

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Liophis miliaris

PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DE HEMOGLOBINAS
DE *Liophis miliaris* *Helicops modestus*
E IMPLICAÇÕES ESTRUTURAIS

Tese de Doutorado

Orientador:-Prof.Dr.Aldo Focesi Jr.

Maria sumiko Arita Matsuura



UNICAMP

COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: Maria Sumiko Arita Matsunura

Nº de Identificação: 755172

Endereço para Correspondência: Deptº Bioquímica - UNICAMP

Curso: Biologia Celular e Molecular

Nome do Orientador: Aldo Focesi Júnior

Título da Dissertação ou Tese: Propriedades Imunológicas de Hemoglobinas de *Liophys miliaris* e *Helicops modestus* e Implicações estruturais

Data proposta para a Defesa: 30 de setembro de 1982

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

26 / 08 / 82

Data

Maria Sumiko Arita Matsunura
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1 / 1

Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1 / 1

Data

assinatura do aluno

À meus pais, esposo, filha e irmãs, que pela compreensão, total apoio e incentivo constante, muito contribuíram como fonte de estímulo para realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior, exemplo de pesquisador, que através de orientação segura e criteriosa, acompanhou-nos durante todo o tempo como orientador e amigo, nosso profundo agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. José Aristodemo Pinotti, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas; ao Prof.Dr. Clodowaldo Pavan, DD. Diretor do Instituto de Biologia ; ao Prof.Dr. Walter August Hadler; Professor Titular do Departamento de Histologia e ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, Chefe do Departamento de Bioquímica, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento.

Ao Prof.Dr. Paulo de Toledo Artigas, Professor Titular do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, pela colaboração científica, doação e classificação das serpentes utilizadas neste trabalho.

Aos Profs. Dr. Oswaldo Antonio Serra, Professor Adjunto do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP e Dr. José Carlos Say, professor Assistente Doutor do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, pelas correções e valiosas sugestões dadas ao presente trabalho.

Aos Profs. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, Dra. Lucia Pereira da Silva Airoidi, Dra. Nilce Correa Meirelles, Professores Colaboradores do Departamento de Bioquímica - UNICAMP, pelo espírito de colaboração, incentivo e sugestões valiosas apresentados durante todas as etapas da realização desta tese.

À Prof. Satie Hatsushika Ogo, pela amizade, apoio, sugestões valiosas e principalmente pelo espírito de colaboração científica que tem demonstrado desde o início deste trabalho.

À Sra. Anna Gagliardi, bibliotecária-chefe do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo esmero e dedicação no trabalho de referências bibliográficas.

Ao Prof.Dr. Benedito de Oliveira Filho, Professor Titular do Departamento de Bioquímica e à Srta. Rizoleta Marquez, pela colaboração científica.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica e do Instituto de Biologia - UNICAMP, que contribuíram para a realização da presente tese.

À todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

O orientador e a autora externam os agradecimentos às seguintes instituições de pesquisas:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Conselho Nacional de Pesquisa.

ABREVIATURAS

Ac - Anticorpo

Ag - Antígeno

ATP - Adenosina-5'-trifosfato

2,3-DPG - 2,3 difosfoglicerato

EDTA - Ácido etleno-diamino-tetracético

Hb - Hemoglobina

IHP - Inositol hexafosfato

PCMB - p-cloromercuribenzoato

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TEMED - N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

TPCK - 1-tosilamino-2-feniletilclorometil cetona

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	16
Material biológico	16
Preparo dos hemolisados	16
Preparo de hemolisados desionizados	17
Preparo de antígenos	18
Obtenção de antisoros	18
Imunodifusão dupla	19
Obtenção de soro monoespecífico	20
Separação dos componentes de hemoglobinas	21
Preparo de globinas	22
Isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida	23
Análise da composição de amino ácidos	24
Determinação de grupos sulfidrilas tituláveis	24
Determinação de amino ácidos N-terminal	25
Determinação de amino ácidos C-terminal	26
Digestão enzimáticas das globinas	27
RESULTADOS	29
Estudo imunológico das hemoglobinas de <i>H.modestus</i> e <i>L.miliaris</i>	29
Estudos de propriedades estruturais	33
Separação dos componentes das hemoglobinas	33
Análise dos diferentes componentes das hemoglobinas, por imunodifusão dupla	37

Análise das globinas por isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida	40
Determinação da composição em amino ácidos das globinas	42
Determinação de grupos sulfidrilas livres	44
Determinação de amino ácidos N-terminal	44
Determinação de amino ácidos C-terminal	46
 DISCUSSÃO	 51
 CORRELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO	 63
 RESUMO	 69
 SUMMARY	 71
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 73

INTRODUÇÃO

A hemoglobbina constitui excelente modelo para o estudo da correlação entre estrutura e função de proteínas, por possuir cadeias polipeptídicas relativamente pequenas, apresentando cerca de 140 a 150 resíduos de amino ácidos, e por desempenhar funções já bem estabelecidas (ANTONINI & BRUNORI, 1971).

Sendo fundamental, na presente tese o binomio estrutura-função, procuraremos abordar e expor de maneira sucinta alguns conhecimentos relevantes sobre o assunto.

A hemoglobina humana é, evidentemente, a que tem sido melhor estudada sob ponto de vista estrutural, funcional e ontogênica. As estruturas tridimensionais das formas oxigenada e desoxigenada, assim como as sequencias de amino ácidos de várias cadeias polipeptídicas já foram elucidadas (INGRAN, 1957 ; KENDREW et alii, 1960 ; KENDREW, 1961 ; 1963 ; MONOD et alii, 1965 ; PERUTZ, 1965 ; BOLTON et alii, 1968 ; PEUTZ, 1968; BOLTON & PERUTZ, 1970 ; MUIRHEAD & GREER, 1970 ; CHAUVET & ACHER, 1971 ; 1972 ; KILMARTIN et alii, 1978 ; KILMARTIN et alii, 1980).

Estruturalmente, este pigmento respiratório de importância fundamental para os seres vivos, é constituído de quatro cadeias polipeptídicas, das quais duas são denominadas cadeias α , cada uma contendo 141 resíduos de amino ácidos, e as outras duas designadas cadeias β , apresentando cada uma 146 resíduos de amino ácidos. Esses dois tipos de cadeias, α e β , possuem estruturas secundárias e terciárias muito semelhantes entre si e similares a mioglobina (PERUTZ et alii, 1978), e as diferenças nas estruturas primárias existentes entre as três espécies moleculares não determinam grandes alterações nas suas

conformações tridimensionais. O conhecimento da estrutura tridimensional da molécula de hemoglobina, foi obtido através dos estudos de cristalografia por raio-X (PERUTZ et alii, 1968 e MUIRHEAD & GREER, 1970). A mioglobina que contém uma única cadeia polipeptídica é composta de 153 resíduos de amino ácidos, sendo muito semelhante à cadeia da hemoglobina humana.

O diagrama esquemático proposto por KENDREW et alii, 1963 para mioglobina, propõe a existência de oito segmentos helicoidais, designados pelas primeiras letras do alfabeto (A a H), ligados entre si por sete segmentos não helicoidais (AB, BC, CD, DE, EF, FG e GH), formados, geralmente, por resíduos de amino ácidos de natureza polar. A região amino-terminal, recebeu denominação de NA e a região carboxi-terminal de HC. Estes segmentos de A a H constituem a cadeia polipeptídica, que ligada ao grupo heme, forma um monômero ou subunidade. A associação de dois pares de subunidades (α e β) através de ligação não covalente constitui a molécula de hemoglobina. Essa associação permite a formação de uma cavidade no centro da molécula, constituída de amino ácidos de natureza polar que mantêm água em seu interior. Além dessa cavidade polar, existem alguns resíduos hidrofílicos na superfície externa do tetrâmero, que condicionam hidrossolubilidade à molécula. Os grupos hemes ficam localizados em cavidade interna da molécula, onde resíduos hidrofóbicos mantêm um micro ambiente de baixa constante dielétrica, conservando o ferro do anel pirrólico na forma de Fe(II), o que possibilita a ligação reversível do oxigênio molecular (O_2) (PERUTZ, 1965).

O ferro do grupo heme se encontra deslocado do plano do heme na desoxihemoglobina (forma T), e cada resíduo C-terminal está firmemente ligado através de ligações que

se estabelece i) entre o grupo α -carbonil da arginina $141\alpha_1$ (HC3) e α -aminogruppo da valina $1\alpha_2$ (NA1), ii) o grupo guanidíni-
co da arginina $141\alpha_1$ e o aspartato $126\alpha_2$ (H9), iii) o α -carbo-
nil da histidina $146\beta_1$ (HC3) que está ligado ao ϵ -aminogruppo da
lisina $40\alpha_2$ (C5) e iv) o grupo imidazólico da histidina $146\beta_1$
ao aspartato $94\beta_1$ (FG1). Estes pares de residuos são ligados
por grupos opostamente carregados, denominadas ligações salinas.
Na desoxihemoglobina, as tirosinas (HC2) de ambas as cadeias es-
tão fortemente estabilizadas por forças de van der Waals com as
hélices e parcialmente por pontes de hidrogenio entre os seus
grupos OH e as carbonilas da valina (FG5) (PERUTZ,1968;BALDWIN &
CHOTHIA, 1979).

Quando a desoxihemoglobina reage com oxigenio mo-
lecular, o ferro do grupo heme sofre uma transição reversível ,
de alto spin para baixo spin, trazendo o núcleo do anel porfirí-
nico para o mesmo plano do ferro. Com essa alteração, ocorre mo-
vimento na cadeia (F8) aproximando-a do heme, produzindo um mo-
vimento na cadeia polipeptidica. Este movimento desloca a héli-
ce F para junto da hélice A, expulsando a tirosina (HC2) da ca-
vidade entre as hélices F e H, devido ao seu estreitamento. Es-
sa tirosina expelida, altera a posição do grupo carbonil adja-
cente, rompendo as pontes salinas e provocando dissociação de
protons que participam do efeito Bohr. Esse movimento das héli-
ces induz modificações na estrutura quaternária da molécula de
hemoglobina que passa a ter maior afinidade pelo O_2 . Na oxihemo-
globina (forma R), os residuos C-terminais das quatro cadeias tem
completa liberdade de rotação, e a penúltima tirosina apresenta
movimento parcial (MONOD et alii,1965; BOLTON et alii,1968; KILMARTIN &
ROSSI-BERNARDI,1969; PERUTZ et alii,1969; PERUTZ,1970; MUIRHEAD & GREER,1970
BOLTON & PERUTZ,1970; KILMARTIN & HEWITT,1971;ARNONE et alii,1976;KILMARTIN

et alii, 1980).

A propriedade funcional mais importante da hemoglobina ou seja, a combinação reversível com O_2 , é regulada através da cooperatividade na ligação com O_2 , proveniente de interação homotrópica positiva e pelo efeito exercido pelas interações heterotrópicas. A presença simultânea dessas duas interações apresenta vantagem para hemoglobina, possibilitando-lhe a realização do transporte de O_2 em condições metabólicas, aparentemente, das mais adversas, uma vez que a função da proteína parece estar frequentemente adaptada às necessidades metabólicas do animal e ao seu meio ambiente. Esta adaptação da hemoglobina inclui mudanças na afinidade pelo O_2 , mudanças no conteúdo de efetores alostéricos e variação na cooperatividade de interação pelas uniões sucessivas das moléculas de O_2 (BONAVENTURA et alii, 1972 ; RIGGS, 1976).

O fenômeno da cooperatividade na hemoglobina é causada pela transição reversível entre suas formas T e R (MONOD et alii, 1965). Os estudos estruturais da desoxihemoglobina (forma T), revelaram a existência de várias pontes salinas, incluindo as pontes salinas do grupo Bohr. Uma vez que estas pontes salinas estão ausentes na oxihemoglobina (forma R), PEURTZ, 1970, sugeriu que a mudança ou rompimento destas pontes salinas poderia ser responsável pelo menos parcialmente pela cooperatividade na hemoglobina. Por outro lado, ANDERSON, 1975, através dos estudos de cristalografia por raio-X, utilizando mutante de hemoglobina humana, a hemoglobina Kansas ($\beta 102 \text{ Asn} \rightarrow \text{Thr}$), verificou que as pontes salinas do modelo estereoquímico de PERUTZ, 1970, incluindo as pontes salinas entre His 146 β e Asp 94 β , permaneciam inalteradas na hemoglobina Kansas ligada ao NO ou O_2 e em presença de IHP (forma T). Mais recentemente, Kilmartin et alii,

1978, verificaram que o valor de pK da His 146 β permanecia inalterado após ligação da hemoglobina Kansas com ligantes. Estes resultados confirmam a observação de ANDERSON, 1975 de que as pontes salinas do grupo Bohr não eram rompidas na ligação dos ligantes na desoxihemoglobina Kansas. Para conciliar os resultados, aparentemente, contraditórios entre hemoglobina kansas e hemoglobina humana normal, KILMARTIN et alii, 1978, sugeriram que o mecanismo estereoquímico para oxigenação cooperativa da hemoglobina como proposto por PERUTZ, 1970, não seria o único.

As alterações estruturais na molécula de hemoglobina pela oxigenação afetam certos resíduos de amino ácidos, bem como suas propriedades de ionização e liberação ou captação de prótons. Da mesma forma que a interação heme-heme, o efeito Bohr resulta da mudança na estrutura da molécula de hemoglobina, após sua combinação com O_2 . O efeito Bohr é um caso típico de interação heteroptrópica, envolvendo O_2 e prótons. Esse efeito é atualmente conhecido como efeito de pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo O_2 . Nos tecidos, a liberação de O_2 pela hemoglobina é acompanhada pela captação de íons hidrogenio, que fornece importante contribuição para o transporte de CO_2 . Esta captação de íons H^+ ocorre somente em pH acima de 6,0 e é conhecido como efeito Bohr alcalino. Uma vez que valores de pH abaixo de 6,0 não ocorrem "in vivo", o efeito Bohr ácido pode não representar importância fisiológica (PERUTZ, 1970).

Com base nas informações estruturais obtidas por cristalografia de raio-X, PERUTZ, 1970, propôs ser a His 146 β um dos amino ácidos envolvido no efeito Bohr alcalino, pela formação de ponte salina entre o grupo imidazólico e o grupo carbo

nilico do Asp 94 β na desoxihemoglobina. Esta proposição foi confirmada pela remoção enzimática da His 146 β (KILMARTIN & WOOTON, 1970) e pelos estudos da hemoglobina Hiroshima que tem a His 146 β substituída por Asp (PERUTZ et alii, 1971) onde observou-se redução substancial do efeito Bohr alcalino. A remoção enzimática da Arg 141 α , produziu também, redução parcial desse efeito (PERUTZ et alii, 1971).

MATTHEW et alii, 1979 e RUSSU et alii, 1980, investigando o papel da ponte salina existente entre a His 146 β e Asp 94 β no efeito Bohr alcalino, verificaram que a ponte salina permanecia inalterada com a ligação de O_2 , assim como o valor de pK da His 146 β e relataram a existência de várias limitações no estudo do mecanismo molecular do efeito Bohr, uma vez que este dependia das condições experimentais. Entretanto, em 1980, KILMARTIN, FOGG e PERUTZ utilizando solução de hemoglobina (100mg/ml), quimicamente modificada (sem-His 146 β), em baixa concentração de íons cloreto (10mM) e na ausência de fosfatos, isto é, em condições em que somente a contribuição da histidina C-terminal das cadeias estava inibida, verificaram que essa modificação na hemoglobina resultara em redução de 60% do efeito Bohr alcalino. Diferença no mapa de densidade eletrônica, demonstrou que a ponte salina entre a His 146 β e Asp 94 β estava ausente. Esses resultados discordam das observações de RUSSU et alii, 1980 e MATTHEW et alii, 1979 de que na ausência de fosfatos e em baixa concentração de íons cloreto, a ponte salina permanecia inalterada com a oxigenação da hemoglobina, e que a histidina C-terminal apresentava contribuição mínima para o efeito Bohr alcalino.

De acordo com a revisão realizada por BALDWIN & CHOTHIA, 1979, as interações entre resíduos das cadeias localiz

zadas na cavidade interna da molécula, contribuem também para o efeito Bohr. Estes grupos de resíduos incluem Val 1 α , Lys 127 α , Asp 6 α , Asp 126 α , Arg 141 α e His 122 α .

Em estudos comparativos de hemoglobinas de várias espécies de mamíferos RIGGS, 1959 e 1960 sugeriu a participação dos grupos tióis livres como doadores de prótons, pois o número de Hg²⁺ que se ligava na desoxihemoglobina era aproximadamente igual ao número de prótons liberados durante a oxigenação da mesma. O bloqueio do grupo -SH da Cys 93 β da hemoglobina humana por vários reagentes específicos para tióis, levou a alteração do efeito Bohr, demonstrando estar esse amino ácido envolvido no efeito Bohr alcalino (RIGGS, 1961). Recentemente, ANTONINI et alii, 1982, realizando experimentos de bloqueio do grupo -SH da Cys 93 β , verificaram que nessas hemoglobinas modificadas, a diferença de afinidade por 2,3-DPG apresentadas pelas duas formas de hemoglobinas diminuía com decréscimo de pH, devido principalmente, à menor afinidade da forma desoxigenada da hemoglobina modificada para com o ligante fosfato. O efeito Bohr dessas hemoglobinas apresentou-se bastante diminuído, cerca de 50%.

Embora os estudos dos efeitos de pH e de ligantes anionicos como 2,3-DPG, IHP e Cl⁻, tenham contribuído para melhor compreensão do papel de ligantes heterotrópicos e a origem da cooperatividade, a ação destes ligantes foram analisados separadamente (BENESCH et alii, 1969 ; PERUTZ et alii, 1969; ARNONE, 1972 ; De BRUIN et alii, 1974a ; 1974b ; 1975 ; BRYGIER et alii, 1975 ; KILMARTIN & ANDERSON, 1978 ; ANTONINI et alii, 1982). Estudos recentes indicam que a ligação de cada ligante heterotrópico está relacionado não somente com a oxigenação, mas também com a ligação de outros moduladores heterotrópicos, alguns

dos quais competindo com os mesmos sítios na molécula de hemoglobina (Van BEEK et alii, 1979 ; IMAIZUMI et alii, 1979).

A importância fisiológica dos fosfatos orgânicos na regulação da propriedade da ligação de O_2 pela hemoglobina, foi amplamente estudada por vários pesquisadores (BENESCH & BENESCH, 1967 ; BENESCH et alii, 1968a, 1968b ; 1969 ; CHANUTIN & CURNISH, 1967 ; ARNONE, 1972 ; De BRUIN et alii, 1973 ; 1974a ; BRYGIER et alii, 1975 ; ANTONINI et alii, 1982). A hemoglobina e o 2,3-DPG, os principais constituintes orgânicos dos eritrócitos humano, apresentam ambos, concentração de 5mM. O fosfato orgânico (2,3-DPG) liga-se preferencialmente com a desoxihemoglobina e facilita a transferência de O_2 dos eritrócitos para os tecidos, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo gás, sem alterar a cooperatividade da ligação com oxigênio e nem o efeito Bohr (BENESCH et alii, 1967).

De BRUIN et alii, 1973 demonstraram o efeito do 2,3-DPG sobre o efeito Bohr, baseando no fato de ser a ligação do 2,3-DPG com as formas desoxi e oxigenada da hemoglobina em pH acima de 6,0 acompanhada por captação de prótons enquanto que em pH abaixo de 6,0, tal efeito é acompanhado por liberação de prótons. Esses resultados demonstram a importância do estudo da liberação de prótons Bohr na presença de 2,3-DPG, como um meio para investigar os sítios de ligação desse efector em ambas as formas de hemoglobinas. A estequiometria da ligação do 2,3-DPG com desoxihemoglobina, como para com a oxihemoglobina foi igual a 1 (1mol/mol), indicando que também na oxihemoglobina o sítio de ligação do fosfato, está localizado na cavidade central que ocorre através da molécula ao longo do eixo de simetria, sítio onde o fosfato orgânico se encaixa. Em valores baixos de pH tanto a desoxihemoglobina como a oxihemoglobina mos-

traram igual afinidade pelo 2,3-DPG, sugerindo que nestes valores de pH, o mesmo número de grupos carregados positivamente estão envolvidos na ligação de ambas as formas de hemoglobina com 2,3-DPG. Essas observações justificam a hipótese de que na desoxihemoglobina, como na oxihemoglobina, o 2,3-DPG se liga na cavidade central entre as cadeias β (Van BEEK & De BRUIN, 1979). Evidências cristalográficas confirmam a ligação de uma molécula de 2,3-DPG por sítio e definem os resíduos de amino ácidos que participam na ligação; o α -amino grupo da Val 1 β , os grupos imidazólicos da His 2 β e da His 143 β estão envolvidos na interação eletrostática com os grupos fosfatos, enquanto que o ϵ -amino grupo da Lys 82 β participa na ligação com o grupo carboxílico do fosfato orgânico (ARNONE, 1972; ARNONE & PERUTZ, 1974).

Há mais de uma década, conhece-se que anions monovalentes como cloreto se liga mais fortemente à desoxihemoglobina, e tem grande efeito sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (CHIANCONE et alii, 1972). Entretanto, só recentemente foi demonstrado que não apenas a afinidade pelo O_2 , mas também o número de prótons liberados pela oxigenação da desoxihemoglobina é dependente da presença de íons cloreto (ROLLEMA et alii, 1975). Em pH neutro e concentração fisiológica de íons cloreto, aproximadamente metade do número de prótons Bohr foram liberados, provavelmente, devido a diferença de interação de íons Cl^- com a desoxihemoglobina e oxihemoglobina. A existência de somente dois sítios de ligação para esse íon, foi observada em ambas as formas de hemoglobina; na desoxihemoglobina, o íon cloreto está ligado entre o α -amino grupo da Val 1 α e o grupo guanidínico da Arg 141 α (ARNONE et alii, 1977), enquanto que na oxihemoglobina, os sítios de ligação do cloreto, parecem ser constituído somente por grupos imidazólicos (Van BEEK et alii,

tigadas. Dois resíduos que permaneciam invariáveis nas outras espécies estavam substituídos na cadeia de viper; a Lys 11 α estava substituída por Arg e a His 122 α por Leu. Uma vez que a His 122 α está, supostamente, envolvido no efeito Bohr (BALDWIN & CHOTHIA, 1979) e no sítio de ligação do cloreto (Van BEEK & De BRUIN, 1980), seria interessante a verificação desses efeitos na hemoglobina de viper.

De acordo com PERUTZ et alii, 1968, os resíduos envolvidos nos contactos com heme ou com as cadeias β_2 , são "vitais" para a função biológica, por isso são mais constantes na escala filogenética. Dez resíduos da cadeia α estão envolvidos nos contactos $\alpha_1\beta_2$. Em viper eles são idênticos àqueles encontrados na cadeia da hemoglobina humana, exceto a Val 96 α que está substituída por Ala como na cadeia da hemoglobina de carpa (HILSE & BRAUNITZER, 1968). Os 19 resíduos da cadeia α que estão envolvidos no contacto com heme são idênticos no viper quando comparado com a cadeia da hemoglobina humana, mas somente 14 são invariáveis em todas as outras espécies estudadas (DUGUET et alii, 1974). Contactos "vitais" estão localizados na parte central e C-terminal da sequência (PERUTZ et alii, 1968). Quando a cadeia da hemoglobina humana foi tomada como referência, em 32 resíduos da porção N-terminal foram encontradas 50% de substituições, em 60 resíduos da parte central 32% e em 49 resíduos da porção C-terminal 31% de substituições foram encontradas. A porcentagem total de substituição nas aves, viper e carpa foram de 25% , 35% e 50% respectivamente (DUGUET et alii, 1974).

Sendo assunto da presente tese a propriedade imunológica da hemoglobina de serpentes aquáticas, analisaremos agora o que se conhece a respeito na literatura.

O estudo da hemoglobina através de técnicas imu

noquímicas tem sido muito divulgado, dada a imunogenicidade da proteína, ou seja à sua capacidade de induzir formação de anticorpos. A estrutura antigênica das hemoglobinas tem sido exaustivamente investigada e foi revisada por REICHLIN, 1975. Em uma série de proteínas homólogas, tem-se observado que a conformação tridimensional da molécula é preservada mesmo quando há alterações na estrutura primária (NOLAN & MARGOLIASH, 1986; DICKERSON et alii, 1971). Estudos mais detalhados feito por REICHLIN, 1974 e 1975, comparando hemoglobina humana e de coelho, verificou-se que dentro das cadeias α e β , havia uma região variável e outra conservativa; e foi postulado que dentro da região variável da superfície da molécula de hemoglobina estariam situados os determinantes antigênicos. Esse fato mostra uma conservação dos resíduos do interior da molécula, em contraste com a variação dos resíduos da superfície, o que não impede a proteína de exercer suas funções, apesar de apresentar diferenciação antigênica durante o processo evolutivo (TAN-WILSON et alii, 1976).

Propriedades funcionais de hemoglobinas de anfíbios de "habitat" terrestre e aquáticos, foram estudadas por VIEIRA et alii, 1981, a fim de correlacioná-las com propriedades antigênicas destas proteínas. Os resultados das reações antígeno-anticorpo, em diferentes condições, mostraram uma grande semelhança antigênica entre as hemoglobinas de anuros de "habitat" terrestre em contraste com a dos aquáticos que apresentaram maiores diferenças antigênicas entre si.

Estudos de globinas, a apoproteína da hemoglobina, recebeu pouca caracterização imunoquímica, devido a hetero

geneidade das globinas isoladas (REICHLIN et alii, 1963) Trabalhos de ASKONAS & SMYTH, 1964, com globina humana, demonstraram que somente as cadeias β eram imunogênicas, sugerindo uma maior homogeneidade na estrutura molecular das cadeias α , o que implica ser essa cadeia mais constante dentro da escala evolutiva. Por outro lado, trabalhos realizados por REICHLIN, 1966 e 1970 e TAN-WILSON, 1976, relatam que ambas as cadeias α e β da globina humana foram imunogênicas em coelho e cabra.

Imunologicamente, nem todas as mudanças que ocorrem na sequencia de amino ácidos podem ser diferenciadas, mas desde que os resíduos de superfície são os que mais variam no decorrer da evolução, a antigenicidade é um dos meios que pode ser utilizado para discriminar importantes diferenças entre proteínas relacionadas. Geralmente, a reação cruzada entre duas proteínas desaparece quando a mudança de sequencia entre seus pares exceder de 40% do total (PRAGER & WILSON, 1971). Entretanto quando se muda um resíduo de amino ácido na molécula de hemoglobina, sua antigenicidade pode ser afetada (CRADOCK - WATSON, 1967).

Alguns trabalhos foram realizados, correlacionando o metabolismo fisiológico e o modo de vida dos répteis (BENNETT, 1973; BENNETT et alii, 1976), porém as características adaptativas do sangue de répteis, assim como as propriedades funcionais de suas hemoglobinas receberam atenção esporádica (POUGH, 1969 ; 1971 ; 1977).

Dentre a classe de réptil, os estudos das propriedades funcionais e estruturais das hemoglobinas de serpentes, despertaram particular interesse, desde que dentre os vertebrados terrestres, elas, possivelmente, sofreram a mais in-

tensa irradiação adaptativa, em contraste à extinção ou estagnação evolucionária de outros répteis e podem ainda estar em processo adaptativo (ROMER, 1966).

Diversos trabalhos recente, focalizaram a atenção na correlação entre o metabolismo e as propriedades funcionais das hemoglobinas de serpentes semi-aquáticas, uma vez que a vida aquática dos animais, somente tornou-se possível pela adaptação das hemoglobinas que possibilita transportar oxigênio em ambiente deficiente desse gás (ABE, 1977 ; OGO et alii, 1979 ; OGO & FOCESI, 1979).

O estudo das propriedades funcionais de duas espécies de serpentes de "habitat" aquático, pertencente a família Colubridae, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris*, revelou diferenças fundamentais (OGO et alii, 1979). A afinidade da hemoglobina desionizada pelo oxigênio foi maior na espécie *H.modestus*, e independente de pH, enquanto que na espécie *L.miliaris*, a curva de saturação da hemoglobina desionizada pelo oxigênio dependeu da concentração de íons hidrogenio. Em ambas as espécies, o valor do coeficiente de Hill, n , que indica o grau de interação entre os sítios de ligação com oxigênio, não se modificou no intervalo de pH estudado (pH 5,6 a 8,4) e tendeu para valor 1,0 em pH próximo de 8,0, indicando interação heme-heme mínima, ou mesmo ausente neste pH. Por outro lado, o valor do efeito Bohr das hemoglobinas de ambas as espécies de serpentes tornou-se maior na presença de fosfatos orgânicos, embora o efeito do ATP sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio fosse mais acentuado em *L.miliaris*. Ao mesmo tempo verificou-se diminuição da afinidade dessas hemoglobinas pelo oxigênio, além de alterar a interação heme-heme, indicando elevado efeito alostérico (OGO et alii, 1979).

,Dando prosseguimento aos estudos realizados por OGO & FOCESI , 1979 , procurou-se estabelecer de forma comparativa, algumas propriedades estruturais e antigênicas das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, ambas serpentes de "habitat" aquático com diferentes graus de adaptação a este ambiente. Certas diferenças estruturais existentes entre as duas proteínas intimamente relacionadas, foram estimadas por comparação antigênicas e outras através de comparação dos peptídeos obtidos por digestão enzimática dessas hemoglobinas. Por estes estudos foi possível obter evidências sobre a estrutura primária das proteínas e correlacioná-las a suas funções.

MATERIAL e MÉTODOS

Material biológico

Hemoglobinas de serpentes adultas de ambos os sexos, recém capturadas, pertencentes à família Colubridae, *Helicops modestus* (GUNTER, 1861) e *Liophis miliaris* (LINNAEUS, 1758), foram utilizadas neste trabalho.

A espécie mais aquática, *Helicops modestus*, considerada vivípara, forma de reprodução que apresenta vantagem para as espécies aquáticas, pois poupa-lhes o retorno para a terra na época da reprodução (NEILL, 1964), pesavam aproximadamente 50g e apresentavam cerca de 60cm de comprimento.

Liophis miliaris, espécie mais anfíbia que a anterior, ovíparas, apresentavam cerca de 150g e 100cm de comprimento.

As duas espécies de serpentes foram doadas e classificadas pelo Prof. Dr. Paulo de Toledo Artigas do Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

Os ratos brancos de laboratório pesavam aproximadamente 150g.

Preparo dos hemolisados

A coleta de sangue foi efetuada em animais injetados com 0,5ml de heparina, por via intraperitoneal, 15 minutos antes de serem sacrificados. A sangria foi realizada via arco sistêmico esquerdo, com seringas heparinizadas, sem empre-

go de anestésico. Em seguida o sangue foi transferido para tubos de polietileno, contendo 0,1ml de heparina (500 UI/ml) e 0,5ml de solução de NaCl 1,7% contendo EDTA 1mM pH 7,0.

Os hemolisados foram preparados segundo o método descrito por FOCESI et alii, 1979. As hemácias foram separadas do plasma por centrifugação a 480 X G, 0^oC, por 5 minutos, em uma Sorvall... modelo RC-2B. O precipitado resultante foi lavado três vezes com solução de NaCl 1,7% e as hemácias obtidas destas lavagens foram lisadas com solução de EDTA 1mM pH 7,0, na proporção de um volume de hemácias para três volumes de EDTA 1mM pH 7,0. Após a lise das hemácias foi realizada outra centrifugação para separar o estroma da solução de hemoglobina. O sobrenadante límpido foi utilizado como solução de hemolisado de eritrócitos.

Preparo de hemolisados desionizados

A preparação de hemolisado isento de íons, foi feita segundo os métodos descritos por BRUNORI et alii, 1979. Inicialmente, 10ml de hemolisados foram passados através de coluna de filtração em gel de Sephadex G-25 (15 x 2cm) e eluidos com solução de EDTA 1mM pH 7,0. Os eluatos obtidos foram passados sucessivamente em colunas de troca iônica, constituídas pelas seguintes resinas: Dowex 1-X8 na forma de acetato⁻ (8 x 2cm) ; Dowex 50W-X4 na forma de NH₄⁺ (8 x 2cm) e resina mista, constituída de Amberlite IRC-50 na forma de H⁺ e IR-4B na forma de OH⁻ (20 x 2cm). Após esse tratamento foi adicionada aos hemolisados, uma solução de EDTA pH 7,0 para concentração final de 1mM, para evitar polimerização, como também a oxidação das oxihemoglobinas (SANNES & HULTQUIST, 1979).

Preparo de antígenos

O adjuvante foi preparado segundo FREUND, 1956. Em um almofariz, foram emulsificados 15g de lanolina em 85ml de nujol. A emulsão foi distribuída em tubos de ensaio e esterilizada em autoclave.

Os antígenos utilizados para imunização, foram as soluções desionizadas de hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund, na proporção de 1 volume de antígeno para 1 volume de adjuvante.

Obtenção de antisoros

Um lote de ratos foi inoculado com hemoglobina *H.modestus* e outro com hemoglobina de *L.miliaris*, ambas emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund, na concentração final de 5mg de Prot./ml. Nas doses de reforço, foram utilizados antígenos diluídos em solução de salina fisiológica, na concentração de 500µg de Prot./ml. O esquema de imunização empregado foi o seguinte: 1.^a inoculação - antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (2mg de Prot./animal) injetado por via intramuscular, em quatro locais, junto à inserção muscular próxima às patas. 2.^a inoculação - (três semanas após o primeiro estímulo) - antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (2 mg de Prot./animal) injetado por via intramuscular em quatro locais próximo às patas. 3.^a inoculação - (quatro semanas após o primeiro estímulo) - antígeno em solução de salina fisiológica (50µg de Prot./animal), administrado intradermicamente no dorso do animal; após a terceira inoculação as que se seguiram foram

executadas nas mesmas condições, até que se obtivesse título satisfatório. Sangrias eram realizadas sempre que se obtivesse sorro "Ring test" positivo. O sangue foi centrifugado e os soros catalogados e mantidos a -20°C .

Imunodifusão dupla

As técnicas de imunodifusão dupla para análise imunológica comparativa, foram realizadas em gel de agarose a 1% em salina tamponada com fosfatos 0,15M pH 7,2 segundo o método descrito por OUCHTERLONY, 1958, empregando-se placas de vidro (7,5 x 2,5cm e ou 11,0 x 5,0cm), recobertas por uma camada de 3mm de gel. Os orifícios no gel foram feitos com molde próprio para esse fim, sendo a distância entre os orifícios padronizada, onde se colocava o material a ser analisado. Após aplicação dos reagentes, as lâminas de gel foram mantidas em câmara úmida e as reações antígeno-anticorpo foram processadas a temperatura ambiente, durante 24 horas e após este período, deixadas a 4°C , sendo a leitura final efetuada somente após 48 horas. Em seguida, as lâminas de gel foram lavadas com solução fisiológica de NaCl e o gel foi desidratado a temperatura ambiente. Após esse tratamento, as lâminas foram coradas com solução de negro de amido 2% e descoradas com solução contendo 90ml de metanol e 10ml de ácido acético glacial; ou coradas com solução de benzidina constituída de 2g de benzidina, 100ml de metanol, 0,5ml de ácido acético glacial, 0,1ml de peróxido de hidrogenio a 130 volumes; alguns cristais de nitroprussiato de sódio, para caracterização de hemeproteínas. O excesso de corante foi retirado com solução descorante constituída de 25ml de metanol, 50ml de éter sulfúrico e

1ml de peróxido de hidrogênio a 130 volumes (MEIRELLES, 1975).

As hemoglobinas usadas nas reações antígeno-anticorpo foram padronizadas em suas concentrações para 1mg de proteína por ml ou 4mg de Prot./ml, dependendo do experimento.

Obtenção de soro monoespecífico

Para a obtenção de soro específico, foi empregada a reação de precipitação em meio líquido, segundo o método descrito por HEIDELBERGER & KENDALL, 1935. À 0,5ml de hemoglobina de *H. modestus*, nas concentrações que variavam de 32ug a 1000 ug por ml, foi adicionado 0,5ml de soro de rato anti-hemoglobina de *L. miliaris*. A reação foi desenvolvida a 37°C por 60 minutos, e após este período a 5°C durante 12 horas. Os tubos de reação foram submetidos a centrifugação a 16000 rpm, por 2 minutos (Eppendorf), e com os sobrenadantes obtidos de cada tubo foi realizado teste de imunodifusão dupla, colocando-se em uma das canaletas o antisoro (soro de rato anti-Hb de *L. miliaris*) e em outra o antígeno (hemoglobina de *H. modestus*); os sobrenadantes foram colocados nos orifícios e a reação foi processada a 37°C, durante 48 horas. O sobrenadante que não apresentou excesso de antígeno e nem de anticorpo, por teste de imunodifusão dupla, foi utilizado como sendo soro monoespecífico (soro de rato anti-Hb de *L. miliaris* absorvido com hemoglobina de *H. modestus*).

Separação dos componentes das hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* .

Os componentes das hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* foram separados em coluna de isoeletrofocalização em gradiente de sacarose, segundo manual de instrução da LKB. Coluna de vidro e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 e 9,0, eram de procedência LKB tipo 8100-2 e 1809 respectivamente. A solução mais densa de sacarose era constituída de 107,5g de sacarose, 9,0ml de anfólito, 7,3ml de solução de hemoglobina e H₂O desionizada para completar o volume final de 215ml. A solução de sacarose menos densa era constituída de 10,75g de sacarose, 3,0ml de anfólito, 2,7ml de solução de hemoglobina e H₂O desionizada para completar o volume de 215ml. A amostra em um volume de 10,0ml de hemoglobina (3,5mg de Prot./ml) foi introduzida 3/4 na solução de sacarose mais densa e 1/4 na solução de sacarose menos densa. O gradiente de sacarose foi preparado empregando-se soluções de sacarose anteriormente descrita, com auxílio de Ampholine Gradient Mixer e Ampholine Stirrer Motor da LKB modelo 8123-1, para distribuição adequada de sacarose na coluna.

A solução de catodo consistia de 48g de sacarose, 30ml de H₂O desionizada e 20ml de NaOH 1M e a solução de anodo era constituído de 6,0ml de H₃PO₄ 1M e de 34ml de H₂O desionizada. Os eletrodos foram conectados de modo que o polo positivo da fonte de alta tensão (High Voltage Supply, Savant Instrument Inc.) estivesse em contacto com eletrodo imerso em solução de H₃PO₄ e o polo negativo, no eletrodo imerso em solução de NaOH. No início da focagem isoelétrica, a corrente aplicada foi de 30mA, correspondendo a 1600 volts. Durante todo o processo, as amostras de hemoglobinas foram mantidas a 4°C, através de circulação de água

refrigerada na coluna, utilizando Recirculating Water Cooler da Savant Instrument, Inc.

Após 60 horas de focalização isoelétrica, a corrente manteve-se estável a 7mA e os componentes da hemoglobina foram separados em várias bandas e coletados por gravidade em alíquotas de 2,0ml, onde foram determinados a absorbância em 415nm, utilizando espectrofotômetro Varian Série 634, e o pH correspondente, utilizando pHmetro digital da Ambriex. As frações individuais de hemoglobinas foram dialisadas contra tampão maleato 0,05M pH 7,0, para eliminar os anfólitos e a sacarose.

Preparo de globinas

As globinas foram preparadas segundo o método descrito por ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958. O grupo heme do componente encontrado em maior concentração nas hemoglobinas de cada espécie de serpente, foi extraído com uma mistura de acetona-HCl, constituída de 3,0ml de HCl 2N por litro de acetona. A precipitação das globinas foi efetuada a temperatura de -20°C, pela adição lenta de acetona-ácida, sob constante agitação, mantendo a proporção de 1 volume de hemoglobina (3mg%) para 30 volumes de acetona-ácida. Após a remoção do grupo heme, as globinas foram lavadas 2 vezes com acetona-ácida (-20°C), dissolvidas em água desionizada e dialisadas contra solução de bicarbonato de sódio 100mg/l. Posteriormente, procedeu-se outra diálise contra água desionizada e então liofilizadas.

Isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida

O controle de pureza das globinas foi realizado através de isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida, segundo MERZ et alii, 1972. Os géis eram constituídos de acrilamida 2,5%, bis-acrilamida 0,1%, sacarose 12,5%, anfólito de intervalo de pH entre 3,5 a 10,0, uréia 8M. A seguinte mistura foi utilizada para preparação de géis: 2,5ml de solução contendo acrilamida 10%, bis-acrilamida 0,4% e sacarose 25% ; 0,25ml de anfólito ; 1,25ml de sacarose 50% ; 4,75ml de ureia 8M ; 0,01 ml de TEMED e 1,25ml de persulfato de amônio 1,5%.

Seis tubos foram usados na eletrofocalização, sendo colocado 1,0ml da mistura em cada tubo. Os géis foram deixados em repouso, ao abrigo da luz, até completa polimerização. Aliquotas de 20µl de amostras, contendo 3mg de Prot./ml, foram aplicadas sobre o gel e a focalização isoelétrica, foi desenvolvida a 49°C, utilizando corrente de 5mA/gel, durante tempo suficiente para a corrente cair a zero. Os eletrodos foram conectados de modo que o polo positivo da fonte elétrica estivesse em contacto com o eletrodo imerso em solução de H_3PO_4 1M e o polo negativo no eletrodo imerso em solução de NaOH 1M. Os géis que não continham amostra foram seccionados em pedaços de 0,2cm e transferidos para tubos de ensaio contendo 1,0ml de KCl 0,01M, permanecendo a 49°C, durante 2 horas, e em seguida foram realizadas medidas de pH. Paralelamente, os géis contendo amostras foram lavados exaustivamente com solução constituída de 57,7g de ácido tricloroacético, 17,25g de ácido sulfanílico e 500ml de H_2O desionizada, para eliminação dos anfólitos. Após a lavagem, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue 0,1% e o excesso de corante foi retirado com solução descorante constituída

por 25ml de etanol, 80ml de ácido acético e 65ml de H_2O desionizada.

Análise da composição de amino ácidos

A determinação quantitativa dos amino ácidos nas globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*, foi realizada por BARRA, BOSSA e FOCESI, no laboratório do Instituto de Química Biológica da Universidade de Roma, segundo método de SPACKMAN et alii, 1958.

A hidrólise das globinas foi realizada a 110°C, usando ácido clorídrico 6N, em ampolas de vidro seladas a vácuo. Após 24 horas de hidrólise ácida, os hidrolisados foram secos por evaporação à pressão reduzida e dissolvidos em tampão citrato de sódio 0,2M pH 2,2 para serem analisados no autoanalisador de amino ácidos da LKB modelo 4 400. Dado às perdas consideráveis de triptofano na hidrólise ácida, não foi determinado o conteúdo desse amino ácido nas globinas de ambas as espécies de serpentes.

Determinação de grupos sulfidrilas tituláveis

A determinação de grupos sulfidrilas livres foi feita de acordo com método de BOYER, 1954, através de titulação espectrofotométrica com p-cloromercuribenzoato (PCMB). As hemoglobinas desionizadas destinadas à determinação de grupos sulfidrilas livres, foram passadas em coluna de Sephadex G-25 (20 x 1,0cm) para eliminar eventual presença de glutathione intrace-

lular (RIGGS, 1964), detectável pelo PCMB, uma vez que a filtração em gel de Sephadex G-25, separa a glutathione e outros compostos sulfidrílicos de baixo peso molecular da hemoglobina. Os hemolisados tratados dessa maneira apresentam menos que 10% de conteúdo sulfidrílico não hemoglobínico (TRADER et alii, 1966).

A titulação com PCMB foi realizada utilizando-se tampão acetato de sódio 0,33M pH 4,6 e hemoglobina na concentração final de 5×10^{-6} M em heme. A formação do complexo Proteína-PCMB através do grupo sulfidrílico livre, foi determinada pelo acréscimo da absorbância em 255nm. O número de grupos -SH reativos foi determinado utilizando o coeficiente de extinção molar do complexo ($6,2 \times 10^3$).

Determinação de amino ácidos amino-terminal

A análise de resíduos N-terminais nas duas globinas em estudo foi realizada por RIGGS & FOCESI, no Departamento de Zoologia da Universidade de Texas. Os amino ácidos sequenciados foram baseados na homologia com globinas de viper (*Vipera aspis*), uma vez que não foi possível separar as cadeias α das cadeias β , devido aos pontos isoelétricos muito próximos apresentadas pelas duas cadeias de hemoglobinas. Em todas as globinas analisadas, dois resíduos de amino ácidos eram determinados em cada etapa, indicando que ambas as cadeias α e β estavam livres.

A sequência foi determinada no sequenciador de proteína e peptídeo da Beckman modelo 890 B. O programa para peptídeo 111374 foi da Beckman DMAA.

PTH-amino ácidos foram identificados por cromatografia gasosa, segundo método de PISANO & BRONZERT, 1969, utilizando cromatógrafo de gás da Beckman GC-45 e usando resina SP 400 nas colunas, ou por cromatografia em camada delgada, conforme o método descrito por JEPPSON & SJOQUIST, 1967.

Determinação de amino ácidos carboxi-terminal

A análise dos resíduos C-terminais das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, foi realizada por FOCESI no Laboratório do Instituto de Química Biológica da Universidade de Roma.

A identificação de amino ácidos C-terminais foi realizada segundo AMBLER, 1967. Globinas das duas espécies de serpentes, contendo 16mg de Proteína, foram dissolvidas em 2,0ml de bicarbonato de amônio 0,1M na presença de SDS 0,1%. Aos substratos foram adicionados 1mg de ácido arginínico (inibidor da carboxipeptidase B) e 10µl de carboxipeptidase A, contendo 50 U/mg de proteína. A mistura de reação foi incubada a 38°C, durante 60 minutos, e a reação foi paralisada pela adição de 4,0ml de ácido perclórico a 7% O sobrenadante foi neutralizado com solução de KOH a 40% e o precipitado de perclorato de potássio formado foi removido por centrifugação. O sobrenadante límpido, foi seco por evaporação a pressão reduzida e analisado no autoanalisador de amino ácidos da LKB modelo 4 400.

Digestão enzimática das globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*

A digestão das globinas foi realizada utilizando tripsina tratada com TPCK, segundo método descrito por MAO et alii, 1978. Amostras de 10mg de globinas foram dissolvidas em 0,8ml de água desionizada, e o pH das soluções de globinas foi ajustado para 8,5 pela adição de 0,2ml de bicarbonato de amônio 0,5M. Neste estágio houve formação de precipitado branco floculento. A mistura foi colocada a 38°C e em seguida adicionou-se 0,2ml de solução aquosa de tripsina 1mg/ml, e a digestão enzimática foi desenvolvida durante 5 horas. A reação foi paralizada pela adição de ácido acético 0,5M e centrifugou-se a solução a 16000 rpm por 2 minutos, a fim de remover os peptídeos resistentes à ação da tripsina que permaneceram insolúveis ("core"). O sobrenadante contendo os peptídeos solúveis foi seco por evaporação, utilizando dessecador, em presença de H_2SO_4 concentrado, e aplicando pressão reduzida.

Mapeamento peptídico das globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*

Os peptídeos solúveis obtidos da digestão com tripsina foram redissolvidos em 0,1ml de água desionizada. Aliquotas de 50µl foram aplicadas no centro da extremidade inferior do papel Whatmann 3MM (100 x 27cm) e no centro da extremidade superior foi aplicada mistura de dois amino ácidos padrão (lisina e ácido aspártico). O papel contendo as amostras foi embebido com tampão piridina pH 5,4 e o excesso de tampão foi removido com papel de filtro. A eletroforese de alta tensão foi desenvolvida durante 90 minutos, a 4°C, empregando sistema tam-

pão constituído de piridina - ácido acético glacial - água desionizada (72:25:3600 v/v) pH 5,4, aplicando-se 3000 volts que correspondia a 50mA. Utilizou-se cuba horizontal refrigerada procedente da Savant Instrument, Inc. Processada a eletroforese, o papel foi seco e a extremidade superior foi cortada e submetida à coloração com ninhidrina 2% em acetona, para determinar os limites de migração dos componentes do digesto. A cromatografia ascendente foi realizada em outra dimensão utilizando-se solvente constituído de n-butanol - piridina - ácido acético glacial- H_2O (15:10:3:12 v/v) durante 4 horas. Os cromatogramas foram secos à temperatura ambiente e as manchas correspondentes aos peptídeos foram reveladas com solução de ninhidrina a 2% em acetona.

RESULTADOS

Estudo imunológico das hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris*

Com finalidade de se realizar estudos imunológicos das hemoglobinas de serpentes, soros de ratos a partir de hemólise do total de *H. modestus* e *L. miliaris* foram preparados. Após 2 meses de inoculação os soros mostraram título de 1:64, testados com antígeno (200µg/ml) por imunodifusão dupla. As linhas de precipitação obtidas por reação antígeno-anticorpo foram evidenciadas por coloração com negro de amido e apresentaram atividade peroxidásica quando submetidas a ensaio com benzidina, demonstrando a especificidade do antisoro às hemoglobinas de ambas as espécies de serpentes que serviram de antígeno.

Os soros imunes foram utilizados para realização de imunodifusão dupla, com objetivo de se analisar os tipos de relação antigênica existentes entre as duas hemoglobinas. Três tipos de reação foram observadas nas hemoglobinas estudadas, ou seja, reação de identidade total, reação de identidade parcial e reação de não identidade. Reação de identidade total foi caracterizada pela similaridade de determinantes antigênicos existentes entre as duas hemoglobinas; reação de identidade parcial foi caracterizada pela existencia de alguns determinantes antigênicos comuns às duas hemoglobinas; reação de não identidade foi caracterizada pela inexistencia de determinantes antigênicos comuns entre as duas hemoglobinas distintas.

O soro anti-Hb de *H. modestus*, não foi capaz de diferenciar o antígeno homólogo do antígeno heterólogo, eviden-

ciando-se reação de identidade total entre as duas diferentes hemoglobinas, quando comparadas por imunodifusão dupla, demonstrando a inespecificidade desse antisoro.

Reação de identidade parcial foi observada entre as duas hemoglobinas, quando se utilizou soro anti-Hb de *L.miliaris*. A presença de "esporão" indica o reconhecimento de determinantes antigênicos que não são comuns entre as hemoglobinas de serpentes pertencentes às espécies *H.modestus* e *L.miliaris* (Fig.1). Dado a maior especificidade desse antisoro, ele foi utilizado para realização de experimentos subsequentes.

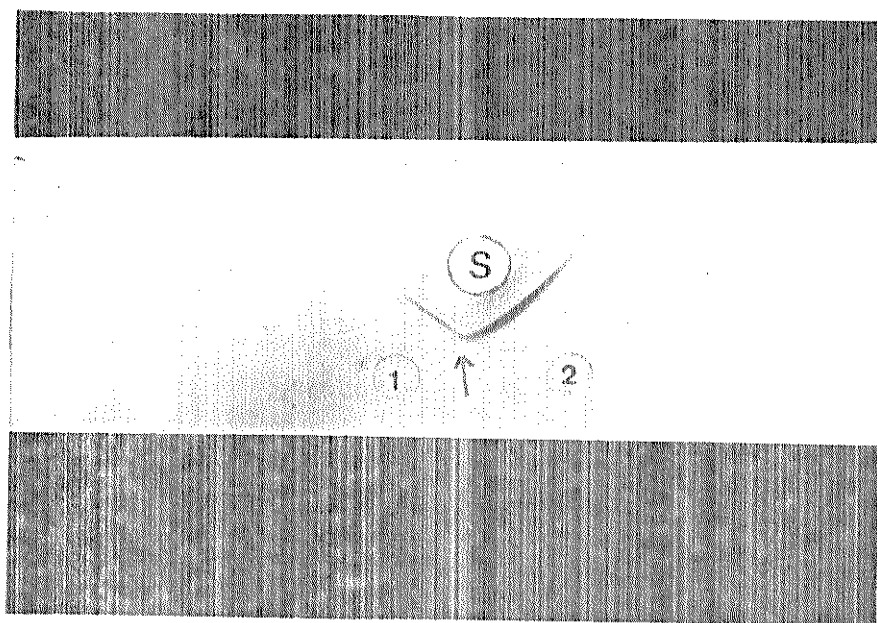


Fig.1- Análise por imunodifusão dupla das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, revelada com soro anti-Hb de *L.miliaris* (S)- soro anti-Hb de *L.miliaris*; (1)- hemoglobina de *H.modestus*; (2)- hemoglobina de *L.miliaris*.

A evidência de "esporão" existente entre as duas hemoglobinas, indicando reação de identidade parcial, conduziu-nos à realização de experimentos de absorção para a obtenção de antisoro específico.

O teste de absorção foi realizado utilizando-se soro anti-Hb de *L.miliaris* (anticorpo) e hemolisado total de *H.modestus* (antígeno). Vários tubos de ensaio foram utilizados, onde se colocava 0,5ml de antisoro, cuja concentração foi mantida constante, e 0,5ml de antígeno nas concentrações que variavam de 32µg a 1000µg de Prot./ml. Após centrifugação para remover os anticorpos que reconheceram os determinantes antigênicos comuns às duas hemoglobinas, os sobrenadantes de cada tubo de reação foram colocados para reagirem com antígeno e anticorpo, com o objetivo de se determinar o ponto de equivalência. O sobrenadante que não apresentava excesso de antígeno e nem de anticorpo, foi utilizado como sendo antisoro monoespecífico (Fig.2)

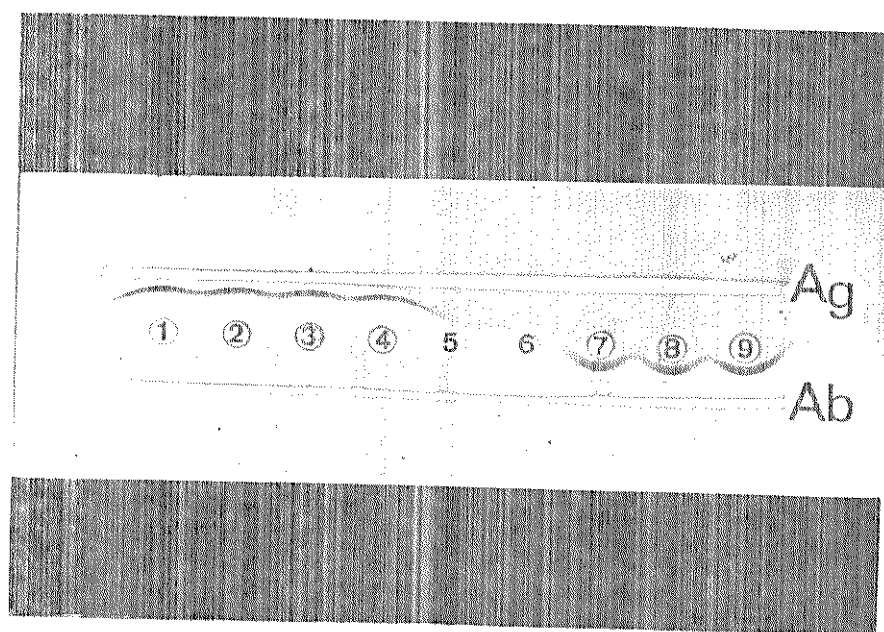


Fig.2- Análise dos sobrenadantes da reação de precipitação por imunodifusão dupla. (Ag)- hemoglobina de *H.modestus* ; (Ab)- soro anti-Hb de *L.miliaris* ; (1 a 9)- sobrenadantes da reação de precipitação em meio líquido.

A especificidade do antisoro absorvido foi testada por imunodifusão dupla, fazendo-o reagir com as hemoglobinas de ambas as espécies de serpentes. Evidência de apenas uma linha de precipitação com antígeno homólogo e a ausência de precipitação com antígeno heterólogo, demonstrou a especificidade do antisoro após ter sido absorvido (Fig.3).

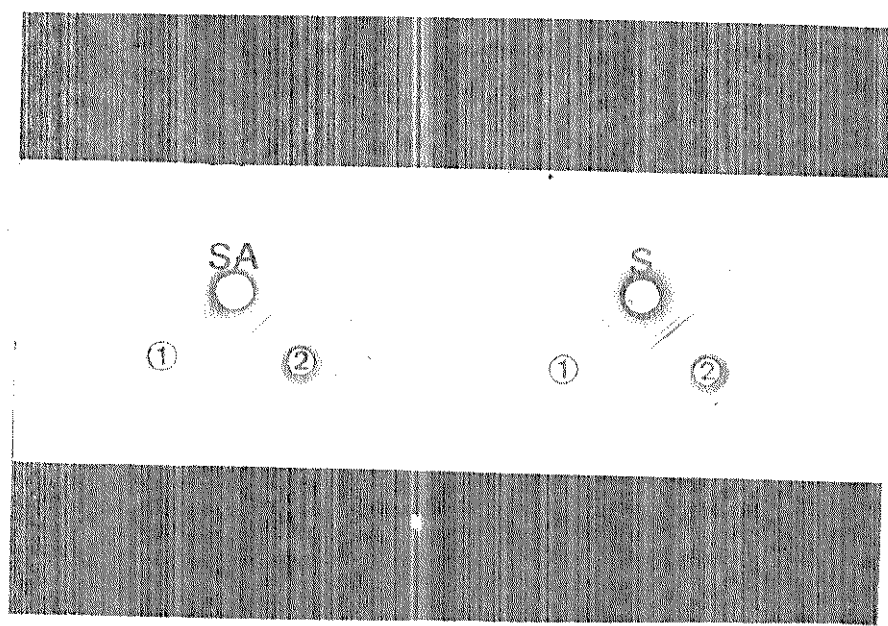


Fig.3- Análise da especificidade do soro anti-Hb de *L. miliaris*, absorvido com hemoglobina de *H. modestus*, por técnica de imunodifusão dupla. (SA)- soro anti-Hb de *L. miliaris*, absorvido com hemoglobina de *H. modestus*; (1)- hemoglobina de *H. modestus*; (2)- hemoglobina de *L. miliaris*; (S)-soro anti-Hb de *L. miliaris*.

Experimentos similares foram realizados, utilizando as globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*, com objetivo de se verificar exposição de determinantes antigênicos adicionais, após remoção do grupo heme das duas hemoglobinas. Os estudos imunológicos demonstraram resultados análogos aos obtidos com

as hemoglobinas (holoproteínas).

Devido à diferença encontrada entre as hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* em relação ao seu comportamento funcional (OGO et alii, 1978), e à diferença encontrada em termos de determinantes antigênicos, foi de interesse verificar até que ponto as alterações funcionais e antigênicas implicariam em diferenças na estrutura primária das moléculas de hemoglobinas das duas espécies de serpentes.

Estudos de propriedades estruturais

Separação dos componentes das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

As dificuldades de se obter separação dos componentes de ambas as hemoglobinas de serpentes por cromatografia de troca iônica, fizeram-nos optar por separação através de isoeletrofocalização em coluna, de acordo com o método descrito por PALEUS, 1971. Cerca de 10ml de solução de hemoglobina, sob forma de oxihemoglobina, contendo de 1,5 a 3,5 mg de Prot./ml, foram aplicadas em coluna de focalização isoelétrica contendo gradiente de sacarose e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 a 9,0. Após 60 horas, os componentes foram eluídos da coluna por gravidade, em volume de 2ml/tubo. Medida de pH e da absorvância em 415nm foram efetuadas tubo por tubo. O hemolisado total de *H.modestus*, mostrou a existência de três componentes principais (Tabela I e Fig.4) e o hemolisado total da espécie *L.miliaris*, apresentou cinco componentes principais (Tabela II e Fig.5).

Tabela I

Componentes da hemoglobina de *H. modestus*, obtidos por focalização isoeletrica em coluna, utilizando gradiente de sacarose e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 e 9,0.

Componentes	% do hemolisado	Ponto isoeletrico
	total	aparente
I	80%	8,1
II	15%	7,9
III	5%	7,8

Tabela II

Componentes da hemoglobina de *L. miliaris*, obtidos por focalização isoeletrica em coluna, utilizando gradiente de sacarose e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 e 9,0.

Componentes	% do hemolisado	Ponto isoeletrico
	total	aparente
I	2%	8,4
II	6%	8,1
III	85%	8,0
IV	5%	7,7
V	2%	7,6

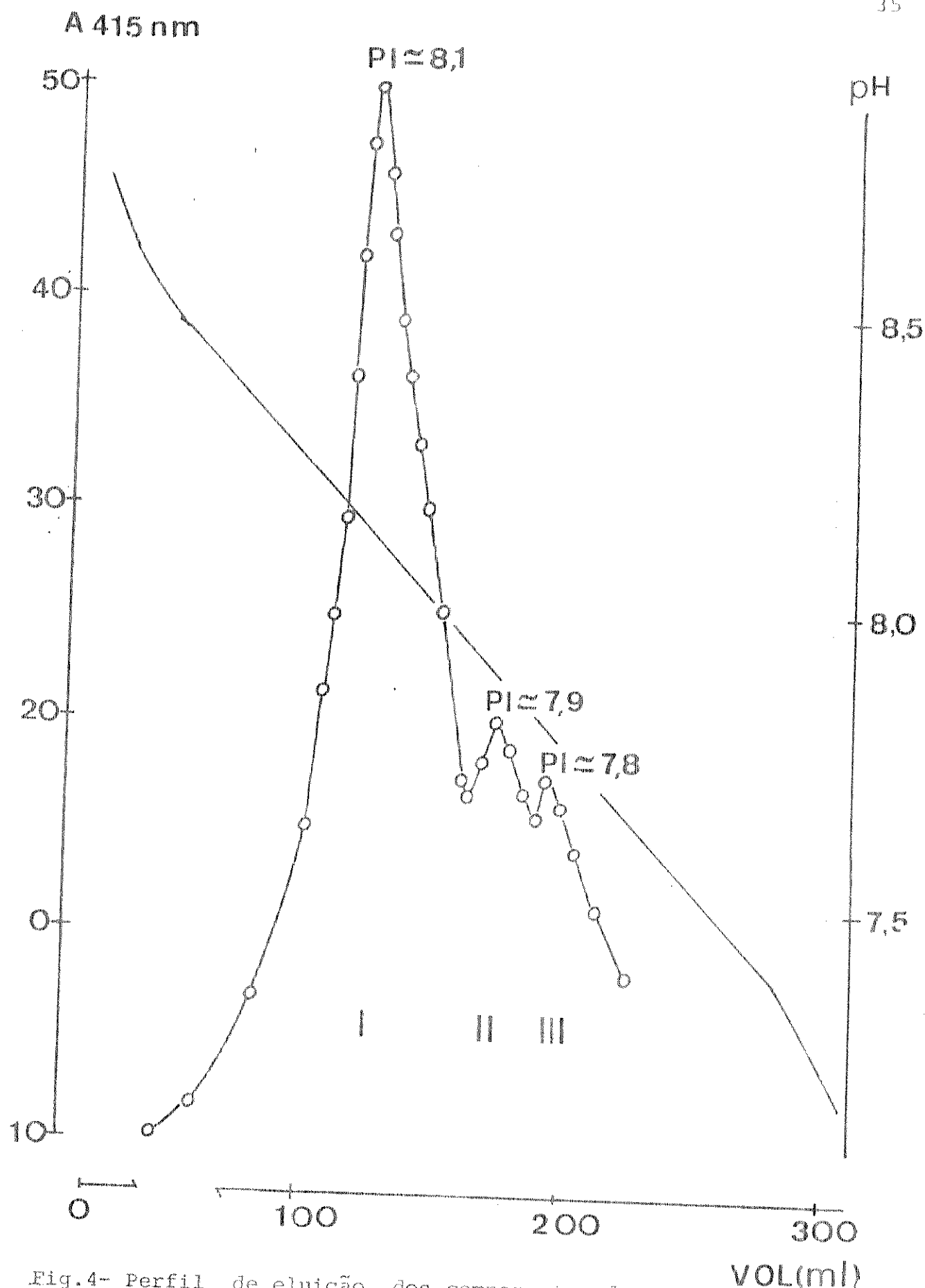


Fig.4- Perfil de eluição dos componentes da hemoglobina de *H. modestus*, obtidos em coluna de isoeletrofocalização utilizando gradiente de sacarose e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 e 9,0

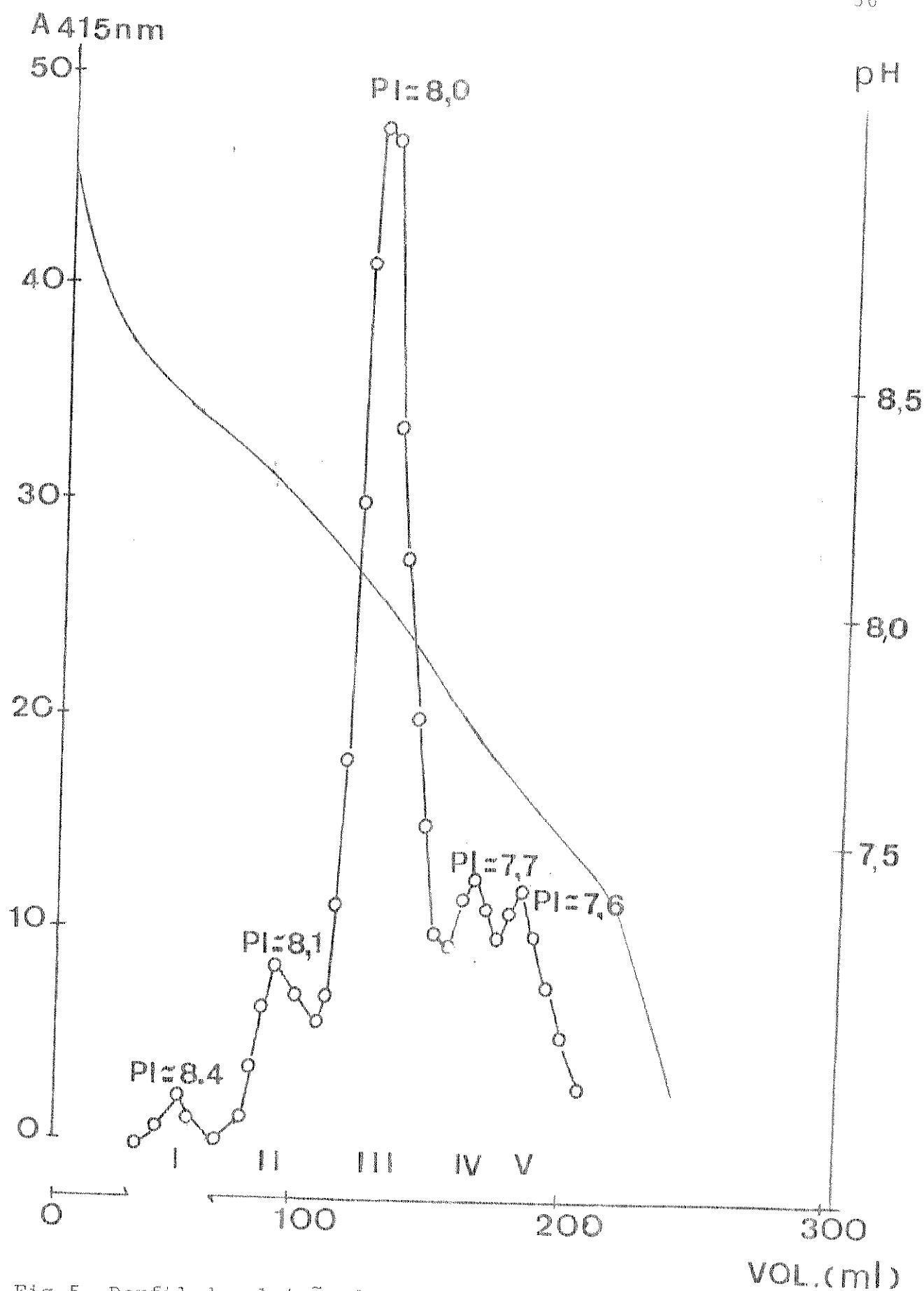


Fig.5- Perfil de eluição dos componentes da hemoglobina de *L.miliaris* , obtidos por coluna de isoeletrofocalização utilizando gradiente de sacarose e anfólito de intervalo de pH entre 7,0 a 9,0.

Análise dos diferentes componentes das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, por imunodifusão dupla.

Com objetivo de constatar diferenças entre os componentes da hemoglobina de cada espécie de serpente, utilizamos reação tipo antígeno-anticorpo, que além de nos fornecer diferenças em determinantes antigenicos sequenciais, pode também indicar diferenças antigenicas conformacionais.

Os resultados dos testes de imunodifusão dupla mostraram, quando se trabalhou com antisoro homólogo, que havia identidade total entre os componentes I,II e III da hemoglobina de *H.modestus* (Fig.6). Com relação à hemoglobina da espécie *L.miliaris*, observou-se reação de identidade parcial entre o componente III (Maior concentração) e os demais componentes. Os componentes I,II,IV e V mostraram reação de identidade total entre eles (Fig.7).

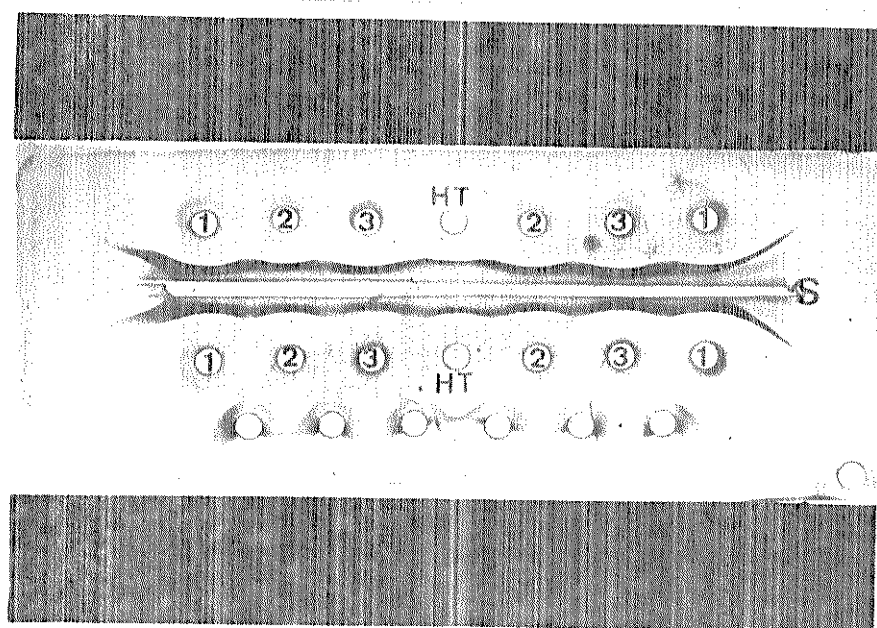


Fig.6- Análise por imunodifusão dupla dos componentes da hemoglobina de *H.modestus* , obtidos por isoeletrofocalização em coluna, revelados por soro anti-Hb de *H.modestus*. (S)-soro anti-Hb de *H.modestus* ; (1)- componente I ; (2) componente II ; (3)-componente III ; (HT)- hemolisado total de *H.modestus*.

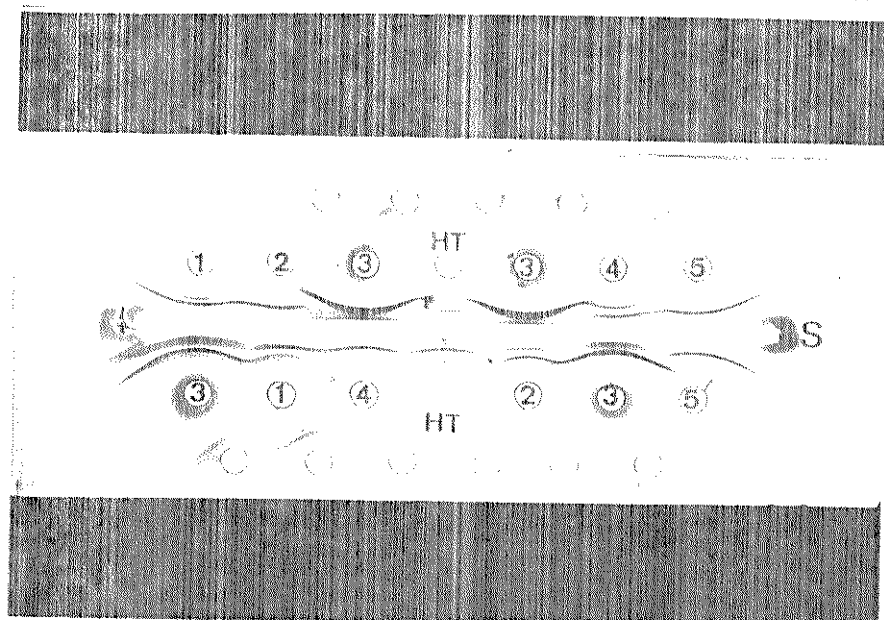


Fig.7- Análise por imunodifusão dupla dos componentes da hemoglobina de *L.miliaris*, obtidos por isoeletrofocalização em coluna, revelados por soro anti-Hb de *L.miliaris*. (S)- soro anti-Hb de *L.miliaris* ; (1)- componente I ; (2)- componente II ; (3)- componente III ; (4)- componente IV ; (5)- componente V ; (HT)- hemolisado total de *L.miliaris* .

Análise das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

Os componentes de maior concentração, isto é, o componente I da hemoglobina de *H.modestus* e o componente III da hemoglobina de *L.miliaris*, foram tratados de modo a se obter suas globinas. Assim, após a remoção do grupo heme, as globinas foram submetidas à isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida, utilizando anfólito de intervalo de pH entre 3,5 e 10,0 em presença de uréia 8M. Duas bandas foram observadas nas globinas de ambas as espécies de serpentes, sugerindo a dissociação das cadeias α e β cadeias (Fig.8). As bandas apresentaram PI aparente de 8,7 e 8,5 para globina de *L.miliaris* e PI aparente de 8,4 e 8,2 para globina de *H.modestus*. Dado aos pontos isoelétrico muito próximos, purificações posteriores das cadeias tornaram-se impraticáveis por métodos usuais.

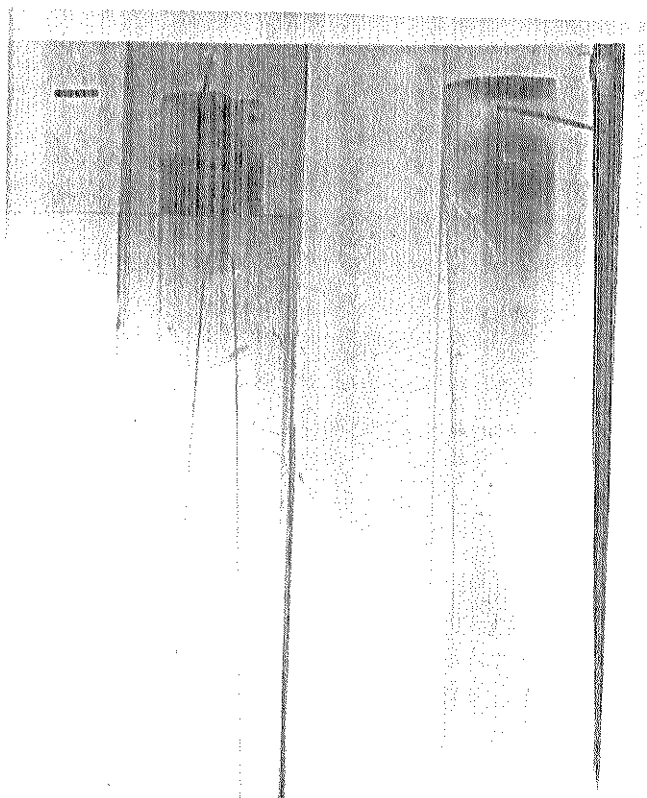


Fig.8- Análise das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris* por isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida, utilizando anfólito de intervalo de pI entre 3,5 e 10,0 , e em presença de uréia 8 M. (1)- globina de *H.modestus*; (2) - globina de *L.miliaris*

Determinação da composição em amino ácidos das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

As globinas das duas espécies de serpentes foram hidrolisadas com HCl 6N, a 110°C, durante 24 horas. O conteúdo em resíduos de Triptofano não foi determinado, devido à perda substancial desse amino ácido durante a hidrólise ácida com HCl.

A composição em amino ácidos, (Tabela III), não demonstrou grande variação entre as duas hemoglobinas. As globinas de ambas as serpentes não apresentaram resíduo de metionina e o conteúdo em lisina, 24 resíduos na globina de *H.modestus* e 27 resíduos na globina de *L.miliaris*, foi, pois, ligeiramente diferente. O número de meia cistina foi idêntico nas duas globinas (5 resíduos/ $\alpha\beta$ dímero).

Tabela III

Análise da composição em amino ácidos das globinas de duas espécies de serpentes (*H.modestus* e *L.miliaris*) , assumindo pêsso molecular de 32 000 daltons ($\alpha\beta$ dímero).

Amino ácidos	<i>H.modestus</i>	<i>L.miliaris</i>
Ác. císteico*	-	-
CM cisteína*	-	-
Ác. aspártico	27,6	27,4
Treonina	14,7	14,3
Serina	17,7	17,4
Ác. glutâmico	29,1	28,4
Prolina	13,4	13,2
Glicina	20,7	21,1
Alanina	39,1	38,5
Cistina	5,3	4,9
Valina	16,2	16,9
Metionina	-	-
Isoleucina	8,2	9,4
Leucina	34,1	32,8
Tirosina	6,0	6,8
Fenilalanina	13,2	16,0
Histidina	16,8	16,2
Lisina	24,2	27,6
Arginina	9,5	9,9
Triptofano*	-	-

* Não foram determinados.

Determinação de grupos sulfidrilas livres em hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris*

Os grupos tióis reativos das hemoglobinas foram investigadas através de reação com PCMB, por titulação espectrofotométrica, de acordo com método de BOYER, 1954. A hemoglobina de *H. modestus*, apresentou 3 grupos -SH/heme na proteína nativa enquanto que a hemoglobina da espécie *L. miliaris* apresentou 2 grupos -SH/heme na proteína nativa.

Determinação de amino ácidos amino-terminal nas globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*

As sequencias dos amino ácidos N-terminais foram estabelecidas, baseando-se na homologia com a hemoglobina de *Vipera aspis*, devido à dificuldade de se separar as cadeias α das cadeias β nas globinas de ambas as serpentes. Em todas as amostras analisadas, dois resíduos de amino ácidos eram determinados em cada etapa, indicando que as cadeias α e β estavam livres (Tabelas IV e V). Tanto a cadeia α como a cadeia β das duas globinas apresentaram resíduo de Valina como amino ácido amino-terminal.

Tabela IV

Sequencia de amino ácidos N-terminais das cadeias de hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* .

Resíduos de amino ácidos da cadeia	
<i>H.modestus</i>	Val - Leu - Thr - Asp - Glu
<i>L.miliaris</i>	Val - Leu - Thr - Glu - Asp
<i>V.aspis</i>	Val - Leu - Thr - Glu - Asp

Tabela V

Sequencia de amino ácidos N-terminais das cadeias das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* .

Resíduos de amino ácidos da cadeia	
<i>H.modestus</i>	Val - His - Trp - Ala
<i>L.miliaris</i>	Val - His - Trp - Ala

Determinação de amino ácidos carboxi-terminal nas globinas de *H.modestus* e *L.miliaris* .

As globinas de ambas as espécies de serpentes foram submetidas a ação de carboxipeptidase A, segundo método descrito por RIGGS et alii, 1975, com finalidade de se determinar os resíduos C-terminais. Essa enzima apresenta a propriedade de atuar somente nas cadeias β da hemoglobina humana, removendo os dois últimos resíduos de amino ácidos, histidina e tirosina, enquanto que a carboxipeptidase B atua apenas nas cadeias α da hemoglobina humana, removendo o último resíduo de amino ácido, a arginina (ZITO et alii, 1964).

Como o nosso objetivo era determinar exclusivamente os resíduos C-terminais nas cadeias β das globinas de ambas as serpentes em estudo, utilizou-se a carboxipeptidase A, devido ao envolvimento do resíduo C-terminal das cadeias da hemoglobina humana no efeito Bohr alcalino (PERUTZ et alii, 1968).

A digestão enzimática foi desenvolvida a 37°C, durante 60 minutos, em presença de inibidor da carboxipeptidase B, o ácido arginínico. Os amino ácidos liberados foram identificados no analisador de amino ácidos e estão contidos na tabela VI.

As hemoglobinas de ambas as espécies de serpentes, apresentaram como resíduo C-terminais das cadeias β , a Histidina e a Tirosina, como a hemoglobina humana e as hemoglobinas de vários outros animais estudados.

Tabela VI

Análise dos amino ácidos liberados das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, pela ação da carboxipeptidase A.

Resíduos de amino ácidos liberados	<i>H.modestus</i> $\alpha\beta$ dímero	<i>L.miliaris</i> $\alpha\beta$ dímero
Histidina	1,0 mol/mol	1,0 mol/mol
Tirosina	0,9 mol/mol	0,5 mol/mol
Alanina	-	0,4 mol/mol

Mapeamento peptídico das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

Com intuito de se comparar globinas das espécies *H.modestus* e *L.miliaris* ao nível de estrutura primária, realizou-se técnica de "fingerprint" que nos pode fornecer o grau de similaridade e ou diferença entre os padrões de peptídeos triptícos. O critério usado para comparar os componentes do "fingerprint" de proteínas das duas espécies de serpentes foi de acordo com os trabalhos de MAO et alii, 1978.

As globinas foram submetidas a ação da tripsina (tratada com TPCK), durante 5 horas a 37°C. Maior proporção de peptídeos insolúveis foi observada na globina da espécie *H.modestus*, quando comparada com a globina de *L.miliaris*. Após centrifugação para remoção do precipitado, os peptídeos solúveis foram analisados. Inicialmente, isto é, na 1.^a dimensão

foi realizada, eletroforese de alta tensão em tampão piridina pH 5,4, constituída de piridina - ácido acético glacial - H_2O (72 : 25 : 3600 v/v). Na 2.^a dimensão, foi desenvolvida a cromatografia ascendente, utilizando como solvente n-butanol - piridina - ácido acético - H_2O , (15 : 10 : 3 : 12 v/v). Os cromatogramas foram corados com solução de ninhidrina 2g%, e as manchas obtidas nos forneceram informações do número total de produtos da digestão triptica; 26 manchas foram observadas no mapeamento peptídico da globina de *L.miliaris* (Fig.9) e 25 manchas no mapeamento peptídico da globina de *H.modestus* (Fig.10). No que se diz respeito aos peptídeos solúveis, obteve-se diferenças em apenas um peptídeo entre as proteínas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

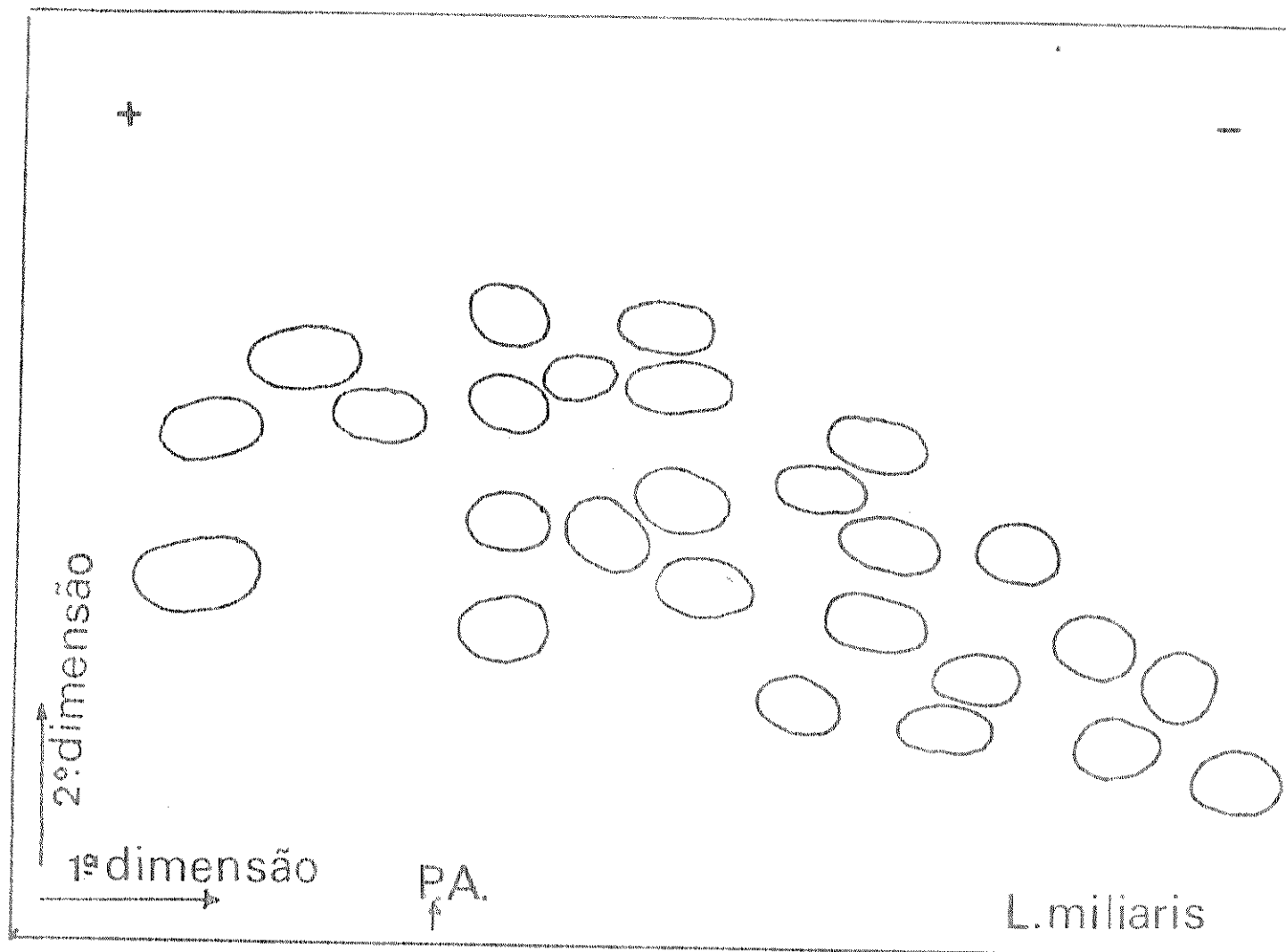


Fig.9- Mapeamento peptídico da globina de *L.miliaris*, revelado com reagente de ninhidrina. 1ª dimensão: eletroforese de alta tensão, 3500 volts, 50 mA, 120 minutos, em tampão piridina pH 5,4. 2ª dimensão: cromatografia ascendente, por 4 horas, utilizando solvente n-butanol - piridina - ácido acético glacial - H_2O .

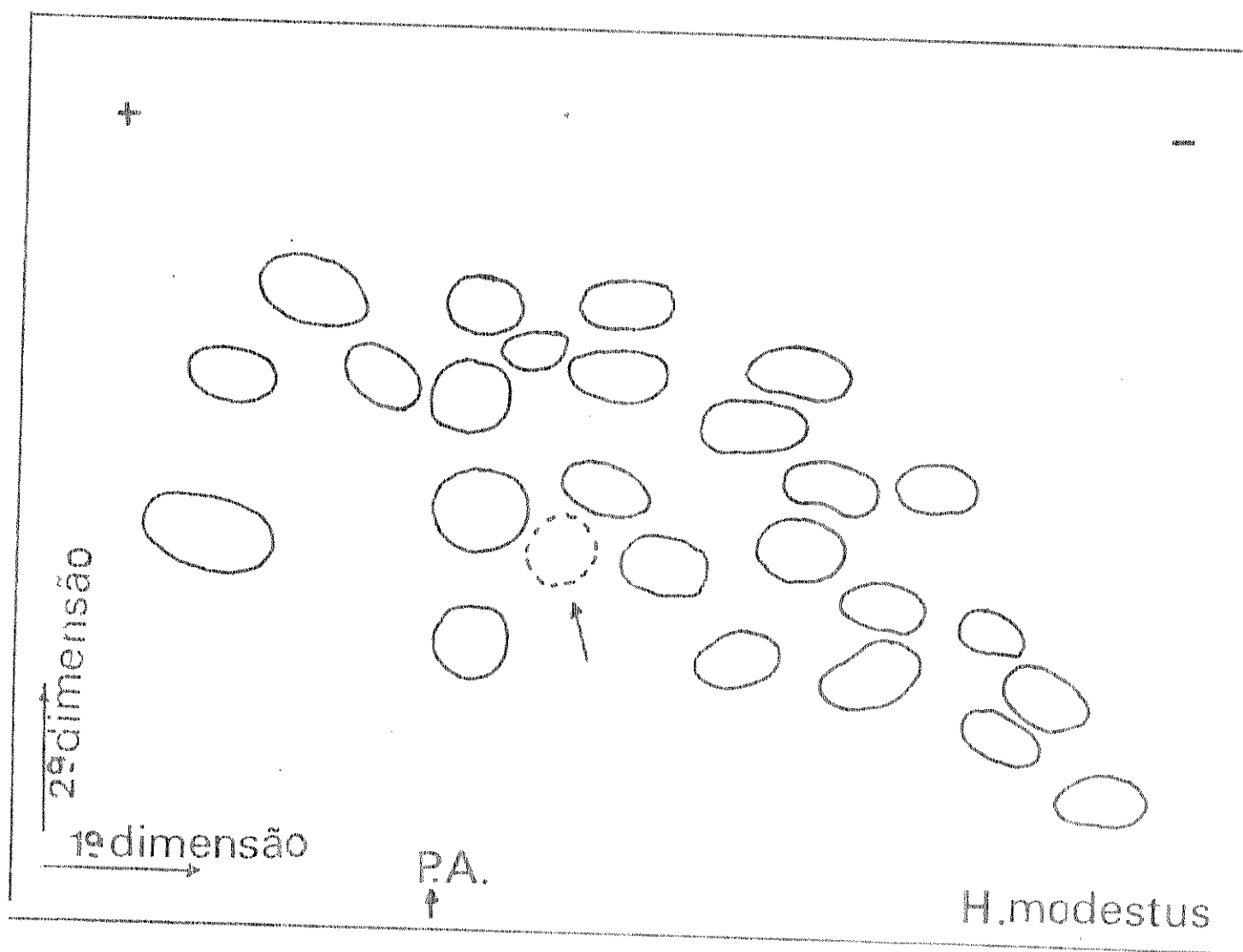


Fig.10-Mapeamento peptídico da globina de *H.modestus*, revelado com reagente de ninhidrina. 1.^a dimensão: eletroforese de alta tensão, 3500 volts, 50 mA, 120 minutos, em tampão piridina pH 5,4. 2.^a dimensão: cromatografia ascendente por 4 horas, utilizando solvente n-butanol - piridina - ácido acético - H₂O.

DISCUSSÃO

Estudos sobre propriedades funcionais das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, espécies de serpentes semi aquáticas, que apresentam diferentes graus de adaptação ao ambiente aquático, foram realizados inicialmente por OGO et alii, 1979. De acordo com estes autores a afinidade pelo ligante oxigênio era maior e independente de pH na espécie *H.modestus* enquanto que na espécie *L.miliaris*, a afinidade era menor e dependente da concentração de íons hidrogênio. Estas diferenças funcionais foram atribuídas a adaptação fisiológica de ambas as serpentes ao meio ambiente.

Diferenças estruturais que, possivelmente, ocorrem entre essas duas hemoglobinas funcionalmente distintas, despertaram nosso interesse e nos levaram a estudar alguns aspectos estruturais dessas moléculas. Neste contexto, experimentos imunológicos foram realizados no sentido de se verificar se tais diferenças funcionais correspondia a diferenças estruturais de tal modo que sítios antigênicos das duas hemoglobinas estivessem comprometidos e fossem diferentes entre elas.

A grande distância filogenética apresentada entre répteis e roedores, levou-nos a suposição de que as suas hemoglobinas poderiam diferir em numerosas posições na estrutura primária, e que a grande maioria dos resíduos de amino ácidos existentes na superfície da moléculas das hemoglobinas de serpentes, poderia ser imunogênica em ratos. Desta forma imunizamos ratos com hemoglobina de ambas as serpentes e preparamos soros que apresentaram títulos relativamente altos após 2 meses de inoculação, e demonstraram serem específicas a essas hemoglo

binas, e não às possíveis outras proteínas contaminantes, uma vez que as linhas de precipitação obtidas pela reação antígeno-anticorpo apresentavam atividade peroxidásica, quando submetidas a ensaio com benzidina.

O soro anti-Hb de *H. modestus*, quando testado por imunodifusão dupla, mostrou reação de identidade total entre as hemoglobinas das duas serpentes demonstrando baixa especificidade. De fato CRADOCK-WATSON, 1967, por exemplo, não puderam evidenciar diferenças imunológicas entre hemoglobina de cavalo, de mula e de jumento, por teste de imunodifusão dupla. Comparação antigênica das hemoglobinas de duas espécies de truta, a *Salmo irideus* e *Salmo gairdneri*, foi realizada por TAN-WILSON et alii, 1976, utilizando técnicas de fixação de complemento e os autores também verificaram que as hemoglobinas das duas espécies de trutas eram antigenicamente indistinguíveis. Interessante pois, foram nossos achados quando examinamos a reação antígeno-anticorpo, utilizando soro anti-Hb de *L. miliaris*. Tal reação mostrou relação antigenica de identidade parcial, sugerindo a existência de diferenças antigenicas entre as hemoglobinas das duas serpentes que apresentam propriedades funcionais diferentes. Esse dado é compatível com os trabalhos de TAN-WILSON e RAND, 1975, que relataram a existência, dentro da mesma espécie de truta, de dois componentes de hemoglobina também funcionalmente distintas, isto é, um deles com afinidade pelo oxigênio independente de pH e de fosfatos orgânicos, e o outro com efeito Bohr e efeito de fosfatos orgânicos nítidos; esses dois componentes pertencendo ao mesmo animal, também apresentaram reação imunológica cruzada. Já HIGGINS, 1978 analisando as hemoglobinas de réptil, iguana marinha, evidenciou reação cruzada entre espécies diferentes, tais diferenças foram discutidas do

ponto de vista, filogenético. Uma árvore filogenética foi também proposta por LYKAKIS, 1974 determinando a interrelação existente entre três tartarugas terrestres (*T. graeca*, *T. hermanni* e *T. marginata*) e duas aquáticas (*C. caspica* e *E. orbicularis*) através de reações cruzadas por semelhanças antigenicas.

A utilização de anticorpos como provas imunológicas das proteínas globulares, é reconhecidamente um método de escolha para distinguir diferenças entre proteínas relacionadas quando se obtêm anticorpos de alta especificidade. No nosso caso, a evidencia de "esporão" entre as reações das hemoglobinas das duas serpentes com anticorpo, levou-nos mais longe, a realizar reação de absorção do soro anti-Hb de *L. miliaris* com hemoglobina de *H. modestus*, com objetivo de se preparar antisoro específico à hemoglobina de uma das espécies de serpentes, isto é, a de *L. miliaris*. A especificidade do antisoro foi ensaiada por imunodifusão dupla, e a evidencia de apenas uma linha de precipitação com antígeno homólogo e a ausência de precipitação com antígeno heterólogo, demonstrou a especificidade desse antisoro, bem como a presença de maior número de determinantes antigenicos na hemoglobina de *L. miliaris* em relação a hemoglobina de *H. modestus*.

Os determinantes antigênicos de uma proteína na forma nativa (determinantes conformacionais) podem ser diferentes quando se desnatura (determinantes sequenciais) (CARVER et alii, 1980). Antisoros obtidos contra proteína nativa apresentam pequena reação cruzada com a proteína desnaturada (SHINKA et alii, 1976) e nas hemoproteínas as formas ferrosa e férrica mostraram reações diferentes com anticorpos (REICHLIN et alii, 1966b; NOBLE et alii, 1969). Portanto, experimentos foram realizados, fazendo-se reagir globinas de *H. modestus* e *L. miliaris*. Os

estudos imunológicos demonstraram resultados similares aos encontrados com hemoglobinas nativas.

Dada as diferenças encontradas nos determinantes antigênicos das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, foi de interêsse estudar outras propriedades estruturais. A multiplicidade de componentes destas proteínas foi pois analisadas. Esta multiplicidade em diferentes espécie animal nos parece importante, visto a frequência com que ela aparece. Assim, hemoglobinas de vários rēpteis foram analisadas por DESSAUER et alii, 1957 e DESSAUER, 1970 e os resultados mostraram a existência de múltiplos componentes, podendo essa variação no número de componentes ser evidenciada dentro de uma mesma espécie animal. Certas evidencias atribuem essa multiplicidade de componentes às ligeiras diferenças estruturais, bem como às tendências para a proteína se dissociar em subunidades por interações com íons do sistema tampão utilizado nos trabalhos, ou mesmo por interações com outras moléculas proteicas. Esses fatores, evidentemente, dificultam os estudos comparativos das hemoglobinas, por análises eletroforéticas e cromatográficas (RIGGS, 1965 ; SULLIVAN & RIGGS, 1967). Em trabalhos antigos de SVEDBERG & HEDENIUS, 1934 era relatado a grande uniformidade de coeficiente de sedimentação nas hemoglobinas de mamíferos, aves e peixes. Estas hemoglobinas foram caracterizadas por apresentarem constante de sedimentação 4,0 - 4,5 S, sugerindo peso molecular de 60 000 - 70 000 daltons. Contudo trabalhos mais recentes com hemolisados de rēpteis e anfíbios, relatam o aparecimento frequente de componentes de hemoglobina com coeficiente de sedimentação 7,0 - 7,4 S e ocasionalmente maiores 12,5 S. A polimerização das hemoglobinas através de pontes dissulfetos é uma das características frequentemente encontradas em hemoglobinas de an-

fíbios (SULLIVAN, 1974b) e rēpteis (SULLIVAN, 1974a). Dentre a classe dos rēpteis tem sido evidenciada polimerização nas hemoglobinas de crocodilo (REISCHIL & DIEFENBACH, 1976), de duas espécies de serpentes aquáticas (SULLIVAN, 1967) e de iguana marinha (HIGGINS, 1978).

Os componentes das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* foram separados por isoeletrofocalização em coluna. O hemolisado total de *H.modestus*, mostrou a existencia de três componentes principais apresentando PI aparente de 7,8 a 8,1 e no hemolisado total de *L.miliaris* foram encontrados cinco componentes principais, apresentando PI aparente de 7,8 a 8,4. Aquêles encontrados em maior concentração em ambas as serpentes apresentaram exclusivamente como tetrâmeros com peso molecular da ordem de 64 000 daltons, eliminando a possibilidade de dissociação (dímeros) ou associação (octâmeros).

Os diferentes componentes obtidos por isoeletrofocalização em coluna foram analisados por técnica de imunodifusão dupla, utilizando-se antisoro homólogo, uma vez que os métodos eletroforéticos não forneceram resultados satisfatórios devido talvez, à interação dos componentes com íons do sistema tampão, ou à formação de híbridos assimétricos de hemoglobina (BERNSTEIN & BOWMAN, 1976). Os resultados da reação antígeno-anticorpo revelaram que os três componentes da hemoglobina de *H.modestus* não diferiam antigenicamente entre si. Porém, com relação a hemoglobina de *L.miliaris*, o componente III mostrou ser antigenicamente diferente dos demais componentes. Para os estudos estruturais utilizamos os componentes das hemoglobinas existentes em maior concentração nas duas serpentes.

As globinas dos componentes isolados apresentaram duas bandas no gel de poliacrilamida submetido a focaliza-

ção isoelétrica, sugerindo a dissociação das cadeias α e β . Em contraste com as hemoglobinas de mamíferos, a separação das cadeias de hemoglobinas de vertebrados inferiores vai se tornando cada vez mais difícil à medida que os animais vão se distanciando na escala evolutiva (CHAUVET & ACHER, 1972). Em nossos experimento, as bandas referentes às globinas de *H.modestus* apresentaram PI aparente de 8,4 e 8,2 e as globinas de *L.miliaris* 8,7 e 8,5. Devido aos pontos isoelétricos muito próximos não foi realizada a purificação das cadeias de ambas as globinas.

A diferença na composição de amino ácidos é, geralmente, acompanhada de polimorfismo da hemoglobina dentro de uma espécie. Em salmão (*Oncorhynchus keta*), HASHIMOTO et alii, 1960 encontraram diferenças na composição de amino ácidos entre dois componentes com mobilidade eletroforética diferente, denominados componentes rápido e lento. Da mesma forma os dois componentes principais da hemoglobina de carpa (*Cyprinus carpio*), apresentaram diferenças na composição de amino ácidos nas cadeias β (BRAUNITZER & SORGER, 1969). Contudo, a composição de amino ácidos das globinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, mostrou ser bastante similar, diferindo apenas no conteúdo de lisina, sendo 27 resíduos/ $\alpha\beta$ dímero na espécie *L.miliaris* e 24 resíduos por $\alpha\beta$ dímero na espécie *H.modestus*. Nenhum resíduo de metionina foi constatada pela análise de amino ácidos nas duas globinas. É interessante observar que na cadeia α de viper (*Vipera aspis*) foi evidenciada apenas um resíduo de metionina (DUGUET et alii, 1974).

A relativa estabilidade dos derivados oxigenados é a base da função fisiológica das hemoglobinas, e as diferenciam de outras hemoproteínas ou simples compostos heme ferrosos, os quais são rapidamente oxidados em presença de oxigênio mole-

cular. Esta propriedade é perdida com a desnaturação e portanto está intimamente relacionada à integridade da conformação proteica (ANTONINI & BRUNORI, 1971). Razões estruturais para esta estabilidade não são totalmente esclarecidas, embora um papel importante tenha sido atribuído à presença de grupos -SH, como discutiremos (RIGGS, 1974 ; MANSOURI, 1979), e à presença de um envolvimento hidrofóbico ao redor do heme de acordo com KENDREW, 1960 e PERUTZ, 1965. Porém, CAUGHEY et alii, 1969 e TUCKER et alii, 1978, atribuíram uma grande importância para a estabilização, a proximidade do resíduo de histidina distal ou proximal, o bastante para interagir com a molécula de oxigênio ligada ao ferro. Hemoglobinas anormais, onde a histidina distal ou proximal está substituída por tirosina reforçam esta evidência, e apresentam velocidade de auto-oxidação muito rápida. As hemoglobinas das duas espécies de serpentes, cujo derivado oxigenado é tão estável quanto as de mamíferos, contêm 17 resíduos de histidina/ $\alpha\beta$ dímero, sugerindo a não ocorrência de substituições nas histidinas distal e proximal.

Quanto aos grupos -SH de proteínas, duas espécies são descritas, um dos quais são geralmente descritos como grupos -SH reativos, rapidamente tituláveis com reagentes de metais pesados, e outros denominados grupos -SH não reativos que são de difícil acesso aos reagentes (SNOW, 1962). Na presente investigação os grupos -SH reativos foi realizada através de titulação espectrofotométrica com PCMB. Na hemoglobina de *H. modestus*, evidenciamos 3 grupos -SH/heme e na hemoglobina *L. miliaris* 2 grupos -SH/heme, quando ambas as proteínas se encontravam no estado nativo.

Uma possível função dos grupos tióis nas hemoglobinas de répteis, que apresentam alto teor de grupos -SH, é a manutenção dos átomos de ferro na sua forma ferrosa (RIGGS, 1971), recentemente confirmado por MANSOURI, 1979 que realciona o papel do grupo -SH da Cys 93 β ao mecanismo de óxido-redução do ferro heme nas cadeias β das hemoglobinas. O conteúdo de meia cistina encontrado nas hemoglobinas das duas serpentes por composição de amino ácidos foi de 5 resíduos/ $\alpha\beta$ dímero. O elevado número de grupos -SH encontrados nas globinas de ambas as serpentes, pode explicar a estabilidade apresentada por essas hemoglobinas na forma oxigenada durante várias semanas a 49°C.

Desde que uma grande parte das adaptações funcionais depende somente de pequena parte da molécula de hemoglobina, sendo as propriedades funcionais controladas, principalmente, pelos segmentos NH₂ e COOH terminais das cadeias polipeptídicas das hemoglobinas (RIGGS, 1976), foi de interesse identificar os resíduos amino e carboxi terminais nas globinas das duas serpentes. A análise da sequência dos resíduos N-terminais nas duas proteínas estudadas foi baseada na homologia com a cadeia α da hemoglobina de viper (*Vipera aspis*), dada a dificuldade de se separar as cadeias α das cadeias β nas duas globinas de serpentes. Tanto a cadeia α como a cadeia β das duas hemoglobinas apresentaram a Calina como resíduo N-terminal. Devido ao envolvimento da Val 1 α na ligação de íons cloreto na desoxihemoglobina (Van BEEK & De BRUIN, 1980) e o alto conteúdo de resíduos de histidinas encontrado nas globinas de ambas as serpentes por análise da composição de amino ácidos, era de se esperar que o efeito desse anion fosse semelhante nas duas hemoglobinas. Porém, apesar das hemoglobinas das duas serpentes, aparentemente, possuírem sítios para ligação de cloreto, tanto na desoxihemoglobi-

na como na oxihemoglobina, o anion não apresentou efeito sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigenio na espécie *L.miliaris*, embora na espécie *H.modestus*, a afinidade da hemoglobina pelo se apresentou diminuida pela presença de cloreto (OGO, 1982*). Esse fato sugere diferenças conformacionais, ao nível de estruturas terciárias e quaternárias, entre as duas hemoglobinas no sítio de ligação desse anion.

A identificação de Val 1 β como residuo N- terminal das cadeias β das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, um doa amino ácidos envolvido no sítio de ligação de fosfatos orgânicos (ARNONE, 1972 ; ARNONE & PERUTZ, 1974), não nos forneceu subsídios para explicar a diferença funcional apresentada pelas hemoglobinas das duas espécies de serpentes na presença de anions polifosfatos; contudo, podemos especular ser essa diferença devido a outros residuos como His 2 β , His 143 β e Lys 82 β (ARNONE, 1972 ; ARNONE & PERUTZ, 1974), bem como às possíveis diferenças conformacionais existentes entre as duas proteínas na cavidade central formada pelas cadeias β , sítio onde se encaixam os fosfatos orgânicos (BENESCH et alii, 1967).

Com relação aos amino ácidos C-terminais identificamos, exclusivamente, os residuos pertencentes às cadeias β na hemoglobina de serpentes por ser este importante no efeito Bohr alcalino destas proteínas (PERUTZ, 1968 ; BOLTON & PERUTZ, 1970 ; MUIRHEAD et alii, 1970). Os amino ácidos liberados pela ação da carboxipeptidase A foram a histidina e tirosina nas duas espécies de serpentes. Ficou pois evidente que as duas hemoglobinas por nos estudadas, não apresentaram diferenças nos residuos N e C terminais. Esses resultados demonstram a invariabilidade dos residuos "vitais" para a função biológica no decorrer da evolução, conforme aventado por PERUTZ et alii, 1968. Vis

* OGO, S.H. (1982) - Comunicação Pessoal.

to que as hemoglobinas das duas serpentes apresentaram a histidina como residuo C-terminal das cadeias β e valina como resi-
duo N-terminal da cadeia α , torna-se difícil explicar a diferen-
ça da grandeza do efeito Bohr apresentada entre elas atraves
destes amino ácidos. No hemolisado total de *L.miliaris*, a cur-
va de saturação da hemoglobina pelo oxigenio dependeu da concen-
tração de íons hidrogenio, enquanto que na hemoglobina desioni-
zada da espécie *H.modestus* o efeito Bohr foi próximo de zero,
sendo pois independente de pH (CGO et alii, 1979). A diferença
de efeito Bohr apresentada pelas hemoglobinas das duas serpentes
pode ser atribuida aos outros residuos envolvidos nesse efeito,
como também às diferenças conformacionais existente entre as du-
as moléculas proteicas.

As diferenças funcionais e antigênicas apresenta-
das pelas hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, conduzi-
ram-nos a realizar mapeamento peptidico, com finalidade de evi-
denciar diferenças ao nível de estrutura primária, uma vez que
as duas hemoglobinas não apresentaram diferenças significativas
na composição de amino ácidos e nem nos residuos amino e carbo-
xila terminais. Obviamente a análise completa de sequencia de
amino ácidos das duas proteínas nos daria informações mais de-
talhadas sobre as possíveis diferenças existentes entre as he-
moglobinas das duas serpentes, que poderiam estar envólvidas
nas propriedades funcionais e ou antigênicas. Não obstante o es-
tudo comparativo de cromatogramas obtidos por mapeamento pepti-
dico, pode ser aplicado para estimar o grau de similaridade en-
tre duas proteínas relacionadas, apresentando-se como método
útil e rápido. Utilizamos pois, técnica de "fingerprint" como
método comparativo que apesar de apresentar limitações como por
exemplo a de fração considerável dos digestos tripticos se apre-

sentar insolúvel, que podem ser devida i) à resistência apresentada pelos peptídeos à ação da enzima, ii) à insolubilidade dos peptídeos no pH do meio de reação, iii) à agregação de peptídeos, ou iv) à dificuldade de se reproduzir exatamente as duplicatas do "fingerprint" por variações no conteúdo de material insolúvel. Contudo, controlando cuidadosamente as composições do solvente e do sistema tampão, tempo de eletroforese e cromatografia, as posições relativas dos peptídeos foram bastante reprodutíveis. A análise do mapeamento peptídico apresentou 25 manchas na globina de *H. modestus* e 26 manchas na globina da espécie *L. miliaris*. As duas globinas examinadas mostraram estruturas muito similares, diferindo em apenas um peptídeo. O critério utilizado para a comparação dos componentes do dígito tripéptico das duas globinas, foi de acordo com os trabalhos realizados por MAO et alii, 1978 que usaram esse mesmo método para correlacionar as hemoglobinas de diferentes espécies de serpentes marinhas. Entre os répteis, as tartarugas que apresentam "habitats" bastante variados (água doce, água salgada ou terrestres), foram estudadas por diversos pesquisadores (DESSAUER & FOX, 1964 ; FRAIR, 1964 ; 1972 ; 1978 ; 1979 ; LYKAKIS, 1971 ; 1974 ; BURBIDGE et alii, 1974 ; CHEN et alii, 1980). Os métodos utilizados para estudar as relações existentes entre diferentes espécies de tartarugas foram por imunoprecipitação, eletroforese, imuno-eletroforese e micro fixação de complemento. Recentemente, CHEN & MAO, 1980 descreveram os padrões de peptídeos tripticos, como um meio adicional para sugerir uma possível relação taxonômica entre algumas tartarugas da sub-ordem Cryptodira.

Para finalizar podemos concluir que no presente trabalho, procuramos avaliar a diversidade estrutural entre as hemoglobinas de duas espécies de serpentes, *H. modestus* e

L. miliaris, utilizando métodos imunológicos, determinação de principais resíduos de amino ácidos envolvidos no efeito Bohr alcalino, composição global de amino ácidos e análise dos padrões de peptideos trípticos. Embora os principais resíduos de amino ácidos envolvidos no efeito Bohr alcalino e nos sítios de ligação de cloretos e fosfatos orgânicos sejam os mesmos nas hemoglobinas das duas espécies de serpentes, os resultados do mapeamento tríptico sugerem diferenças ao nível de estrutura primária, podendo essas diferenças estar localizadas em sítios da molécula envolvidos na conformação da proteína. Experimentos imunológicos deverão ser cuidadosamente elaborados com objetivo de se verificar se as diferenças nos determinantes antigênicos são conformacionais ou sequenciais, assim como estudos mais detalhados com os peptideos solúveis e insolúveis deverão ser realizados para melhor esclarecimento das propriedades estruturais e antigênicas visando correlacioná-las com as propriedades funcionais.

Correlação estrutura-função

Estudos das propriedades estruturais e funcionais das hemoglobinas provenientes de diferentes origens, podem representar um instrumento valioso para analisar os mecanismos moleculares que parecem operar nas hemoglobinas de mamíferos. Além disso, possibilitam a compreensão dos mecanismos adaptativos que são desenvolvidos em diferentes organismos para satisfazer os requerimentos especiais em relação às condições ambientais e fisiológicas que podem ser de grande importância biológica.

Se compararmos nossos resultados com aqueles encontrados em hemoglobina A humana (HbA) e componente I da hemoglobina de *Salmo irideus* (HbI), alguma correlação entre estrutura e função poderá ser alcançada (Tabela VII).

TABELA VII

Resíduos amino e carboxil terminais das hemoglobinas e seus parâmetros funcionais (pH 7,0).

	Cadeia α		Cadeia β		"Striped"		Fosfato Orgânico			
	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal	n(Hill)	log P ₅₀	Ef. Bohr	n(Hill)	log P ₅₀	Ef. Bohr
HbA humana (1)	Val - Leu	-Tyr - Arg	Val - His	-Tyr - His	2,6	0,50	-0,30	2,6	1,0	-0,30
HbI <i>S. iridiens</i> (2)	Val	-Tyr - Arg	Val	-Phe	2,5	1,1 *	0,00	2,5	1,1	0,00
HbI <i>R. modestus</i> (3)	Val - Leu	-	Val - His	-Tyr - His	1,0	0,02	-0,07	1,7	0,95	-0,50
HbIII <i>L. meliarius</i> (4)	Val - Leu	-	Val - His	-Tyr - His	1,0	0,009	-0,30	2,0	1,25	-0,90

(1) ANTONINI et alii, 1982 ; (2) BARRA et alii, 1973 ; (2^{*}) AIROLDI et alii, 1981 ; (3) OGO et alii, 1979.

Cooperatividade

O fenômeno da cooperatividade na hemoglobina é causada pela mudança conformacional entre as suas formas T e R (MONOD et alii, 1965). Os estudos estruturais da desoxihemoglobina (forma T), revelaram a existência de várias pontes salinas, incluindo as do grupo Bohr. Uma vez que estas pontes salinas estão ausentes na oxihemoglobina (forma R), PERUTZ, 1970, sugeriu que a mudança ou rompimento destas ligações salinas poderia ser responsável pela cooperatividade na hemoglobina. Por outro lado, ANDERSON, 1975, através de estudos de cristalografia por raio-X, utilizando hemoglobina Kansas, verificou que as pontes salinas do modelo estereoquímico de PERUTZ, 1970, incluindo as ligações salinas entre His 146 β e Asp 94 β , permaneciam inalteradas na hemoglobina Kansas ligada ao NO ou O₂ na presença de IHP (forma T).

O componente I da hemoglobina de *S. iridiaceus*, apesar de ter a His 146 β substituída por Phe, apresenta cooperatividade (BARRA et alii, 1973). Entretanto, as hemoglobinas de serpentes *H. modestus* e *L. miliaris*, embora tenham os mesmos resíduos C-terminais da HbA humana, não apresentam interação heme-heme (OGO et alii, 1979).

Efeito Bohr alcalino

Da mesma forma que a interação heme-heme, o efeito Bohr resulta da mudança na estrutura tridimensional da molécula de hemoglobina, após sua combinação com oxigênio molecular. O efeito Bohr é um caso típico de interação heterotrópica, envolvendo prótons e O₂.

A His 146 β tem sido considerada como sendo o principal resíduo de amino ácido envolvido no efeito Bohr alcalino (PERUTZ, et alii, 1969 ; KILMARTIN et alii, 1980), embora tenha sido questionado por outros autores (RUSSU et alii, 1980) com base nos experimentos de ressonância nuclear magnética. Na verdade na ausência de fosfatos orgânicos e baixa concentração de íons cloretos (5mM), a His 146 β parece não contribuir para o efeito Bohr alcalino. Por outro lado, o componente I da hemoglobina de *S. irideus*, que não possui este efeito nem na presença ou na ausência desses anions, apresenta a His 146 β substituída por Phe, o que vem reforçar as observações de PERUTZ, et alii, 1969. As hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris*, também apresentam His como resíduo C-terminal das cadeias β e comportam-se diferentemente em relação ao efeito Bohr alcalino. Assim a hemoglobina designada de *H. modestus* tem efeito Bohr alcalino próximo de zero, e a de *L. miliaris* tem um valor semelhante à HbA humana.

Efeito de fosfatos

Na hemoglobina humana, os fosfatos orgânicos ligam-se, preferencialmente, à desoxihemoglobina o que facilita a transferência de O₂ dos eritrócitos para os tecidos, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo gás, sem alterar a cooperatividade da ligação com O₂ e nem o efeito Bohr alcalino (BENESCH et alii, 1967 ; ANTONINI et alii, 1982). Foi proposto por ARNONE, 1972, que os fosfatos orgânicos ligam-se à hemoglobina humana através de 4 pares de resíduos catiônicos que estão situados na cavidade entre duas cadeias β :- Val 1 β , His 2 β , Lys 2 β , His 143 β .

É interessante observar que HbI de *S. irideus* , apresenta como residuo N-terminal das cadeias β , a Valina, e fosfatos orgânicos não apresenta efeito sobre a cooperatividade, afinidade pelo O_2 ou no efeito Bohr alcalino.

Nas hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* , apesar de não terem sido determinados todos os resíduos, supostamente, envolvidos na ligação com fosfatos orgânicos, foram identificadas Val 1 β e His 2 β como resíduos N-terminais das cadeias β , resíduos estes também presentes na hemoglobina humana. O fosfato orgânico teve grande efeito sobre as hemoglobinas de ambas as serpentes em estudo, não somente sobre a afinidade da proteína pelo O_2 , como também alterando a interação heme-heme, tornando-as mais cooperativas e aumentando drasticamente o efeito Bohr alcalino.

Efeito de cloretos

Anions cloretos quando ligados à HbA humana, diminuem a afinidade pelo O_2 , aumentam o efeito Bohr alcalino e o valor de n (POYART et alii, 1980). ARNONE et alii, 1977, demonstraram que íons cloretos se ligavam entre o α -aminogruppo da Val 1 α e o grupo guanidinico da Arg 141 α . Mais recentemente, Van BEEK & De BRUIN, 1980, demonstraram que na desoxihemoglobina, apenas o α -aminogruppo da Val 1 α estava envolvido no sítio de ligação do cloreto.

Corroborando os dados acima, a HbI de *S. irideus* , que tem a Val 1 α , apresentou afinidade pelo O_2 diminuída em presença de cloretos, e o valor de n tornou-se menor embora não tenha perdido a cooperatividade.

As hemoglobinas de *h. modestus* e *L. miliaris* também apresentam Valina como residuo N-terminal das cadeias α . Con

tudo, estudos preliminares realizados por OGO, 1982, mostraram que as hemoglobinas das duas espécies de serpentes não tem efeito de cloretos em pH 7,0, comportando-se como hemoglobinas desionizadas. Todavia, em valores de pH menores que 7,0, esse anion não apresentou nenhuma alteração sobre as propriedades funcionais da hemoglobina de *L.miliaris*, enquanto que, na hemoglobina de *H.modestus*, a afinidade pelo O_2 apresentou-se diminuída, o efeito Bohr aumentado e a proteína tornou-se mais cooperativa.

Não obstante estudos comparativos (funcionais e estruturais) de hemoglobinas de vários animais nos forneçam informações a cerca do papel de ligantes heterotrópicos e origem da cooperatividade, as ações dos ligantes tem sido analisadas separadamente. Estudos recentes indicam que a ligação de cada modulador heterotrópico está relacionado não somente com a oxigenação mas também com a ligação de outros ligantes heterotrópicos, alguns dos quais competindo pelos mesmos sítios na molécula de hemoglobina (IMAIZUMI et alii, 1979). Além disso, a interação de vários componentes carregados (cátions e ânions) da solução com a proteína, dificultam a análise da correlação entre estrutura e função das hemoglobinas (BRUNORI et alii, 1982*).

Tendo em vista que a identificação dos amino ácidos bem como os mecanismos envolvidos nas propriedades funcionais das hemoglobinas continuam obscuros (ANDERSON, 1975; KILMARTIN et alii, 1978 ; 1980 ; MATTHEW et alii, 1979 ; RUSSU et alii, 1980 ; ANTONINI et alii, 1982) as hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* podem ser tomadas como modelo, que podem contribuir para auxiliar na elucidação das interpretações funcionais e estruturais da molécula de hemoglobina.

* BRUNORI, M. No prelo.

RESUMO

Certas propriedades antigênicas e estruturais de hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, serpentes de "habitat" semi-aquático, foram estudadas a fim de correlacioná-las com suas propriedades funcionais.

Antisoros contra hemoglobinas das duas espécies de serpentes foram obtidos em ratos. O soro anti-Hb de *H.modestus* mostrou similaridade antigênica entre as hemoglobinas das duas serpentes, quando testado por imunodifusão dupla. Entretanto no soro anti-Hb de *L.miliaris* somente reação cruzada foi possível de se constatar, sugerindo a existência de diferenças antigênicas entre as duas hemoglobinas.

Os componentes das hemoglobinas de ambas as serpentes foram separados por coluna de isoeletrofocalização em gradiente de sacarose, utilizando-se anfólito com intervalo de pH entre 7,0 e 9,0. No hemolisado total da espécie *H.modestus* foram encontrados 3 componentes principais e no de *L.miliaris*, 5 componentes principais. Os componentes obtidos foram testados por imunodifusão dupla, utilizando antisoro homólogo. Os componentes da hemoglobina de *H.modestus*, mostraram ser antigenicamente indistintas entre si. Por outro lado, na hemoglobina da espécie *L.miliaris*, foi observada reação cruzada entre o componente III (o de maior concentração no hemolisado) e outros componentes. Os componentes I, II, IV e V, mostraram reação de identidade total. Para os estudos estruturais foram utilizados os componentes de hemoglobinas encontrados em maior concentração em ambas as serpentes.

A composição de amino ácidos das globinas das

duas serpentes mostrou grande similaridade entre si, diferenciando apenas no conteúdo de lisina. Com relação aos resíduos N e C terminais, tanto as cadeias α quanto as cadeias β das hemoglobinas de ambas as serpentes apresentaram valina como resíduo N-terminal, e histidina como amino ácido C-terminal das cadeias β .

A análise do mapeamento triptico apresentou 25 manchas na globina de *H.modestus* e 26 na de *L.miliaris*. As duas globinas examinadas mostraram estruturas muito similares diferindo apenas em um peptídeo.

SUMMARY

Antigenic and structural properties of haemoglobins of *H.modestus* and *L.miliaris*, snakes of semi-aquatics habitat, were studied to establish relationships to their functional properties.

Antisera against haemoglobins of both snakes species were obtained in rats. The anti-Hb serum of *H.modestus* showed antigenic similarity between the haemoglobins of the two snakes, when tested by double immunodiffusion test. However, using antiserum to *L.miliaris* haemoglobin, only immunological reaction could be detected, suggesting the existence of antigenic difference between them.

The haemoglobins components of both snakes were separated by isoelectrofocusing in sucrose gradient, using ampholine in a pH range of 7,0 to 9,0. In the *H.modestus* the total hemolysate was found 3 major components and in the *L.miliaris* 5. The components obtained were assayed by double immunodiffusion using homologous antisera. The components of the *H.modestus* haemoglobin seem to be antigenically indistinguishable among them. However, in the components of the *L.miliaris* haemoglobin, was observed antigenic cross-reaction among the component III (major component) and other components. The Components I, II, IV and V, presented identity reaction among them. For the structural studies were used the haemoglobins components found in major concentration in both two snakes.

The amino acid composition of the globins of both snakes showed to be very closed, differing only in the lysine amount. The N-terminal analysis, showed that the α chains

and β chains of the haemoglobins of two snakes were valine and the C-terminal residues of β chains were histine.

Peptide mapping showed 25 spots in the *H.modestus* globin and 26 in that of *L.miliaris* . Thus only one peptide seems to be different in the snakes haemoglobins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, A.S. Adaptações respiratórias e tolerância a variações de alguns fatores extrínsecos em *Helicops modestus* GUNTER, 1861 e *Liophis miliaris* (LINNAEUS, 1758), serpentes de hábitos aquáticos (serpentes: Colubridae) São Paulo, 1977 161p. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências

AIROLDI, Lucia; BRUNORI, M. & GIARDINA, B. Properties of trout HbI in water and ligand linked binding of Na⁺. Febs letts, 129 (2): 273-6, 1981.

AMBLER, R.P. Hydrolysis with carboxypeptidases. Meth.Enzym., 11:437-44, 1967.

ANDERSON, N.L. Structures of deoxy and carbonmonoxy haemoglobin Kansas in the deoxy quaternary conformation. J.molec.Biol., 94:33-49, 1975.

ANTONINI, E.J. & BRUNORI, M. The equilibrium of hemoglobin and myoglobin with ligands. In: _____ & _____. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam, North-Holland, 1971. p.153-186 (North-Holland Research Monographs. Frontiers in Biology, V.21).

_____ ; GONDO, S.G. ; GIARDINA, B. ; IOPOLLO, C. & BERTOLLINI, A. The effect of pH and D-glycerate 2,3-Biphosphate on the O₂ equilibrium of normal and SH(β93) modified human hemoglobin. Eur. J. Biochem., 121:325-8, 1982.

ARNONE, A. X-ray diffraction estudy of binding of
2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin Nature
Lond., 237:146-9, 1972.

_____ & PERUTZ, M.F. Structure of inositol hexaphosphate
human deoxyhaemoglobin complex. Nature Lond., 249:34-6, 1974.

_____ ; BENESCH, Ruth E. & BENESCH, R. Structure of human
deoxyhemoglobin specifically modified with pyridoxal compounds.
J.molec. Biol., 115:627-42, 1977.

_____ ; O'DONNELL, S. & SCHUSTER, T. X-ray diffractions
studies of carbamylated human deoxyhemoglobin. Fedn. Proc.
Fedn. Am. Socs. exp. Biol., 35(7):1604, 1976.

ASKONAS, B.A. & SMYTH, D.G. Antigenicity of β -chain of human
hemoglobin. Nature Lond., 201: 496-7, 1964.

BALDWIN, Joyce & CHOTHIA, C. Haemoglobin : The structural changes
related to ligand binding and its allosteric mechanism. J.molec.
Biol., 129: 175-220, 1979.

BARRA, Donatella ; BOSSA, F.; BONAVENTURA, J. & BRUNORI, M.
Hemoglobin components from trout (*Salmo irideus*): determination
of the carboxyl and amino terminal sequences and their functional
implications. Febs lett., 35: 151-4, 1973.

BENESCH, Ruth E.; BENESCH, R. & YO, C.I. The oxygenation of
hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate effect
of temperature, pH, ionic strength and hemoglobin concentration.
Biochemistry, 8(6): 2567-71, 1969.

BENESCH, R. & BENESCH, RUTH E. The effect of organic phosphate from human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. biophys. Res. Commun., 26: 162-66, 1967.

_____ ; _____ & YU, C.I. Reciprocal binding of oxygen diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 59: 526-532, 1968a.

_____ ; _____ & ENOKI, Y. The interaction of hemoglobin and its subunits with 2,3-diphosphoglycerate. Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A., 61:1102-6, 1968b.

BENNETT, A.F. Blood physiology and oxygen transport during activity in two lizards, *Varanus gouldii* and *Sauromalus hispidus* Comp. Biochem. Physiol., 46A: 673-90, 1973.

_____ & DAWSON, W.R. Metabolism. In: GAUS, C. & DAWSON, W.R., eds. Biology of Reptilia, London, Academic, 1976, V.5, p.127-223.

BERNSTEIN, S.C. & BOWMAN, J.E. The demonstration of asymmetric hemoglobin hybrids by polyacrylamide electrophoresis. Biochim. biophys. Acta, 427: 512-9, 1976.

BOLTON, W.; COX, M.J. & PERUTZ, M.F. Structure and function of hemoglobin. J. molec. Biol., 33: 283-97, 1968.

_____ & PERUTZ, M.F. Tridimensional Fourier synthesis of horse desoxyhaemoglobin at 2,8 Å⁰ resolution. Nature Lond., 228: 551-2, 1970.

- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, Celia ; GIARDINA, B. ; ANTONINI, E.;
BRUNORI, M. & WYMAN, J. Partial restoration of normal functional
properties in carboxypeptidase A-digest hemoglobin. Proc. natn.
Acad. Sci., U.S.A., 69 (8): 2174-2178, 1972.
- _____ ; _____ ; BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.
BOSSA, F. & WYMAN, J. Functional properties of carboxypeptidase-
-digested hemoglobins. J. molec. Biol., 82:499-511, 1974.
- BOYER, P.D. Spectrophotometric study of reaction of protein
sulphydryl groups with organic mercurials. J. Am. chem. Soc.,
76:4331-7, 1954.
- BRAUNITZER, G. & SORGER, U. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.,
350: 405, 1969. Apud FLORKIN, M. & SCHEER, B.T., eds.
Chemical Zoology. New York, Academic, 1974. V.8, p.331-68.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI Jr., A.; GALDAMES-PORTUS, M.I.
& WILSON, M.T. Separation and characterization of the
hemoglobin components of *Pterugoplichthys pardalis*, the
acaribodo. Comp. Biochem. Physiol., 62A: 173-7, 1979.
- BURBIDGE, A.A.; KIRSCH, J.A. & MAIN, A.R. Relationships within
the Chelidae (Testudines: Pleurodira) of Australia and New
Guinea. Copeia : 392-409, 1974.
- BRYGIER, J.; De BRUIN, S.H.; Van HOOFF, M.K.B. & ROLLEMA, H.S.
The interaction of organic phosphate with human and chicken
hemoglobin. Eur. J. Biochem., 60: 379-83, 1975.

CAUGHEY, W.S.; ALBEN, J.O.; MCCOY, S.; BOYER, S.H.; CARACHE, S.
& HATHWAY, P. Differences in the infrared stretching
frequency of carbon monoxide bound to abnormal hemoglobins.
Biochemistry, 8: 59-62, 1969.

CHANUTIN, A. & CURNISH, R. Effect of organic and inorganic
phosphate on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.
Archs. Biochem. Biophys., 121: 96-102, 1967.

CHAUVET, J.P. & ACHER, R. Isolation of frog hemoglobin
(*Rana esculenta*). Purification, amino acid composition, and
terminal sequences of the α and β chain. Int. J. Protein. Res.
3: 261-9, 1971.

_____, _____ Phylogeny of hemoglobins. Chains of frog
(*Rana esculenta*) hemoglobin. Biochemistry, 11:916-27, 1972.

CHEN, B-Y ; MAO, S-H. & LIN, Y.H. Evolutionary relationships
of turtles suggested by immunological cross-reactivity of
albumins. Comp. Biochem. Physiol., 66B: 421-5, 1980.

CHIANCONE, E.; NORNE, J.E.; FORSEN, S.; ANTONINI, E. & WYMAN, J.
Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of
chloride binding to human oxy- and deoxy haemoglobin. J. molec.
Biol., 70: 675-88, 1972.

_____; GIARDINA, B.; BRUNORI, M. & ANTONINI, E. Invertebrate
hemoglobins. In: BOLIS, L. et alii., ed. Comparative Physiology,
Amsterdam, North-Holland, 1973, p.523-541.

CRADOCK-WATSON, J.E. Immunological similarity of horse, donkey and mule hemoglobins. Nature Lond., 215:630-1, 1967.

DAUHOFF, M.O., ed. Atlas of protein sequence and structure. Maryland, Silver Spring, 1976. V.5 The National Biochemical Research Foundation.

De BRUIN, S.H.; ROLLEMA, H.S.; JANSSEN, L.H.M. & Van Os, G.A.J. The interaction of 2,3-diphosphoglycerate on the human deoxy and oxyhemoglobin. Biochem. biophys. Res. Commun., 55:193-9, 1973.

_____, _____, _____ & _____ The interaction of 2,3-biphosphoglycerate with human deoxy and oxyhemoglobin. Biochem. biophys. Res. Commun., 58:204-209, 1974a.

_____, _____, _____ & _____ The interaction of chloride ions with human hemoglobin. Biochem. biophys. Res. Commun., 58: 210-5, 1974b.

DESSAUER, H.C. FOX, W. & RAMIREZ, J.R. Preliminary attempt to correlate paper electrophoretic migration of hemoglobin with phylogeny in amphibia and reptiles. Archs. Biochem. biophys., 71: 6-11, 1957.

_____, _____ & _____ Electrophoresis in taxonomic studies illustrated by analyses of blood proteins. In: LEONE, C.Q. ed. Taxonomic biochemistry and serology, New York, Ronald, 1964. p.625-647.

- _____ Blood chemistry of reptiles. In: Physiological and evolutionary aspects. In: GANS, C. Biology of Reptilia, New York 3: 1-72, Academic, 1970.
- DICKERSON, R.E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, O.B.; SAMSON, L.; COOPER, A. & MARGOLIASH, E. Ferricytochrome c. I. General features of the horse and bonito proteins at 2,8 Å⁰ resolution. J. biol. Chem., 246: 1511-35, 1971.
- DUGUET, M.; CHAUVET, J.P. & ACHER, R. Phylogeny of hemoglobins: The complete amino acid sequence of an α-chain of viper (*Vipera aspis*) hemoglobin. Febs lett., 47(2):333-7, 1974.
- HASHIMOTO, K.; YAMAGUCHI, Y & MATSUURA, F. Comparative studies on two hemoglobins of salmos. IV. Oxygen dissociation curve. Bull.Jap.Soc.Scient. Fish., 26:827-34, 1960.
- FOCESI Jr., A. ; BRUNORI, M.; BONAVENTURA, M.; WILSON, M.T. & GALDAMES-PORTUS, M.I. Effect of pH on the kinetics of oxygen and carbon monoxide reactions with hemoglobins from the air-breathing fish, *Loricarichthys*. Comp. Biochem. Physiol., 62A: 169-71, 1979.
- FRAIR, W. Turtle family relationships as determined by serological tests. In: LEONE, C.A., ed. Taxonomic biochemistry and serology. New York, Ronald, 1964, p.535-44.

_____ Taxonomic relation among Chelydrid and Kinosternid turtles elucidated by serological tests. Copeia : 97-108, 1972.

_____ ; MITTERMEIER, R.A. & PHODIN, A.G. Blood biochemistry and relations among Pondocnemis turtles (Pleurodira, Pelomedusidae). Comp. Biochem., Physiol., 61B: 139-43, 1978.

_____ Taxonomic relations among sea turtles elucidated by serological tests. Herpetologica, 35: 239-44, 1979.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Fortschr. Tuberkforsch., 7: 130, 1956.

HEIDELBERGER, M. & KENDALL, F.E. The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. J. exp. Med., 61:559, 1935.

HIGGINS, P.J. Immunochemical identify of the high and low molecular weight forms of Galapagos marine iguan hemoglobin. Comp. Biochem, Physiol., 59B: 129-32, 1978.

_____ & RAND, C.S. Comparative immunology of *Galapagos iguana* hemoglobins. J.exp. Zool., 193: 391-7, 1975.

HILSE, K. & BRAUNITZER, G. Hemoglobins. XVI: amino acid sequence of α -chains of 2 main components of carp hemoglobin. Z. phys. chem., 849: 433-50, 1968.

IMAIZUMI, K ; IMAI, K. & TYUMA, I. The linkage between of four-step binding of oxygen and binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin. J. Biochem., 86:1829-40, 1979.

INGRAN, V.M. Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. Nature Lond., 180: 326-8, 1957.

JEPPSON, J-O & SJOQUIST, J. Structural studies on genetic variants of human transferrin. Protides biol. Fluids, Proc. Colloq., 14: 87-91, 1967.

KENDREW, J.C. Structure of myoglobin - A three dimensional fourier synthesis at 2 Å⁰ resolution. Nature, Lond., 185: 422-7, 1960.

_____ ; WATSON, H.C.; STRANDBERG, B.E.; DICKERSON, R.E.; PHILIPS, D.C. & SHORE, V.C. A partial determination by X-ray methods, and its correlations with chemical data. Nature, Lond., 190:666-70, 1961.

_____ Myoglobin and the structure of proteins. Science, 131: 1259-61, 1963.

KILMARTIN, J.V. & ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO₂ combination and reduction of the Bohr effect in haemoglobin chemically modified its α-amino groups. Nature, Lond., 222:1243-46 1969.

_____ & WOOTON, J. Inhibition of Bohr effect after removal of C-terminal histidines from haemoglobin β-chains. Nature Lond., 228: 766-7, 1970.

- KILMARTIN, J.V. & HEWITT, J.A. The effect of C-terminal residues on the cooperative interactions in hemoglobin Cold. Spring Harb. Symp. quant. Biol., 36:311-4, 1971.
- _____ ; ANDERSON, N.L. & OGAWA, S. Response of the Bohr group salt bridges to ligation of the T state of hemoglobin Kansas. J. molec. Biol., 123: 71-87, 1978.
- _____ ; FOGG, J.H. & PERUTZ, M.F. Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. Biochemistry, 19: 3189-3193, 1980.
- LKB, ampholine 8100. Elektrofocusing equipment; instruction manual. Sweden, 1976. 47p.
- LYKAKIS, J.J. Serological and immunological comparison of turtle blood protein: serum protein and hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 39B : 83-8, 1971.
- _____ A phylogenetic study on the turtle hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 48B: 231-40, 1974.
- MAO, S-H.; DESSAUER, H.C. & CHEN, B-Y. Fingerprint correspondence of hemoglobins and the relationships of sea snakes. Comp. Biochem. Physiol., 59B: 353-61, 1978.
- MANSOURI, A. Oxidation of human hemoglobin by sodium nitrite. Effect of β -93 thiol groups. Biochem. biophys. Res. Commun., 89: 441-7, 1979.

- MATTHEW, J.B.; HANANIA, G.I.H. & CURD, F.R.N. Electrostatic effects in hemoglobin: hydrogen ion equilibria in human deoxy and oxyhemoglobin A. Biochemistry, 18: 1919-28, 1979.
- _____ ; _____ & _____ Electrostatic effects in hemoglobins: Bohr effect and ionic strength dependence of individual groups. Biochemistry, 18: 1928-36, 1979.
- MEIRELLES, Nilce C. Estudos sobre hemoglobinas de *Pipa carvalhoi*. Campinas, 1975. 73p. (Tese-Doutoramento) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- MERZ, D.C.; GOOD, R.A. & LITMAN, G.W. Segregation of membrane components using isoelectric focusing in polyacrilamide gels. Biochem. biophys. Res. Commun., 49: 84-91, 1972.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEAUX, J.P. On the nature of allosteric transitions; a plausible model. J. molec. Biol., 12: 88-118, 1965.
- MUIRHEAD, H. & GREER, J. Three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhemoglobin at 3,5 Å⁰ resolution. Nature Lond., 228: 516-9, 1970.
- NEIL, W.T. Viviparity in snakes: some ecological and zoogeographical considerations. Am. Nat., 98 (898): 35-55, 1964.
- NOBLE, R.W.; REICHLIN, M. & GIBSON, Q.H. The reactions of antibodies with hemeprotein antigens; the measurement of reaction kinetics and stoichiometry by fluorescence quenching. J. biol. Chem., 244: 2403-11, 1969.

- NOLAN, C. & MARGOLIASH, E. Comparative aspects of primary structures of proteins. A. Rev. Biochem., 37: 727-90, 1968.
- OGO, Satie, H.; ABE, A.S. & FOCESI Jr., A. Oxygen dissociation constants in haemoglobins of *H. modestus* and *L. miliaris*, two water-snakes with different morphological adaptations to the aquatic environment. Comp. Biochem. Physiol., 63A:285-9, 1979.
- _____ & FOCESI Jr., A. Haemoglobin Bohr effect and lactic acid content of the blood of 2 water-snakes with different degrees of aquatic adaptation. Experientia, 35: 862-31, 1979.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allerg., 5: 78, 1958.
- PADLAN, E.A. & LOVE, W.E. Structure of the hemoglobin of the marine annelid worm, *Glicera dibranchiata* at 5,5 Å⁰ resolution. Nature Lond., 220: 376-9, 1968.
- PALEŮS, S.; VESTERBERG, O. & LILJEQVIST, G. The hemoglobins of *Myxine glutinosa* L.I. Preparation and crystallization. Comp. Biochem. Physiol., 39B: 551-7, 1971.
- PERUTZ, M.F. Structure and function haemoglobin. I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. J. molec. Biol., 13: 646-68, 1965.
- PERUTZ, M.F. ; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.G.; MATHEWS, F.H.; MCGANDY, E.L. & WEBB, L.E. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2,8 Å⁰ resolution: (1) X-ray analysis. Nature Lond., 219: 29-32, 1968.

- PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature Lond., 22: 726-39, 1970.
- PERUTZ, M.F.; PUSINELLI, P.D.; TENNEYCK, L.F.; KILMARTIN, J.V. SHIBATA, S.; IUCHI, I.; MIYAJI, T. & HAMILTON, H.B. Haemoglobin Hiroshima and the mechanism of alkaline Bohr effect. Nature, Lond., 232: 147-9, 1971.
- PISANO, J.J. & BRONZERT, T.J. Analysis of amino acid phenylthiohydantoins by gas chromatography. J. biol. Chem., 244: 5597-607, 1969.
- POUGH, F.H. Environment adaptations in the blood of lizards. Comp. Biochem. Physiol., 31: 885-901, 1969.
- _____ Ontogenetic changes in molecular and functional properties of blood garter snakes, *Thamnophis sirtalis*. J.exp. Zool. 204: 47-55, 1977
- _____ Ontogenetic changes in oxygen transport properties of blood of garter snakes, *Thamnophis sirtalis*. Am. Zool., 11: 657, 1971.
- POYART, C. BURSAUX, E. BOHN, B. & GUESNON, P. The involvement of tertiary conformational changes and the role of the α chain-binding sites on oxygen-linked chloride release from human hemoglobin. Biochim. biophys. Acta, 626: 417-23, 1980.
- PRAGER, E.M. & WILSON, A.C. The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Micro-complement fixation studies. J. biol. Chem., 257: 5974-89, 1971.

REICHLIN, M. HAY, M. & LEVINE, L. Immunochemical studies of hemoglobin and myoglobin and their globin moities.

Biochemistry, 2 (5): 971-9, 1963.

_____ ; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; WYMAN, J.; ANTONINI, E.; Iopollo, C. & ROSSI-FANELLI, A. The properties and interactions of the isolated and α -chain of human hemoglobin.

IV. Immunological studies involving antibodies against the isolated chains. J. molec. Biol., 17: 18-28, 1966a.

_____ ; FOGEL, S; NISONOFF, A. & MARGOLIASH, E. Antibodies against cytochromics from vertebrates. J. biol. Chem., 241: 251-3, 1966b.

_____ ; The distribution of specificity in rabbit antisera directed toward human hemoglobin. Immunochemistry, 7:15-27, 1970.

_____ Quantitative immunological studies on single amino acid substitution in human hemoglobin: demonstration of specific antibodies to multiple sites. Immunochemistry, 11: 21-27, 1974.

_____ Amino acid substitution and antigenicity of globular proteins. Adv. Immunol., 20: 71-119, 1975.

REISHL, E. & DIFENBACH, C.O. Heterogeneity and polymerization of hemoglobins of *Caiman latirostris* (Crocodylia:Reptilia). Comp. Biochem. Physiol., 54B: 543-545, 1976.

RIGGS, A. Molecular adaptation in hemoglobins: Nature of the Bohr effect. Nature, Lond. 183: 1037-8, 1959.

_____ The nature and significance of the Bohr effect in mammalian hemoglobin. J. Gen. Physiol., 43: 737-52, 1960.

_____ The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect upon the oxygen equilibrium. J. biol. Chem., 236: 1948-54, 1961.

_____ The relation between structure and function in hemoglobins. Can. J. Biochem., 42: 763, 1964.

_____ Functional properties of hemoglobins. Physiol. Rev., 45: 619-73, 1965.

_____ Properties of fish hemoglobins. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J., ed., New York, Academic, 1970, V. 9, p. 209-251.

_____ Factors in the evolution of hemoglobin function. Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol., 35: 2115-8, 1976.

ROLLEMA, H.S.; De BRUIN, S.H.; JANSSEN, L.H.M. & Van Os, G.A.J. The effect of potassium chloride on the Bohr effect of human hemoglobin. J. molec. Biol., 250: 133-9, 1975.

ROMER, A. vertebrate Paleontology. 39. Chicago, Univ. Chicago, 1966.

- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the structural of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin. Biochim. biophys. Acta., 30:608, 1958.
- RUSSU, Irene M. ; HO, N.T. & HO, C. Role of the 6146 histidyl residue in the alkaline Bohr effect hemoglobin. Biochemistry, 19: 1043-52, 1980.
- SANNES, Lucy J. & HULTQUIST, D.E. The basis for EDTA-stimulation of methemoglobin reduction in hemolysates of human erythrocytes. Biochem. biophys. Res. Commun., 91(4):1309-13, 1979.
- SHINKA, S. ; IMANISHI, M. ; MIYAGAWA, T. ; AMANO, M. INOUE, M. & TSUGITA, A. Chemical studies on the antigenic determinants of egg white lysozyme. Biken.J., 10:89-107, 1967.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analyt. Chem., 30:1190, 1958.
- SULLIVAN, B. Oxygenation properties of snake hemoglobin. Science, 157:1308-10, 1967.
- _____ & RIGGS, A. The subunits dissociation properties of turtle hemoglobins. Biochim. biophys. Acta, 140:274-83, 1967.
- _____ & _____ Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. II. Electrophoretic studies. Comp. Biochem. Physiol., 23:449-58, 1967.
- _____ Amphibian hemoglobins. In: FLORKIN, M. & SCHEEN, B.ed. New York, Academic, 1974a. V.9, cap.5, p.77-118.

- _____ Reptilian hemoglobin. In: FLORKIN, M. & SCHEER, B. ed.
New York, Academic, 1974b, v.9, cap.14, p.353-374.
- SNOW, N.S. Some observation on the reactive sulphydryl group
in haemoglobin. Biochem. J., 84: 360-4, 1962.
- SVERDBERG, T. & HEDENIUS, A. The sedimentation constant of the
respiratory proteins. Biol. Bull., 66:191-223, 1934.
- TAN-WILSON, A.L.; REICHLIN, M; BRUNORI, M. & Noble, R.W. The
virtual absence of antigenic cross-reactivity between
functionally distinct trout hemoglobins. Eur. J. Biochem.,
71: 125-9, 1976.
- TRADER, C.D. & FRIDEN, E. Dimerization and other chemical
changes in amphibian hemoglobins during metamorphosis. J.
biol. Chem. 241: 357-66, 1966.
- TUCKER, P.W.; PHILLIPS, S.E.V.; PERUTZ, M.F.; HOUTCHEN, R. &
CAUGHEY, W.S. Structure of hemoglobin Zurich (His E7(63) β Arg)
and Sydney (Val E11(77) β Ala) and role of distal residues
in ligand binding. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 75(3):1076-80,
1978.
- Van BEEK, G.G.M.; ZUIDERWEG, E.R.P & De Bruin, S.H. The
binding of D-glycerate 2,3-biphosphate to deoxyhemoglobin and
oxyhemoglobin. Eur. J. Biochem., 100:497-502, 1979b.

- _____ & _____ Identification of the residues involved in the oxygen-linked chloride-ions binding sites in human deoxyhemoglobin and oxyhemoglobin. Eur. J. Biochem., 105: 353-60, 1980.
- VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, H.F.; MEIRELLES, Nilce C. & FOCESI Jr., A. *Pipa carvalhoi* haemoglobin. VI. Comparative serological studies with terrestrial amphibia haemoglobin. IRCS. med. Sci., 9:50-1, 1981.
- WATT, K. & RIGGS, A. Hemoglobins of tadpole of the bulfrog, *Rana catesbeiana*. Structure and function of isolated components. J. biol. Chem., 50(15): 5934-44, 1975.
- YOUNG, N.S.; EASTLAKE, A & SCHECHETER, A.N. The NH₂-terminal region of the sickle hemoglobin β -chain. II. Characterization of monospecific antibodies. J. biol. Chem., 251: 6431-8, 1976.
- ZITO, R ; ANTONINI, E. & WYMAN, J. The effect of oxygenation of the rate of digestion of human hemoglobin by carboxypeptidase. J. biol. Chem., 239(6): 1804-8, 1964.