

MARIA LAISE CHAVES VIEIRA

PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ANTIGÊNICAS DE HEMOGLOBINAS DE
ANFÍBIOS TERRESTRES E AQUÁTICOS.

Tese de Doutorado apresen-
tada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de
Campinas.

Orientador:

Prof. Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

Campinas

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Aos meus pais,
meus irmãos*

Hélio

Cássio e Daniel.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr., pela orientação segura e pelo incentivo, oportunidades e ensinamentos proporcionados durante a realização deste trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

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.

Aos Profs. Drs. Arno Schwantes, da Universidade Federal de São Carlos; Avelino Rodrigues Oliveira, da Universidade Estadual de Campinas; Benedito Oliveira Filho, da Universidade Estadual de Campinas, Metry Bacila, da Universidade Federal do Paraná e Nilce Correa Meirelles, da Universidade Estadual de Campinas pelas correções e sugestões dadas ao presente trabalho.

A todos os Professores e colegas do Departamento de Bioquímica, em especial a Hélió F. Vieira e Nilce Correa Meirelles, pela amizade, incentivo e colaboração científica.

A Universidade Federal do Ceará na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Paulo Elpidio Menezes Neto e aos Profs. Drs. Eurico Litton de Freitas e José Borges Sales, do Departamento de Análises Clínicas e toxicológicas que nos permitiram a realização da presente tese.

A Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Su

perior (CAPES) pela ajuda na concessão de Bolsa de Estudos.

A todos os funcionários do Departamento de Bíoquímica 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
MATERIAIS E MÉTODOS	16
Material biológico	16
Hemolisado dos eritrócitos	17
Eletroforese em gel de amido	19
Cromatografia de troca iônica	20
Preparação da hemoglobina isenta de íons	21
Concentração das soluções de hemoglobinas	22
Equilíbrio da hemoglobina com o ligante oxigênio	22
Titulação da solução de monóxido de carbono	24
Equilíbrio da hemoglobina com o ligante monóxido de carbono	25
Determinação do efeito Bohr	27
Estudo imunológico de hemoglobinas de anfíbios	27
Imunização	27
Imunodifusão dupla	29
Imunodifusão radial simples	30
Ensaio preliminar de imunodifusão em meio líquido.....	31
Precipitação em meio líquido	32

RESULTADOS	34
Separação analítica dos componentes por eletroforese..	34
Separação preparativa dos componentes por cromatogra - fia de troca iônica	34
Propriedades funcionais das hemoglobinas	41
Equilíbrio com oxigênio	41
Equilíbrio com monóxido de carbono	44
Efeito Bohr nas hemoglobinas	45
Estudo imunológico de hemoglobinas de anfíbios	51
Titulação dos soros	51
Comparação antigênica de diferentes hemoglobinas	53
Imunodifusão dupla	53
Imunodifusão radial simples	59
Imunoprecipitação em meio líquido	61
 DISCUSSÃO	 63
 RESUMO	 84
 SUMMARY	 86
 BIBLIOGRAFIA	 88

INTRODUÇÃO

É fato bem conhecido ser a molécula de hemoglobina constituída de 2 cadeias α e duas cadeias β . Esses dois tipos de cadeias possuem estruturas secundárias e terciárias muito semelhantes entre si e semelhante também a de mioglobina (PERUTZ et alii, 1968) enquanto que as diferenças nas estruturas primárias existentes entre as três espécies moleculares em quase nada altera suas conformações. Podemos então descrever essas cadeias por vários modelos, mas para os nossos estudos o modelo KENDREW et alii (1961) descrito para a mioglobina nos parece mais adequado para nossas finalidades e passaremos, pois a descrevê-lo.

Nesse modelo são relatadas a existência de 8 segmentos, com diferentes números de resíduos de aminoácidos apolares que se enovelam formando α -hélice. Esses segmentos denominados pelas primeiras letras do alfabeto de A a H estão ligados entre si, por segmentos não-helicoidais, formados, geralmente, por resíduos de aminoácidos de natureza hidrofílica. As regiões não helicoidais tomam a designação das hélices vizinhas. Assim, a região não helicoidal entre as hélices A e B é denominada de AB. A figura 1 esclarece esta descrição.

É conveniente relatar que resíduos de prolina, incapazes de formar α -hélice estão situados no final de algumas regiões

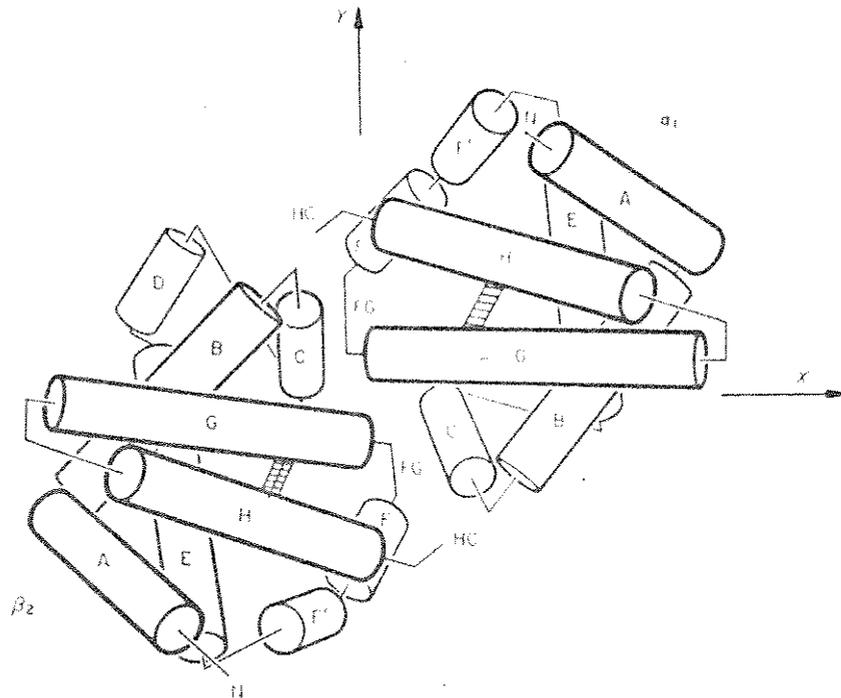


FIGURA 1. - Representação esquemática de um dímero $\alpha \beta$; as hélices estão representadas com cilindros ocos de A a H; a interface $\alpha \beta$ está designada com um segmento F G; o grupo heme é visto como um bastonete espiralado.

helicoidais ou confinados entre duas dessas regiões. Outros importantes resíduos responsáveis pelo término dos segmentos helicoidais são os de serina e de treonina que interagem com a carbonila da cadeia principal através de suas hidroxilas.

Na hemoglobina, (PERUTZ, 1965), os segmentos helicoidais denominados de hélices, possuem números diferentes de resíduos de aminoácidos como dissemos. O maior deles é a hélice H, que possui 21 resíduos de aminoácidos tanto na cadeia α como na cadeia β , e o menor é a hélice D com 2 resíduos de aminoácidos na cadeia α . Os segmentos não helicoidais provocam, geralmente, dobras na molécula. O maior deles é o segmento EF que possui 8 resíduos de aminoácidos tanto na cadeia α como na β , e o menor, é AB com apenas um resíduo de aminoácidos na cadeia α , inexistindo na cadeia β . Entre as hélices B-C e D-E da cadeia α e entre as hélices A-B, B-C e C-D da cadeia β não há dobras na cadeia peptídica. Na região NH terminal da cadeia α , 2 resíduos denominados NA 1 e NA 2 estão estruturados em região não helicoidal, o mesmo acontecendo na cadeia β com seus três resíduos NA 1, NA 2 e NA 3. Na região da carboxila terminal estão colocados 3 resíduos de aminoácidos HC1, HC2 e HC3 tanto na cadeia α como β .

Os segmentos de A a H constituem a cadeia polipeptídica que ligada com o grupo heme forma uma subunidade ou monômero da hemoglobina. A molécula completa é composta de 4 cadeias, sendo, geralmente 2α e 2β , que formam um tetrâmero.

Os conhecimentos atuais mostram o relacionamento das 4 cadeias peptídicas que estão associadas, sendo que entre as cadeias α_1 e α_2 e β_1 e β_2 existem contatos de natureza polar. Entre as cadeias heterólogas o contato é hidrofóbico. Contactos hidrofóbicos ocorrem em maior número entre α_1 e β_1 onde 34 resíduos de aminoácidos estão envolvidos, e em menor número entre α_1 e β_2 , onde 19 resíduos de aminoácidos estão relacionados. Essa interação entre α_1 e β_2 é a região da molécula que mais sofre alteração durante o processo de combinação do heme com o ligante oxigênio por exemplo (PERUTZ et alii, 1968).

O número de ligações entre as subunidades α_1 e β_1 e α_2 e β_2 fazem com que elas fiquem tão fortemente aderidas que seu contato é dificilmente alterado pela reação com oxigênio (PERUTZ, 1978). Na estrutura quaternária há pequenas mudanças, não mais que de 1 Å, nos contatos das subunidades $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_2 \beta_2$ e grandes mudanças, cerca de 7 Å, nos contatos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$. Alterações entre os contatos $\alpha_1 \beta_2$ diminuem a interação heme-heme, embora alterações entre $\alpha_1 \beta_1$ não interfiram (PERUTZ, 1970).

A associação das 4 cadeias peptídicas permite a formação de uma cavidade no centro da molécula (BRAGG et alii, 1954). Dada a natureza polar dos aminoácidos envolvidos nessa região essa cavidade mantém água em seu interior, sendo que suas dimensões foram estimadas como 20 Å de comprimento por 8-10 Å de largura

^o
 e 25 Å de altura, sendo limitada lateralmente pelas hélices G α e G β ; inferiormente pelas hélices H β_1 e H β_2 e na parte superior pelas hélices H α_1 e H α_2 (PERUTZ, 1965). Além dessa cavidade polar, há na superfície externa do tetrâmero alguns resíduos de aminoácidos polares que condicionam solubilidade à molécula. Alguns resíduos polares do interior da molécula ficam comprometidos nos pontos de contatos das 4 cadeias e outros resíduos polares e resíduos hidrofílicos (não polares), são os constituintes das superfícies das cavidades internas.

O grupo heme fica localizado em cavidade interna onde resíduos hidrofóbicos mantêm essa estrutura afastada do solvente, preservando o ferro do anel pirrólico na forma ferrosa. No processo de oxigenação há alterações estruturais na molécula e essas alterações são em nível de estrutura terciária e quaternária. A mudança de estruturas terciárias e quaternárias acontecem quando a deoxihemoglobina reage com o oxigênio molecular. O ferro do grupo heme que se encontra deslocado do plano do heme na desoxihemoglobina, e por ligação com o oxigênio sofre uma transição do estado de alto para baixo spin trazendo o núcleo do anel porfirínico para o mesmo plano desse. Com essa alteração há movimento da histidina proximal (F8) no qual o heme está ligado para junto deste, produzindo um movimento na cadeia peptídica. Este movimento na cadeia consiste no deslocamento da hélice F para junto da hélice H, expulsando a tirosina HC2 da cavidade entre as hélices F e H,

devido ao seu estreitamento. A tirosina expelida altera a posição do grupo carboxil adjacente (Arg HC3) rompendo as pontes salinas que seguram as subunidades, que por sua vez provoca outros esforços nas vizinhanças do tetrâmero deoxi, com saída de protons de Bohr. Esse movimento das hêlices induz alteração nas cadeias adjacentes (estrutura quaternária) que passaram a ter maior afinidade pelo oxigênio. É através dessas alterações conformacionais que se explica o fenômeno de cooperatividade pelo ligante (PERUTZ, 1970).

Apesar de uma homologia de 43% na sequência de aminoácidos das cadeias α e β e uma grande similaridade em sua estrutura tridimensional como mostra a cristalografia de Raio X (PERUTZ, et alii, 1965; DAYHOFF 1972) a variação da estrutura primária, e conseqüentemente das demais estruturas proteicas, nas hemoglobinas de diferentes espécies é pouco consistente, isto é, acarreta alterações de algumas propriedades funcionais e estruturais porém alguns resíduos de aminoácidos que comandam a estrutura terciária se mantêm comuns a diversas espécies (BRAUNITZER et alii, 1964).

A substituição de apenas um resíduo de aminoácidos pode acarretar mudanças drásticas nas propriedades funcionais da molécula como é o caso da hemoglobina S. Esta hemoglobina difere da hemoglobina A em apenas um resíduo de aminoácido pois na Hb S o resíduo de ácido glutâmico da posição AG da cadeia β ($\text{Glu } 6\beta_1$) e substituído pela valina (INGRAM, 1957). Esta substituição provoca mu-

danças na afinidade dessa molécula pelo ligante oxigênio diminuindo sua afinidade (CHARACHE, et alii, 1970) e reduzindo sua solubilidade na forma desoxigenada (HOFRICHTER et alii, 1974). Outras substituições em hemoglobina humana podem ser citadas como: Hb Kansas onde Asn G4 (102) β é substituída pelo Thr tornando a forma oxihemoglobina menos estável que a desoxi devido a ausência de ligações nos contatos da $\alpha_1 \beta_1$ da forma oxi (BONAVENTURA & RIGGS, 1968). Tal hemoglobina apresenta menor afinidade pelo ligante oxigênio e baixa cooperatividade (GREER, 1971); Hb Chesapeake onde Arg FG4 (92) é substituída pela Leu provocando alterações nas forças de van der Waals na interface $\alpha_1 \beta_2$ (CLEGG et alii, 1966). Esta hemoglobina possui uma grande afinidade porém uma cooperatividade diminuída (GREER, 1971); Hb Rainer que possui a Tyr HC2 (145) β substituída pela Cys provocando distorção do C-terminal da cadeia devido a formação de pontes disulfeto entre a Cys 145 β e Cys 93 β desestabilizando a sua estrutura desoxi (HAYASHI et alii, 1971). Ela apresenta uma afinidade bastante alta (GREER & PERUTZ, 1971); Hb Hiroshima que tem a His HC3 (146) β substituída pela Asp rompendo as pontes salinas que ocorrem normalmente na forma desoxi tornando-a menos estável que a normal. Possui uma afinidade aumentada cerca de duas vezes e n (coeficiente de Hill) maior que dois (PERUTZ et alii, 1971).

Em hemoglobinas de outras espécies, quando comparada com a humana, várias substituições podem ser observadas bem como a

existência de um número maior ou menor de resíduos de aminoácidos. Comparando a estrutura primária de hemoglobinas da mesma espécie, alterações também são observadas. Assim, hemoglobinas de anfíbios mostram uma estrutura primária diferente das hemoglobinas de mamíferos. A *Rana esculenta*, por exemplo, apresenta a cadeia β com 140 resíduos de aminoácidos (CHAUVET & ACHER, 1971) enquanto que na *Rana catesbeiana*, essa mesma cadeia, apresenta 143 resíduos (AGGARWAL & RIGGS, 1969). A frequência com que determinados resíduos aparecem nas cadeias também é importante. O número de grupos tiois de cisteína, quando livres, mostra uma grande variação dentro dos diferentes anfíbios. Este número varia desde 0 (zero) nos girinos até números bastante grande como ocorre na *Pipa carvalhoi* adulta que possui 8 grupos tiois acessíveis (MEIRELLES et alii, 1979), *Rana catesbeiana* de 3-4 (RIGGS, 1951), *Rana grylio* de 6-8, *Rana pipiens* de 5-7, *Leptodactylus pentadactylus* de 5-8 (TRADER & FRIEDEN, 1966) e *Rana esculenta* que possui em torno de 4 grupos SH (TENTORI et alii, 1965).

Dentro das diferenças observadas nas hemoglobinas de anfíbios, a existência de um radical acetil na região NH terminal da cadeia α , torna-se marcante como o *Bufo bufo* (CAFFIN et alii, 1969) e *Rana catesbeiana* (DE WITT & INGRAM, 1967).

Curioso também, é relatar que as alterações que ocorrem nas diferentes hemoglobinas das distintas espécies são mais comuns na cadeia α o que implica em ser a cadeia β mais constante dentro

da escala evolutiva. Dentro dos resíduos comuns nas diferentes hemoglobinas vários podem ser citados como as histidinas das posições F_8 e E_7 que são comuns em diferentes espécies e são elas responsáveis pela interação heme-proteína. A F_8 é a histidina proximal, e a E_7 , a distal. A fenilalanina da porção CD1 também é preservada por ser o aminoácido responsável pelo contato do heme, isto é, que ajuda a formar a parede da cavidade do heme, o mesmo acontecendo com a Leu F_4 . Interessante, também, o papel da glicina na posição B6. Este aminoácido é o único possível de permanecer nessa posição pois as hélices B e C se aproximam e a existência de um radical maior que um átomo de hidrogênio na posição B6 parece impedir essa aproximação das hélices. A prolina C2 é invariável dada a sua capacidade de dobrar a hélice, assim como a tirosina HC2 que une as hélices H e F. Os demais resíduos de aminoácidos, quando variados, não alteram a conformação da molécula pois a substituição de um resíduo hidrofóbico por outro de igual natureza ou não altera ou o faz de modo muito pequeno na estrutura da molécula (PERUTZ et alii, 1965) e somente técnicas muito sensíveis seriam capazes de determinar essas alterações. Dentro dessas técnicas podemos citar a de reação antígeno-anticorpo, capaz de demonstrar diferenças entre duas hemoglobinas que possuam tais alterações. Essas alterações podem ser vistas, então, como alterações antigênicas.

O uso de técnicas imunoquímicas para se avaliar os de-

terminantes antigênicos de diferentes moléculas tem sido bastante divulgados. Assim determinantes antigênicos de carboidratos (KABAT & MAYER, 1961) de ácidos nucleicos (LEVINE & STOLLAR, 1968), de proteínas (SELA et alii, 1967; SELA, 1969; BENJAMINI et alii, 1972) foram estudadas por técnicas imunoquímicas e correlacionadas com a conformação dessas moléculas obtidas por outros estudos. O uso dessas técnicas implica na obtenção de um soro hiper-imune que reconhece todos os sítios antigênicos da superfície da molécula (PRAGER & WILSON, 1971). Em uma série de proteínas homólogas o que se tem observado é que a conformação tridimensional da molécula é preservada mesmo quando há alterações na estrutura primária (NOLAN & MARGOLIASH, 1968 e DICKERSON et alii, 1971). Esse fato mostra uma conservação dos resíduos do interior da molécula em contraste com a variação dos resíduos da superfície da molécula o que não impede a proteína de exercer suas funções, apesar de apresentar diferenciação antigênica durante o processo de evolução (PRAGER et alii, 1972; SARICH & WILSON, 1967 a,b; WILSON & SARKCH,, 1969 e WALLACE et alii, 1971).

Outro aspecto que pode alterar os determinantes antigênicos de uma proteína foi mostrado pelo modelo alostérico (MONOD et alii, 1965) onde proteínas que apresentam estruturas quaternárias podem apresentar dois estágios conformacionais diferentes como é o caso da hemoglobina nas formas oxi e deoxi (REICHLIN et alii, 1964 e REICHLIN et alii, 1965).

As diferenças antigênicas apresentadas por uma proteína quando na sua forma nativa e desnaturada também pode ser drástico. Antissoros obtidos contra proteínas desnaturadas apresentam pequena reação cruzada com a proteína nativa (WU et alii, 1927; SHINKA et alii, 1967; BROWN, 1962; MACPHERSON & HEIDELBERGER, 1945; e nas hemoproteínas as formas ferrosa e férrica mostram reações diferentes com o anticorpo, (REICHLIN et alii, 1966b) trabalhando com citocromos.

É interessante também citar que estudos imunológicos foram importantes na localização da reação da hemoglobina com a haptoglobina a fim de verificar se os determinantes antigênicos da hemoglobina estão envolvidos nesta reação inespecífica. Para tanto, COHENDIX et alii (1973) demonstram que os sítios na hemoglobina onde a haptoglobina liga era completamente independente dos sítios de ligação do anticorpo e que os anticorpos são dirigidos contra regiões da hemoglobina que variam durante a evolução enquanto que os sítios de ligação da haptoglobina estariam na região da molécula que seria conservada durante a evolução. Confirmando os estudos anteriores REICHLIN et alii (1974) demonstrava que hemoglobina humana, de carneiro, de galinha, de boi e de coelho reagiam irreversivelmente com haptoglobinas enquanto que hemoglobina de anuros e carpa ligariam fraca e irreversivelmente e que a saturação completa dos sítios antigênicos na hemoglobina não tinha nenhum efeito na ligação desta com a haptoglobina, sugerindo assim,

a completa independência dos sítios de ligação na hemoglobina para a haptoglobina e anticorpos.

Dada a imunogenicidade da hemoglobina, isto é, sua capacidade de induzir a formação de anticorpos em um animal, o uso dessa molécula como imunógeno tem sido aproveitado. A obtenção de soro hiper-imune anti-hemoglobina humana, tanto hemoglobinas normais como anormais, bem como anti-hemoglobinas de outras espécies tem sido obtido.

O estudo da hemoglobina através de técnicas de imunquímica, mostra por um lado, seus determinantes antigênicos através da determinação de reações cruzadas entre hemoglobinas normal(A₁) e anormais como por exemplo hemoglobinas S, M, Kansas, Chesapeake, etc (REICHLIN, 1972), bem como com hemoglobina fetal (REICHLIN et alii, 1966a) e reações cruzadas entre hemoglobinas de diferentes espécies como por exemplo hemoglobina de cavalo, jumento e mula que são conhecidas por diferirem uma da outra pela substituição de um ou dois aminoácidos (CRADOCK & WATSON, 1967). Por outro lado, as consequências da reação antígeno-anticorpo sobre as propriedades funcionais da molécula seriam de um aumento na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio com a diminuição do valor n e a preservação do efeito Bohr. (REICHLIN et alii, 1969).

Segundo PRAGER & WILSON (1971), quando duas proteínas heterólogas diferem na sua sequência mais que 40%, nenhuma reação cruzada é observada por teste de precipitação ou fixação de com-

plemento. Entretanto quando se muda um simples resíduo de aminoácidos na molécula de hemoglobina sua antigenicidade pode ser afetada e isto se deve a mudanças do determinante local e não pela mudança conformacional a longa distância.

Além de soro anti-hemoglobina já foram conseguidos soros antiglobina (injetando-se apenas a porção protéica da molécula) e tentando se obter soro anti-cadeias isoladas. Em trabalhos de ASKONAS & SMYTH (1964), foi mostrado, em coelhos, ser a cadeia β imonogênica, isto é, houve resposta umunológica quando injetada, e a cadeia α mostrou ser não imunogênica, pois nenhum título de anticorpos foi observado. Já em trabalhos realizados por REICHLIN (1970) e TAN-WILSON et alii (1976) anticorpos foram obtidos em coelho e cabra quando se inoculava tanto cadeia α como β , mostrando que ambas são moléculas imunogênicas para esses animais. Por outro lado a distribuição da especificidade do antissoro para hemoglobina humana A_1 ($\alpha_2 \beta_2$) e fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) foram diferentes. Em um soro anti A_1 a quantidade de anticorpos para cadeias α e β são semelhantes enquanto que em um soro anti-F há uma preponderança de anticorpos para cadeia γ comparada com a cadeia α indicando ser a hemoglobina F um imunógeno mais potente que a A_1 e esta imunogenicidade se deve a cadeia γ (REICHLIN, 1970).

Com a obtenção de anticorpos específicos foram estimados o número de sítios antigênicos por unidade assimétrica ($\alpha \beta$) da hemoglobina humana (NOBLE et alii, 1969) e anticorpos anti-Val dirigidos especificamente para o sítio de substituição Val, mos-

trando o grande efeito que a modificação de um simples aminoácido na molécula de um antígeno pode ter sobre sua antigenicidade (NOBLE et alii, 1972 e SCHREIBER et alii, 1975).

Estudos mais detalhados feitos por REICHLIN (1974, 1975) comparando hemoglobina humana e de coelho verificou-se que dentro das cadeias α e β havia uma região variável e outra conservativa e foi postulado que dentro da região variável estariam os determinantes antigênicos, mas havia também posições na região variável que não estavam envolvidos em determinantes antigênicos. Mesmo assim, o mesmo autor encontrou anticorpos específicos para hemoglobina humana com substituição de um simples aminoácido em ambas regiões variável e invariável. O importante é que todos os mutantes que estão envolvidos em determinantes antigênicos estão na superfície da molécula e aminoácidos com regiões α -hélice.

Apesar dos estudos intensos em hemoglobinas humanas pouco se tem feito com animais. Tem sido uma preocupação o estudo de hemoglobinas de anfíbios em particular com finalidades de estabelecimento de estrutura-função e na presente tese procuramos ampliar esses estudos comparando hemoglobinas dos diferentes anfíbios: *Bufo paracnemis*, *Rana catesbeiana*, *Pipa pipa* e *Pipa carvalhoi*. Esses anfíbios pertencem às famílias: Bufonidae, Ranidae e Pipidae respectivamente e possuem condições ecológicas diferentes. Assim, os anuros *Pipa pipa* e *Pipa carvalhoi* são de habitat estritamente aquático mesmo após a metamorfose, enquanto que as

espécies *Bufo paracnemis* e *Rana catesbeiana* têm vida terrestre na forma adulta e habitat aquático na fase larval. Na correlação estrutura e função dessas hemoproteínas temos acumulado dados relativos a propriedades funcionais das hemoglobinas inerentes às condições ecológicas desses animais quais sejam disponibilidade de oxigênio, pressão, estados metabólicos, etc. As diferenças encontradas nestes anfíbios com relação a hemoglobina do ponto de vista funcional poderiam refletir-se também nas propriedades antigênicas que foram por nós analisadas no presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Foram usados neste trabalho hemoglobinas dos anuros brasileiros oriundos de regiões distintas e "habitats" bem diferentes. Os animais utilizados foram: Bufo paracnemis A. Lutz, adultos da família Bufonidae de "habitat" estritamente terrestre, capturados na região de Campinas, SP; Rana catesbeiana Shaw, adultos e girinos da família Ranidae, de "habitats" terrestre e aquático respectivamente criados em cativeiro, em Jundiaí, S.P.; Leptodactylus labyrinthicus Spix, (Rã pimenta), adultos da família Leptodactylidae, de vida terrestre e aquática, coletados nas regiões próximas de Itapira, S.P.; Pipa pipae (Linnaeus) e Pipa carvalhoi (Miranda-Ribeiro), adultos da família Pipidae, animais de "habitats" exclusivamente aquáticos tanto na sua fase larval como adulta, oriundos dos estados do Pará e da Bahia, respectivamente. Hemoglobinas de outros animais que também foram eventualmente utilizados nos nossos estudos com a finalidade comparativa foram: girinos de Hyla geographica Spix, da família Hylidae capturados no litoral do Estado de São Paulo, Pterygoplichthys sp (acaribodô) das famílias Loricaridae, peixe da região amazônica, ambos de vida aquática e Bufo marinus (Linnaeus), da família Bufonidae também

da região amazônica, de vida terrestre e mais hemoglobinas humana e de carneiro.

HEMOLISADO DOS ERITRÓCITOS

O sangue colhido com heparina sódica foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi recolhido e lavado 3 a 4 vezes com solução de NaCl 0,15M contendo EDTA 10^{-3} M, gelada. Após a última lavagem o precipitado foi ressuscendido em água bidestilada e deixado em agitação por 30 a 60 minutos. Esta solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C, desprezando-se o precipitado e obtendo-se assim a solução do hemolisado de eritrócitos.

ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO

A eletroforese vertical em gel de amido foi feita segundo o método de SMITHIES, (1959), modificado por MEIRELLES, (1975).

O gel foi preparado com amido hidrolizado (Connaught-Lot 307-1) a 14,5%. O amido em pó foi dissolvido em um tampão pH 8,2 contendo: Tris (trishidroximetilaminoetano) 62,5g/litro, EDTA (Ac. etilenodiamino tetra-acético) 6,0g/litro e Ácido bórico 4,6g

/litro, sendo no final diluído 20 vezes e adicionado KCN 0,01% e transferido para um balão de fundo chato contendo o amido, sendo aquecido com agitação constante até o gel ficar incolor. Após retirar as bolhas de ar através de uma bomba de vácuo o gel foi colocado sobre uma placa de acrílico (33 x 10cm) deixando-se solidificar. Em seguida a amostra foi aplicada cerca de 8 a 10 cm da extremidade superior do gel sob a forma de cianohemoglobina pela adição de uma solução de KCN 2% pH 7,0. A aplicação foi feita com auxílio de retângulos de papel de filtro, Watman 3M, que foram embebidos nas amostras e inseridos nos orifícios feito anteriormente no gel, cerca de 10 mm de distância um do outro. A placa contendo o material foi coberta com parafilme para evitar evaporação e em cada uma das extremidades foi colocado um pedaço de gaze embebido no tampão da eletroforese para fazer a ponte entre as cubas superior(-) e inferior(+) que continham tampão borato 0,3M pH 9,2 e tampão borato 0,03M pH 9,2 respectivamente. A corrida eletroforética foi feita durante 6 horas usando uma intensidade de campo elétrico de 6,4V/cm. Após essa corrida o gel foi corado com uma solução de Comassieblue a 2% durante 20 minutos e descorado com uma solução contendo 10 partes de etanol, 10 partes de água destilada e 2 partes de ácido acético.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita segundo ORNSTEIN, (1964) e DAVIS, (1964) usando gel de poliacrilamida 7,5% pH 8,9.

Os geles foram preparados a partir de soluções estoques A, B, D e E guardadas a 4°C e uma solução C que foi preparada na hora do uso. Em 100 ml de cada solução continha os seguintes componentes: A:30,0g de acrilamida, 0,8g de bisacrilamida; B:24 ml de uma solução de HCl 1N, 18,15g de tris e 0,4 ml de TEMED (N, N.N', N' Tetramethyl e thylenediamine); C:0,2g de persulfato de amônia; D:5,0g de acrilamida e 1,25g de bisacrilamida; E:12,8 ml de H₃PO₄ 1M, 2,85g de tris e 0,1 ml de TEMED.

Em tubos de vidro (8 x 0,5cm) sobre um suporte foi colocado 1 ml do gel de resolução que foi preparado contendo uma mistura das soluções A, B e C na proporção de 1:1:2 v/v e imediatamente colocava-se uma gota de água destilada. Após polimerização cerca de 30 a 40 minutos na ausência de luz, foi retirada a camada de água, foi adicionado mais 0,2 ml do gel de concentração que continha uma mistura das soluções D, E e C usando a seguinte proporção 2:1:2 v/v e deixou-se polimerizar na ausência de luz por aproximadamente uma hora. Em seguida, os tubos foram montados nos orifícios da cuba superior por uma das extremidades, de maneira que a outra parte pudesse ficar mer-

gulhada no tampão da cuba inferior. As amostras aplicadas continham 50 μ l de glicerol para 50 a 100 μ l de hemoglobina na forma de ciano ou carboxihemoglobina. Os tampões usados foram tris-glicina 0,05M pH 8,9 na cuba superior e tris-HCl 0,1M pH 8,1 na cuba inferior. A corrida eletroforética foi feita do polo negativo (cuba superior) para o positivo (cuba inferior) usando 2mA/tubo durante 1 a 2 horas.

Após a eletroforese os geles foram retirados dos tubos cuidadosamente e colocados numa solução de ácido tricloroacético a 12,5% durante 30 minutos. Posteriormente foi adicionado gotas de solução de Comassie-blue a 2%, no mesmo ácido por cerca de 2 horas. O excesso do corante foi retirado com uma solução contendo 1,4% de metanol e 7% de ácido acético.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A resina de CM-celulose (carboximetil-celulose) foi preparada lavando-se inicialmente, várias vezes, com água destilada a fim de retirar os finos. Em seguida foi adicionada uma solução de NaOH 0,5M à resina, agitando-se esporadicamente por 1 a 2 horas e depois lavada com bastante água destilada até pH próximo a neutralidade com auxílio de um funil de Büchner adaptado a bomba de vácuo. Posteriormente foi adicionado ácido fosfórico 0,5N

permanecendo por cerca de 1 a 2 horas com agitações alternadas. Por fim, a resina foi lavada novamente com água destilada até pH próximo de 7 equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 6,4.

Uma coluna de 30 x 2cm, aproximadamente, foi montada com essa resina até uma altura cerca de 20 a 25 cm e refrigerada a 4°C.

As amostras a serem cromatografadas foram dialisadas contra tampão fosfato 0,01M pH 6,4 contendo β -mercaptoetanol na concentração final de 1 mM por uma hora a 4°C. A eluição do material foi feita com tampão fosfato 0,01M usando um sistema de gradiente de pH que variou de 6,4 a 8,5 e coletado automaticamente, cerca de 2 ml por tubo, com o auxílio de um coletor de frações. O pH e as absorbâncias a 540 nm foram determinados em cada tubo e colocados em gráficos.

PREPARAÇÃO DA HEMOGLOBINA ISENTA DE ÍONS

Para obtenção da solução de hemoglobina isenta de íons, as amostras foram passadas consecutivamente através de 4 colunas cromatográficas medindo cerca de 15 x 1,2 cm cada uma delas e eluídas com água bidestilada. Após passagem pela coluna de Sephadex G-25 o eluato obtido foi submetido a 3 colunas de troca iônica: Dowex 1-X8(A_C⁻), Dowex 50W-X4(NH₄⁺) e uma mistura de Amberlite IRC-50(H⁺) e IR-4B(OH⁻).

CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINAS

Quando se obtinha solução de hemoglobina muito diluída se concentrava a solução através de um processo de diálise a vácuo, a 4°C. Para isto foi preparado um saco de diálise de parede grossa, de 1 cm de diâmetro e medindo cerca de 80 a 90 cm de comprimento. Uma das suas extremidades foi colocado um funil acoplado a uma rolha de borracha que continha também uma saída de ar por onde se fazia vácuo e a outra extremidade foi fechada. Esse tubo de diálise assim preparado, foi transferido para um cilindro de vidro (100 x 3 cm) fechado na parte inferior e colocado a amostra a ser concentrada. Em seguida foi vedada a parte superior do cilindro com a rolha onde estava inserido o funil e saco de diálise. Por fim, foi feito vácuo durante 3 a 5 minutos e deixado a 4°C durante várias horas, até concentração desejada do material.

Muitas vezes, a concentração do material foi feita simplesmente por diálise contra solução saturada de polietilenoglicol (PM = 20.000d) a 4°C.

EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM O LIGANTE OXIGÊNIO

Este estudo foi feito por método espectrofotométrico as sociado ao tonométrico. Para isto, tomava-se uma alíquota de 2ml

da hemoglobina já isenta de cofatores, colocava-se no tonômetro e passava-se nitrogênio durante 10 a 15 minutos até a hemoglobina ficar totalmente desoxigenada. Em seguida registrava-se o espectro de absorção na região do visível entre 600 e 500 nm. Procedia-se então com adições sucessivas de diferentes volumes de ar de quantidade conhecidas e a cada adição, a amostra era equilibrada em banho a 27°C durante 10 minutos, quando então processava-se o registro do espectro correspondente a cada uma delas. Por fim, após 4 adições o tonômetro era aberto e passado através dele uma corrente de ar com auxílio da bomba de vácuo, equilibrando a temperatura a 27°C durante os 10 minutos e novamente era registrado o espectro, agora da oxihemoglobina. Em seguida os valores da porcentagem de saturação (\bar{Y}) eram calculados através das absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda a 577, 555 e 540 nm após a correção, se necessária, dos pontos isosbéticos.

Usando os valores de \bar{Y} e a pressão parcial de O_2 (PO_2) calculava-se o $\log P_{50}$ (log da pressão de O_2 onde 50% das moléculas estão na forma de oxihemoglobina e 50% na forma desoxi) e o n (coeficiente de Hill) que indica o grau de cooperatividade da molécula. Este cálculo foi determinado através de uma calculadora Sharp, modelo Compet-364P, que foi programada para receber as absorbâncias dos 3 comprimentos de onda das formas oxi, desoxi, e os valores do $\log PO_2$ (logaritmo da pressão parcial de oxigênio). Todas as experiências de equilíbrio com oxigênio fo-

ram feitas com solução de hemoglobina na concentração em torno de 5×10^{-5} M em tampão bis-tris lactato 0,05M, algumas delas usando ATP na concentração final de 10^{-3} M, no intervalo de pH entre 6 a 8.

TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO

A solução de monóxido de carbono foi preparada usando água bi-destilada, onde se borbulhava CO obtido pela reação de H_2SO_4 concentrado com ácido fórmico concentrado. Essa solução foi mantida em seringa hipodérmica a 4°C.

O título de CO na solução foi determinado pela reação com mioglobina de músculo de baleia onde se convertia a desoximioglobina em carboximioglobina. Para tanto se colocou em uma cubeta 4 ml de solução de mioglobina diluída em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 de modo que a mioglobina ficasse na concentração de 1×10^{-7} aproximadamente. Uma pequena quantidade de ditionito de sódio foi adicionado, agitado, e registrada, por varredura, as absorvâncias de 450-400 nm da forma deoxi. Volumes conhecidos da solução de CO foram adicionados, registrando-se novamente no espectrofotômetro da mesma forma que a desoxi. Após várias adições de solução de CO, observou-se que a solução de mioglobina estava saturada pois não mais havia alterações no espectro.

Pelas leituras dos picos em 419 e 432 nm da desoxi, car

boxi, e de cada adição calculou-se \bar{Y} (porcentagem de saturação) de cada adição.

Em papel milimetrado foi feito um gráfico lançando os valores obtidos, colocando-se nas abcissas a diluição da solução de CO e nas ordenadas \bar{Y} . Nesse gráfico foi possível extrapolar o valor exato da diluição que saturou 100% das moléculas.

Conhecendo-se a concentração da solução da mioglobina e a diluição da solução de CO, pode-se calcular a concentração de CO na solução pela reação $Mb + CO \rightarrow MbCO$. O título dessa solução se mantém constante durante alguns dias quando guardada a 4°C.

EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM O LIGANTE MONÓXIDO DE CARBONO

Para esses estudos, a solução de hemoglobina foi colocada em uma cubeta de 4 ml e de 1 cm de caminho ótico contendo pérolas de vidro em seu interior. À amostra, foi adicionada uma quantidade de ditioníto de sódio, suficiente para a obtenção da hemoglobina em sua forma desoxi. Em seguida fechou-se a cubeta com uma rolha de borracha de maneira que não ficasse nenhuma bolha de ar. Nesta borracha foram colocadas 2 agulhas hipodérmicas que serviam para introduzir solução de CO e escapar o excesso de material. Foram registradas as absorbâncias por varredura entre 450 a 400 nm. Com auxílio de uma microseringa foi adicionada quanti-

dades de solução de CO conhecidas cujo título era $6,02 \times 10^{-4} M$, titulada anteriormente. A interação da hemoglobina com o ligante CO foi acompanhada pela mudança espectral entre 450 a 400 nm, registrada após cada adição, até à completa saturação da hemoglobina por este ligante. Com as leituras da desoxihemoglobina, carboxihemoglobina e das saturações intermediárias, feitas em 432 nm (pico da desoxiHb) e em 419 (pico da carboxiHb) foi calculada a porcentagem de saturação de cada adição de CO. Com esses valores de \bar{Y} e com os valores da concentração do CO em cada adição, calculou-se o valor de C_{50} , isto é, a concentração de CO necessária para saturar 50% das moléculas de hemoglobina. Considerando que essa concentração corresponde a concentração do CO total, isto é, a quantidade de monóxido de carbono que foi injetada e sabendo-se que nessas condições o C_{50} é dependente da concentração de proteína (ANTONINI et alii, 1963), corrigimos o valor de C_{50} para uma solução de hemoglobina de concentração $1 \times 10^{-7} M$. O n (coeficiente de Hill), foi calculado pela tangente da curva de \bar{Y} contra concentração de CO.

Esses experimentos foram feitos com hemoglobina em tampão bis-tris lactato 0,05M, no intervalo de pH entre 6 a 8 na presença e ausência de ATP na concentração final de $1 \times 10^{-3} M$.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO BOHR

O cálculo do efeito Bohr foi feito através de gráficos registrando-se nas abcissas os valores de pH e nas ordenadas os valores de $\log P_{50}$, determinando-se, então, a tangente da curva obtida.

Esse valor, (H^+) , denominado efeito Bohr pode ser positivo ou negativo dependendo do tipo de inclinação que a curva apresentar e expressa a mudança de afinidade da hemoglobina pelo ligante quando se altera o pH.

A determinação do efeito Bohr fornece um parâmetro que possibilita avaliar as alterações das interações homotrópicas na molécula de hemoglobina bem como o efeito das alterações heterotrópicas produzidas pela presença de polifosfatos.

ESTUDO IMUNOLÓGICO DE HEMOGLOBINAS DE ANFÍBIOS

IMUNIZAÇÃO

Para o estudo imunológico das hemoglobinas foram obtidos em coelhos soros contra hemolisado total e o segundo componente cromatográfico (Hb II) de hemoglobina de B. paracnemis e soros contra hemolisado total e terceiro componente cromatográfico (Hb III) de hemoglobina de Pipa carvalhoi.

As inoculações foram feitas semanalmente por via intramuscular (nos linfonodos das patas trazeiras) usando adjuvante completo de Freund na proporção de v/v. Do hemolisado total foi usado cerca de 35 mg de hemoglobina em cada injeção durante um período de 3 meses tanto para hemoglobina de B. paracnemis como para hemoglobina de P. carvalhoi. Essa imunização foi continuada por mais um mês, com injeções sub-cutâneas feitas semanalmente no dorso do animal com adjuvante completo de Freud. Paralelamente foram injetados coelhos com Hb II de B. paracnemis e Hb III de P. carvalhoi, que foram concentradas por diálise contra solução saturada de polietilenoglicol (PM = 20.000d) a 4°C. As inoculações foram feitas semanalmente por via intra-muscular (nos glânglios popliteais) usando cerca de 4 a 10 mg de hemoglobina emulsionada com adjuvante completo de Freund (em partes iguais v/v). No início todos os coelhos foram sangrados diariamente para se verificar em quanto tempo se obtinha a formação de anticorpo e a partir do 4º mês, foram feitas injeções semanais no dorso dos animais com os antígenos nas mesmas condições anteriores. Por dificuldades de manter esses coelhos imunizados por maiores períodos, até obtenção de imunesoro menos específico resolvemos inocular carneiro, pois não só obtínhamos maior quantidade de soro hiper imune e por ser um animal que tolera melhor as frequentes injeções usadas no processo de imunização.

Usamos carneiro fêmea, de aproximadamente 60 kg, que foi inoculado por via intramuscular com Hb II de B. paracnemis, injetando-se cerca de 5mg de hemoglobina com adjuvante completo de Freund (v/v), semanalmente. Essa imunização foi feita por um período de 6 meses que foi suficiente para obtenção de um soro imune de menor especificidade, a fim de poder reagir com hemoglobinas de outros anfíbios.

IMUNODIFUSÃO DUPLA

As técnicas de imunodifusão para análise imunológica comparativa foram realizadas com gel de agarose a 1% em tampão fosfato 0,01M - NaCl 0,15M pH 7,1, segundo o método de OUCHTERLONY, (1958). O preparo das lâminas para a imunodifusão foi feito usando cerca de 4 ml da agarose fundida que se colocava cuidadosamente com auxílio de uma pipeta, sobre uma lâmina de vidro (75 x 25mm) bem limpa e seca. Após solidificação, foram feitos orifícios no gel com um molde próprio para este fim, sendo a distância entre os orifícios padronizada, onde se colocou o material a ser analisado. Geralmente, no furo central colocava-se o imune-soro e nos orifícios ao redor, os antígenos, isto é, as soluções de hemoglobinas a serem testadas, que foram colocadas 2 horas depois da aplicação do imune-soro. As lâminas de gel foram mantidas em câmara úmida e as reações antígeno-anticorpo foram feitas à temperatura ambiente. Após algumas horas de reação, observou-se a formação de linha de precipitação sendo a leitura final feita somente com 24 horas. Em seguida, as lâminas de gel foram lavadas com solução de NaCl 0,15M durante 2 a 4 dias com sucessivas trocas, e o gel foi desidratado com auxílio de um pedaço de papel de filtro cobrindo toda a superfície da lâmina e deixando-se à temperatura ambiente até se tornarem totalmente secas. Após esse tratamento foi retirado o papel e as lâminas foram coradas

com solução de Comassie-blue a 2% durante 10 minutos, e o excesso de corante foi removido por uma solução descorante contendo 1,4ml de metanol, 7 ml de ácido acético, para 100 ml de H₂O destilada . As soluções de hemoglobinas usadas nas reações foram padronizadas em suas concentrações para 1 mg/ml ou 4 mg/ml dependendo do experimento.

IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES

A técnica de imunodifusão radial simples, para quantificação de reação antígeno-anticorpo foi feita segundo MANCINI et alii (1964 e 1965). Foi preparado uma solução de agarose a 2% em tampão fosfato 0,01M contendo NaCl 0,15M pH 7,1 e igual volume de soro anti-Hb II de B. paracnemis, diluído 3 vezes no mesmo tampão e foi adicionado a agarose fundida, quando esta alcançava a temperatura de 56°C aproximadamente. Em seguida, 20 ml do gel de agarose contendo anticorpos foi distribuído sobre uma lâmina de vidro (12 x 9cm), cuidadosamente, com uma pipeta e esperou-se solidificar. Foram feitos orifícios no gel e colocados os antígenos, ou seja, 50 µl de solução de hemoglobina dos diferentes anfíbios que apresentaram reações cruzadas, nas mesmas concentrações (1 mg de Hb/ml). Após 24 horas de reação à temperatura ambiente e em câmara úmida, as lâminas foram lavadas com solução de NaCl 0,15M, secadas e coradas conforme descrito no item anterior e o diâmetro

dos halos de precipitação foram medidos. O diâmetro do halo da reação com o antígeno homólogo foi definido como 100% de reação e as demais reações foram calculadas a partir desse parâmetro.

TESTES PRELIMINARES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

O soro anti-Hb II de B. paracnemis foi incubado a 50°C por 30 minutos a fim de inativar o complemento e diluído em tampão fosfato 0,01M contendo NaCl 0,15M pH 7,1, usando diluições seriadas de razão 2 desde 1:2 até 1:64. Para cada diluição do soro foi testado o antígeno homólogo, Hb II de B. paracnemis, em diferentes concentrações: 0,9mg/ml; 0,7mg/ml; 0,4mg/ml; 0,2mg/ml; 0,1mg/ml; 0,06mg/ml e 0,03mg/ml, usando na reação 0,5ml de cada concentração do antígeno e 0,5 ml de cada diluição do soro.

Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 24 horas e centrifugados. O resultado foi determinado qualitativamente pela observação do precipitado formado, sendo que os tubos com maior precipitação indicam as melhores concentrações de antígeno e anticorpo para se processar a reação.

IMUNOPRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

Após a avaliação preliminar das concentrações ideais de antígeno e anticorpo para a máxima precipitação do imuno-complexo, foram feitos os testes de imunoprecipitação em meio líquido (HEIDELBERGER & KENDALL, 1935) e a quantidade de proteína dos precipitados foi determinada por técnica espectrofotométrica.

Para tanto, o soro foi diluído 1:16 em tampão fosfato 0,01M - NaCl 0,15 pH 7,1 e colocado em 10 tubos, usando 0,5 ml/tubo. Para cada tubo foi adicionado 0,5 ml de antígeno cujas concentrações variavam de 0,5mg/ml a 0,020mg/ml, estimada como ideal. Os tubos foram agitados e incubados a 4°C por 48 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados 10.000 rpm por 2 a 5 minutos. O precipitado obtido foi lavado com solução de cloreto de sódio 0,15M, gelada, por 3-4 vezes e ressuspendido em 0,5 ml de solução de hidróxido de sódio 0,1M a fim de se dissolver o complexo antígeno-anticorpo.

Essa solução foi então lida no espectrofotômetro em 260, 280 e 410 nm. A concentração de proteínas totais do precipitado foi determinada pelo método de WARBURG & CHRISTIAN (1941), utilizando-se o cálculo: $A_{280} \times 1,45 - A_{260} \times 0,74 = \text{mg de proteína/ml}$ (KALCKAR, 1947). A concentração de hemoglobinas foi feita utilizando-se o coeficiente de extinção mM em 410 nm, $E = 120$.

A avaliação da quantidade de anticorpos no precipitado

foi feita pela diferença entre proteína total menor antígeno e esses dados foram lançados em gráfico onde se colocou em ordenadas anticorpos precipitados, em mg e nas abcissas as quantidades de antígeno adicionado, também em miligramas. Com os dados de mg de antígeno e de proteína total precipitada em cada ensaio calculou-se mg de anticorpo precipitado pela diferença e a relação Ac/Ag em peso foi estimada. Esta relação ponderal foi convertida em relação molar dividindo-se pelo quociente dos pesos moleculares do anticorpo de carneiro (ESTEVES et alii, 1972) do antígeno ($160.000/64.000 = 2,5$). Os valores da relação molar em função de antígeno adicionado que mostra uma função linear (HEIDELBERGER & KENDALL, 1935) foram aplicados na equação: $Ac/Ag = a - b Ag$, onde a = coeficiente linear e b = coeficiente angular a fim de se calcular a relação molar existente na região de máximo excesso de anticorpos (a). Esses cálculos foram feitos por regressão linear simples. Baseado no trabalho de KABAT (1961), a relação molar, nessas condições, exprime o dobro da valência dos antígenos, assumindo que os anticorpos são bivalentes e b fornece uma estimativa da avididade do anticorpo pelo antígeno testado e o pico de maior precipitação é dado, no gráfico, no eixo das abcissas que corresponde a $a/2$.

Considerando esse número de sítios no antígeno homólogo sendo o máximo (100%), pode-se calcular as porcentagens de semelhança antigênica de cada uma das demais hemoglobinas em relação a Hb II de B. paracnemis.

RESULTADOS

SEPARAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPONENTES POR ELETROFORESE

A separação analítica dos componentes dos hemolisados de eritrócitos de B. paracnemis, de P. pipae, de P. carvalhoi e de R. catesbeiana foram feitos por eletroforese em gel de poliacrilamida e por eletroforese em gel de amido (figura 2). Os hemolisados dos eritrócitos foram convertidos na forma de carboxihemoglobina pela adição de monóxido de carbono ou de cianohemoglobina pela adição de uma solução de KCN 2% pH 7,0 e aplicados nos geles. Após a corrida eletroforética os geles foram corados para proteína com solução de Coomassie-Brillant Blue a 2%.

A eletroforese em disco de gel de poliacrilamida utilizando um gradiente de pH entre 8,9 e 8,1 e uma intensidade de corrente elétrica de 2 mA por tubo mostrou que o hemolisado total de B. paracnemis apresentava duas populações de hemoglobinas, HbI e HbII, sendo que a primeira era mais anódica e que se encontrava em maior proporção. Trabalhando com hemolisado de eritrócitos de P. pipae a eletroforese em idênticas condições mostrou a existência de 4 componentes, todos anódicos: HbI, HbII, HbIII e Hb IV, sendo o HbIII o de maior proporção.

Os resultados em poliacrilamida foram confirmados em

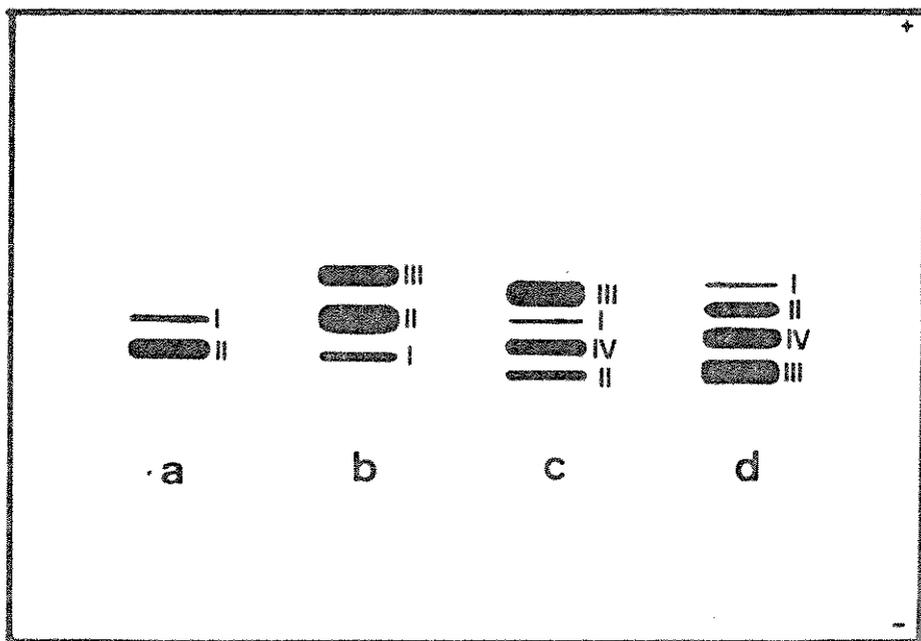


Figura 2. Esquema da eletroforese em gel de amido mostrando os diferentes componentes das hemoglobinas de:

- a) B. paracnemis
- b) R. catesbeiana
- c) P. pipae
- d) P. carvalhoi

A numeração (I - IV) corresponde a eluição cromatográfica em CM-celulose.

eletroforese vertical em gel de amido utilizando-se gradiente de concentração entre 0,03M e 0,3M de tampão borato pH 9,2, tanto para hemolisado de B. paracnemis como para o de P. Pipae. Para as hemoglobinas de R. catesbeiana já bastante estudadas por RIGGS (1951) e confirmadas por nós mostraram a existência de 3 a 4 componentes quando submetidas a eletroforese vertical em gel de amido (AGGARWAL & RIGGS, 1969). Já as hemoglobinas de P. carvalhoi mostraram a existência de 4 componentes conforme relatado (MEIRELLES & FOCESI, 1977), utilizando as mesmas técnicas.

SEPARAÇÃO PREPARATIVA DOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Para separação e caracterização dos componentes das diferentes hemoglobinas em estudo, utilizou-se cromatografia de troca iônica. O hemolisado de B. paracnemis foi submetido à cromatografia de CM-celulose equilibrada em tampão fosfato 0,01M pH 6,4 usando gradiente linear de pH. A amostra foi dialisada contra o mesmo tampão contendo β -mercaptoetanol na concentração final de 10^{-3} M e colocada na coluna onde se efetuava o gradiente de pH. O primeiro componente, menos anódico na eletroforese, foi eluído em tampão fosfato 0,01M pH 6,8 e correspondia a cerca de 20-30% do hemolisado total. O segundo componente foi eluído com o mesmo

tampão quando o pH atingia 7,7 e correspondia a 80-70% do hemolizado total (Figura 3).

O perfil cromatográfico do hemolizado total de P. pipae em cromatografia de CM-celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 6,4 mostrou a separação de 4 componentes utilizando gradiente linear de pH. O primeiro componente foi eluido em tampão fosfato 0,01M pH 6,5 que correspondia a 4% do hemolizado total. O segundo componente foi eluido com o mesmo tampão porém em pH 6,8, correspondendo cerca de 6% da hemoglobina total. O terceiro componente que representa 71% do total, foi eluido quando o pH atingia 7,4 e o quarto componente foi eluido em pH 7,8 e representava 19% do hemolizado total (Figura 4).

O hemolizado de eritrócitos de P. carvalhoi mostrou a existência de 4 componentes quando submetido à cromatografia de troca iônica em CM-celulose equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 6,4 usando gradiente linear de pH que variou entre pH 6,4 a pH 8,5. O primeiro componente foi eluido em pH 6,4 e correspondia a 2% do hemolizado. O segundo em pH 7,0 representava 10% do total; o terceiro, em pH 7,6, representava 68% e o quarto, representando 20% foi eluido em pH 8,3 (Figura 5).

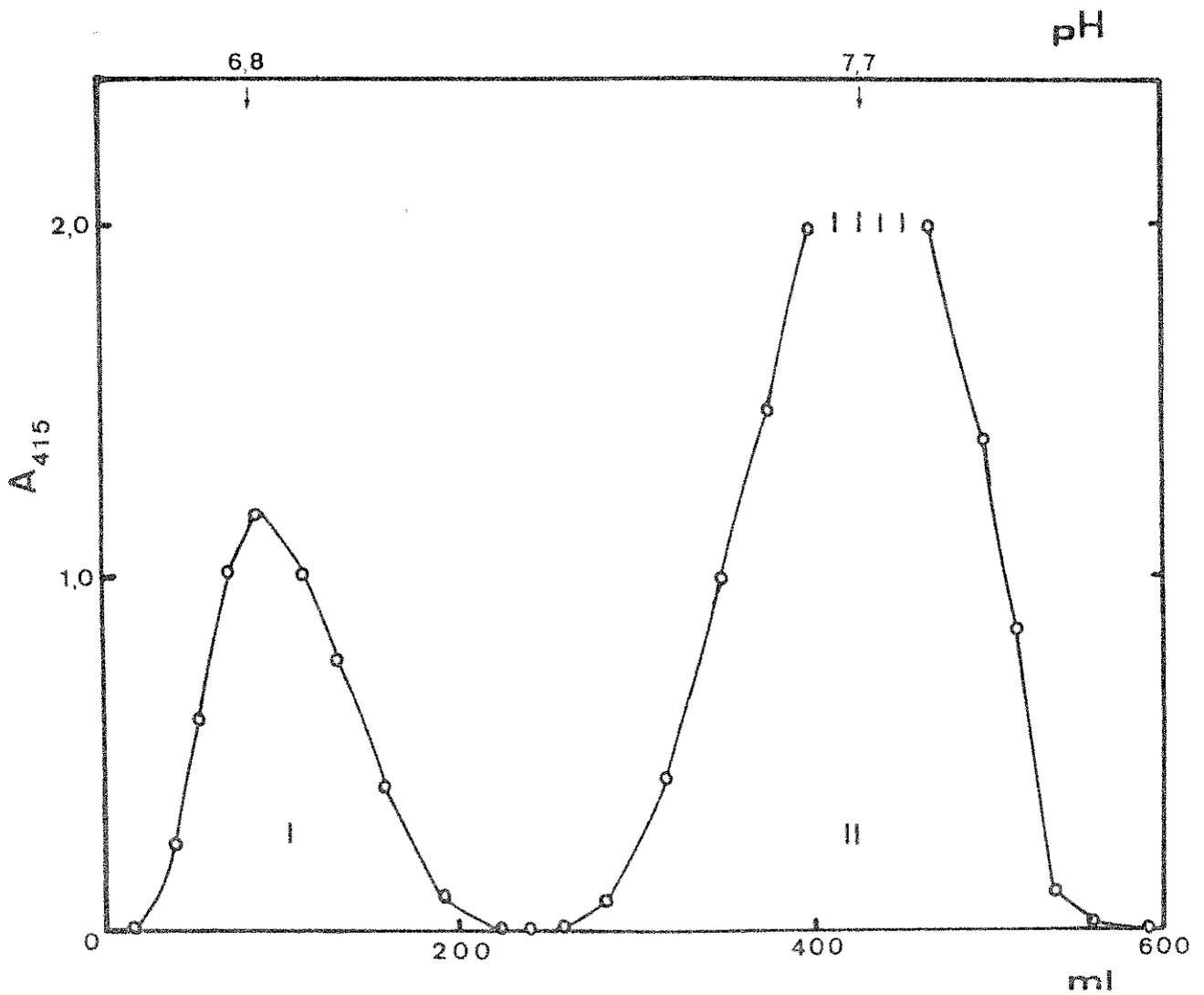


FIGURA 3. Mostra o perfil cromatográfico do hemolisado total de eritrócitos de Bufo paracnemis em CM-celulose eluída com tampão fosfato 0,01M em gradiente linear de pH.

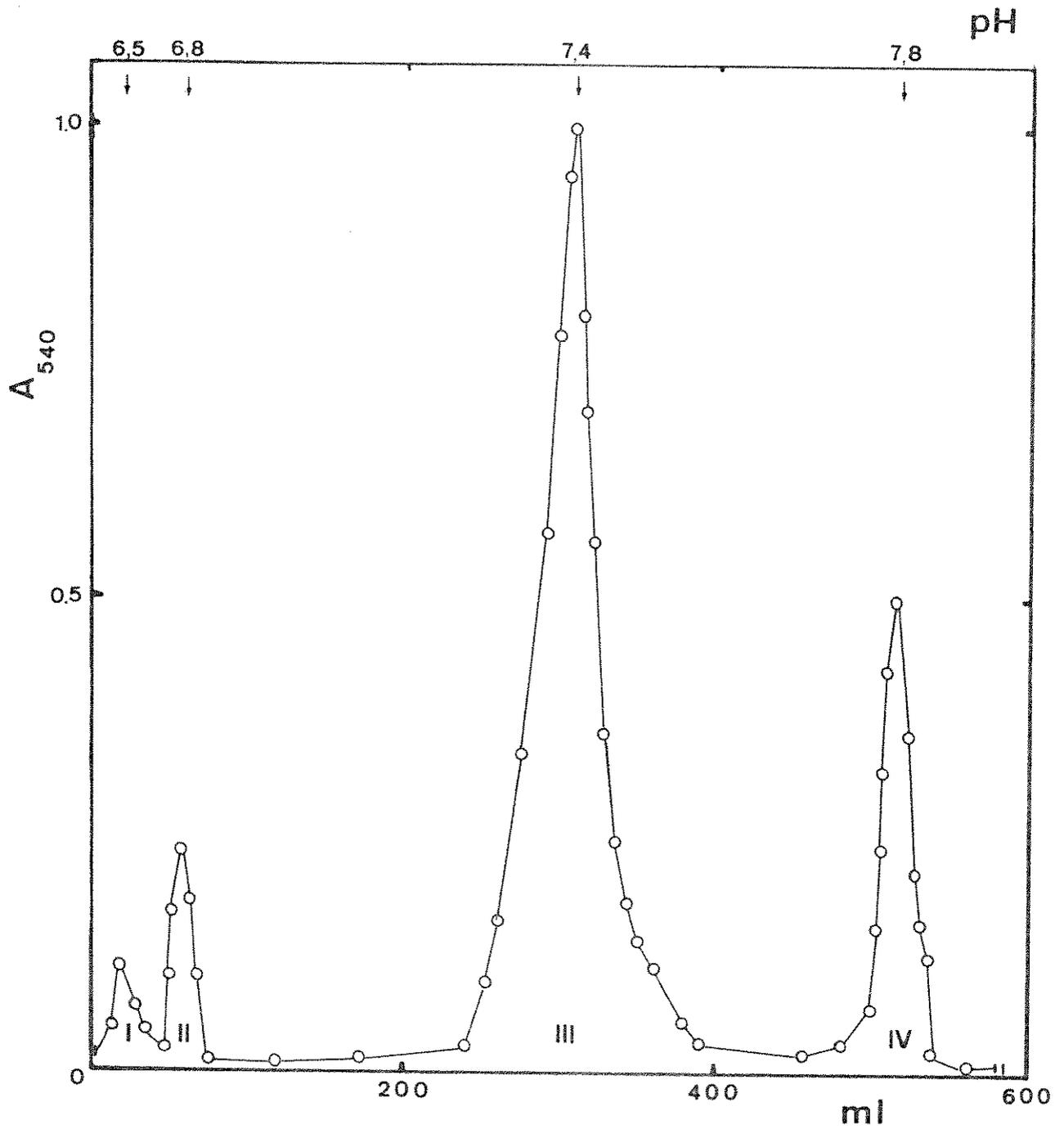


FIGURA 4. Separação dos componentes de hemoglobina de *P. pipae* por cromatografia em CM-celulose eluída em tampão fosfato 0,01M em gradiente de pH.

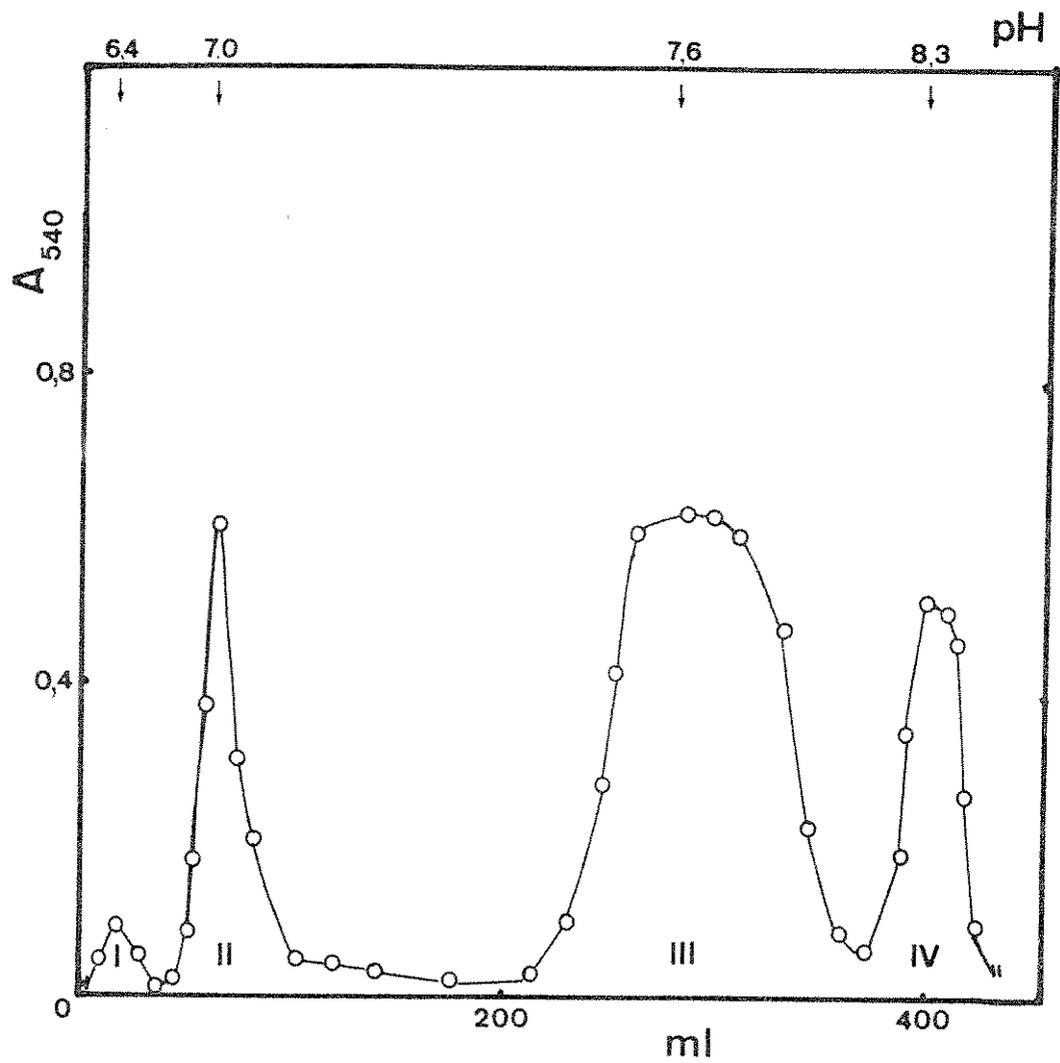


FIGURA 5. Cromatografia de hemolisado total de eritrócitos de Pipa carvalhoi em CM-celulose eluída com tampão fosfato 0,01M em gradiente linear de pH.

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS HEMOGLOBINAS

EQUILÍBRIO COM OXIGÊNIO

As propriedades funcionais das hemoglobinas de B. paracnemis, P. pipae, P. carvalhoi e R. catesbeiana, foram estudadas tanto no hemolisado total como em alguns dos componentes. Para tanto foram preparadas amostras isentas de cofatores através da passagem por colunas cromatográficas de Sephadex G-25, Dowex-1, Dowex-50w e uma mistura de Amberlite IRC-50 e IR-4B, conforme descrito em Material e Métodos. Os eluatos foram diluídos em tampão bis-tris lactato 0,05M de pH que variava de 6 a 8.

A afinidade dessas hemoglobinas pelo oxigênio foram estudadas pela técnica espectrofotométrica. Os dados relativos aos parâmetros funcionais P_{50} (pressão de O_2 para saturação de 50% das moléculas de Hb) e n (coeficiente de Hill) foram obtidos com amostras de hemolisados de eritrócitos ou dos componentes, após transformadas na forma desoxi foram submetidas as diferentes pressões do ligante O_2 . A sequência destes eventos foram acompanhadas espectrofotometricamente. Assim hemolisado total de B. paracnemis isento de cofatores em uma concentração em torno de 5×10^{-5} em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M pH 7,0 apresentou um $\log P_{50}$ de 1,27, quando isento de cofatores. Na presença de ATP em concentração

saturante (10^{-3} M) não se verificou mudança na afinidade dessas hemoglobinas pelo oxigênio. Os valores de \underline{n} (coeficiente de Hill) encontrados foram sempre maiores que 1 (Tabela I).

O segundo componente cromatográfico de hemoglobina de B. paracnemis que corresponde a fração mais concentrada apresentou, quando isento de cofatores as mesmas características do hemolisado total não demonstrando nenhuma alteração do $\log P_{50}$ quer na ausência ou presença de ATP. Os valores do coeficiente de Hill (\underline{n}) também permaneceram inalterados durante os experimentos acima estudados (Tabela I).

A reação de equilíbrio com O_2 do hemolisado de eritrócitos de P. carvalhoi em uma concentração cerca de 5×10^{-5} M em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M pH 7,0 mostrou $\log P_{50}$ de 0,80 para hemoglobina isenta de cofatores e na presença de ATP 10^{-3} M esse valor passou para 1,0.

Com o componente III o $\log P_{50}$ obtido para a hemoglobina isenta de íons e com ATP 10^{-3} M foi de 0,84 e 1,1 respectivamente. Os valores de \underline{n} indicam cooperatividade (Tabela I).

Para hemoglobina de P. pipae isenta de cofatores em uma concentração em torno de 5×10^{-5} M em tampão bis-tris 5×10^{-2} M obteve-se um $\log P_{50}$ de 0,36 a pH 7,0 e um $\log P_{50}$ de 0,74 no mesmo pH, quando em presença de ATP 10^{-3} M. A interação heme-heme praticamente não foi alterada pois os valores de \underline{n} variaram entre 2 a 1,5 quer na ausência ou presença de ATP (Tabela I).

TABELA I

Valores de $\log P_{50}$ e coeficiente de Hill nas reações de equilíbrio de diferentes hemoglobinas com o ligante oxigênio, em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M, pH 7,0, tratados ou não com ATP 1×10^{-3} M.

HEMOGLOBINAS	$\log P_{50}$		n	
	Isenta de Cofatores	ATP	Isenta de Cofatores	ATP
<u>B. paracnemis</u>	1,27	1,29	1,97	1,89
Hb-II de <u>B. paracnemis</u>	1,19	1,15	1,85	1,75
<u>P. carvalhoi</u>	0,30	1,0	2,00	1,60
Hb-III de <u>P. carvalhoi</u>	0,84	1,1	2,23	1,65
<u>P. pipae</u>	0,36	0,74	1,58	1,62
<u>R. catesbeiana</u>	1,22	1,23	2,1	2,00

A reação de equilíbrio com O_2 das hemoglobinas de R. castesbeiana mostrou em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ pH 7,0 valores de $\log P_{50}$ ao redor de 1,22 para a hemoglobina isenta de cofatores e os mesmos valores na presença de ATP $10^{-3} M$. Os valores de \underline{n} obtidos foram sempre maiores que 2, indicando uma interação heme-heme positiva (Tabela I).

EQUILÍBRIO COM MONÓXIDO DE CARBONO

As propriedades funcionais do primeiro componente cromatográfico correspondente à fração menos concentrada de B. paracnemis foram estudadas através de reação com monóxido de carbono, tanto na presença de ATP como quando isenta de íons. Para isto, amostras diluídas em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$, pH variando de 6 a 8 foram preparadas de modo que a concentração final ficasse por volta de $1 \times 10^{-6} M$ a $5 \times 10^{-7} M$. A afinidade da hemoglobina pelo ligante CO foi analisada em função dos valores de C_{50} . Para estudo destes valores nós utilizamos de técnica espectrofotométrica descrita em métodos.

Os resultados do $\log C_{50}$ obtidos para o componente I de Hb de B. paracnemis em pH 7,0 foi de -7,10 para a hemoglobina isenta de cofatores e de -6,95 para a hemoglobina na presença de ATP $10^{-3} M$. O valor do coeficiente de Hill, \underline{n} , variou de 1,7 a 1,9 no pH estudado.

EFEITO BOHR NAS HEMOGLOBINAS

A afinidade das hemoglobinas pelo O_2 foram analisadas a través de determinação do P_{50} em diferentes pH e o efeito Bohr (H^+) foi determinado pela razão,

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

Trabalhando com o hemolisado total de B. paracnemis em tampão bis-tris-lactato $5 \times 10^{-2} M$ na faixa de pH que variou de 6,5 a 8,0, foi encontrado para a amostra isenta de íons, pequena diferença nos valores de $\log P_{50}$ o que mostrou um efeito Bohr alcalino quase nulo ($H^+ = -0.08$). Na presença de ATP $10^{-3} M$, utilizando-se as mesmas condições acima, o efeito Bohr observado foi o mesmo, já que este efector não atua sobre essas hemoglobinas (Figura 5).

Para segunda fração cromatográfica, correspondente à fração mais concentrada, HbII, de B. paracnemis foi também verificada ausência de efeito Bohr quando estudada com o mesmo tampão entre pH 6,5 e 8,0 e em presença de ATP apresentou o mesmo comportamento do hemolisado total (Figura 6).

Os resultados obtidos para o componente I de B. paracnemis, isento de íons, usando CO como isento em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ pH variando de 6,7 a 7,7 mostraram que a afinidade dessa molécula pelo CO não é alterada quando se altera o pH, isto é, essa fração não apresenta efeito Bohr. Quan-

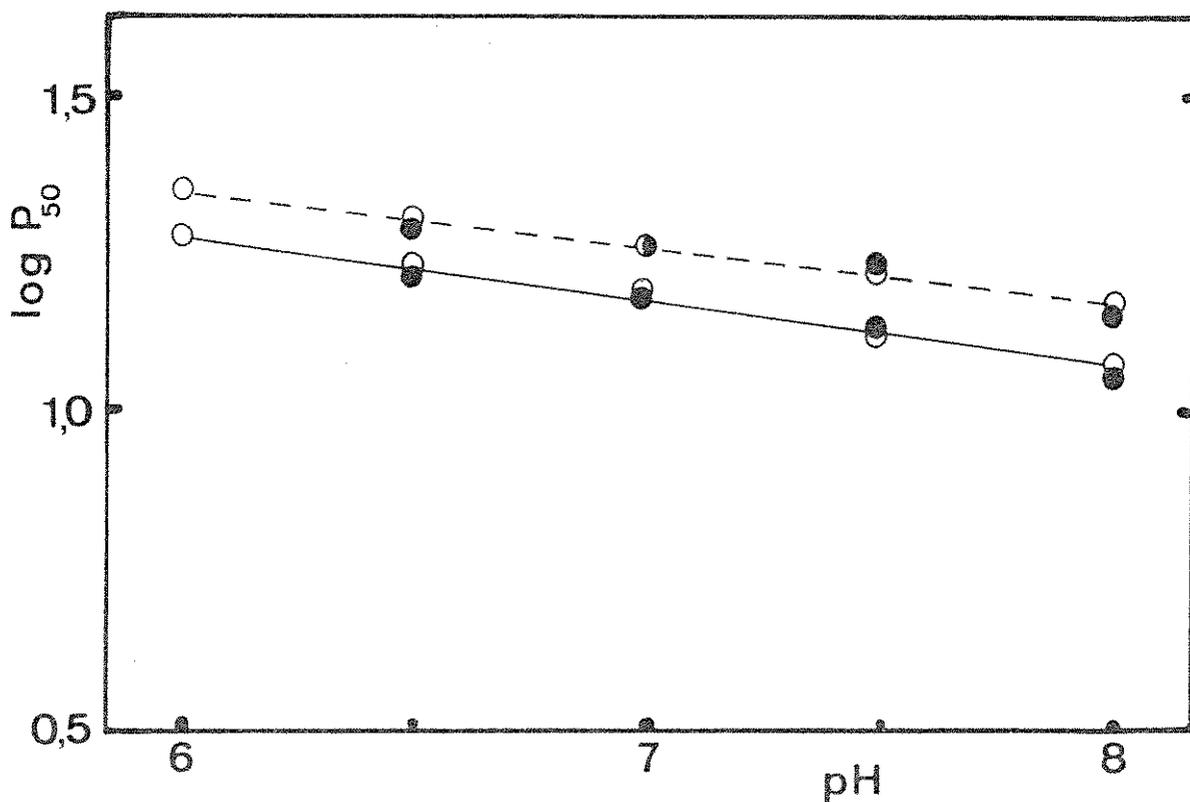


FIGURA 6. Efeito Bohr das hemoglobinas isentas de cofatores (o) e com ATP 10^{-3} M (●) do hemolisado de eritrócitos (---) e do segundo componente cromatográfico, Hb II (—) de B. paracnemis em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M.

to ao efeito de ATP em concentração saturante os resultados obtidos mostraram que essa molécula apresenta efeito Bohr de $-0,26$ quando em presença de ATP na faixa de pH estudada (Figura 7).

O efeito Bohr encontrado no hemolisado de eritrócitos de P. carvalhoi em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ na faixa de pH entre 6,5 a 8,0 mostrou, com o ligante O_2 , um valor de $-0,06$ na hemoglobina isenta de cofatores. Esse efeito, quando em presença de ATP $10^{-3} M$, apresentou valor de $-0,46$ para o mesmo hemolisado de eritrócitos. O componente III de P. carvalhoi estudado nas mesmas condições do hemolisado mostrou possuir um efeito Bohr de $-0,39$ na presença de ATP $10^{-3} M$. Na ausência desse nucleotídeo esse efeito foi praticamente nulo, isto é, $-0,04$ (Figura 8).

Os estudos feitos com hemolisado de eritrócitos de P. pipae em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ isento de cofatores com variação de pH entre 6,5 a 8 evidenciaram mínimas modificações nos valores de $\log P_{50}$, mostrando um efeito Bohr de $H^+ = -0,01$. Porém na presença de fosfato orgânico usando ATP em concentração saturante os valores de $\log P_{50}$ em pH menor que 7 foram bastante alterados, mostrando serem essas hemoglobinas moduladas pelo ATP que diminui a afinidade delas pelo O_2 substancialmente, cujo efeito Bohr foi de $H^+ = -0,3$ na mesma faixa de pH (Figura 9).

O hemolisado total de R. catesbeiana isento de cofatores em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ na faixa de pH entre 6,5 e 8,0 apresentou um efeito Bohr de $H^+ = -0,29$. As mesmas experiên-

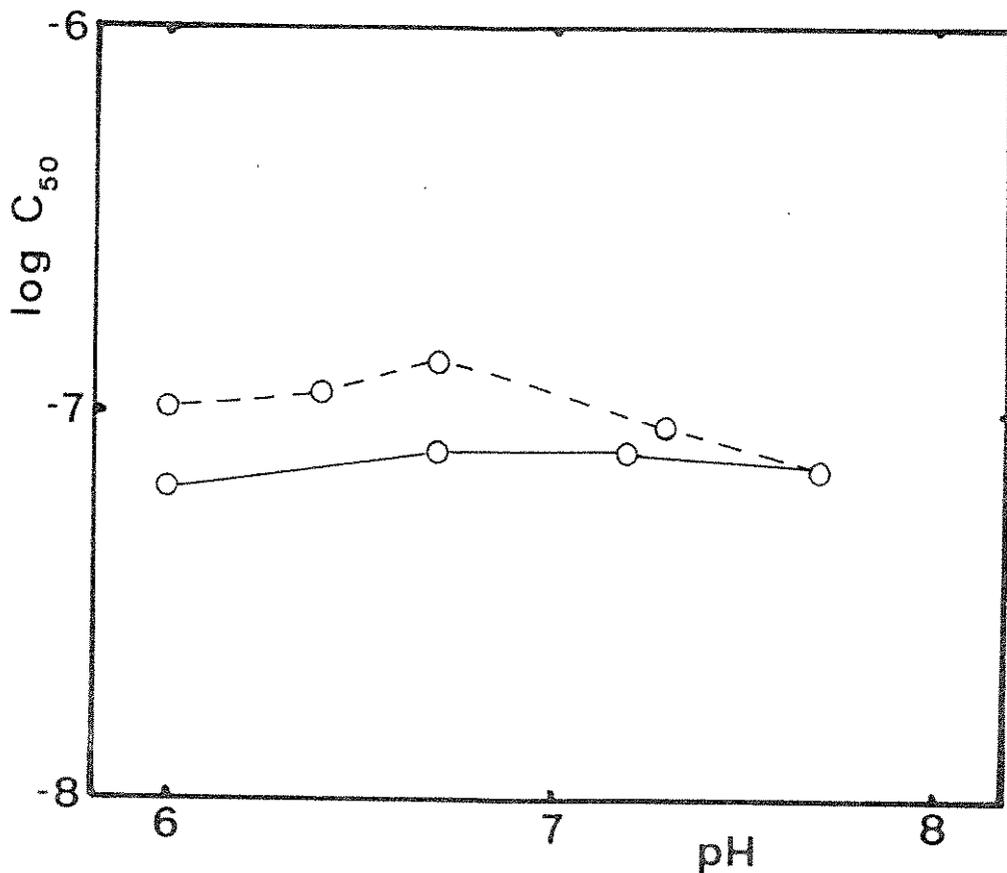


FIGURA 7. Afinidade do primeiro componente cromatográfico (Hb-I) de B. paracnemis em termos de $\log C_{50}$ e pH, na ausência (o—o) e presença de ATP $10^{-3}M$ (o---o), em tampão bis-tris lactato $5 \times 10^{-2}M$, usando CO como ligante.

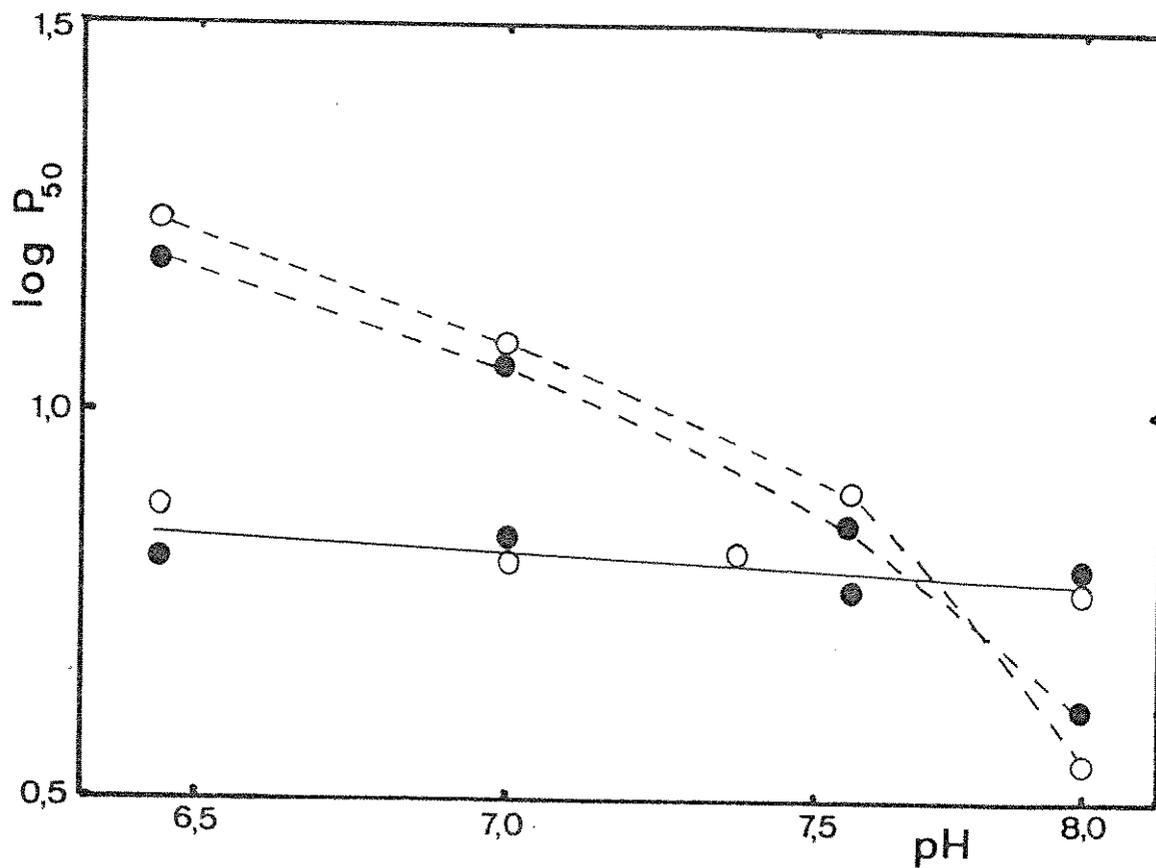


FIGURA 8. Efeito Bohr das hemoglobinas isentas de cofatores (—) e na presença de ATP 10^{-3} M (---) do hemolisado de eritrócitos (o) e terceiro componente cromatográfico, Hb III (●) de *P. carvalhoi* em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M.

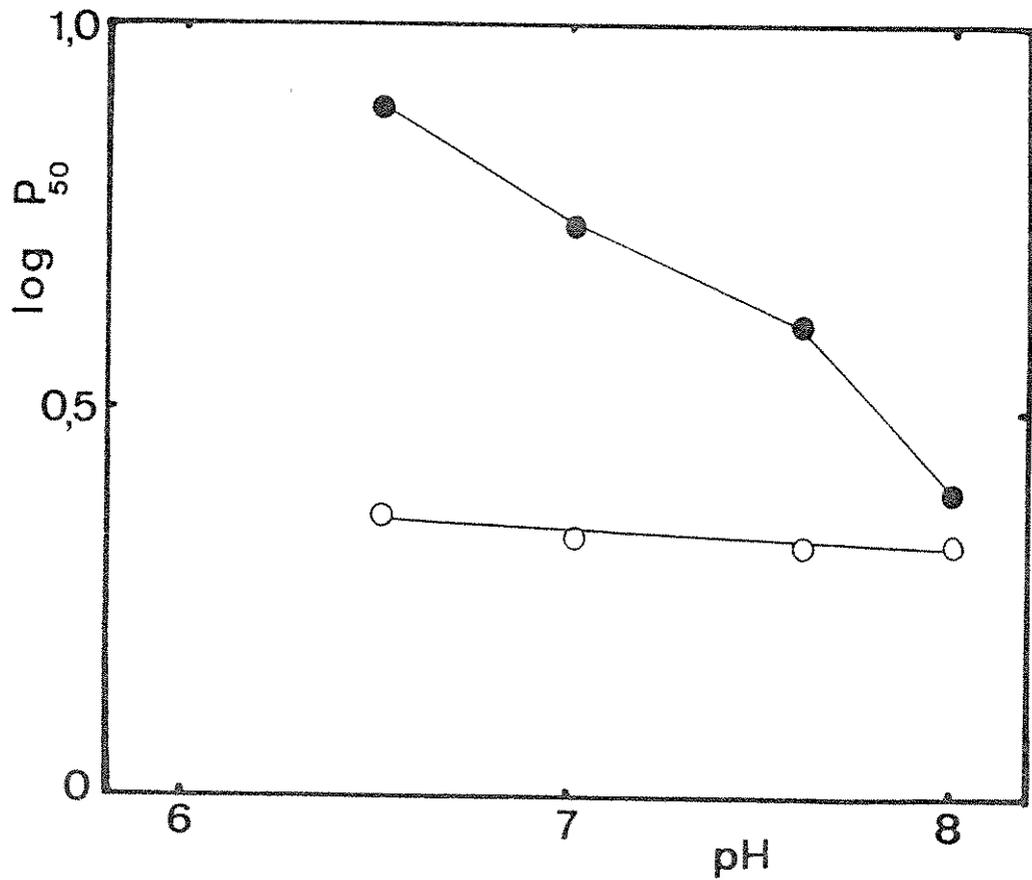


FIGURA 9. Efeito Bohr de hemolisado de eritrócitos de P. pipae na ausência (o—o) e na presença de ATP 10⁻³M (●—●) em tampão bis-tris lactato 5x10⁻²M.

cias feitas em presença de ATP 10^{-3} não demonstraram alterações nos valores de $\log P_{50}$ obtidos anteriormente, apresentando um efeito Bohr semelhante ao obtido na ausência deste efector (Figura 10).

ESTUDO IMUNOLÓGICO DE HEMOGLOBINAS DE ANFÍBIOS

TITULAÇÃO DOS SOROS

Para o estudo imunológico foram obtidos em coelhos soros contra hemolisado total e contra o segundo componente cromatográfico (Hb-II) de B. paracnemis e ainda soros contra o hemolisado total e contra o terceiro componente cromatográfico (Hb-III) de P. carvalhoi. Após quase 4 meses de inoculação, os soros por testes de imunodifusão mostraram títulos de 1:8 e 1:32 para o hemolisado e para os componentes II de B. paracnemis e 1:4 tanto para hemolisado como para componente III de P. carvalhoi.

Por dificuldades de manter esses coelhos imunizados por maiores períodos, até obtenção de ímune-soros menos específicos resolvemos inocular carneiros, pois além de se obter maior quantidade de soro sabe-se que esse animal é capaz de tolerar melhor as frequentes injeções usadas no processo de imunização. Usamos carneiro fêmea, que foi inoculado com HbII de B. paracnemis utilizando esquema de imunização semelhante ao anterior por um pe

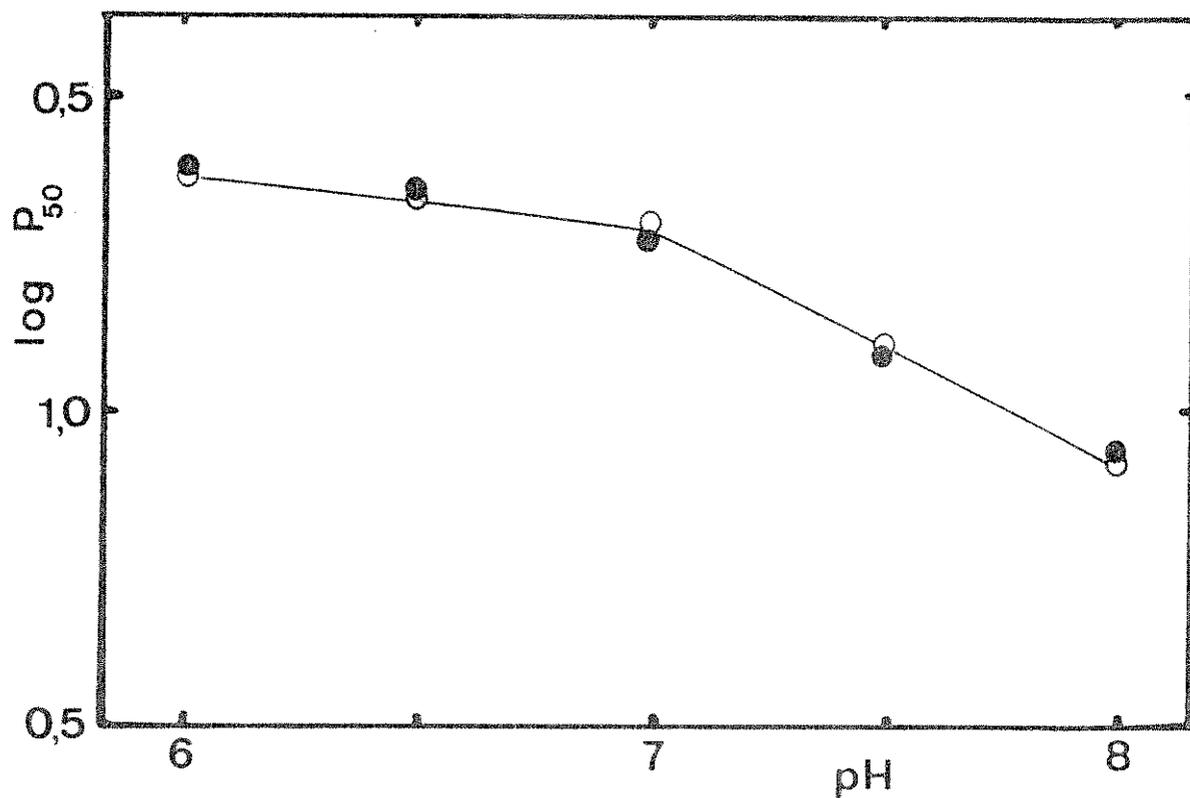


FIGURA 10. Efeito Bohr de hemolisado de eritrócitos de R.catesbeiana na ausência (o—o) e na presença de ATP 10^{-3} M (●—●) em tampão bis-tris lactato 5×10^{-2} M.

rīodo total de 6 meses onde conseguimos imune-soro cujo tītulo por teste de imunodifusāo foi de 1:128, sendo tambēm observado a diminuiçāo da especificidade desse soro anti-HbII, que passou a mostrar reaçōes cruzadas, em testes de imunodifusāo, com HbI de B. paracnemis e com hemolisado de eritrōcitos de diferentes animais, bem como com alguns dos componentes testados (Tabela II). Nessa mesma tabela estāo os resultados obtidos com o soro de coelho anti-Hb-III de P. carvalhoi.

COMPARAÇAO ANTIGENICA DE DIFERENTES HEMOGLOBINAS

IMUNODIFUSAO DUPLA

Utilizando o soro hiperimune obtido em coelhos e carneiro, testes de imunodifusāo em gel de agar (imunodifusāo bidimensional dupla) foram feitos a fim de se analisar o tipo de identidade das hemoglobinas que deram reaçōes cruzadas.

Assim, podemos observar trēs tipos de reaçāo cruzada nas hemoglobinas dos anfībios estudados: identidade total, identidade parcial e nāo identidade. A identidade total foi caracterizada pela nāo existēncia de determinantes antigēnicos diferentes quando duas hemoglobinas distintas foram testadas. A identidade

TABELA II

Resultados qualitativos de reações de imunodifusão em gel de agar utilizando 0,9 mg/ml de antígeno (hemoglobina) com soro de carneiro anti-Hb-II de B. paracnemis e soro de coelho anti-Hb-III de P. carvalhoi.

Hemoglobinas	Soro anti-Hb-II <u>B. paracnemis</u>	Soro anti-Hb-III de <u>P. carvalhoi</u>
Humana	-	
Carneiro	-	
Peixe (<i>Pterygoplichtys</i> sp)	-	
Serpente (<i>Liophis miliaris</i>)	-	
<u>B. paracnemis</u>	+	-
Hb-I de <u>B. paracnemis</u>	+	-
Hb-II de <u>B. paracnemis</u>	+	-
<u>B. marinus</u>	+	-
<u>L. labyrinthicus</u>	+	-
<u>R. catesbeiana</u>	+	-
<u>R. catesbeiana</u> (girino)	-	-
<u>H. geographica</u> (girino)	-	-
<u>P. pipae</u>	+	-
<u>P. carvalhoi</u>	+	-
Hb-I de <u>P. carvalhoi</u>	-	+
Hb-II de <u>P. carvalhoi</u>	-	+
Hb-III de <u>P. carvalhoi</u>	+	+
Hb-IV de <u>P. carvalhoi</u>	+	+

parcial foi caracterizada pela existência de apenas alguns determinantes antigênicos comuns à duas diferentes hemoglobinas. A não identidade foi caracterizada pela não existência de alguns de terminantes antigênicos comuns a duas hemoglobinas distintas quando comparadas.

Os resultados desses testes mostraram quando se trabalhou com soro de coelho anti-Hb III de P. carvalhoi, que havia identidade total apenas entre os componentes I e II de P. carvalhoi e entre os componentes I e III e entre II e III, reação de identidade parcial. As lâminas feitas com o componente IV não permitiu avaliar o tipo de reação de identidade desse componente com os demais (Figura 11). Com o soro de carneiro anti-Hb II de B. paracnemis várias reações foram processadas e identidade total foi observada entre Hb II de B. paracnemis e hemoglobina de B. marinus e entre os componentes III e IV de P. carvalhoi. Reação de identidade parcial foi observada entre Hb II de B. paracnemis e as hemoglobinas de R. catesbeiana, de L. labyrinthicus, de P. carvalhoi e os componentes, I de B. paracnemis e III de P. carvalhoi. As demais hemoglobinas testadas não possibilitam evidenciar o tipo de identidade existente (Figura 12).

Por esse mesmo teste (imunodifusão em gel de agar) também foi possível observar que dependendo da hemoglobina testada a linha de precipitação se apresentava com maior ou menor intensidade demonstrando maior ou menor nitidez. Desse modo foi possível comparar semi-quantitativamente essas reações. Na tabela III apre

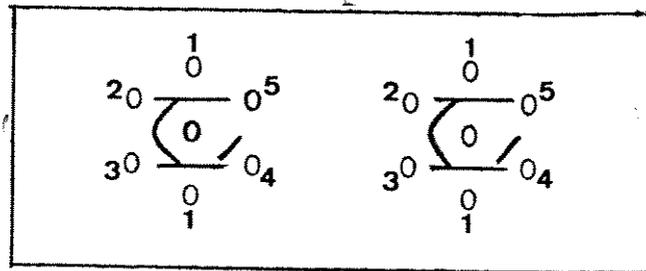
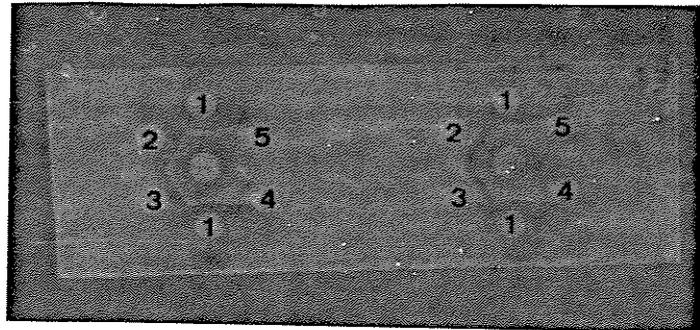


FIGURA 11. Imunodifusão em gel de agar usando soro anti-Hb III de P. carvalhoi (centro) e os antígenos: Hb III de P. carvalhoi (1); Hb-I de P. carvalhoi (2); Hb-II de P. carvalhoi (3); Hb IV de P. carvalhoi (4); Hb II de B. paracnemis (5).

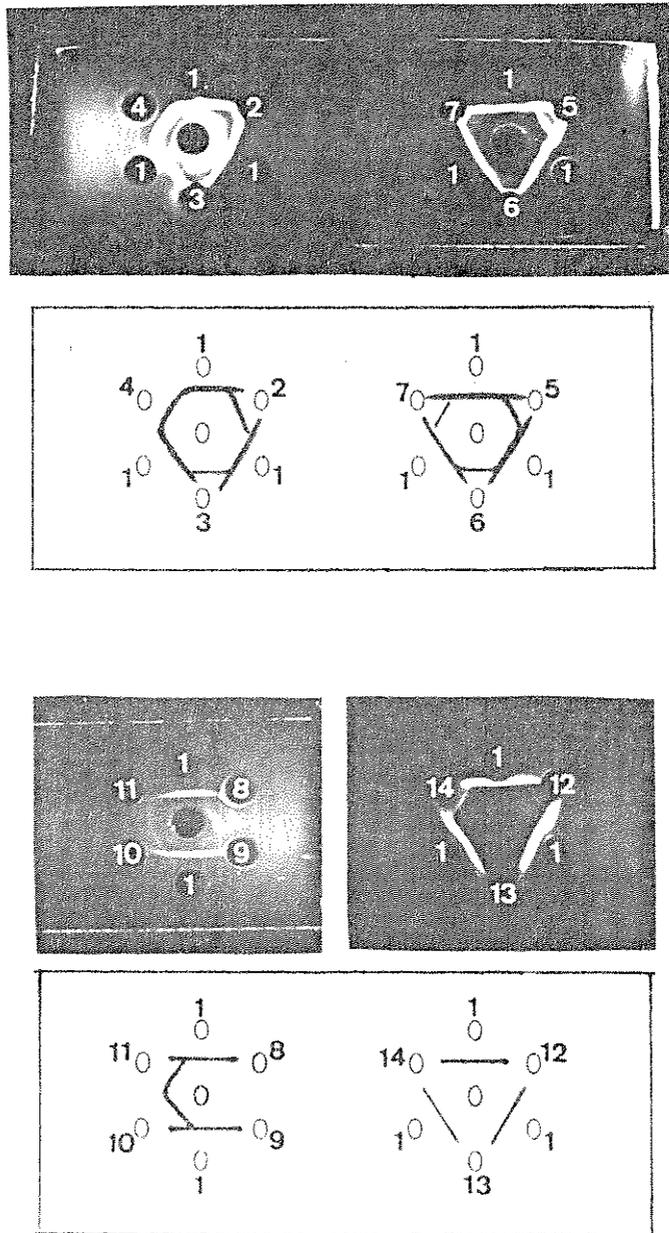


FIGURA 12. Imunodifusão em gel de agar utilizando soro de carneiro anti-Hb II de B.paracnemis (centro) e os antígenos: Hb II de B.paracnemis (1); Hb I de B.paracnemis (2); L.labyrinthicus (3); B.marinus (4); R.catesbeiana (5) ; P.carvalhoi (6); P.pipae (7); Hb I de P.carvalhoi(8) ; Hb II de P.carvalhoi (9); Hb III de P.carvalhoi (10) ; Hb IV de P.carvalhoi (11); girino de H.geographica(12) girino de R.catesbeiana (13); Humana (14).

TABELA III

Resultados semi-quantitativos de reação de imunodifusão em gel de agar utilizando todas hemoglobinas na mesma concentração (0,5 mg/ml), com soro de carneiro anti-Hb-II de B. paracnemis. À grandeza do precipitado foi atribuído valores de 0 a 6.

HEMOGLOBINAS	PRECIPITAÇÃO COM SORO ANTI-Hb-II de <u>B. paracnemis</u>
Hb-II de <u>B. paracnemis</u>	6 +
<u>B. marinus</u>	5 +
Hb-I de <u>B. paracnemis</u>	5 +
<u>L. labyrinthicus</u>	4 +
<u>R. catesbeiana</u>	3 +
<u>P. carvalhoi</u>	2 +
Hb-III de <u>P. carvalhoi</u>	2 +
Hb-IV de <u>P. carvalhoi</u>	2 +
<u>P. pipae</u>	1+

sentamos esses resultados expressando em número de cruces a quantidade observada do precipitado, (REICHLIN & DAVIS, 1979a) pois 6 diferentes linhas de precipitação foram observadas nesses testes.

IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES

Utilizando o soro de carneiro anti-Hb-II de B. paracnemis dissolvido no gel de agar, pudemos quantificar as diferenças antigênicas apresentadas por diferentes hemoglobinas.

O resultado desse teste foi avaliado pelo diâmetro do halo de precipitação, mostrando para o antígeno homólogo a máxima reação antígeno-anticorpo. Esse diâmetro foi estimado como 100% de reação possibilitando-nos calcular a reatividade das demais hemoglobinas testadas.

Os diâmetros dos halos observados foram: componente II de Bufo paracnemis, 12 mm; componente I de B. paracnemis, 9 mm; hemolisado de B. marinus, 9 mm; hemolisado de R. catesbeiana, 8mm; hemolisado de P. carvalhoi, 7 mm e hemolisado de P. pipae, 6mm. (Figura 13).

As porcentagens de semelhança antigênica, calculadas para essas hemoglobinas foram: B. paracnemis (componente II) 100%; B. paracnemis (componente I) 82%; B. marinus, 82%; R. catesbeiana, 73%; L. labyrinthicus, 73%; P. carvalhoi, 63% e P. pipae, 54%.

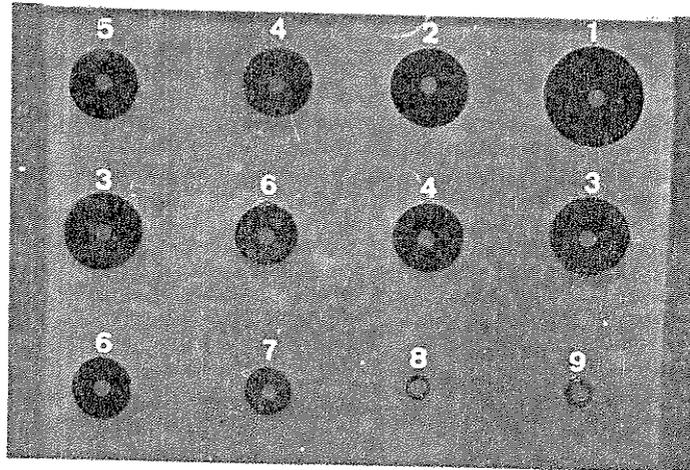


FIGURA 13. Imunodifusão radial simples em gel de agar das hemoglobinas: Hb II de B. paracnemis (1); Hb I de B. paracnemis (2); B. marinus (3); R. catesbeiana (4); L. labyrinthicus (5); P. carvalhoi (6); P. pipae (7); girino de R. catesbeiana (8) e girino de H. geographica (9) com soro anti-Hb II de B. paracnemis (concentração dos antígenos: 0,5 mg/ml).

IMUNOPRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

Os testes de imunoprecipitação em meio líquido foram feitos usando-se soro de carneiro anti-Hb-II de B. paracnemis e as hemoglobinas de B. paracnemis (Hb-II), R. catesbeiana e P. carvalhoi. Nesses testes foram utilizados vários ensaios onde a concentração do soro foi mantida constante e as concentrações de antígeno variaram de 0,020 mg/ml a 0,5 mg/ml, em proteínas. Após a reação, foi feita dosagem de proteínas do precipitado bem como a dosagem de hemoglobina. Esses dados foram lançados em gráfico onde se colocou nas abscissas a concentração de antígeno utilizado e nas ordenadas, anticorpos precipitados (Figura 14).

O número de sítios antigênicos foi estimado pela razão molar de anticorpos e antígenos precipitados na zona de excesso de anticorpos. Os valores encontrados (coeficiente linear), como sendo o possível número de sítios antigênicos reativos com soro Anti-Hb-II de B. paracnemis foram: B. paracnemis, 24; R. catesbeiana, 16 e P. carvalhoi, 8 (Figura 14), considerando o anticorpo como sendo bivalente.

Considerando a reação com antígeno homólogo como 100%, temos para R. catesbeiana 66% e para P. carvalhoi 29% da reação.

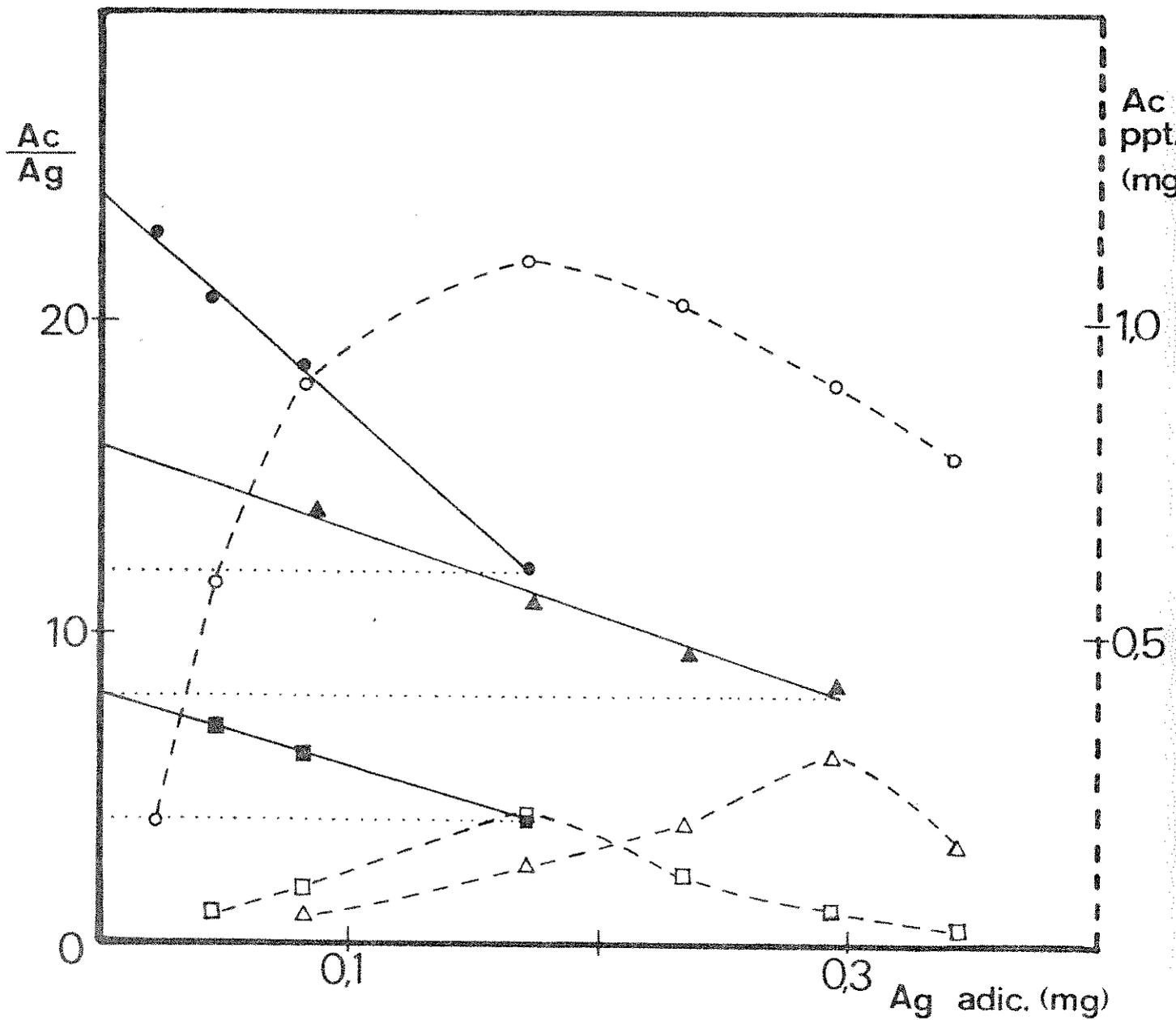


FIGURA 14. Relação molar Ac/Ag (—) e curva de precipitação (---) em função de antígeno adicionado nas reações de precipitação de Hb II de *B. paracnemis* (●,○), *R. catesbeiana* (▲,△) e *P. carvalhoi* (■,□) com soro de carneiro anti-HbII de *B. paracnemis*.

DISCUSSÃO

O estudo eletroforético do hemolisado de eritrócitos de Bufo paracnemis, Rana catesbeiana, Pipa pipae e Pipa carvalhoi mostrou diferente comportamento das hemoglobinas desses distintos anfíbios. Assim as hemoglobinas de Pipa pipae e Pipa carvalhoi, ambas aquáticas são bastante semelhantes em seus comportamentos eletroforéticos bem como são idênticos os números de componentes de ambas. Já as hemoglobinas dos anfíbios de "habitat" terrestres o número de componentes é menor.

A existência de números diferentes de componentes de hemoglobinas nos hemolisados de eritrócitos de diferentes anfíbios é discutida por MACLEAN (1972) como sendo função de vários fatores tais como variação ontogenética na síntese de proteínas, diferença em alelos responsáveis pela síntese protéica e origem da molécula em diferentes tecidos. Além deste podemos estar a frente de problemas de polimerização ou hibridização das cadeias α e β .

A eletroforese desses hemolisados mostrou a homogeneidade das hemoglobinas nos exemplares utilizados, servindo como critério de avaliação da inexistência de polimorfismo dentro da mesma espécie bem como a conservação dessas características em exemplares de distintas regiões, como por exemplo, nossos resultados de eletroforese das hemoglobinas de Rana catesbeiana que são com-

patíveis com os resultados de HAMADA et alii (1964) com exemplares de outra região.

Além da avaliação dos componentes pela migração eletroforética, hemoglobinas de Bufo paracnemis, Pipa carvalhoi e Pipa pipae foram separadas por cromatografia. A cromatografia em CM-celulose do hemolisado de eritrócitos de Bufo paracnemis confirmou a existência de dois componentes, sendo que um deles representava 70% do hemolisado. Utilizando-se a mesma técnica cromatográfica o hemolisado de eritrócitos de Pipa carvalhoi confirmou a existência de quatro componentes sendo que o mais representativo, correspondia a 68% do hemolisado. A Pipa pipae foi, também, cromatografada mostrando um perfil cromatográfico muito semelhante ao da Pipa carvalhoi mostrando que dentro desse mesmo gênero as hemoglobinas não mostram variação quanto ao número e proporção dos componentes, mesmo se tratando de exemplares de diferentes regiões.

Alguns estudos de propriedades funcionais desses hemolisados foram realizados e a afinidade pelo ligante oxigênio mostrou ser bastante diferente para as espécies de "habitats" tão distintos, sugerindo ser essa afinidade uma adaptação fisiológica ao meio ambiente. Os valores de P_{50} , parâmetro que indica a afinidade pelo ligante, mostram que hemoglobinas de espécies de vida aquática possuem afinidade muito grande em relação às hemoglobinas de animais de vida terrestre. É interessante observar que a varia-

ção da afinidade, aferida como $\log P_{50}$ em função da variação do pH (efeito Bohr) é observada apenas no hemolisado de Rana catesbeiana (RIGGS, 1951) quando a proteína está isenta de íons, enquanto que o hemolisado de Pipa pipae, Pipa carvalhoi e Bufo paracnemis não apresentaram esse efeito. Porém, na presença de concentração saturante de ATP o efeito Bohr só não foi alterado no hemolisado de B. paracnemis e de R. catesbeiana. Contudo, podemos observar que o ATP foi capaz de diminuir a afinidade pelo oxigênio em hemoglobinas de P. carvalhoi e P. pipae, sendo que em B. paracnemis e em R. catesbeiana a ação desse nucleotídeo não pode ser demonstrada. Esses resultados podem ser discutidos como existência ou não de um sítio de ligação de ATP nessas hemoglobinas. A ação de fosfatos orgânicos na diminuição da afinidade da molécula pelo ligante, já descrita, (BENESCH & BENESCH, 1967 e CHANUTIN & CURNISH, 1967), explica a complexação dos polifosfatos na desoxihemoglobina (BENESCH et alii, 1968) em uma dobra da cadeia β onde a Val $\beta 1$, His $\beta 2$ e His $\beta 143$ estão implicados (ARNONE, 1972). Sendo assim, podemos afirmar, pelos nossos resultados, que as hemoglobinas dos anfíbios aquáticos por nós estudados possuem esse sítio de fosfato enquanto que os terrestres, no componente II de B. paracnemis, e R. catesbeiana não o possuem, sugerindo alterações na estrutura primária que comprometem a região dos resíduos implicados na formação desse "locus".

Analisando os valores de $\log P_{50}$ dos componentes Hb II

de B. paracnemis e Hb III de Pipa carvalhoi e Hb III de P. pipae, obtidos pela cromatografia em CM-celulose, podemos observar que esses valores estão bem próximos dos obtidos no hemolisado uma vez que esses componentes representam a fração mais concentrada, isto é, 70% no B. paracnemis e 68 na P. carvalhoi e 70% na P. pipae. Da mesma forma poderemos analisar o efeito Bohr desses componentes em relação ao do hemolisado. Quanto à cooperatividade da molécula em reação com o oxigênio utilizamos o parâmetro n (coeficiente de Hill) para analisar. O valor de n, expresso pela equação:

$$n = \frac{d(\log \frac{\bar{y}}{1 - \bar{y}})}{d(\log P)}$$

corresponde a 1 quando não há cooperatividade da molécula durante o equilíbrio com o ligante, e valores maiores que 1 quando há cooperatividade. Esse valor torna-se importante para se avaliar as possíveis dissociações que podem ocorrer na hemoglobina. Desse modo, um valor superior à unidade só pode ser observado quando a hemoglobina se encontra em sua forma tetramérica, isto é, com sua estrutura quaternária intacta, e valores iguais à unidade quando há dissociação das cadeias, impedindo a cooperatividade.

Analisando esse parâmetro nos equilíbrios de oxigenação dos hemolisados e dos componentes isolados podemos observar, em primeiro lugar a existência de cooperatividade, pois n, nesses experimentos sempre se mostrou maior que 1. Outro fato é a varia-

ção desse valor encontrado quando se varia o pH, nas amostras isentas de cofatores. Assim, em pH ácido observa-se uma menor cooperatividade da molécula enquanto que em pH alcalino essa cooperatividade aumenta. Esse fato, observado por BUNN & GUIDOTTI, (1972) e já analisado como sendo dependente da liberação de prótons que não ocorre na mesma proporção que a oxigenação (BRUNORI et alii, 1965), é consequência da heterogeneidade das cadeias α e β se tornarem mais acentuadas a pH abaixo de 7 (BRUNORI et alii, 1968), induzindo nestas condições menor cooperatividade. Ao contrário, estudos feitos com o ligante CO, mostraram que o número de prótons liberados era proporcional ao número de CO ligado (ANTONINI et alii, 1965) e que o monóxido de carbono se liga em igual proporção nas cadeias α e β (GRAY & GIBSON, 1971). Entretanto, JOHNSON & HO, (1974), mostraram que a heterogeneidade entre as cadeias α e β em relação aos ligantes oxigênio e monóxido de carbono era amplificada pela presença de fosfatos orgânicos. Portanto, CO liga igualmente nas cadeias α e β na hemoglobina isenta de cofatores e mostra igualmente uma preferência maior pela cadeia α na presença de fosfatos enquanto que as ligações feitas com O_2 mostram uma preferência pela cadeia α na hemoglobina isenta de cofatores, sendo esta preferência aumentada na presença de fosfatos orgânicos, mostrando uma afinidade maior para cadeia α do que para cadeia β .

Dentro desse mesmo parâmetro, podemos ainda observar que para as hemoglobinas por nós estudadas, a cooperatividade foi sem

pre maior em pH alcalino e que para as amostras isentas de íons essa cooperatividade era superior às aquelas na presença de ATP no intervalo de pH entre 6 e 7,5, de acordo com os valores de n obtidos.

Dada a impossibilidade de se efetuar estudos de equilíbrio de hemoglobina e oxigênio com o primeiro componente cromatográfico (Hb-I) de B. paracnemis que corresponde cerca de 20 a 30% do hemolisado total, devido a pequena quantidade de material, a avaliação da afinidade dessas moléculas foram feitas usando-se, como ligante, o monóxido de carbono e determinando-se os valores de C_{50} (concentração de CO necessária para saturar 50% das moléculas de hemoglobinas). A afinidade da hemoglobina pelo CO é cerca de 200 vezes maior que pelo O_2 , porém outras propriedades como os valores n , efeito Bohr e ação de efetores alostéricos não são alterados (ANTONINI et alii, 1963).

Como descrito em resultados, a Hb-I de B. paracnemis isenta de cofatores não apresentou efeito Bohr quando se variava o pH em ensaios de equilíbrio com CO, porém a presença de polifosfatos alterou a sua afinidade e apresentou um efeito Bohr de -0,26, mostrando portanto um comportamento diferente da Hb II já analisado anteriormente. Como era de se esperar, os valores de n permaneceram inalterados durante todos os experimentos demonstrando sempre cooperatividade molecular. Sendo assim, podemos deduzir que a hemoglobina de B. paracnemis, anuro terrestre, não possui

sítio de fosfato no seu componente de maior concentração, enquanto que hemoglobinas de P. pipae e P. carvalhoi, anuros aquáticos, possuem esse sítio no maior componente.

Dada a grande diferença encontrada entre as hemoglobinas estudadas em relação ao seu comportamento funcional foi de nosso interesse verificar a que ponto estas alterações funcionais implicariam na estrutura molecular que pudessem refletir no seu comportamento antigênico. Para isto, preparou-se ímune-soros específicos contra hemoglobina purificada a fim de podermos analisar o comportamento imunológico das hemoglobinas em estudo. Para a obtenção de soro anti-Hb III de P. carvalhoi e anti-Hb II de B. paracnemis, alíquotas dessas frações foram inoculadas em coelhos, e títulos razoáveis só foi conseguido após quatro meses de inoculação. Essa demora na obtenção de um soro hiper-ímune se deve a hemoglobina ser pouco imunogênica uma vez que essa molécula dificilmente é reconhecida como estranha pelo animal dada a semelhança com a mioglobina existente em seu músculo.

Os soros obtidos após quatro meses de inoculação mostraram-se altamente específicos, isto é, só eram capazes de reagir com as hemoglobinas homólogas, não dando reações cruzadas com hemoglobinas de nenhuma outra espécie. É conhecido que o ímune-soro obtido no início da inoculação é altamente específico e essa especificidade vai diminuindo com o processo imunização. Assim, por dificuldade em dar continuidade ao processo de imunização em

coelho até obtermos um soro menos específico resolvemos inocular carneiro pois é um animal de maior porte e que resiste melhor a quantidade de injeções feitas durante o esquema de inoculação além de nos oferecer maior quantidade de soro. A imunização de carneiro feita relativamente da mesma maneira que a do coelho, permitiu-nos soro de título 1/32 após 2 meses de inoculação e após seis meses o soro já era menos específico, reconhecendo hemoglobinas de outras espécies e seu título chegou a 1:128 por teste de imunodifusão. Esse sucesso na inoculação de carneiro parece ser devido a hemoglobina injetada ser mais imunogênica para esse animal, pois o mesmo título da ordem de 1:32 foi conseguido em menor tempo bem como também no final, com baixa especificidade. Portanto, a variação da imunogenicidade pode depender do animal utilizado na imunização, como foi o nosso caso ou de outros fatores como tipo de imunógeno. Por exemplo, a hemoglobina fetal é mais imunogênica do que a A₁, e isto provavelmente se deve à existência da cadeia γ , pois tanto a fetal como a A₁ possuem cadeias α iguais, diferindo apenas na outra cadeia (α ou γ), (REICHLIN, 1970).

Com o soro de carneiro anti-Hb II de B. paracnemis, de menor especificidade porém de maior título, foram feitos os ensaios de determinação das reações cruzadas com hemoglobinas de diferentes espécies e as reações de precipitação em meio líquido com as hemoglobinas estudadas do ponto de vista funcional. As reações de imunodifusão em gel de agar mostraram linhas de precipita

ção quando se reagiu anti-Hb II de B. paracnemis com diversas hemoglobinas (Tabela I). Esses resultados mostram que o soro anti-Hb II reconheceu apenas hemoglobinas de anfíbios entre as demais usadas, e que entre as próprias hemoglobinas de anfíbios elas diferem antigenicamente uma da outra dependendo uma da outra dependendo da espécie estudada, mostrando uma heterogeneidade nessas hemoglobinas do ponto de vista imunológico. Esse fato também foi observado por diversos autores que descrevem reações cruzadas entre hemoglobinas de diferentes espécies. Segundo o trabalho de CRADOCK-WATSON, (1967) não foram observadas diferenças imunológicas entre hemoglobinas de cavalo, de jumento e de mula por testes de imunodifusão em agar. A análise de hemoglobinas de répteis Galapagos iguana, evidenciou reação cruzada entre três espécies diferentes, as quais foram correlacionadas no ponto de vista filogenético (HIGGINS & RAND, 1975). Foi proposta também por LYKAKIS, (1974) uma árvore filogenética determinando a interrelação entre três tartarugas terrestres (T. graeca, T. hermanni e T. marginata) e duas aquáticas (C. caspica e E. orbicularis) através de reações cruzadas por semelhanças antigênicas.

Pelos resultados dos nossos experimentos podemos observar que hemoglobinas de girinos não reagiram enquanto que hemoglobinas de adultos deram reação positiva com o mesmo soro, anti-Hb II de B. paracnemis. Esses dados são compatíveis com os do trabalho de WISE, (1970) que não observou a existência de reação cruza

zada entre as hemoglobinas de girino e adulto de R. catesbeiana, usando o soro preparado contra as duas hemoglobinas, indicando a não existência de cadeias polipeptídicas de antigenicidade comum entre elas. O mesmo fato foi constatado com os resultados de MANIATIS & INGRAM, (1971) que trabalharam não só com a hemoglobina como também com a apohemoglobina dos mesmos animais.

Apesar de ser a R. catesbeiana um anfíbio terrestre e seu girino aquático, o mesmo comportamento foi demonstrado por JURD & MACLEAN, (1969) em Xenopus laevis que é um anuro de vida aquática quer na fase larval quer na adulta e que não apresentaram reação cruzada entre suas hemoglobinas usando soro anti-Hb de X. laevis adulto, por técnicas imunológicas. Isto mostra que hemoglobinas de girino e adulto são bastante diferentes, mesmo se tratando da mesma espécie. Já na espécie humana, hemoglobina fetal e de adulto são antigenicamente semelhantes mostrando identidade parcial (SCHNEIDER & JONES, 1965). Por esses resultados pode-se notar que na espécie humana as duas hemoglobinas (adulta e fetal) se diferenciam em uma das cadeias mantendo a cadeia α comum. No caso dos anfíbios a diferença entre as duas hemoglobinas (adulto e girino) parece ser maior, isto é, ambas as cadeias devem ser diferentes. Esses dados podem ser analisados juntamente com a observação de (MANIATIS & INGRAM, 1971) que evidenciaram serem essas duas hemoglobinas dos anfíbios sintetizados em "locus" distintos pois, por técnicas imunológicas foi detectado que as he

moglobinas, no girino de R. catesbeiana, são sintetizadas na medula enquanto que as hemoglobinas do adulto da mesma espécie são sintetizados no fígado não mostrando nada de comum entre elas. Além disso, podemos também observar que nas hemoglobinas de P. carvalhoi as reações de precipitação por imunodifusão com o soro anti-Hb II de B. paracnemis são conseqüências da reatividade das frações III e IV, uma vez que as frações I e II quando testadas mostram resultados negativos. Nas frações I e II de B. paracnemis podemos observar semelhanças antigênicas entre elas, mostrando que apesar de diferenças nas propriedades funcionais essas hemoglobinas se comportam de maneira semelhante nos testes imunológicos. A identidade entre os componentes I e II de B. paracnemis e a diferença entre os componentes I e II da III e IV de P. carvalhoi são resultados que podem ser comparados com aqueles obtidos com hemoglobina de Xenopus laevis, componentes F_1 e F_2 . Estes componentes foram também comparados antígenicamente, mostrando que ambas dão reação cruzada quando testadas com o soro hiper-imune (MACLEAN & JURD, 1971).

O soro de coelho anti-Hb III de P. carvalhoi mostrou, por testes de imunodifusão, reações com os 4 diferentes componentes do mesmo animal (componentes I, II, III e IV) e não foi capaz de reagir com as hemoglobinas de B. paracnemis. Quando comparados com os resultados da reação do soro anti-Hb II de B. paracnemis, com os resultados dos componentes de P. carvalhoi notamos que os compo

entes III e IV são antigenicamente pouco semelhante às hemoglobinas de B. paracnemis e os componentes I e II são diferentes. Por outro lado, componentes I e II reagem com soro anti-Hb III mostrando reação de identidade total. Esses resultados nos sugerem que os 4 componentes de P. carvalhoi possuem uma estrutura antigênica diferente das hemoglobinas de anfíbios terrestres sendo que os componentes III e IV mais se assemelham com estas, sugerindo serem essas hemoglobinas as mais evoluídas e o componente II de P. carvalhoi o menos evoluído pois é ele que dá uma pequena reação com soro anti-Hb III de P. carvalhoi.

Nos testes de imunodifusão o soro anti-Hb III de P. carvalhoi não reconheceu as hemoglobinas de P. pipae o que nos põe em dúvida se essas hemoglobinas diferem demasiado da de P. carvalhoi ou se o soro, que possui um título muito pequeno, se conserva muito específico. A segunda hipótese parece-nos a mais viável pois esse soro reagiu apenas com os quatro diferentes componentes de P. carvalhoi, mostrando-se incapaz de reconhecer qualquer outra hemoglobina e pelo fato de hemoglobina de P. carvalhoi e de P. pipae serem reconhecidas pelo soro anti-Hb II de B. paracnemis sugerindo haver entre elas alguma semelhança. Esse mesmo resultado de só reconhecer o antígeno homólogo foi também observado com soro de coelho anti-hemolisado de eritrócitos de P. carvalhoi que só reagiu com o mesmo hemolisado. Esses fatos parece-nos mostrar que os soros obtidos anti-Hb de P. carvalhoi sempre foram muito específicos apesar do longo tempo de imunização em todos os casos.

Os mesmos testes de imunodifusão em meio semi-sólido foi utilizado para se evidenciar o tipo de reação que ocorre quando duas distintas hemoglobi

nas são testadas com um mesmo soro. Nesse tipo de reação podemos observar, pela linha de precipitação, se os antígenos utilizados são totalmente idênticos, isto é, se ambos possuem exatamente os mesmos sítios antigênicos, ou se esses antígenos diferem entre si, em alguns sítios. Essas reações denominadas testes de identidade mostraram com o soro anti Hb II de B. paracnemis, que identidade total existe apenas entre o antígeno homólogo e hemoglobina de Bufo marinus (oriundos da região amazônica) e entre componentes III e IV de P. carvalhoi. Essa identidade total significa que duas hemoglobinas possuem geralmente os mesmos sítios antigênicos. Identidade parcial foi observada entre o componente II de B. paracnemis e hemoglobinas de L. labyrinthicus, R. catesbeiana (adulto), P. carvalhoi e componente I de B. paracnemis, mostrando que essas hemoglobinas possuem alguns sítios antigênicos comuns, porém outros desses sítios só existem em Hb II de B. paracnemis.

Esse mesmo tipo de reação, porém usando o soro anti-Hb III de P. carvalhoi podemos observar identidade total entre os componentes I e II de P. carvalhoi e identidade parcial entre os componentes I e III e entre os componentes II e III de P. carvalhoi. Essa identidade mostra que tanto no componente I como no componente II existe determinantes antigênicos comuns ao componente III, porém alguns sítios que existem no componente III não são comuns nos componentes I e II.

As hemoglobinas de L. labyrinthicus e de R. catesbeiana reagem fortemente com o soro anti-Hb II de B. paracnemis, mostrando que muitos sítios são comuns para o componente II e L. labyrinthicus.

ciação ou contaminação, a presença de duas linhas de precipitação mostra a existência de duas substâncias antígenicamente diferentes.

Nos testes de imunodifusão o soro anti-Hb III de P. carvalhoi não reconheceu as hemoglobinas de P. pipae o que nos põe em dúvida se essas hemoglobinas diferem demasiado da de P. carvalhoi ou se o soro, que possui um título muito pequeno, se conserva muito específico. A segunda hipótese parece-nos a mais viável pois esse soro reagiu apenas com os quatro diferentes componentes de P. carvalhoi, mostrando-se incapaz de reconhecer qualquer outra hemoglobina e pelo fato de hemoglobina de P. carvalhoi e de P. pipae serem reconhecidas pelo soro anti-Hb II de B. paracnemis sugerindo haver entre elas alguma semelhança. Esse mesmo resultado de só reconhecer o antígeno homólogo foi também observado com soro de coelho anti-hemolisado de eritrócitos de P. carvalhoi que só reagiu com o mesmo hemolisado. Esses fatos parece-nos mostrar que os soros obtidos anti-Hb de P. carvalhoi sempre foram muito específicos apesar do longo tempo de imunização em todos os casos.

Os mesmos testes de imunodifusão em meio semi-sólido foi utilizado para se evidenciar o tipo de reação que ocorre quando duas distintas hemoglobinas são testadas com um mesmo soro. Nesse tipo de reação podemos observar, pela linha de precipitação, se os antígenos utilizados são totalmente idênticos, isto é, se am-

bos possuem exatamente os mesmos determinantes antigênicos, ou se esses antígenos diferem entre si, em alguns sítios. Essas reações denominadas testes de identidade mostraram com o soro anti-Hb II de B. paracnemis, que identidade total existe apenas entre o antígeno homólogo e hemoglobina de Bufo marinus (oriundos da região amazônica) e entre componentes III e IV de P. carvalhoi. Essa identidade total significa que duas hemoglobinas possuem exatamente os mesmos sítios antigênicos. Identidade parcial foi observada entre o componente II de B. paracnemis e hemoglobinas de L. labyrinthicus, R. catesbeiana, (adulto), P. carvalhoi componente I de B. paracnemis, mostrando que essas hemoglobinas possuem alguns sítios antigênicos comuns, porém outros desses sítios só existem em Hb II de B. paracnemis.

Esse mesmo tipo de reação, porém usando o soro anti-Hb III de P. carvalhoi podemos observar identidade total entre os componentes I e II de P. carvalhoi e não identidade entre os componentes I e III e entre os componentes II e III de P. carvalhoi. A não identidade mostra que em ambos existem determinantes antigênicos não comuns, isto é, alguns sítios existem no componente III que não são comuns nos componentes I e II e alguns sítios existentes nos componentes I e II não aparecem no componente III.

As hemoglobinas de L. labyrinthicus e de R. catesbeiana reagem fortemente com o soro anti-Hb II de B. paracnemis, mostrando que muitos sítios são comuns para o componente II e L. labyrinthicus.

thicus bem como para componente II e Rana catesbeiana, porém existem sítios comuns para componente II que não são encontrados em hemoglobinas de L. labyrinthicus ou de R. catesbeiana. O Bufo marinus e o Bufo paracnemis utilizado para a obtenção do soro, parece-nos serem idênticos quer em número de determinantes quer na existência de sítios diferentes. Já com relação às hemoglobinas de Pipa carvalhoi podemos observar que tanto componente I como componente II diferem de componente III. Esse fato já havia sido descrito pois componentes I e II não reagem com soro anti-Hb II de Bufo paracnemis, enquanto que o componente III reage.

Para completar nossos estudos de diferenças antigênicas das hemoglobinas de anfíbios, fizemos testes de imunodifusão radial simples em meio semi-sólido (MANCINI et alii, 1964 e 1965) utilizando como antígenos hemoglobinas de Bufo paracnemis (componentes I e II), de Rana catesbeiana, de Leptodactylus labyrinthicus, de Pipa carvalhoi (hemolisado de eritrócitos e componente III), de Bufo marinus e de Pipa pipae. Os resultados desses experimentos possibilitou avaliar quantitativamente o grau de semelhança antigênica dessas hemoglobinas. Assim, hemoglobinas de Bufo marinus mostrou que possui 82% de sítios antigênicos capazes de serem reconhecidos pelo soro anti-Hb II de Bufo paracnemis. Esse grau de semelhança bastante elevado é compatível com os resultados de imunodifusão dupla em que essas duas hemoglobinas apresentaram identidade total. No componente I de Bufo paracnemis, tam-

bém foi evidenciado a existência de 82% de semelhança com o componente II, mostrando que apesar de terem essas hemoglobinas propriedades funcionais diferentes, as propriedades antigênicas são bastante semelhantes pois são hemoglobinas da mesma espécie. Hemoglobinas de Rana catesbeiana e de Leptodactylus labyrinthicus mostraram que se assemelham ao componente II de Bufo paracnemis em 73% e a de Pipa carvalhoi em 63%.

Esses resultados podem ser discutidos em termos de eficiência do método em distinguir hemoglobinas de dois animais do mesmo gênero (Bufo) em 18% de seus sítios antigênicos ou mostrar que em hemoglobinas de animais de mesma ordem (Diplasio coela) ambos diferem do Bufo paracnemis em 30%. As semelhanças em apenas 63% e 54% mostradas pelas hemoglobinas de Pipa carvalhoi e Pipa pipae respectivamente, podem perfeitamente serem analisadas como diferenças moleculares associadas ao condicionamento ao meio ambiente pois são essas hemoglobinas, de animais aquáticos, as que mais se diferenciam das hemoglobinas de animais terrestres dentro das amostras por nós estudadas e dentro do método empregado.

Analisando ainda esses resultados podemos observar, por outro lado que as hemoglobinas dos anuros de "habitat" terrestre, guardam entre si, uma maior homogeneidade na estrutura molecular pois animais de diferentes famílias, (Ranidae e Leptodactylidae), guardam mesma diferença antigênica quando testadas com o mesmo an

tíssoro, isto é, mostram que tanto hemoglobina de R. catesbeiana como hemoglobina de L. labyrinthicus possuem cerca de 70% dos antígenos de Hb II de B. paracnemis enquanto que nos aquáticos animais de mesma família (Pipidae) a diferença antigênica em relação a Hb II de B. paracnemis é diferente para P. carvalhoi e P. pipae, isto é, P. carvalhoi possui 63% dos sítios antigênicos de Hb II de B. paracnemis enquanto que P. pipae apresenta apenas 54%.

Outros experimentos feitos com finalidade de quantificar as reações de imunoprecipitação foram testes de precipitação em meio líquido (HEIDELBERGER & KENDALL, 1935) que nos possibilitou avaliar o número de sítios antigênicos de cada molécula estudada na região de excesso de anticorpos. Nessas condições, todos os sítios antigênicos estão ocupados e a relação molar Ac/Ag fornece uma estimativa do número mínimo de determinantes antigênicos da molécula. Esse número corresponde à metade do número de sítios antigênicos quando assumimos a bivalência do anticorpo. Esses dados de número de sítios antigênicos mostraram que Hb II de B. paracnemis possui 24 sítios enquanto que hemoglobina de R. catesbeiana possui 16 e a de P. carvalhoi 8, isto é, o soro anti-Hb II de B. paracnemis reconheceu 24 sítios no antígeno homólogo e 16 e 8 nos outros antígenos estudados. Esses resultados nos permite admitir que as hemoglobinas de R. catesbeiana possuem 65% de sua estrutura antigênica semelhante a de Hb II de B. paracnemis enquanto que a de P. carvalhoi se assemelha em 29%. Essas porcenta

gens estão bastante compatíveis com os dados de diferenciação antigênica obtidos nos testes de imunodifusão radial em relação a hemoglobina de R. catesbeiana. Porém para as hemoglobinas de P. carvalhoi esses dados diferem bastante mostrando que pelo teste de imunoprecipitação em meio líquido as hemoglobinas de P. carvalhoi se diferem mais da Hb II de B. paracnemis do que quando testadas por imunodifusão radial.

Segundo descrito por KABAT (1961), o número de sítios antigênicos mostrado por uma molécula quando testada com seu antígeno é proporcional ao peso molecular da molécula. O número de sítios antigênicos de uma molécula de 65.000 - 70.000d é 12, segundo este autor, e que esse número tende a aumentar quando o processo de imunização é longo, o que condiciona uma menor especificidade do soro. Assim sendo, nossos resultados com soro de carneiro anti Hb II de B. paracnemis demonstram que este soro atingiu baixa especificidade analisando-se pelo provável número de sítios antigênicos apresentado pelo antígeno homólogo.

Analisando os resultados obtidos pelo teste de imunoprecipitação em meio líquido e observando o gráfico de anticorpo precipitado contra antígeno adicionado, um fato nos chamou a atenção. O pico de maior precipitação de anticorpo tanto com Hb II de B. paracnemis como com a hemoglobina de P. carvalhoi ocorre quando há mesma concentração de antígeno, ao passo que com a hemoglobina de R. catesbeiana esse pico é observado quando a concentra-

ção de antígeno é bem maior.

O deslocamento do pico de máximo de precipitação observado na hemoglobina de Rana catesbeiana nos faz suspeitar ser a reação dos anticorpos com esse antígeno uma reação de baixa afinidade, isto é, os anticorpos mostram pouca afinidade para reagir com essa hemoglobina, só o fazendo quando se aumenta a concentração do reagente (antígeno). Sendo assim, podemos salientar que essa hemoglobina possui cerca de 70% de sítios antigênicos reativos com esse soro e a baixa afinidade do soro pode, então, ser analisada como consequência de uma menor exposição dos determinantes. Em outras palavras, esses dados sugerem que as hemoglobinas de Rana catesbeiana possuem sítios antigênicos pouco reativos devido sua localização na superfície da molécula não ser muito proeminente. Esse deslocamento do pico máximo de precipitação, também pode ser analisado como devido à existência de um ou mais componentes nas hemoglobinas de Rana catesbeiana que não sejam reconhecidos pelo soro utilizado e para se obter o máximo de reação seria necessário aumentar a concentração do reagente (antígeno) até se conseguir a concentração ótima dos componentes realmente reativos.

Neste sentido, o critério por nós adotado, de métodos imunoquímicos, para avaliação de diversidade estrutural entre hemoproteínas de diferentes espécies de anfíbios de condições ecológicas diversas, apresentou-se como um índice de avaliação da evo-

lução desta molécula que sofre adaptações ambientais.

Tal critério, utilizado anteriormente por REICHLIN(1978), para classificação de peixes comuns da Amazônia, nos leva a sugerir que a não identidade entre Hb II de B. paracnemis e hemoglobinas de formas larvais e aquáticas, girinos de H. geográfica e de R. catesbeiana, Hb I e Hb II de P. carvalhoi (adulto), demonstram que nestes animais existem espécies moleculares de hemoglobina que divergem das hemoglobinas dos anfíbios terrestres com maior grau de evolução. Assim sendo, nos anfíbios aquáticos, que possuem propriedades funcionais características tais como alta afinidade pelo ligante oxigênio, presença de efeito Bohr latente, estabilidade a agentes desnaturantes, tais hemoglobinas seriam estruturalmente e antigenicamente diversas das hemoglobinas dos anfíbios terrestres com propriedades funcionais distintas.

RESUMO

Propriedades funcionais de hemoglobinas de anfíbios de "habitats" terrestres e aquáticos foram estudadas a fim de correlacioná-las com propriedades antigênicas destas proteínas. Pôde-se observar que as hemoglobinas dos anuros terrestres Bufo paracnemis, Bufo marinus, Rana catesbeiana e Leptodactylus labyrinthicus possuem menor afinidade pelo oxigênio que as dos anuros aquáticos estudados Pipa carvalhoi, Pipa pipae, girino de Rana catesbeiana e girino de Hyla geographica. Também foi observado que hemoglobinas de anuros aquáticos não apresentam efeito Bohr quando isentas de cofatores, porém, na presença de ATP esse efeito torna-se evidente. Já nos anuros terrestres, o efeito dos polifosfatos, na maioria dos casos foi desprezível.

Imune-soros foram obtidos em coelho e em carneiro após prolongado período de imunização com os componentes mais representativos das hemoglobinas de Pipa carvalhoi e de Bufo paracnemis. Os resultados das reações antígeno-anticorpo, em diferentes condições, mostraram uma grande semelhança antigênica entre as hemoglobinas de anuros de "habitat" terrestre em contraste com a dos aquáticos que apresentaram maiores diferenças antigênicas tanto entre si como em relação a dos terrestres. Assim, observamos identidade total entre hemoglobinas de Bufo paracnemis e Bufo marinus, identidade parcial entre hemoglobinas de B. paracnemis

e de Rana catesbeiana, de Leptodactylus labyrinthicus e de Pipa carvalhoi com o soro anti-hemoglobina II (Bufo paracnemis) e não detectamos identidade entre hemoglobina de Bufo paracnemis e hemoglobinas das formas larvais de Hyla geographica, Rana catesbeiana e hemoglobina I e II de Pipa carvalhoi. Por outro lado, com soro de Pipa carvalhoi observamos identidade total entre os componentes I e II e identidade parcial entre os componentes II e III ou I e III deste anuro. Uma avaliação da semelhança antigênica feita por imunodifusão radial simples e por imunoprecipitação em meio líquido sugeriu uma possível escala evolutiva dessas hemoglobinas.

SUMMARY

Functional properties of hemoglobins of terrestrial and aquatic amphibia were studied in order to establish relationship with their antigenic properties. It was possible to show that the hemoglobins of the terrestrial anura B. paracnemis and R. catesbeiana present less oxygen affinity than the hemoglobins of aquatic anura P. carvalhoi and P. pipae.

It was also observed that the stripped hemoglobins of aquatic anura do not show Bohr effect. However, in the presence of ATP, the Bohr effect becomes evident. In the terrestrial anura on the other hand, the poly-phosphates effects were, in many cases, so small that can be neglected.

Antisera were obtained in rabbits and in sheep, after a long period of immunization with the more representative hemoglobins of P. carvalhoi and of B. paracnemis. The results of antigen-antibody reaction, under different conditions, show antigenic similarity among hemoglobins of terrestrial anura.

It was also found that hemoglobins of aquatic anura have antigenicity differences both, among themselves and when compared with the hemoglobins of terrestrial anura. Then it was observed a total identity between hemoglobin of B. paracnemis and of B. marinus, partial identity between hemoglobins of B. paracnemis

and R. catesbeiana, B. paracnemis and L. labyrinthicus and L. labyrinthicus with the anti-Hb II of B. paracnemis serum. It was not found identity between B. paracnemis and larval form of Hyla geographica, Rana catesbeiana hemoglobins. However it was observed a total identity between the components I and II of P. carvalhoi hemoglobins and a partial identity between the components I and III or I and III of the same anura.

A evaluation of the antigenic similarity, both by simple radial immunodiffusion, and by immunoprecipitation suggest that an evolutive degree of the hemoglobin seems to be possible.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S.J. and RIGGS, A. (1969). The hemoglobins of the bullfrog, Rana catesbeiana. I. Purification, amino acid composition, and oxygen equilibria. J. Biol. Chem., 244:2372-2383.
- ANTONINI, E.; SHUSTER, T.M.; BRUNORI, M. and WYMAN, J. (1965). The kinetics of the Bohr effect in the reaction of human hemoglobin with carbon monoxide. J. Biol. Chem., 240:PC2262-PC2265.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C. and ROSSI-FANELLI, A. (1963). Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. J. Biol. Chem., 238:2950-2957.
- ARNONE, A. (1972). X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature, 237:146-149.
- ASKONAS, B.A. and SMITH, D.G. (1964). Antigenicity of the β -chain of human haemoglobin. Nature (London); 201:496-497.

- BALDWIN, J.M. (1975). Structure and function of hemoglobin. Progress in Biophys. Molec. Biol. 29:225-320.
- BENESCH, R. and BENESH, R.E. (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 26:162-167.
- BENESCH, R.; BENESCH, R.E. and YU, C.I. (1968). Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 59:526-532.
- BENJAMINI, E.; SCIBIENSKI, R.J. and THOMPSON, K. (1972). Apud REICHLIN, M., 1975.
- BONAVENTURA, J. and RIGGS, A. (1968). Hemoglobin Kansas, a human hemoglobin with a neutral amino acid substitution and an abnormal oxygen equilibrium. J. Biol. Chem., 243:980-991.
- BRAGG, W.L.; HOWELLS, E.R. and PERUTZ, M.F. (1954). Apud PERUTZ, M.F. et alii, 1965.
- BRAUNITZER, G.; HILSE, K.; RUDLOFF, V. and HILSCHMANN, N. (1964). The hemoglobins. Advan. Protein. Chem., 19:1.

- BROWN, R.K. (1962). Studies on the antigenic structure of ribonuclease. III. Inhibition by peptides of antibody to performic acid-oxidized ribonuclease. J. Biol. Chem., 237:1162-1167.
- BRUNORI, M.; ALFSEN, A.; SAGGESE, U.; ANTONINI, E. and WYMAN, J. (1968). Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J. Biol. Chem., 243:2950-2954.
- BRUNORI, M.; WYMAN, J.; ANTONINI, E.; ROSSI-FANELLI, A. (1965). Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. J. Biol. Chem., 240:3317-3324.
- BUNN, H.F. and GUIDOTTI, G. (1972). Stabilizing interactions in hemoglobin. J. Biol. Chem., 247:2345-2350.
- CAFFIN, J.P.; CHAUVET, J.P. and ACHER, R. (1969). Apud CHAUVET, J.P. & ACHER, R., 1972.
- CHANUTIN, A. and CURNISH, R. (1967). Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch. Bioch. Biophys., 121:96-102.
- CHARACHE, S.; GRISOLIA, S.; FIEDLER, A.J. and HELLEGERS, A. (1970) Effect of 2,3-diphosphoglycerate on oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. J. Clin. Invest., 49:806.

CHAUVET, J.P. and ACHER, R. (1971). Isolation of a frog hemoglobin (Rana esculenta). Purification, amino acid composition, and terminal sequences of the α and β chain. Int. J. Protein Research, III:261-269.

CHAUVET, J.P. and ACHER, R. (1972). Phylogeny of hemoglobins. Chain of frog (Rana esculenta) hemoglobin. Biochemistry, 11: 916-927.

CLEGG, J.B.; NAUGHTON, M.A. and WEATHERALL, D.J. (1966). Abnormal human haemoglobins. Separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). J. Molec. Biol. 19: 91-108.

CRADOCK-WATSON, J.E. (1967). Immunological similarity of horse, donkey, and mule hemoglobins. Nature, Lond. 215:630-631.

COHEN-DIX, P.; NOBLE, R.W. and REICHLIN, M. (1973). Comparative binding studies of the hemoglobin-haptoglobin and the hemoglobin antihemoglobin reactions. Biochemistry, 12:3744-3751.

DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis II. Method and applications to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404-427.

- DAYHOFF, M.O. (1972). "Atlas of Protein Sequence and Structure".
Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.
- DE WITT, W. and INGRAM, V.M. (1967) Acetylated peptide chains
in bullfrog hemoglobins. Biochem. Biophys. Res. Comm., 27:236-
241.
- DICKERSON, R.E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, O.B., SAMSON,
L.; COOPER, A. and MARGOLIASH, E. (1971). Ferricytochrome c
I. General features of the horse and bonito proteins AT 2.8 Å
resolution. J. Biol. Chem., 246:1511-35.
- ESTEVEZ, M.B.; SANT'ANNA, O.A.; ANNES, V.C.S. and BINAGHI, R. A.
(1974). Characterization and properties of an anaphylactic 7S
antibody in sheep. J. Immunology, 112:722-727.
- GRAY, R.D. and GIBSON, Q.H. (1971). The effect of inositol hexa-
phosphate on the kinetics of CO and O₂ binding by clinical
modified hemoglobins. J. Biol. Chem., 246:5176-5180.
- GREER, J. (1971). Three-dimensional structure of abnormal human
haemoglobins Chesapeake and J. Capetown. J. Molec. Biol., 62:
241-249.

GREER, J. and PERUTZ, M.F. (1971). Apud BALDWIN, J.M., 1975.

HAMADA, K.; SAKAI, Y.; SHUJUYA, R. and KAZIRO, K. (1964) Biochemical Metamorphosis of hemoglobin in Rana catesbeiana. I. Purification procedures and properties of hemoglobins from bullfrog and tadpole erythrocytes. J. Biochem., 55:636-642.

HAYASHI, A.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; YOSHIDA, A. and ADAMSON, J. (1971). Apud BALDWIN, J.M., 1975.

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

HIGGINS, P.J. and RAND, C.S. (1975). Comparative immunology of Galapagos iguana hemoglobins. J. Exp. Zool., 193:391-397.

HOFRICHTER, J.; ROSE, P.D. and EATON, W.A. (1974). Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:4864.

INGRAM, V.M. (1957). Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. Nature, 180:326-328.

JOHNSON, M.E. and HO, C. (1974). Effects of ligands and organic phosphates on functional properties of human adult hemoglobin. Biochemistry, 13:3653-3655.

JURD, R.D. and MACLEAN, N. (1969). The investigation of *Xenopus laevis* hemoglobins during development by a fluorescent antibody. Experientia, 25:626-628.

KABAT, E.A. and MAYER, M.M. (1961). In: "Experimental Immunochemistry", p.241, Thomas, Springfield, Illinois.

KABAT, E.A. and MAYER, M.M. (1964). Experimental Immunochemistry. 1st. ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A.

KALCKAR, H.M. (1947). Apud LAYNE, E. (1957).

KENDREW, J.C.; WATSON, H.C.; STRANDBERG, B.E.; DICKERSON, R. E.; PHILLIPS, D.C. and SHORE, V.C. (1961). A partial determination by X-ray methods, and its correlations with chemical data. Nature, 190:666-670.

- LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Apud COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O., Methods in Enzymology, vol. III, pp. 447-454. Academic Press Inc., Publishers, New York.
- LEVINE, L. and STOLLAR, B.D. (1968) Apud REICHLIN, M., 1975.
- LYKAKIS, J.J. (1974). A phylogenetic study on turtle hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 48B:231-240.
- MACLEAN, N. and JURD, R.D. (1971). The haemoglobins of healthy and anaemic Xenopus laevis. J. Cell Sci., 9:509-528.
- MACLEAN, N. and JURD, R.D. (1972). The control of haemoglobin synthesis. Biol. Rev., 47:393-437.
- MACPHERSON, C.F.C. and HEIDELBERGER, M. (1945). Denatured egg albumin. III. Quantitative immunochemical studies on crystalline egg albumin denatured in various ways. J. Amer. Chem. Soc., 67:585-591.
- MANCINI, G.; VAERMAN, J.P.; CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J. F. (1964). Apud WEIR, D.M., 1973.

- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J.F. (1965). Apud WEIR, D.M., 1973.
- MANIATIS, G.M. and INGRAM, V.M. (1971a). Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins of Rana catesbeiana. J. Cell. Biol., 49: 380-389.
- MANIATIS, G.M. and INGRAM, V.M. (1971b). Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. I. Site of maturation of erythrocytes in Rana catesbeiana. J. Cell Biol., 49:372-379.
- MEIRELLES, N.C. (1975). Estudos sobre hemoglobinas de Pipa carvalhoi. Tese de doutoramento. UNICAMP.
- MEIRELLES, N.C. and FOCESI Jr., A. (1977). Pipa carvalhoi hemoglobins. I. Electrophoretic and chromatographic analysis of the blood hemolysate. IRCS Med. Sci., 5:91.
- MEIRELLES, N.C.; VIEIRA, M.L.C.; AIROLDI, L.P.S. and FOCESI Jr. , A. (1979). Some larval properties of Pipa carvalhoi adult hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 62A:859-862.

- MONOD, J.; WYMAN, J. and CHANGEAUX, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions; a plausible model. J. Mol. Biol., 12:88-118.
- NOBLE, R.W.; REICHLIN, M. and GIBSON, Q.H., (1969). The reactions of antibodies with hemeprotein antigens; the measurement of reaction kinetics and stoichiometry by fluorescence quenching. J. Biol. Chem., 244:2403-2411.
- NOBLE, R.W.; REICHLIN, M. and SCHREIBER, R.D. (1972). Studies on antibodies directed toward single antigenic sites on globular proteins. Biochemistry, 11:3326-3332.
- NOLAN, C. and MARGOLIASH, E. (1968). Comparative aspects of primary structures of proteins. Ann. Rev. Biochem., 37:727-790.
- ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:321-349.
- OUCHTERLONY, O. (1958). Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allerg. 5:78.
- PERUTZ, M.F. (1965). Structure and function of haemoglobin. I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. J. Mol. Biol. 13:646-668.

- PERUTZ, M.F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Nature, 228:726-734.
- PERUTZ, M.F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport. Hemoglobin carries oxygen from the lungs to the tissues and helps to transport carbon dioxide back to the lungs. It fulfills this dual role by clicking back and forth between two alternative structures. Scientific American, 239:68-86.
- PERUTZ, M.F.; KENDREW, J.C. and WATSON, H.C. (1965). Structure and function of haemoglobin. II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. J. Mol. Biol., 13:669-678.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.G.; MATHEWS, F. S.; MCGANDY, E.L. and WEBB, L.E. (1968). Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2,8^oA resolution: (1) X-ray analysis. Nature, 219:29-32.
- PERUTZ, M.F.; PULSINELLI, P.D.; TENEYCK, L.F.; KILMARTIN, J. V.; SHIBATA, S.; IUCHI, I.; MIYAJI, T. and HAMILTON, H.B. (1971). Apud BALDWIN, J.M., 1975.

PRAGER, E.M.; ARNHEIM, N.; MROSS, G.A. and WILSON, A.C. (1972).
Amino acid sequence studies on bobwhite quail egg lysozyme.
J. Biol. Chem., 247:2905-16.

PRAGER, E.M. and WILSON, A.C. (1971). The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Micro-complement fixation studies. J. Biol. Chem., 5978-5989.

REICHLIN, M. (1970). The distribution of specificity in rabbit antisera directed toward human hemoglobins. Immunochemistry, 7:15-27.

REICHLIN, M. (1972). Localizing antigenic determinants in human haemoglobin with mutants: molecular correlations of immunological tolerance. J. Mol. Biol., 64:485-496.

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

REICHLIN, M. (1975). Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. Adv. Immun., 20:71-119.

REICHLIN, M.; BUCCI, E.; ANTONINI, E.; WYMAN, J. and ROSSI-FANELLI, A. (1964). The immunochemical difference between horse oxy- and deoxyhaemoglobin. J. Mol. Biol., 9:785-800.

REICHLIN, M.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; WYMAN, J.; ANTONINI, E.; IOPOLLO, C. and ROSSI-FANELLI, A. (1966a). The properties and interactions of the isolated α - and β -chains of human haemoglobin. IV. Immunological studies involving antibodies against the isolated chains. J. Mol. Biol., 17:18-28.

REICHLIN, M.; BUCCI, E.; WYMAN, J.; ANTONINI, E. and ROSSI-FANELLI, A. (1965) The role of α and β chains in the immunochemical difference between oxy and deoxy human haemoglobin. J. Mol. Biol., 11:775.

REICHLIN, M. and DAVIS, B.J. (1979a). Antigenic relationships among fishes common to the Amazon River basin. Comp. Biochem. Physiol., 62A:101-104.

REICHLIN, M. and DAVIS, B.J. (1979b). A precipitating reaction between human serum and fish hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 62A:105-107.

- REICHLIN, M.; DIX, P.C.; NOBLE, R.W. and WANG, K.M. (1974) Immunological, biochemical and comparative studies of the hemoglobin haptoglobin reaction. J. Clin. Phys. 71:999-1006.
- REICHLIN, M.; FOGEL, S.; NISONOFF, A. and MARGOLIASH, E. (1966b) Antibodies against cytochromics c from vertebrates. J. Biol. Chem., 241:251-253.
- REICHLIN, M.; UDEM, L. and RANNEY, H.M. (1969). The effect of specific antibody on the oxygen equilibrium of human hemoglobin. Biochim. Biophys. Acta, 175:49-54.
- RIGGS, A. (1951). The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog. J. Gen. Physiol. 35:23-40.
- SARICH, V.M. and WILSON, A.C. (1967a). Bases of albumin evolution in primates. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58:142-148.
- SARICH, V.M. and WILSON, A.C. (1967b). Immunological time scale for hominid evolution. Science, 158:1200-1203.
- SCHNEIDER, R.G. and JONES, R.T. (1965). Hemoglobin F_{Texas}: gamma-chain variant. Science, 148:240-242.

- SCHREIBER, R.D.; NOBLE, R.W. and REICHLIN, M. (1975). Restriction of heterogeneity of goat antibodies specific for human hemoglobin S. J. Immun. 114:170-175.
- SELA, M. (1969). Antigenicity: some molecular aspects; synthetic antigens help our understanding of immunological phenomena on a molecular level. Science, 166:1365-1374.
- SELA, M.; SHECHTER, B.; SHECHTER, I. and BOREK, F. (1967). Antibodies to sequential and conformational determinants, Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 32:537-545.
- SHINKA, S.; IMANISHI, M.; MIYAGAWA, T.; AMANO, M.; INOUE, M. and TSUGITA, A. (1967). Chemical studies on antigenic determinants of hen egg white lysozyme. Biken J., 10:89-107.
- SMITHIES, O. (1959). An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem. J., 71:585-587.
- TAN-WILSON, A.L.; REICHLIN, M. and NOBLE, R.W. (1976). Properties of goat anti-human hemoglobin antibodies fractionated on subunit affinity columns. Immunochemistry, 13:491-498.

- TENTORI, L.; VIVALDI, G.; CARTA, S.; SALVATI, A.M.; SORCINI, M. and VELANI, S. (1965). The hemoglobin of amphibia. II. characterization of the hemoglobin of Rana esculenta L. Physicochemical properties and amino acid composition. Arch. Biochem. Biophys., 108:404-414.
- TRADER, C.D. and FRIEDEN, E. (1966). Dimerization and other chemical changes in amphibian hemoglobins during metamorphosis. J. Biol. Chem., 241:357-366.
- WALLACE, D.G.; MAXSON, L.R. and WILSON, A.C. (1971). Albumin evolution in frogs: a test of the evolutionary Elock hypothesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68:3127-3129.
- WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. (1941). Apud LAYNE, E., 1957.
- WEIR, D.M. (1973). Hand-book of Experimental Immunology. 2nd. edition, vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburg-Melbourne,
- WILSON, A.C. and SARICH, V.M. (1969). A molecular time scale for human evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 63:1088-1093.

WISE, R.W. (1970). An immunochemical comparison of tadpole and frog hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 32:89-95.

WU, H.; BROECK, C.T. and LI, C.P. (1927). Antigenic character of denatured egg albumin. Proc. Soc. Exp. Biol., 24:472-473.