

HÉLIO FROTA VIEIRA †

PROPRIEDADES FUNCIONAIS E CONFORMACIONAIS DE HEMOGLOBINAS  
DE *Pipa pipae*

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

Orientador: †  
Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

Campinas

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*A minha mãe*

*Laise*

*Cássio e Daniel*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr., pelo incentivo, apoio e orientação constante durante todo período de realização deste trabalho.

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

Ao Prof. Dr. Rodolfo Hoffmann da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, pela programação e computação dos dados necessários para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Luis Scaff, Diretor do Museu Paranaense Emílio Goeldi, Belém-Pa, pela gentileza de nos enviar os exemplares de Pipa pipae utilizados para a execução deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Arno R. Schwantes, Marcel Tabak, Metry Bacila e Nilce C. Meirelles, pelas correções e sugestões dadas ao presente trabalho.

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

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Paulo Elpidio Menezes Neto e ao Departamento de

Análises Clínicas e Toxicológicas na pessoa dos Profs. Dr. Eurico Litton de Freitas e José Borges Sales, que nos permitiram a realização da presente tese.

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

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica que de diversas maneiras nos ajudaram.

A Srta. Maria Luiza de Souza, Srta. Mirian Elizande da Silva e Sra. Irene Malaguti Semionatto Scuro, pelo esmero e dedicação no trabalho datilográfico.

## ÍNDICE

Página

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	18
Material biológico .....	18
Preparação do hemolisado .....	18
Eletroforese em gel de amido .....	19
Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	20
Separação dos componentes por cromatografia de troca iônica .....	22
Cromatografia em DEAE-Sephadex .....	22
Cromatografia em CM-Celulose .....	22
Estimativa do peso molecular .....	24
Preparo de amostras isentas de cofatores e concentração de material .....	25
Equilíbrio da hemoglobina com oxigênio .....	26
Preparo e titulação de solução de CO .....	27
Determinação da curva de equilíbrio da reação das he- moglobinas com monóxido de carbono .....	30
Determinação do efeito Bohr .....	31
Cinética da reação de deslocamento do CO por ferricia- neto .....	32

Cinética de desnaturação das hemoglobinas por benzoato de sódio e uréia .....	34
Desnaturação por solução de dodecilsulfato de sódio a 0,1% .....	35
Estimativa dos parâmetros no esquema de Adair e no modelo M.W.C. ....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	41
Separação dos componentes de hemoglobina de <u>Pipa pipae</u> por eletroforese .....	41
Separação dos componentes por cromatografia de troca iônica .....	43
Filtração em gel .....	45
Equilíbrio de oxigenação do hemolisado e das reações..	
Efeito Bohr .....	45
Equilíbrio da ligação do hemolisado e dos componentes com monóxido de carbono .....	47
Efeito Bohr do hemolisado dos componentes utilizando - CO como ligante .....	53
Cinética da reação de deslocamento do CO por ferriciana- neto na carboxihemoglobina .....	53
Cinética da desnaturação por uréia e benzoato .....	58

Desnaturaçãõ da oxi e deoxihemoglobina por dodecil sul	
fato de sódio .....	59
Parâmetros do esquema de Adair e do modelo MWC .....	61
DISCUSSÃO .....	68
RESUMO .....	83
SUMMARY .....	85
BIBLIOGRAFIA .....	87

## INTRODUÇÃO

A habilidade da hemoglobina como transportadora do oxigênio para os tecidos é controlada por uma série de fatores ditos homotrópicos ou heterotrópicos, por exemplo, a cooperatividade e o efeito Bohr. Esta capacidade de transporte pode ser estudada com finalidade de se esclarecer correlações funcionais e estruturais; quando esta hemoproteína se acha ligada ou não a um ligante específico. Foi de nosso interesse o estudo dos estágios intermediários de saturação que nos podem fornecer um novo aspecto desta correlação.

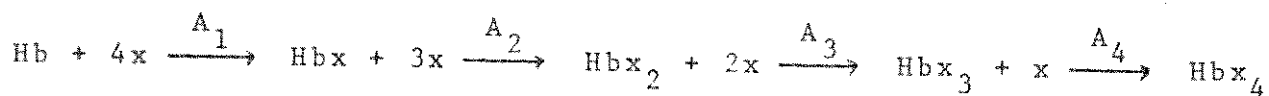
As propriedades das estruturas dos estágios intermediários do processo de reação com o ligante, contudo, exigem estudos mais complexos e aprofundados, geralmente utilizando parâmetros aferidos em função das formas oxi e deoxihemoglobina. Tais parâmetros podem ser relacionados: i) medidas da afinidade da molécula pelo ligante gasoso descrita como  $P_{50}$ . ii) avaliação da cooperatividade da molécula pelo ligante através do valor de  $n$  (plot de Hill). iii) evidenciação da ação de moduladores alostéricos através da alteração do valor de  $P_{50}$  e iv) medidas da afinidade da molécula pelo ligante CO aferida pelo valor de  $C_{50}$ .

O estudo das propriedades e da estrutura baseado nos estágios intermediários da reação da molécula com o ligante podem ser efetuados através de modelos propostos, uma vez que essas propriedades não são passíveis de serem medidas ou mesmo observadas



experimentalmente, como por exemplo as diferentes formas de estrutura quaternária existentes em equilíbrio na solução de hemoglobinas. Deste modo as propriedades que podem ser avaliadas pela reação do ligante na forma não ligada são estudadas através da saturação fracional da molécula pelo ligante. Nesses experimentos é calculado a pressão do ligante necessária para saturar uma fração ( $\bar{y}$ ) da molécula.

É conhecido o fato de ser molécula de hemoglobina constituída de 4 subunidade e que em cada subunidade existe um sítio para o ligante o que pode ser representado de acordo com Adair (1925) pela seguinte expressão:



Essa representação é termodinamicamente exata quando se considera que as quatro subunidades (passos) são associadas e não idênticas. As quatro constantes (constantes de Adair) são dadas pelas expressões:

$$A_1 = \frac{[\text{Hbx}]}{[\text{Hb}][p]}; \quad A_2 = \frac{[\text{Hbx}_2]}{[\text{Hbx}][p]}; \quad A_3 = \frac{[\text{Hbx}_3]}{[\text{Hbx}_2][p]} \quad \text{e} \quad A_4 = \frac{[\text{Hbx}_4]}{[\text{Hbx}_3][p]}$$

Sendo  $p$  = pressão do ligante.

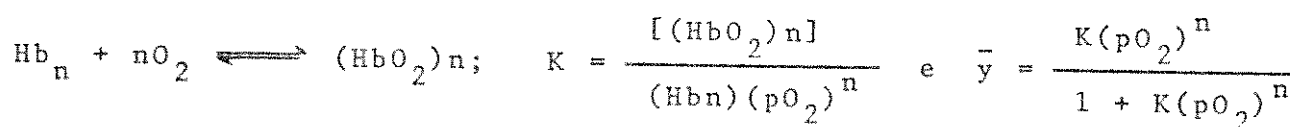
As constantes de Adair estão relacionadas às constantes de associação dos sucessivos estágios de ligação ( $A$ ) e representam

o produto da constante intrínseca de associação ( $A'$  ou  $K$ ) do ligante à molécula por um fator estatístico calculado pela probabilidade de  $x$  se ligar a um sítio livre. A curva de equilíbrio da reação hemoglobina-ligante é dada pela equação:

$$\bar{y} = \frac{A'_1 p + 3A'_1 A'_2 p^2 + 3A'_1 A'_2 A'_3 p^3 + A'_1 A'_2 A'_3 A'_4 p^4}{(1 + 4A'_1 p + 6A'_1 A'_2 p^2 + 4A'_1 A'_2 A'_3 p^3 + A'_1 A'_2 A'_3 A'_4 p^4)}$$

onde,  $\bar{y}$  é saturação fracionada da molécula e  $p$  = pressão do ligante  $x$ .

A reação de equilíbrio ( $\bar{y} = f(p)$ ) mostra uma curva sigmoide onde a última molécula do ligante a se combinar com a hemoglobina apresenta uma afinidade maior que a do primeiro, isto é, a combinação do primeiro ligante facilita a ligação dos demais, mostrando ser essa uma reação cooperativa pela interação dos sítios de ligação. Essa cooperatividade foi descrita por Hill (1910) que propôs ser a hemoglobina uma forma polimérica onde mais de uma molécula do ligante (oxigênio) reage com uma molécula da proteína. Essa hipótese foi baseada em experimentos que mostravam uma curva hiperbólica na reação hemoglobina-oxigênio (Barcroft & Roberts, 1909). O equilíbrio dessa reação foi descrito como uma reação de enésima ordem, (Hill, 1910) isto é:



O significado físico dessa equação perdeu consistência quando foi constatado ser a hemoglobina um tetrâmero (Adair, 1923) e não um polímero e que o equilíbrio não se tratava de uma reação de enésima ordem (Hartridge & Roughton, 1925). Hoje o valor de  $n$  (coeficiente de Hill) é, apesar destas considerações, uma medida de grande importância para se avaliar a interação heme-heme (cooperatividade).

A curva sigmoide descrita por  $\bar{y} = f(x)$  foi demonstrada, por deduções matemáticas, ser simétrica (Wyman, 1948) e essa simetria foi constatada experimentalmente por Wyman & Allen (1951) trabalhando com hemoglobina humana. Esses dados são contradizentes com os dados de Courtice & Douglas (1947) e de Forbes & Roughton (1931) que mostram assimetria na curva de equilíbrio da hemoglobina humana e na de carneiro, respectivamente. Esses dados de assimetria foram discutidos por Allen et alii (1950) baseados nos estudos cristalográficos da hemoglobina (Perutz, 1949) onde a orientação dos grupos heme na molécula é que determina o equilíbrio de oxigenação. Os dados de assimetria foram explicados como alterações estruturais ocorridas devido ao fator tempo, pois Courtice trabalhou com hemoglobina estocada há dias, e ao fator diluição, pois Forbes trabalhou com hemoglobina muito diluída.

A simetria da curva de equilíbrio hemoglobina-ligante permite determinar o valor de  $P_m$  (Wyman, 1964) que corresponde à pressão média do ligante. O valor de  $P_m$  em termos da constante de Adair é dado por:

$$\frac{1}{P_m^4} = A_1' A_2' A_3' A_4'$$

Esse valor fornece uma medida simples da energia livre de combinação ou seja, a mudança da energia livre total das formas não ligadas e saturada. A energia livre de combinação por sítio é dada por:

$$\Delta F_1 = -RT \ln P_m$$

Em função da simetria da curva de equilíbrio, Wyman (1964) propõe o uso do logito  $y/1-y$  baseado no fato de  $\bar{y} \rightarrow 0$  quando  $x = 0$  e  $\bar{y} \rightarrow 1$  quando  $x \rightarrow \infty$ . A função exponencial de  $\bar{y}/1-\bar{y} = f(\log p)$  pode ser tratada como uma função linear quando se registra  $\log \frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} = f'(\log P)$ . Nesse caso o valor de  $\underline{n}$  é dado por:

$$n = \frac{d \log \left( \frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \right)}{d \log x}$$

baseado na equação de Hill (1910) onde  $\bar{y} = \frac{Ky^n}{1-Kp^n}$  ou  $\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} = Kp^n$

Essa apresentação de  $\log \frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} / \log p$  é conhecida como plot de Hill e possibilita calcular os valores de  $\underline{n}$  e  $P_{50}$  (pressão necessária para saturar 50% das moléculas) sem mesmo ser necessário estimar muitos valores de  $\bar{y}$ , isto é, quando todos os valores de  $\bar{y}$  obtidos estiverem próximos de 0,5.

A função  $\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}}$  quando analisada pela constante de Adair (1925) mostra  $\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \longrightarrow A'_1 p$  quando p é muito pequeno e  $\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \longrightarrow A'_4 p$  quando p é muito alto, isto é, uma assíntota da tangente  $45^\circ = 1$  que passa pelos valores de p próximo a zero intercepta o eixo das abscissas em  $\log A_1$  e a assíntota tangente de p próximo a uma intercepção a abscissa em  $-\log A'_4$ . A energia livre de combinação do ligante é dada por:

$$\Delta F_1 = -RT \log A'_1 + RT \log A'_4$$

O valor de  $P_{50}$  expresso pela equação de Adair (1925) é:

$$1 + 2A'_1 P_{50} = 2A'_1 A'_2 A'_3 P_{50}^3 + A'_1 A'_2 A'_3 A'_4 P_{50}^4 \quad \text{ou}$$

$$P_{50} = \frac{1}{A'} \quad \text{ou seja,} \quad \frac{1}{P_{50}^4} = A'_1 A'_2 A'_3 A'_4$$

que equivale dizer que  $P_{50} = P_m$  (Wyman, 1967), assumindo-se que a curva de equilíbrio é simétrica.

Na prática  $P_{50}$  e  $P_m$  mostram valores bastante próximos como foi encontrado na hemoglobina humana em tampão bis-tris + NaCl 0,1M, pH 7,4, ai,  $\log P_{50} = 0,763$  e  $\log P_m = 0,737$  (Tyuma et alii, 1973a) enquanto que na hemoglobina humana em tampão bis-tris, pH 7,0 na presença de DPG mostrou  $\log P_{50} = 1,693$  e  $\log P_m = 1,643$  (Imai, 1974). As diferenças encontradas na prática são desprezíveis e a igualdade dos valores de  $P_{50}$  e  $P_m$  são discutidos, matematicamente, por Wyman (1964 e 1967).

Na presença de efetores alostéricos, como os fosfatos orgânicos, as alterações que ocorrem nos estágios de ligação do ligante à molécula, mostram que é  $A_1'$  que se modifica mais (Tyuma et alii, 1973a). No último estágio de ligação o efeito dos fosfatos torna-se imperceptível, pois  $A_4'$  não é alterado na presença ou ausência do efector (Gibson, 1970) e como sugere Salhany et alii (1972), na presença de efetores alostéricos, a estrutura quaternária da proteína na forma  $HbX_3$  é a mesma da molécula saturada.

O valor de  $P_m$  na presença de efetores sofre acréscimos. A expressão matemática para  $\log P_m$ , DPG (Baldwin, 1975) é dada por:

$$\log P_m, \text{ DPG} = \log P_m + \frac{1}{4} \left[ (\log (1 + B_0 (\text{DPG}))) - \log (1 + B_4 (\text{DPB})) \right]$$

onde  $B_0$  = constante de associação do DPG na hemoglobina não ligada e  $B_4$  = constante de associação do DPG na hemoglobina saturada.

Essa expressão é encontrada, assumindo-se que a ligação do efector se faz na proporção de 1 mol de efector para 1 mol de proteína (tetrâmero) e que a concentração do efector é constante no processo de ligação hemoglobina-ligante.

A relação que se pode obter do traçado sigmoide da curva de equilíbrio da hemoglobina com um ligante e de estrutura da hemoglobina que foi bastante elucidada pelos estudos cristalográficos de Perutz (1949) e Perutz et alii (1960 e 1964) levou Monod et alii (1965) a propor um modelo para explicar as alterações estru-

turais que ocorrem nos estágios intermediários da reação da molécula com o ligante. Esse modelo, denominado pelos autores de Modelo Alostérico (do grego, alos= outro; stero= sólido) também conhecido como Modelo MWC (Monod, Wyman, Changeux) mostra os estágios de transição que a molécula pode assumir durante a transformação da forma não ligada à forma saturada pelo ligante.

O modelo MWC baseia-se em dois tipos de efeitos alostéricos: homotrôpicos e heterotrôpicos (Wyman, 1963) que são definidos como interação entre ligantes idênticos, ou inter-cadeia (homotrôpicos) e interações entre ligantes diferentes, ou da proteína com outras moléculas (heterotrôpicos) que ocorre em proteínas alostéricas envolvendo, geralmente, estrutura quaternária.

As subunidades da molécula de hemoglobina estão associadas com duas diferentes estruturas quaternárias e essas duas formas se mantêm em equilíbrio em todos os estágios de ligação. Elas diferem na maneira de ligar uma subunidade na outra, condicionando a uma das formas uma maior facilidade de se ligar ao ligante (alta afinidade) e a outra forma fica condicionada a uma baixa afinidade. Essas duas formas de estrutura quaternária da hemoglobina foram denominadas forma T (tensa) e forma R (relaxada). A forma T é a de baixa afinidade pelo ligante sendo então a forma mais estável das moléculas quando não ligada. A forma R, de maior afinidade, é a forma mais estável para as moléculas ligadas. A existência dessas duas formas e o deslocamento do equilíbrio entre elas na presença do ligante é que favorecem a cooperatividade

(Rubin & Changeux, 1966). A cooperatividade é máxima quando o máximo de moléculas na forma T é convertida ao máximo de moléculas na forma R pela adição do ligante, isto é, quando não ligada as moléculas de hemoglobina estão na forma T e quanto são saturadas se convertem ao máximo na forma R.

Quando o equilíbrio é sempre favorável à forma R ou à forma T, de acordo com o modelo, não haverá mudança na estrutura quaternária, impossibilitando o fenômeno de cooperatividade. A necessidade de mudanças na estrutura quaternária, como condição para haver cooperatividade também foi demonstrada com base na estrutura da molécula (Perutz, 1970).

A não cooperatividade apresentada por algumas hemoglobinas anormais e modificadas mostram também não haver nenhuma alteração de estrutura quaternária durante a reação com o ligante. Assim, hemoglobina Yakima (Novy et alii, 1967) hemoglobina de cavalo BME Hb (Simon et alii, 1971) NES (Kilmartin & Hewitt, 1971) mostram  $n$  em torno de 1 indicando ausência de cooperatividade. Essa não cooperatividade já foi analisada, em algumas dessas hemoglobinas, como sendo consequência da estabilização dessas moléculas em uma das forma T ou R tanto na forma saturada como na ausência do ligante. Assim, por exemplo Hb BME de cavalo permanece na forma R mesmo quando deoxigenada (Perutz, 1970) e Hb (C Pase) humana é estabilizada na forma T (Imai, 1973).

A forma T é pois caracterizada pela baixa afinidade pelo ligante, o que pode ser explicado pela posição do átomo de ferro no grupo heme. O ferro



fica deslocado do plano de  $0,75 \text{ \AA}$  (Bolton & Perutz, 1970) isto é, fora do plano do heme que contribui para aumentar a distância His F8-Fe. Esta estrutura é mantida pelos contatos existentes entre essa cadeia e as demais. A baixa afinidade também é condicionada pelo reduzido tamanho da cavidade que aloja o grupo heme, dificultando a entrada do ligante na molécula da hemoglobina (Perutz, 1970). A afinidade de cada sub-unidade do tetrâmero é menor que a afinidade de uma cadeia isolada. Essa alteração da afinidade na cadeia do tetrâmero é explicada pelo fato da distância ferro-heme ser maior devida a posição da histidina proximal. Essa distância (His-heme), no tetrâmero, é de  $2,8 \text{ \AA}$  (Bolton & Perutz, 1970) e de  $2,5 \text{ \AA}$  (Fermi, 1975) nas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ).

A forma R, por sua vez, mostra a estrutura terciária de suas subunidades idênticas às estruturas das cadeias isoladas (Perutz et alii, 1974), isto é, com ferro próximo ao grupo do heme ( $0,3$  a  $0,4 \text{ \AA}$ ) (Watson & Nobbs, 1978) e a alta afinidade pelo ligante.

A transição da forma T para forma R ocorre quando a molécula na forma T recebe o ligante. A reação com o ligante provoca o deslocamento do ferro que estava fora do plano do heme para mais próximo desse plano. O deslocamento do ferro, por sua vez, provoca uma atração na histidina da cadeia peptídica, onde ele está coordenado, induzindo movimento na subunidade protéica. Esse movimento provoca alteração de estrutura terciária, induz alteração na estrutura quaternária. Com isso, há uma diminuição na rigidez da estrutura quaternária que mantinha as demais subunidades com baixa afinidade pelo ligante, isto é, com o ferro deslocado do plano do heme. Em outras palavras, a molécula passa da forma T para a forma R.

Nesse processo, a transição de T para R implica na tran

sição de cada uma das subunidades da forma T para R, pois no modelo alostérico as formas intermediárias da hemoglobina são  $T_1 T_2 T_3 T_4$  e  $R_1 R_2 R_3$  e  $R_4$ . Na presença do ligante a forma R é a forma mais estável onde as subunidades ficam associadas no tetrâmero com a mesma estrutura terciária das cadeias livres e sem o ligante é a forma T a mais estável devido aos pontos de contacto entre as sub-unidades que mantêm cada sub-unidade com baixa afinidade. A reação de um ligante a um heme de uma cadeia não implica, obrigatoriamente, na transição de T para R porém favorece a estabilidade maior para R.

Pelo modelo MWC pode-se afirmar que as formas T e R coexistem na mesma solução, independentemente da existência ou não do ligante, isto é, na hemoglobina não ligada a estabilidade da forma T é maior, porém a presença da forma R é possível e na hemoglobina saturada a forma R é a mais estável o que não impede a existência de moléculas na forma T.

O equilíbrio das duas formas pode ser expresso pela constante de equilíbrio conformacional (L) que é dada por:

$$L = \frac{T_o}{R_o} \quad \text{quando } T_o \rightleftharpoons R_o$$

Outros parâmetros do modelo MWC são estimados por c (razão das constantes de dissociação e associação do ligante) expresso por:

$$c = \frac{K_T}{K_R}$$

As constantes intrínsecas de associação do ligante (Adair, 1925) podem ser expressas para cada estágio ou ligação por:

$$A'_1 = \frac{1(Lc+1)}{K_R(L+1)} ; A'_2 = \frac{1(Lc^2+1)}{K_R(Lc+1)} ; A'_3 = \frac{1(Lc^3+1)}{K_R(Lc^2+1)} ; A'_4 = \frac{1(Lc^4+1)}{K_R(Lc^3+1)}$$

A atividade média do ligante (Pm) pela equação de Adair é dada por:  $Pm = \frac{1}{A'_1 A'_2 A'_3 A'_4}$ , que por substituição pode ser expresso por:

$$Pm = K_R^4 \left( \frac{1+L}{1+Lc} \right)$$

A diferença de energia livre de ligação do primeiro ao último ligante é dada por:

$$\Delta F = -RT \log \frac{(1+Lc^4)(1-L)}{(1+Lc^3)(1+L)}$$

e  $P_{50}$  é dado pela equação:  $P_{50} = \delta_{50} K_R$  sendo que  $\delta_{50}$  é dado pela equação:

$$L = \frac{(\delta_{50}-1)(1+\delta_{50})^3}{(1-\delta_{50})(1+\delta_{50}c)^3}$$

$$n = 1 + \frac{3(1 - c\delta_{50}) (\delta_{50}^- - 1)}{(1 + c\delta_{50}) (\delta_{50}^+ + 1)}$$

Assim, temos que quando  $L$  é muito grande  $Lc^4$  torna-se, também muito grande e as moléculas permanecem na forma T mesmo quando ligadas e quando  $L$  é muito pequeno as moléculas ficam na forma R mesmo que não ligadas. Nesses casos o valor de  $n$  tende a 1 (não há cooperatividade) e o  $\Delta F$  tende a ser nulo.

Os efetores alostéricos como DPG, ATP, IHP são capazes de se ligar mais facilmente a forma T (Rubim & Changeaux, 1966). Essas substâncias têm alta afinidade pela forma T e baixa afinidade pela forma R. Sendo  $B_T$  a constante de ligação do efector na forma T da molécula, a concentração total de moléculas na forma T é dada por:

$$T'_O = T_O (1 + B_T x)$$

sendo:  $T'_O$  = total de moléculas na forma T

$T_O$  = moléculas na forma T, livres do efector

$x$  = moléculas do efector livre

e ainda:

$$R'_O = R_O (1 + B_R x)$$

Deste modo podemos obter:

$$L' = \frac{T'_O}{R'_O} = L \frac{(1 + B_T x)}{(1 + B_R x)} \quad \text{ou}$$

$$\log L' = \log L + \log (1 + B_T x) - \log (1 + B_R x)$$

Na presença do efetor alostérico, quando  $L' > L$  a cooperatividade aumenta e o valor de  $K_R$  tende a diminuir quando  $P_{50}$  diminui, ou  $K_R$  aumenta quando  $P_{50}$  aumenta. Assim, na presença do efetor alostérico, quando há mudança na afinidade da molécula pelo ligante, o equilíbrio das formas R e T é alterado, isto é,  $L$  e  $c$  são alterados (Herfeld & Stanley, 1972).

O equilíbrio da hemoglobina com o ligante estudado quer pelos parâmetros de Adair quer pelo modelo alostérico, fornece informações da reação dessa molécula pelo ligante. Essas reações ocorrem obedecendo as dimensões já descritas, variando apenas os valores absolutos quando diferentes ligantes são experimentados. Em outras palavras, diferentes ligantes são capazes de se ligar ao ferro do grupo heme da hemoglobina obedecendo sempre os princípios da termodinâmica expressos na equação de Adair (1925) ou nos conceitos de transição da estrutura quaternária propostos por Monod et alii (1965).

O ligante mais estudado tem sido o oxigênio principalmente por ser o mais fisiológico. Porém outros ligantes como o monóxido de carbono tem sido objeto de estudo devido a sua alta afinidade apresentada pela proteína por esse ligante como também pelo interesse que possa ter em implicações ecológicas dada a sua competição com o oxigênio.

A ligação do monóxido de carbono à hemoglobina se faz

através do átomo de ferro ao grupo heme. Essa interação é uma ligação covalente, bastante estável. A equação geral da reação hemoglobina monóxido de carbono pode ser escrita como:



O estudo da curva de equilíbrio dessa reação é dificultado devido a alta afinidade da molécula pelo ligante. Os primeiros trabalhos realizados (Douglas et alii, 1912) utilizando sangue humano mostrou a alta afinidade quando comparado com a reação do oxigênio. Posteriormente foram realizados trabalhos que avaliaram a afinidade da hemoglobina humana visando  $P_{1/2}$  como parâmetro. O valor de  $P_{1/2}$  observado foi de 0,15 a 0,085 mm de Hg nos pHs 7,15 e 7,5 (Joels & Pugh, 1958) respectivamente, mostrando uma reatividade de aproximadamente 240 vezes maior que pelo oxigênio. Por método espectrofotométrico Anderson & Antonini (1968) utilizando baixas concentrações de hemoglobina (na ordem de  $10^{-6}\text{M}$ ) mostraram que os valores de  $C_{50}$  (concentração de CO suficiente para saturar 50% das moléculas de hemoglobina) variavam de 4,3 a  $5,6 \times 10^{-8}\text{M}$  na hemoglobina humana em tampão fosfato 0,1M pH 7,0.

O efeito Bohr utilizando-se o monóxido de carbono como ligante foi mostrado ser o mesmo que o apresentado pelo ligante  $\text{O}_2$  (Antonini et alii, 1963) dentro da faixa estudada de pH (de 5 a 10) para hemoglobina de mamíferos. Para outras espécies, não mamíferos, foi observado uma alteração na magnitude do

efeito Bohr quando comparado com o produzido pelo  $O_2$ , porém o aspecto do gráfico ( $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ ) permanecia idêntico. Esses dados são bastante evidentes em hemoglobinas de peixes (Brunori, 1966).

Outro fato que justifica o estudo com o ligante CO é a possibilidade de se obter dados cinéticos da dissociação e associação desse ligante através de reações de cinética rápida (stop flow) ou mesmo cinética de dissociação do ligante por reação de deslocamento.

O objetivo da presente tese foi caracterizar as hemoglobinas de Pipa pipae estudando suas propriedades funcionais e avaliar algumas características de sua estrutura notadamente o equilíbrio entre as formas T e R. Em nossos estudos de propriedades funcionais das hemoglobinas de Pipa pipae utilizamos oxigênio e monóxido de carbono como ligante para podermos aferir alguns parâmetros fisiológicos e cinéticos para o estudo dessas hemoglobinas do ponto de vista funcional e estrutural.

O interesse pelo tema nasceu das experiências anteriores com hemoglobinas de Pipa carvalhoi feitos em nossos laboratórios que mostraram a inexistência de efeito Bohr no hemolisado isento de cofatores e um considerável aumento desse efeito quando em presença de ATP (Meirelles et al, 1978). Além dessa característica outros parâmetros eram significativamente alterados na presença de fosfatos como a sensibilidade à desnaturação (Airoldi et alii, 1978) e a acessibilidade dos grupos tióis (Vieira et alii,

1979). Esses resultados nos fez suspeitar que essas hemoglobinas de Pipa carvalhoi eram mais estáveis na forma T, mesmo quando saturadas pelo ligante, pois apesar desse anuro ser de habitat aquático a afinidade dessas moléculas pelo ligante  $O_2$  mostram não ser muito grande quando comparada com a afinidade das hemoglobinas de peixes, por exemplo, e a resistêcia a agentes desnaturantes são elevadas bem como o acesso aos grupos SH bem mais difícil. De posse desses resultados pudemos analisar a "compactação" da molécula dificultada pelo acesso de reagentes SH específicos pela liberação de prótons de Bohr e pela resistêcia a desnaturação.

A Pipa pipae que também é um anuro aquático, passou a nos interessar dado a sua semelhança à Pipa carvalhoi e possivelmente com hemoglobinas de mesmas propriedades. Além disto, é animal de maior porte e de mais fácil aquisição. Assim passamos a estudar as propriedades funcionais das hemoglobinas de Pipa pipae utilizando tais propriedades na obtenção de dados que pudessem fornecer subsídios para a caracterização dos estágios intermediários da reação da molécula com ligante.



## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais utilizados nesse trabalho foram Pipa pipa (Linnaeu), anuro brasileiro oriundos de Belém do Pará. Os exemplares utilizados foram animais adultos de ambos os sexos e que pesavam entre 50 e 100 g.

### PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO

Os animais foram anestesiados em gelo e por uma incisão torácica o coração foi seccionado, adicionando-se heparina. O sangue foi colhido no fundo da cavidade torácica utilizando-se pipetas previamente heparinizadas. Após a colheita, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em solução de NaCl 0,15 M contendo  $1 \times 10^{-3}$  M de EDTA e novamente centrifugado da maneira descrita. Esse processo foi repetido por 3 vezes. Finalmente, o precipitado foi ressuspendido em uma solução de Ring-frog (Moss e Ingram, 1968) que consiste em uma solução de 6,6 g de cloreto de sódio 0,15 g de cloreto de potássio e 0,15 g de cloreto de cálcio dissolvidos em 1 litro de água.

Após o material ter sido ressuspendido em solução de Ring-frog foi submetido a um processo de congelamento e descongelamento por 2-3 vezes e finalmente o hemolisado dos eritrócitos foi obtido por centrifugação a 5.000 rpm por 10 min.; onde o precipitado foi desprezado.

#### ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO

A eletroforese vertical descendente foi feita segundo o método de Smithies (1959). Para isso foi preparado um tampão contendo tris 62,5 g/l, EDTA 6,0 g/l, ácido bórico 4,6 g/l sendo este tampão diluído 20 vezes e acrescentado KCN 0,01% pH 8,2. Nesse tampão foi dissolvido o amido (Smithies) ficando com uma concentração final de 14,5%. Essa solução foi colocada em um balão de vidro e em fogo brando com agitação, foi aquecido até ficar incolor. Com auxílio da bomba de vácuo foi retirada as bolhas de ar e o gel fundido foi colocado em uma placa de 10x33 cm deixando-o esfriar.

A aplicação das amostras foram feitas a uma distância de aproximadamente 10 cm de uma das extremidades da placa, mantendo sempre uma distância de 1 cm entre uma amostra e outra. Para a aplicação utilizou-se um pedaço de papel de filtro de 1x1,5 cm em bebido da amostra. Esse papel foi colocado em um sulco feito no gel.

Para se processar a corrida eletroforética colocou-se nas extremidades da placa uma gaze para se fazer a conexão com as cubas.

Na cuba superior foi colocada tampão borato 0,3 M pH 8.9 e na cuba inferior tampão borato 0,1 M pH 8.9. Os eletrodos foram ligados, sendo o negativo na cuba superior e o positivo na inferior. A voltagem foi regulada para 180V e o tempo de corrida foi de seis horas.

Após a corrida o gel foi colocado em uma solução de comassie blue a 2% por 20 minutos e descorado em solução de etanol/ácido acético.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita segundo Ornstein (1964) e Davis (1964). Os geles de poliacrilamida para a eletroforese foram preparados na hora de usar utilizando-se quatro soluções estoque e uma solução recém preparada. Assim o gel de resolução continha a mistura de 1 ml da solução A; 1 ml da solução B e 2 ml da solução C e o gel de concentração continha 2 ml de solução D; 1 ml de solução E e 2 ml da solução C. As soluções A, B, D e E eram mantidas a 4°C e continham: A, 30% de acrilamida e 0,8% de bisacrilamida; B, 8,5% de tris, 0,4% de TEMED e 24 ml de HCl 1N; D, 5% de acrilamida e 1,25% de bisacrilamida e E, 12,9 ml de ácido fosfórico 1 M, 2,9% de tris e 0,1% de TEMED.

A solução C utilizada foi uma solução recém preparada de 0,2% de persulfato de amônia.

Os tubos (10x0,5 cm) foram preparados colocando-se 1 ml da solução de gel para resolução e após a polimerização (30-40 minutos) adicionou-se mais 0,2 ml da solução de gel de concentração que polimeriza dentro de 40-60 minutos.

Após a polimerização dos geles os tubos foram encaixados nos orifícios existentes na cuba superior e a amostra foi colocada (50-100  $\mu$ l de hemoglobina + 50  $\mu$ l de glicerol). A cuba superior foi colocada sobre a inferior de modo que os tubos ficassem com suas extremidades mergulhadas no tampão tris-HCl 0,1M pH 8,1 e o tampão tris-glicina 0,05 M pH 8,9 foi colocado na cuba superior. Os eletrodos foram ligados, sendo o negativo conectado na cuba superior e a intensidade da corrente elétrica, regulada para 2 mA por tubo. O tempo de corrida utilizado foi de uma hora.

Após a corrida os geles foram retirados dos tubos e colocados em solução de ácido tricloro-acético a 12,5% por 30 minutos e depois adicionado a solução corante (solução de comassie blue a 2%). O descoramento foi feito durante 24 a 36 horas com uma solução de ácido acético 7% e metanol 1,4%.

## SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

### CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHADEX

2 g de DEAE-sephadex A<sub>50</sub> foi colocada em 50 ml de tampão tris-Cl 0,05 M pH 8,0 e incubada à temperatura ambiente por 2 - 3 horas para inchar. Após esse período as bolhas de ar foram retiradas da resina por vácuo.

A montagem da coluna cromatográfica foi feita em uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro por 25 cm de altura, utilizando se o mesmo tampão. Com essa coluna foi obtido um fluxo de aproximadamente 0,6 ml por minuto.

A amostra (hemolisado de eritrócitos de Pipa pipae foi aplicada e o tampão inicial utilizado foi o tris-Cl 0,05 M pH 8,0. Após a passagem de 100-200 ml desse tampão foi montado o sistema de gradiente. Para tanto foi utilizado a mistura desse tampão tris-Cl 0,05 M pH 8,0 com o tampão tris-fosfato 0,05 M pH 6,2.

O eluato foi colhido em tubos de ensaio (3 ml por tubo) que foi lido em espectrofotômetro a 540 nm. O pH de cada tubo também foi lido.

### CROMATOGRAFIA EM CM-CELULOSE

Para essa cromatografia, a resina foi montada em uma coluna de vidro de 30 cm de altura por 2 cm de diâmetro, equilibra-

da com tampão fosfato 0,01 M pH 6,4. Essa resina foi inicialmente lavada em água com várias trocas por um período de 24 horas para se retirar as granulações mais finas. A ativação foi feita utilizando-se solução de NaOH 0,5 M por duas horas, lavando-se depois a resina com água destilada até pH próximo a 7. Essa lavagem foi feita com auxílio de um funil de Buchner adaptado a uma bomba de vácuo. Em seguida colocou-se a resina em uma solução de ácido fosfórico 0,5 M deixando por duas horas, agitando-se esporadicamente e repetiu-se a lavagem até pH próximo a neutralidade. Finalmente, equilibrou-se a resina com tampão fosfato 0,01 M pH 6,4 e montou-se a coluna até uma altura de 25 cm, aproximadamente, mantendo-se 4°C. Isso foi conseguido através da circulação de água refrigerada pela jaqueta da coluna de vidro.

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

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

## ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR

Para se avaliar o peso molecular de cada uma das frações eluídas na cromatografia de troca iônica foi preparada uma coluna de sephadex G-200. Para tanto foi pesado 3 g sephadex G-200 e colocada em 200 ml de água deixando-se incubar por 24 horas à temperatura ambiente.

Após essa incubação foi retirada as bolhas de ar da resina por vácuo e procedeu-se a montagem de uma coluna de 50x2,5cm.

A padronização dessa coluna foi feita pela passagem de hemoglobina humana (PM= 64.000) eluída com água destilada e com mioglobina de músculo de baleia (PM= 16.000) também eluída com água. O eluado foi coletado em tubos (2 ml por tubo) que foram lidos em 540 nm. Os dados da absorbância obtidos foram registrados em gráfico (na ordenada) usando-se nas abscissas o volume de eluição.

Após a padronização da coluna, uma das frações do hemolisado de eritrócitos de P. pipae foi cromatografado. O eluato foi colhido e lido da mesma maneira que os padrões e os resultados foram colocados no gráfico.

Outro gráfico foi elaborado onde se colocou nas ordenadas o peso molecular (em daltons) dos padrões e nas abscissas o volume de eluição. Esses pontos determinaram uma reta. Os dados da eluição das frações (volume) foi interpolado nesse gráfico permitindo estimar o peso molecular de cada fração.

## PREPARO DE AMOSTRAS ISENTAS DE COFADORES E CONCENTRAÇÃO DE MATERIAL

Amostras de hemoglobinas isentas de cofatores foram obtidas pela passagem da amostra por uma coluna de sephadex G-25, de 15x1,5 cm montada em água bi-destilada e pela passagem por três colunas de troca iônica.

Essas colunas de troca iônica eram: Dowex 1-X8 ( $\text{H}_3\text{COO}^-$ ): Dowex 50W-X4 ( $\text{NH}_4^+$ ) e mistura de Amberlite IRC-50 ( $\text{H}^+$ ) e IR-4B ( $\text{OH}^-$ ).

O material, após passagem pelo sephadex G-25, foi submetido às cromatografias de troca iônica, usando-se água bi-destilada como eluente.

O eluato foi colhido e, dependendo da concentração, era colocado em tubo de diálise (parede grossa) de 1 cm de diâmetro e aproximadamente 90 cm de comprimento; conectado por uma das extremidades a um funil preso a uma rolha de borracha. A outra extremidade do saco de diálise foi fechada. Para se conseguir a concentração do material, esse tubo de diálise era colocado em um cilindro de vidro de 100 x 3 cm, fechando-se a extremidade superior com a rolha acoplada ao tubo de diálise e a inferior com uma rolha de borracha simplesmente. Nesse cilindro era feito vácuo e nessas condições mantido à temperatura de 4°C durante 10 - 20 horas até se obter uma amostra mais concentrada.



## EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO

O estudo do equilíbrio da hemoglobina com o ligante oxigênio foi feito por método espectrofotométrico onde se calculou os valores de n (plot de Hill) e  $P_{50}$  (pressão de oxigênio onde me tade das moléculas estão na forma de oxihemoglobina) através da diferença entre as absorbâncias das formas oxi e deoxihemoglobina em 560, 577 e 540 nm e em função do volume de ar adicionado.

Em um tonômetro de vidro, previamente aferido, se colocou 3 ml de solução de hemoglobina isenta de cofatores diluída em tampão bis-tris lactato 0,05 M pH variando de 6,5 a 8,0 de modo que a solução ficasse com a concentração final na ordem de  $5 \times 10^{-5}$  M. Pela passagem de nitrogênio no tonômetro se conseguia a amostra na forma deoxi, que era lida, por varredura, de 500 a 600 nm registrando-se as absorbâncias com auxílio de um registrador acoplado ao espectrofotômetro.

Após o registro da deoxihemoglobina adicionava-se no tonômetro um volume conhecido de ar, deixando-se o tonômetro em banho-maria a 27°C por 10 minutos, com agitação. Após o equilíbrio térmico novamente se registrava as absorbâncias nas mesmas condições descritas. Essa operação (com novas adições de ar) era repetida 4 - 5 vezes. Finalmente, o tonômetro era aberto e se fazia passar uma corrente de ar por 1 - 2 minutos a fim de se obter a forma oxihemoglobina que também era lida e registrada de 500 a 600 nm.

Os cálculos foram feitos utilizando-se a somatória das diferenças das absorbâncias (nos três comprimentos de onda) de cada adição de ar com a da deoxihemoglobina, sendo esse valor na forma oxigênio a saturação total, calculou-se as porcentagens de saturação ( $\bar{y}$ ) de cada adição em função desse valor de 100%.

Os valores de  $\log \frac{\bar{y}}{1-\bar{y}}$  foram calculados e registrados em gráfico contra  $\log PO_2$  (logarítimo da pressão de oxigênio) onde se pode obter  $\log P_{50}$  e  $n$  ou simplesmente calculando esses parâmetros, por regressão linear utilizando-se os dados de  $\log \frac{\bar{y}}{1-\bar{y}}$  e  $\log PO_2$ . O  $\log P_{50}$  corresponde ao intercepto no eixo X onde se obtém a pressão suficiente para 50% de saturação e  $n$  corresponde à tangente da reta obtida. Pela regressão linear  $\log P_{50} = \frac{-a}{b}$  e  $n = b$  onde:

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular

#### PREPARO E TITULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE CO

A solução de CO foi preparada utilizando-se água bidestilada isenta de oxigênio, onde se borbulhava monóxido de carbono por 20-30 minutos. O monóxido de carbono foi conseguido pela reação de ácido sulfúrico concentrado com ácido fórmico concentrado. Após essa preparação, a solução era transferida para uma seringa e estocada a 4°C.

A concentração da solução de CO foi determinada pela reação com deoximioglobina. Para tanto preparou-se uma solução da mioglobina de músculo de baleia (Sigma) de concentração conhecida (cerca de  $10^{-7}$  M). Certa quantidade de ditonito de sódio foi adicionada a fim de converter essa amostra em deoximioglobina, a qual foi colocada numa cubeta preparada para esse fim. As absorvâncias foram registradas no intervalo de 450 a 400 nm. Após o registro da forma deoxi pequeno volume da solução de CO foi adicionado (2  $\mu$ l) registrando-se as absorvâncias. Novas adições de solução de CO foram feitas até se conseguir a saturação da amostra.

As absorvâncias dos picos em 432 e 423 foram lidas e a diferença de leitura da deoxi para cada adição foi calculada. A somatória das diferenças na forma deoxi correspondia a 0% de saturação e a somatória das diferenças na forma carboxi (totalmente saturada) correspondia a 100% de saturação. Para os dados intermediários foi calculada a função  $\bar{y}$  (porcentagem de saturação).

Em um gráfico foram colocados nas ordenadas a função  $\bar{y}$  e nas abscissas a diluição da solução de CO, isto é,  $\frac{X}{y + X}$  onde X = volume de solução de CO adicionado e y = volume da cubeta.

Nesse gráfico (Figura 1) foi determinado a maior diluição da solução de CO capaz de saturar a mioglobina. Nessa diluição a solução de monóxido de carbono tem o título igual ao da solução de mioglobina pois  $Mb + CO \longrightarrow MbCO$  e possibilita calcular a concentração da solução estoque em função da concentração da proteína.

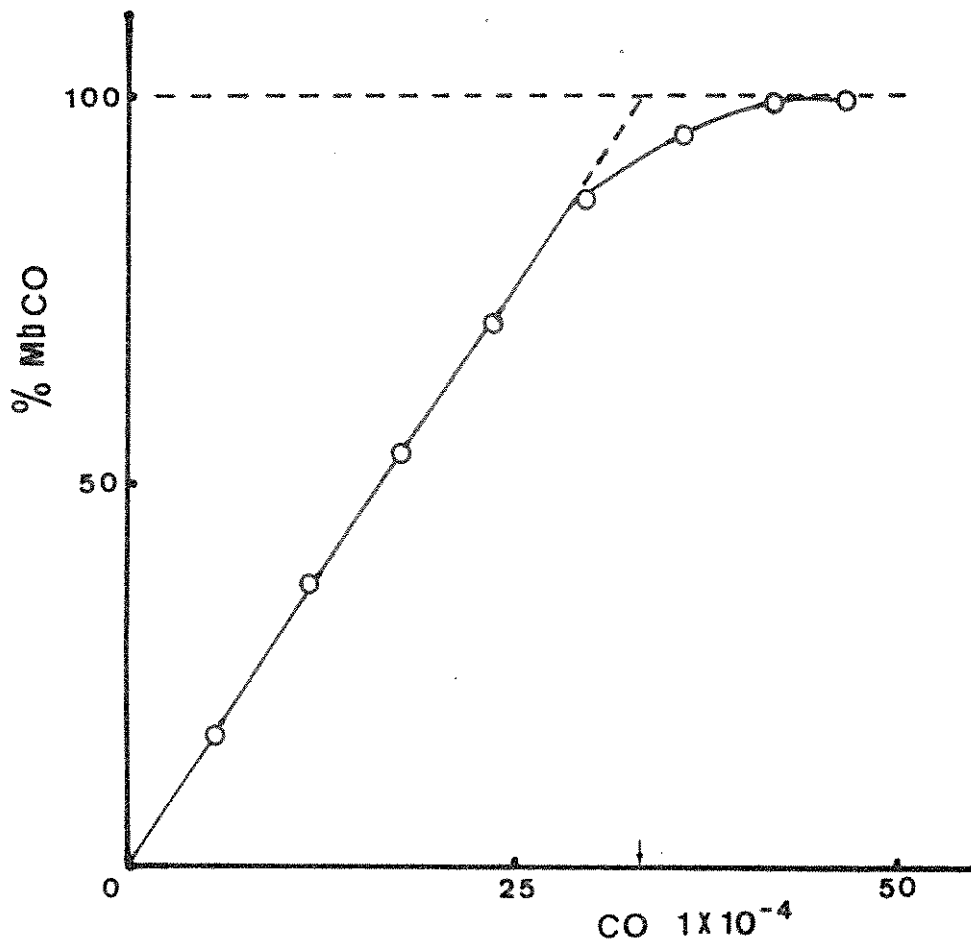


Fig. 1 - Titulação de uma solução de CO utilizando 4,88 ml de mio globina de músculo de baleia diluída em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 com concentração final de  $3,1 \times 10^{-6}$  M.

Essa titulação foi repetida todas as vezes em que foi utilizada a solução de CO pois, com o tempo o título da solução diminui.

### DETERMINAÇÃO DA CURVA DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS COM MONÓXIDO DE CARBONO

Os estudos de equilíbrio da hemoglobina com o ligante CO foi feito por método espectrofotométrico onde se calculou o valor de n (plot de Hill) e o  $C_{50}$  (concentração de CO capaz de saturar 50% das moléculas de hemoglobina) através das diferenças entre as absorbâncias das formas carboxihemoglobina e desoxihemoglobina de pois de diferentes adições da solução de CO em dois comprimentos de onda diferentes: 432 a 419 e em função da concentração de CO.

Essas experiências foram feitas em uma cubeta de vidro de 4 ml de volume e caminho óptico de 1 cm que continha em seu interior pérolas de vidro. Nessa cubeta colocava-se a amostra em estudo (deixando-a totalmente cheia) e se adicionava ditionito de sódio em quantidade suficiente para transformar toda a amostra em deoxihemoglobina. A cubeta era então fechada com uma rolha de borracha, de modo que não ficasse nenhuma bolha a fim de evitar a existência de duas fases no sistema. Volumes conhecidos de uma solução de CO de título pré determinado era injetado na cubeta através de uma das agulhas e o excesso de material saía pela outra.

Com auxílio de um espectrofotômetro acoplado a um registrador, registrou-se as absorbâncias da deoxihemoglobina, bem como da amostra após cada adição da solução de CO na faixa de 450 a 400 nm.

As absorbâncias eram lidas em 432 e 419 nm e a somatória das diferenças da deoxi e carboxi correspondiam a 100% de saturações.

Os demais valores de  $\bar{y}$  foram calculados pelas somatórias das diferenças das absorbâncias de cada adição com a deoxi em função do valor de 100%.

Os cálculos dos valores ou da concentração de CO foram feitos pelo produto do fator da diluição da solução injetada na cubeta pelo título da solução de CO e com esses dados foram calculados as concentrações de CO. Esses valores foram sempre corrigidos para uma solução de hemoglobina na concentração de  $1 \times 10^{-7}$  M.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO BOHR

O efeito Bohr definido como mudança da afinidade da hemoglobina pelo ligante em função da alteração do pH do meio, pode ser descrito como efeito Bohr ácido e efeito Bohr alcalino, dependendo da faixa de pH onde ocorre a alteração da afinidade e positivo ou negativo, dependendo de como a afinidade é alterada. Se a afinidade da hemoglobina pelo ligante aumentar conforme se aumen-

ta o pH, temos o efeito Bohr negativo e se a afinidade diminuir com a elevação do pH, temos efeito Bohr positivo.

Para estimar os valores do efeito Bohr pode-se calculá-lo em função do pH e do  $\log P_{50}$  ou  $\log C_{50}$  (para o ligante  $O_2$  ou CO) pela equação:

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

A determinação do efeito Bohr foi feita através de gráfico onde se colocou em ordenadas  $\log P_{50}$  ou  $\log C_{50}$  e nas abscissas os valores de pH. O coeficiente angular da reta determinado corresponde ao efeito Bohr. Os valores de  $\log P_{50}$  ou  $\log C_{50}$  utilizados correspondiam à média desses valores obtidos em 2 ou 3 experimentos em idênticas condições, considerando um erro aceitável, quando o desvio padrão encontrado fosse menor que 0,1.

#### CINÉTICA DA REAÇÃO DE DESLOCAMENTO DO CO POR FERRICIANETO

Amostras de carboxihemoglobina de diferentes concentrações diluídas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foram preparadas, por gaseamento de CO na amostra (esse gás foi obtido pela reação de ácido sulfúrico concentrado com ácido fórmico concentrado). Essas amostras (1 ml) foram colocadas em cubeta de vidro onde se procedeu a reação. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de solução de ferricianeto de potássio 0,1 M e colocada no espectrofotômetro a 560 nm. As absorbâncias foram registradas e lidas a cada 30 segundos. A reação foi acompanhada durante 5-7 minutos.

Para cada dado experimental (cada uma das concentrações de hemoglobina) foi calculada a reatividade por:

$$R = \frac{d(A)}{d(t)}$$

onde:

A = valor da absorbância no início da reação subtraída da absorbância observada no intervalo de tempo.

Com os valores de R de diferentes dados experimentais foi calculada a cinética da reação. A constante cinética foi determinada em gráfico onde se colocou nas abscissas o inverso da reatividade de cada dado experimental e nas ordenadas o inverso da proporção molar de monóxido de carbono e ferricianeto. A interceptação da reta obtida com o eixo das abscissas fornece o inverso da velocidade da reação ( $1/R$ ) representado por  $\ell'$  e a tangente dessa reta fornece a constante de oxidação da hemoglobina por ferricianeto, por:

$$\text{tg} = \frac{\ell'}{\ell x}$$

sendo x essa constante. Isso é expresso pela equação:

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{\ell} + \frac{\ell'}{\ell x} \frac{\text{CO}}{\text{Fe}}$$



sendo  $\ell'$  = constante de dissociação do CO e  $x$  = constante de oxidação da hemoglobina e  $\ell$  = constante de associação (Bannister et alii, 1976) e sendo:

$$\frac{\text{HbCO}_4}{\text{Hb } 4\text{CO}} = \frac{\ell}{\ell'}$$

podemos calcular a constante de associação do CO ( $\ell$ ) através de L

$$\log \frac{y}{1 - y} = \log L + \log \text{CO}$$

#### CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS POR BENZOATO DE SÓDIO E URÉIA

A cinética de desnaturação da hemoglobina foi estudada usando-se como agente desnaturante benzoato de sódio, concentrado final de 1 M, e uréia 7 M como concentração final. Em ambos os casos os experimentos foram feitos usando-se hemoglobina isenta de cofatores de concentração na ordem de  $10^{-5}$  M.

Para tanto foi colocado em uma cubeta de 1 ml de volume 0,5 ml de uma solução de benzoato de sódio 2 M ou de uréia 14 M e adicionado 0,5 ml de solução de hemoglobina (diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0). Após rápida agitação procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 577 nm. Essa leitura corresponde ao tempo

zero. Novas leituras foram efetuadas a cada 1 ou 3 minutos (dependendo da velocidade da reação).

Após 15-20 minutos de reação a solução de hemoglobina era submetida a tratamento térmico para se obter uma solução totalmente desnaturada. Isso foi conseguido quando a leitura em 577 nm se mantinha constante.

Das absorvâncias obtidas se calculou as porcentagens de desnaturação em cada leitura. Esse cálculo foi feito utilizando-se a absorvância do tempo zero da reação como 100% da forma nativa e a absorvância após o aquecimento como 0% da forma nativa. O complemento aritmético desses valores correspondia a porcentagem de desnaturação em cada leitura.

O cálculo da constante cinética da desnaturação da hemoglobina foi feito determinando-se a função  $\text{Ln} \frac{100}{100-x}$  onde  $x$  = porcentagem de desnaturação no tempo  $t'$  e esses dados foram registrados em gráfico nas ordenadas, usando  $t'$  (tempo em minutos) nas abscissas. O coeficiente angular da reta corresponde ao valor  $k'$  (constante de pseudo-primeira ordem da cinética de desnaturação).

#### DESNATURAÇÃO POR SOLUÇÃO DE DODECILSULFATO DE SÓDIO A 0,1%

A desnaturação por dodecilsulfato de sódio (SDS) foi feita na oxi e deoxihemoglobina.

A desnaturação da deoxihemoglobina foi feita em um tonô

metro onde se colocou a amostra (2 ml) com concentração em torno de  $5 \times 10^{-5}$  M diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Pela passagem contínua de nitrogênio conseguiu-se a deoxihemoglobina. Foi preparada, também, uma solução de SDS 1% isenta de oxigênio. Isso foi conseguido pela deoxigenação de um frasco (pela saturação com nitrogênio) onde se colocou água previamente fervida. O SDS foi pesado e dissolvido nessa água, tendo-se o cuidado de saturar a atmosfera do frasco com nitrogênio.

A reação de desnaturação foi conseguida adicionando-se no tonômetro 0,2 ml da solução de SDS preparada de maneira descrita.

As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro por varredura entre 600 a 500 nm no instante que se adicionava a solução de SDS. Novas leituras foram feitas de cada 15 minutos. A desnaturação total foi conseguida pelo calor e registrada nas mesmas condições.

O cálculo das porcentagens de forma nativa e desnaturada foram feitos pelas diferenças da somatória das absorbâncias em 577 e 542 nm, no início e no final da reação. A diferença obtida entre tempo zero e final corresponde a 100% de desnaturação.

A desnaturação da oxihemoglobina foi feita da mesma maneira sem porém se ter a necessidade de se converter a amostra em deoxi.

As porcentagens de desnaturação obtidas foram analisadas em função do tempo.

## ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS NO ESQUEMA DE ADAIR E NO MODELO M.W.C.

A estimativa desses parâmetros foram feitas a partir dos dados de equilíbrio do hemolisado isento de cofatores e com ATP diluídos em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 7,4 com CO, onde aproximadamente 20 pares de valores  $\bar{y}$  e p fossem conhecidos e que pelo menos dois valores de y estivessem acima de 0,95 e 2 abaixo de 0,05. Os valores de p foram obtidos a partir da concentração de CO (já descrito) e convertidos em pressão de CO, onde uma solução de CO  $1,36 \times 10^{-6}$  M corresponde a pressão de 1 mm de Hg (Ainsworth e Ford, 1968).

Desses dados, quatro pontos foram selecionados, sendo que dois deles correspondessem aos pontos mais próximos ao início e ao final da reação e os outros dois próximos aos pontos de inflexão da reta. Para cada par de dados (x e y) foi desenvolvida a equação de Adair,

$$y = \frac{A_1 p + 2A_2 p^2 + 3A_3 p^3 + 4A_4 p^4}{4(1 + A_1 p + A_2 p^2 + A_3 p^3 + A_4 p^4)}$$

obtendo-se quatro equações com quatro incógnitas.

A estimativa preliminar dos valores de  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$  foram feitas resolvendo-se esse sistema de equações e depois, esses dados foram corrigidos por um processo iterativo pois foi pos

sível desenvolver essa função de acordo com a série de Taylor (Hoffmann & Vieira, 1977) e considerando apenas os termos lineares, obtêm-se:

$$y = f_0 + f'_1 \Delta A_1 + f'_2 \Delta A_2 + f'_3 \Delta A_3 + f'_4 \Delta A_4$$

onde:  $f_0$  = valor da função para a estimativa preliminar dos parâmetros ( $A_1, A_2, A_3$  e  $A_4$ );  $f_i$  = valor da derivada parcial da função em relação a  $A_i$  e calculada para a estimativa preliminar dos parâmetros e  $i = 1, 2, 3$  e  $4$ .

Como os valores de  $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3$  e  $\Delta A_4$  podem ser considerados como parâmetros de uma regressão múltipla com quatro variáveis independentes, pode-se aplicar o método de mínimos quadrados ordinários obtendo-se estimativas de  $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3$  e  $\Delta A_4$ . Em seguida as estimativas preliminares dos parâmetros foram corrigidas:

$$A_1 = A_{01} + \Delta A_1$$

$$A_2 = A_{02} + \Delta A_2$$

$$A_3 = A_{03} + \Delta A_3$$

$$A_4 = A_{04} + \Delta A_4$$

Esses novos valores de  $A_1, A_2, A_3$  e  $A_4$  passaram, então, a serem considerados como estimativa preliminar dos parâmetros e as correções ( $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3$  e  $\Delta A_4$ ) foram recalculadas. O processo iterativo é chamado de convergente quando as correções forem diminuindo e, nessas condições é considerado satisfatório. Quando

as correções forem consideradas (no nosso experimento consideramos que as correções chegassem até o terceiro valor significativo para  $A_1$ ) os cálculos são interrompidos e só a última estimativa dos parâmetros é considerada.

Com esses dados os valores de  $y$  são corrigidos em cada valor de  $p$  por:

$$y = \frac{A_1 p + 2A_2 p^2 + 3A_3 p^3 + 4A_4 p^4}{4(1 + A_1 p + A_2 p^2 + A_3 p^3 + A_4 p^4)}$$

e a soma dos quadrados dos resíduos, que dá uma idéia da qualidade dos ajustamentos e calculada:

$$S.Q.Res. = \sum_{j=1}^n (Y_j - \bar{Y}_j)^2$$

onde  $n$  é o número de observações,  $\bar{y}$  é o valor calculado e  $y$  é o valor obtido.

Após a obtenção dos valores de  $A_i$  calcula-se os valores de  $K_i$  (constante intrínsecas de associações) por:

$$K_1 = \frac{A_1}{4}; K_2 = \frac{2}{3} \frac{A_2}{A_3}; K_3 = \frac{3}{2} \frac{A_3}{A_2} \text{ e } K_4 = 4 \frac{A_4}{A_3}$$

Outros parâmetros do esquema de Adair foram, também calculados. Assim,  $P_m$  (pressão média do ligante) foi calculado por:

$$P_m = \frac{1}{K_i^4} \text{ e } \Delta F = -R T (\log K_1 + \log K_4)$$

A estimativa dos parâmetros no modelo alostérico (MWC) foram feitas a partir das constantes de Adair para a obtenção de L ( $L = \frac{T}{R}$ ) e ( $c = \frac{K_T}{K_R}$ )

Assim,

$$f_i = \frac{K_i}{K_1} = \frac{A_i}{A_1} = \frac{(Lc^i + 1)(L + 1)}{(Lc^{i-1} + 1)(Lc + 1)}$$

Então, valores positivos menores que 1 foram substituídos para c nessa equação para  $i = 4$  e os diferentes valores de L foram calculados para os diferentes valores de c. Esses cálculos foram feitos, também, para  $f_3$  e  $f_2$  e o par de valores de c e L que melhor satisfizesse as equações em  $f_4$ ,  $f_3$  e  $f_2$ , foi escolhido (Imai, 1973).

De posse dos valores estimados para esses parâmetros, calculou-se  $i_s$  (que dá uma idéia do ponto de transição da forma T para a forma R) pela equação de Hopfield et al (1971):

$$i_s = \frac{(-\log L)}{\log c}$$

baseado no equilíbrio das formas T e R em cada estágio de ligação onde  $\frac{T_i}{R_i} = Lc^i$ . A proporção de T e R em cada estágio de saturação foi calculado por:

$$\frac{T_i}{T_i + R_i} = \frac{Lc^i}{Lc^i + 1} \quad (\text{Imai, 1973})$$

## RESULTADOS

SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA DE Pipa pipae POR ELETROFORESE.

Amostra do hemolisado de eritrócitos de Pipa pipae após ser tratada com KCN a 2% pH 7,0, com a finalidade de converter todas as diferentes formas de hemoglobina em uma única: cianohemoglobina; foi submetida à análise eletroforética.

Nesta análise em suporte de gel de amido a 14,5% foi utilizado tampão borato pH 9,2 em gradiente de concentração, após seis horas de corrida com diferença de potencial de 150 V, foram obtidas quatro bandas com diferentes mobilidades anódicas, reveladas após a coloração do gel. Foi observado que o componente de maior concentração apresentava maior mobilidade (Figura 2).

Na mesma análise quando o suporte utilizado foi o gel de poliacrilamida a 7,5%, o tampão usado foi o tris-glicina 0,05M e tris-Cl 0,05 M em gradiente de pH, após 1-2 horas de corrida com intensidade de corrente de 2,5 mA por tubo obtivemos, também, uma resolução de quatro componentes anódicos que foram evidenciados pela coloração com comassie blue.



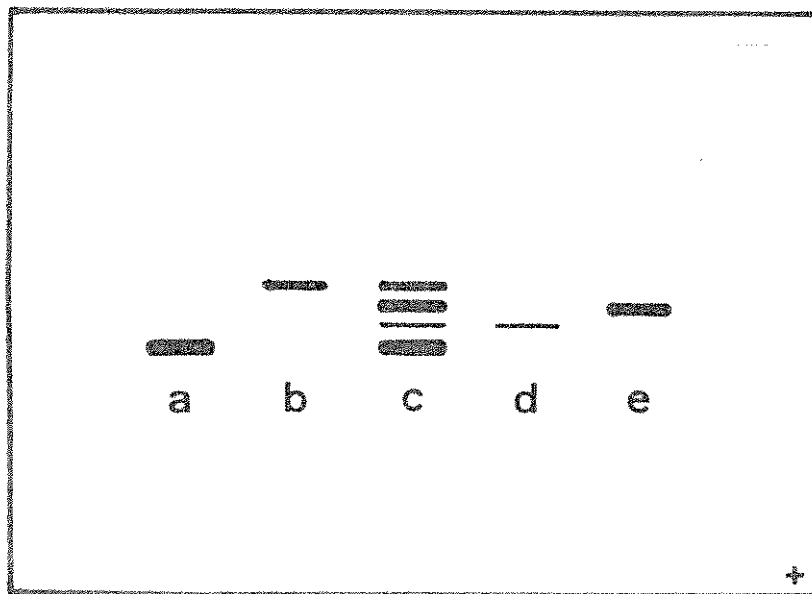


Figura 2 - Esquema da eletroforese em gel de amido de hemoglobi-  
nas de Pipa pipae.

- a) componente I do DEAE-sephadex
- b) componente IV do DEAE-sephadex
- c) hemolisado de eritrócitos
- d) componente III do DEAE-sephadex
- e) componente II do DEAE-sephadex.

## SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Na utilização de técnica cromatográfica obtivemos separação analítica e quantitativa dos componentes de hemoglobina de Pipa pipae. A cromatografia utilizada foi a de troca iônica e a resina escolhida foi o DEAE-sephadex A<sub>50</sub> preparada como descrito em MÉTODOS.

A eluição dos componentes separados por esse procedimento foi feita através de um sistema gradiente de pH, compostos pelos tampões: tris-HCl 0,05 M e tris-fosfato 0,05 M, na faixa de pH 8,0 a 4,6. A velocidade de eluição foi de 3 ml/por tubo/ 5min. e os dados do cromatograma foram colocados em gráfico onde as concentrações de proteína, expressa em absorbância a 540 nm ( $A_{540}$ ) foram lançadas nas ordenadas e o volume de eluição (ml) nas abscissas (Figura 3).

Analisando esse gráfico observamos, também, a existência de componentes eluídos com diferentes pHs. O primeiro componente que representa 35% do hemolisado total foi eluído em pH 7,6; o segundo representando 25% do hemolisado, foi eluído em pH 7,2; o terceiro (25% do hemolisado) eluído em pH 6,8 e o último, eluído em pH 4,6 representou 15% do total.

As três primeiras frações foram utilizadas para os estudos de propriedades funcionais e como critério de pureza para essas frações foi utilizado eletroforese em gel de amido e gel de poli(acrilamida) (Figura 2).

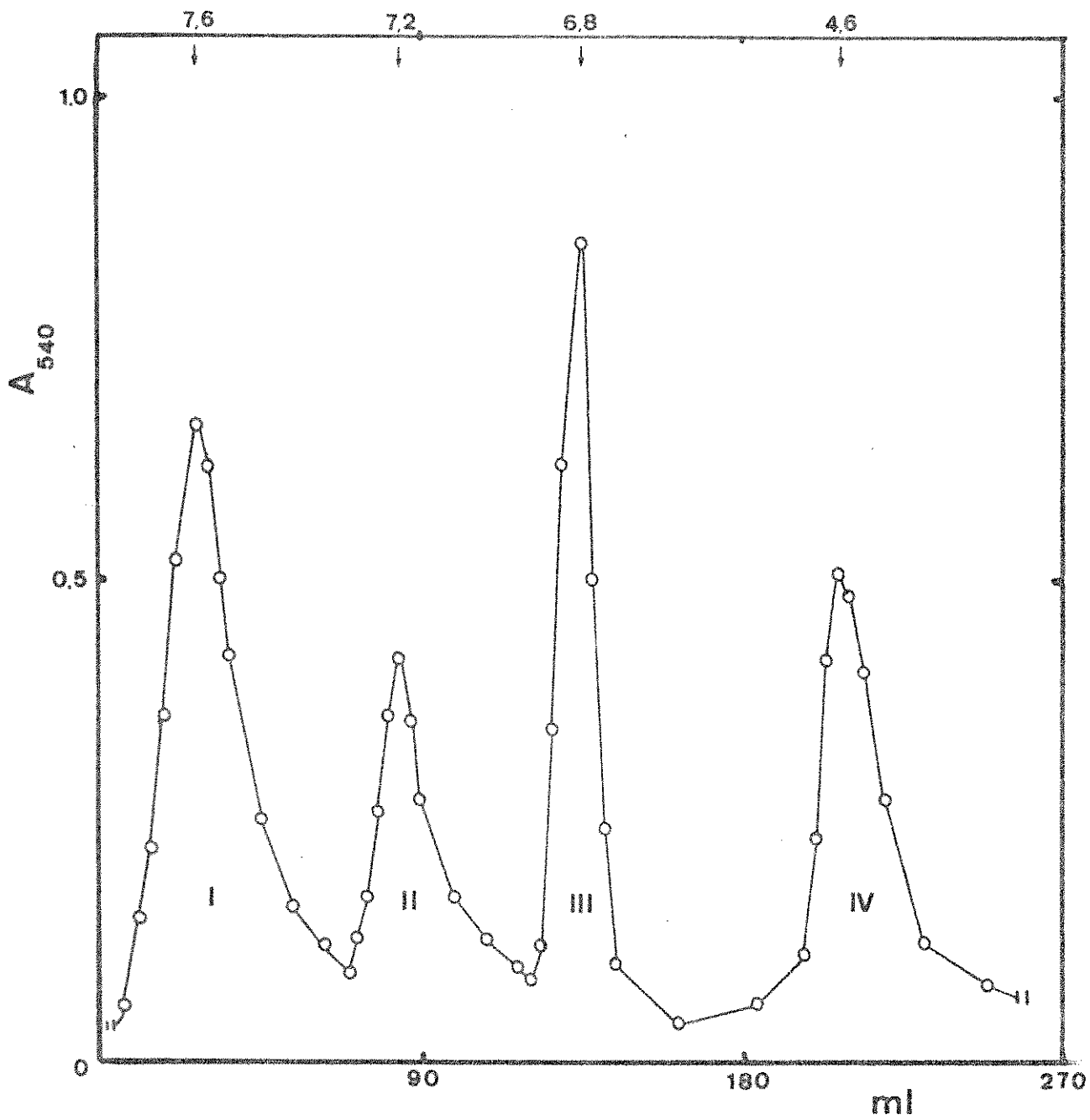


Fig. 3 - Perfil cromatográfico do hemolisado total de eritrócitos de Pipa pipa em DEAE-sephadex com tampão tris-fosfato 0,05 M em gradiente linear de pH.

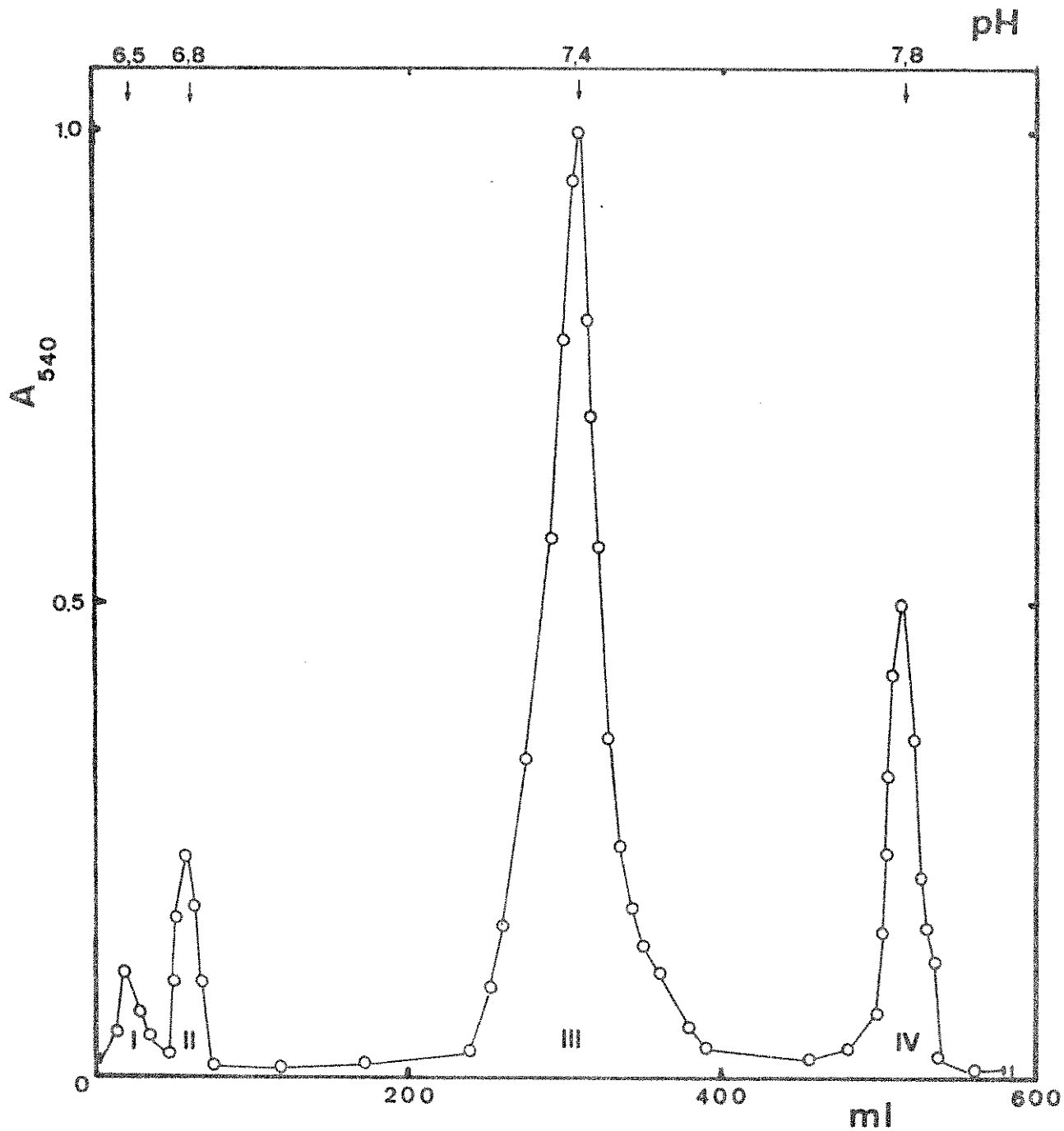


Fig. 4 - Perfil cromatográfico de hemolisado total de eritrócitos de Pipa pipae em CM-celulose com tampão fosfato 0,01 M em gradiente linear de pH.

Na cromatografia em CM-celulose os quatro componentes eluídos apresentaram as seguintes porcentagens: 4; 6,5; 70 e 19,5 e a eluição se deu em pH 6,5; 6,8; 7,4 e 7,8 respectivamente (Figura 4).

#### FILTRAÇÃO EM GEL

Para se comprovar que os componentes obtidos por cromatografia de troca iônica eram componentes individualizados e não produto resultante de dissociação ou polimerização, utilizamos técnica de filtração em gel.

A padronização de uma coluna de 2x90 cm de sephadex G-200 equilibrada com água baseou-se nos volumes de eluição da forma tetramérica da hemoglobina humana (PM 64.000 d) e da forma monomérica da mioglobina de músculo de baleia (PM 16.000 d).

Os resultados obtidos constam da figura 5 comprovando-se que os componentes analisados (componentes I e II do DEAE sephadex) tratavam de formas tetraméricas.

#### EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO DO HEMOLISADO E DAS FRAÇÕES

Um dos parâmetros por nós utilizados na análise das propriedades funcionais foi a afinidade das hemoglobinas de Pipa pi-

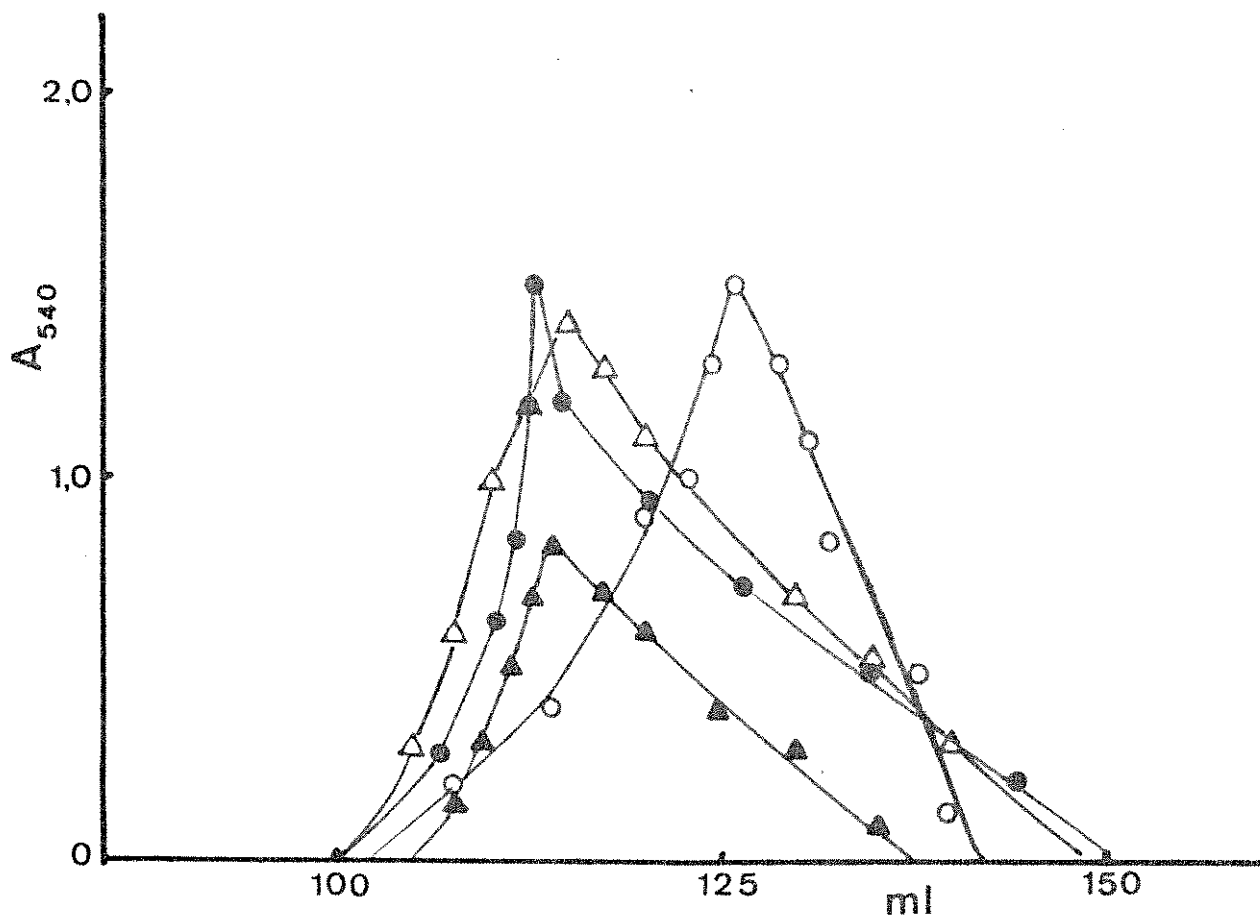


Fig. 5 - Eluição das frações de P. pipae da coluna de sephadex-G-200 usando hemoglobina humana e mioglobina de músculo de baleia como padrão.

- (●---●) hemoglobina humana
- (○---○) mioglobina de músculo de baleia
- (△---△) hemoglobina de P. Pipae - componente I do DEAE-sephadex
- (▲---▲) hemoglobina de P. Pipae - componente II do DEAE-sephadex

pae pelo ligante  $O_2$ . Para a obtenção dos valores de  $\log P_{50}$  do hemolisado total sem cofatores ou na presença de ATP, foi utilizado o método espectrofotométrico descrito. Assim, uma amostra do hemolisado após tratamento foi convenientemente diluída à concentração na ordem de  $5 \times 10^{-5}$  M/heme em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 6,5, colocada no tonômetro e convertida na forma de deoxihemoglobina através da passagem de nitrogênio. Posteriormente foram feitas sucessivas adições de ar (volume conhecido) para a obtenção de saturações fracionadas. Os valores de  $P_{50}$  foram obtidos conforme descritos em MÉTODOS. Os resultados estão na tabela I.

#### EFEITO BOHR

A determinação do efeito Bohr do hemolisado e componente I foi realizado em intervalos de pH de 6,5 a 8,0. As amostras, para isto, foram diluídas em tampão bis-tris-lactato 0,05 M nos seguintes valores de pH: 6,5; 7,0 e 7,5 e 8,0. O equilíbrio das hemoglobinas com o oxigênio em diferentes valores de pH foi expresso como o valor do efeito Bohr através da equação:

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

tanto nas amostras isentas de cofatores como naquelas com ATP  $1 \times 10^{-3}$  M.

TABELA I

Valores do  $\log P_{50}$  e  $n$  (plot de Hill) do hemolisado e dos componentes obtidos na cromatografia em DEAE-sephadex ou tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 6,5 tendo  $O_2$  como ligante.

	$\log P_{50}$	$n$
Hemolisado isento de cofatores	0,37	1,52
Hemolisado + ATP	0,94	1,63
Componente I isento de cofatores	0,50	1,23
Componente + + ATP	0,82	1,36
Componente II isento de cofatores	0,18	1,10
Componente II + ATP	0,98	1,60
Componente III isento de cofatores	0,46	0,96
Componente III + ATP	1,17	1,23



Os resultados obtidos do efeito Bohr do hemolisado sem cofatores foi de  $-0,033$  e quando em presença de ATP,  $-0,30$ . Já no componente I do DEAE-sephadex os resultados foram  $-0,012$  para hemoglobina sem cofatores e  $-0,40$  na presença de ATP (figura 6).

#### EQUILÍBRIO DA LIGAÇÃO DO HEMOLISADO E DOS COMPONENTES COM MOXÓXIDO DE CARBONO

Resultados obtidos com valores de  $\log C_{50}$  expressam outra propriedade funcional, ou seja, a da afinidade da hemoglobina de Pipa pipae pelo ligante monóxido de carbono.

Para a obtenção desses resultados as amostras em concentração da ordem de  $1 \times 10^{-7} M$  em tampão bis-tris-lactato  $0,05 M$  pH  $6,5$  foram transformadas na forma de deoxihemoglobina pela adição de ditionito de sódio. O método utilizado foi o espectrofotométrico. Para tanto a amostra de deoxihemoglobina foram adicionados volumes conhecidos de solução de CO (de título conhecido) devidamente equilibrada e o espectro foi registrado ( $450-400 nm$ ).

Em função das absorbâncias obtidas e de concentração de CO nas amostras foi calculado os  $\log C_{50}$ . Esses valores estão expressos na tabela II.

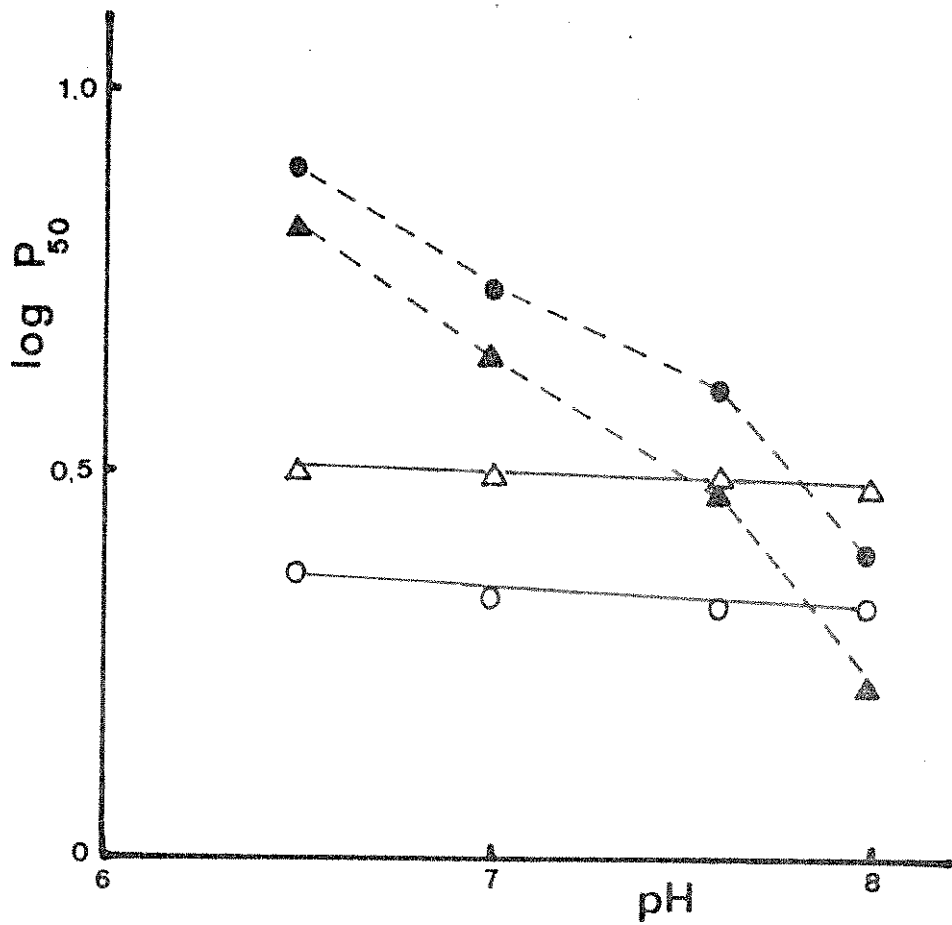


Fig. 6 - Efeito Bohr do hemolisado e do componente I de DEAE-sephadex usando O<sub>2</sub> como ligante.

- (○---○) hemolisado isento de cofatores
- (●---●) hemolisado + ATP
- (△---△) componente I isento de cofatores
- (▲---▲) componente I + ATP

TABELA II

Valores de  $\log C_{50}$  e  $n$  (plot de Hill) do hemolisado e dos componentes obtidos na cromatografia em DEAE-sephadex em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 6,5.

	$\log C_{50}$	$n$
Hemolisado isento de cofatores	-7,23	2,98
Hemolisado com ATP	-6,80	2,80
Componente I isento de cofatores	-7,08	3,01
Componente I com ATP	-6,84	2,11
Componente II isento de cofatores	-7,36	2,63
Componente II com ATP	-7,13	1,83
Componente III isento de cofatores	-7,23	1,66
Componente III com ATP	-7,14	1,65

## EFEITO BOHR DO HEMOLISADO DOS COMPONENTES UTILIZANDO CO COMO LIGANTE

A determinação do efeito Bohr utilizando CO como ligante foi feito no hemolisado e nos componentes I, II e III. A obtenção desses valores ( $H^+$ ) foi feito através do  $\log C_{50}$  encontrado para o hemolisado e componentes tanto em presença de fosfatos orgânicos como quando na ausência com valores de pHs variando de 6,5 a 8,0.

A tabela III e a figura 7 mostram esses resultados.

## CINÉTICA DA REAÇÃO DE DESLOCAMENTO DO CO POR FERRICIANETO NA CARBOXIHEMOGLOBINA

Hemoglobina em presença do agente oxidante ferricianeto reage oxidando o ferro do grupo heme, havendo formação de metahemoglobina.

A oxidação da deoxihemoglobina por ferricianeto é uma reação que se processa rapidamente (Taylor, 1957). Já a oxidação da hemoglobina quando ligada, apresenta-se como reação que se processa mais lentamente (Antonini et alii, 1965). Em uma primeira fase da reação há o deslocamento do ligante (Brunori et alii, 1965) e em uma segunda fase, a formação de metahemoglobina. A primeira fase dessa reação é descrita como uma reação de pseudo-pri

TABELA III

Valores do efeito Bohr do hemolisado e dos componentes obtidos em cromatografia em DEAE-sephadex no intervalo de pH 6,5 a 8,0, tendo CO como ligante.

	Isenta de cofatores	ATP $10^{-3}$ M
Hemolisado	-0,013	-0,306
Componente I	-0,013	-0,20
Componente II	-0,010	-0,193
Componente III	-0,020	-0,26

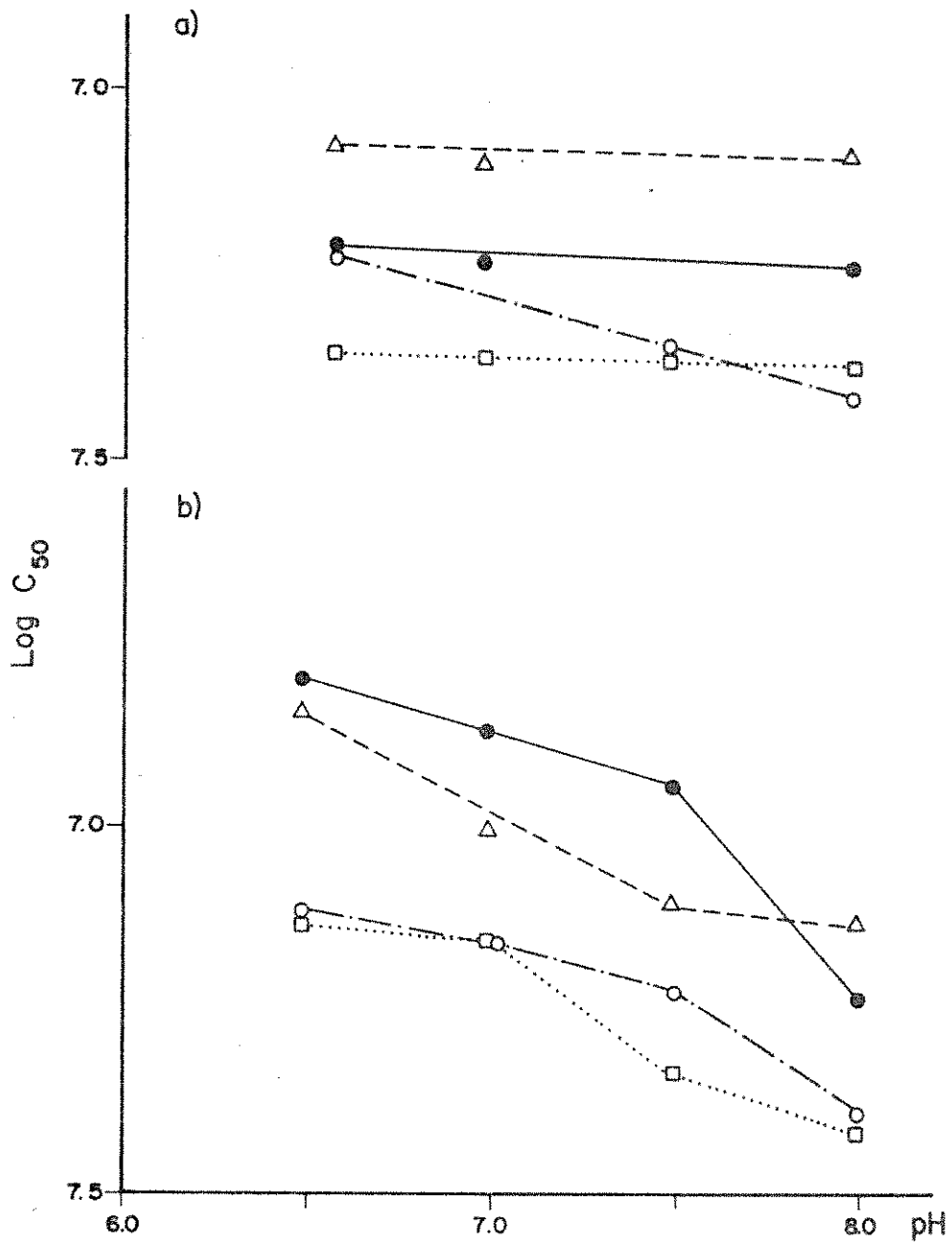


Fig. 7 - Efeito Bohr dos componentes obtidos pela cromatografia em DEAE-sephadex e do hemolisado usando CO como ligante a) isento de cofatores; b) com ATP  $10^{-3} \text{ M}$

- (□---□) hemolisado
- (●---●) componente I
- (△---△) componente II
- (○---○) componente III

meira ordem enquanto que a segunda fase é reação de segunda ordem. Essa reação permite avaliar a cinética de dissociação do CO, talvez com alguma alteração mostrando o valor de K maior do que o medido por outros métodos (Wittenberg et alii, 1967).

Nessa reação de deslocamento do CO foi estudado o hemolisado sem cofatores e na presença de ATP transformado em carboxi hemoglobina, diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 de modo que a concentração final ficasse na ordem  $1 \times 10^{-5}$  M. Em uma cubeta foi colocado 1 ml dessa solução e adicionado 100  $\mu$ l de uma solução de ferricianeto de potássio  $1 \times 10^{-3}$  M. Após rápida agitação foi colocada no espectrofotômetro e o progresso da reação foi registrado por 5-10 minutos em 560 nm.

Com as absorbâncias obtidas foi calculado o valor de:

$$R = \left( \frac{d(A_{560})}{d(t)} \right)$$

esse procedimento foi repetido utilizando-se concentrações menores de hemoglobina.

Em um gráfico foi colocado valores de  $1/R$  nas ordenadas e  $[Fe]/[CO]$  nas abscissas. O ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas fornece o valor de  $1/k$  ( $k'$  = constante cinética da reação de deslocamento do CO da carboxihemoglobina) (Figura 8).

O valor de  $k'$  obtido para o hemolisado sem cofatores

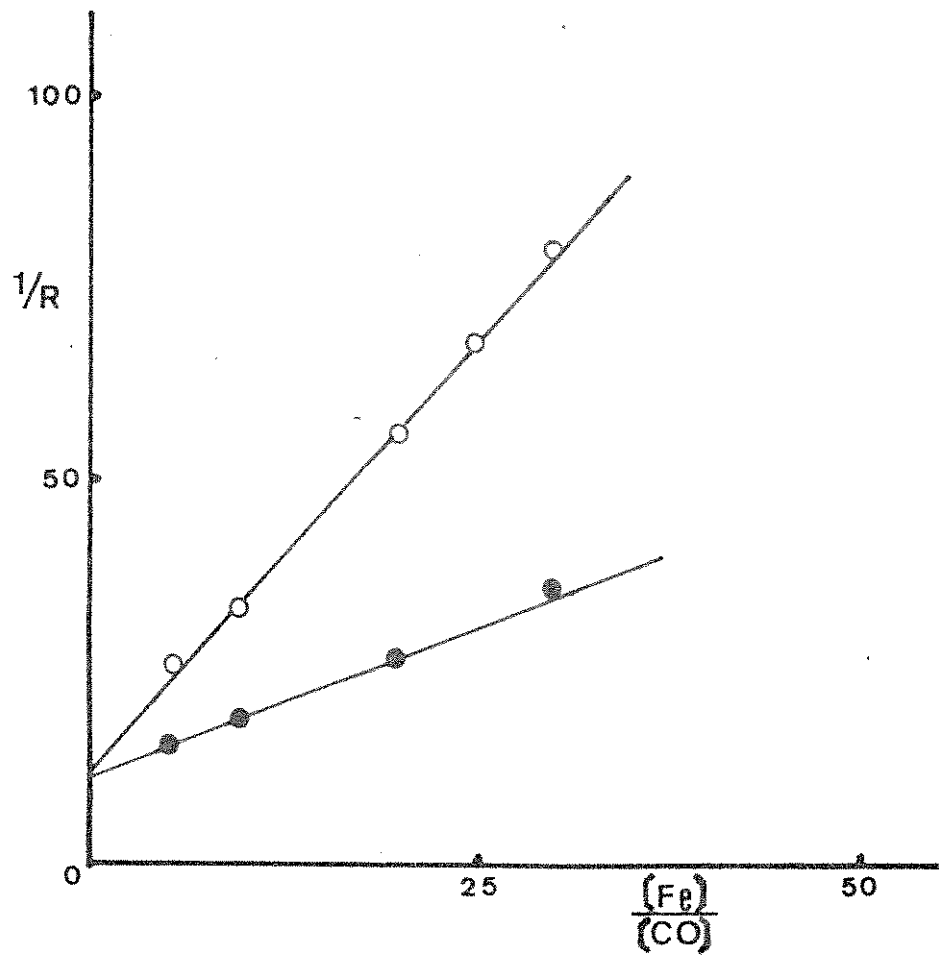


Fig. 8 - Deslocamento do CO na carboxihemoglobina isenta de cofatores (●--●) e com ATP (0--0) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, por ferricianeto de potássio.



e para essa mesma amostra em presença de ATP  $1 \times 10^{-3}$  M foi o mesmo e igual a  $0,09 \text{ min}^{-1}$ .

$$\text{Sendo } L = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$$

onde,  $L$  = constante de equilíbrio;  $k_{\text{on}}$  = constante de associação;  $k_{\text{off}}$  = constante de dissociação e  $L$  foi determinado por:

$\log \frac{y}{1-y} = \log L + \log P$ . Assim, foi feito o cálculo para estimar a constante de associação pois  $k'$  é uma constante que simula o valor de  $k_{\text{off}}$ . Assim pudemos calcular as constantes de associação para a amostra sem cofatores e para a amostra com ATP em concentração saturante que foi  $1,94 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$  e  $8,33 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$  respectivamente.

As constantes de segunda ordem da reação foram:  $1,44 \times 10^9 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$  para a amostra sem cofatores e  $4,459 \times 10^8 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$  com ATP.

#### CINÉTICA DA DESNATURAÇÃO POR URÉIA E BENZOATO

Com a finalidade de comparar a estabilidade das moléculas das hemoglobinas de Pipa pipa (componentes I, II e III) foram estudadas as constantes cinéticas das reações de desnaturação por uréia 7 M (que dissocia a hemoglobina em dímeros) e benzoato de sódio 1 M (que age sobre os grupos hidrofóbicos da superfície da molécula).

Para tanto foi colocado em uma cubeta uma solução de uréia ou benzoato e aí adicionado uma amostra da solução de hemoglobina de modo que no final tivéssemos concentração de hemoglobina na ordem de  $10^{-5}$  M e uréia 7 M ou benzoato 1 M. A reação de desnaturação foi acompanhada pelo espectrofotômetro em 557 nm a fim de aferir a formação de metahemoglobina. O progresso da reação foi acompanhado por 20-30 minutos e o final da reação foi conseguido com auxílio do calor.

Através das concentrações de metahemoglobina formada em função do tempo foi calculada a constante cinética, tratando a reação como sendo de pseudo-primeira ordem.

Os resultados das constantes cinéticas da desnaturação dos componentes I, II e III tanto quando isenta de cofatores como quando em presença de concentração saturante de ATP estão na Tabela IV.

#### DESNATURAÇÃO DA OXI E DEOXIHEMOGLOBINA POR DODECIL SULFATO DE SÓDIO

A fim de comparar a estabilidade das moléculas de hemoglobina ligada e não ligada ao oxigênio e evidenciar a possível transição da forma T em R foi feito o ensaio de desnaturação por dodecil sulfato de sódio (SDS), agente desnaturante energético.

Para tanto foi colocado em um tonômetro 2 ml do hemoli-

TABELA IV

Constantes de pseudo-primeira ordem da reação de desnaturação por uréia 7 M e benzoato de sódio 1 M para os componentes obtidos na cromatografia em DEAE-sephadex.

	Uréia k min <sup>-1</sup>	Benzoato k min <sup>-1</sup>
Componente I isento de cofatores	0,11	0,03
Componente I + ATP	0,11	0,11
Componente II isento de cofatores	0,04	0,03
Componente II + ATP	0,13	0,23
Componente III isento de cofatores	0,01	0,02
Componente III + ATP	0,17	0,27

sado de Pipa pipae isento de cofatores diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 até concentração de  $5 \times 10^{-5} M$  e pela passagem de nitrogênio foi conseguida a forma deoxi. A desnaturação foi iniciada com a adição de 200  $\mu l$  de uma solução de SDS a 1%, isenta de oxigênio. O progresso da reação foi analisado pelo espectro registrado (600-500 nm) em intervalos de tempo. Esse mesmo experimento foi feito com a oxihemoglobina de Pipa pipae.

Esse experimento mostrou que tanto a oxi como a deoxihemoglobina sofrem um processo de desnaturação rápido (menos de um minuto) que abrange 20% das moléculas. Os outros 80% permanecem na forma nativa por várias horas.

O mesmo experimento foi feito com hemoglobina humana e o resultado obtido foi idêntico ao das hemoglobinas de Pipa pipae quando se trabalhou com a forma deoxi, porém com a oxihemoglobina foi observado a mesma reação rápida (20% das moléculas desnaturadas em menos de um minuto) e um processo mais lento de desnaturação onde após trinta minutos apenas 10% das moléculas permaneciam na forma nativa.

#### PARÂMETROS DO ESQUEMA DE ADAIR E DO MODELO MWC

Com os dados da curva de equilíbrio com CO (Figura 9) de cinco experimentos feitos em idênticas condições, os valores de  $y$  e  $p$  foram utilizados para os cálculos dos parâmetros no es-

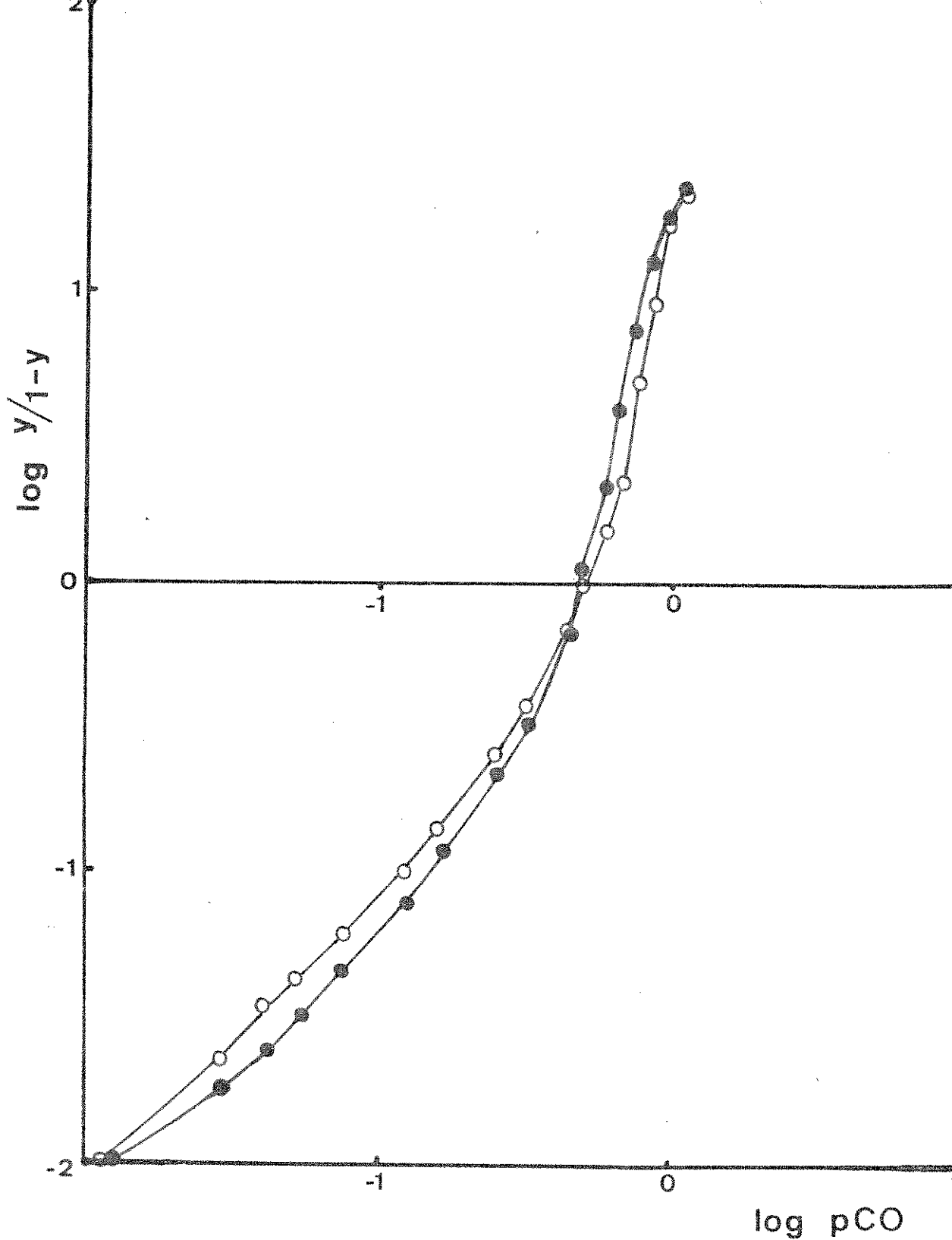


Fig. 9 - Saturação fracional do hemolisado de Pipa pipa isento de cofatores em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 7,0 tendo CO como ligante.

(● -- ●) y experimentais

(0 -- 0) y estimado

quema de Adair. Porém pela não convergência no processo iterativo e pelo fato de uma das incógnitas apresentar valor negativo, o sistema de quatro equações com quatro incógnitas deixou de ser utilizado para o cálculo de um dos  $A_s$ . Assim, o valor de  $A_1$  foi calculado pela função:

$$\frac{y}{1 - y} = A_1 p$$

utilizando-se o menor par de valores ( $y$  e  $p$ ) obtido, conforme descrito por Tyuma et al. (1971).

Desse modo os valores de  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$  foram calculados pelo sistema proposto utilizando-se três equações com três incógnitas. O resultado dessas constantes estão na tabela V.

Na determinação dos valores de  $L$  no modelo alostérico verificamos que quando  $c = 0,4$  os valores de  $L$  são: 18,73 em  $f_4$ , 7,58 em  $f_3$  e 15,36 em  $f_2$  (fig. 10), sendo esse valor dado para  $c$  que melhor se ajusta nas equações para os experimentos com hemolisado isento de cofatores. O valor de  $L$  utilizado foi a média dos valores de  $L$  (13,89) que mostrou, nessas circunstâncias, um desvio padrão de 4,67. Para os experimentos na presença de ATP não foi encontrado nenhum valor de  $L$  e  $c$  que satisfizessem as três equações. Os valores dos parâmetros do modelo MWC também estão na tabela V.

Com os valores de  $L$  e  $c$  foi calculado os valores de  $\frac{T_i}{T_i + R_i}$ . Esses valores foram colocados em gráfico nas ordenadas,

TABELA V

A) Valores dos parâmetros no esquema de Adair obtidos no hemolisado isento de cofatores e com ATP em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 7,0.

B) Valores dos parâmetros no modelo MWC obtidos das constantes intrínsecas de Adair para hemolisado isento de cofatores diluído em tampão bis-tris-lactato 0,05 M pH 7,0.

A		$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	SQ Res.	$P_m$	$P_{50}$	$\Delta F$
Hemolisado isento de cofatores		20,32	22,038	23,93	28,57	0,00053	0,0425	0,42	-947,47
com ATP $10^{-3}$ M		8,16	11,73	8,67	12,24	0,00098	0,0996	0,98	-691,97

B		L	c	i <sub>s</sub>	$\frac{T_1}{T_1+R_1}$	$\frac{T_2}{T_2+R_2}$	$\frac{T_3}{T_3+R_3}$	$\frac{T_4}{T_4+R_4}$
Hemolisado isento de cofatores		13,89	0,44	3,2	0,8583	0,7289	0,5419	0,3423

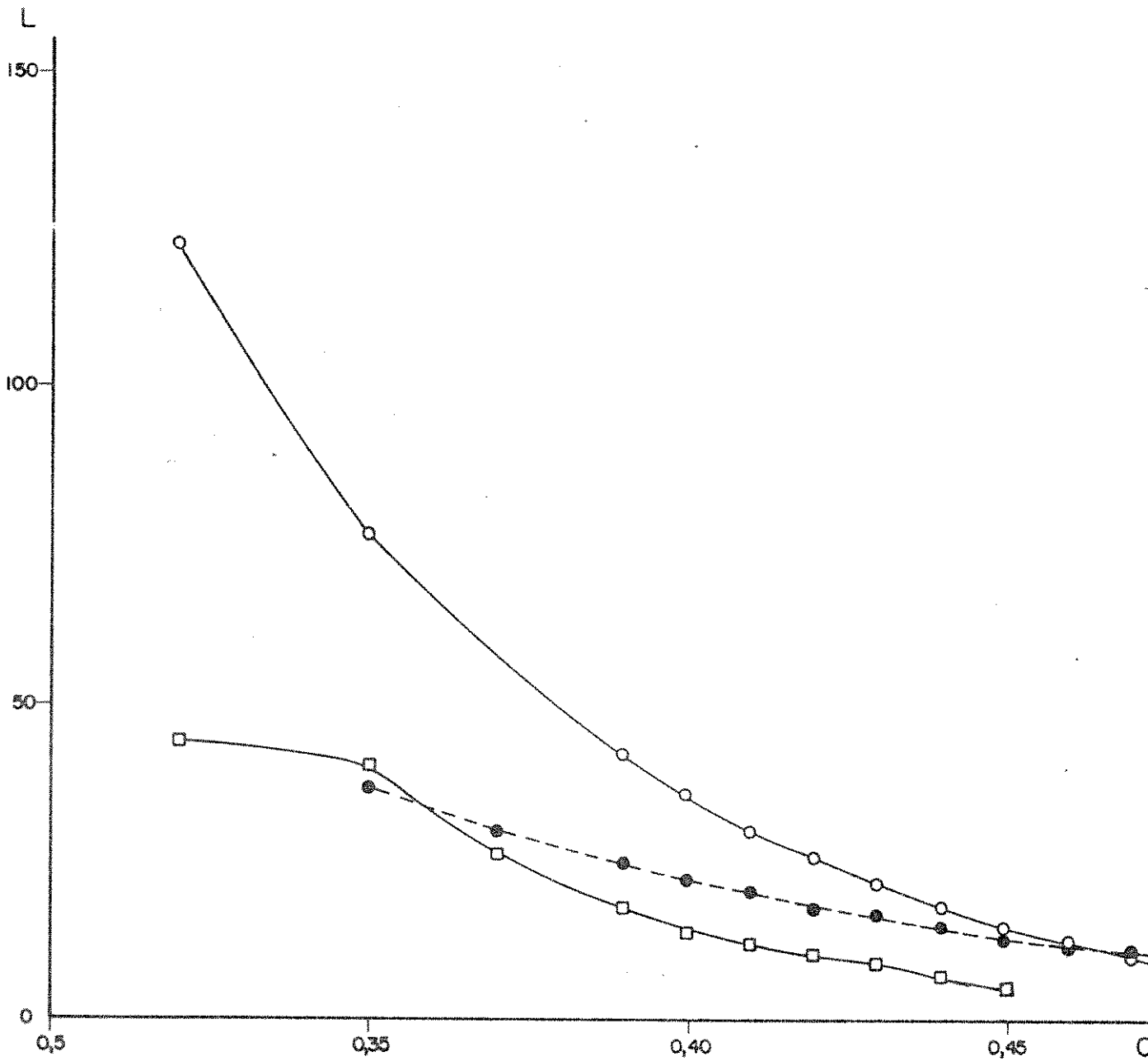


Fig. 10 - Valores de L e c para as equações em  $f_4$  (○ -- ○),  $f_3$  (● -- ●) e  $f_2$  (□ -- □).



colocando-se nas abscissas os valores 1, 2, 3 e 4 correspondentes aos estágios de saturação (Figura 11). Esse gráfico mostra a transição da forma T para forma R.

O valor  $i_s$  que mostra o ponto de transição de T para R foi calculado por  $i_s = - \frac{\log L}{\log c}$  e o valor obtido foi 3,2 (Tabela V).

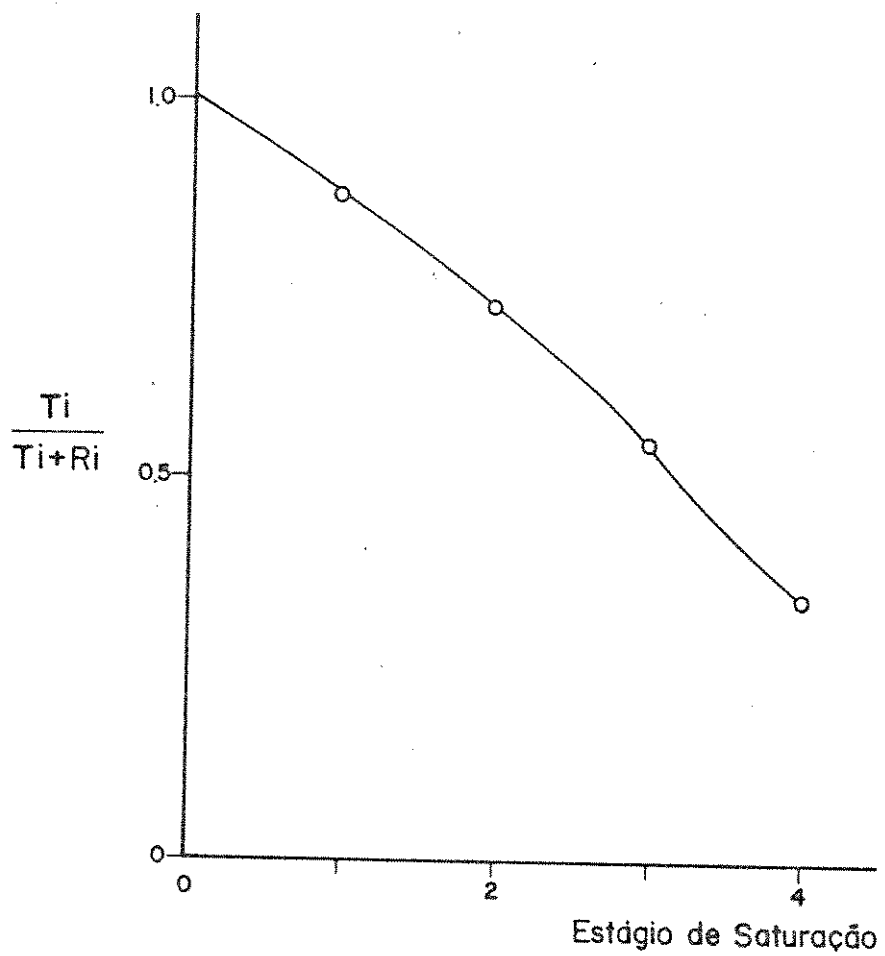


Fig. 11 - Dependência da proporção de T em (T + R) nos estágios de ligação.

## DISCUSSÃO

A análise eletroforética do hemolisado de eritrócitos de Pipa pipa mostrou, tanto em gel de poliacrilamida como em gel de amido, a existência de quatro componentes. Esses resultados foram obtidos com hemolisado de eritrócitos de vários exemplares o que nos possibilitou sugerir a não existência de polimorfismo nas hemoglobinas desses anfíbios.

A separação cromatográfica desses componentes em DEAE sephadex A<sub>50</sub> ou em CM-celulose, conforme descrito em Métodos, confirmou a existência desses quatro componentes bem como permitiu estabelecer a proporção de cada um deles em relação ao total. Assim, observamos que o primeiro componente eluído é que representa o de maior proporção, quando se trabalha em DEAE-sephadex. Utilizando CM-celulose, o componente mais concentrado foi o terceiro, semelhante aos resultados descritos para o hemolisado de Pipa carvalhoi (Meirelles et alii, 1979) que mostrou ser, também, o terceiro componente eluído na cromatografia de CM-celulose o mais concentrado.

Esse número de componentes (quatro) mostrado nas hemoglobinas de Pipa pipa e Pipa carvalhoi (Meirelles e Focesi 1977a) é bastante consistente com outros resultados observados em anfíbios aquáticos como o Xenopus laevis que possui três componentes (Mac Lean e Jurd, 1971) e girino de Rana catesbeiana que possui

de três a cinco (Moss e Ingram, 1968).

A afinidade dessas hemoglobinas pelo oxigênio mostrou  $P_{50}$  de 2,18 mm de Hg quando se trabalhou com hemolisado sem cofatores em tampão bis-tris-lactato 0,05M pH 7,0. Essa afinidade, comparada com a apresentada por hemoglobinas de anfíbios terrestres, é bastante alta, pois Rana catesbeiana, nessas mesmas condições tem um  $P_{50}$  de 13,4 de Hg (Riggs, 1951), Bufo marinus de 42mm de Hg (Prosser e Brown, 1968) porém quando comparada com anfíbios aquáticos ou mesmo com outras espécies aquáticas essa afinidade mostra-se coerente pois girinos de Rana catesbeiana possui um  $P_{50}$  de 4 mm de Hg (Hamada et alii, 1964) e Pipa carvalhoi, de 6 mm de Hg (Meirelles et alii, 1978) e peixes que mostram o valor de  $P_{50}$  em torno de 1 mm de Hg.

A determinação do valor de  $P_{50}$  em três dos quatro componentes de hemoglobina de Pipa pipae mostrou, em pH 7,0 que a afinidade pelo oxigênio é diferente em cada uma das frações estudadas. O quarto componente, por ser eluído em pH muito ácido (4,2) não pôde ser estudado pois a porcentagem de metahemoglobina obtida era muito grande, impossibilitando o estudo de propriedades funcionais.

Foi, também, observado que o  $P_{50}$  não variava, no hemolisado, quando se alterava o pH do meio, entre 6,5 e 8,0. Essa não alteração da afinidade pelo oxigênio quando se varia o pH corresponde a inexistência de efeito Bohr, demonstrando que o hemolisado de eritrócitos de Pipa pipae se comporta como o hemolisado de

outros anfíbios aquáticos como a Pipa carvalhoi (Meirelles e Focesi, 1977b) e girino de Rana catesbeiana (Araki et alii, 1973).

Os valores de  $P_{50}$  e  $n$  (coeficiente de Hill) das frações e hemolisado, tanto na forma isenta de cofatores como também com concentração saturante de ATP, estão na tabela I, onde podemos observar que o efeito do nucleotídeo na diminuição da afinidade da molécula pelo oxigênio é bastante pronunciado. Esse maior efeito maior nos componentes II e III, sendo que no hemolisado a ação do efetor alostérico torna-se menos evidente por causa da predominância da componente I, a de maior concentração.

Para os estudos das propriedades funcionais de cada componente dessas hemoglobinas foram realizadas experiências de equilíbrio com monóxido de carbono. A afinidade da hemoglobina humana por esse ligante é cerca de 200 vezes maior que a afinidade pelo oxigênio (Antonini et alii, 1963) e a reação se processa da mesma maneira, isto é, para cada heme um mol de CO se liga covalentemente (Pauling e Conyell, 1936). As propriedades como efeito Bohr e efeito dos moduladores alostéricos não são alterados quando se trabalha com CO ou  $O_2$  conforme descrito na Introdução. A opção pelo ligante CO, no estudo dessas propriedades foi feita em virtude da quantidade de material disponível para o trabalho ser pequena, e para esses experimentos a concentração de proteína utilizada é da ordem de  $10^{-7}$  M ao contrário dos experimentos de equilíbrio com  $O_2$  que requer concentrações na ordem de  $10^{-5}$  M. Além disso, no equilíbrio com CO é possível se obter saturação fra-

cionada correspondentes aos extremos da curva, isto é, valores de  $\bar{Y}$  bastante próximos de 0 e bastante próximos de 1, que nos permitiu avaliar outros parâmetros no processo de saturação da molécula pelo ligante. Assim, foram realizadas as experiências para a determinação do efeito Bohr e efeito de fosfatos no hemolisado e nas frações usando CO como ligante.

Em pH 7,0 o hemolisado mostrou um valor de  $\log C_{50} = -7,24$  que corresponde a uma pressão de CO de  $5,7 \cdot 10^{-8}$  M isto é,  $P_{50}(\text{CO}) = 1,1$  mm de Hg. A conversão da concentração de CO em pressão foi feita usando-se o cálculo de Ainsworth e Ford (1968), onde uma solução de CO  $1,36 \cdot 10^{-6}$  M corresponde a uma pressão de 1 mm de Hg. Nas mesmas condições experimentais  $P_{50}(\text{O}_2) = 2,19$  mm de Hg significando que a afinidade da molécula pelo monóxido de carbono, nessas condições é cerca de 50 vezes maior.

Os valores de  $C_{50}$  do hemolisado e componentes (mostrado na tabela II) quando comparado com os valores de  $P_{50}$  (tabela I) evidenciam a maior afinidade das hemoglobinas pelo monóxido de carbono guardando sempre a mesma proporção.

Trabalhando com cada componentes obtidos por cromatografia em DEAE sephadex observamos que componentes I, II e III apresentam o mesmo efeito Bohr do hemolisado, isto é, ausência desse efeito nas hemoglobinas sem cofatores e o efeito Bohr pronunciado quando em presença de concentração saturante de ATP (Tabela III).

Esses resultados, dos componentes e do hemolisado são con-

sistentes, pois na presença do nucleotídeo a afinidade da molécula pelo ligante diminui quando há interação hemoglobina-fosfato. Essa interação ocorre mais facilmente em pH ácido, diminuindo a afinidade nessas circunstâncias. Já em pH alcalino a afinidade não se altera pela dificuldade de interação do fosfato a hemoglobina (Benesch et alii, 1969).

O efeito do modulador alostérico, ATP, tem sido discutido em termos da existência de sítios de fosfato na molécula. Assim nas hemoglobinas que possuem esse sítio, a afinidade da molécula pelo ligante é diminuída. Esse sítio, descrito por Perutz, (1970) fica situado entre as duas cadeias  $\beta$  da hemoglobina, e que por ligações eletrostáticas, possibilita a ligação de polifosfatos orgânicos. Eles fazem ponte salina com Val  $\beta 1$ , His  $\beta 2$  e His  $\beta 143$  da cadeia I com a Lys  $\beta 82$  da outra cadeia (Arnone, 1972) o que implica na diminuição da afinidade da molécula pelo ligante. Evidentemente, moléculas que apresentam a mesma estrutura primária na região do sítio de fosfato mostram o efeito de seus moduladores, na afinidade pelo ligante. Nas hemoglobinas sem cofatores, de Pipa pipae, o efeito Bohr nulo, torna-se bastante alterado quando em presença de ATP. A esse efeito Bohr, denominado efeito Bohr latente (Araki et alii 1973) ou designado como a segunda parte do efeito Bohr (Riggs, 1971) é observado em algumas hemoglobinas de anfíbios aquáticos como o girino de Rana catesbeiana (Araki et alii, 1973) e Pipa carvalhoi (Meirelles et alii, 1978).

A existência desse efeito também observado no hemolisa-

do e componentes de Pipa pipa, podem ser analisados como controles fisiológicos da respiração e mostram a existência de alguns resíduos de aminoácidos comuns tanto na hemoglobina desses anfíbios como na de alguns mamíferos.

A cooperatividade, avaliada pelos valores de  $\underline{n}$  mostrou ser positiva em todos os experimentos pois esse valor sempre foi maior que a unidade. Analisando esses dados, alguns valores nos chamaram a atenção: o primeiro é que, nos equilíbrios com oxigênio,  $\underline{n}$  aumenta conforme aumenta o pH, isto é, em pH 6,5 a cooperatividade é menor que em pH 8,0. O segundo fato é que nos equilíbrios com CO o valor de  $\underline{n}$  sempre foi maior que nos equilíbrios com O<sub>2</sub>, sendo em pH ácido mais acentuada essa diferença. Finalmente podemos observar que a cooperatividade, avaliado por  $\underline{n}$ , na presença do efector alostérico, ATP, aumenta nos equilíbrios com O<sub>2</sub> quando comparada com a proteína sem cofatores e diminui nos equilíbrios com CO. Esses fatos podem ser analisados em função do número de prótons liberados durante a saturação da molécula pelo ligante. A variação de  $\underline{n}$  em função da variação de pH já foi descrita (Bunn, 1972 e Tyuma, 1973b). Para a elucidação desse fato já havia sido demonstrado que a liberação de prótons e a oxigenação ocorrem como função não linear (Brunori et alii, 1965) e que a heterogeneidade das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são mais acentuadas em pH baixo (Brunori et alii, 1968). Essa heterogeneidade das cadeias foi demonstrada por Banerjee e Cassoly, (1969) pois as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  possuem o mesmo potencial de redução em pH 8,0, mas em pH ácido,



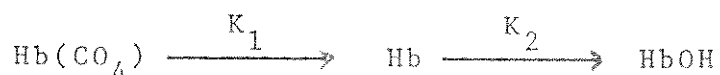
o potencial de redução da cadeia  $\beta$  é maior. A não linearidade na liberação de prótons e saturação fracional da hemoglobina ocorre apenas com o ligante oxigênio. Com monóxido de carbono essa função é linear (Antonini et alii, 1965; Gray, 1970 e Olson e Gibson, 1973) pois cadeia  $\alpha$  e  $\beta$  são igualmente saturadas pelo CO (Gray e Gibson, 1971a). Em outras palavras, oxigênio e monóxido de carbono ligam-se as hemoglobinas de maneira similar, diferindo apenas na afinidade e em alguns aspectos cinéticos (Gibson, 1973).

Esses fatos explicam nossos resultados que mostram a variação de  $\bar{n}$  com a variação do pH nos equilíbrios com oxigênio e a maior cooperatividade da molécula nos equilíbrios com CO. A menor cooperatividade nos equilíbrios com monóxido de carbono na presença de ATP pode ser analisada de acordo com os trabalhos de Gray e Gibson (1971a e 1971b) que sugerem a ligação do CO mais rápida na cadeia  $\alpha$  nas hemoglobinas tratadas com fosfatos orgânicos, isto é, monóxido de carbono liga-se igualmente as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das hemoglobinas isentas de cofatores, porém mostra uma ligeira preferência pela cadeia  $\alpha$  nas hemoglobinas saturadas pelos polifosfatos induzindo uma heterogeneidade nas cadeias. Já no equilíbrio com oxigênio, o ligante mostra preferência pela cadeia nas hemoglobinas isentas de cofatores e na presença de fosfatos orgânicos essa preferência é mais acentuada (Johnson & Ho, 1974).

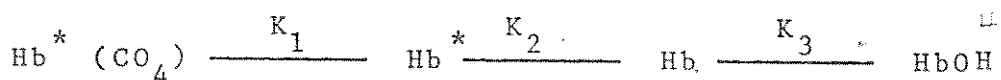
A constante cinética de deslocamento do CO na hemoglobina isenta de cofatores e na tratada com ATP mostrou valores iguais, o que era de se esperar, pois o efector alostérico embora possa al

terar o processo de associação é indiferente no processo de dissociação. Já na constante de associação, calculada em função das constantes de equilíbrio e de dissociação (deslocamento de CO) a presença de ATP induz uma diminuição de, aproximadamente, 2 - 3 vezes, isto é, de  $1,98 \cdot 10^8 \text{ min}^{-1}$  para  $8,33 \cdot 10^7 \text{ min}^{-1}$ . Estas constantes de associação do CO na hemoglobina de Pipa pipae quando comparada com a constante de associação do CO na hemoglobina humana, que é de  $4,5 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1}$  obtido por experiências de cinética rápida (Gibson, 1959) evidencia a maior facilidade de combinação desse ligante em Pipa pipae sugerindo ser esse animal menos resistente ao monóxido de carbono.

A formação de metahemoglobina pela ação de ferricianeto mostrou constante cinética de dissociação maior na molécula isenta do cofator. Por esse resultado podemos supor que a reação se faz em dois passos:



isto é, a carboxihemoglobina é transformada em deoxihemoglobina e esta a metahemoglobina. Em presença de ATP, a carboxihemoglobina ligada ao fosfato orgânico se transforma em deoxihemoglobina ligada também ao nucleotídeo que deve liberar esse cofator antes de se transformar em metahemoglobina. A reação se passaria em três passos:



onde  $\text{Hb}^*$  representa a hemoglobina ligada ao efetor existindo, assim, um estágio intermediário a mais no deslocamento do CO da hemoglobina tratada por ATP, o que explicaria a velocidade de formação de metahemoglobina ser mais lenta nessa condição. Esses dados estão consistentes com algumas observações feitas em nosso laboratório pois hemoglobinas estocadas a 4°C mostram ser menos estáveis quando estocadas na forma isenta de íons. A hipótese de existência desses três passos na reação de formação de metahemoglobina carece ser melhor estudada.

Para melhor elucidar nossos estudos da estrutura das moléculas de hemoglobina de Pipa pipae, com ou sem ATP, resolvemos analisar o comportamento destas em presença de agentes desnaturantes. Pela constante cinética de desnaturação (tabela V) podemos observar a sensível alteração do valor  $K'$  nas hemoglobinas com ATP. É interessante observar componentes I, II e III, que, como já discutido, evidenciam a existência de sítios de fosfato, mostrando-se bastante resistentes aos agentes desnaturantes, uréia e benzoato, quando isentos de cofatores ao passo que na presença do modulador alostérico tornam-se mais sensíveis a desnaturação (tabela IV). Curioso, também, é observar que as amostras tratadas pelos agentes desnaturantes estavam na forma de oxihemoglobina e o comportamento dessas moléculas foram sensivelmente diferentes quando tratadas ou não com ATP. A ação dos polifosfatos nas

hemoglobinas é descrita como sendo em um sítio da cadeia da deo-  
xihemoglobina (Benesch et alii, 1968) possibilitando, na forma  
oxi, apenas a ligação de fosfatos que estejam na forma de pirido-  
xal, através de ligação no NH terminal da cadeia  $\alpha$  (Benesh et  
alii, 1972 e Benesch et alii, 1973) o que não implica em alterações  
alostéricas.

Esses resultados da desnaturação além do pequeno valor  
de  $n$  observado nos experimentos de equilíbrio com oxigênio (tabe-  
la I) nos fez suspeitar de uma alta afinidade da oxihemoglobina  
de Pipa pipae pelo fosfato orgânico que são capazes de induzir al-  
terações conformacionais na molécula, tornando-se mais sensível a  
desnaturação, isto é, o ATP, seria capaz de provocar alterações  
conformacionais na hemoglobina mesmo quando saturada pelo ligan-  
te. De acordo com o modelo alostérico (Monod et alii, 1965) que  
propõe a existência de duas formas, T e R, coexistindo em uma so-  
lução, e podendo o equilíbrio destas estarem deslocado para uma  
ou outra forma, e conforme descrito por Rubin e Changeus (1966)  
que o efector alostérico se liga mais facilmente a forma T que a  
forma R, podemos, então, suspeitar serem as hemoglobinas de Pipa  
pipae estabilizadas na forma T.

Essa hipótese possibilita-nos explicar as diferentes  
constantes de desnaturação da oxihemoglobina isentas de cofatores  
e com ATP pois sendo estável na forma T, a oxihemoglobina pode se  
ligar ao modulador alostérico.

Para comprovar essa hipótese foram feitos ensaios de des

naturação da oxi e deoxihemoglobina com SDS. O resultado obtido mostrou que a oxi e deoxihemoglobina de Pipa pipae possuem o mesmo comportamento que a deoxihemoglobina humana frente ao agente desnaturante, isto é, bastante resistente enquanto que a oxihemoglobina humana é mais sensível.

Esses fatos favorecem nossa hipótese pois oxi e deoxihemoglobina de Pipa pipae se comportam da mesma maneira, sugerindo serem as duas formas de estrutura "compacta", resistente, como a deoxihemoglobina humana (forma T), enquanto que a oxihemoglobina humana mostra-se menos resistente (forma R).

Esses resultados vieram enfatizar melhor a hipótese de serem as hemoglobinas de Pipa pipae configuradas na forma T.

Em vista do exposto resolvemos estudar a reação da hemoglobina com o CO em termos das constantes intrínsecas de associação (Adair, 1925) e desses dados avaliar o parâmetro  $L$  ( $L = \frac{T}{R}$ ) do modelo alostérico de (Monod et al, 1965). Os resultados desses experimentos serviram-nos para obter a relação das formas T e R de uma maneira aproximada uma vez que nos experimentos a reação hemoglobina - CO não deve ter acontecido de maneira homogênea, isto é, quando se adicionou a solução de monóxido de carbono na cubeta contendo a solução de hemoglobina, a reação se processa de maneira muito rápida, impedindo um contacto amplo e homogêneo entre os reagentes. Assim, provavelmente, se obteve formação de carboxihemoglobina (com as moléculas totalmente saturadas) em parte da mistura ao invés de uma distribuição melhor do ligante, pela

solução, que provocaria a saturação de maior número de moléculas de hemoglobina bem como a saturação parcial de outra grande quantidade de moléculas. Dada a natureza essencialmente irreversível dessa reação, o estabelecimento do equilíbrio entre as formas totalmente saturadas e as formas parcialmente saturadas tornou-se praticamente impossível. Mesmo assim, alguns parâmetros foram de terminados e puderam ser analisados (tabela V).

Das constantes intrínsecas da saturação da hemoglobina isenta de cofatores pelo ligante CO podemos observar que  $K_2$  mostra um valor bem próximo ao das demais constantes diferindo dos valores encontrados com hemoglobina humana isenta de cofatores tendo  $O_2$  como ligante. Os resultados com hemoglobina humana mostram valores das constantes às vezes até contrastantes, por exemplo Tyuma et alii (1971) encontrou as seguintes ( $K_1 = 0,079$ ;  $K_2 = 0,295$   $K_3 = 0,75$  e  $K_4 = 4,35$  e já o mesmo autor em 1973 (Tyuma et alii, 1973a) relata outros valores ( $K_1 = 0,114$ ;  $K_2 = 0,165$ ;  $K_3 = 1,117$ ; e  $K_4 = 4,04$ ). Pela impossibilidade de podermos comparar esses valores da hemoglobina humana com os nossos em virtude das diferenças de condições de cada um (diferença no ligante utilizado) podemos apenas comparar a variação da grandeza das constantes de um mesmo experimento. Assim, em experimentos com hemoglobina humana observamos que  $K_4$  é 30-50 vezes maior que  $K_1$  enquanto que na Pipa pipae essa proporção é de 1,5 vezes.  $K_2$  na humana toma um valor pouco superior a  $K_1$  (no máximo três vezes) enquanto que em Pipa pipae essa relação é pouco menor. Enfim, os valores das constantes na

hemoglobina humana crescem de  $K_1$  para  $K_4$  semelhantes aos nossos resultados. Podemos observar, também, que em hemoglobina de Pipa pipae as constantes são proporcionais entre si diferentes dos resultados da humana que mostra um exagerado aumento da constante no último estágio de ligação.

A determinação dessas constantes em hemoglobina na presença de concentração saturante de ATP mostrou as 4 constantes menores que na hemoglobina isenta de cofatores sugerindo que o ATP não necessariamente se desliga da molécula pela saturação com CO. Na humana o efector alostérico diminui os valores das 3 primeiras constantes, mantendo a quarta constante igual a da hemoglobina isenta de cofatores sugerindo que o efector é liberado após a ligação do terceiro ligante, o fato é evidenciado por outras técnicas (Huestis e Raftery, 1972).

Outros parâmetros que podemos citar são:  $P_m$  que mostrou ser semelhante a  $P_{50}$  tanto nas moléculas isentas de cofatores como com ATP e a variação de energia livre que mostrou ser maior na hemoglobina tratada com o modulador alostérico, como era esperado.

Analisando nossos dados dentro do modelo MWC podemos observar que o valor de  $L$  ( $L = \frac{T}{R}$ ) encontrado na hemoglobina de Pipa pipae isenta de cofatores indica que a forma T é predominante. Considerando que dentro dos parâmetros utilizados o valor de  $c$  ( $c = \frac{K_T}{K_R}$ ) se mantém constante mesmo quando algumas condições

são alteradas como a força iônica e o pH (Edelstein, 1971). A transição de uma forma para outra no processo de saturação (T—R) é avaliada pela alteração de L na equação  $i_s = -(\log L)/\log c$  (Hopfield et alii, 1971) ou simplesmente pelo gráfico de  $\frac{T_i}{T_i + R_i}$ . Por esse gráfico podemos notar que só há transição de forma T para formar R próximo ao quarto estágio de ligação, o que permite se afirmar que a forma T se mantém, mesmo após a saturação. O valor  $i_s$  mostra também um valor próximo de quatro o que indica que a transição de T para R se dá, teoricamente, próximo a ligação do último ligante.

A razão  $\frac{T_4}{T_4 + R_4}$  dada por  $\frac{L_c^4}{L_c^4 + 1}$  mostra um valor de 0,34 indicando que após a saturação 34% das moléculas permanecem na forma T.

A análise dos parâmetros do modelo MWC permitiu mais uma vez evidenciar a possível estrutura tensa da hemoglobina de Pipa pipae que tanto na forma saturada como quando não ligada mostra-se na mesma configuração alostérica. Infelizmente não nos foi possível determinar os valores de L e c para a hemoglobina de Pipa pipae na presença de efector alostérico ATP, pois nenhum par de valores para L e c foi capaz de satisfazer as equações para o cálculo de  $f_4$ ,  $f_3$  e  $f_2$ .

A análise matemática das constantes de Adair mostraram que a variação do valor de  $\bar{Y}$  calculado com o valor de  $y$  obtido experimentalmente é bem pequena, isto é, pouca variação possivelmen



te por erro experimental pode ser observada. Esses dados podem ser descritos pela soma dos quadrados dos desvios que apresentou um valor muito pequeno (tab. V).

Nossos resultados, embora preliminares, serviram para caracterizar as hemoglobinas de Pipa pipa que julgamos ser um modelo dos mais interessantes quer pelas correlações que se possa fazer com o habitat do animal, quer pelas características dentro do modelo alostérico ou mesmo de suas propriedades de apresentar apenas efeito Bohr latente e grande efeito de ATP. Além de caracterizar físico-quimicamente a proteína procuramos descrevê-la do ponto de vista conformacional, ficando-nos claro que a forma T é predominante. Evidentemente os resultados foram prejudicados pelas razões discutidas principalmente de ordem técnica. Temos a impressão contudo que uma aproximação bem razoável pode ser alcançado. Melhores condições experimentais devem ser procurados no futuro para termos segurança nos valores, principalmente das constantes de Adair por nós delineadas.

Nesse trabalho podemos sugerir o uso de outras técnicas que permitam comprovar nossos achados através de estudos com outros ligantes e avaliação dos parâmetros do modelo MWC e do esquema de Adair por técnicas de cinética rápida quer na associação como dissociação de ligantes ou mesmo através de estudos dos parâmetros magnéticos e cristalográficos. Além de comprovação de nossos resultados outros estudos dessas hemoglobinas parece-nos interessantes a fim de se caracterizar as estruturas dessas hemoglobinas bem como correlacionar com suas implicações fisiológicas.

## RESUMO

A caracterização de três dos quatro componentes das hemoglobinas de Pipa pipae obtidos pela cromatografia em DEAE-sephadex mostrou que os três componentes bem como o hemolisado de eritrócitos apresentam uma afinidade pelo oxigênio na ordem de 4 mm de Hg quando em tampão bis-tris lactato 0,05M pH 7.0. A afinidade dessas moléculas pelo ligante CO apresenta uma afinidade 50 vezes maior que a apresentada pelo oxigênio e o efeito Bohr estudado nos equilíbrios com CO mostra-se praticamente nulo nas hemoglobinas isentas de cofatores e um aumento desse efeito para -0,3 é encontrado quando na presença de ATP  $10^{-3}$ M, sugerindo a existência de sítios de fosfato nos três componentes estudados.

A cinética de desnaturação por benzoato de sódio 1M e uréia 7M mostra existir uma grande resistência da molécula quando isenta de cofatores e existir sensibilidade quando em presença do efector alostérico. Com o agente desnaturante SDS a 1%, tanto a forma oxí como a forma deoxí se comportam de maneira semelhante à deoxihemoglobina humana, que sofre desnaturação de 20% das moléculas com esse tratamento, ao contrário da oxihemoglobina humana, que desnatura cerca de 80% das moléculas.

Suspeitando ser as hemoglobinas de Pipa pipae estabilizadas na forma T (do modelo MWC) mesmo após a saturação, foi estudado seu comportamento frente ao ligante CO dentro dos parâmetros

do esquema de Adair calculando-se as constantes intrínsecas de as sociação. Com esses dados alguns parâmetros do modelo alostérico foram calculados e assim evidenciado que após a saturação 33% das moléculas permanecem na forma T, indicando ser essa a forma predo minante em quase todo o processo de saturação.

As constantes cinéticas de associação e dissociação do CO obtidas pelo deslocamento do ligante por solução de ferricianeto também foi estimada.

## SUMMARY

Three out of the four components of hemoglobin of Pipa pipae, obtained by DEAE-sephadex chromatography, were studied. The three components and the whole hemolysate showed an oxygen affinity around 4 mm of Hg when in bis-0,05M bis-tris-lactate buffer pH 7,0. The affinity of the molecules to CO binding is 50 times greater than that of the oxygen. The Bohr effect, studied in CO equilibria is, in practice, equal to zero in hemoglobins without cofactors. An increase of that effect of zero to -0,3 is observed in the presence of  $10^{-3}$  M of ATP, which indicates the existence of phosphate sites in the three components.

The kinetics of denaturation by 1 M sodium benzoate and 7 M urea shows that there is a strong resistance of the stripped molecule to denaturation and there is sensibility when in the presence of the allosteric effector. With the denaturing agent SDS (1%) where both the oxy form and the deoxy form behave as the human deoxyhemoglobin which shows denaturation of 20% of the molecules, with the same treatment.

Supposing that the hemoglobins of Pipa pipae are established in the T form (MWC model) even after the saturation, their behaviour in the presence of the CO ligands was studied according to Adair's theory. The intrinsic association constants were

computed. By using these results, some parameters of the allosteric model were calculated, showing that after the saturation, there are 35% of the molecules in the T form.

The kinetics constants of association and dissociation of CO, obtained through displacement of the ligand with ferricyanet solution, were also estimated.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAIR, G. S. (1923) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M. 1971
- ADAIR, G. S. (1925) The hemoglobin system. J. Biol. Chem. 63:  
529-545.
- AINSWORTH, S. e FORD, W. H. (1968) Reaction of partially oxidised  
hemoglobin solution. Bioch. Biophys. Acta 160:18-31.
- AIROLDI, L. P. S.; VIEIRA, H. F.; MEIRELLES, N.C. e FOCESI, Jr.A.,  
(1978) Pipa carvalhoi hemoglobins. IV. Effect of denaturing  
agents. IRCS Med. Sci. 6:227.
- ALLEN, D.W.; GUTHE, K.F. e WYMAN, J. (1950) Further studies on  
the oxygen equilibrium of hemoglobin. J. Biol. Chem. 187:393-  
410.
- ANDERSON, S.R. e ANTONINI, E. (1968) The binding of carbon  
monoxide by human hemoglobin; proof of validity of the spectro-  
photometric method and direct determination. J. Biol. Chem.  
243:2918-2920.

- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C. e ROSSI-FANELLI, A. (1963) Studies on the relation between molecular and functional properties of hemoglobin. J. Biol. Chem. 238:2950-2957.
- ANTONINI, E.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; WYMAN, J. e ROSSI-FANELLI, A. (1965) The properties and interactions of the isolated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of human haemoglobin. IV. Observations on the equilibria and kinetics of the reactions with gases. J. Mol. Biol. 12:375-384.
- ANTONINI, E. e BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 1971.
- ARAKI, T.; KAJITA, A.; SHUKUYA, R. (1973) Latent Bohr effect in the tadpole haemoglobin of Rana catesbeiana. Nature New Biology 242:254-256.
- ARNONE, A. (1972) X-ray diffraction study of binding of 2-3-di-phosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature 237:146-149.
- BALDWIN, J.M. (1975) Structure and function of haemoglobin. Prog. Biophys. Molec. Biol. 29:225-320.

- BANERJEE, R. e CASSOLY, R. (1969) Preparation and properties of the isolated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of human hemoglobin in the ferri state. Investigation of oxidation-reduction equilibria. J. Molec. Biol. 42:337-349.
- BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H.; ASCENZI, P.; FOCESI, A. e BRUNORI, M. (1976) Oxygen and carbon monoxide binding to myoglobin from the Dolphin fish Coryphaena hippurus. FEBS-Letters 65: 361-364.
- BARCROFT, J. e ROBERTS, A. (1909-1910) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M. 1971.
- BENESCH, R.; BENESCH, R.E. e YU, C.I. (1968) Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. US 59:526-532.
- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. e YU, C.I. (1969) The oxigenation of hemoglobin in the presence of 2-3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. Biochemistry 8:2567-2571.
- BENESCH, R.E.; BENESCH, R.; RENTHAL, R.D. e MAEDA, N. (1972) Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. Biochemistry 11:3576-3581.



- BENESCH, R.E.; YUNG, S.; SUZUKI, T.; BAUER, C. e BENESCH, R. (1973)  
Pyridoxal compounds as specific reagents for the  $\alpha$  and  $\beta$  N-termini of hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. US 70:2595-2599.
- BOLTON, W. e PERUTZ, M.F. (1970) Three dimensional <sup>o</sup> fourier synthesis of horse deoxyhaemoglobin at 2,8 Å resolution. Nature 228:551-562.
- BRUNORI, M. (1966) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M., 1971.
- BRUNORI, M.; WYMAN, J.; ANTONINI, E. e ROSSI-FANELLI, A. (1965)  
Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J. Biol. Chem. 240 :3317-3324.
- BRUNORI, M.; ALFSEN, A.; SAGGESE, U.; ANTONINI, E. e WYMAN, J. (1968) Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J. Biol. Chem. 243:2950-2954.
- BUNN, H.F.; BRADLEY, T.B.; DAVIS, W.E.; INSDALE, J.W.; BURKE, J. F.; BECK, W.S. e LAVER, M.B. (1972) Structural and functional studies on hemoglobin Bethesda ( $\alpha_2 \beta_2$  <sup>145</sup> His): A variant associated with compensatory erythrocytosis. J. Clin. Invest.
- COURTICE, F.C. e DOUGLAS, C.G. (1947) The ferricyanide method of blood-gas analysis. J. Physiol. 105:345-356.

- DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121:404-427.
- DOUGLAS, C.G.; HALDANE, J.S. e HALDANE, J.B.S. (1912) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M., 1971.
- EDELSTEIN, S.J. (1971) Extensions of the allosteric model for haemoglobin. *Nature* 230:224-227.
- FERMI, G. (1975) citado por BALDWIN, J.M., 1975.
- FORBES, W.H. e ROUGHTON, F.J.W. (1931) The equilibrium between oxygen and haemoglobin. I. The oxygen dissociation curve of dilute blood solutions. *J. Physiol.* 71:229-256.
- GIBSON, Q.H. (1959) citado por BALDWIN, J.M., 1975.
- GIBSON, Q.H. (1970) The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *J. Biol. Chem.* 245:3285-3288.
- GIBSON, Q.H. (1973) The contribution of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains to the kinetics of oxygen binding to and dissociation from hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 70:1-4.

- GRAY, R.D. (1970) The kinetics of the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. J. Biol. Chem. 245:2914-2921.
- GRAY, R.D. e GIBSON, Q.H. (1971a) The effect of inositol hexaphosphate on the kinetics of CO and O<sub>2</sub> binding by chemically modified hemoglobins. J. Biol. Chem. 246:5176-5180.
- GRAY, R.D. e GIBSON, Q.H. (1971b) The effect of inositor hexaphosphate on the kinetics of CO and O<sub>2</sub> binding by human hemoglobin. J. Biol. Chem. 246:7169-7174.
- HAMADA, K.; SAKAI, Y.; SHUKUYA, R. e KAZIRO, K. (1964) Biochemical metamorphosis of hemoglobin in Rana catesbeiana. I. Purification procedures and properties of hemoglobins from bullfrog and tadpole erythrocytes. J. Biol. Chem. 55:636-642.
- HARTRIDGE, H. e ROUGHTON, F.J.W. (1925) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M., 1971.
- HERFELD, J. e STANLEY, H.E. (1972) A general model of cooperativity and its application to DPG inhibition of hemoglobin oxygenation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48:307-313.
- HILL, A.V. (1910) The possible effects of the aggregation of the

- molecules of hemoglobin on its dissociation curves. J. Physiol. 40:IV.
- HOFFMANN, R. e VIEIRA, S. Análise de regressão: uma introdução à econometria. HUCITEC-Ed. da USP, São Paulo, 1977.
- HOPFIELD, J.J.; SHULMAN, R.G. e OGAWA, S. (1971) An allosteric model of hemoglobins. I. Kinetics. J. Mol. Biol. 61:425-444.
- HUESTIS, W.H. e RAFTERY, M.A. (1972) "F-NMR studies of oxygen binding to hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49:1358-1365.
- IMAI, K. (1973) Analysis of oxygen equilibria of native and chemically modified human adult hemoglobins on the basis of Adair's stepwise oxygenation theory and the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. Biochemistry 12:798-808.
- IMAI, K. (1974) Hemoglobin Chesapeake (92  $\alpha$  arginine  $\rightarrow$  leucine): Precise measurement and analysis of oxygen equilibrium. J. Biol. Chem. 249:7609-7613.
- JOELS, N. e PUGH, L.G.C.E. (1958) The carbon monoxide dissociation curve of human blood. J. Physiol. 142:63-77.

- JOHNSON, M.E. e HO, C. (1974) Effects of ligands and organic phosphates on functional properties of human adult hemoglobin. Biochemistry 13:3653-3655.
- KILMARTIN, J.V. e HEWITT, J.A. (1971) The effect of removal of C-terminal residues on cooperative interactions in hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36:311.
- McLEAN, N. e JURD, R.D. (1971) The haemoglobins of healthy and anaemic Xenopus laevis. J. Cell. Sci. 9:509-511.
- MEIRELLES, N.C. e FOCESI Jr., A. (1977a) Pipa carvalhoi hemoglobins. I. Eletrophoretic and chromatographic analysis of the blood hemolysate. IRCS Med. Sci. 5:91.
- MEIRELLES, N.C. e FOCESI Jr., A. (1977b) Pipa carvalhoi hemoglobins. II. Bohr effect of the blood hemolysate. IRCS Med. Sci. 5:92.
- MEIRELLES, N.C.; VIEIRA, M.L.C. e FOCESI Jr., A. (1978) Pipa carvalhoi hemoglobins. III. Influence of organic phosphates on the Bohr effect. IRCS Med. Sci. 6:226.
- MEIRELLES, N.C.; VIEIRA, M.L.C.; AIROLDI, L.P.S. e FOCESI Jr., A. (1979) Some larval properties of Pipa carvalhoi adult hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol. 62 A:859-862.

- MONOD, J.; WYMAN, J. e CHANGEUX, J.P.. (1965) On the nature of allosteric transition: A plausible model. J. Mol. Biol. 12: 88-118.
- MOSS, B. e INGRAM, V.M. (1968) Synthesis during amphibian metamorphosis. I. Chemical studies on the hemoglobins from the larval and adult stages of *Rana catesbeiana*. J. Mol. Biol. 32: 481-492.
- NOVY, M.J.; EDWARDS, C.J. e METCALFE, J. (1967) Hemoglobin: Yakima II. Blood O<sub>2</sub> affinity associated with compensatory erythrocytosis and normal hemodynamics. J. Clin. Invest. 46:1848-1852.
- OLSON, J.S. e GIBSON, Q.H. (1973) The release of protons and anions during ligand binding to human deoxyhemoglobin. J. Biol. Chem. 248:1623-1630.
- ORNSTEIN, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory Ann. N. Y. Acad. Sci. 121:321-349.
- PAULING, L. e CORYELL, C.D. (1936) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M., 1971.
- PERUTZ, M. (1949) citado por ALLEN et alii, 1950.

- PERUTZ, M.; ROSSMANN, M.G.; CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G. e NORTH, A.C.T. (1960) Structure of haemoglobin. A three-dimensional fourier synthesis at 5,5 Å resolution obtained by X-ray analysis. Nature 185:416-427.
- PERUTZ, M.F.; BOLTON, W.; DIAMOND, R.; MUIRHEAD, H. e WATSON, H.C. (1964) Structure of haemoglobin. An X-ray examination of reduced horse haemoglobin. Nature 203:687-690.
- PERUTZ, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature 228:726-739.
- PERUTZ, M.F.; FERSHT, A.R.; SIMON, S.R. e ROBERTS, G.S.K. (1974) Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transitions in methemoglobin. Biochemistry 13: 2174-2176.
- PROSSER, C.L. e BROWN, F.A. Fisiologia comparada. Editorial Interamericana, 2a. edição, 1968.
- RIGGS, A. (1971) Mechanism of the enhancement of the Bohr effect in mammalian hemoglobins by diphosphoglycerate. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68:2062-2065.

- RUBIN, M.M. e CHANGEUX, J.P. (1966) .On the nature of allosteric transition: Implications of non-exclusive ligand binding. J. Mol. Biol. 21
- SALHANY, J.M.; MATHERS, D.H. e ELIOT, R.S. (1972) The deoxygenation kinetics of hemoglobin partially saturated with carbon monoxide. J. Biol. Chem. 247:6985-6990.
- SIMON, S.R.; ARNOT; D.J. e KONIGSBURG, W.H. (1971) Structure and functional properties of chemically modified horse hemoglobin. I. Determination of the functional properties. J. Mol. Biol. 58:69-77.
- SMITHIES, O. (1959) An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem. J. 71:585-587.
- TAYLOR, J.F. (1957) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M. 1971
- TYUMA, I.; SHIMIZU, K. e IMAI, K. (1971) Effect of 2,3-diphosphoglycerate on the cooperativity in oxygen binding of human adult hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:423-428.
- TYUMA, I.; IMAI, K. e SHIMIZU, K. (1973a) Analysis of oxygen



equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic phosphates. Biochemistry 12:1491-1498.

TYUMA, I.; KAMIGAWARA, Y. e IMAI, K. (1973b) pH dependence of the shape of the hemoglobin-oxygen equilibrium curve. Biochem. Biophys. Acta 310:317-320.

VIEIRA, H.F.; VIEIRA, M.L.C.; MEIRELLES, N.C. e FOCESI Jr., A. (1979) Pipa carvalhoi hemoglobins. V. Reactive sulfhydryl groups. IRCS Med. Sci. 7:125.

WATSON, H.C. e NOBBS, C.L. (1968) citado por BALDWIN, J. M. 1975.

WITTENBERG, B.A.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M.; NOBLE, R.W.; WITTENBERG, J.B. e WYMAN, J. (1967) Studies on the equilibria and kinetics of the reactions of peroxidases with ligands. IV. The dissociation of carbon monoxide from carbon monoxide ferro-horseradish peroxidase. Biochemistry 6:1970-1975.

WYMAN, J. (1948) Heme proteins. Advan. Protein. Chem. 4:407-531

WYMAN, J. (1963) Allosteric effects in hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXVIII:483-489.

WYMAN, J. (1964) Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. Advan. Protein. Chem. 19:223-286.

WYMAN, J. (1927) Allosteric linkage. J. Am. Chem. Soc. 89:2202-2218.

WYMAN, J. e ALLEN, D.W. (1951) citado por ANTONINI, E. e BRUNORI, M., 1971.