extracts of human muscle. *Acta Chem. Scand.*, **2**: 264-89, 1948.
- DESIDERI, A.; VERZILI, D.; ASCOLI, F.; CHIANCONE, E. & ANTONINI, E. High- and Low-Spin EPR forms of the ferric derivative of earthworm erythrocrucorin. *Biochim. Biophys. Acta*, **708**: 1-5, 1982.
- DILL, K.A. & SHORTLE, D. Denatured States of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**: 795-825, 1991.
- EVERAARTS, J.M. & WEBER, R.E. Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (Polichaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, **48 A**: 507-20, 1974.
- FROSSARD, P. The Erythrocrucorin of *Eisenia foetida*. I. Properties and Subunit Structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **704**: 535-41, 1982.
- FUSHITANI, K.; IMAI, K. & RIGGS, A.F. Oxygenation Properties of Hemoglobin from the Earthworm *Lumbricus terrestris*. Effects of pH, salts and temperature. *J. Biol. Chem.*, **261**(18): 8414-8423, 1986.
- FUSHITANI, K. & RIGGS, A.F. Non-heme protein in the giant extracellular hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 9461-63, 1988.
- GARLICK, R.L. & TERWILLIGER, R.C. The quaternary structure and oxygen equilibrium properties of the vascular hemoglobin of the terebellid polychete *Thelepus crispus* Johnson. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51 A**: 849-57, 1975.
- GARLICK, R.L. & TERWILLIGER, R.C. Structure and oxygen equilibrium of hemoglobin and myoglobin from the Pacific lugworm *Abarenicola pacifica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **57 B**: 177-84, 1977.

- GIARDINA, B.; CHIANCONE, E. & ANTONINI, E. Studies on Erythrocrurin. III. Oxygen Equilibrium of Earthworm Erythrocrurin. *J. Molec. Biol.*, 93: 1-10, 1975.
- GOTOH, T. & KAMADA, S. Subunit Structure of Erythrocrurin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 87: 557-62, 1980.
- HAESER, P.E.; DITADI, A.S.F.; PETERSEN, J.A.; ULHÔA CINTRA, A.B. & SAWAYA, P. Chemical Studies on the Giant Earthworm *Glossoscolex giganteus* (Leuckart). *Comp. Biochem. Physiol.* 16: 491-96, 1965.
- HILL, A.V. citado por ANTONINI, E. & Brunori, M., 1971.
- HAUGHTON, T.M.; KERKUT, G.A. & MUNDAY, K.A. The Oxygen Dissociation and Alkaline Denaturation of Haemoglobins from two species of Earthworm. *J. Exp. Biol.*, 35: 360-68, 1958.
- HERSKOVITS, T.T. & HARRINGTON, J.P. Solution Studies on Heme Proteins: Subunit Structure, Dissociation, and Unfolding of *Lumbricus terrestris* Hemoglobin by the Ureas. *Biochemistry*, 14:(22): 4964-71, 1975.
- IGARASHI, Y.; KIMURA, K. & KAJITA, A. Analysis of oxygen equilibria of the giant hemoglobin from the earthworm *Eisenia foetida* using the Adair Model. *J. Biochem.*, 109: 256-61, 1991.
- IMAI, K. & YOSHIKAWA, S. Oxygen-binding characteristics of *Potamilla chlorocrurin*. *Eur. J. Biochem.*, 147: 453-63, 1985.
- KAPP, O.H. & VINOGRADOV, S.N. Characterization of the 9-10 S subunits of earthworm hemoglobins. *Proceedings of the EMBO workshop "Quaternary Structure of Oxygen Carriers"*. Tours, August, 21-25, 1979.
- KAPP, O.H.; HENRY, R.L. & VINOGRADOV, S.N. Oxygen binding by heme-containing subunits of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980.

- KAPP, O.H.; POLIDORI, G.; MAINWARING, M.G.; CREWE, A.V. & VINOGRADOV, S.N. The Reassociation of *Lumbricus terrestris* Hemoglobin Dissociated at Alkaline pH. *J.Biol. Chem.*, 259.(1): 628-39, 1984.
- KOPPENHEFFER, T.L. & GINSBERG, S.M. A comparative immunochemical study of hemoglobins from the earthworm and horse leech. *Comp. Biochem Physiol.* 61 A: 97-100, 1978.
- KRONMAM, M.J.; HOFFMAN, W.B.; JEROSZKO, J. & SAGE, G.W. Inter- and Intramolecular interactions of α -lactoalbumin. XI. Comparison of the "Exposure" of Tyrosyl, Tryptophyl and Lysyl side chains in the Goat and Bovine Proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 285: 124-44, 1974.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-85, 1970.
- MANGUM, C.P. The oxygenation of hemoglobin in lugworms. *Physiol. Zoology*, 49: 85-99, 1976.
- McCRUTCHEON, F.H. Hemoglobin during the life story of the bullfrog. *J. Cell Comparative Physiology*, 8: 63-81, 1936.
- MEZZASALMA, V.; DI STEFANO, L.; PIAZZESE, S.; ZAGRA, M.; SALVATO, B.; TOGNON, G. & GHIRETTI-MAGALDI, A. Physicochemical and structural properties of the extracellular hemoglobin of *Ophelia bicornis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 829: 135-43, 1985.
- MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; DE PAULA, E.; MARANGONI, S. & MARQUES, M.R.F. Erythrocrurin of *Glossoscolecidae* (Oligochaeta, Glossoscolecidae): presence of disulfide bonds and their relation to ligand properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 B: 203-5, 1985.
- MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, A.R.; DE PAULA, E. MARANGONI, S. & RENNEBECK, G.M. Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) : dissociation at alkaline pH and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron microscopy studies. *Comp. Biochem Physiol.*, 88 A.(2): 377-79, 1987.

- MESSERSCHMIDT, U.; WILHELM, P.; PILZ, O.; KAPP, O.H. & VINOGRADOV, S.N. The Molecular Size and Shape of the Extracellular Hemoglobin of *Nephtys incisa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 742: 366-73, 1983.
- OCHIAI, T. & YASUNORI, E. The Molecular Architecture and the Subunits of Earthworm (*Eisenia foetida*) Hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68 B: 275-79, 1981.
- OCHIAI, T. & YASUNORI, E. Reversible Dissociations from the Molecule to 10S Subunit in Earthworm (*Pheretima communissima* and *Pheretima hilgendorfi*) hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 71 B.(4): 727-29, 1982.
- OCHIAI, T. Dissociation and Oxygen Equilibrium Properties of the Earthworm (*Pheretima hilgendorfi*) Hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226.(1): 111-17, 1983.
- OCHIAI, T. Dissociation and Oxygen Equilibrium Properties of the extracellular hemoglobin of *Eisenia foetida*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 231.(1): 136-43, 1984.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. in Allergy*, 5: 78-82, 1958.
- PATEL, S. & SPENCER, C.P. Studies on the hemoglobin of *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 8:65-82, 1963.
- PERUSSI, J.R., IMASATO, H., TABAK, M. & MEIRELLES, N.C. Fluorescence study of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* erythrocrurin. *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 22: 159-68, 1990.
- PERUSSI, J.R.; SOUZA, A.R.; TINTO, M.H.; IMASATO, H.; MEIRELLES, N.C. & TABAK, M. Oxidation of the Extracellular Hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. In *Invertebrate Oxygen Carriers*, ed. S. Vinogradov & O. Kaap, Springer-Verlag, 1990.
- RENNEBECK, G.M. Estrutura Quaternária da Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas-SP, 1990.

- ROSSI-FANELLI, M.R.; CHIANCONE, E.; VECCHINI, P & ANTONINI, E. Studies on Erythrocrurin. I. Physicochemical Properties of Earthworm Erythrocrurin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 141: 278-83, 1970.
- SANTUCCI, R. & CHIANCONE, E. Oxygen binding to *Octolasmus complanatum* Erythrocrurin. Modulation of Homo and Heterotropic Interactions by Cations. *J.Molec. Biol.*, 179: 713-27, 1984.
- SCHELER, W. & SCHNEIDERANT, L. Über die preparation und die bestimmung des molekulargewichtes wie der konzentration des haemoglobins von *Tubifex tubifex*. *Acta Biologica et Medica Germana*, 3: 588-97, 1959.
- SHLOM, J.M. & VINOGRADOV, S.N. A Study of the Subunit Structure of the Extracellular Hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *J.Biol. Chem.*, 248.(22): 7904-12, 1973.
- SHORTLE, D. & MEEKER, A.K. Residual Structure in Large Fragments of Staphylococcal Nuclease: Effects of Amino Acid Substitutions. *Biochemistry*, 28: 936-44, 1989.
- SHORTLE, D.; MEEKER, A.K. & GERRING, S.L. Effects of Denaturants and Low Concentration on the Reversible Denaturation of Staphylococcal Nuclease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 272: 103-13, 1989.
- SILVA, J.L.; VILLAS-BOAS, M.; BONAFÉ, C.F.S. & MEIRELLES, N.C. Anomalous Pressure Dissociation of Large Protein Aggregates. *J.Biol. Chem.*, 264.(27): 15863-868, 1989.
- STOCKEL, P.; MAYER, A. & KELLER, R. X-ray small angle scattering investigation of a giant respiratory protein hemoglobin of *Tubifex tubifex*. *Eur. J. Biochem.* 37: 193-200, 1963.
- SUZUKI, T. & GOTOH, T. Subunit Assembly of the Giant Haemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J.Molec. Biol.*, 190: 119-23, 1986.

- SUZUKI, T.; TAKAGI, T. & GOTOH, T. Primary Structure of Two Linker Chains of the Extracellular Hemoglobin from the Polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.*, 265.(21): 12168-177, 1990.
- SWANEY, J.B. & KLOTZ, I.M. Properties of Erythrocrucorin from *Cirraformia grandis*. *Arch. Bioch. Biophys.*, 147: 475-86, 1971.
- TABAK, M.; TINTO, M.H.; IMASATO, H. & PERUSSI, J.R. Interaction of Divalent Metal Ions with the Erythrocrucorin of *Glossoscolex paulistus*: an EPR Study.
- TANFORD, C. *Advanced in Proteins Chemistry*, 23:121-282, 1968.
- TERWILLIGER, R.C. Oxygen Equilibria of the Vascular and Coelomic Hemoglobins of Terebellid Polychaete *Pista pacifica*. Evidence for an Oxygen Transfer System. *Comp. Biochem. Physiol.*, 48 A: 745-55, 1974.
- TERWILLIGER, R.C.; TERWILLIGER, N.B. & SCHABTACH, E. Comparison of Chlorocruorin and Annelid Hemoglobin Quaternary Structures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55 A: 51-55, 1976.
- TSUNESHIGE, A.; IMAI, I.; HORI, H.; TYUMA, I. & GOTOH, T. Spectrofotometric, Electron Paramagnetic Resonance and Oxygen Binding Studies on the Hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grube): Comparative Physiology of Hemoglobin. *J. Biochem.*, 106.(3): 406-17, 1989.
- VAN BRUGGEN, E.F.J. & WEBER, R.E. Erythrocrucorin with Anomalous Quaternary Structure from the Polychaete *Oenone fulgida*. *Biochim. Biophys. Acta*, 359: 210-14, 1974.
- VINOGRADOV, S.S.; HERSEY, S.L. & SHUKUYA, R. Subunit of *Limnodrilus erythrocrucorin*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66: 505-13, 1975.
- VINOGRADOV, S.; SHLOM, J.M.; HALL, B.C.; KAPP, O.H. & MIZUKAMI, H. The Dissociation of *Lumbricus terrestris* Hemoglobin: a Model of its Subunit Structure. *Biol. Biophys. Acta*, 492: 136-55, 1977.

- VINOGRADOV, S.; SHLOM, J.M.; KAPP, O.H. & FROSSARD, P. The Dissociation of Annelid Extracellular Hemoglobins and their Quaternary Structure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67 B: 1-16, 1979.
- VINOGRADOV, S. The Structure of Invertebrate Extracellular Hemoglobins (Erythrocruorins and Chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 B.(1): 1-15, 1985.
- VINOGRADOV, S. & KOLODZIEJ, P. The Molecular Weight of the Extracellular Haemoglobin of *Lumbricus terrestris* determined by Electron Microscopy. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91 B.(3): 577-79, 1988.
- VINOGRADOV, S.N.; SHARMA, P.K., QABAR, A.N.; WALL, J.S.; WESTRICK, J.A.; SIMMONS, J.H. & GILL, S.J. A Dodecamer of Globin Chains is the Principal Functional Subunit of the Extracellular Hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. (in press).
- WAXMAN, L. The structure of annelid and mollusc hemoglobins. *J.Biol. Chem.*, 250: 3790-95, 1965.
- WEBER, R.E. On the variation in oxygen binding properties in haemoglobins of lugworms (*Arenicolae, polichaeta*) *Proceedings of the 5th European Marine Biology Symposium, Venice*, pg 231-43, 1962.
- WEBER, R.E. Relations between functional and molecular properties of annelid haemoglobins . Interaction between haems in the haemoglobin of *Arenicola marina* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 179-89, 1970.
- WEBER, R.E. Oxygenation properties of vascular and coelomic haemoglobins from *Nephtys bombergii* (*Polychaeta*) and their functional significance. *Netherlands J. Sea. Res.*, 5: 240-51, 1971.
- WEBER, R.E. Functions of Invertebrate Hemoglobins with Special Reference to Adaptation to Environmental Hypoxia. *Amer. Zool.*, 20: 79-101, 1980.
- WILSON, D.R. & BURR, A.H. Kinetics and mechanism of hemoglobin denaturation in alkali. *Biochim. Biophys. Acta*, 830: 86-94, 1985.