

MARCIO ALBERTO TORSONI

**MULTIPLICIDADE E PROPRIEDADES
FUNCIONAIS DA HEMOGLOBINA DE
GEOCHELONE CARBONARIA (SPIX, 1924)
(TARTARUGA TERRESTRE)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação do
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Biologia da Universidade
de Campinas.

Orientador:
Profa. Dra. Satie H. Ogo
Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia
UNICAMP.

CAMPINAS - SP

1994

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida por (o) candidato a)
Marcio Alberto Torsoni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Satie H. Ogo
25/08/94

T638m
22785/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

**"As mentes organizadas são limitadas, o gênio é aquele
que consegue administrar o caos"**

-Alguém-

A

***meus Pais e minha família,
a Adriana, e sua família.***

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Dra. Satie H. Ogo, minha orientadora, pela paciência, orientação e o incentivo desde o início do programa de pós-graduação.

A Dra. Nilce Corrêa Meirelles, Dra. Lúcia Pereira da Silva e Dr. Sergio Marangoni pelas sugestões, críticas e revisões desta tese.

A Dra. Maria S. A. Matsuura e Dr. Aldo Focesi Jr. pelas sugestões durante a realização dos experimentos e confecção da tese.

Ao Dr. Aníbal E. Vercesi pela disposição que sempre mostrou em auxiliar no desenvolvimento do projeto.

A Ester Rocha pelo auxílio técnico no laboratório e ao Sr. Jaime pelo auxílio dado na manutenção dos animais no biotério.

Aos meus Pais, Laercio e Dionis, a minha família, Marsal, Valéria, Vanessa, Amanda e Rodrigo, pela formação do meu caráter e pelo amor que sinto por eles.

A minha namorada Adriana Nascimento Souza pelas revisões ortográficas, auxílio no laboratório, companherismo e carinho nos momentos mais difíceis.

A família da Adriana, Mario, Silvia, Neto, Angélica, Marli e Vó Ondina pela atenção, carinho e pelos finais de semana que me proporcionaram na presença da família.

Ao Tio Paulinho, Tia Mirian e Juliana que indiretamente também me apoiaram neste trabalho.

Aos amigos André Luís Jacob de Oliveira (**caca**) e Mario Nascimento Souza **Neto**, pela amizade que me proporcionaram, pela paciência que tiveram durante todo o tempo de execução do trabalho e pela colaboração na preparação da tese.

As amigas Daniela, Silvia e Patricia pela hospedagem no início deste trabalho.

A Andréia, Marina e Mirian pela simpatia e eficiência com a qual sempre me atenderam.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, Cláudia, Isabel, Marlene, Mauro e Paulo.

Aos colegas de república, Lima, Hideraldo e Marcelo Jager

A Sub-comissão de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica.

A CONTEP, na pessoa do Sr. Mario Nascimento Souza Filho, pelo auxílio na confecção da tese.

A CAPES, FAEP e FAPESP pelo apoio financeiro do projeto.

A DEUS pela saúde que tenho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
SUMMARY	iii
1- INTRODUÇÃO	01
1.1- LIGAÇÃO REVERSÍVEL DA HEMOGLOBINA COM O OXIGÊNIO	03
1.2- INTERAÇÃO HEME-HEME (COOPERATIVIDADE)	04
1.3- EFEITO BOHR	05
1.4- EFEITO DE POLIFOSFATOS ORGÂNICOS	06
1.5- VARIAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS EM HEMOGLINA	07
2- OBJETIVOS	18
3- MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1- MATERIAL	20
3.2- MÉTODOS	20
3.2.1- OBTENÇÃO DO SANGUE	20
3.2.2- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO	20
3.2.2.1- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO TRATADO COM AGENTE ALQUILANTE (IODOACETAMIDA)	21
3.2.3- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO "STRIPPED"	22
3.2.4- EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO	22
3.2.4.1- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA EQUILÍBRIO	23
3.2.5- ESTIMATIVA DOS VALORES DE Log DE P50 E COEFICIENTE DE HILL	24
3.2.6- ESTUDOS SOBRE O EFEITO BOHR	25
3.2.7- ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE POLIFOSFATOS ORGÂNICOS (ATP E IHP) SOBRE A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO	27
3.2.8- HEMATÓCRITO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NO SANGUE.	27
3.2.9- ELETROFORESE.	28

3.2.9.1-	ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES	28
3.2.9.2-	ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CADEIAS DIFERENTES	29
3.2.9.3-	COLORAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DO GEL	30
3.2.9.4-	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE	30
3.2.10-	SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	31
3.2.10.1-	RESINA DE TROCA CATIÔNICA (CM- CELULOSE)	31
3.2.10.2-	RESINA DE TROCA ANIÔNICA (DEAE- CELULOSE)	32
3.2.11-	IDENTIFICAÇÃO DAS CADEIAS DO "POOL" DE COMPONENTES QUE CONSTITUEM A FRAÇÃO POLIMÉRICA E DAS CADEIAS QUE CONSTITUEM OS COMPONENTES TETRAMÉRICOS QUE NÃO POLIMERIZAM	32
3.2.12-	TITULAÇÃO DE GRUPOS -SH REATIVOS DA HEMOGLOBINA	32
3.2.12.1-	TITULAÇÃO COM p-HMB	33
3.2.12.1.1-	MÉTODO DE PADRONIZAÇÃO	34
3.2.12.1.2-	TITULAÇÃO COM A HEMOGLOBINA	35
3.2.12.1.3-	CÁLCULO	35
3.2.12.2-	TITULAÇÃO COM DTNP	36
3.2.13-	DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLECULAR.	38
4-	RESULTADOS	42
4.1-	EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO COM A HEMOGLOBINA	42
4.1.1-	INTERAÇÃO HEME-HEME	43
4.2-	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP E IHP NA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO	46
4.3-	HEMATÓCRITO E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NO SANGUE	50
4.4-	ANÁLISE DO NÚMERO DE COMPONENTES POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (sem tratamento com iodoacetamida)	51
4.5-	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CADEIAS DE GLOBINA QUE COMPÕEM O HEMOLISADO DE <i>Geochelone carbonaria</i>	54

4.6-	SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	56
4.6.1-	SEPARAÇÃO EM CM-CELULOSE	56
4.6.2-	SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE	60
4.6.2.1-	DETERMINAÇÃO DAS CADEIAS (globina) QUE CONSTITUEM CADA COMPONENTE SEPARADO EM DEAE-CELULOSE	60
4.7-	DETERMINAÇÃO DAS CADEIAS QUE CONSTITUEM O "POOL" DE COMPONENTES COM CAPACIDADE DE POLIMERIZAR E DOS COMPONENTES QUE NÃO APRESENTAM ESTA CAPACIDADE	65
4.8-	NÚMERO DE GRUPOS -SH REATIVOS NO HEMOLISADO "STRIPPED" E HEMOLISADO TOTAL	68
4.9-	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	70
4.10-	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES COM CAPACIDADE DE POLIMERIZAÇÃO	74
5-	DISCUSSÃO	76
6-	PERSPECTIVAS DE ESTUDO DA HEMOGLOBINA DE Geochelone carbonaria	92
7-	CONCLUSÕES	93
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9-	COMUNICAÇÕES CIÊNTIFICAS DECORRENTES DO TRABALHO DE TESE	107

ABREVIATURAS

A	Absorbância
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
CM-Celulose	Carboximetil celulose
DEAE-Celulose	Dietilaminoetil-celulose
2,3-DPG	2, 3- Difosfoglicerato
DTNP	2, 2'- Dítio-Bis (5- nitro-piridina)
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
GTP	Guanosina 5'-Trifosfato
GSSG	Glutationa oxidada
GSH	Glutationa reduzida
Hb	Hemoglobina
IHP	Inositol Hexafosfato
Kav	Coefficiente de partição
nH	Coefficiente de Hill
NTP	Nucleotídeo Trifosfato
P_{CO2}	Pressão de Dióxido de carbono
P₅₀	Pressão necessária para saturar 50% dos sítos para O ₂ da Hb
p-HMB	p-Hidroximercuribenzoato

RESUMO

O hemolisado de *Geochelone carbonaria* apresentou heterogeneidade eletroforética. No hemolisado foram observados 8 componentes e o oitavo componente foi completamente reduzido quando a amostra foi tratada com agente redutor, indicando que tenha sido originado pela polimerização através da formação de pontes de dissulfeto entre as hemoglobinas. O hemolisado tratado com agente alquilante (iodoacetamida), apresentou apenas 3 frações em cromatografia de troca iônica. A determinação das cadeias que constituem estes componentes demonstrou que apenas dois componentes são estruturalmente diferentes e constituídos pelas cadeias de globina $(G_1G_2)_2$ e $(G_1G_3)_2$.

Baixa afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi observada tanto para o hemolisado total como para o hemolisado "stripped". O hemolisado "stripped" na presença de ATP ou IHP, mostrou ligeira alteração com relação ao valor de P_{50} . Em concentrações fisiológicas o efeito destes polifosfatos foi ainda menor. No entanto, o sítio para ligação de polifosfatos mostrou maior afinidade pelo IHP. Todas as formas do hemolisado apresentaram efeito Bohr e os valores de nH foram sensivelmente maiores em pH próximos de 7,5 e em presença de ATP.

A polimerização iniciou-se logo após a hemólise e após 210 dias de estoque do hemolisado "stripped", 73% do hemolisado era constituído pelo polímero maior (256.000 Da) e 27% por hemoglobina tetramérica. O número de grupos -SH reativos encontrados para o hemolisado "stripped" logo após a hemólise (5,3 SH/mol de Hb), corrobora os dados eletroforéticos e de peso molecular. O hemolisado total apresentou 7,3 SH/mol de Hb, logo após a hemólise. A diferença observada entre o hemolisado "stripped" e total, pode ser devido a presença de tióis não protéicos no hemolisado total, possivelmente glutationa. A ligação de glutationa a hemoglobina pode aumentar a heterogeneidade eletroforética, originando componentes GS-SHb. As pontes de dissulfeto mistas foram menos acessíveis ao agente redutor.

SUMMARY

G. carbonaria hemolysate shows electrophoretic heterogeneity. In hemolysate 8 components were observed. The eighth component was completely reduced when the sample was treated with a reducing agent, indicating that it originated through polymerization induced by disulphide bridge formation between hemoglobins. Hemolysate treated with an alkylating agent (iodoacetamide) presented only 3 fraction in ion exchange chromatography. The determination of constituent globin chains demonstrated that only two types of structurally distinct components exist, constituted by globin chains $(G_1G_2)_2$ and $(G_1G_3)_2$.

Low hemoglobin oxygen affinity was observed for total and stripped hemolysate and both were dependent of pH. Stripped hemolysate showed a slight alteration in P_{50} values in the presence of ATP or IHP. In physiological concentration, the effect of these polyphosphate was even smaller. The polyphosphate binding site demonstrated higher affinity for IHP. The nH values were considerably higher in pH close to 7,5 and in the presence of ATP.

Polymerization initiated soon after hemolysis, and after 210 days of stocking the stripped hemolysate showed 73% the larger polymer (256.000 Da) and 27% of tetrameric hemoglobin. The number of reactive -SH groups found for the stripped hemolysate following hemolysis (5,3 SH/moles of Hb) corroborates the electrophoretic and molecular mass data. Total hemolysate presented 7,3 SH/moles of Hb following hemolysis. The observed difference between total and stripped hemolysate may be due to non-proteic thiol, present in total hemolysate, possibly glutathione. The binding of glutathione to hemoglobin can raise electrophoretic heterogeneity, originating GS-SHb components. The mixed disulphide bridges were less accessible to the reducing agent.

1- INTRODUÇÃO

Hemoglobina é uma hemoproteína essencial para a vida de todos os vertebrados, ocorrendo também em alguns invertebrados, nódulos de algumas plantas leguminosas, assim como, em algumas bactérias e etc. Sua ampla distribuição é o resultado de inúmeras mudanças ambientais e fisiológicas pelas quais passaram os organismos ancestrais, resultando em adaptações seletivas da molécula para encontrar diferentes caminhos e satisfazer as necessidades metabólicas dos organismos (FUTUYMA, 1992). As características morfológicas e fisiológicas presentes nos organismos viventes na atualidade, são o resultado cumulativo das características selecionadas que tornaram estes indivíduos melhor adaptados ao ambiente que habitam no momento. Determinada característica estrutural e funcional da hemoglobina, assim como as características fisiológicas de uma espécie, podem não atender os processos adaptativos aos quais está sujeita uma outra espécie que habita um outro ambiente (DOBZHANSKY, 1937). Analisando por este ponto de vista, a hemácia, ou, mais precisamente a molécula de hemoglobina torna-se uma estrutura muito importante cientificamente, por estar exatamente na interface entre as necessidades metabólicas do organismo e o ambiente que seleciona as características moleculares indispensáveis à vida (PRISCO et alii, 1991).

Para que o oxigênio atmosférico, em um determinado organismo, pudesse ser eficientemente transportado dos pulmões para os tecidos, uma série de mudanças na estrutura da hemoglobina foram necessárias, para satisfazer os diversificados organismos existentes.

No curso da evolução, as hemoglobinas têm desenvolvido um mecanismo molecular comum, baseado no princípio de mudança conformacional com a ligação de ligantes. Contudo, muitos organismos têm adquirido características particulares com relação a esta proteína. Isto fica bem claro quando analisamos alguns animais que vivem em condições ambientais extremas, como os animais de regiões muito frias (PRISCO et al., 1991).

A hemoglobina humana é constituída por 4 cadeias polipeptídicas, 2 cadeias α com 141 aminoácidos e 2 cadeias β com 146 aminoácidos. Estas cadeias apresentam estrutura tridimensional similar e um grupo heme inserido em uma fenda hidrofóbica de cada cadeia. O heme é formado por um átomo de ferro II, ligado ao nitrogênio de 4 anéis pirrólicos; o conjunto das 4 subunidades tem massa molecular de 64.000 Da. Acredita-se que as cadeias α e β tenham se originado por uma duplicação gênica ocorrida há pelo menos 400 milhões de anos, e os processos evolutivos que levaram às propriedades respiratórias eficientes encontradas hoje, tenham se iniciado de moléculas de hemoglobina monoméricas que não satisfazem as necessidades fisiológicas de espécies superiores atuais (RIGGS, 1976; POYART et al., 1992). A duplicação gênica ocorrida foi um processo importante na evolução da hemoglobina que, com o surgimento de um segundo tipo de cadeia (tipo α) com alta afinidade pela subunidade primária original (tipo β), conduziu a uma hemoglobina oligomérica com propriedades distintas daquelas encontradas nas cadeias isoladas.

O aparecimento da estrutura quaternária em hemoglobinas trouxe 3 consequências importantes no processo evolutivo das mesmas (POYART et al., 1992):

- 1- Menor afinidade pelo oxigênio;
- 2- Surgimento da cooperatividade na ligação com oxigênio e a origem do comportamento alostérico;
- 3- Possibilidade de ligação preferencial de ligantes citossólicos à deoxihemoglobina, diminuindo a afinidade pelo oxigênio.

1.1- LIGAÇÃO REVERSÍVEL DA HEMOGLOBINA COM O OXIGÊNIO

Em todos os casos, o processo básico comum para proteínas respiratórias é sua capacidade de formar complexos reversíveis com o oxigênio molecular. Esta propriedade, que é um pré-requisito para a sua função, depende de interações específicas entre o grupo prostético e os aminoácidos que constituem a proteína, mais precisamente os aminoácidos que se localizam próximos ao grupamento heme. O ambiente hidrofóbico no qual o grupamento heme está inserido e as histidinas proximal e distal, estabilizam o complexo hemoglobina-oxigênio. CAUGHEY (1967), demonstrou que em hemoglobinas anormais, onde a histidina distal está substituída por um outro resíduo, a velocidade de autoxidação é maior, caracterizando assim, a importância do papel de alguns aminoácidos na ligação do oxigênio.

1.2- INTERAÇÃO HEME-HEME (COOPERATIVIDADE)

A hemoglobina humana combina-se com o oxigênio e o monóxido de carbono cooperativamente. Esta cooperatividade não se dá por qualquer interação direta entre os sítios e o ligante, e sim, por um deslocamento do equilíbrio entre duas estruturas com diferentes afinidades pelo oxigênio, T (tensa) e R (relaxada), com seus sucessivos graus de oxigenação (PERUTZ et alii, 1976; PERUTZ et alii, 1978; PERUTZ, 1979; BALDWIN, 1975). Estas estruturas são distinguidas pelo arranjo interno das 4 subunidades, pelo arranjo de cada subunidade e pelo número de ligações entre elas. Outra característica importante da transição T e R é a diferença de afinidade pelo oxigênio e por efetores alostéricos que cada estado da molécula apresenta. A forma T (tensa) da molécula de hemoglobina apresenta menor afinidade pelo oxigênio, mas liga-se facilmente com polifosfatos, estabilizando sua estrutura; a forma R (relaxada) é caracterizada pela maior afinidade pelo oxigênio e baixa afinidade por fosfato. Os dois estados também apresentam diferenças na afinidade por outros ligantes heterotrópicos, como H^+ , Cl^- e CO_2 , que diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio por deslocarem o equilíbrio em direção ao estado de menor afinidade e estabilizarem a estrutura T (PERUTZ, 1990).

PERUTZ (1970), demonstrou que a combinação do oxigênio com o átomo de ferro muda a estrutura terciária da subunidade, conduzindo a um rearranjo da estrutura quaternária da subunidade, de T (tensa) de baixa afinidade pelo oxigênio, para a estrutura R (relaxada) de alta afinidade pelo oxigênio. A baixa afinidade da estrutura T é devido à existência de inúmeras ligações fracas entre as 4 subunidades, as quais dificultam o movimento do

ferro, necessário para que ocorra a ligação com oxigênio. Na oxigenação estas ligações são quebradas com a liberação de íons hidrogênio que estão ligados ao efeito Bohr. (MONOD et alii, 1965; PERUTZ, 1970)

1.3- EFEITO BOHR

O controle da ligação do oxigênio com a hemoglobina pelo pH é de muita importância por facilitar a troca de gases no sangue. Esta modulação conhecida como efeito Bohr, se dá devido a liberação de H^+ quando ocorre a ligação do oxigênio à hemoglobina e a captação de H^+ quando ocorre a liberação do oxigênio. Este efeito foi descrito por BOHR (1904), que acreditava que o efeito ocorria por ação do dióxido de carbono sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Entretanto, HENDERSON (1920), descobriu que este efeito era devido principalmente ao ácido carbônico, que estava presente no sangue e nos tecidos, doando prótons que se ligavam à sítios específicos da hemoglobina. Os prótons ligam-se à hemoglobina em aminoácidos específicos que são chamados de grupos Bohr; os principais são a valina 1α , lisina 82β e a histidina 146β , na ausência de fosfato, e adicionalmente, as histidinas 2β e 143β , na presença de fosfato (WEBER & JENSEN, 1988). O modelo estereoquímico proposto por PERUTZ (1970), sugere que a histidina 146β é o aminoácido que tem o papel mais importante no efeito Bohr alcalino. Dados de raios X mostraram que o grupo imidazol deste aminoácido forma uma ponte salina com a Asp 94β da mesma cadeia na forma desoxihemoglobina, que está ausente na forma oxihemoglobina ou na metahemoglobina. Em hemoglobinas que apresentam substituição da histidina 146β , como na hemoglobina Hiroshima ($His\ 146\beta \Rightarrow Asp$) e

hemoglobina Conchin- Royal (His 146 β \Rightarrow Arg), o efeito Bohr é sensivelmente menor.

1.4- EFEITO DE POLIFOSFATOS ORGÂNICOS

Estudos recentes demonstraram o papel importante da resposta celular que modula a função da hemoglobina via alteração no microambiente eritrocitário. Um tipo de interação heterotrópica de especial importância é a modulação da afinidade da hemoglobina através de polifosfatos orgânicos. Sabe-se que um grande número de espécies de vertebrados apresentam hemoglobinas com uma maior afinidade pelo oxigênio, quando na ausência dos polifosfatos ligados (BARTLETT, 1980).

Em um estudo clássico RAPOPORT & GUEST (1941), descreveram a natureza e a quantidade de polifosfatos orgânicos presentes nos eritrócitos de um grande número de animais. Seus resultados indicaram alta concentração de DPG em eritrócitos de mamíferos, com exceção de gatos e ruminantes. Em células vermelhas de aves não foi encontrado DPG, mas sim, uma grande quantidade de IHP. Em contraste, os vertebrados ectotérmicos apresentaram o ATP como principal modulador alostérico, sendo que alguns, entretanto, apresentaram GTP e outros NTP (BARTLETT, 1978; HAZARD et alii, 1982).

Em geral, a modulação alostérica exercida por polifosfatos orgânicos ocorre com maior efeito em organismos que apresentam hemoglobinas com alta afinidade intrínscica pelo oxigênio, necessitando, assim, de um fator citoplasmático, como polifosfatos orgânicos, para modular esta afinidade. A

evolução destes organismos pode ter levado à fixação de características moleculares específicas da hemoglobina de uma determinada espécie, para satisfazer às necessidades metabólicas do organismo, dependendo das características morfológicas e do habitat em que vive esta espécie. O processo de seleção de características moleculares da hemoglobina, pode ser particularmente observado quando analisamos os peixes, anfíbios, aves, mamíferos e répteis em separado. Nestes grupos temos variações a nível de morfologia do sistema respiratório e do ambiente que habitam.

1.5- VARIAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS EM HEMOGLOBINAS

Entre os peixes encontramos o mais primitivo grupo de vertebrados vivos, os Ciclostomados (Classe: Agnatha), sendo a lampréia um de seus representantes (BRITTAIN, 1991). Nesta espécie a molécula de hemoglobina é um homopolímero, diferentemente da de vertebrados superiores que são heteropolímeros (BAUER et alii, 1975). Embora muitos trabalhos anteriores tivessem estabelecido a necessidade de heteropolímeros para que a molécula pudesse ser cooperativa (PELLER, 1982; WEBER, 1982), observou-se em lampréias um exemplo de cooperatividade onde encontramos uma forma de alta afinidade pelo oxigênio, o monômero, e uma forma de baixa afinidade, a forma agregada. BRIEHL (1963), observou nesta última, que a afinidade diminui significativamente com a diminuição do pH e com o aumento da concentração protéica. Um aumento da cooperatividade foi observado com a agregação dos monômeros idênticos.

Em hemoglobinas de elasmobrânquios podemos encontrar uma grande variedade de propriedades. Pode ser observado em *Squalus acanthias*, o equilíbrio entre as formas oxigenadas-diméricas e desoxigenadas-tetraméricas (FYHNN & SULLIVAN, 1975). Em outras espécies, tanto a forma oxigenada como a desoxigenada, apresentam-se tetraméricas; por outro lado, algumas espécies apresentam a capacidade de formar *in vitro* moléculas maiores que octâmeros (128.000 d) (FYHNN & SULLIVAN, 1975). Com relação ao comportamento funcional das hemoglobinas de elasmobrânquios, estas são caracterizadas por um marcado polimorfismo associado a uma fraca cooperatividade e modesto efeito Bohr dos componentes (DICKINSON & GIBSON, 1981; BRITTAIN et alii, 1982; WELLS & DAVIE, 1985). Outra característica notável em elasmobrânquios é a presença de altos níveis de uréia no sangue (BROWNING, 1978). Sua concentração está em torno de 0,45 M e a hemoglobina, mesmo nestas concentrações de uréia, apresenta-se estável e sem alteração da sua função. Algumas espécies apresentam hemoglobinas altamente resistentes a elevadas concentrações de uréia (5 M), ao passo que, a hemoglobina humana é sensivelmente afetada nesta concentração de (BONAVENTURA et alii, 1974).

Nos teleósteos as células vermelhas do sangue apresentam um marcado grau de polimorfismo molecular da hemoglobina (FYHNN et alii, 1979) e, na maioria destes peixes, o ATP e o GTP são os principais efetores alostéricos. Em hemoglobinas de trutas encontramos um exemplo clássico de polimorfismo molecular, onde podemos visualizar diferença na função dos componentes. Nesta espécie encontramos 2 componentes principais; o componente I apresenta cooperatividade, é insensível ao ATP e apresenta

efeito de íon cloreto; o componente IV é sensível ao pH e fosfatos orgânicos e apresenta um efeito Bohr acentuado, comumente chamado de efeito Root (BRUNORI et alii, 1975; BOSSA et alii, 1976; PERUTZ, 1983).

Todos os vertebrados apresentam uma transição de hemoglobinas durante as fases de sua ontogenia. Em anfíbios, este processo torna-se interessante pelo fato de ocorrer uma transição de habitat em que vivem, da água na fase larval para a terra na fase adulta, e esta, estar associada a uma mudança na função da hemoglobina. Os anfíbios anuros apresentam uma grande variação de valores de P_{50} com o pH, mas o efeito Bohr é constante tanto para a hemoglobina purificada, quanto para o sangue total (BRITAINN, 1991). Em contraste, os urodelos apresentam independência de pH, fraco efeito Bohr reverso e uma pequena variação de valores de P_{50} (BRITAINN, 1991), mas na presença de fosfatos orgânicos, a hemoglobina destes anfíbios apresenta efeito Bohr normal.

Muitas espécies de aves têm 2 formas de hemoglobinas, sendo normalmente chamadas de componente I ou D, e componente II ou A, que possuem propriedades diferentes. (TAKEI et alii, 1975; BRAUNITZER & GODOVAC, 1982; OBERTHUR & BRAUNITZER, 1984; OBERTHUR et alii, 1981). A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio do componente D é aproximadamente igual à da hemoglobina humana, enquanto que do componente A é muito maior, mas, ambos os componentes, apresentam alto grau de cooperatividade na ligação do oxigênio (VANDECASSERIE et alii, 1973). O ATP e o IHP são encontrados em altas concentrações nas células vermelhas de aves e o IHP tem efeito sobre a função da hemoglobina, sendo este mais acentuado no componente A. Além disso, o IHP possui um importante papel na prevenção da cristalização do componente D, que

também é evitada pela presença do componente A, indicando uma interação molecular intraeritrocitária (BAUMANN et alii, 1986).

Os mamíferos formam um grupo de animais que estão sujeitos a uma menor variabilidade nas condições ambientais. Diferentemente de outros vertebrados, as células vermelhas dos mamíferos são anucleadas e apresentam metabolismo mais simples que as células nucleadas. Virtualmente, todos os mamíferos apresentam hemoglobinas com substancial efeito Bohr, com pequenas variações entre as espécies, e isto se deve, provavelmente, em parte, a uma ligação diferencial de prótons que acompanham a interação com fosfatos orgânicos e, em parte, por diferenças intrínsecas da molécula de hemoglobina de diferentes espécies (TOMITA & RIGGS., 1971). O 2,3-DPG é o fosfato orgânico mais abundante nas células vermelhas dos mamíferos exercendo, em grande número de espécies, efeito sensível sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Já em espécies de não mamíferos, o 2,3-DPG não exerce grande efeito, ou então, está ausente em suas células vermelhas (Bunn, 1971).

Os répteis estão divididos em 3 ordens, a saber, Squamata (lagartos e cobras), Chelonios (tartarugas) e Crocodilia. Entre os répteis encontramos representantes que vivem na terra, ou na água e representantes que vivem na água e na terra. As hemoglobinas dos répteis diferem das de outros vertebrados em 2 aspectos interessantes: a) em várias espécies de tartarugas, ofídios, lagartos e crocodilos, elas podem polimerizar-se pela formação de pontes de dissulfeto (SULLIVAN & RIGGS, 1967c; REISCHL et alii, 1976); b) ha presença de altos níveis de metahemoglobina no sangue de muitas espécies, incluindo serpentes e tartarugas (POUGH, 1980).

Um aspecto relevante que merece destaque é a ocorrência da transição entre as formas diméricas-oxigenadas e tetraméricas-desoxigenadas, observadas em *Liophis miliaris* (MATSUURA, et alii, 1987; MATSUURA, et alii, 1989; FOCESI, et alii, 1990), mecanismo este, atribuído a algumas substituições de aminoácidos que se encontram na interface de contato das subunidades $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$. Este ofídio de hábito aquático apresenta ausência de cooperatividade quando na forma "stripped" e valor de P₅₀ bastante baixo. Na presença de ATP, o equilíbrio entre as formas T e R está deslocado para o estado T (forma tetramérica), a afinidade diminui significativamente e a molécula mostra-se cooperativa.

Em Crocodilia, *Crocodylus porosus*, a modulação alostérica não é exercida por fosfatos orgânicos como na maioria dos vertebrados superiores. O eritrócito deste réptil contém baixos níveis de fosfatos orgânicos e a modulação da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é exercida pelo íon bicarbonato, que pode se ligar a dois sítios existentes na hemoglobina tetramérica (BRITTAIN & WELLS, 1991).

A heterogeneidade funcional e estrutural da hemoglobina de répteis, aliada a grande diversidade de habitat aos quais estes animais estão adaptados, torna este grupo particularmente interessante no estudo da função e estrutura da hemoglobina.

Os quelônios constituem dentro da classe dos répteis, um compacto e distinto grupo taxnômico. A maioria das famílias evoluíram a partir do Cretáceo, há mais ou menos 135 milhões de anos. É sabido que muitas espécies de répteis apresentam hemoglobinas com a capacidade de polimerizar-se *in vitro*, particularmente observado em algumas espécies de quelônios (SULLIVAN et alii, 1967a, c).

RIGGS et alii (1964), demonstraram que a hemoglobina da tartaruga *Chelidra serpentina*, do anfíbio *Rana catesbiana* e algumas linhagens de camundongo, polimerizavam *in vitro*. SULLIVAN et alii (1964), também observaram a polimerização da hemoglobina de tartaruga de água doce, *Pseudemis scripta elegans*. A polimerização nesta espécie de tartaruga é acompanhada por altos níveis de metahemoglobina. Contudo, a metahemoglobina estava também presente na fração não polimerizada do hemolisado.

A presença de hemoglobinas com capacidade de polimerizar-se está associada a presença de grupos SH reativos. O hemolisado de *Phrynops hilarii* apresenta dois componentes de hemoglobina com mobilidades eletroforéticas diferentes (REISCHL et alii, 1979). Nesta espécie de tartaruga foram encontrados de 8 a 10 SH reativos por tetrâmero de hemoglobina, sendo que 40% destes grupos sulfidrílicos desapareceram nas primeiras horas após a hemólise (REISCHL et alii, 1984). O desaparecimento dos grupos SH reativos foi acompanhado pela polimerização de tetrâmeros de hemoglobina através da formação de pontes de dissulfeto intertetrâmeros. SULLIVAN et alii (1967 c), demonstraram que das espécies por eles estudadas, mais de 50 espécies apresentavam polimerização pela formação de pontes de dissulfetos intertetrâmeros. Isto foi também observado em hemolisados de outras espécies de répteis, anfíbios e elasmobrânquios (SULLIVAN, 1974 a,b; FYHN & SULLIVAN, 1975). A ausência de um ambiente redutor parece contribuir para a formação de pontes de dissulfetos intertetrâmeros, o que pode ser visualizado através dos resultados obtidos por SULLIVAN & RIGGS (1964). Quando os eritrócitos de *Pseudemys scripta elegans* foram incubados com o plasma por alguns dias, o componente polimérico foi quase

completamente reduzido e o nível de metahemoglobina diminuiu sensivelmente, demonstrando que a polimerização é um processo reversível.

Hemoglobinas ricas em SH reativos ocorrem muitas vezes em espécies animais que apresentam alta resistência a hipóxia (REISCHL et alii, 1984). Foi também sugerido por REISCHL (1986), que este processo envolve um mecanismo de tamponamento redox minimizando a ação de agentes oxidantes sobre o grupamento heme e a membrana do eritrócito, considerando-se a reversibilidade da ligação de dissulfeto, como demonstrado por RIGGS (1964).

Além da formação de pontes de dissulfeto entre tetrâmeros, as hemoglobinas podem também formar pontes de dissulfeto mistas entre grupos -SH da hemoglobina e grupos -SH não proteico, provavelmente de glutathione, que resultam em maior heterogeneidade eletroforética, como ocorre em *Phrynops hilarii* (REISCHL et alii, 1984; REISCHL, 1986). O estudo de hemoglobinas que apresentam capacidade de polimerizar, torna-se importante do ponto de vista comparativo, tendo em vista o possível papel de tamponamento redox destas hemoglobinas na adaptação dos vertebrados a novos ambientes e nos processos evolutivos, como a transição da água para a terra (REISCHL, 1986).

A polimerização de hemoglobinas *in vitro* pode originar moléculas maiores que octâmeros (512.000 Da), através da ligação de hemoglobinas tetraméricas (64.000 Da) por pontes de dissulfeto. Em hemoglobina de *Phrynops hilarii*, estocada a -20° Celsius, foram encontradas moléculas de 1x, 2x e 5x a massa molecular do tetrâmero, que foi quase totalmente revertido ao tetrâmero normal de 64.000 Da, após o tratamento com um agente redutor (REISCHL et alii, 1984).

A modulação alostérica exercida por fosfatos orgânicos e outros moduladores da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi investigada por vários autores com diferentes espécies de répteis. Foi observado a presença de diferentes tipos de fosfatos orgânicos nos eritrócitos destas espécies, como ATP, GTP, IHP e outros (BARTLETT, 1980). Foi demonstrado que pelo menos parte do ATP que modula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em *Bothrops alternatus*, é proveniente de fosforilação oxidativa em mitocôndrias funcionais presentes em seus eritrócitos (OGO et alii, 1993).

A magnitude do efeito de fosfatos orgânicos sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia em diferentes espécies. Nas tartarugas marinhas, "green turtles" (*Chelonia mydas*) e "loggerhead turtles" (*Caretta caretta*), o IHP é o modulador da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio mais efetivo, sendo mais sensível em "green turtles" que em "loggerhead turtles" (LUTZ & LAPENNAS, 1982). Segundo WELLS & BALDWIN (1994) o efeito deste polifosfato orgânico é pequeno e pode ser ainda menor *in vivo*, devido a formação do complexo com o íon magnésio.

Estudos funcionais recentes demonstraram que a hemoglobina de "loggerhead turtles" (*Caretta caretta*) tem baixa afinidade pelo O₂, pequena sensibilidade aos efetores alostéricos e temperatura, provavelmente, devido ao fato da molécula estar em uma conformação de baixa afinidade, mesmo na forma oxigenada e na ausência de efetores alostéricos. Os estudos espectroscópicos realizados por GIARDINA et alii, (1992), confirmaram esta hipótese.

McCUTCHEON (1947) trabalhando com soluções de hemolisado "stripped", notou que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio variava de acordo com a atividade das espécies. As espécies marinhas apresentavam

afinidade menor que as de água doce, mas era maior que nas espécies terrestres. Esta tendência também pode ser observada em *Pseudemis scripta* e *testudo graeca* (BURGGREN et alii,1977); porém SULLIVAN & RIGGS (1967), observaram que entre as 50 espécies por eles estudadas, haviam algumas exceções.

O comportamento funcional das hemoglobinas de quelônios está sujeito a uma grande variedade de fatores, como temperatura, pH, atividade metabólica, etc. ROBIN (1962), mostrou que a oxigenação é realizada em uma faixa de pH de 6,5 a 7,5; este fato pode refletir a grande extensão do efeito Bohr encontrado entre os quelônios, caracterizando os diversos graus de adaptação à grande flutuação de pH a que está sujeito o sangue e, conseqüentemente, as hemoglobinas. Em conseqüência, encontramos entre os quelônios propriedades distintas, que tornam difícil estabelecer uma relação entre a sua fisiologia e o seu comportamento. Para a maioria das espécies o valor de nH (interação heme-heme) é dependente do pH, podendo também ser encontradas espécies com valores muito próximos de 1, entre pH 5,0 e 8,0, e espécies com valores mais altos em pH 7,0 (SULLIVAN & RIGGS, 1967c).

WOOD et alii (1978), demonstraram que a temperatura altera o comportamento funcional da hemoglobina de *Malacochercus tornieri*, uma espécie de tartaruga terrestre. Nos espécimes adaptados ao frio, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é menor que em espécimes não adaptados. Outra característica observada nesta espécie, com relação a adaptação ao frio, é a maior concentração de NTP no eritrócito das espécies adaptadas, independentemente da temperatura e do ambiente em que se encontram. A interação heme-heme é também influenciada pela temperatura, alterando os

valores de acordo com o ambiente em que o animal se encontra. O hemolisado "stripped" de tartarugas adaptadas e não adaptadas ao frio, não mostrou diferenças significantes nas propriedades de oxigenação, assim como nas propriedades funcionais dos componentes isolados.

A heterogeneidade observada com relação às hemoglobinas de muitas espécies de vertebrados pode refletir um processo de adaptação do animal a uma maior diversidade de habitat por ele explorado. Em muitas espécies, a heterogeneidade não reflete uma grande variação nas propriedades funcionais das hemoglobinas, como na espécie *Malacochercus tornieri*, que apresenta dois maiores componentes com propriedades funcionais semelhantes (WOOD et alii, 1978). No entanto, algumas espécies apresentam heterogeneidade de componentes com diferentes propriedades funcionais. Isto permite ao animal realizar eficientemente o transporte de O₂, mesmo sob variações de pH, temperatura ou outros fatores moduladores (WEBER et alii, 1976; AGGARWAL & RIGGS, 1969). As diferenças funcionais destes componentes podem apresentar-se de diversas maneiras: componentes que apresentam diferenças de efeito Bohr; componentes com diferente afinidade pelo oxigênio e componentes que são diferentemente sensíveis a modulação alostérica por polifosfatos orgânicos, por exemplo. Esta heterogeneidade funcional é possível, principalmente, pela presença de cadeias de globina diferentes na constituição dos componentes. O número de cadeias de globina presente é muitas vezes constante entre as espécies relacionadas (ABBASI & BRAUNITZER, 1991; RÜCKNAGEL et alii, 1988). Portanto, os estudos destas cadeias, podem fornecer dados importantes com relação à evolução biológica das espécies.

Em alguns quelônios é possível observar 3 diferentes tipos de cadeias de globina, que dão origem a dois componentes tetraméricos, como foi mostrado por RÜCKNAGEL & BRAUNITZER (1988), em *Chrysemys picta bellii*. Nesta espécie, estão presentes 3 tipos de globina, 1 globina do tipo β e 2 globinas do tipo α , sendo a α^D a globina em menor concentração.

RIGGS (1976), conclui que a presença de vários componentes no interior da célula é vantajoso para o animal porque possibilita a ocupação de uma maior diversidade de habitat. No entanto, em algumas espécies ocorrem a presença de múltiplos componentes de hemoglobina com propriedades funcionais idênticas.

2- OBJETIVOS

Com a finalidade de dar continuidade aos estudos dentro de uma linha de pesquisa já estabelecida no laboratório, sobre estrutura e função de hemoglobina de répteis, consideramos os quelônios, um grupo particularmente interessante.

O animal poderia ser mantido no biotério do departamento, aliado ao fato de ser um réptil com uma história evolutiva bastante antiga, apresentar hábitos de forrageamento muito lento e uma heterogeneidade eletroforética, a nível de componentes, mesmo sem sofrer grandes variações ambientais estando muito bem adaptado ao ambiente em que vive. O estudo de transporte de oxigênio pela hemoglobina de quelônios continua escasso especialmente em tartarugas terrestres em que os dados são praticamente inexistentes. Consideramos o estudo desta classe particularmente interessante, pois, além das características acima descritas, chama particular atenção, sua longevidade sendo esta uma das maiores que se conhece. Além disso, o lento "turnover" das hemácias (as células vermelhas do sangue de tartarugas possuem vida média de cerca de 600 a 800 dias em comparação, a cerca de 120 dias no homem) e a grande resistência dos queônios a hipóxia, despertaram nosso interesse em conhecer melhor o sistema de transporte de oxigênio dessa classe de vertebrados.

Assim, o nosso objetivo neste trabalho foi estudar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diversas condições, como por exemplo na ausência e presença de polifosfatos orgânicos que modulam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em outros animais

A espécie escolhida foi *Geochelone carbonaria*, tartaruga terrestre, pertencente à família Testudinidae.

Evidentemente, o conhecimento da estrutura das moléculas responsáveis pelas propriedades funcionais é fundamental, razão pela qual o segundo objetivo deste trabalho foi caracterizar parcialmente a hemoglobina sob o ponto de vista estrutural.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MATERIAL

Os animais foram cedidos pelo Bosque Municipal de Campinas e o trabalho foi realizado utilizando-se espécimens adultos de *Geochelone carbonaria* (SPIX, 1924), pesando em torno de 2 Kg. Os animais foram mantidos durante 45 a 60 dias no biotério do departamento.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- OBTENÇÃO DO SANGUE

O sangue foi obtido por punção cardíaca através de uma modificação do método de STEFHENS & CREEKMORE (1983), com auxílio de uma seringa hipodérmica previamente heparinizada ou na presença de EDTA 10%. O sangue obtido foi imediatamente colocado em banho de gelo, lavado e hemolisado.

3.2.2- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO

O sangue foi centrifugado por 20 segundos em centrífuga Eppendorf 3200, a 28000 rpm, para a separação do plasma. As hemácias foram lavadas

com 3 vezes o volume em NaCl 1,7%. A hemólise das células foi realizada com água destilada ou com tampão Tris-HCl 25 mM contendo EDTA 1mM. Para a maior rapidez e eficiência da hemólise, as células foram maceradas com o auxílio de um bastão de vidro; a suspensão foi, então, centrifugada novamente a 28000 rpm durante 1 minuto. Realizada esta última centrifugação, o sobrenadante foi retirado com muito cuidado para que este não estivesse contaminado com os restos celulares.

Desde a coleta até a hemólise tomou-se o cuidado de manter, sempre que possível, o sangue ou o hemolisado em banho de gelo para evitar níveis indesejáveis de metahemoglobina.

3.2.2.1- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO TRATADO COM AGENTE ALQUILANTE (iodoacetamida).

Uma solução de hemolisado recém preparado total (5 mL) de concentração de 1.3 mM, foi incubada com 5 mL de uma solução de iodoacetamida (356 mg/5 mL ou então 0.38 M) durante 1 hora a 25°C. Após este período, a solução foi dialisada contra tampão tris-HCl 25 mM, pH 7.0, contendo 1 mM de EDTA durante 20 horas a 4°C. Este tampão foi trocado pelo tampão tris-HCl 25 mM, pH 8.3, contendo 1 mM de EDTA, o mesmo tampão utilizado no equilíbrio da coluna de troca iônica (DEAE-celulose). Neste tampão a solução de hemoglobina + iodoacetamida foi mantida a 4°C por mais 20 horas.

3.2.3- OBTENÇÃO DO HEMOLISADO "STRIPPED"

O hemolisado "stripped" foi obtido pela passagem do hemolisado total (solução de hemoglobina, contendo cerca de 120 mg de proteína, obtida após a hemólise e sem tratamento posterior) em uma coluna (2,0 X 20 cm) de Sephadex G-25 previamente equilibrada com uma solução de Tris 25 mM contendo EDTA 1 mM, pH 9,0, e posterior passagem em coluna (1,5 X 15 cm) de "Mixed bed". A realização deste tratamento com o hemolisado total teve como finalidade eliminar os fosfatos orgânicos e possíveis íons que poderiam apresentar efeito sobre o comportamento funcional da hemoglobina. Esta solução foi mantida na geladeira a 4° C até o momento de uso.

3.2.4- EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO

Os experimentos de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio foram realizados pelo método espectrofotométrico (ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958) a 25° Celsius. Soluções de hemoglobina de concentração 50 a 60 μ M (0,6 - 0,8 mg/mL) em tampão Tris-HCl 0,05 M contendo EDTA 1 mM, em vários pH, eram submetidas a um fluxo de nitrogênio até a obtenção da hemoglobina desoxigenada, que era obtida quando a razão entre as absorbâncias em 555 nm e 540 nm alcançava pelo menos 1,20. A curva de saturação da hemoglobina era obtida com adições de volumes conhecidas de oxigênio atmosférico, que se equilibrava com a solução de hemoglobina durante 10 minutos a 25° Celsius. Posteriormente, era obtido o espectro de

absorção em um espectrofotômetro Varian, série 634, de 500 nm a 600 nm da hemoglobina para cada adição de ar. O espectro da oxihemoglobina era obtido após a passagem de uma corrente de ar no interior do tonômetro, e novamente equilibrada a 25° C por 10 minutos. O valor de pH era medido logo após o término de cada experimento.

As curvas de equilíbrio foram determinadas com o hemolisado total, hemolisado "stripped", hemolisado "stripped" na presença de 2 mM de IHP, hemolisado "stripped" na presença de 2 mM de ATP e hemolisado "stripped" na presença de concentrações variadas de IHP e ATP.

3.2.4.1- Preparação das amostras para o equilíbrio:

O estoque do tampão Tris-HCl estava na concentração de 0.5 M contendo 10 mM de EDTA, pH 6,8.

Todas as amostras foram preparadas a partir desta solução como descrito abaixo:

- a) As amostras foram preparadas para um volume final de 3 mL.
- b) Adicionou-se 0.3 mL de tampão Tris-HCl 0.5 M contendo EDTA 10 mM.
- c) Adicionou-se o volume de hemoglobina necessário para que a solução tivesse absorvância de 0.800, em 541 nm, após o volume ser completado para 3 mL com água destilada. O coeficiente de extinção milimolar neste comprimento de onda é 13,8 e, portanto, a concentração da solução de hemoglobina obtida, era cerca de 50 μ M.

d) O equilíbrio da hemoglobina com oxigênio na presença de moduladores alostéricos obedecia o mesmo critério de preparação das amostras, apenas adicionava-se 60 μL de uma solução de ATP ou IHP 0.1 M e depois o volume era acertado para 3 mL.

e) O pH da solução era acertado com uma solução de Tris 1 M.

3.2.5- ESTIMATIVA DOS VALORES DE Log P₅₀ E COEFICIENTE DE HILL.

Para a obtenção dos valores de log P₅₀ e do coeficiente de Hill (nH) a partir das curvas experimentais de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio, foi estabelecido um programa para calcular os valores de log K a partir dos valores de absorbância entre as formas oxi e desoxihemoglobina nos comprimentos de onda 541, 560 e 576 nm; para o cálculo dos valores de log P₅₀ foi utilizado um programa de regressão linear, tomando-se em ordenada os valores de log K (y) e em abcissa os valores de log PO₂ (x). Sendo $y = a + bx$, quando $y = 0$, X representando log P₅₀ é igual a $-a/b$.

O valor de n representa o coeficiente angular da reta. Os dados de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio podem ser apresentados usando vários tipos de gráficos que auxiliam a visualização.

Em nosso caso foi utilizado o gráfico de Hill onde:

$$\log K = \log \frac{Y}{1 - Y} = f(\log PO_2)$$

log K: log da pressão de oxigênio em que a solução de hemoglobina se apresenta com 50% de seus sítios para a ligação do oxigênio saturados.

Y: porcentagem dos sítios totais da hemoglobina já saturados pelo oxigênio para cada adição de ar.

O gráfico obtido (Fig. 01) nos fornece o valor de P₅₀, isto é, a pressão parcial de oxigênio necessária para produzir 50% de saturação dos sítios da hemoglobina com oxigênio. É portanto, uma medida da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

A inclinação da reta nos dá o coeficiente nH (constante de Hill) que representa o grau de interação entre os sítios de ligação na molécula de hemoglobina (Wyman, 1948, 1964).

3.2.6- ESTUDOS SOBRE O EFEITO BOHR

O método experimental para a medida do efeito Bohr envolve valores da afinidade da hemoglobina pelo ligante, ou seja, o valor do log P₅₀ em função do pH. A partir das curvas de associação da hemoglobina com oxigênio para o hemolisado "stripped", hemolisado total e hemolisado "stripped" na presença de 2 mM ATP ou IHP, foi possível determinar o valor de efeito Bohr para cada curva.

O cálculo do efeito Bohr foi realizado pela seguinte fórmula:

$$\text{Efeito Bohr } (\Delta\phi) = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$$

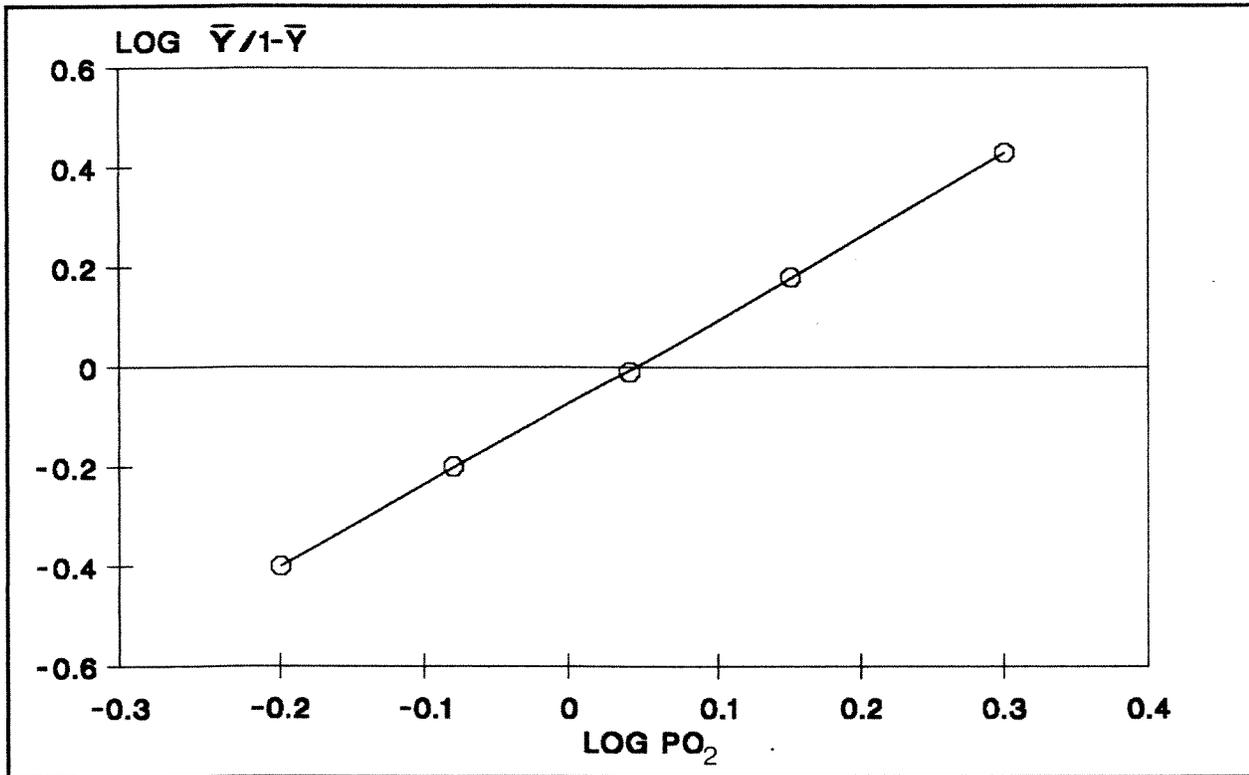


Fig. 01: Gráfico de Hill ilustrativo da ligação do O_2 à hemoglobina. A inclinação da reta determina o valor de nH .

3.2.7- ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO (ATP E IHP) SOBRE A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO

A curva do efeito da concentração de ATP e IHP, foi determinada utilizando o hemolisado "stripped" na presença de concentrações variadas de ATP e IHP a 25° Celsius. A partir de soluções estoques de ATP e IHP foram feitas adições para obter-se uma concentração final de fosfato conhecida.

3.2.8- HEMATÓCRITO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NO SANGUE.

O hematócrito foi realizado com sangue recém coletado com heparina. O sangue dos 9 espécimens foram homogeneizados separadamente com uma agitação suave e, em seguida, coletado em capilares heparinizados e identificados. Os capilares foram centrifugados a 16.000 g, por 10 minutos e posteriormente analisados. O valor foi determinado estimando-se a porcentagem de células sedimentadas em relação ao volume total de sangue no capilar.

A concentração de hemoglobina foi determinada segundo o método de Drabkin, utilizando 100 mg de NaCN e 300 mg de K_3FeCN_6 dissolvido em 1 litro de água (reagente de Drabkin). Uma alíquota de sangue foi dissolvida em reagente de Drabkin para uma diluição conhecida, e a absobância foi determinada em 540 nm ($\epsilon_{mM} = 11.5/\text{heme}$).

3.2.9- ELETROFORESE

3.2.9.1- Eletroforese em condições não desnaturantes:

As análises eletroforéticas das hemoglobinas foram feitas em gel de poliacrilamida, segundo o método de DAVIS (1964) e ORNSTEIN (1964), utilizando para o gel de resolução a concentração de 7,5% e de 3,5% para o gel de concentração. A preparação destes géis foi realizada a partir da mistura das seguintes soluções: solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bisacrilamida), solução B (24 mL de HCl 1 N e 18,15 g de Tris/100 mL), solução C (persulfato de amônio 0,1%), solução D (acrilamida 5% e bisacrilamida 1,25%) e solução E (12,8 mL de H₃PO₄ 1 M e 2,85 g de Tris/100 mL). O gel de concentração continha as soluções D:E:C na seguinte proporção 2:1:2 e o gel de resolução continha as soluções A:B:C na seguinte proporção 1:1:2. Foi utilizado na cuba superior tampão Tris-Glicina 0,05 M, pH 8,9 e na cuba inferior o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1. A corrida foi realizada durante aproximadamente 4 horas, com 28 mA, e cada amostra continha cerca de 30 µg de proteína.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) também foi utilizada para a observação do grau de pureza dos componentes separados por cromatografia em coluna de troca-iônica. Nestes experimentos algumas amostras continham concentrações menores de proteína, devido á baixa concentração das frações obtidas após a separação cromatográfica.

3.2.9.2- Eletroforese em condições desnaturantes para a determinação do número de cadeias diferentes.

Para quantificação do número de cadeias que constituem o hemolisado de *Geochelone carbonaria* foi realizada eletroforese segundo o método de ALTER et alii (1980), na presença de uréia e triton X-100, portanto, em condições desnaturantes. A condição final do gel para a realização do experimento foi a seguinte: 12% de acrilamida; 6 M de uréia; 2% de triton X-100 e 5% de ácido acético. Este gel foi obtido com a adição de 10 ml de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida (60%/0,4%); 2,5 mL de ácido acético glacial; 37,5 mL de uréia 8 M; 0,250 mL de TEMED; 1 mL de triton X-100 e 30 mg de persulfato de amônio (esta solução foi degaseificada antes da adição do persulfato de amônio). O tampão de corrida utilizado foi uma solução de ácido acético a 5%.

Antes da aplicação das amostras foram realizadas 2 pré-eletroforeses com o ânodo no topo, a primeira por 1 hora a 220 V, para a retirada do excesso de persulfato de amônio e íons, e a segunda a 150 V por 1 hora após a adição de 50 μ L de β -mercaptoetanol 1,3 M em cada orifício do gel, com a finalidade de distribuir o agente redutor pelo gel. A cada pré-eletroforese, o tampão de corrida foi trocado por um tampão recém preparado. Durante a corrida contendo as amostras, a amperagem foi mantida constante a 20 mA por 8 horas.

3.2.9.3- Coloração e descoloração do gel.

A coloração dos géis foi realizada pela imersão deste em uma solução de "Comassie blue", durante 4 horas, contendo 1,25 g de "Comassie brilliant blue R" para 250 mL de metanol, 46 mL de ácido acético e 250 mL de água destilada. A descoloração dos géis se deu com uma solução de ácido acético 7% e metanol 14%.

3.2.9.4- Preparação das amostras para eletroforese.

As amostras para eletroforese em condições nativas continham 50 µL de tampão inferior, 100 µL de tampão superior, 50 µL de glicerina. As amostras foram reduzidas utilizando 2 concentrações diferentes de β-mercaptoetanol: em determinados experimentos 24 mM e a hemoglobina em uma concentração em torno de 0,07 mM, portanto, uma razão molar [Hb]:[reductor] de 1:120, ao passo que, em outros, uma concentração em torno de 150 mM de agente redutor, para uma concentração final de hemoglobina na amostra de 0,07 mM e a razão molar [Hb]:[reductor] era >1:2000. Neste último método as amostras também foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente 25°C +/- 0.5.

As amostras para eletroforese em condições desnaturantes foram preparadas a partir de uma solução contendo 5 mL de uréia 8 M, 0,5 mL de ácido acético glacial, 0,5 mL de β-mercaptoetanol 1,3 M e 2 mg de pyronin Y. Amostras contendo 30 µg de proteína foram adicionadas a 50 µL da solução acima.

3.2.10- SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

3.2.10.1- Resina de troca catiônica (CM-CELULOSE).

Em nossas separações a utilização de um gradiente de força iônica mostrou pequena resolução, visto que, o número de componentes separados era menor do que o observado em eletroforese; a melhor resolução foi obtida utilizando tampão de pH crescentes do tipo "step wise". A eluição foi realizada alterando-se o pH do tampão, utilizando-se uma solução de Tris 1 M. O pH do tampão foi alterado a medida que as frações eluíram da coluna, sem que a força iônica fosse mudada. Este método atendeu aos nossos propósitos por ser, a hemoglobina, uma proteína visível durante a eluição da coluna.

Foi utilizada uma coluna (2,5 X 15 cm) de CM-Celulose previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 6,0 contendo EDTA 1 mM, com um fluxo de 30 mL/hora. Foi aplicada uma solução de hemolisado "stripped" contendo cerca de 100 mg de proteína.

O eluato foi coletado em volumes de 2 mL/tubo e a absorbância foi lida em 541 nm em um espectrofotômetro Varian (série 634), para que fosse possível traçar o perfil de eluição. A observação do grau de pureza de cada componente foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2.10.2- Resina de troca aniônica (DEAE-CELULOSE).

Esta resina foi utilizada para a separação dos componentes presentes no hemolisado total de *Geochelone carbonaria* tratado com agente alquilante (iodoacetamida, concentração final de 0.19 M). Uma coluna (2.5 x 15 cm) de DEAE-celulose previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, contendo 1 mM de EDTA. Durante a separação o fluxo foi mantido em 30 mL/hora e a amostra aplicada na coluna continha cerca de 100 mg de proteína. O eluato foi coletado em volumes de 2 mL para que fosse possível traçar o perfil de eluição dos componentes. O perfil foi obtido expressando-se a absorbância de cada tubo a 541 nm, em função do volume total.

3.2.11- IDENTIFICAÇÃO DAS CADEIAS DO "POOL" DE COMPONENTES QUE CONSTITUEM A FRAÇÃO POLIMÉRICA E DAS CADEIAS QUE CONSTITUEM OS COMPONENTES TETRAMÉRICOS QUE NÃO POLIMERIZARAM.

A identificação dos diferentes tipos de cadeias, que constituem os componentes que apresentam capacidade de polimerizar e dos componentes que não apresentam esta capacidade, foi realizada por 2 métodos consecutivos: um primeiro método cromatográfico, seguido de um método eletroforético.

Para a separação cromatográfica, uma coluna (57 x 1,7 cm) de Sephadex G-100 foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM. A amostra continha 26 mg de proteína (hemolisado

"stripped" estocado a 4°C por 138 dias). O fluxo foi mantido em 12 mL/hora. O eluato foi coletado em volumes de 2 mL/tubo e a absorbância lida a 541 nm, para se traçar o gráfico de eluição.

Para a realização do segundo experimento, foram utilizados apenas os tubos contendo o eluato mais concentrado de cada pico de eluição. Com este sistema tentou-se evitar que ocorresse contaminação de amostras de um pico para outro.

As duas frações obtidas a partir desta cromatografia foram analisadas eletroforéticamente segundo o método 3.2.9: primeiramente uma eletroforese em condições nativas, para a determinação dos componentes que constituíam cada fração eluída, e depois uma eletroforese em condições dissociantes para a determinação das cadeias que constituíam cada fração.

3.2.12- TITULAÇÃO DE GRUPOS -SH REATIVOS DA HEMOGLOBINA.

3.2.12.1- Titulação com p-HMB

As titulações dos grupos -SH reativos da hemoglobina foram feitas segundo o método de Boyer, modificado por Benesh & Benesh, (1962). O método é baseado na reação entre o grupamento -SH da hemoglobina com o mercúrio (Hg) do composto p-hidroximercuribenzoato (p-HMB). Esta reação dá origem a um mercapeptídeo que absorve em 255 nm, podendo-se, assim, monitorar a sua formação.

Antes de ser preparada a solução A, uma solução estoque de p-HMB foi preparada através da adição de 8 - 9 mg de p-HMB, 1 mL de NaOH 0.04 M e posteriormente diluída para 25 mL com água. Esta solução foi preparada com agitação constante devido a pouca solubilidade do p-HMB, e estocada a temperatura ambiente. A partir desta solução estoque, uma alíquota de 2 mL foi diluída para 25 mL em tampão acetato de sódio 0.33 M, pH 4,6 (Solução A). Esta solução sempre foi preparada imediatamente antes do início do experimento e titulada com uma solução de concentração conhecida de glutathiona reduzida, recém preparada. Logo em seguida, foi realizada a titulação com a solução de hemoglobina.

Soluções de hemoglobina (hemolisado total e hemolisado "stripped") de concentração 0,55 mM e sem EDTA, foram utilizadas. As mesmas soluções de hemoglobina foram estocadas em geladeira a 4° Celsius para a observação do desaparecimento dos grupamentos -SH com a polimerização.

3.2.12.1.1- Método de padronização

As padronizações das soluções de p-HMB (solução A) foram realizadas com soluções de glutathiona reduzida, 2,4 mM, recém preparadas. O zero do espectrofotômetro (modelo Varian, série 634) foi acertado com tampão acetato de sódio 0,33 M, pH 4,6 na cubeta do branco e na cubeta de reação, no comprimento de onda de 255 nm.

Como branco da reação foi utilizado o mesmo tampão com o qual foi obtido o zero do aparelho, com um volume de 3 mL (cubeta 1); na cubeta 2 foi adicionado 3 mL de solução A. A absorvância do p-HMB foi registrada antes

da primeira adição de glutathione reduzida. Para cada adição de um volume conhecido de solução de glutathione reduzida nas duas cubetas era feita uma leitura após rápida agitação. Várias adições foram feitas até atingir o ponto estequiométrico da reação; a partir de uma curva construída com os dados obtidos, pôde-se determinar o volume de glutathione (2,4 mM) necessário para titular a concentração de p-HMB presente na solução no interior da cubeta.

3.2.12.1.2- Titulação com hemoglobina.

A titulação com a hemoglobina foi realizada pelo método descrito para a glutathione. Uma única mudança foi realizada quando o número de grupos -SH reativos na solução de hemoglobina estava muito baixo, o que tornava o volume de hemoglobina total adicionado muito alto, inviabilizando o método. Este problema foi resolvido diluindo-se a solução de p-HMB para 1:2. A curva típica deste tipo de titulação pode ser vista na figura 02.

3.2.12.1.3- Cálculo.

Determinou-se o volume de hemoglobina ou glutathione reduzida adicionado até o ponto estequiométrico da curva (V.Hb ou V.GSH). Multiplicando-se a concentração da amostra pelo volume necessário para titular o p-HMB presente na cubeta tem,-se:

$V.GSH \times [GSH] = \text{concentração de glutathione necessária no interior da cubeta para titular todo o p-HMB. (X)}$

$V.Hb \times [Hb]$ = concentração de hemoglobina necessária no interior da cubeta para titular todo o p-HMB (Y).

X 1 SH

Y Z \Rightarrow $Z = \frac{X}{Y} \times 4 \Rightarrow \therefore z$ -SH /mol de hemoglobina.

O valor encontrado foi multiplicado por 4 devido a concentração da hemoglobina estar expressa em heme.

3.2.12.2- Titulação com DTNP

O número de grupos -SH reativos presentes nos hemolisados também foi determinado por um segundo método baseado na reação do DTNP com os grupamentos -SH livres da hemoglobina e outros grupos tióis presentes na solução de hemoglobina (WINTERBOURN, 1990). Este método utiliza concentrações menores de hemoglobina, da ordem de 5 - 15 μ M (heme). Para 1 mL de solução de hemoglobina foi adicionada 30 μ L de solução de DTNP (1,55 mg/mL em acetona). Após 20 minutos foi lida a absorbância desta solução em 386 nm contra um branco constituído da mesma solução de hemoglobina. A absorbância do DTNP foi subtraída da absorbância da solução de hemoglobina + DTNP e a concentração foi determinada utilizando o $\epsilon_{mM} = 14.0$, em 386 nm. A solução de DTNP foi sempre preparada imediatamente antes da realização do experimento e a concentração da solução de hemoglobina foi determinada diariamente antes de cada dosagem, pelo método de Drabkin (WINTERBOURN, 1990).

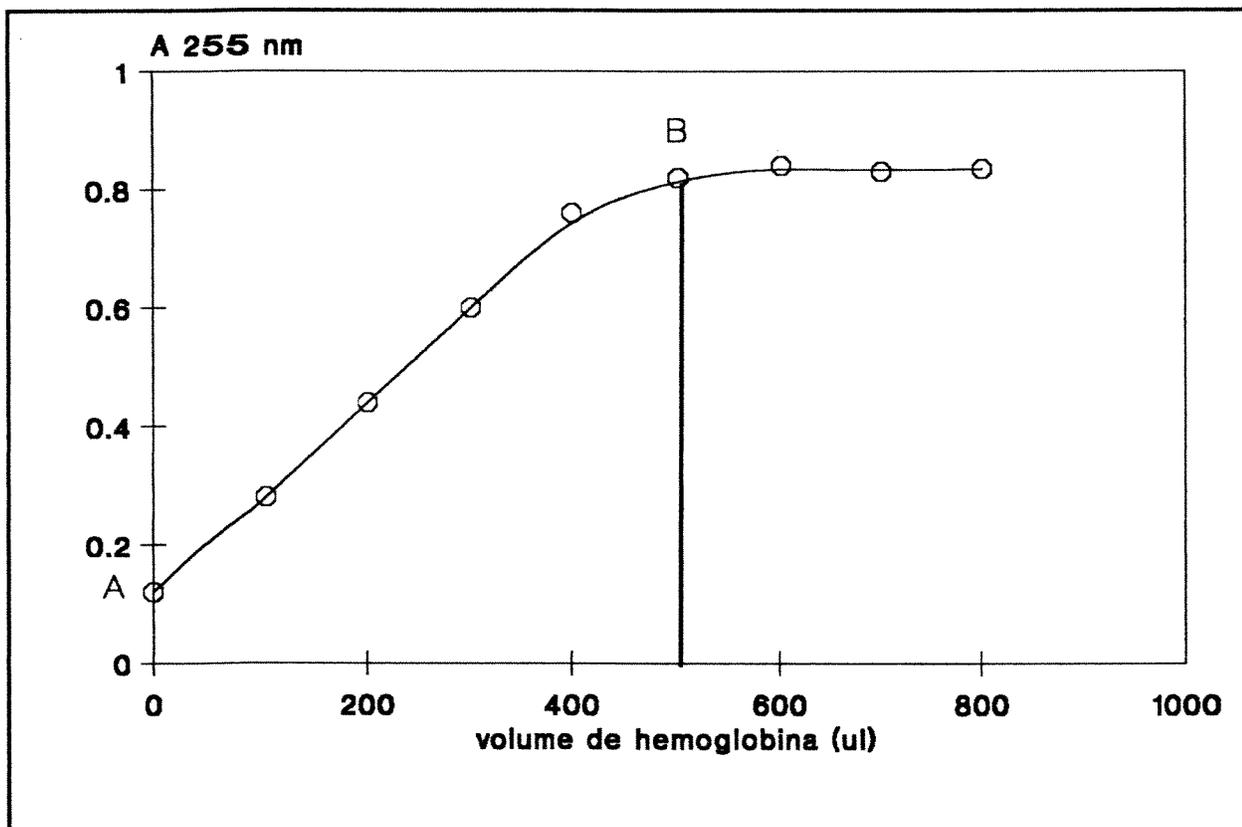


Fig. 02: Curva de titulação típica de grupos -SH disponíveis de hemoglobina. Em (A) temos a absorbância do p-HMB e em (B) temos o ponto estequiométrico da reação.

3.2.13- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-200 (LAURENT & KILLANDER, 1964) foi utilizada para os estudos da massa molecular da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* recém coletada e da hemoglobina estocada a 4°C.

O experimento foi realizado em uma coluna de 2,5 X 100 cm de resina Sephadex G-200, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM contendo EDTA 1 mM, pH 7,5. Foi aplicado em cada experimento cerca de 12 mg de proteína. O fluxo foi mantido em 12 mL/hora durante todo o experimento. A concentração de hemoglobina no eluato foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção milimolar da oxihemoglobina humana em 541 nm que é de 13,8.

Considerando as variáveis V_o , V_e e V_t , foi possível determinar o valor de K_{av} pela seguinte equação (LAURENT & KILLANDER, 1964):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

K_{av} = coeficiente de partição entre a fase líquida e o gel;

V_o = Volume morto, isto é, volume eluído com uma substância que é completamente excluída do gel (blue dextran); massa molecular de 2×10^6 Da.

V_e = Volume do eluente, isto é, volume de eluição de cada uma das frações cujos os valores estão entre V_o e V_t ;

V_t = Volume total do leito do gel, que é calculado pela fórmula do volume do cilindro

$$V = \pi \times R^2 \times H$$

onde;

$$\pi = 3,14$$

R^2 = Raio da coluna ao quadrado

H = Altura

Conhecido o K_{av} de várias substâncias de massa molecular já estabelecido, foi possível construir a curva de calibração da coluna. Para isto foram utilizadas as seguintes proteínas, cujo o perfil de eluição é mostrado na figura 03: Dímero de *Liophis miliaris* (32.000 Da), tetrâmero da hemoglobina humana (64.000 Da), Catalase I (120.000 Da) e Catalase II (240.000 Da), cujos K_{av} foram: 0,64, 0,586, 0,50 e 0.32 respectivamente (Fig.03a).

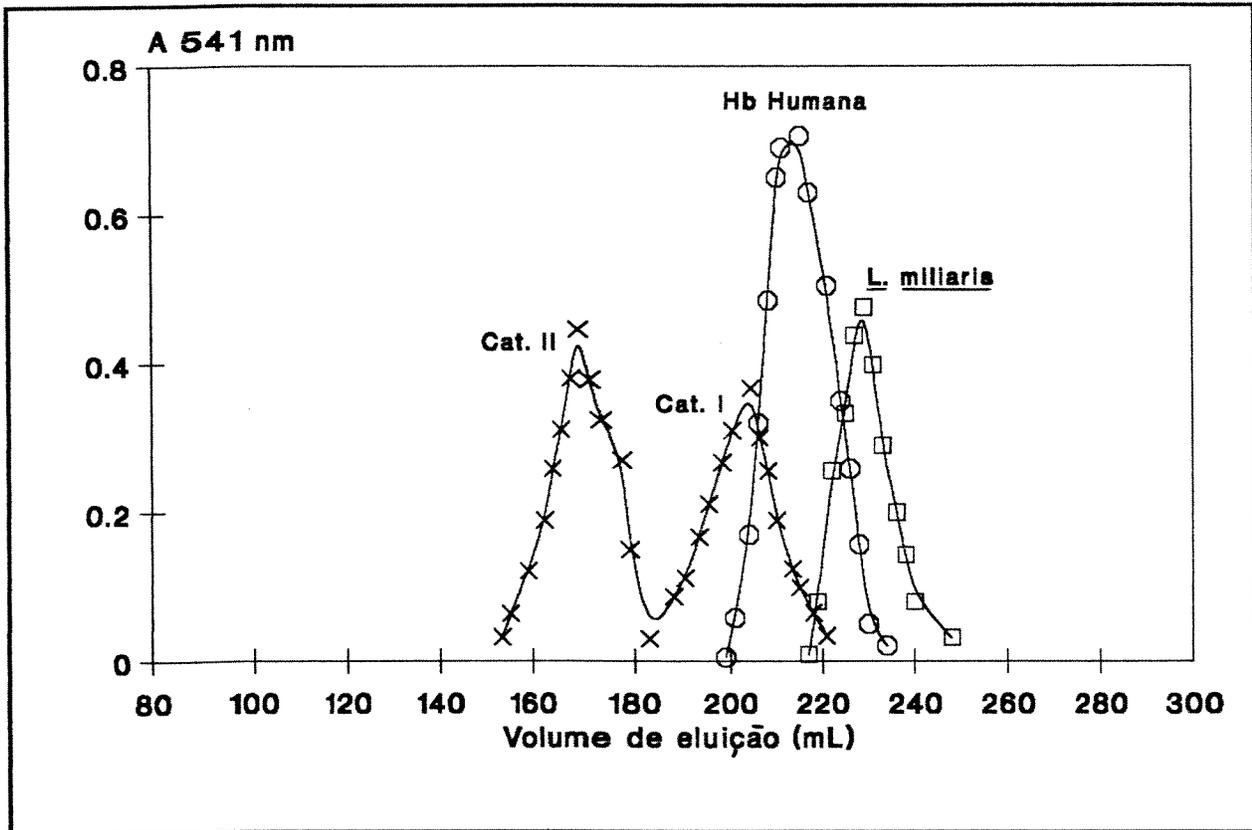


Fig. 03: Perfil de eluição das proteínas de massa molecular conhecida em Sephadex G-200, equilibrada com tampão tris-HCL 25 mM contendo EDTA 1 mM, pH 7,5. Fluxo: 10 - 12 mL/hora. (□) dímero de *Liophis miliaris*, (○) tetrâmero de hemoglobina humana, (X) catalase I e catalase II.

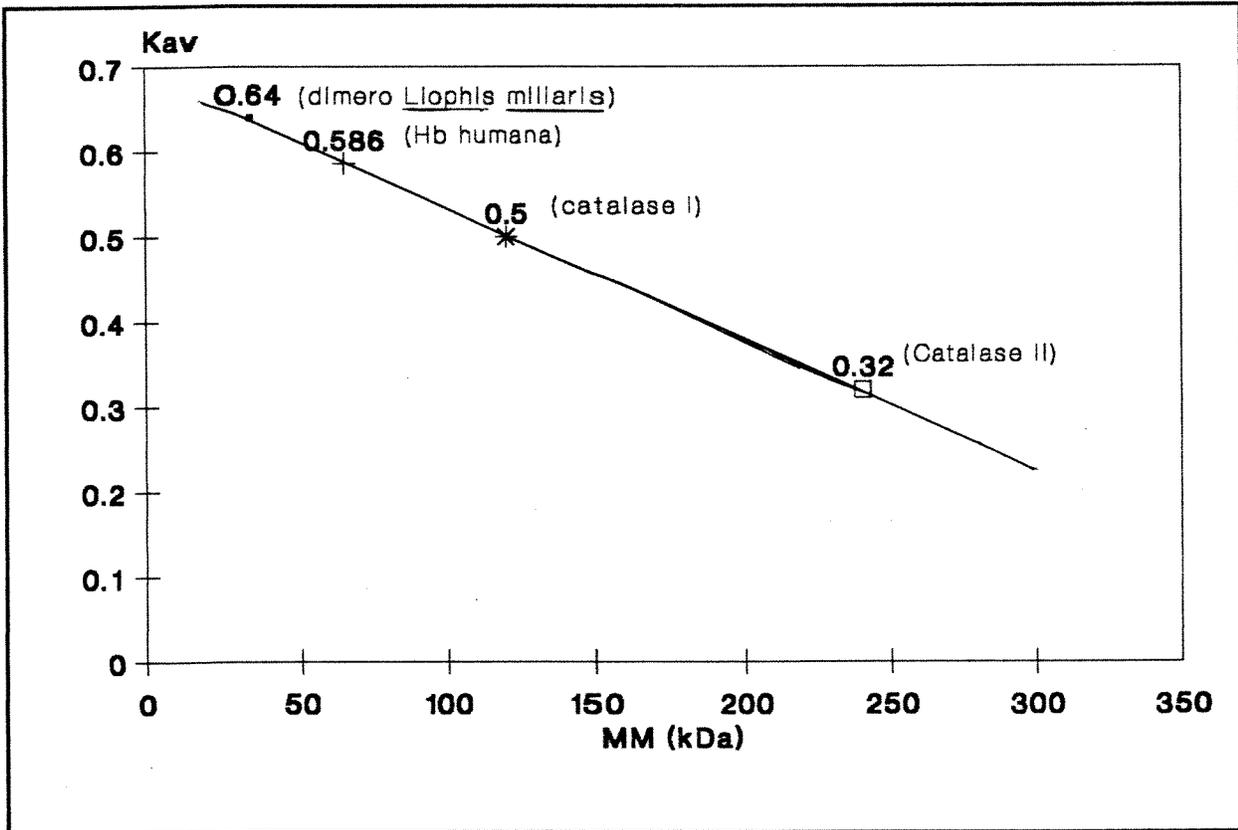


Fig. 03a: Coeficiente de partição (K_{av}) das proteínas de peso molecular conhecido entre a fase líquida e a fase sólida (Laurent & Killander, 1964); (■) dímero de *Liophis miliaris* (32.000 Da), (+) tetrâmero de hemoglobina humana (64.000 Da), (*) catalase I (120.000 Da), (□) catalase II (240.000 Da).

4- RESULTADOS

4.1- EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO DA HEMOGLOBINA

Os estudos do efeito Bohr da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* foram realizados com o hemolisado "stripped", total e "stripped" na presença de 2 mM de IHP ou ATP. Os valores de log P₅₀ obtidos em vários experimentos e calculados pelo gráfico de Hill (Fig. 01) foram expressados em um gráfico, em função dos valores de pH. A partir desse gráfico foram, calculados os valores de efeito Bohr na faixa de pH entre 7,0 e 8,0.

Como mostram as figuras 04 e 04A, a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* apresenta baixa afinidade pelo oxigênio, mesmo na ausência de efetores alostéricos. O hemolisado "stripped" apresentou valor de P₅₀ de 11,5 mmHg em pH 7,0; os hemolisados total e "stripped" na presença de ATP e IHP, apresentaram valores de P₅₀ maiores, 14,79 mmHg, 22,9 mmHg e 35,98 mmHg, respectivamente. A afinidade pelo oxigênio mostrou-se dependente do pH e os valores do efeito Bohr para o hemolisado "stripped", total e "stripped" na presença de efetores alostéricos foram, respectivamente: $\Delta\phi = -0,60$; $\Delta\phi = -0,67$; $\Delta\phi$ (ATP) = -0,61 e $\Delta\phi$ (IHP) = -0,67 (Fig.04, 04A)

4.1.1- INTERAÇÃO HEME-HEME

A hemoglobina de *Geochelone carbonaria* mostrou-se cooperativa, com valores de nH maiores na presença de efetores alostéricos e no hemolisado total. Foi também observada uma tendência bifásica dos valores de nH. O efeito do ATP sobre a cooperatividade foi ligeiramente maior do que do IHP (Fig 04A). No entanto, ambos demonstraram efeito sensível sobre a cooperatividade.

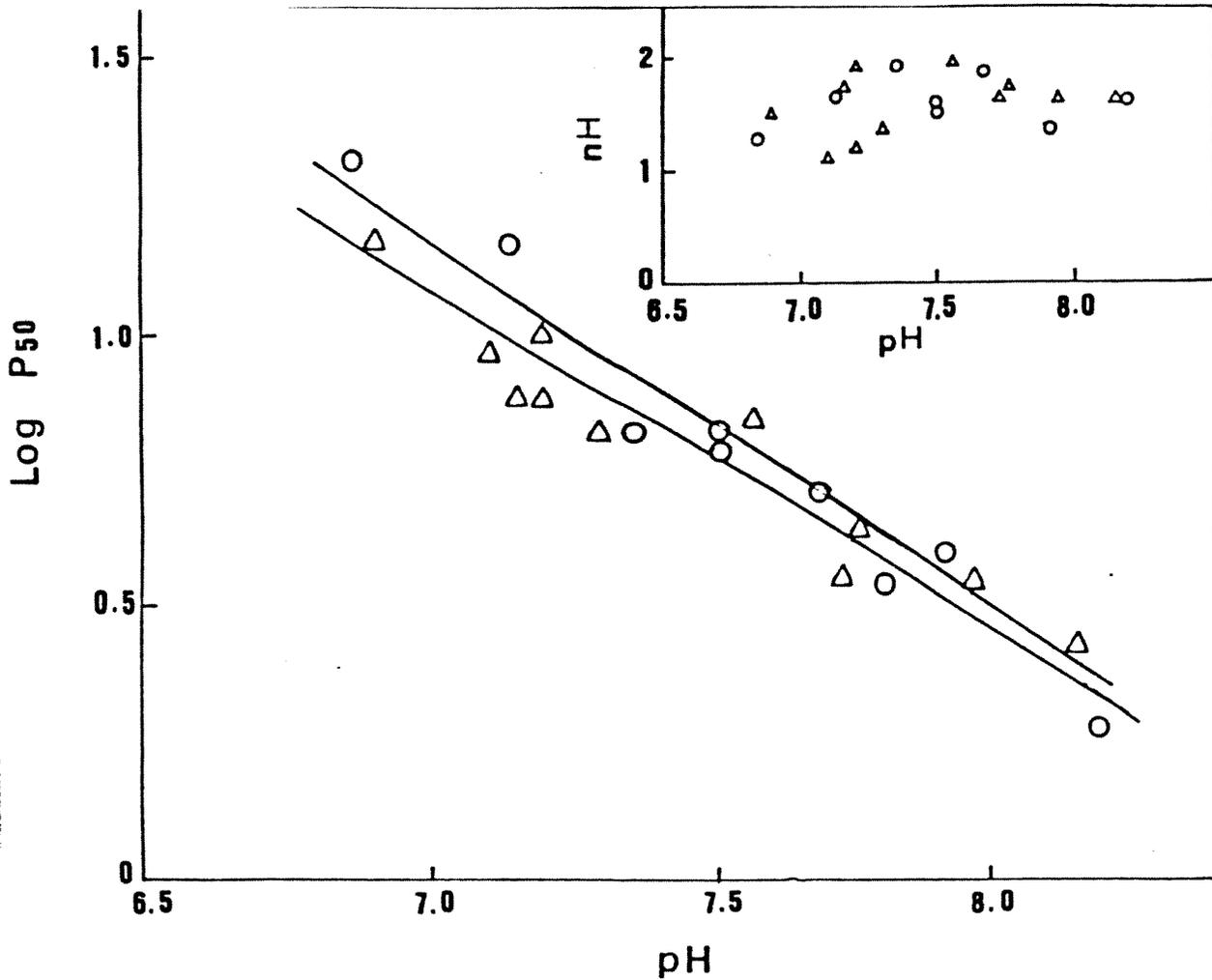


Fig. 04: Afinidade da hemoglobina pelo oxigênio expressa em log P50 em função do pH e valores de nH, para a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Solução de hemoglobina a $60 \mu\text{M}$ (heme) em tampão tris-HCl $0,05 \text{ M}$, contendo 1 mM de EDTA. (Δ) hemolisado "stripped", (O) hemolisado total.

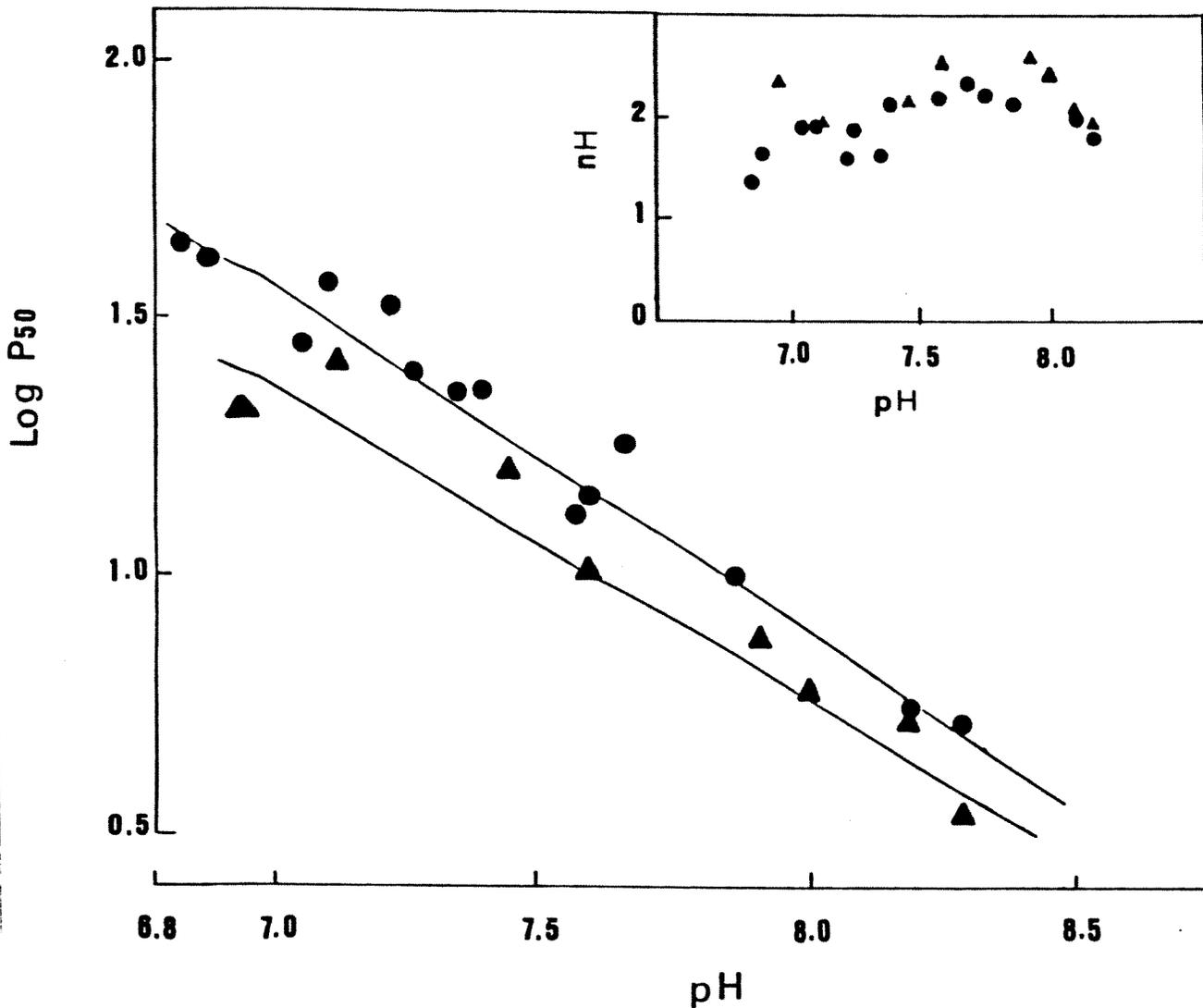


Fig. 04a: Afinidade da hemoglobina pelo oxigênio expressa em log P₅₀ em função do pH e valores de nH, para a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* a 25°C ± 0,5. Solução de hemoglobina a 60 μM (heme) em tampão tris-HCl 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA. (▲) hemolisado "stripped" na presença de 2 mM de ATP; (●) hemolisado "stripped" na presença de 2 mM de IHP.

4.2- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP E IHP NA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO OXIGÊNIO.

Para observar o efeito da concentração de efetores alostéricos sobre a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* foi escolhido o pH 7,2, por este estar próximo do pH fisiológico do animal e neste pH, o ATP e o IHP apresentarem efeito considerável sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

Como pode ser visto pela fig. 05 e 05a e tabela 01, o efeito do ATP e do IHP mostraram-se diferentes sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A menor concentração na qual o IHP apresentou o maior efeito (0,05 mM) (C), foi 6 vezes menor que a concentração na qual o ATP apresentou o maior efeito (0,3 mM) (D). O valor de log de P_{50} , em concentrações saturantes é 21,6% maior para o IHP.

É interessante observar, também, que o sítio para o fosfato na hemoglobina, apresenta maior afinidade para o IHP do que para o ATP. O IHP mesmo em baixas concentrações, da ordem de 0,010 mM, que corresponde a uma razão molar de Hb:IHP de 1,5:1 (razão fisiológica para a concentração de IHP) (ponto A na Figura 05a), mostrou ligeira alteração no valor de log de P_{50} . No entanto, com ATP em razão molar fisiológica de 1:1 (ponto B na Figura 05a), nenhum efeito foi observado.

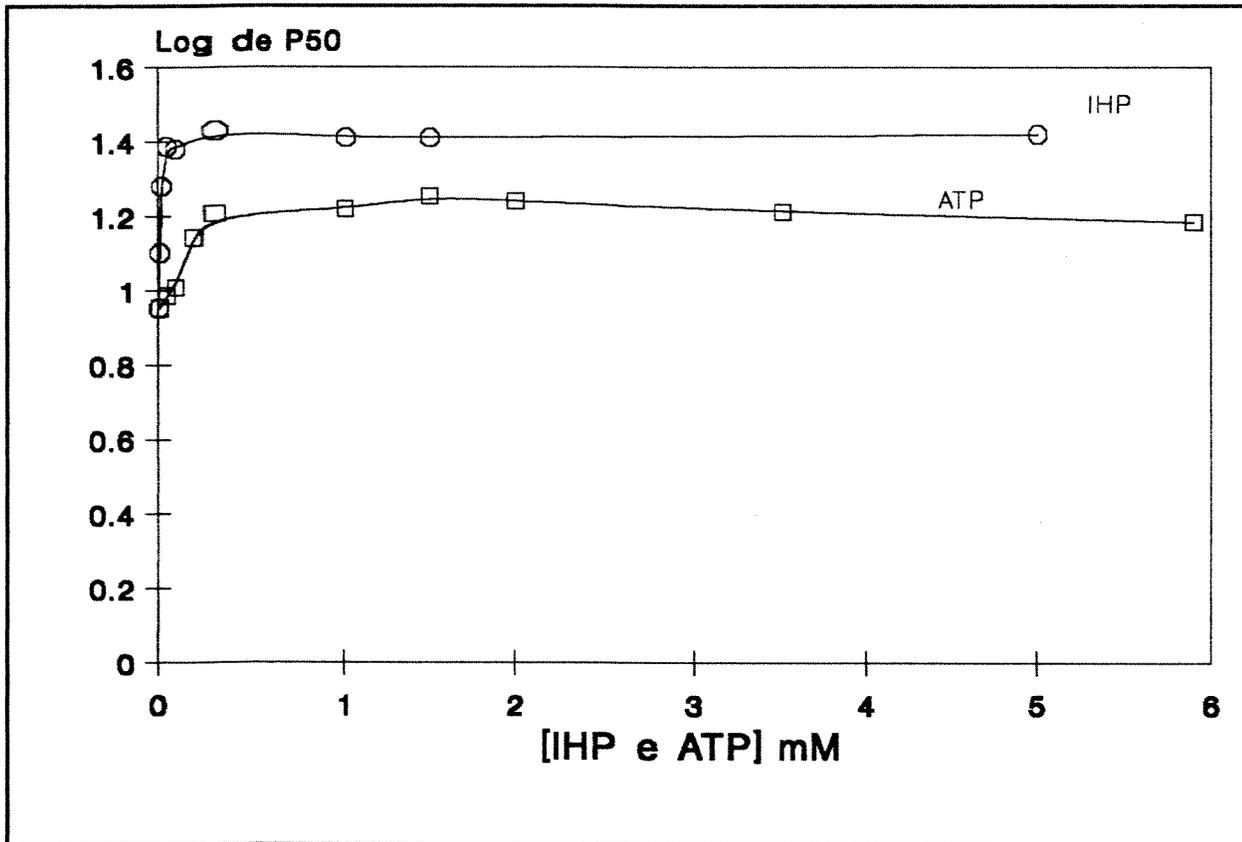


Fig. 05: Efeito da concentração de ATP (□) e IHP (O) sobre a afinidade da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* pelo oxigênio. Concentração final de hemoglobina de 60 μ M (em heme). Tampão tris-HCl 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA, pH 7,2. Temperatura 25°C \pm 0,5.

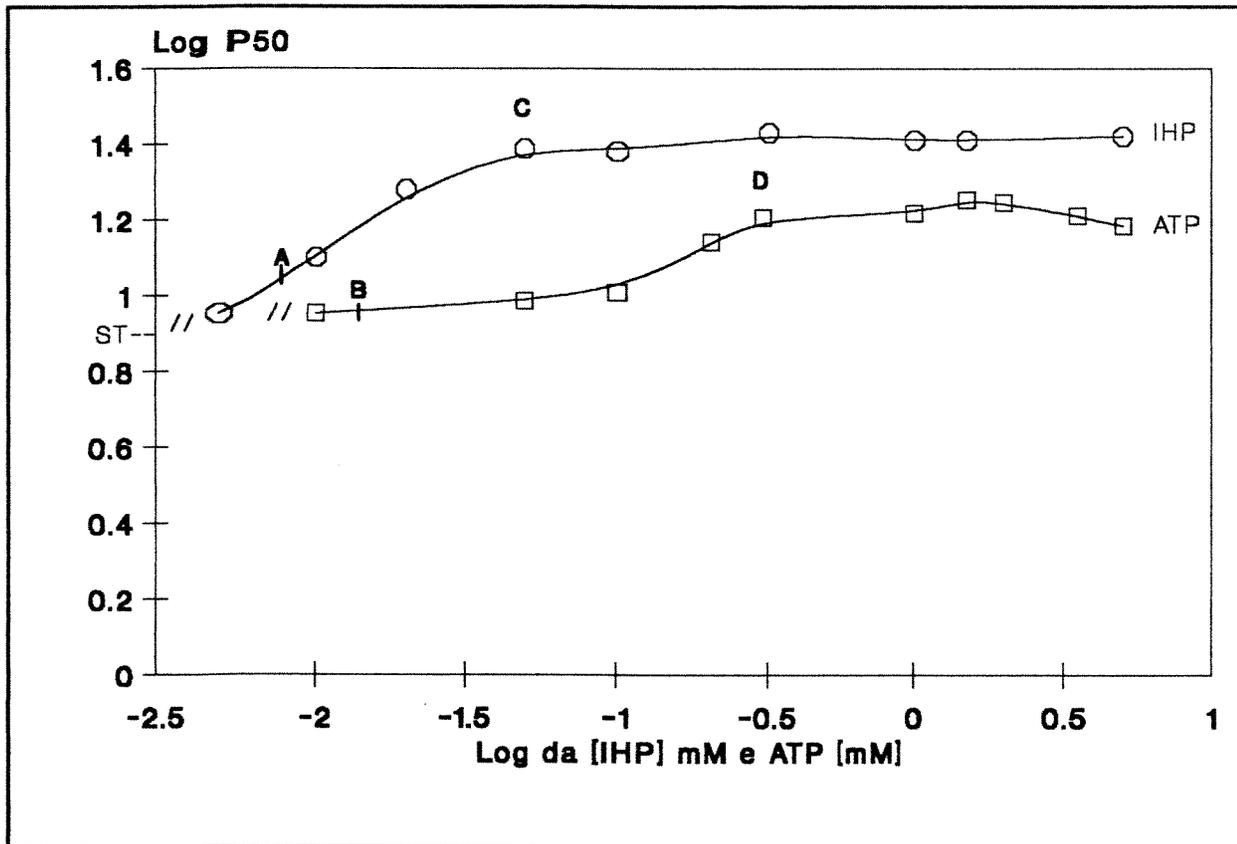


Fig. 05a: Efeito da concentração de ATP (\square) e IHP (\circ) sobre a afinidade da hemoglobina de *Geochelone carbonaria*. Valores em abcissa (X) expressos em log da concentração em mM dos polifosfatos orgânicos; (A) razão molar fisiológica para o IHP; (B) razão molar fisiológica para o ATP; (C) concentração de maior efeito do IHP, (D) concentração de maior efeito do ATP e (ST) valor do Log de P₅₀ no pH 7,2 para o hemolisado "stripped".

Tabela 01: Valores de log de P₅₀, obtido a partir dos experimentos de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio na presença de ATP e IHP em concentrações diferentes.

Concentração de ATP (mM)	Log de P₅₀
0,1	1,008
0,2	1,142
0,3	1,207
1,0	1,218
1,5	1,253
2,0	1,24
3,5	1,21
5,0	1,184

Concentração de IHP (mM)	Log de P₅₀
0,005	0,953
0,01	1,101
0,02	1,28
0,05	1,387
0,1	1,38
0,3	1,43
1,0	1,41
1,5	1,41
5,0	1,42

4.3- HEMATÓCRITO E CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA NO SANGUE.

O hematócrito foi realizado com o sangue de 9 espécimens, sendo todos os indivíduos utilizados de peso aproximado de 2 Kg. A coleta de material foi realizada sempre na primeira punção de cada indivíduo. Os resultados foram semelhantes entre si, como pode ser visto na tabela 02, com um valor médio de 24 % e desvio padrão de 0,71.

A concentração média de hemoglobina no sangue foi de 3.0 mM (heme), desvio padrão de 0,2, para os 9 indivíduos analisados, com uma concentração média de metahemoglobina de 1%.

Tabela 02: Valores de hematócrito e concentração de hemoglobina no sangue de *Geochelone carbonaria*.

Espécimes.	% de hemácias/volume de sangue total.	de de	concentração Hb (mM) no sangue total.
1	24		3,0
2	25		2,9
3	23,5		3,4
4	25		3,2
5	24		2,8
6	23,9		2,8
7	25		3,0
8	23		3,1
9	24		2,8

4.4- ANÁLISE DO NÚMERO DE COMPONENTES POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (sem tratamento com iodoacetamida).

A determinação do número de componentes que constituem o hemolisado de *Geochelone carbonaria* foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 8,9 (PAGE). Como pode ser visto na figura 06, 8 componentes são distinguíveis eletroforéticamente e estão presentes tanto no hemolisado total quanto na forma "stripped" (os componentes foram enumerados de acordo com a mobilidade eletroforética de I a VIII). O componente VIII apresenta mobilidade eletroforética menor em direção ao ânodo, quando comparado com os demais componentes presentes no hemolisado. O mesmo hemolisado tratado com agente redutor (β -mercaptoetanol) em uma razão de 1:120 ([Hb]:[reductor]) apresentou o oitavo componente totalmente reduzido. Nesta concentração do agente redutor, os componentes restantes não sofreram nenhuma alteração com relação a concentração e a mobilidade eletroforética. Em razões próximas de 1:2000, 2 componentes principais estavam presentes no hemolisado total de *Geochelone carbonaria* (Fig.07). É possível observar que mesmo em concentrações tão elevadas do agente redutor, alguns componentes não foram totalmente reduzidos.

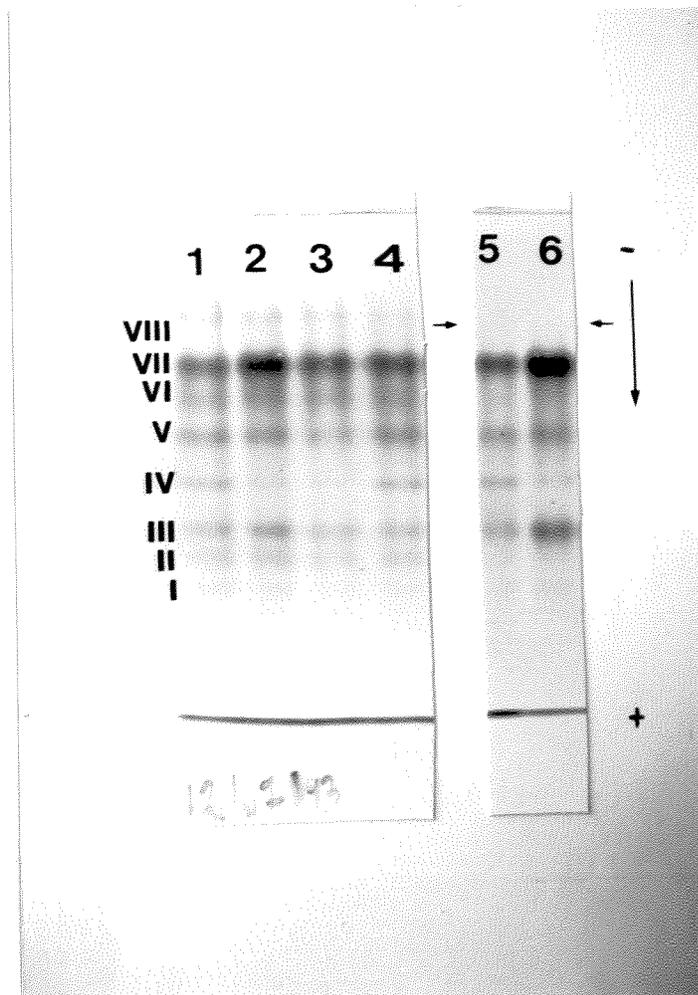


Fig. 06: Eletroforese em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 7,5%. Condições: Vide material e método. Coloração: "Comassie brilliant blue R". Na amostra 5 e 6 o componente VIII está ausente (→)

Amostras:

1, 2, 3 e 4: Componentes de I a VIII do hemolisado total de *Geochelone carbonaria* recém coletado (cerca de 30 µg de proteína).

5 e 6: Componente de I a VII do hemolisado total de *Geochelone carbonaria* recém coletado na presença de β-mercaptoetanol (1:120 = razão molar da [Hb]:[agente redutor]) (cerca de 30 µg de proteína).

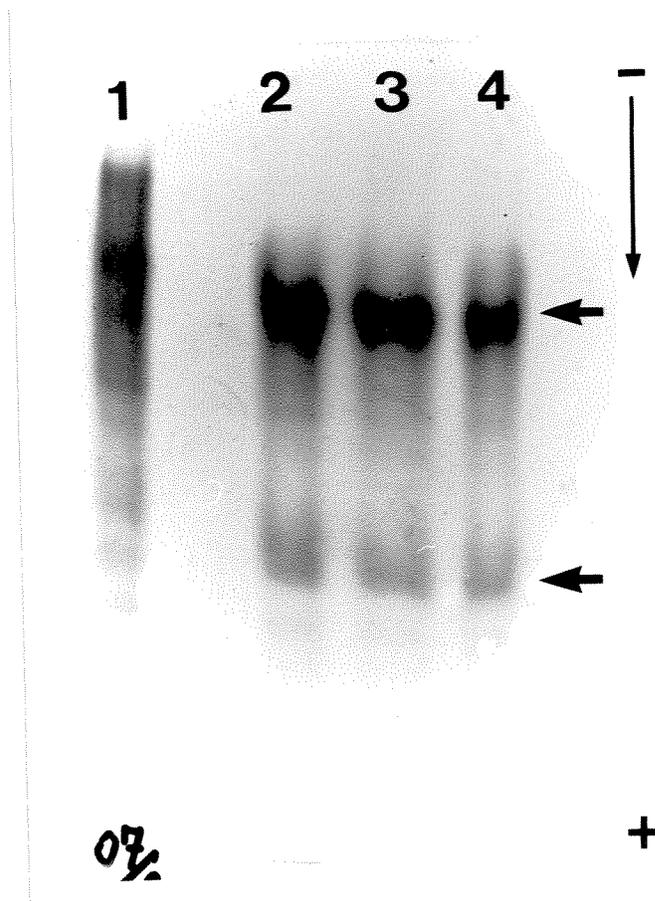


Fig. 07: Eletroforese em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 7,5%. Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R". Amostras: cerca de 40 μ g de proteína por amostra.

1: hemolisado total de *Geochelone carbonaria*.

2, 3 e 4: As setas (\leftarrow) indicam os 2 principais componentes do hemolisado total de *Geochelone carbonaria* tratado com excesso de β -mercaptoetanol (2.000 x).

4.5- DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CADEIAS DE GLOBINA QUE COMPÕEM O HEMOLISADO DE *Geochelone carbonaria*.

Como pode ser observado na figura 08, a eletroforese para determinação do número de cadeias que compõem o hemolisado recém coletado de *Geochelone carbonaria*, mostrou 3 cadeias diferentes quanto a sua mobilidade eletroforética (G_1 , G_2 e G_3).

Uma quarta banda (G_4), com menor mobilidade catódica, é observada no hemolisado 15 dias após a coleta. A mesma banda não está presente no hemolisado recém coletado, mas este apresenta uma banda ($G_{4'}$), com maior mobilidade e em menor concentração que a banda (G_4). Esta banda representa uma associação de cadeias de maneira aleatória que é favorecida pelo pH em que é realizada a preparação das amostras. A banda (G_2) com mobilidade eletroforética intermediária está em menor concentração no hemolisado de *Geochelone carbonaria*, quando comparada com as outras bandas (G_1 e G_3).

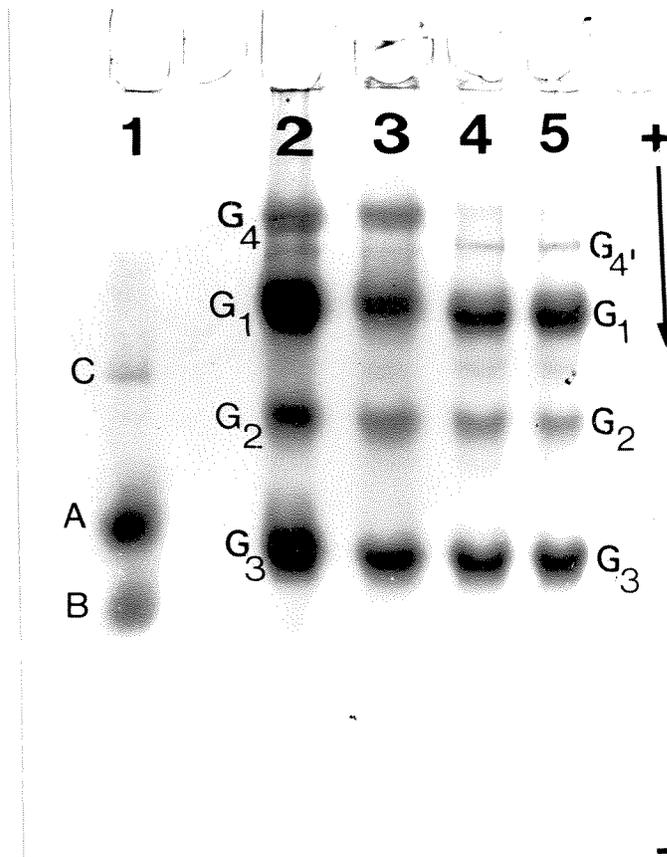


Fig.08: Eletroforese (condições desnaturantes) em gel de poliacrilamida a 12% na presença de uréia 6 M e triton X-100. Condições: vide material e método. Coloração: "Comassie brilliant blue R".

Amostras: 30 µg de proteína.

1- cadeia α (indicada pela letra A), β (indicada pela letra B) e γ (indicada pela letra C) da hemoglobina humana.

2 e 3- cadeias G₁, G₂ e G₃ da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* com 15 dias após a coleta e hemólise e a cadeia G₄ originada possivelmente pela associação aleatória das cadeias.

4 e 5- cadeias G₁, G₂ e G₃ da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* recém coletada e a cadeias G₄' também originada pela associação aleatória de cadeias.

4.6- SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.

4.6.1- SEPARAÇÃO EM CM-CELULOSE.

Os componentes observados em eletroforese de poliácridamida foram separados por cromatografia em coluna de CM-celulose, resultando em 8 frações. Este resultado corrobora os obtidos por eletroforese. A oitava fração foi separada em algumas cromatografias, e corresponde ao componente polimerizado. O perfil mostrado na figura 09, foi obtido a partir do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* dois dias após a coleta e hemólise, e já apresentava o componente polimérico (VIII) representando cerca de 15% da proteína eluída da coluna. As frações foram enumeradas na ordem de eluição e a porcentagem relativa calculada (Fig.09a).

A eletroforese de amostras das frações mais concentradas (IV, V, VI, VII e VIII), separados pela cromatografia de troca-iônica é mostrada na figura 11b. Nesta eletroforese é possível observar que a fração IV, obtida a partir da cromatografia de troca iônica (Fig.09), corresponde, na verdade, ao componente III da eletroforese (Fig.06). Com relação aos componentes V, VI, VII e VIII, ocorre correspondência entre as frações obtidas em cromatografia de troca-iônica (Fig.09) e os componentes visualizados em eletroforese (Fig.09b). Estas frações eluíram da coluna constituídas por apenas 1 tipo de componente eletroforético. A única exceção foi a fração VIII que é uma mistura do componentes eletroforéticos VII e VIII.

As amostras referentes às frações I, II e III não apresentaram resolução tão boa em PAGE quanto as frações restantes, devido a concentração na qual eluíram da coluna.

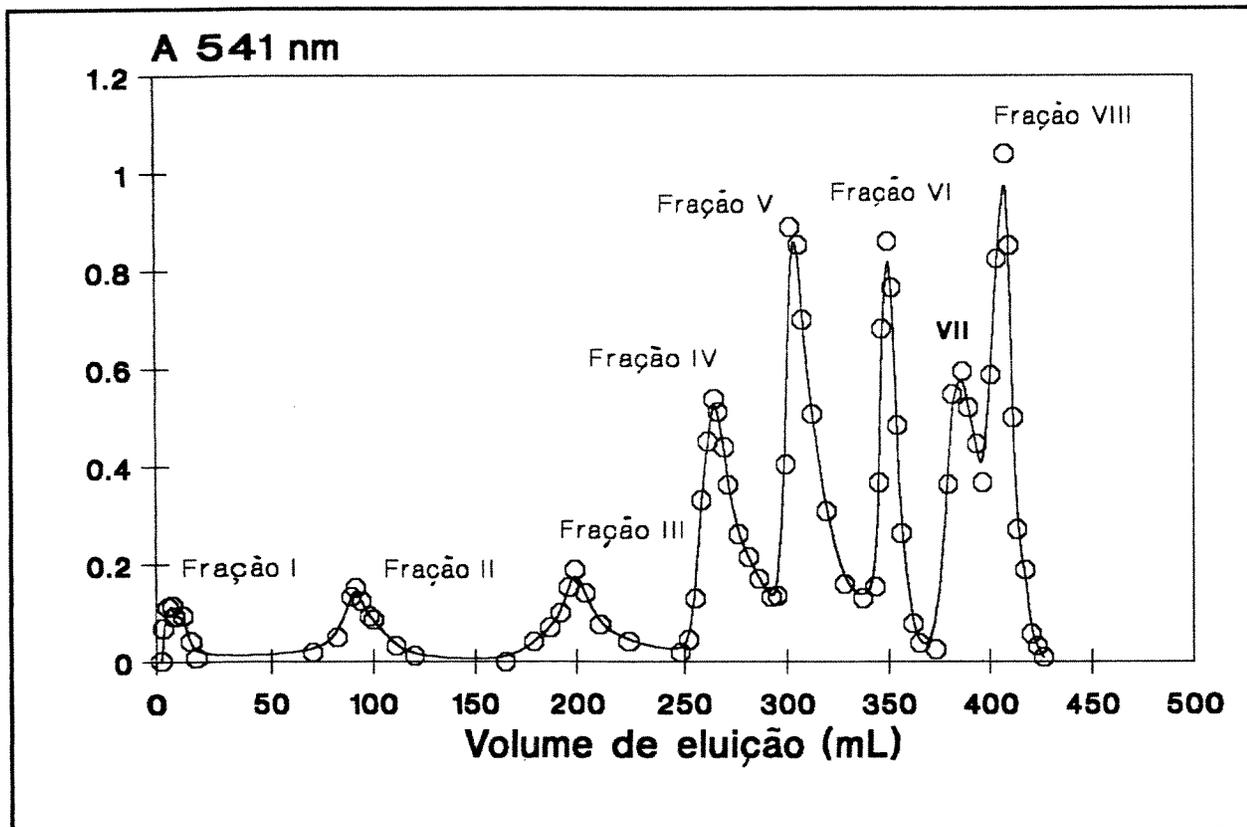


Fig. 09: Perfil de eluição do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* em coluna de troca iônica (CM-Celulose), equilibrada com tampão tris-HCl 25 mM, pH 6,0, contendo EDTA 1 mM. Temperatura 25°C, com fluxo de 30 ml/hora. Amostra: 100 mg de proteína. A eluição foi realizada pela mudança de pH de acordo com o método descrito. As frações foram enumeradas de acordo com a ordem de eluição.

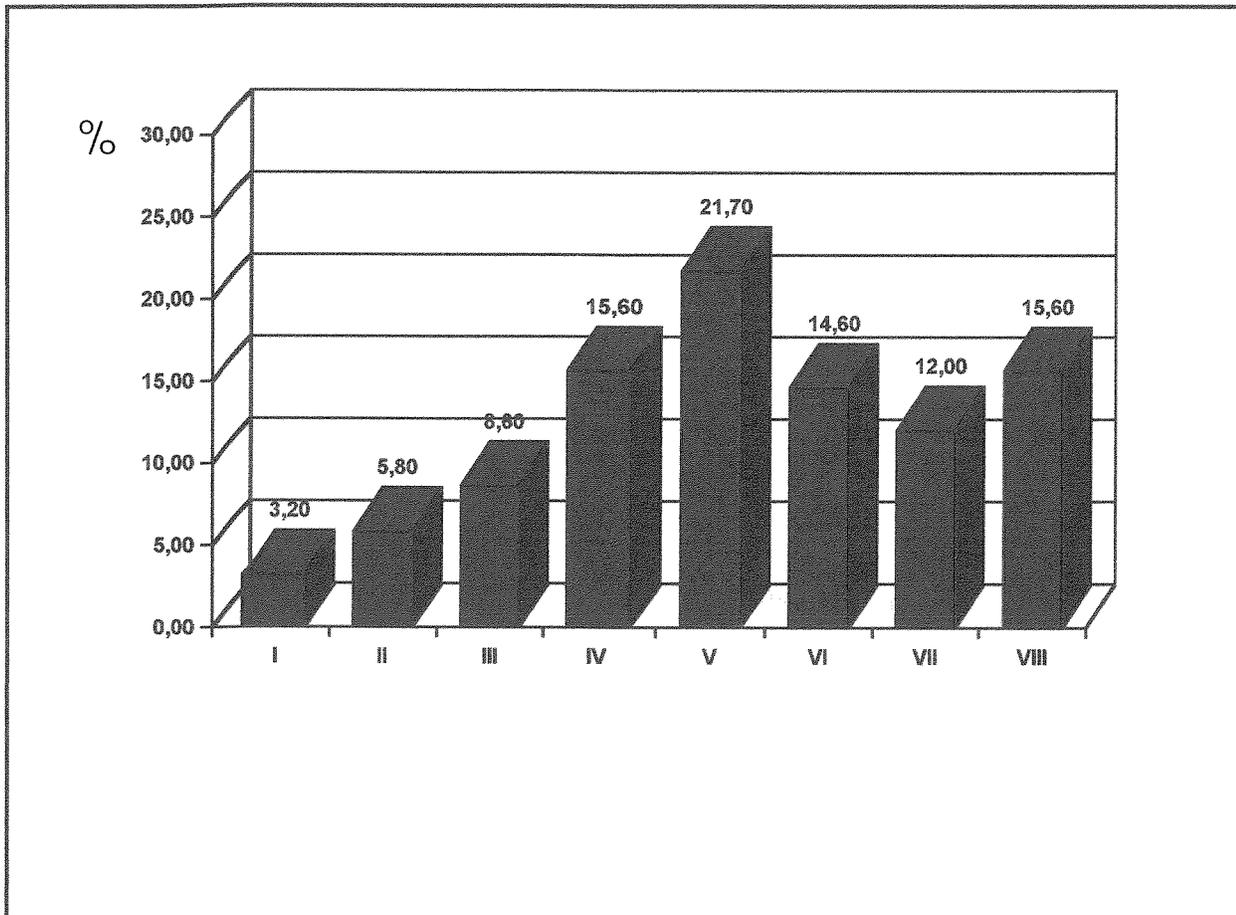


Fig.09a: Representação gráfica das porcentagens relativas de cada fração eluída da coluna. O cálculo foi realizado levando-se em consideração a quantidade de proteína que eluiu da coluna, portanto, 100% representa a somatória de todas as frações. Não está sendo considerado a proteína que permaneceu na coluna após a eluição da fração VIII.

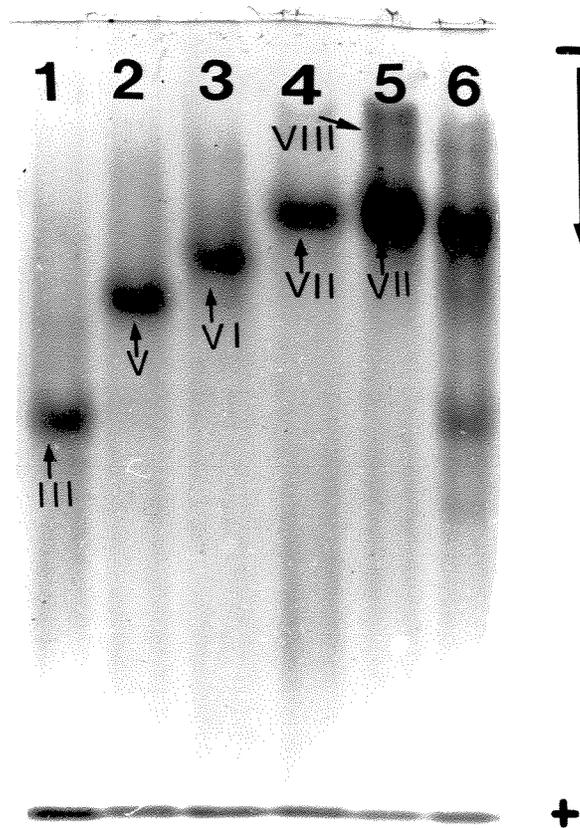


Fig. 09b: Eletroforese em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 7,5% dos picos de cada fração do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria*, separados em coluna de troca iônica de CM-celulose (vide fig.09). Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R". Amostras: cerca de 40 µg de proteína

- 1- Componente III obtido pela eletroforese da fração IV
- 2- Componente V obtido pela eletroforese da fração V
- 3- Componente VI obtido pela eletroforese da fração VI
- 4- Componente VII obtido pela eletroforese da fração VII
- 5- Componente VII e VIII obtido pela eletroforese da fração VIII
- 6- Hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria*, a partir do qual foi realizada a separação dos componentes em cromatografia de troca iônica.

4.6.2- SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE.

O hemolisado tratado com iodoacetamida apresentou 3 componentes eletroforéticos principais (I^i , II^i e III^i) (Fig.10b). A separação por cromatografia em DEAE-celulose do hemolisado total tratado com iodoacetamida também resultou em 3 frações (fração 1, fração 2 e fração 3) (Fig.10). A fração 1 representou 50% do total de proteína eluída da coluna; a fração 2 representou 24% e a fração 3, 26% (Fig.10a). A PAGE das frações eluídas (Fig.10b), demonstrou que os principais componentes eram homogêneos e corroboraram os dados do perfil cromatográfico (Fig.10).

4.6.2.1- DETERMINAÇÃO DAS CADEIAS (globina) QUE CONSTITUEM CADA COMPONENTE SEPARADO EM DEAE-CELULOSE.

As frações separadas em DEAE-celulose foram submetidas a uma eletroforese em condições desnaturantes para identificação das cadeias que constituíam cada componente (Fig.10c).

As frações 1 e 2 (Fig.10c), que correspondem aos componentes eletroforéticos I^i e II^i (Fig.10b), apresentaram as cadeias G_1 e G_3 na sua estrutura e a fração 3, que corresponde ao componente eletroforético III^i (Fig.10b), apresentou as cadeias G_1 e G_2 (Fig.10c).

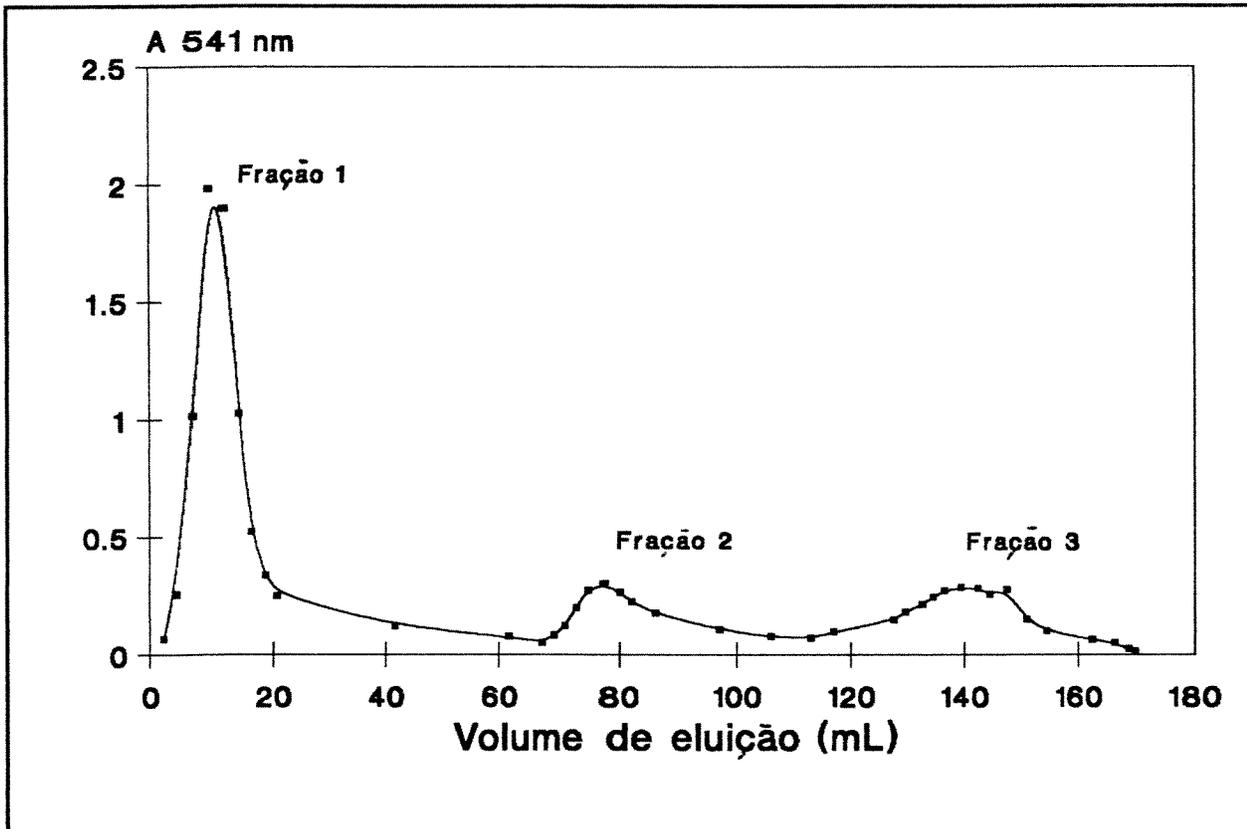


Fig. 10: Perfil de eluição do hemolisado total tratado com iodoacetamida de *Geochelone carbonaria* em coluna de troca iônica (DEAE-Celulose) equilibrada com tampão tris-HCl 25 mM, pH 8,3, contendo EDTA 1 mM. Temperatura 25°C, com fluxo de 30 mL/hora. Amostra: 80 mg de proteína. A eluição foi realizada pela mudança de pH de acordo com o método descrito. As frações foram enumeradas de acordo com a ordem de eluição.

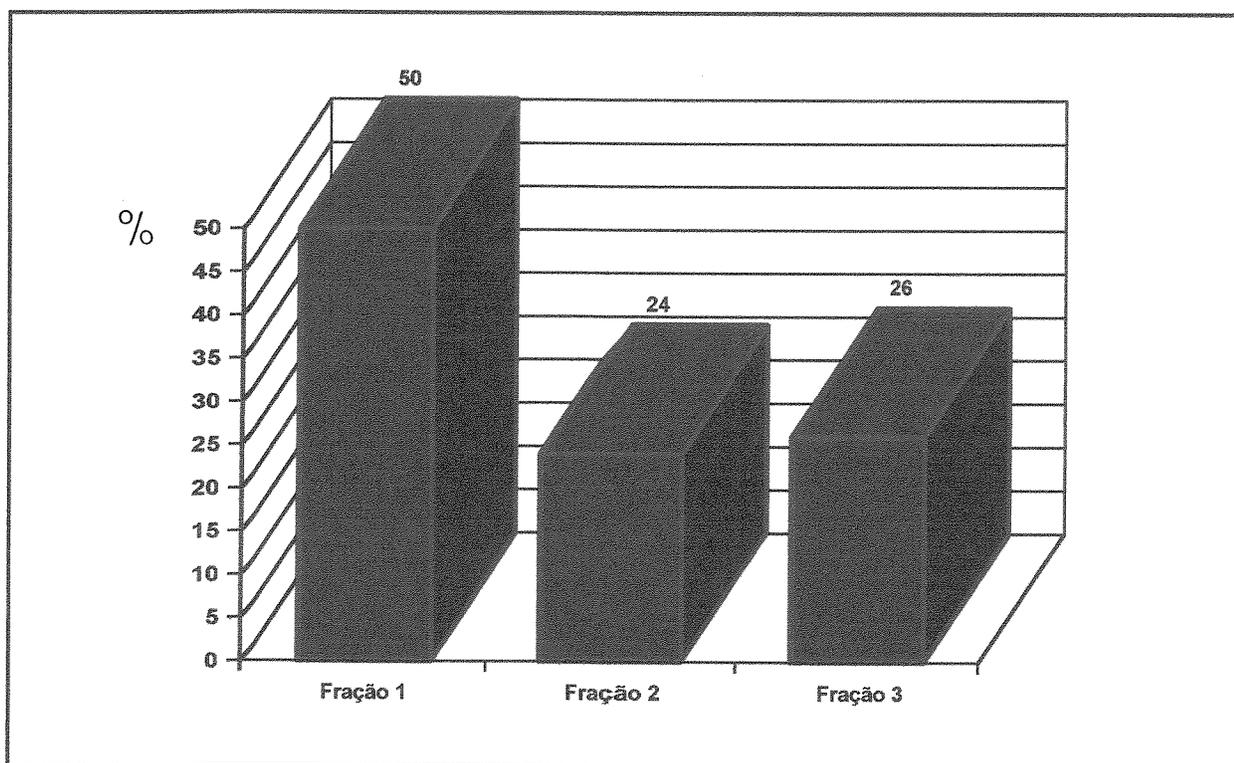


Fig.10a: Representação gráfica da porcentagem relativa de cada fração eluída em coluna de DEAE-celulose. Os cálculos foram realizados levando-se em consideração o total de hemoglobina que eluiu da coluna. Portanto, 100% representa a soma de todas as frações.

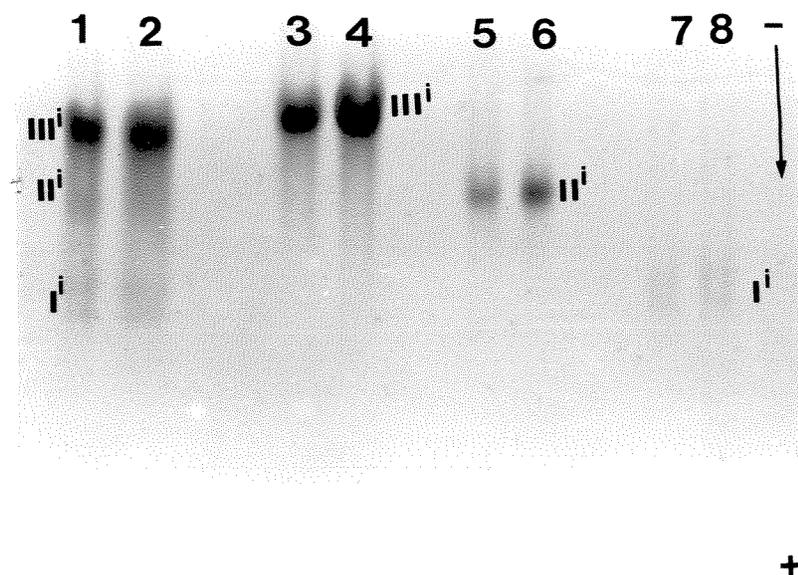


Fig. 10b: Eletroforese em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 7,5% das frações do hemolisado total de *Geochelone carbonaria*, separados em coluna de troca-iônica (DEAE-celulose) após tratamento com iodoacetamida. Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R".

Amostras: as amostras foram preparadas diretamente das frações obtidas para que fosse possível comparar o padrão de coloração dos componentes Iⁱ, IIⁱ e IIIⁱ com o padrão do hemolisado total tratado com iodoacetamida.

1 e 2: hemolisado total tratado com iodoacetamida.

3 e 4: componente IIIⁱ obtido a partir da eletroforese da fração 1.

5 e 6: componente IIⁱ obtido a partir da eletroforese da fração 2.

7 e 8: componente Iⁱ obtido a partir da eletroforese da fração 3.

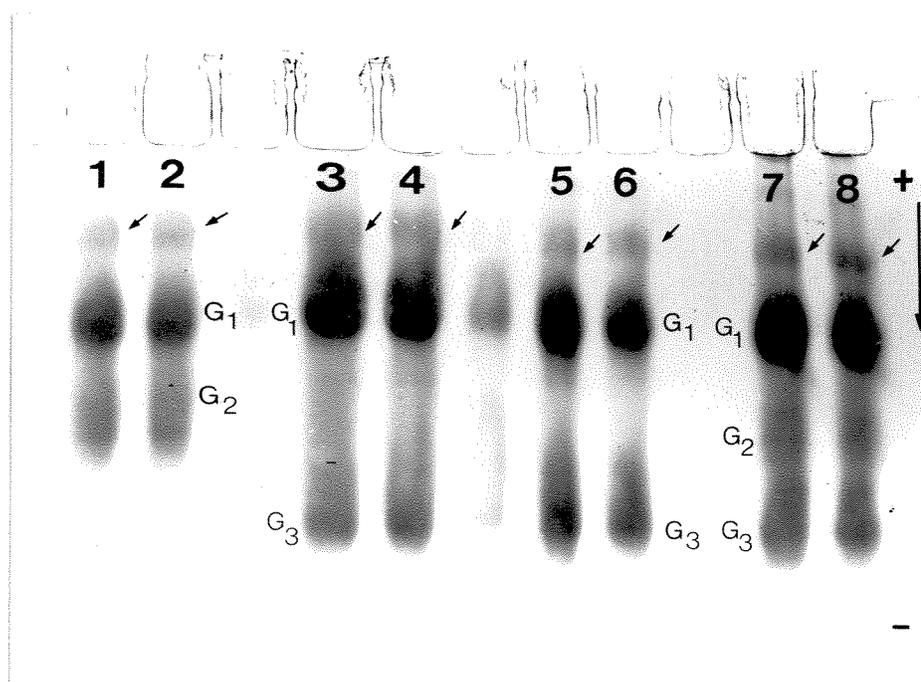


Fig.10c: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, na presença de uréia 6 M e triton X-100 (condições desnaturantes), para determinação quantitativa de cadeias de globina. Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R". As bandas que estão indicadas com a seta (→) representam a cadeia G₄, que é formada pela associação aleatória de cadeias.

Amostras: cerca de 50 µg de proteína

7 e 8: cadeias G₁, G₂ e G₃ que constituem o hemolisado total de *G. carbonaria*.

3 e 4: cadeias G₁ e G₃ que constituem a fração 1 do hemolisado total de *G. carbonaria*.

5 e 6: cadeias G₁ e G₃ que constituem a fração 2 do hemolisado total de *G. carbonaria*.

1 e 2: cadeias G₁ e G₂ que constituem a fração 3 do hemolisado total de *G. carbonaria*.

4.7- DETERMINAÇÃO DAS CADEIAS QUE CONSTITUEM O "POOL" DE COMPONENTES COM CAPACIDADE DE POLIMERIZAR E DOS COMPONENTES QUE NÃO APRESENTAM ESTA CAPACIDADE.

O hemolisado "stripped" envelhecido por 138 dias foi submetido a uma cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100 (Fig.11), para separar o componente polimérico (256.000 Da) do tetramérico (64.000 Da). A partir desta cromatografia foram obtidas 2 frações enumeradas de acordo com a ordem de eluição. A fração I, constituída pelo polímero (256000 Da) e a fração II, constituída pelos componentes tetraméricos (64000 d).

Subsequentemente, amostras de cada fração foram submetidas a eletroforese em condições desnaturantes (Fig.11A); com isso foi possível observar que a fração I, que era constituída pelo polímero, apresentou os 3 tipos de cadeias presentes no hemolisado de *Geochelone carbonaria* (G_1 , G_2 e G_3), ao passo que, a fração II apresentou apenas 2 tipos de cadeias (G_1 e G_3). A diferença entre as duas frações é que os componentes que constituem a fração polimérica apresentaram a cadeia de mobilidade eletroforética intermediária (G_2) e que estava ausente entre os componentes que constituem a fração tetramérica.

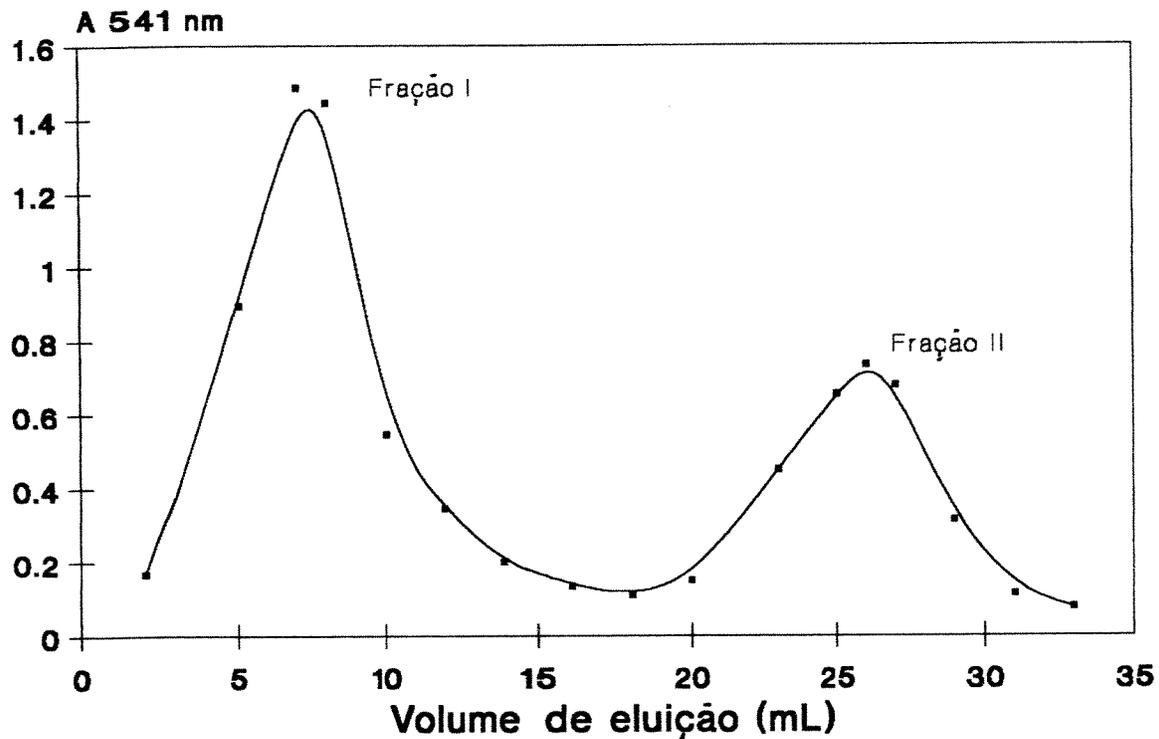


Fig. 11: Perfil de eluição do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* (138 dias após a hemólise e estocada em geladeira a 4°C) em Sephadex G-100, equilibrada com tampão tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM. Temperatura: 25°C e fluxo de 12 ml/hora. Amostra 30 mg de proteína.

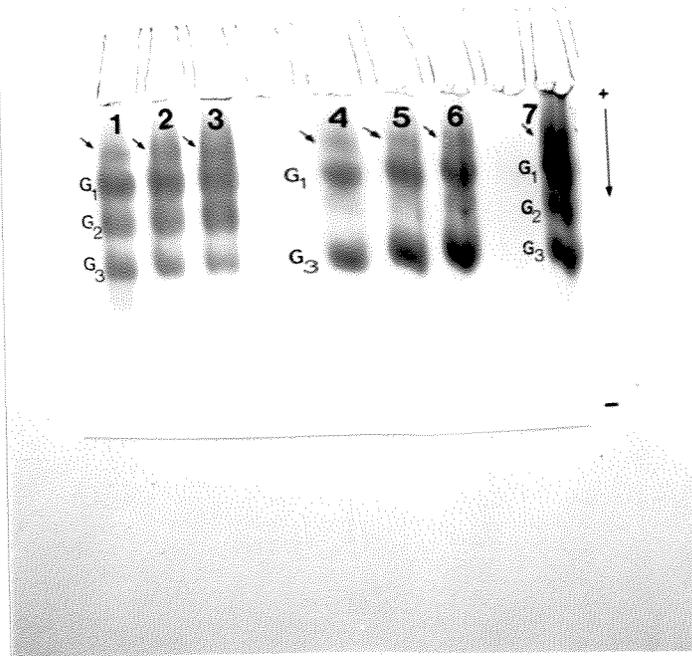


Fig. 11A: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, na presença de uréia 6 M e triton X-100. Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R". As bandas que estão indicadas pela seta (→) representam a cadeia G_4 , que é originada pela associação aleatória de cadeias.

Amostra: frações obtida da cromatografia mostrada na figura 11.

1, 2 e 3: cadeias G_1 , G_2 e G_3 que constituem a fração I obtida da cromatografia em sephadex G-100 do hemolisado de *G. carbonaria* (cerca de 30 μ g de proteína).

4, 5 e 6: cadeias G_1 e G_3 que constituem a fração II obtida da cromatografia em sephadex G-100 do hemolisado de *G. carbonaria* (cerca de 30 μ g de proteína).

7: cadeias G_1 , G_2 e G_3 que constituem hemolisado de *G. carbonaria* 138 dias de estoque após a hemólise (cerca de 45 μ g de proteína).

4.8- NÚMERO DE GRUPOS SH REATIVOS NO HEMOLISADO "STRIPPED" E HEMOLISADO TOTAL.

A titulação de grupos sulfidrílicos das hemoglobinas de *Geochelone carbonaria* com p-HMB, foi realizada para a observação do número de grupos -SH reativos presentes no hemolisado total e hemolisado "stripped", logo após a hemólise, devido ao aumento progressivo da polimerização com o tempo de hemólise, observado em eletroforese e cromatografia de exclusão molecular.

O hemolisado total apresentou um número superior de grupos -SH reativos por mol de hemoglobina, com 12 horas após a hemólise foram determinados 5,4 -SH/mol de hemoglobina tetramérica (n=3). Para o hemolisado "stripped" foram observados 4,9 -SH/mol de hemoglobina tetramérica (n=3) (Fig.12).

A titulação dos grupos SH reativos com DTNP foram realizadas 3 horas após a hemólise e os valores para o hemolisado "stripped" e total foram de 5,3 SH/mol de Hb tetramérica e 7,3 SH/mol de Hb tetramérica, respectivamente (n=9).

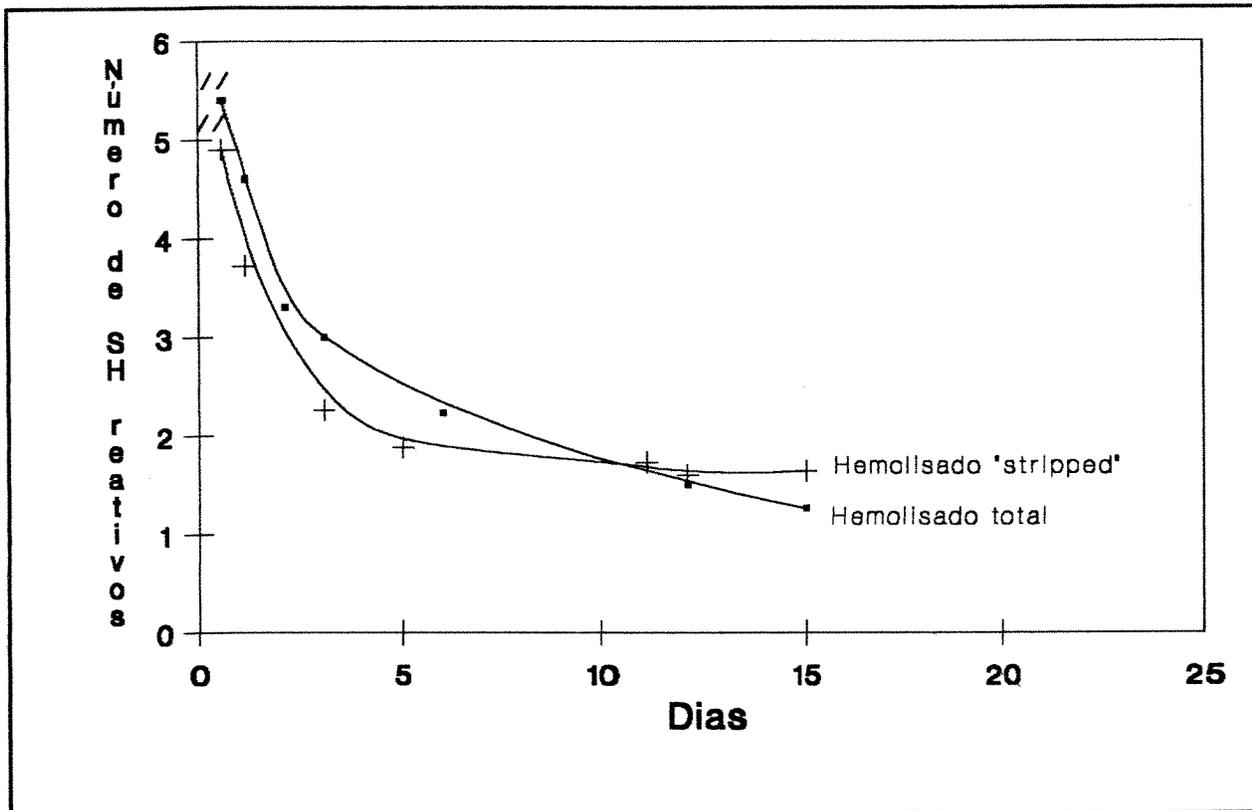


Fig. 12: Cinética de desaparecimento de grupos -SH reativos obtida a partir da titulação destes com p-HMB. Hemolisado total (●) e hemolisado "stripped" (+) de *Geochelone carbonaria*. O hemolisado total e hemolisado "stripped" foram estocados em concentração de 0,55 mM (em heme) a 4°C.

4.9- DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.

A massa molecular da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* foi determinada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna de Sephadex G-200. O experimento foi realizado com soluções de hemolisado "stripped" fresco, com 45 dias e com 210 dias de coleta e hemólise, para a observação da formação do polímero durante a estocagem. As porcentagens relativas das frações de cada amostra aplicada na coluna está representada na figura 13a.

No hemolisado "stripped" (2 dias após a coleta e hemólise), a fração 3, que representa a maior porcentagem (86%) do hemolisado, apresentou o K_{av} de eluição (0,589) semelhante ao da hemoglobina humana (0,586) portanto uma fração que representa a massa molecular de 64.000 Da. Nesta amostra foram observadas apenas duas pequenas frações com volumes de eluição menores (fração 1, 7% e fração 2, 7%) que apresentaram os volumes de eluição da fração 1 e fração 2 do hemolisado "stripped", com 45 dias de coleta e hemólise (Fig.13).

O hemolisado "stripped" (45 dias após a coleta e hemólise), apresentou 3 frações com volumes de eluição diferentes, a fração 1 com K_{av} (0,293) de eluição correspondente à massa molecular de 4 tetrâmeros (256.000 Da); a fração 2, que apresentou o K_{av} (0,41) correspondente à massa molecular de 192.000 Da, e a fração 3, com K_{av} (0,59) correspondente à massa molecular de 64.000 Da (Fig. 13).

O hemolisado com 210 dias de coleta apresentou apenas 2 frações com K_{av} (0,591) correspondentes a massa molecular de 64.000 d (fração 3, 27%) e K_{av} (0,293) ao maior polímero de 256.000 Da (fração 1, 73%).

A massa molecular de cada fração eluída da coluna, foi determinada de acordo com o K_{av} estimado para cada fração, utilizando a curva mostrada na figura 03a.

Pode-se observar também que a proporção entre as frações de massa molecular diferentes se alteram de acordo com o tempo de estocagem; a princípio, quase 100% do hemolisado "stripped" estava na forma tetramérica. Com 7 meses de estocagem, o componente polimérico constituía 73% do hemolisado "stripped".

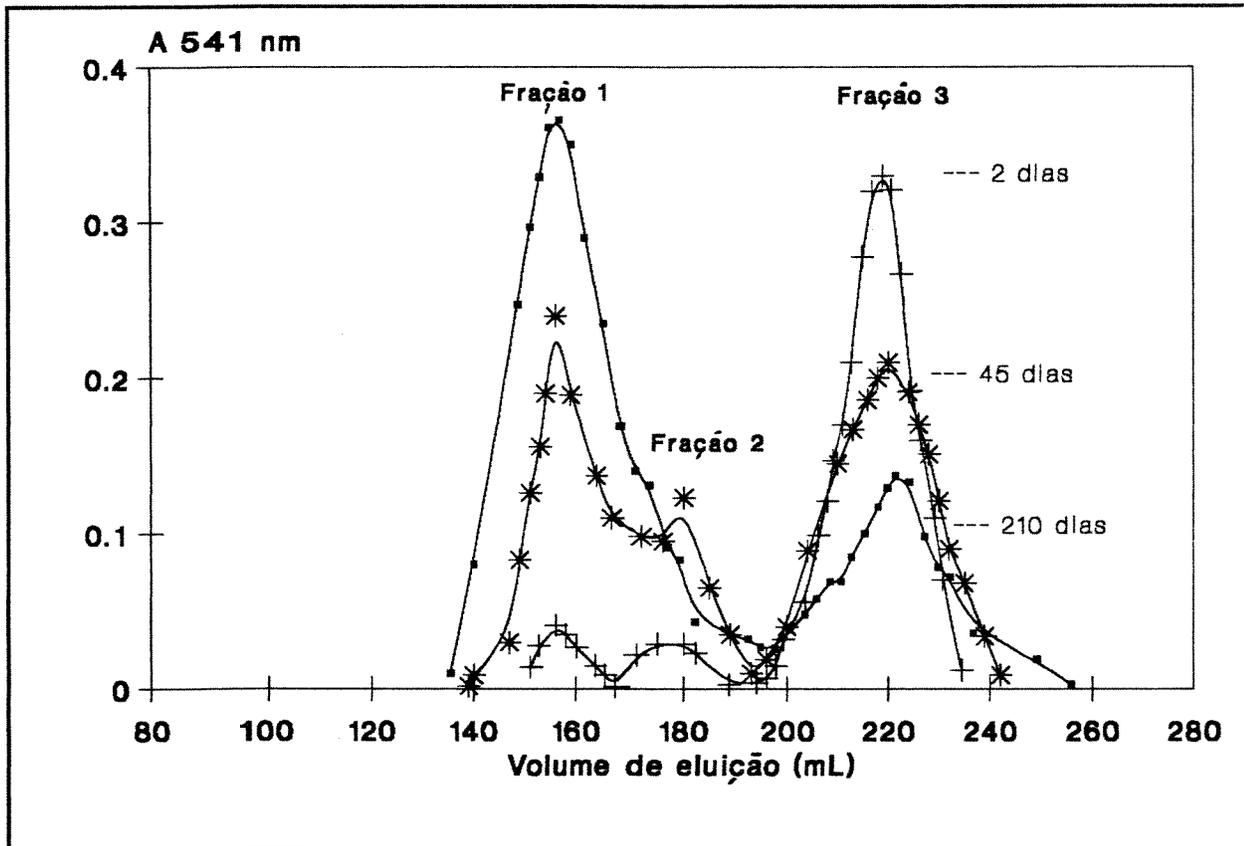


Fig. 13: Perfil de eluição do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* em Sephadex G-200 equilibrada com tampão tris-HCl 25 mM, contendo EDTA 1 mM, pH 7,5. Fluxo: 10-12 mL/hora.

Amostras: 10 a 14 mg de proteína.

- + hemolisado "stripped" (2 dias após a hemólise)
- * hemolisado "stripped" (45 dias após a hemólise)
- hemolisado "stripped" (210 dias após a hemólise)

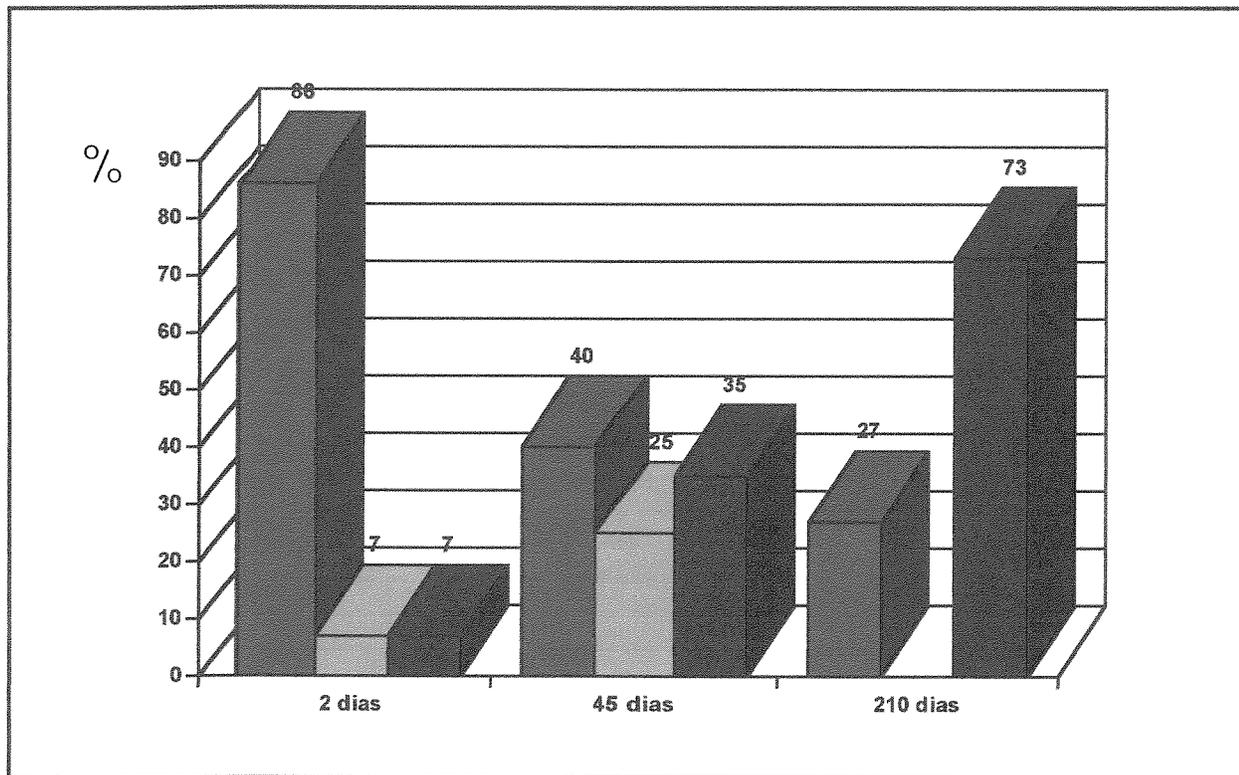


Fig.13a: Representação gráfica das porcentagens relativas de cada fração eluída por cromatografia de exclusão molecular dos hemolisados "stripped". (vermelho) 64.000 Da, (verde) 192.000 Da e (azul) 256.000 Da. Os cálculos foram realizados levando-se em consideração o volume total de hemoglobina que eluiu da coluna.

4.10- IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES COM CAPACIDADE DE POLIMERIZAÇÃO.

As frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-200 do hemolisado estocado 210 dias foram submetidas a PAGE, para o estudo dos componentes do hemolisado que dão origem ao polímero maior (256.000 Da) (Fig. 14).

A figura 16, mostra que a fração 1 (vide Figura 13), apresenta apenas um componente com mobilidade eletroforética correspondente ao do componente polimérico (componente VIII, vide Figura 06). A fração 3 apresentou os componentes V e VI (vide Figura 06). A fração 1 (polimérica), quando tratada com agente redutor, originou 4 componentes principais em eletroforese (II, III, VI e VII); no entanto, a fração 3 tratada com o mesmo agente redutor, não deu origem a nenhum componente adicional, mostrando que esta fração era constituída apenas de tetrâmeros de hemoglobinas que não apresentam a capacidade de se polimerizar, ou o fazem muito lentamente.

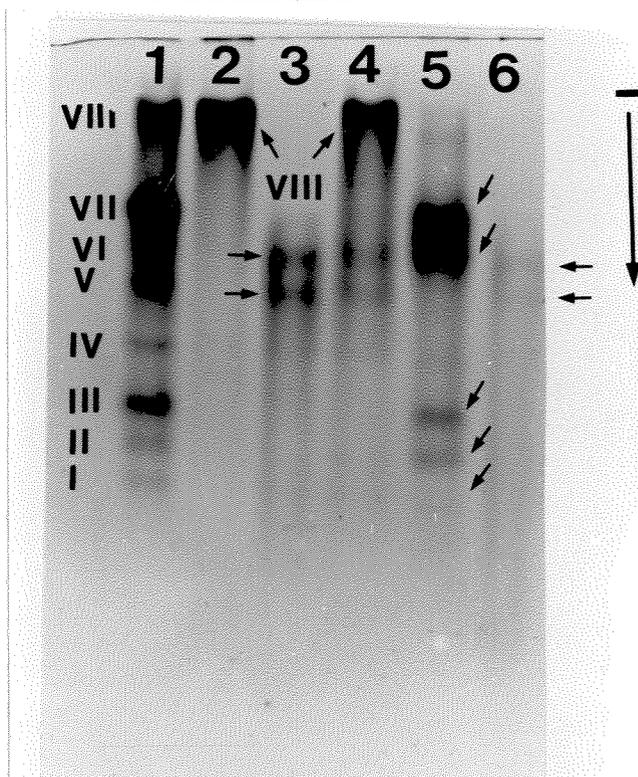


Fig. 14: Eletroforese em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 7,5% das frações eluídas em Sephadex G-200 a partir do hemolisado "stripped" estocado 210 dias. Condições: vide material e métodos. Coloração: "Comassie brilliant blue R".

Amostras:

- 1- Componentes de I a VIII do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* (após 10 dias de hemólise).
- 2- Componente VIII (→) da fração 1 obtida da cromatografia em sephadex G-200 mostrada na figura 13 (210 dias após a hemólise).
- 3- componentes V e VI (→) da fração 3 obtida da cromatografia em sephadex G-200 mostrada na figura 13 (210 dias após a hemólise).
- 4- Componentes V, VI e VIII do hemolisado "stripped" de *Geochelone carbonaria* antes da separação em sephadex G-200 (após 210 dias de hemólise).
- 5- Componentes II, III, VI e VII (→) que se originaram a partir do tratamento da fração 1 (fig.13) com agente redutor (β -mercaptoetanol).
- 6- Componentes V e VI (→) presentes fração 3 (fig.13) tratada com β -mercaptoetanol (amostra mais diluída devido a adição do agente redutor).

5- DISCUSSÃO

Nossos resultados sobre os estudos funcionais da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* indicaram que esta proteína se caracteriza pela baixa afinidade intrínseca pelo oxigênio (Fig.04). Embora, a hemoglobina tenha sua afinidade diminuída em presença de fosfatos orgânicos como ATP e IHP que estão usualmente presentes nas células vermelhas do sangue de tartarugas (RAPAPORT & GUEST, 1941; BARTLETT, 1976; DAVIS, 1991), esse efeito é pequeno quando comparado com o do 2,3-DPG sobre a afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio (BONAVENTURA et alii, 1976) e do ATP em *Bothrops alternatus* (OGO et alii, 1993). De fato, na presença de ATP e IHP, os valores de P_{50} em pH próximo ao fisiológico (7,4) diminuíram 2 a 3,6 vezes respectivamente, enquanto, que na hemoglobina humana a presença de seu modulador fisiológico, o 2.3-DPG, causou diminuição na afinidade de cerca 9 vezes. O pequeno efeito dos cofatores alostéricos observado pode ser explicado em parte, pela baixa afinidade intrínseca da molécula de hemoglobina, que não necessita de uma regulação para a liberação do oxigênio. Como demonstrado por LUTZ & LAPENNAS (1982), para outras espécies de tartarugas, o IHP apresentou maior efeito sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, quando comparado com o ATP, mesmo considerando que o ATP está presente em maior concentração no interior da célula, o que tornaria mais viável a sua participação como modulador alostérico na ligação do oxigênio à hemoglobina. Contudo, a afinidade da hemoglobina mostrou-se maior pelo IHP, que mesmo em concentrações muito baixas, foi sensivelmente mais efetivo que o ATP (Fig.05a). WEBER & LYKKEBOE (1978), sugeriram que *in vivo* o efeito do

ATP seria ainda menor devido à formação do complexo ATP-íon magnésio. Considerando a razão molar fisiológica entre a hemoglobina e o ATP de 1:1, os resultados por nós obtidos indicaram que o efeito do ATP, nesta razão molar, foi inexistente (Fig.05a). DAVIS (1991), sugeriu que a presença de ATP em concentração elevada nos eritrócitos de animais que não o utilizam como modulador da hemoglobina tenha papel como fonte de energia em reações celulares.

A baixa concentração de hemoglobina no sangue (Tabela 02) de *Geochelone carbonaria* de cerca de 3 mM em heme, nos permitiu deduzir que a razão molar entre hemoglobina e IHP era cerca de 1,5:1. Esse cálculo foi feito com base na concentração de IHP descrita por DAVIS (1991), BARTLETT (1978) e ISAACKS & HARKNESS (1980), uma vez que esta não foi por nós determinada. Nesta razão molar, o efeito do IHP foi muito pequeno (Fig.05a), corroborando os dados de equilíbrio que mostraram uma pequena diferença no valor do log de P_{50} entre o hemolisado "stripped" e o hemolisado total (Fig.04). Portanto, parece que a nível fisiológico o IHP não exerce uma função moduladora significativa do transporte de oxigênio pela hemoglobina, corroborando os dados de ISAACKS et alii (1978) e GIARDINA et alii (1992). DAVIS (1991), baseando-se nos resultados de PITTET et alii (1989) e KOPPITZ et alii (1986), propôs que o IHP presente nos eritrócitos de tartaruga exerceria papel de um possível sinalizador de membrana ou de modulador alostérico de enzimas intracelulares, como as aldolases. Além dos quelônios em que a concentração do inositol polifosfato é baixa (0,5 $\mu\text{mol/mL}$ eritrócito) (DAVIS, 1991), este modulador está também presente na hemácias das aves. Nestas o inositol polifosfato é o

principal modulador da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, mas a sua concentração nos eritrócitos é 10 vezes mais elevada (5 $\mu\text{mol/mL}$ eritrócito).

Da mesma forma que *Geochelone carbonaria*, outras espécies de quelônios apresentam baixa concentração de hemoglobina (SHEELER & BARBER, 1964; LEFANT et alii, 1970). Algumas espécies aquáticas apresentaram concentrações superiores, da ordem de 7 mM (GAUMER & GOODNIGHT, 1957; BURGGREN et alii, 1977; LAPENNAS & LUTZ, 1982). Entretanto, 2 espécies terrestres estudadas por BURGGREN et alii (1977) e GAUMER & GOODNIGHT (1957), mostraram concentrações de hemoglobina superior a 7 mM, o que demonstra a ausência de um padrão adaptativo com relação ao habitat e à fisiologia do animal.

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio mínima foi encontrada em pH mais ácido. A amplitude do efeito Bohr ($\Delta\text{Log P50}/\Delta\text{pH}$) da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* (-0,60) é menor do que a observada na hemoglobina humana (-0,73) (BONAVENTURA et alii, 1976), mais é maior do que a das tartarugas marinhas, *Caretta caretta*, e *Chelonia mydas* (-0,35) (GIARDINA et alii, 1990; LUTZ & LAPENNAS, 1982; LAPENNAS & LUTZ, 1982). É também maior do que a observada na espécie terrestre *Testudo graeca* (-0,28) (BURGGREN et alii, 1977). A presença de polifosfatos orgânicos, ATP ou IHP, não causou uma mudança significativa na amplitude do efeito Bohr (-0,61 e -0,67, respectivamente). Alguns répteis como os ofídeos *Bothrops alternatus* (OYAMA et alii, 1993) e *Liophis miliaris* (FOCESI et alii, 1992), a presença de moduladores alostéricos da hemoglobina é fundamental para que ocorra um aumento da amplitude do efeito Bohr. Deve-se ressaltar que nessas espécies, o efeito Bohr é aparente e a estabilização do tetrâmero ocorre apenas em presença do modulador. Em

soluções "stripped", a hemoglobina está predominantemente dissociada em dímeros e o efeito Bohr é nulo.

Sob o ponto de vista fisiológico, o efeito Bohr observado na hemoglobina de *Geochelone carbonaria* (Fig.04 e 04a) pode ter um papel relevante no transporte de oxigênio, embora em condições normais, não deve haver mudança significativa do PCO_2 e portanto, do pH sanguíneo. Contudo, o efeito Bohr parece ser vantajoso para os quelônios, desde que a tensão do CO_2 e pH em animais ectotérmicos são temperatura dependentes. A medida que a temperatura ambiental aumenta, a solubilidade do CO_2 aumenta, produzindo um aumento da concentração de íons hidrogênio. Isto causa um decréscimo no pH sanguíneo, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, através do efeito Bohr. Parece, portanto, que o mecanismo que regula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em *Geochelone carbonaria* está mais diretamente relacionado com os fatores que regulam o pH sanguíneo, do que com a modulação da hemoglobina por polifosfatos orgânicos.

Os valores de coeficiente de Hill (nH) que medem a interação heme-heme, mostraram que a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* na forma "stripped" é cooperativa e pequenas variações ocorreram em função do pH (Fig.04). Algumas outras espécies de tartarugas (SULLIVAN & RIGGS, 1967c) e outros répteis, como ofídeos, mostraram que os valores de nH eram dependentes de pH (MATSUURA et alii, 1987)

A determinação precisa da variação dos valores de nH com a variação do pH foi impraticável devido a ocorrência da dispersão dos valores de nH nos limites entre 1 e 2. Entretanto, foi possível observar uma tendência dos valores de nH serem maiores próximos de pH 7,5. Estudos realizados na

presença de ATP e IHP mostraram que houve aumento dos valores de nH mais acentuado na presença de ATP, porém a dispersão persistiu.

Dispersão similar foi também observada nos valores de P_{50} (Fig,04 e 04a) e o cálculo do efeito foi feito determinando-se a curva de afinidade em função da regressão linear. A origem da dispersão não é bem compreendida, porém, não podemos descartar a possibilidade que seja determinada pela heterogeneidade molecular devido a multiplicidade de componentes presentes nos hemolisados. Como será enfatizado posteriormente, a formação de pontes de dissulfeto mistas entre hemoglobina e moléculas não protéicas podem ser fatores adicionais de interferência nos estudos funcionais, originando as dispersões dos pontos. Nos estudos realizados por BURGGREN et alii 1977, com hemoglobina de *Testudo graeca* e *Pseudemys scripta*, podemos observar igualmente uma dispersão dos pontos na curva da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em função do pH. O mesmo ocorreu com a hemoglobina de *Malacochercus tornieri* (WOOD et alii, 1978). A dispersão dos pontos não foi, pois, uma ocorrência exclusiva da espécie *Geochelone carbonaria*, porém nenhum dos trabalhos focalizam atenção especial para o fato.

Os valores de nH menores que 2,0 e a baixa afinidade pelo oxigênio observados na hemoglobina de *Geochelone carbonaria* podem seguir a estabilização da conformação de baixa afinidade (estrutura T), previamente observada por PERUTZ & IMAI (1980) em hemoglobina bovina e por GIARDINA et alii (1992) e LOURO & BEMSK (1982) em hemoglobina de tartarugas marinhas, *Caretta caretta* e *Chelonia mydas mydas*.

O estudo da estrutura tridimensional da molécula é sem dúvida muito atraente, porém devemos estabelecer inicialmente a estrutura básica da molécula.

Esta investigação foi iniciada determinando-se o número de componentes de hemoglobinas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os nossos resultados eletroforéticos do hemolisado "stripped" e total de *Geochelone carbonaria* mostraram uma grande heterogeneidade com relação ao número de componentes, como pode ser visto na figura 06. Tanto o hemolisado "stripped", como o hemolisado total, apresentaram 8 componentes eletroforéticos, mesmo em experimentos realizados logo após a hemólise. A presença de heterogeneidade eletroforética de componentes no hemolisado recém coletado é uma indicação de que pode estar ocorrendo no hemolisado de *Geochelone carbonaria* o mesmo que foi demonstrado para o hemolisado de aves e tubarão por REISCHL & DAFRÉ (1992) e DAFRÉ & REISCHL (1990). Nessas espécies a presença de SH não protéico, principalmente a glutathiona, leva a formação de pontes de dissulfetos mistas. Os componentes originados pela ligação entre SH da hemoglobina e SH não protéico apresentam mobilidade eletroforética diferente, conduzindo a um aumento da heterogeneidade. A formação desses componentes, glutathionil-hemoglobina ocorre em eritrócitos de animais que apresentam hemoglobinas ricas em grupos sulfidrilas reativos. O número de grupos SH reativos por molécula de hemoglobina tetramérica pode variar de 2, em alguns ruminantes, a 18 no crocodilo do nilo (KLEINSCHMIDT & SGOUROS, 1987). A grande heterogeneidade de componentes de hemoglobina é uma das características do hemolisado de muitas espécies de tartarugas. Esta heterogeneidade também é encontrada no hemolisado de vários outros grupos

de vertebrados, como peixes (elasmobrânquios e teleósteos), anfíbios e outros répteis (SULLIVAN, 1974 a, b; FYHN & SULLIVAN, 1975). A origem e a função da heterogeneidade ainda não estão bem estabelecidas. Para alguns autores, a presença de vários componentes evitaria a precipitação da hemoglobina no interior do eritrócito, quando a concentração estiver muito próxima do limite de solubilidade (RIGGS, 1976). Outros autores acreditam que a existência de um grande número de componentes com propriedades funcionais diferentes, seria uma vantagem seletiva na exploração de novos ambientes.

As amostras tratadas com β -mercaptoetanol apresentaram os grupos SH do oitavo componente totalmente reduzidos, levando ao desaparecimento deste componente em eletroforese, demonstrando, assim, que este era originado através da formação de pontes de dissulfeto (Fig.06). É interessante observar também, que, nas amostras tratadas com agente redutor em uma razão de 120:1 (agente redutor : hemoglobina), no caso o β -mercaptoetanol, ocorreu somente a redução das pontes de dissulfeto do componente VIII (Fig.06). Os demais componentes que estavam presentes nos hemolisados não apresentaram nenhuma alteração na mobilidade. Este comportamento demonstra que a redução das ligações de dissulfetos dos componentes eletroforéticos parecem ter diferentes acessibilidade ao agente redutor. No entanto, foram observadas alterações na concentração de algumas bandas que, provavelmente, representam os componentes originados por estas ligações de dissulfeto mistas e que foram parcialmente reduzidas (Fig.06). Estes componentes foram quase completamente reduzidos em concentrações mais elevadas do agente redutor, como pode ser visto na figura 07. A presença de 3 principais tipos de cadeias no hemolisado "stripped" e total de

Geochelone carbonaria (Fig.08), corrobora a hipótese da possível presença de componentes originados pela formação de pontes de dissulfeto mistas com SH não protêico no hemolisado de *Geochelone carbonaria*, como ocorre em hemolisado de aves (galinha) (REISCHL & DAFRÉ, 1992).

A heterogeneidade presente nos hemolisados de *Geochelone carbonaria* e de outras espécies animais, pode ser discutida levando-se em consideração algumas funções possíveis para este comportamento: Primeiramente, a presença de vários componentes evitaria a precipitação da hemoglobina no interior do eritrócito. Esta possibilidade pode ser aceita levando-se em consideração que o eritrócito de répteis é nucleado, tendo, portanto, menor volume citoplasmático e, conseqüentemente, maior contato entre tetrâmeros de hemoglobina, facilitando, assim, a precipitação intracelular. Isto não justificaria a heterogeneidade eletroforética nos hemolisados de *Geochelone carbonaria* devido a baixa concentração de hemoglobina encontrada no sangue, que é cerca de 3 mM (heme) (Tabela 02).

Uma segunda possibilidade seria a da existência de componentes com funções diferentes, possibilitando, assim, uma vantagem seletiva na exploração de novos habitats. Esta proposição pode ser discutida levando-se em consideração as diferenças a nível de cadeias na constituição dos componentes, como já demonstrado para outras espécies de tartarugas por REISCHL et alii (1989) e RÜCKNAGEL & BRAUNTIZER (1988). A pequena variação ambiental a que esta espécie de tartaruga está sujeita, não justificaria a presença de um elevado número de componentes com funções diferentes. No entanto, os mecanismos de seleção natural em conjunto com

os processos químicos que controlam o genótipo e, conseqüentemente, o fenótipo de uma espécie, não estão bem esclarecidos.

A hipótese mais recente para a origem da heterogeneidade de componentes observados em eletroforese, é baseada na formação de pontes dissulfetos mistas (SH não protéico e SH de hemoglobina) ou entre tetrâmeros de hemoglobina dando origem aos polímeros.. O hemolisado de *Geochelone carbonaria* apresenta hemoglobinas ricas em grupos -SH reativos (Fig. 12 e 12a), e isto possibilita a formação de componentes a partir pontes de dissulfetos mistas. Segundo HUISMAN & DOZY (1962) e GAREL et alli. (1986), os componentes glutationil-hemoglobina, originados em eritrócitos humanos, apresentam maior afinidade pelo oxigênio, reduzida cooperatividade e reduzido efeito Bohr, quando comparados com os componentes normais, isto é, sem a ligação de glutatona. Apesar da quantidade de glutatona ligada à hemoglobina não ser significativa em eritrócitos humanos normais, os componentes glutationil-hemoglobina estão presentes em porcentagem elevada em hemolisados de várias espécies de animais (REISCHL et alii, 1984; DAFRÉ & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRÉ, 1992). Segundo SEXTON & MUTUS (1992), a glutatona é o tiol não-protéico mais abundante presente na célula. Esta é uma característica importante no processo de formação dos componentes glutationil-hemoglobina, e a presença destes componentes no hemolisado é um fator adicional de interferência nos estudos funcionais da hemoglobina. Uma grande heterogeneidade eletroforética implicaria na presença de várias cadeias de globinas. Portanto, a presença de 3 tipos de globinas no hemolisado de *Geochelone carbonaria*, que possibilitariam a formação de apenas 2 componentes, estruturalmente diferentes, sugeriram que os demais

componentes observados em eletroforese seriam formados pela ligação de diferentes números de tióis não protéicos de pequena massa molecular (provavelmente glutatona), como foi descrito por REISCHL & DAFRÉ (1992).

A reversibilidade da ligação entre SH não protéico e a hemoglobina pode dar origem a um mecanismo de proteção contra o "stress" oxidativo causado, por exemplo, por espécies reativas de oxigênio. O papel de hemoglobinas ricas em grupos -SH reativos na proteção da membrana do eritrócito, assim como, na proteção do Fe^{2+} contra a oxidação, foi sugerido por REISCHL (1989), DAFRÉ & REISCHL (1990) e REISCHL & DAFRÉ (1992), estudando hemoglobinas de animais ricas em grupos -SH. A presença de glutatona, glutatona redutase, glutatona peroxidase e outras enzimas que fazem parte de um sistema de proteção celular, é associada por muitos autores, a um mecanismo de proteção do eritrócito, como por exemplo, contra radicais livres de oxigênio (KURATA et alii., 1993). Esta função poderia ser rapidamente selecionada na natureza, levando em consideração as vantagens que este sistema traria para a célula, como por exemplo aumentando a vida média do eritrócito (SOHAL & ALLEN, 1986; SOHAL et alii., 1987), ou então, minimizando o efeito deletério de moléculas oxidantes sobre a membrana do eritrócito e sobre a hemoglobina.

A separação dos componentes (I a VIII) observados em eletroforese (Fig.06) foi realizada por cromatografia de troca iônica (Fig. 09) e posteriormente as frações obtidas foram analisadas eletroforéticamente (Fig.09b). A porcentagem relativa das frações I, II e III obtidas por cromatografia foi muito pequena e, mesmo após a sua concentração, não foi possível obter-se um perfil eletroforético razoável. Não houve, portanto,

maior empenho para alcançar esse objetivo, uma vez que a contribuição dessas frações no hemolisado total é pouco relevante (fig.09a). As frações que eluíram da coluna em concentrações mais elevadas (frações IV, V, VI, VII e VIII) e representavam 80% do hemolisado "stripped" e total, foram submetidos a PAGE. As frações IV, V e VI mostraram-se homogêneas e as frações VII e VIII eram uma mistura dos componentes eletroforéticos VII e VIII (fig.09b).

Como observado na figura 07, 2 componentes principais estavam presentes após o tratamento com excesso de agente redutor. A identificação dos componentes que possivelmente deram origem aos demais componentes, foi possível somente através da alquilação dos grupamentos SH reativos pelo tratamento do hemolisado recém coletado com iodoacetamida. As figuras 10, 10a e 10b mostram que, após o tratamento, apenas 3 frações foram obtidas por cromatografia em DEAE-celulose. Este resultado mostrou que os demais componentes, observados em PAGE do hemolisado recém coletado, poderiam ser, como sugerido previamente, provenientes de formação de pontes de dissulfeto entre hemoglobinas ou, então, pontes de dissulfeto mistas.

Como já citado anteriormente, a hemoglobina de *Geochelone carbonaria* é rica em grupos SH reativos e esta é a principal característica de hemoglobinas que apresentam capacidade de se polimerizar. O hemolisado total de *Geochelone carbonaria* apresentou um número maior de grupos -SH reativos (5,6 SH/mol de hemoglobina tetramérica), com aproximadamente 12 horas após a hemólise. O hemolisado "stripped" apresentou 4,9 SH/mol de hemoglobina tetramérica (Fig. 12). A determinação do número de grupos -SH reativos no hemolisado "stripped" e total, logo após a hemólise, foi

impraticável devido ao tempo gasto para a hemólise e tratamentos posteriores realizados para a preparação do hemolisado "stripped". Portanto, a titulação dos grupos SH foi realizada 3 após a hemólise e foi utilizado o DTNP. Foram encontrados 7,3 SH/mol de Hb tetramérica e 5,3 SH/ mol de Hb tetramérica para o hemolisado total e "stripped", respectivamente. Este número é provavelmente inferior ao encontrado *in vivo*, devido à rápida formação de dissulfetos *in vitro*. Devemos enfatizar o fato de que, um dos componentes apresenta maior capacidade de se polimerizar. Portanto, o número de grupos -SH reativos encontrados para o hemolisado de *Geochelone carbonaria*, é uma média entre os componentes que o constituem. Segundo REISCHL (1984), no hemolisado "stripped" de *Phrynops hilarii*, 40% dos grupos -SH disponíveis desapareceram nas primeiras 5 horas após a hemólise e a glutathiona presente na amostras do hemolisado de *Phrynops hilarii* não contribuiu significativamente para o número total de grupos -SH reativos titulados. Contudo, a dosagem de grupos SH reativos no hemolisado total de *Geochelone carbonaria*, demonstrou que a presença de grupos -SH não protéicos, de pequena massa molecular, provavelmente de glutathiona, alterou o número de grupos SH titulados em cerca de 37% para o hemolisado total.

A polimerização da hemoglobina de *Geochelone carbonaria* foi analisada em 3 tempos diferentes de estocagem, por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-200 (Fig.13 e 13a). As frações foram enumeradas de acordo com a ordem de eluição (fração 1, 2 e 3). Os hemolisados com 2 e 45 dias após a coleta e hemólise, apresentaram as 3 frações (frações 1, 2 e 3), enquanto que, o hemolisado analisado 210 dias após a coleta e hemólise apresentou apenas 2 frações (frações 1 e 3). O K_{av} determinado para a fração 1, correspondeu à massa molecular de 4x o

tetrâmero (256.000 Da), a fração 2 apresentou K_{av} correspondente à massa molecular de 192.000 Da e a fração 3, um K_{av} correspondente à massa molecular de 64.000 Da. O comportamento de polimerização observado para os hemolisados "stripped" de 2 e 45 dias de estocagem a 4°C, corroborou os dados de titulação de grupos SH reativos, mostrando que a polimerização inicia-se logo após a hemólise e que esta se processa dando origem a componentes com massa molecular de 192.000 Da e 256.000 Da. O mesmo padrão de formação de polímeros com massa molecular intermediária foi também observado em outras espécies de tartarugas (REISCHL et alii, 1984; SULLIVAN & RIGGS, 1967).

O estudo eletroforetico da fração 1, obtida a partir da cromatografia em Sephadex G-200 do hemolisado "stripped" estocado, possibilitou a identificação dos componentes que constituíam o polímero (Fig.14). A figura 13 mostra que o hemolisado "stripped" estocado a 4°C durante 210 dias é constituído por 2 frações: fração 1 e fração 3. Quando analisadas em PAGE, a fração 1 mostrou que era constituída de apenas um componente polimérico, com mobilidade correspondente ao componente VIII (vide Figura 14), e a fração 3, com maior mobilidade anódica, era composta por 2 componentes tetraméricos, com mobilidade correspondente aos componentes V e VI (vide Figura 14). Tratando-se ambas as frações com agente redutor, β -mercaptoetanol (cerca 24 mM), verificou-se que a fração 1 era composta por 4 componentes principais presentes no hemolisado recém obtido: II, III, VI e VII, e a fração 3 permaneceu inalterada, demonstrando ser constituída pelos componentes V e VI, que apresentaram massa molecular de 64.000 Da (Fig.14). Em vista destes resultados, podemos concluir que em 210 dias os componentes II, III e VII estavam totalmente, e o componente VI apenas

parcialmente, envolvidos na formação de polímeros de alta massa molecular. Contudo, o componente V, presente apenas na fração 3, parece não ter a capacidade de polimerizar ou o faz muito lentamente. Com estes resultados é possível inferir que, mesmo os componentes originados através da formação de pontes de dissulfeto mistas também polimerizam-se.

A análise do número de cadeias que constituem o hemolisado de *Geochelone carbonaria*, através de eletroforese na presença de uréia e triton X-100, demonstrou a presença de 3 principais tipos de cadeias (G_1 , G_2 e G_3) que se combinam originando os componentes do hemolisado (Fig.08). Este número de cadeias foi também encontrado em outras espécies de tartarugas, *Chrysemys picta bellii* e *Phrynops hilarii* (RÜCKNAGEL & BRAUNITZER, 1988; REISCHL et alii, 1989). As duas espécies são constituídas por uma cadeia do tipo β e duas cadeias do tipo α , α^A e α^D , originando 2 componentes de hemoglobina : Hb A ($\beta_2\alpha^A_2$) e Hb D ($\beta_2\alpha^D_2$). A combinação das cadeias que constituem o hemolisado de *Geochelone carbonaria*, como acima citado, não possibilita a heterogeneidade de componentes observada. Outras espécies de animais que apresentam 3 cadeias de globinas na constituição do hemolisado, demonstram também a presença de apenas 2 tipos de componentes, Hb D e Hb A, sendo estes, do tipo simétrico. Este tipo de arranjo estrutural é observado no hemolisado de aves (NOTHUM et alii, 1989)

No entanto, segundo OHKUBO et alii (1993) e TSUYUKI & RONALD (1971), a heterogeneidade também poderia ser gerado pela presença de componentes assimétricos *in vivo*. Estes componentes seriam pouco estáveis e, portanto, difíceis de serem observados *in vitro*. A presença destes componentes assimétricos seria possível principalmente em espécies

que apresentam dissociação do tetrâmero em dímeros. A partir desta possibilidade tornou-se necessário a identificação dos componentes após o tratamento com um agente alquilante (iodoacetamida). Como pôde ser observado na figura 10, 3 frações foram obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (fração 1, 2 e 3), a partir do hemolisado de *Geochelone carbonaria* tratado com iodoacetamida. Estas frações foram homogêneas quanto ao padrão eletroforético (Fig.10b) e a fração 1 correspondeu ao componente eletroforético IIIⁱ, a fração 2 correspondeu ao componente eletroforético IIIⁱ e a fração 3 correspondeu ao componente IIⁱ. A identificação da constituição, a nível de globina, dos 3 componentes foi interessante na tentativa de determinar a presença de componentes assimétricos no hemolisado. Quando submetida a PAGE na presença de uréia e triton X-100 (Fig.10c), a eletroforese demonstrou que a fração 1 (componente IIIⁱ) era constituída por $(G_1)_2(G_3)_2$, a fração 3 (componente IIⁱ) era constituída por $(G_1)_2(G_2)_2$ e a fração 2 (componente IIIⁱ) apresentou a mesma constituição que a fração 1, sugerindo portanto, que a fração II era um componente originado a partir da formação de pontes de dissulfeto mistas, possivelmente com glutathione. Isto demonstrou a rápida formação dos componentes IIIⁱ no hemolisado ou então, que este está presente *in vivo*.

A separação cromatográfica das frações polimérica e tetramérica por cromatografia em sephadex G-100 (Fig.11) e posterior eletroforese (PAGE) na presença de uréia e triton X-100, com as frações eluídas (Fig.11a), possibilitou observar que a fração polimérica (fração I da Fig.11) era constituída pelos 3 tipos de cadeias (G_1 , G_2 e G_3). A ausência da cadeia G_2 na fração tetramérica (fração II da Fig.11) indicou que esta globina era a principal responsável pela polimerização dos componentes. Entretanto, a

presença dos 3 tipos de globina na fração polimérica, indicou que pelo menos 2 cadeias devem apresentar grupos SH reativos (fração I da Fig.11). REISCHL *et alii*, (1989) e RÜCKNAGEL & BRAUNITZER (1988), demonstraram que as 3 cadeias presentes nos hemolisados de *Phrynops hilarii* e *Chrysemys picta bellii* apresentam resíduos de cisteína em suas estruturas primárias. Contudo, apenas a espécie *Phrynops hilarii*, apresenta a capacidade de polimerização, devido ao arranjo terciário e quaternário das subunidades.

6- PERSPECTIVAS DE ESTUDO DA HEMOGLOBINA DE *Geochelone carbonaria*.

O estudo funcional dos componentes de hemoglobina de *Geochelone carbonaria* observados em eletroforese (Fig.06) é sem dúvida fundamental para se estabelecer a correlação entre a estrutura e função. Este estudo oferecerá dados com relação a interação entre os componentes e o tipo de modulação a que cada componente está sujeito.

Separação dos componentes por cromatografia de troca iônica e posterior determinação da composição de globina de cada componente.

Determinação da composição de aminoácidos de cada cadeia de globina.

A nível de estrutura tridimensional estudos utilizando técnica de EPR, nos forneceriam dados para a observação se o estado T (tenso) é predominante nestas hemoglobinas.

Enfatizar os estudos sobre os grupamentos SH de glutathione e de hemoglobina, procurando assim, observar o comportamento destes grupos tióis quando o eritrócito está sob uma condição "stress" e observar se existe alguma relação entre a presença de pontes de dissulfeto mistas e os mecanismos de proteção da hemoglobina e do eritrócito contra espécies reativas de oxigênio.

7- CONCLUSÕES

1- A hemoglobina *Geochelone carbonaria*, apresentou baixa afinidade pelo oxigênio, com valores de P_{50} maiores que de algumas espécies de tartarugas marinhas estudadas por outros autores.

2- A molécula se mostrou cooperativa, mas com valores de nH bastante heterogêneos, variando de 1,2 a 2,0 para os hemolisados "stripped", na presença de IHP e hemolisado total. Na presença de ATP variou de 2,0 a 2,5.

3- O sítio para ligação de fosfato tem maior afinidade por IHP em relação ao ATP, mas o efeito alostérico de fosfatos (IHP e ATP) sobre a ligação da hemoglobina com oxigênio é pequeno, mesmo em concentrações elevadas, e quando em concentrações que obedecem a razão molar fisiológica de concentração do fosfato e de hemoglobina, o efeito é praticamente inexistente.

4- A amplitude do efeito Bohr (-0,60) não varia significativamente em presença de ATP ou IHP, e sob o ponto de vista fisiológico, parece que os mecanismos que regulam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio está mais diretamente relacionada com fatores que controlam a concentração de íons hidrogênio no sangue do que a modulação por ATP ou IHP.

5- O hemolisado de *Geochelone carbonaria* apresenta apenas 2 componentes diferenciados estruturalmente, evidenciado pelo tratamento com agente alquilante com agente alquilante $(G_1G_2)_2$ e $(G_2G_3)_2$.

6- A cadeia G_2 é a principal responsável pela polimerização do componente; no entanto, a outra cadeia parece também apresentar grupos -SH reativos, contudo, em menor número ou menos reativos.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, A.; WELLS, R. M. G.; BRITAIN, T. & BRAUNITZER, G.
"Primary structure of the hemoglobins from *Sphenodon* (*Sphenodon punctatus*, Tuatara, Rynchocephalis)". **Biol. chem. Hoppe-seyler**, 369: 755-764, 1988.
- ABBASI, A. & BRAUNITZER, G. "Primary Structure of Hemoglobin from Monitor Lizard (*Varanus exanthematicus albigularis*-Squamata)". **Biol. chem. Hoppe-seyler**, 372: 473-479, 1991.
- ALTER, B. P.; GOFF, S. C.; EFREMOV, G. D.; GRAVELY, M. E. & HUISMAN, T. H. J. "Globin chain eletrophoresis: a new approach to the determination of the γ^G/γ^A ration infetal haemoglobin and to studies of synthesis". **British Journal of Haematology**, 44: 527-534, 1980.
- BALDWIN, J. M. "structure and function of haemoglobin". **Progr. Biophys. Mol. Biol.**, 29: 225-320, 1975.
- BARTLETT, G. R.. "Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish". **Comp. Biochem. Physiol.**, 55A:211-214, 1976.
- BARTLETT, G. R. "Phosphate compounds in Vertebrate Red Blood Cells". **Amer. Zool.**, 20: 103-114, 1980
- BARTLETT, G. R. "Water-soluble phosphates of fish red cells". **Can. J. Zool.**, 56: 870-877, 1978.
- BAUER, C.; ENGELS, V. & PALEUS, S. . "Oxygen binding to haemoglobin of the primitive vertebrate *Myxine glutinosa*". **Nature**, Lond., 256: 66-68, 1975.
- BAUMANN. R.; GOLDBACK, E.; HALLER, E. A. & WRIGHT, P..
"Organic phosphates increase the solubility of avian haemoglobin D

- and embryonic chicken haemoglobin". **Biochem. J.**, 217: 767-771, 1986.
- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. "Determination of -SH groups in proteins". In **methods of Biochemical Analysis** (Edited by Glick, D), 10: 43-70, 1962. Wiley International, New York.
- BOHR, C.; HASSELBALCH, K. & KROGH, A.. "Über einen in biologischer Beziehung Wichtigen einfluss, den die Kohlensäurespannung des blutes auf desen Sauerstoffbindung". **Skand. Arch. Physiol.**, 16: 402-412, 1904.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B.; FERRUZZI, G.; McCURDY, P. R.; FOX, J. & MOO PENN, W.. "Hemoglobin Providence Functional consequences of two alterations of the 2,3- Diphosphoglycerate binding site at position β 82". **J. Biol. Chem.**, 251: 7563-7571, 1976.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.. "Urea tolerance as a molecular adaptation in elasmobranch haemoglobin". **Science**, N.Y., 186: 57-59, 1982.
- BOSSA, F.; BARRA, D.; COLLETA, M.; MARTINI, F.; LIVERSONI, A.; PETZUZZELLI, R.; BONAVENTURA, J. & BRUNORI, M.. "Primary structure of hemoglobins from Trout (*Salmo irideus*). Partial determination of Amino Acid Sequence of Hb Trout IV". **FEBS LETTER**, 64: 76- , 1976.
- BRAUNITZER, G. & GODOVAC, J.. "The amino acid sequence of phasant (*Phasianus colchicus colchicus*) haemoglobins". **Hoppe-Seyler's Z. physiol. chem.**, 363: 229-238, 1982.
- BRIEHL, R. W.. "The relation between the oxigen equilibriun and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin". **J. Biol. Chem.**, 238: 2361-2366, 1963.

- BRITTAİN, T.; BARBER, D.; GREENWOOD, C. & WELLS, R. M.. "An investigation of the cooperative binding of carbon monoxide to the haemoglobin of the carpet shark, *Cephaloscyllium*". **Comp. Biochem. Physiol.**, 72: 689-693, 1982.
- BRITTAİN, T. & WELLS, R. M.. "An investigation of the cooperative functioning of the haemoglobin of the crocodile, *Crocodylus porosus*". **Comp. Biochem. Physiol.**, 98B (4):641-646, 1991.
- BRITTAİN, T.. "Cooperativity and allosteric regulation in non-mammalian vertebrate haemoglobins". **Comp. Biochem. Physiol.**, 99B (4): 731-740, 1991.
- BROWNING, J.. "Urea levels in plasma and erythrocytes of southern fidler skate. *Trygonorhina fasciata geranierius*". **J. exp. Zool.**, 203: 325-320, 1978.
- BRUNORI, M.; FALCIONI, G.; FORTUNA, G. & GIARDINA, B.. "Effect of anions on the oxygen binding properties of the haemoglobin components from Trout (*Salmo irideus*)". **Archs. Biochem. Biophys.**, 168: 512-519, 1975.
- BUNN, H. F.. "Differences in the interaction of 2,3-disphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins". **Science**, 172: 1049-1050, 1971.
- BUNN, H. F.. "Regulation of hemoglobin function in mammals". **Am. Zool.**, 20: 199-211, 1980.
- BURGGREN, W., HAHN, C. E. W. & FOËX, P.. "Properties of blood oxygen transport in the turtle *Pseudemys scripta* and the tortoise *Testudo graeca* : effects of temperature, CO₂ and pH". **Respiration Physiology**, 31: 39-50, 1977.
- CAUGHEY, W. S.. "Porphyrin proteins and enzymes". **Ann. Rev. Biochem.**, 36: 611-644, 1967(parte II).

- DAFRÉ, A. L. & REISCHL, E.. "High hemoglobin mixed disulfide content in hemolysates from stressed shark". **Comp. Biochem. Physiol.**, 96B(2): 215-219, 1990.
- DAVIS, B. J.. "Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins". **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 121: 404-427, 1964.
- DAVIS, B. J.. "Developmental changes in the blood oxygen transport system of kemp's ridley sea turtle, *Lepidochelys kempi*". **Can. J. Zool.**, 69: 2660-2666, 1991.
- DICKINSON, F. M. & GIBSON, Q. H.. "Studies on carbon monoxide binding by shark haemoglobin". **Biochem. J.**, 197: 436-446, 1981.
- DOBZHANSKY, T.. "In: Genetics and origins of species". Edição I. Columbia University Press, New York, 1937.
- FOCESI JR., A., OGO, S. H. & MATSUURA, M. S. A.. "Dimer-tetramer transition in hemoglobin from *Liophis miliaris* -II. Evidence with the stripped proteins". **Comp. Biochem. Physiol.**, 96B(1): 119-122, 1990.
- FOCESI JR., A., BONILLA, G. O., NAGATOMO, C. L. & MATSUURA, M. S. A.. "Dimer-tetramer transition in hemoglobin from *Liophis miliaris* -III. The phenomenon in snake species of different evolutionary levels". **Comp. Biochem. Physiol.**, 103B(4): 985-989, 1992.
- FYHNN, U. E. H. & SULLIVAN, B.. "Elasmobranch haemoglobins: dimerisation and polymerisation in various species". **Comp. Biochem. Physiol.**, 50: 119-129, 1975.
- FYHNN, U. E. H., FYHNN, H. J., DAVIS, D. J., POWERS, D. A., FINK, W. L. & GARLICK, R. L.. "Haemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes". **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 39-66, 1979.

- FUTUYMA, D. J.. "In: *Biologia evolutiva*". 2. ed., Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992.
- GAREL, M.C.; DOMENGET, C.; CABURI, J. M; PREHU, C.; GALATEROS, F. & BEUZARD, Y.. "Covalent Binding of Glutathione to Hemoglobin". **J. Biol. Chem.**, 261 (31): 14704-14709, 1986.
- GAUMER, A. E. H. & GOODNIGHT, C. J.. "some aspects of the hematology of turtles as related to their activity". **Am. Midl. Nat.**, 58: 332-340, 1957.
- GIARDINA, B., GALTIERI, A., LANIA, A., ASCENZI, P., DESIDERI, A., CERRONI, L. & CONDO, S. G.. "Reduced sensitivity of transport to allosteric effectors and temperature in loggerhead sea turtle hemoglobin: functional and spectroscopic study". **Biochimica et Biophysica Acta**, 1159: 129-133, 1992.
- HAZARD, E. S. & HUTCHISON, V. H.. "Distribution of acid-soluble phosphates in the erythrocytes of selected species of amphibians". **Comp. Biochem. Physiol.**, 83A: 111-124, 1982.
- HENDERSON, L. J.. "Blood. A study in general physiology. New Haven, Yale University Press, 1928".
- HIEBL, I., WEBER, R. E., SCHNEEGANSS, D. & BRAUNITZER, G.. "The primary structures and functional properties of the major and minor hemoglobin components of the adult white-headed vulture (*Trigonoceps occipitalis*, Aegyptiinae)". **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 370: 699-706, 1989.
- HUISMAN, T. H. J. & DOZY, A. M.. "Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione". **J. Lab. Clin. Med.**, 60: 302-319, 1962.

- ISAACKS, R. E., HARKNESS, D. R. & WITHAM, P. R.. "Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and oxygen affinity of whole blood in the loggerhead (*Caretta caretta*) and green sea turtle (*Chelonia mydas*) during development". **Devel. Biol.**, 62: 344-353, 1978.
- KLEINSCHMIDT, T & SGOUROS J.G.. "Hemoglobin sequences". **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 368: 579-615, 1987.
- KOPPITZ, B.; VOGEL, F. & MAYR, G. W.. "Mammalian aldolases are isomer-selective high-affinity inositol polyphosphate binders". **Eur. J. Biochem.**, 161: 421-433, 1986.
- KURATA, M.; SUZUKI, M. & AGAR, N. S.. "Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals". **Comp. Biochem. Physiol.**, 106B (3): 477-487, 1993.
- LAPENNAS, G. N. & LUTZ, P. L.. "Oxygen affinity of sea turtle blood". **Resp. Physiol.**, 48: 59-74, 1982.
- LAURENT, T. C. & KILLANDER, J.. "A theory of gel filtration and its is experimental verification". **J. Cheomat.**, 14: 317-330, 1964.
- LENFANT, C., JOHANSEN, K., PETERSEN, J. A. & SCHMIDT-NIELSEN, K.. "Respiration in the fresh water turtle, *Chelys fimbriata*". **Resp. Physiol.**, 8: 261-275, 1970.
- LOURO, S. R. W. & BEMSKI, G.. "Turtle hemoglobin: evidence of a T-state oxyhemoglobin". **Febs Letters**, 142(2): 293-296, 1982.
- LUTZ, P. L. & LAPENNAS, G. N.. "Effects of pH, CO₂ and organic phosphates on oxygen affinity of sea turtle hemoglobins". **Resp. Physiol.**, 48: 75-87, 1982.

- MACCUTCHEON, F. H. "Specific oxygen affinity of hemoglobin in elasmobranchs and turtles". **J. Cell. Comp. Physiol.**, 29: 333-344, 1947.
- MATSUURA, M. S. A., OGO, S. H. & FOCESI JR, A. "Dimer-tetramer transition in hemoglobins from *Liophis miliaris*-I. Effect of organic polyphosphates". **Comp. Biochem. Physiol.**, 86A(4): 683-687, 1987.
- MATSUURA, M. S. A., FUSHITANI, K. & RIGGS, A. "The aminoacid sequences of the α and β chains of hemoglobins from snake *Liophis miliaris*". **J. Biol. Chem.**, 264(10): 5515-5521, 1989.
- MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J. P. "On the nature of allosteric transitions: a plausible model". **J. Mol. Biol.**, 12: 88-118, 1965.
- NOTHUM, R., WEBER, R. E., KÖSTERS, J., SCHNEEGANSS, D. & BRAUNITZER, G. "Aminoacid sequences and functional differentiation of hemoglobins A and D from swift (*Apus apus*, Apodiformes)". **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 370: 1197-1207, 1989.
- OBERTHUR, W., BRAUNITZER, G. & KALAS, S. "Untersuchungen am hamoglobin der graugans (*Anser anser*). Die primastruktur der α -und β -ketten der hauptkomponents". **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 362: 1101-1112, 1981.
- OBERTHUR, W. & BRAUNITZER, G. "Haemoglobin vom gemeinen star (*Sturvus vulgaris*, Passeriformes): Die primarstrukter der α A and β ketten". **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 365: 159-173, 1984.
- OGO, S. H.; BERNADES, C. F.; GLASS, M. L.; TORSONI, M. A. & VERCESI, A. E. "Functional mitochondria in snake Bothrops alternatus erythrocytes and modulation of Hb-O₂ affinity by mitochondrial ATP". **J. Comp. Physiol.**, 163B: 614-619, 1993.

- OHKUBO, N.; WATANABE, S.; OSHIRO, T.; TAKASHIMA, H. & NAKAJIMA, H.. "Subunit structures of multiple hemoglobins in carp". **J. Comp. Physiol.** 163B: 445-451, 1993.
- ORNSTEIN, L.."Disc electrophoresis-I: Background and theory". **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 121: 321-349, 1964.
- OYAMA JR., S., NAGATOMO, C. L., BONILLA, G. O., MATSUURA, M. S. A. & FOCESI JR., A.."Bothrops alternatus hemoglobin components. Oxygen binding properties and globin chain hydrophobic analysis". **Comp. Biochem. Physiol.**, 105B(2): 271-275, 1993.
- PELLER, L.."Cooperative deoxygenation of haemoglobin: asymmetry of binding and subunit differences". **Nature**, Lond., 300: 661-662, 1982.
- PERUTZ, M. F.."Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin". **Nature**, 228: 726-739, 1970.
- PERUTZ, M. F. & IMAI, K.. " Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobin". **J. Mol. Biol.**, 136: 183-191, 1980.
- PERUTZ, M. F., KILMARTIN, J. V., NAGAI, K., SZABO, A. & SIMON, S. R.."Influence of globin structures on the state of the heme. Ferrous low spin derivatives". **Biochemistry**, 15(2): 378-387, 1976.
- PERUTZ, M. F., SANDERS, J. K. M., CHENERY, D. H., NOBLE, R. W., PENNELLY, R. R., FUNG, L. W., -M., Ho., C., GIANNINI, I., PÖRSCHKE, D. & WINKLER, H.."Interactions between the quaternary structure of the globin and the spin state of the heme in ferric mixed". **Biochemistry**, 17: 3640-3652, 1978.
- PERUTZ, M. F.."Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme". **Ann. Rev. Biochem.**, 48: 327-386, 1979.

- PERUTZ, M. F. "Species adaptation in a protein molecule". **Molec. Biol. Evol.**, 1: 1-28, 1983.
- PERUTZ, M. F. "Mechanisms regulation the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide". **Annu Rev Physiol.**, 52: 1-25, 1990.
- PITTET, D.; SCHLEGEL, W., LEW, D. P., MONOD, A. & MAYR, G. W.. "Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced by chemotactic peptide stimulation in HL-60 cells". **J. Biol. Chem.**, 264: 18489-18493, 1989.
- POUGH, F. H. "Blood oxygen transport and delivery in reptiles". **Amer. Zool.**, 20: 173-185, 1980.
- POWERS, D.A. "Molecular ecology of teleost fish hemoglobins. Strategies for adapting to changing environments". **Am. Zool.**, 20: 139-162, 1980.
- POYART, C., WAJCMAN, H. & KISTER, J. "Molecular adaptation of hemoglobin function in mammals". **Respiration Physiology**, 90: 3-17, 1992.
- di PRISCO, G., CONDO, S.G., TAMBURRINI, M. & GARDINA, B. "Oxygen transport in extreme environments". **TIBS**, 16: 471-474, 1991.
- RAPOPORT, S. & GUEST, G. M. "Distribution of acid soluble phosphorous in the blood cells of various vertebrates". **J. Biol. Chem.**, 138: 269, 1941.
- REISCHL, E. & DIEFENBACH, C. O. da C. "Heterogeneity and polimerization of hemoglobin of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Reptilia)". **Comp. Biochem. Physiol.**, 54B: 543-545, 1976.

- REISCHL, E.; DIEFENBACH, C. O. da C. & TONDO, C. V.. "Ontogenetic variation of hemoglobins from South american chelonia (reptilia)". **Comp. Biochem. Physiol.**, 62B, 539-543, 1979.
- REISCHL, E; HAMPE, O. G. & CRESTANA, R. H. "Time course of SH group disappearance from the haemoglobins of the turtle *Phrynops hilarii*". **Comp. Biochem. Physiol.**, 77B (1): 207-210, 1984.
- REISCHL, E.. "High sulphhydryl content in turtle erythrocytes: is there a relation with resistance to hypoxia?". **Comp. Biochem. Physiol.**, 85B: 723-726, 1986.
- REISCHL, E.; RUCKNAGEL, K. P.; KLEINSCHMIDT, T. & BRAUNITZER, G."Composição e aminoácidos das cadeias α A e β das hemoglobinas da tartaruga *Phrynops hilarii*". **Ciência e cultura** (revista da sociedade brasileira para o progresso da ciência). 41 (8): 801-803, agosto, 1989.
- REISCHL, E. & DAFRÉ, A. L.. "Glutathione mixed disulphides and heterogeneity of chicken hemoglobins". **Comp. Biochem. Physiol.**, 102B (4): 849-853, 1992.
- RIGGS, A.; SULLIVAN, B. & AGEE, J. R.. "Polimerization of frog and turtle hemoglobins". **Proc. natn. acad. sci. U.S.A.**, 51: 1127-1134, 1964.
- RIGGS, A.. "Factors in the evolution of hemoglobin function". **Federation Proceedings**, 35 (10): 2115-2118, 1976.
- ROBIN, G.. "Relationship between temperature and plasma pH and carbon dioxide tension in the turtle". **Nature**, Lond, 195: 1962.
- ROSSI-FANELLI, A & ANTONINI, E.. "Studies on the oxygen and carbon-monoxide equilibria of human myoglobin". **Archs, Biochem. Biophys.**, 77: 428-492, 1958.

- RÜCKNAGEL, K. P. & BRAUNITZER, G.. "The primary structure of the major and minor hemoglobin component of Adult western Painted Turtle (*Chrysemys picta bellii*). **Biol. Chem. Hoppe-Seyler's**, 369: 123-131, 1988.
- RÜCKNAGEL, K. P.; BRAUNITZER, G. & WIESNER, H.. "The primary structure of the α I and β I chains of common Iguana (*Iguana iguana*) hemoglobin". **Biol. Chem. Hoppe-Seyler's**, 369: 1143-1150, 1988.
- SEXTON, J. D. & MUTUS, B.. "Glutathione reductases from a variety of sources are inhibited by physiological levels of glutathione". **Comp. Biochem. Physiol.**, 103B: 897-901, 1992.
- SHEELER, P. & BARBER, A. A.. "Comparative hematology of the turtle, rabbit and rat". **Comp. Biochem. Physiol.**, 11: 139-145, 1964.
- SPIX, J.. "Species novae testudinatum Brasiliam". **Monachii**, 24, 1924.
- SOHAL, R. S. & FARMER, K. J. & ALLEN, R. G.. "Correlates of longevity in two strains of the housefly, *Musca domestica*". **Mech. Ageing Dev.**, 40: 171-179, 1987.
- SOHAL, R. S. & ALLEN, R. G.. "Relationship between oxygen metabolism, aging and development". **Adv. Free Rad. Biol. Med.**, 2: 117-160, 1986.
- STEPHENS, G. A. & CREEKMORE, J. S.. "Blood collection by cardiac puncture in conscious turtles". **Copéia**, 2: 522-523, 1983.
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.. "Haemoglobin: Reversal of oxidation and polymerization in turtle red cells". **Nature**, Lond. 204: 1098-1099, 1964.
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.. "The subunit dissociation properties of turtle haemoglobins". **Biochem. Biophys. Acta.**, 140: 276-283, 1967a.

- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.. "Structure, function and evolution of haemoglobins-II. Electrophoretic studies". **Comp. Biochem. Physiol.**, 23: 449-458, 1967b.
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.. "Structure, function and evolution of haemoglobins-III. Oxygenation properties". **Comp. Biochem. Physiol.**, 23: 459-474, 1967c
- SULLIVAN, B.. "Reptilia hemoglobins. In chemical zoology (edited by Florkin M. and Scheer, B. T.) vol. 9, cap.14. Academic Press N. Y., 1974a.
- SULLIVAN, B.. "Amphibian hemoglobins, In chemical zoology (edited by Florkin M. and Scheer, B. T.) vol. 5, cap. 5, Academic Press N. Y., 1974b.
- TAKEI, H.; OTA, Y.; WER, K.; KIYOHARA, I. & MATSUDA, G.. "Amino acid sequence of the α chain of chicken A1 haemoglobin". **J. Biochem.**, 77: 1345-1347, 1975.
- TSUYUKI, H. & RONALD, AP.. "Molecular basis for multiplicity of Pacific salmon hemoglobins: evidence for in vivo existence of molecular species with up to four different polypeptides". **Comp. Biochem. Physiol.** 39B: 503-522, 1971.
- TOMITA, S. & RIGGS, A.. "Studies of the interaction of 2,3-diphosphoglycerate and carbon dioxide with hemoglobin from mouse, man and elephant". **J. Biol. Chem.**, 246: 547-554, 1971.
- VANDECASSERIE, C.; PAUL, C.; SCHNEK, A. G. & LEONIS, J.. "Oxygen affinity of avian haemoglobins". **Comp. Biochem. Physiol.**, 44: 711-718, 1973.
- WEBER, G.. "Asymmetric ligand binding to haemoglobin". **Nature**, Lond., 300: 603-607, 1982.

- WEBER, R. E. & JENSEN, F. B.. "Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates". **Ann, Rev. Physiol.**, 50: 161-179, 1988.
- WELLS, R. M. & DAVIE, P. S.."Oxygen binding by the blood and haematological effects of capture stress on two big game fish: mako shark and striped marlin". **Comp. Biochem. Physiol.**, 81: 643-646, 1985.
- WELLS, R. M. & BALDWIN, J. "Oxygen transport in marine green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings: blood viscosity and control of hemoglobin oxygen affinity". **J. Exp. Biol.**, 188: 103-114, 1994.
- WINTERBOURN, C. C.. "Oxidative reactions of hemoglobins". **Methods in Enzymology**, 186: 265-272, 1990.
- WOOD, S. C. & JOHANSEN, K.. "Respiratory adaptations to diving in the Nile monitor lizard, *Varanus niloticus*". **J. Comp. Physiol.**, 89: 145-158, 1974.
- WOOD, S. C.; LYKKEBOE, G.; JOHANSEN, K.; WEBER, R. E. & MALOIY, G. M. O.. "Temperature acclimation in the pancake tortoise, *Malacochersus tornieri*: metabolic rate, blood pH, oxygen affinity and red cell organic phosphates". **Comp. Biochem. Physiol.**, 59A: 155-160, 1978.
- WYMAN, J.. "Heme Proteins".**Adv. Protein. Chem.**, 4: 407-525, 1948.
- WYMAN, J.. "Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: A second look". **Adv. Protein Chem.**, 19: 223-286, 1964.

9- COMUNICAÇÕES CIÊNTIFICAS DECORRENTES DO TRABALHO DE TESE.

TORSONI, M. A.; YOTOKO, K. & OGO, S. H. "Functional properties of hemoglobin from *Geochelone carbonaria*". Apresentado durante a XXII reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambú (MG) de 1 a 4 de maio de 1993.

TORSONI, M. A.; CARVALHO, T. L. & OGO, S. H. "Polymeryzation and SH groups detremination in hemolysate of *Geochelone carbonaria* (turtle). Apresentado durante a XXIII reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambú (MG) de 14 a 17 de maio de 1994.

TORSONI, M. A. & OGO, S. H. "Heterogeneity of *Geochelone carbonaria* (turtle) hemolysate". Apresentado durante a XXIII reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambú (MG) de 14 a 17 de maio de 1994.