

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

"PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HEMOGLOBINAS DE SERPENTES  
COM DIFERENTES GRAUS DE ADAPTAÇÃO MORFOLÓGICA AO  
AMBIENTE AQUÁTICO"

SATIE HATSUSHIKA OGO  
TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR  
PROF. DR. ALDO FOCESI JÚNIOR

1977

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

esposo

e

filhos

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof.Dr. Aldo Focesi Júnior, orientador desta tese, pelo incentivo, apoio e orientação desde o início da minha carreira científica.

Ao Prof.Dr. Zeferino Vaz, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas e ao Prof.Dr. Walter August Hadler Diretor do Instituto de Biologia, pelo apoio no desenvolvimento das pesquisas realizadas no Departamento de Bioquímica.

Ao Prof.Dr. Augusto S.Abe pelas instruções e materiais biológicos gentilmente cedidos para a presente pesquisa.

Aos professores: Dra. Nilce C.Meirelles, Dra. Lucia P.S.Airoldi e Dr. Hiroshi Aoyama pelas sugestões, críticas e revisões desta tese.

A Comissão Coordenadora e aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

A Sra. Amora B.Lima e Srta.Maria Luiza de Souza e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o realização do presente trabalho.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.1 MATERIAL .....	16
2.2 MÉTODOS .....	18
2.2.1. Preparação dos hemolisados .....	18
2.2.2. Preparação dos hemolisados isentos de íons e moléculas pequenas .....	19
2.2.3. Separação eletroforética dos componen <u>u</u> tes das hemoglobinas .....	20
2.2.4. Separação das hemoglobinas por cromatografia de troca iônica .....	21
2.2.5. Equilíbrio das hemoglobinas com ligam <u>en</u> te oxigênio .....	22
2.2.6. Estimativa dos parâmetros $\log P_{50}$ e coeficiente de Hill .....	25
2.2.7. Estudos sôbre efeito Bohr .....	29
2.2.8. Dosagem das hemoglobinas no sangue e hematócrito .....	29
2.2.9. Dosagem de NTP e ácido láctico no san <u>gu</u> e .....	30

2.2.9.1. Determinação de NTP .....	31
2.2.9.2. Determinação de ácido lático .....	32
2.2.10. Identificação dos nucleotídeos por cromatografia .....	33
2.2.11. Determinação de pêsso molecular por cromatografia de exclusão molecular .....	34
3. RESULTADOS .....	36
3.1. Comportamento eletroforético dos hemolisados totais em gel de amido .....	36
3.2. Separação dos componentes das hemoglobinas de <u>H. modestus</u> e <u>L. miliaris</u> por cromatogra fia .....	37
3.3. Propriedades de oxigenação das hemoglobinas das serpentes <u>H. modestus</u> e <u>L. miliaris</u> ...	40
3.4. Efeito do ATP sôbre a afinidade das hemoglo binas das serpentes pelo oxigênio .....	43
3.5. Propriedades de oxigenação dos hemolisados totais dos eritrócitos .....	45
3.6. Efeito da concentração de ATP sôbre a afini dade das hemoglobinas pelo oxigênio em pH 6,8 .....	47
3.7. Determinação de hemoglobina, hematôcrito e NTP no sangue .....	50

3.8. Determinação de lactato no sangue .....	50
3.9. Identificação dos NTP por cromatografia em papel .....	51
3.10. Determinação do pêsso molecular das hemoglo binas de <u>H. modestus</u> e <u>L. miliaris</u> por cro matografia de exclusão molecular .....	53
4. DISCUSSÃO .....	55
5. RESUMO .....	65
6. SUMMARY .....	67
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## ABREVIATURAS

ATP	-Adenosina-5'-trifosfato
$\beta$ -NAD	- $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo
$\beta$ -NADH	- $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
Bis-tris-HCl	-Bis(2-hidroximetil)imino-tris(hidroximetil) metano-HCl
CM-celulose	-Carboximetil-celulose
DEAE-Sephadex	-Diethylamino-etil-Sephadex
DPG	-Difosfoglicerato
EDTA	-Etileno-diamino-tetracético Ácido
G-6-PDH	-Glicose-6-fosfato desidrogenase
GTP	-Guanosina-5'-trifosfato
IHP	-Inositol hexafosfato
LDH	-Lactato desidrogenase
NADP	-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NTP	-Nucleosídeo trifosfato
Tris-HCl	-Tris(hidroximetil)-aminometano-HCl

## 1. INTRODUÇÃO

Hemoglobina é a proteína presente nos eritrócitos de vertebrados que funciona como carregador de oxigênio dos pulmões para os tecidos. A reação desta hemoproteína respiratória com o oxigênio é reversível e se passa através de seu grupo prostético, a proto-porfirina IX (KEILIN et al, 1951).

Em invertebrados a localização da hemoglobina não está limitada a célula específica como o eritrócito, encontrando-se em outros tecidos como nas células de parede traqueal, em larvas de Gastrophylus, nas células musculares em moluscos marinhos como em Aplysia, sendo chamadas eritrocruorina ou hemoglobina de invertebrados (KEILIN et al, 1951). Sua importância funcional é indescritível, visto que, somente poucos animais podem transportar oxigênio em quantidade suficiente, em solução, na ausência desse pigmento. No homem, por exemplo, o plasma tem capacidade de dissolver somente 0,3 vol% de oxigênio, quantidade muito aquém daquela que o sangue arterial transporta, cerca de 98% do oxigênio sanguíneo é pois transportado combinado com a hemoglobina. Além disto os pigmentos do sangue funcionam também como tampões no transporte de  $CO_2$  e participam na manutenção da pressão osmótica do sangue.

Do ponto de vista estrutural a hemoglobina é uma proteína conjugada com peso molecular 64500 daltons, constituída de uma

parte proteica, a globina, e um grupo prostético, o heme. Sua estrutura tridimensional foi estudada por cristalografia em Raio X. Cada molécula possui dois pares de sub-unidades idênticas: as cadeias  $\alpha$  e as cadeias  $\beta$  (CULLIS et al, 1962). A estrutura de cada sub-unidade é semelhante a da proteína respiratória monomérica, mioglobina (KENDREW et al, 1960).

As cadeias polipeptídicas da hemoglobina diferem entre si pela natureza dos aminoácidos presentes e suas posições específicas. As quatro sub-unidades estão arranjadas tetraedricamente e são estruturadas de tal maneira que os quatro grupos heme, sítios de ligação do oxigênio, estão distantes entre si, encontrando-se em cavidades separadas na superfície da molécula.

O arranjo das quatro sub-unidades é diferente na forma desoxigenada e oxigenada da hemoglobina tetramérica (MUIRHEAD et al, 1963a, 1963b). Assim na desoxihemoglobina parece não haver nenhum contacto entre as cadeias  $\beta$ . Por outro lado, as cadeias são mais fortemente unidas, sendo a maior parte por interações hidrofóbicas. Existem provavelmente poucas pontes de hidrogênio que contribuem nestas ligações.

Com relação à estrutura quaternária a hemoglobina é uma proteína globular solúvel em que quase 80% de sua estrutura existe em conformação  $\alpha$ -hélice. A maioria dos resíduos de aminoácidos de ambas as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  fazem parte da hélice, na qual os aminogrupos dos peptídeos da estrutura principal são ligados por pontes de

hidrogênio a grupos carboxílicos da espiral seguinte. Na hemoglobina humana, cadeia  $\alpha$  tem 141 aminoácidos e a cadeia  $\beta$  146 aminoácidos (HILL et al, 1962).

O heme consiste de um complexo de anel porfirínico com um íon  $Fe^{++}$  ocupando o centro, através da reação com o nitrogênio dos quatro anéis pirrólicos. Cada grupo heme está ligado a grupos imidazólicos de dois resíduos de histidina. O ferro no estado ferroso tem um número de coordenação igual a 6 (cada átomo de ferro se liga com 6 pares de elétrons). Na molécula do heme duas das posições de coordenação do ferro não estão ocupadas. Quando o heme se encontra associado com a globina, um N-histidil, da histidina proximal do peptídeo está ligado à quinta posição de coordenação deixando a sexta posição livre para a coordenação com o oxigênio, água ou outro ligante.

A cadeia polipeptídica dobra-se ao redor do grupo heme protegendo-o. Um dos lados do grupo heme, o lado distal, está aberto para a combinação reversível com o oxigênio. Esta parte aberta da molécula está envolvida por grupos hidrofóbicos, resultando um ambiente microquímico de baixa constante dielétrica. Este fato, evita a oxidação do  $Fe^{++}$  para  $Fe^{+++}$  e é responsável pela propriedade da hemoglobina de ligar-se reversivelmente com o oxigênio.

Normalmente quando o  $Fe^{++}$  se combina com o oxigênio, o  $Fe^{++}$  é oxidado a  $Fe^{+++}$  e o  $Fe^{+++}$  não é capaz de ligar-se reversivelmente com o oxigênio. Portanto o que caracteriza a hemoglobina

não é a sua habilidade de ligar o oxigênio mas sim ligar o oxigênio reversivelmente.

A propriedade funcional mais importante tanto da hemoglobina como da mioglobina ou seja, a combinação reversível com oxigênio, ocorre na razão de uma molécula de oxigênio para cada grupo heme, de maneira que quatro moléculas de oxigênio se ligam por molécula de hemoglobina tetramérica, e uma de mioglobina.

A curva que se obtém quando se coloca num gráfico a fração dos grupos hemes ligados ao oxigênio em função da pressão parcial do oxigênio é conhecida como curva de dissociação da hemoglobina, e tem um aspecto sigmóide. A pressão parcial de oxigênio necessária para produzir 50% de saturação da hemoglobina pelo oxigênio ( $P_{50}$ ) é usada como uma medida de afinidade da proteína pelo ligante, de modo que alta afinidade, corresponde a um pequeno valor de  $P_{50}$  e baixa afinidade a um grande valor de  $P_{50}$ , e pode ser representada por uma linha aproximadamente reta de acordo com o gráfico de Hill onde se registra o  $\log \bar{Y}/(1-\bar{Y})$  em ordenadas e  $\log PO_2$  em abcissas, onde  $\bar{Y}$  é a porcentagem de hemoglobina combinada com o oxigênio. Da inclinação da reta resultante se obtém o coeficiente de Hill,  $n$ , que representa a interação entre os diferentes sítios de ligação da hemoglobina tetramérica, isto é, a interação heme-heme. Esta interação entre os sítios de ligação significa que a reatividade de um sítio com o ligante é afetada pela presença de ligante em outro sítio na mesma molécula. Se os sítios fo-

rem da mesma natureza e ligarem o mesmo ligante ou mesmo tipo de ligante, a interação será denominada homotrópica; se os sítios ligarem tipos diferentes de ligantes a interação será denominada heterotrópica.

Na hemoglobina estão presentes ambos os tipos de interações; a interação homotrópica sendo representada por interação heme-heme e a heterotrópica pelo efeito Bohr, efeito do dióxido de carbono, fosfatos orgânicos e outros íons orgânicos e inorgânicos.

O efeito Bohr é um caso típico de interação heterotrópica, envolvendo oxigênio e o próton  $H^+$  ligado aos sítios. Este efeito foi descrito inicialmente por BOHR et al, (1904) como sendo o efeito do dióxido de carbono sobre a curva de equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio. Logo, porém, CHRISTIANSEN et al, (1914) e HENDERSON, (1920) descobriram que esse efeito era devido mais ao ácido carbônico que por seu caráter ácido doava um próton em vez do dióxido de carbono em si.

O efeito Bohr é conhecido atualmente como o efeito do pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Portanto, quando o dióxido de carbono está presente no sangue ou nos tecidos periféricos, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é reduzida e a curva de equilíbrio se desloca para a direita: efeito Bohr normal ou alcalino. Em pH baixos, usualmente bem menor do que os limites fisiológicos, o efeito Bohr pode ser reverso, isto é, aumentar a afinidade com a diminuição do pH.

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diferentes pressões parciais de  $\text{CO}_2$  é de grande importância fisiológica visto que a proteína desempenha um duplo papel in vivo: transporte de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  entre o meio ambiente e os tecidos. Nos pulmões onde a pressão do oxigênio é alta (cerca de 100 mm de Hg) e pH também relativamente alto, a hemoglobina tende a se saturar quase completamente. Nos músculos contudo, onde a tensão de oxigênio é baixa (cerca de 45 mm de Hg) e pH também baixo (devido a alta concentração de  $\text{CO}_2$  formado pelo metabolismo celular) a hemoglobina desliga o oxigênio que é captada pela mioglobina, proteína respiratória com uma simples sub-unidade.

A grandeza do efeito Bohr é expressa pela variação dos valores de  $P_{50}$  por unidade de pH ou  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  e corresponde ao número de prótons liberados por oxigênio ligado por heme.

Através de estudos estruturais da oxihemoglobina de cavalo (PERUTZ et al, 1968) da desoxihemoglobina humana (MUIRHEAD et al, 1970) e de cavalo (BOLTON et al, 1970) foi possível concluir que os aminoácidos responsáveis pelo efeito Bohr alcalino eram valina 1 $\alpha$  e histidina 146 $\beta$ , que na oxihemoglobina tem fraca interação com outros grupos. O grupo amino da valina 1 $\alpha$  contribui com 25% e o grupo imidazólico da histidina 146 $\beta$  com 75% do efeito Bohr. Por outro lado, Riggs correlacionou a magnitude do efeito Bohr com o número de SH reativos disponíveis (RIGGS, 1959).

A identificação dos grupos envolvidos no efeito Bohr al-

calino foi acompanhada pela combinação dos estudos químicos e cristalográficos.

O efeito Bohr tanto alcalino como ácido pode ser resultado de interação entre diversos aminoácidos (McMENAMY et al, 1964), mas as evidências químicas e cristalográficas sugerem que estas interações não são tão importantes e que a maior parte do efeito Bohr alcalino pode ser atribuída ao aminogruppo da valina 1 $\alpha$  e ao imidazol da histidina 146 $\beta$ . PERUTZ (1970), sugeriu que a histidina 122 $\alpha$  e KILMARTIN et al (1973) que interação de íons cloretos contribuiriam também para o efeito Bohr alcalino; ANTONINI et al, (1965), ROSSI-BERNARDI et al, (1967), através de estudos de modificações químicas da molécula sugeriram que possivelmente grupos carboxílicos participavam em efeito Bohr ácido.

Outro tipo peculiar de interação heterotrópica envolve a ligação de fosfatos orgânicos a sítios específicos das hemoglobinas. Os fosfatos orgânicos (DPG, ATP, IHP) que estão normalmente presentes nos eritrócitos, tem um efeito pronunciado sobre a curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio que é deslocado no sentido de diminuir a afinidade da mesma pelo ligante (BENESCH et al, 1967; CHANUTIN et al, 1967). O aumento da resistência da hemoglobina a oxigenação em presença de fosfatos orgânicos, sugere fortemente a estabilização de conformação desoxi em presença desses ânions. Isso explica também porque os fosfatos orgânicos se ligam preferencialmente à hemoglobina na sua forma desoxige-

nada (MANWELL, 1960, 1964).

BENESCH et al (1967, 1969) mostraram que 2,3-DPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em solução e está presente nos eritrócitos de mamíferos em concentração suficientemente alta para explicar o controle da afinidade da hemoglobina observado no sangue total.

Em pássaros, IHP é o fosfato orgânico intra-eritrocítico mais importante (RAPOPORT et al, 1941) e sua ação é semelhante ao 2,3-DPG de mamíferos (BENESCH et al, 1969). Em células vermelhas de certas classes de animais, répteis, o ATP é o nucleotídeo mais encontrado e pode funcionar da mesma maneira. No peixe, "bagre" e no mamífero "lobo do mar" (RAPOPORT et al, 1941) descreveram além de ATP um fosfato orgânico não identificado.

Dentro dos eritrócitos a hemoglobina está num meio homeostático; assim as propriedades respiratórias do sangue total derivam da propriedade intrínseca da hemoglobina e da maneira pela qual essa propriedade é modificada pelas condições físico-químicas dos eritrócitos (pH, presença de ATP e demais íons e moléculas). Usualmente no hemolisado constata-se maior afinidade da hemoglobina pelo oxigênio do que aquela encontrada no sangue total.

Os sítios da molécula onde o DPG se liga é de grande interesse. Diversas considerações discutidas por BENESCH et al (1967) apontam uma cavidade central que corre através da molécula ao longo do eixo de simetria, sítio onde o fosfato orgânico

se encaixa. Os ésteres de fosfatos carregados negativamente são fixados por interações eletrostáticas aos resíduos de aminoácidos carregados positivamente que estão presentes na cavidade.

Medidas de difração ao raio X pelo grupo de Cambridge (BOLTON et al, 1968; MUIRHEAD et al, 1967), mostraram que na oxihemoglobina, a cavidade é muito pequena para admitir a entrada de fosfatos orgânicos; na desoxihemoglobina ocorre uma mudança conformacional que aumenta consideravelmente as dimensões dessa cavidade.

Evidências cristalográficas confirmam a ligação de uma única molécula por sítio e definem os resíduos de aminoácidos que participam na ligação. O  $\alpha$ aminogruppo da valina 1 $\beta$ , o imidazol das histidinas 2 $\beta$  e 143 $\beta$  estão envolvidos na interação eletrostática com os grupos fosfatos enquanto que o aminogruppo da lisina 82 $\beta$  participa na ligação com o grupo carboxílico do fosfato orgânico (ARNONE, 1972).

Como o objetivo final é quase sempre a compreensão da fisiologia humana, os experimentos com mamíferos são os mais numerosos. Assim é dada muita atenção para a hemoglobina de mamíferos; conseqüentemente um grande número de estudos estruturais e funcionais revelaram muitos aspectos dos mecanismos envolvidos em sua função (MANWELL, 1964). Esse tipo de investigação para hemoglobina de outras espécies, cujo conhecimento é muito fragmentado, também é de grande interesse uma vez que pode levar ao conhecimento mais

profundo de proteína em geral e de sua potencialidade, e pode nos informar ainda sobre o mecanismo de controle que se tem desenvolvido para satisfazer as necessidades peculiares de cada espécie.

As hemoglobinas de répteis, e em particular de serpentes, possivelmente não diferem de modo fundamental tanto do ponto de vista estrutural como funcional das de mamíferos. Contudo algumas das características existem que lhes são peculiares para melhor adaptação à vida destes animais.

Geralmente as hemoglobinas de répteis, anfíbios e peixes tem muitos componentes quando comparadas com as de mamíferos (GRATZER et al, 1960); este fato pode estar relacionado com a multiplicidade funcional das hemoglobinas na sua adaptação às condições ambientais. Assim os animais poiquiloterms por exemplo, estão sujeitos a grande variação de temperatura, de pressão de oxigênio, e a velocidade metabólica varia consideravelmente no mesmo indivíduo; as necessidades respiratórias desses vertebrados inferiores variam num limite amplo, dando origem a muitas adaptações interessantes.

O transporte de oxigênio em répteis é semelhante ao dos mamíferos. O aumento de temperatura ou diminuição de pH (dentro dos limites fisiológicos) leva a um decréscimo da afinidade pelo oxigênio. A curva de equilíbrio com oxigênio varia de um réptil para outro e de uma espécie para outra. As tartarugas marinhas são animais muito ativos e apresentam hemoglobinas com baixa afinidade pelo oxigênio (McCUTCHEON, 1947; SULLIVAN, 1966; SULLIVAN et al,

1967b). Em serpentes aquáticas o grau de atividade muscular parece também correlacionado com a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; quanto mais lenta a serpente, maior é esta afinidade (JOHANSEN et al, 1972; SEYMOUR et al, 1975; SEYMOUR, 1976).

Desde que a oxigenação dos tecidos é facilitada pelo decréscimo da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, espera-se que quanto mais ativa a serpente, menor seja esta afinidade.

Não se conhece nenhum outro grupo de animais que sofra mudança tão brusca no pH sanguíneo e na distribuição de ânions como ocorre nos répteis, durante eventos fisiológicos diários (DESSAUER, 1970). A glicólise, que frequentemente fornece a maior parte da energia para processos vitais dos animais, contribui para a alta concentração de lactato no sangue.

Os répteis mergulhadores e os que vivem em tocas, frequentemente estão expostos a falta de oxigênio por períodos prolongados (ANDERSEN, 1976). Assim os crocodilos, lagartos e ofídios são tão usualmente aptos a sobreviver cerca de 45 minutos a 22°C em completa ausência de oxigênio. A tolerância é maior ainda entre as tartarugas. Do exposto pode-se notar grande preocupação entre os pesquisadores por um estabelecimento mais definitivo possível de como a hemoglobina funciona em condições em que os suprimentos de oxigênio são escassos ou muito abundantes e quais são as mudanças estruturais responsáveis por estas adaptações fisiológicas. Acreditamos que entre os répteis há real oportunidade de corroborar a-

queles estudos uma vez que eles estão mais sujeitos a condições adversas que os mamíferos, por exemplo.

A presente tese procura estabelecer algumas propriedades estruturais e funcionais da hemoglobina de ofídios por razões que passamos a relatar.

Diversos trabalhos recentes focalizam a atenção na correlação entre metabolismo fisiológico e o modo de vida dos répteis (BENNETT , 1973; BENNETT et al, 1976), porém ainda continua virtualmente sem informação esta correlação entre as serpentes.

Este grupo de réptil é particularmente interessante desde que dentre todos os vertebrados terrestres, as serpentes, possivelmente sofreram a mais intensa irradiação adaptativa desde o período terciário-médio, em contraste à extinção ou estagnação evolucionária de outros répteis e pode ainda estar em processo adaptativo (ROMER, 1966). Consequentemente cerca de 2700 espécies de serpentes existem em uma grande variedade de habitat: fossial, arboreal, terrestre e aquático, e correspondentemente exibem variedade muito grande de atividade muscular durante a predação e defesa.

Dentre os répteis pertencentes à sub-ordem dos ofídios, estudamos duas espécies de diferentes gêneros, porém da mesma família Colubridae: Helicops modestus e Liophis miliaris (Fig.1 e Fig.2).

A análise comparativa entre essas duas espécies de serpentes nos parece bastante interessante, pois, embora elas ocupem

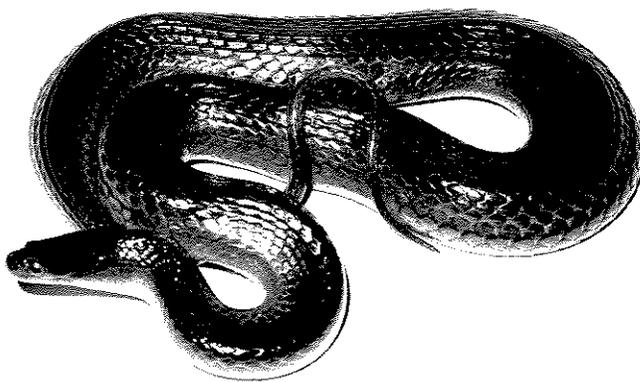


Fig.1 Helicops modestus

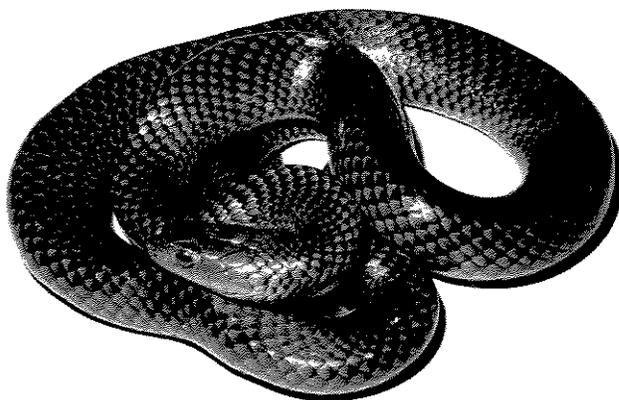


Fig.2 Liophis miliaris

o mesmo habitat aquático, a H. modestus apresenta-se morfológica e fisiologicamente mais adaptada à vida aquática do que a espécie L. miliaris. A H. modestus se caracteriza por ser uma serpente menos ativa, de habitat mais aquático do que a L. miliaris.

Dentre as adaptações morfológicas, aquela que para nós é de interesse mais imediato é a pulmonar (Fig.3 e Fig.4). O pulmão da L. miliaris é bem mais complexo; sua parte anterior possui estrutura bastante elaborada, vascularizada contendo numerosos alvéolos e sua parte posterior é sacular. A H. modestus possui pulmão moderadamente evoluído, região vascularizada contendo poucos alvéolos em toda extensão. Indubitavelmente a área para a troca gasosa em H. modestus é apenas uma fração da L. miliaris.

Nestas duas espécies de ofídios estudamos algumas propriedades estruturais e funcionais de suas hemoglobinas.



Fig.3 Corte transversal da região alveolar do pulmão de H. modestus

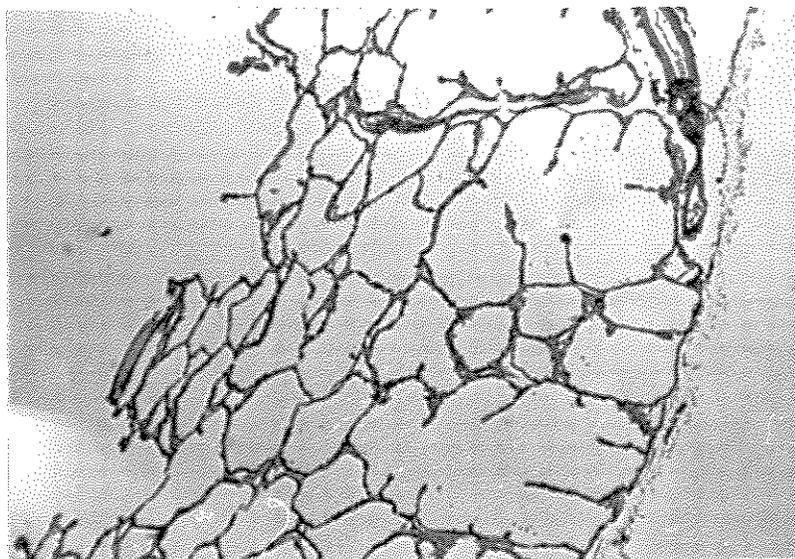


Fig.4 Corte transversal da região alveolar do pulmão de L. miliaris

## 2. MATERIAL E METODOS

### 2.1. MATERIAL.

Serpentes adultas das espécies Helicops modestus Günther 1861 e Liophis miliaris (Linnaeus, 1758) pertencentes à família Colubridae foram coletadas em regiões próximas a Jundiá-SP. Todos os experimentos foram efetuados com exemplares recém capturados a fim de evitar possíveis alterações metabólicas no sangue devido à vida em cativeiro. As serpentes da espécie H. modestus pesavam aproximadamente 50g enquanto que as da espécie L. miliaris tinham peso médio de 130g.

Para as preparações do hemolisado e extrato utilizou-se a centrífuga Eppendorff 3200. As pesagens foram efetuadas principalmente em balanças Metler, tipo SS ou Sartorius, tipo 2443. As determinações potenciométricas foram feitas em pH Meter HM-7A, TOA. Para as determinações espectrofotométricas e colorimétricas empregamos os espectrofotômetros Beckman, modelo DU, espectrofotômetro Zeiss, modelo PMQ-II ou modelo DMR 21 e fotocolorímetro Zeiss modelo PL-4. Para efetuar os cálculos utilizamos a calculadora eletrônica Sharp, modelo Compet 364P-III.

Os estudos experimentais de equilíbrio de oxigenação foram efetuados em tonômetro, conforme indica a Fig.5. Este consiste de um tubo de Thunberg modificado, provido de uma cela espec-

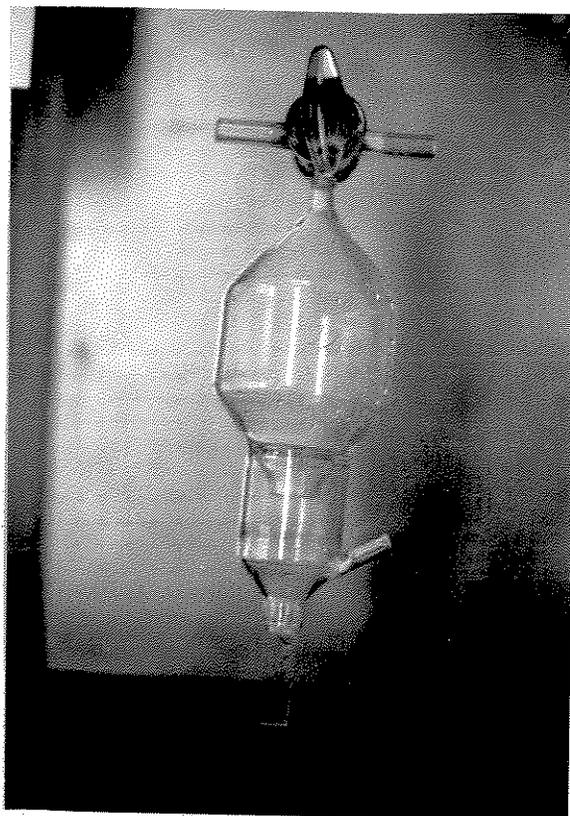


Fig.5 Tonômetro empregado para o estudo da afinidade da hemoglobina com o oxigênio.

trofotométrica de vidro pyrex com capacidade de 4 ml e caminho ótico de 1 cm. Esta é soldada num recipiente de vidro cuja capacidade gasosa é de aproximadamente 250 ml.

Os demais equipamentos usados foram fonte elétrica Thomas modelo 21, coletor de frações Buchler, lâmpada ultra violeta Mineralight UVSL-25.

Os principais reagentes empregados foram: amido hidrolisado Smithies Connaught Medical Research Laboratories, resina CM-celulose Sigma, resina DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-25-150 Sigma e Sephadex G-100 Sigma, Dowex 1-X<sub>8</sub>(acetato<sup>-</sup>) Baker Analysed Reagent, Dowex 50W-X<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) Baker Analysed Reagent, Amberlite Resin IRC 50(H<sup>+</sup>) BDH e IR-4B(OH<sup>-</sup>) BDH.

As enzimas e os demais reagentes foram produtos PA de procedência Sigma, Mann, Merck, Baker ou equivalente.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1. PREPARAÇÃO DOS HEMOLISADOS

Para preparar os hemolisados totais, os animais previamente heparinizados, foram sangrados via arco sistemico esquerdo ; o material coletado com seringa heparinizada foi transferido para

tubos de polietileno (Eppendorff) contendo 0,05 ml. de heparina (500 UI/ml) e solução de NaCl 1,7%, EDTA 1mM pH 7,0. Evitou-se assim a coagulação sanguínea e eventual polimerização da hemoglobina.

Após a separação das hemácias por centrifugação a 13000 rpm por 2 minutos, as células foram lavadas 3 vezes com solução de NaCl 1,7%, EDTA 1mM pH 7,0, na proporção de uma parte de hemácias para três partes de solução.

A hemólise foi efetuada com uma solução de EDTA 1mM pH 7,0 na razão de um volume de hemácias para três volumes da solução.

Todas as operações foram realizadas a 4°C.

#### 2.2.2. PREPARAÇÃO DOS HEMOLISADOS ISENTOS DE ÍONS E MOLÉCULAS PEQUENAS

As hemoglobinas "stripped", livres de fosfatos orgânicos, íons e outras moléculas pequenas foram obtidas por cromatografias em colunas de exclusão molecular e de troca iônica (NOBLE et al, 1976).

10 ml do hemolisado foram eluidos através de uma coluna de filtração em gel, Sephadex G-25 (20x1cm), previamente equilibrada com EDTA  $10^{-3}$ M pH 7,0 e a seguir através de uma série de três colunas de troca iônica constituídas pelas seguintes resinas: Dowex 1-X<sub>8</sub> (acetato<sup>-</sup>) (5x2cm) Dowex 50W-X<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (5x2cm) e uma mis

ta Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup>) e IR-4B(OH<sup>-</sup>) (20x2cm), também equilibradas com a mesma solução.

### 2.2.3. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS COMPONENTES DAS HEMOGLOBINAS

O estudo do comportamento eletroforético das hemoglobinas foi realizado por eletroforese horizontal em gel de amido a 13%, pH 8,55. A separação em gel horizontal foi feita em câmara, segundo esquema de Smithies (1959) com ligeiras modificações. O gel foi preparado com o amido hidrolisado (POULIK et al, 1957; SMITHIES, 1959) e tampão contendo: tris (hidroximetil) aminometano 30,4 mM, EDTA 1,2 mM, ácido bórico 4,4 mM, KCN 0,01%, pH 8,55. O tampão dos eletrodos foi o tampão borato 0,36M pH 9,0.

As amostras foram preparadas dialisando-as durante 12 horas contra o tampão do gel. Imediatamente antes de sua aplicação as hemoglobinas foram convertidas em cianohemoglobinas mediante a adição de 0,01 ml de solução de KCN 2,0%.

A diferença de potencial de campo elétrico usada foi de 6,4 volts/cm, o que resultou numa corrente de 14 mA por placa, durante 6 horas. Essa técnica foi efetuada a temperatura de aproximadamente 4°C para evitar o aquecimento do gel por efeito Joule. Decorridas as 6 horas o gel foi cortado longitudinal em duas par-

tes. Na primeira, individualisaram-se as hemoglobinas pela sua atividade peroxidásica, através da coloração do gel com uma solução contendo 1g de benzidina, 75ml de metanol, 0,5ml de ácido acético glacial, 0,1ml de peróxido de hidrogênio (130 volumes) e cerca de 10mg de nitroprussiato de sódio. Após 20 minutos o gel foi lavado com uma solução contendo 50ml de éter, 25ml de metanol e 5ml de peróxido de hidrogênio (130 volumes). A segunda metade foi corada com negro de amido para detectar as proteínas.

#### 2.2.4. SEPARAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

As hemoglobinas de serpente H. modestus foram separadas por cromatografia em DEAE Sephadex (20x1cm) previamente ativada e equilibrada com tampão tris-HCl 0,05M pH 8,6 contendo EDTA 1mM. A amostra a ser cromatografada foi dialisada 12 horas contra o mesmo tampão, aplicando-se à coluna cerca de 1,5ml (20mg). A eluição foi feita utilizando-se tampão tris-HCl 0,05M em gradiente de pH entre 8,6 e 8,0. A concentração de proteína nas frações eluídas foi determinada por leitura da absorvância em 405nm.

As hemoglobinas da espécie L. miliaris foram fracionadas por cromatografia em CM-celulose (19x1cm), previamente ativada e equilibrada com tampão fosfato 0,01M pH 6,4 contendo EDTA 1mM. A

amostra a ser cromatografada foi dialisada 12 horas contra tampão fosfato 0,01M pH 6,4 contendo 1mM de EDTA e os componentes foram eluidos no mesmo tampão num sistema de gradiente de pH entre 6,4 e 8,0. A concentração da hemoglobina no eluato foi determinada fotometricamente a 405nm.

#### 2.2.5. EQUILIBRIO DAS HEMOGLOBINAS COM LIGANTE OXIGÊNIO

Para se estudar o equilíbrio das hemoglobinas com o oxigênio empregou-se método espectrofotométrico (ANTONINI et al, 1971). Este método baseia-se nos seguintes princípios: o oxigênio se liga somente ao grupo heme na proporção de 1:1; nas saturações intermediárias, as propriedades espectrais do heme livre corresponde a dos derivados desoxigenados e as propriedades dos hemes ligados com o oxigênio correspondem a da hemoglobina completamente saturada.

As curvas de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina foram traçadas utilizando tonômetro especialmente construído que se revelou adequado para esse tipo de estudo. Por um conjunto de orifícios o tonômetro permite a passagem do nitrogênio gasoso através da câmara, arrastando todo o oxigênio de 2ml da solução de oxihemoglobina contida no interior do mesmo. Assim se obteve a desoxihemoglobina. Após o equilíbrio com a fase gasosa durante 10 minutos

em banho a 25°C, as medidas de absorvância da solução de hemoglobina foram registradas por um espectrofotômetro de varredura, entre os comprimentos de onda 500 e 600nm. O oxigênio foi então introduzido no sistema pela adição de quantidades conhecidas de ar na pressão atmosférica. Após cada adição, a solução foi equilibrada com a fase gasosa na temperatura constante do banho. Então traçou-se o espectro entre 500 e 600nm. Repetiu-se o processo e se obteve diversos pontos ao longo da curva de saturação para cada amostra (Fig.6).

A oxihemoglobina possui 2 picos de máxima absorção: 541 e 576nm enquanto que a desoxihemoglobina apresenta apenas um pico de máxima absorção no comprimento de onda 555nm.

A hemoglobina totalmente saturada com oxigênio foi obtida mediante a passagem de uma corrente de ar através do tonômetro e o espectro traçado nas mesmas condições anteriores. Os valores das pressões parciais foram calculados pelo processo de diluição, levando-se em conta a pressão parcial do oxigênio da atmosfera local de trabalho.

O cálculo da pressão parcial do oxigênio foi baseado na equação de Boyle-Mariotti:

$$P_2 = \frac{P_1 V_1}{V_2} \quad \text{onde:}$$

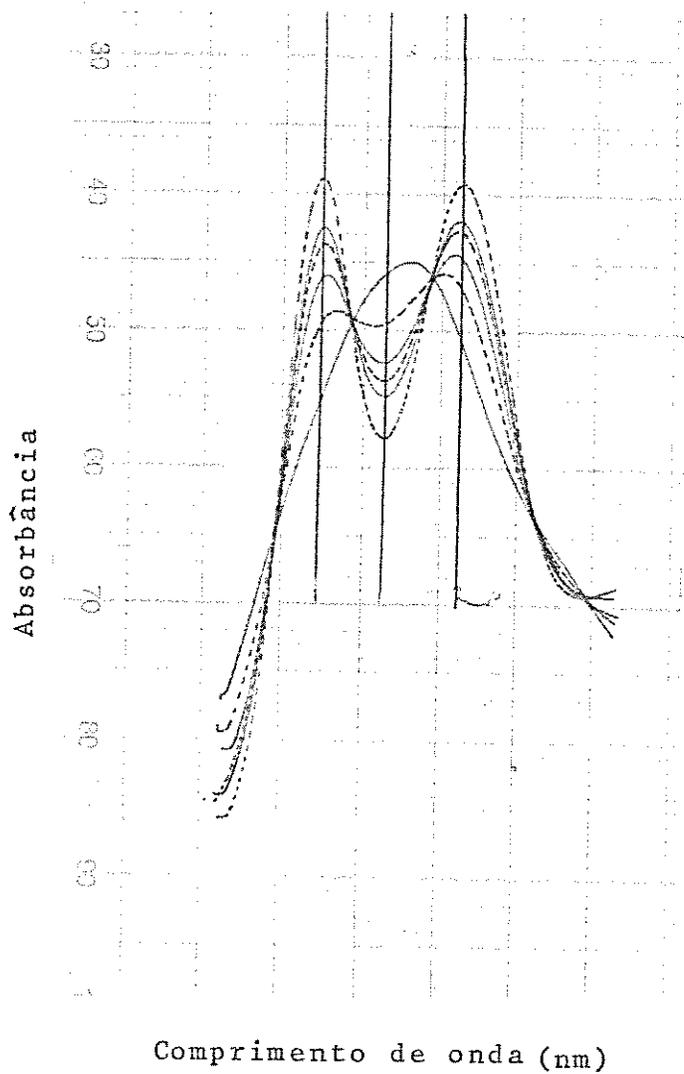


Fig.6 Curvas espectrais da hemoglobina em vários graus de oxigenação em comprimento de onda entre 500 e 600nm.

$P_1$  representa pressão parcial de oxigênio no ar atmosférico (156mm de Hg);  $V_1$  representa volume de ar injetado no tonômetro e  $V_2$  representa volume gasoso do tonômetro: coeficiente tonométrico.

Para cada espécie de ofídio, o material estudado foi: hemolisado total, hemolisado "stripped" e hemolisado "stripped" contendo ATP em concentração saturante.

Cada experimento foi realizado com 2ml de solução de hemoglobina com concentração aproximada de  $4.10^{-5}M$ , em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M num intervalo de pH entre 5,0 e 9,0.

#### 2.2.6. ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS $\log P_{50}$ E COEFICIENTE DE HILL

Para a obtenção dos valores de  $\log P_{50}$  e  $n$  a partir das curvas experimentais de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio, foi utilizada uma calculadora eletrônica Sharp. Foi estabelecido um programa para se calcular os valores de  $\log K$  a partir dos valores de absorbância entre as formas oxi e desoxihemoglobina nos comprimentos de onda 540, 555 e 576nm. Para se obter os valores de  $\log P_{50}$  foi utilizado um programa de regressão linear, tomando-se em ordenada os valores de  $\log K(y)$  e em abcissa os valores de  $\log PO_2$ . Sendo  $y = a + bx$ , quando  $y = 0$ ,  $x$  representando

$\log P_{50}$  é igual a  $-a/b$ .

O valor de  $n$  representa o coeficiente angular desta reta.

Os dados de equilíbrio (TABELA I e Fig.7) podem ser apresentados usando vários tipos de gráficos que auxiliam a visualização.

Em nosso caso utilizamos o gráfico de Hill onde

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

O gráfico (Fig.7) nos fornece o valor de  $P_{50}$ , isto é a, pressão parcial de oxigênio necessária para produzir 50% de saturação dos sítios da hemoglobina com oxigênio. É portanto uma medida da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

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

TABELA I

Valores experimentais obtidas a partir da Fig.6 para o cálculo de  $P_{50}$  e  $\bar{n}$

Hb	Var	$\Sigma V$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$\Delta_1$	$\Delta_2$	$\Delta_3$	$\Sigma \Delta$	Y%	$\log \bar{Y}/1-\bar{Y}$	$\log PO_2$
Desoxi			0,446	0,541	0,491		0,120					
Oxi			0,610	0,421	0,607	0,164		0,116	0,400			
1	1	1	0,500	0,502	0,525	0,054	0,039	0,034	0,127	31,7	-0,3324	-0,268
2	1	2	0,537	0,477	0,552	0,091	0,064	0,061	0,216	54,0	0,0696	0,032
3	1	3	0,561	0,463	0,572	0,115	0,078	0,081	0,274	68,5	0,3373	0,208
4	2	5	0,574	0,452	0,580	0,128	0,089	0,089	0,306	76,5	0,5126	0,430

Var = volume de ar adicionado à desoxihemoglobina (ml);  $\Sigma V$  = somatória de Var (ml);

$A_1$  = absorvância lida a 577nm;  $A_2$  = absorvância lida a 560nm;  $A_3$  = absorvância lida a 540nm;  $\Delta$  = diferenças de absorvância entre as formas oxi e desoxihemoglobina;

$\Sigma \Delta$  = somatória dos  $\Delta$ ; Y% = porcentagem de saturação;  $PO_2$  = pressão parcial de oxigênio.

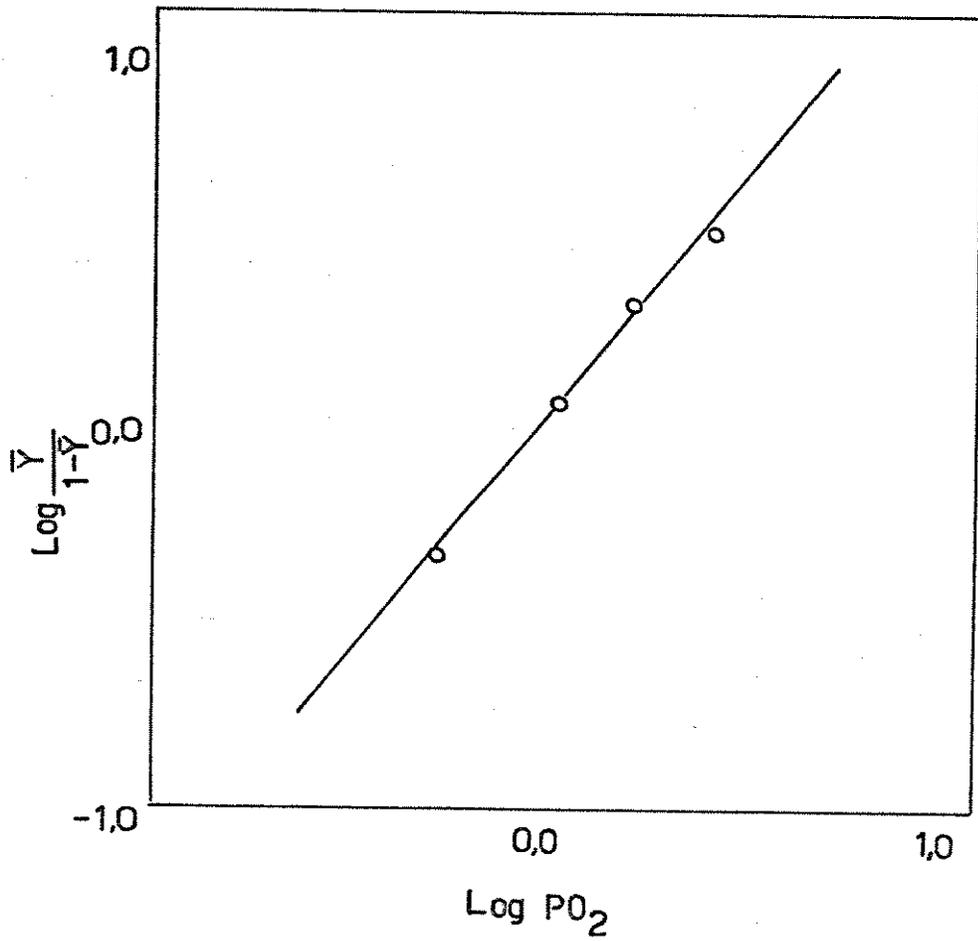


Fig.7 Curva de oxigenação da hemoglobina.

### 2.2.7. ESTUDOS SÔBRE EFEITO BOHR

O método experimental para a medida do efeito Bohr envolve determinação da afinidade da hemoglobina pelo ligante, ou seja, o valor de  $P_{50}$  em função do pH.

O estudo da curva de equilíbrio das hemoglobinas de serpentes com oxigênio foi feito em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M, num intervalo de pH 5,0 a 9,0.

Este método nos fornece também informações a respeito da interação heme-heme em função do pH.

O efeito heterotrópico do ATP sôbre as hemoglobinas das duas espécies de serpentes foi estudado através das curvas de equilíbrio com oxigênio em presença de ATP 1mM e num dos seguintes tampões: bis-tris-HCl 0,01M para pH de 5,7 a 7,0 e tris-HCl 0,01M para pH de 7,0 a 8,8.

### 2.2.8. DOSAGEM DE HEMOGLOBINAS NO SANGUE E HEMATÓCRITO

O conteúdo total de hemoglobinas no sangue foi determinado espectrofotometricamente (ANTONINI et al, 1966), utilizando o coeficiente de extinção milimolar do heme da oxihemoglobina humana, no comprimento de onda 415nm, região do Soret.

0,1ml do sangue coletado via arco sistemico esquerdo foi

convenientemente diluído e hemolisado em água destilada e carbonato de sódio 0,1M e a concentração foi determinada através da leitura de absorbância no comprimento de onda 415nm, sendo os cálculos baseados no coeficiente de extinção milimolar da oxihemoglobina humana no mesmo comprimento de onda ( $A_{415} = 125$ ).

Para a determinação do hematócrito, sangue recentemente coletado foi introduzido em tubo capilar heparinizado para microhematócrito "Pre-cal" cuja extremidade foi vedada com a massa apropriada e centrifugado a 16000 rpm por 5 minutos.

O volume de células vermelhas sedimentadas foi expresso em porcentagem por volume de sangue total.

#### 2.2.9. DOSAGEM DE NTP E ÁCIDO LÁTICO NO SANGUE

O nível de NTP e lactato no sangue de ofídios foi medido em estado de repouso e depois de atividade forçada.

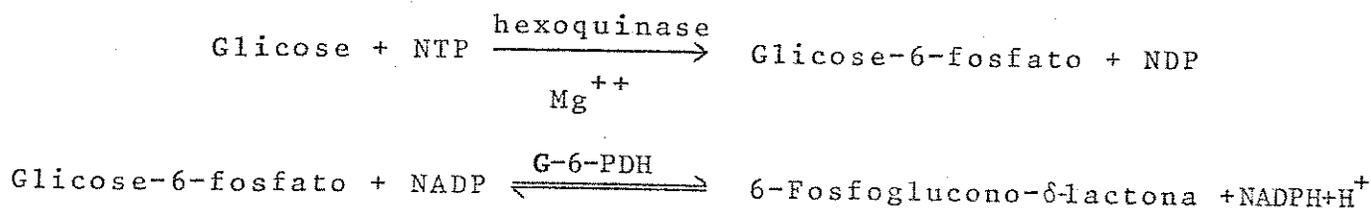
O sangue foi colhido por punção cardíaca ou por corte na extremidade da cauda e imediatamente desproteínizado. A desproteínização (BÜCHER et al, 1953) foi efetuado com solução de ácido perclórico 6% (pêso/vol) 1:1 (vol/vol) e centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos a 4°C obtendo-se o sobrenadante I. O precipitado gelatinoso residual contendo quantidade variável de NTP e ácido láctico foi lavado por mais três vezes com a mesma porção de ácido

perclórico 6% obtendo-se os sobrenadantes II, III e IV os quais foram reunidos e neutralizados com uma solução de  $K_2CO_3$  5M. Nessa solução ensaiou-se o NTP e o ácido lático.

Após a coleta do sangue dos animais em repouso, as serpentes foram estimuladas mediante agressão mecânica. Seguindo um período inicial de alta atividade, após 4-5 minutos elas responderam moderadamente ao estímulo; ao sétimo minuto de exercício elas se encontraram completamente exaustas, não mais responderam as agressões, contorcendo-se e enrolando a cauda e expelindo uma secreção viscosa nauseante da cloaca. Após um período de 8 minutos de repouso, cortou-se a extremidade da cauda e sangrou-se, tratando-se o sangue como descrito anteriormente para dosagem de NTP e lactato.

#### 2.2.9.1. DETERMINAÇÃO DE NTP

Para a dosagem do NTP (LAMBRECHT et al, 1965) utilizou-se a determinação enzimática pelo método espectrofotométrico que se baseia no seguinte princípio:



A concentração de NTP no extrato foi determinada por com paração com uma curva padrão construída previamente com concentrações conhecidas de ATP.

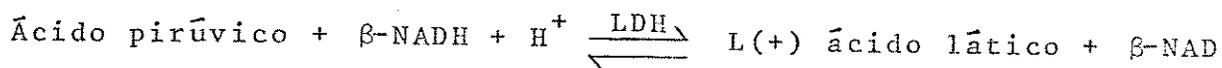
A mistura de reação consistia de: tampão trietanolamina 40mM pH 7,5; NADP 0,364mM; cloreto de magnésio 7,0mM; extrato sanguíneo G-6-PDH em excesso; glicose 40mM e hexoquinase em excesso para um volume final de 1ml.

A reação se iniciou pela adição de hexoquinase e registrou-se a absorbância a 340nm durante 15 minutos à temperatura ambiente (formação do NADPH).

#### 2.2.9.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

O ácido lático foi determinado nos mesmos extratos utilizados para a dosagem de NTP por método descrito por MARBACH et al (1967) baseado na formação de ácido pirúvico em presença de desidrogenase lática preparada de coração de boi pelo método descrito por SCHWERT et al (1962).

O princípio da reação é:



A mistura de incubação para 1 ml consistiu de tampão

glicina-semicarbazida pH 9,5 175mM, extrato, desidrogenase lática e  $\text{NAD}^+$  0,3mM. A reação foi iniciada pela adição de  $\text{NAD}^+$ , lendo-se  $A_{340}$  após 15 minutos à temperatura ambiente (formação de NADH).

A concentração de ácido lático no extrato foi medido através de comparação com uma curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas de lactato.

#### 2.2.10. IDENTIFICAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA

Os nucleotídeos foram identificados por cromatografia em papel, pela técnica ascendente, unidirecional (CATÁLOGO P.L.BIOCHEMICALS, INC., 1973).

As amostras foram preparadas coletando-se pequenas porções de sangue (H. modestus e L. miliaris) via arco sistêmico esquerdo ou da extremidade da cauda em tubos contendo ácido perclórico 6%, as suspensões foram agitadas vigorosamente e após 10 minutos de repouso a 4°C foram centrifugados. Os sobrenadantes neutralizados com  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5M foram usados para a cromatografia. O papel de filtro utilizado foi o Wattman nº 1, sendo a linha de base traçada a 4cm da extremidade. Aplicou-se em paralelo 0,005 ml de cada uma das soluções padrões de ATP e GTP (concentração  $10^{-2}\text{M}$ ) com o auxílio de tubos capilares (0,7 a 1,0 mm de diâmetro) e aproximadamente 0,03 ml de cada uma das soluções das amostras pre-

paradas como descrito acima. O sistema de solvente utilizado foi ácido isobutírico/hidróxido de amônio/água, 66/1/33, pH 3,7.

A cromatografia foi desenvolvida durante 16 horas a temperatura ambiente; as manchas correspondentes aos nucleotídeos foram detectadas através da iluminação com lâmpada ultravioleta, de baixo comprimento de onda.

#### 2.2.11. DETERMINAÇÃO DE PÊSO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

O pêso molecular das hemoglobinas foi determinada por cromatografia de exclusão molecular. A amostra de pêso molecular desconhecido foi aplicada à uma coluna de Sephadex G-100 (75 x 5cm) previamente equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e eluída com o mesmo tampão. A concentração de hemoglobina no eluato foi determinada por absorbância em 546nm.

Considerando as variáveis  $V_o$ ,  $V_e$  e  $V_t$ , foi possível determinar o valor de  $K_aV$  pela seguinte equação:

$$K_aV = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde  $K_aV$  = coeficiente de partição entre fase líquida e gel;  $V_o$  = volume morto, isto é, volume total eluído com uma substância que

é completamente excluída do gel;  $V_e$  = volume eluente, isto é, volume de eluição de cada uma das frações cujos valores estão compreendidos entre  $V_o$  e  $V_t$ .  $V_t$  = volume total do leito do gel.

Conhecido o  $K_{aV}$  de várias substâncias de peso molecular já estabelecido, pode-se construir a curva de calibração da coluna. Para calibrar a coluna foram utilizadas as seguintes substâncias: mioglobina de cavalo (P.M. = 16000), dímero de hemoglobina humana (P.M. = 32250), hemoglobina humana tetramérica (P.M. = 64500) e hexoquinase de levedura (P.M. = 102000), cujos  $K_{aV}$  foram 0,536, 0,420, 0,252 e 0,116 respectivamente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO DOS HEMOLISADOS TORAIS EM GEL DE AMIDO

Hemolisados totais dos eritrócitos de serpentes pertencentes às espécies H. modestus e L. miliaris foram submetidos à eletroforese em gel de amido a 13%, pH 8,55, em forma de cianohemoglobinas. Pela Fig.8 pode-se observar que os hemolisados de ambas as espécies apresentaram três componentes cada uma. De acordo com a mobilidade anódica decrescente foram designados como componente HmI, HmII e HmIII os da espécie H. modestus e LmI, LmII e LmIII os da L. miliaris.

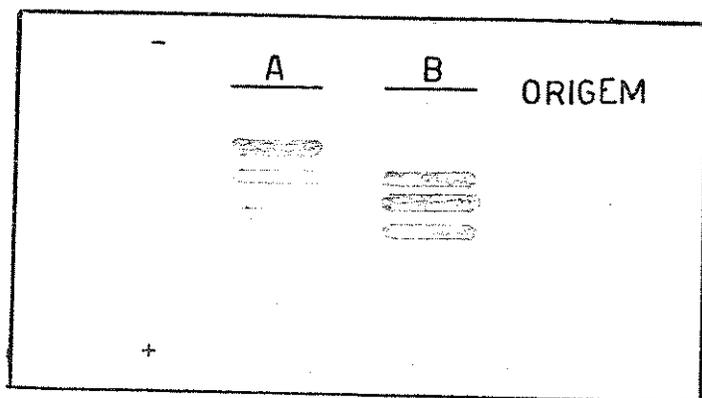


Fig.8 Separação eletroforética das hemoglobinas de

A=H. modestus e B=L. miliaris.

### 3.2. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DAS HEMOGLOBINAS DE H. modestus e L. miliaris POR CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um outro processo de fracionamento e caracterização de hemoglobinas. 1,5ml de hemolisado total de eritrócitos da serpente H. modestus contendo de 15 a 20mg de hemoglobina por ml foi cromatografado em resina aniônica de DEAE-Sephadex A<sub>50</sub>. O hemolisado, previamente dialisado contra tampão tris-HCl 0,05M e EDTA 1mM pH 8,6 foi eluído com o mesmo tampão num sistema de gradiente de pH. A Fig.9 mostra que o primeiro pico representa usualmente 60% e o segundo 40% do hemolisado total. O último componente identificado por eletroforese representa provavelmente uma pequena porcentagem do hemolisado total e é possivelmente eluído junto com as porções finais do segundo pico, como sugere a Fig.9.

1,5ml de hemolisado total de L. miliaris contendo 15 a 20mg de hemoglobina por ml, dialisado contra o tampão fosfato 0,01M e EDTA 1mM pH 6,4 foi cromatografado em coluna de CM-celulose resultando no isolamento de três componentes como mostra a Fig.10.

O primeiro pico corresponde a 40% do hemolisado total, o segundo e o terceiro equivalem a 20% e 40% respectivamente. A eluição foi efetuada com tampão fosfato 0,01M e EDTA 1mM pH 6,4 em sistema de gradiente de pH.

Durante os experimentos preliminares, tentamos separar os diferentes componentes da hemoglobina de H. modestus através

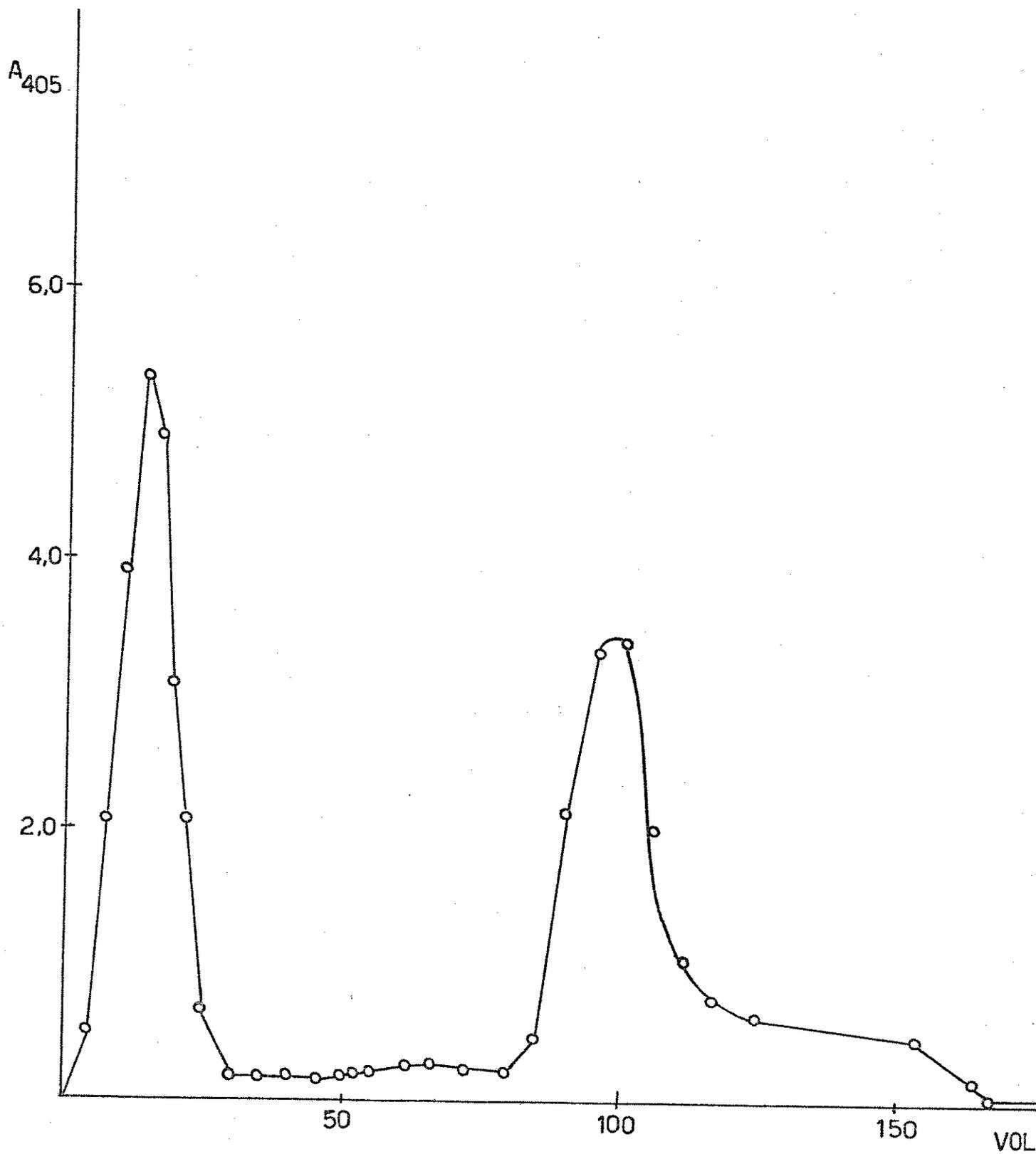


Fig.9 Cromatografia das hemoglobinas de H. modestus em coluna de DEAE-Sephadex A<sub>50</sub> (20x1cm) num sistema de gradiente de pH.

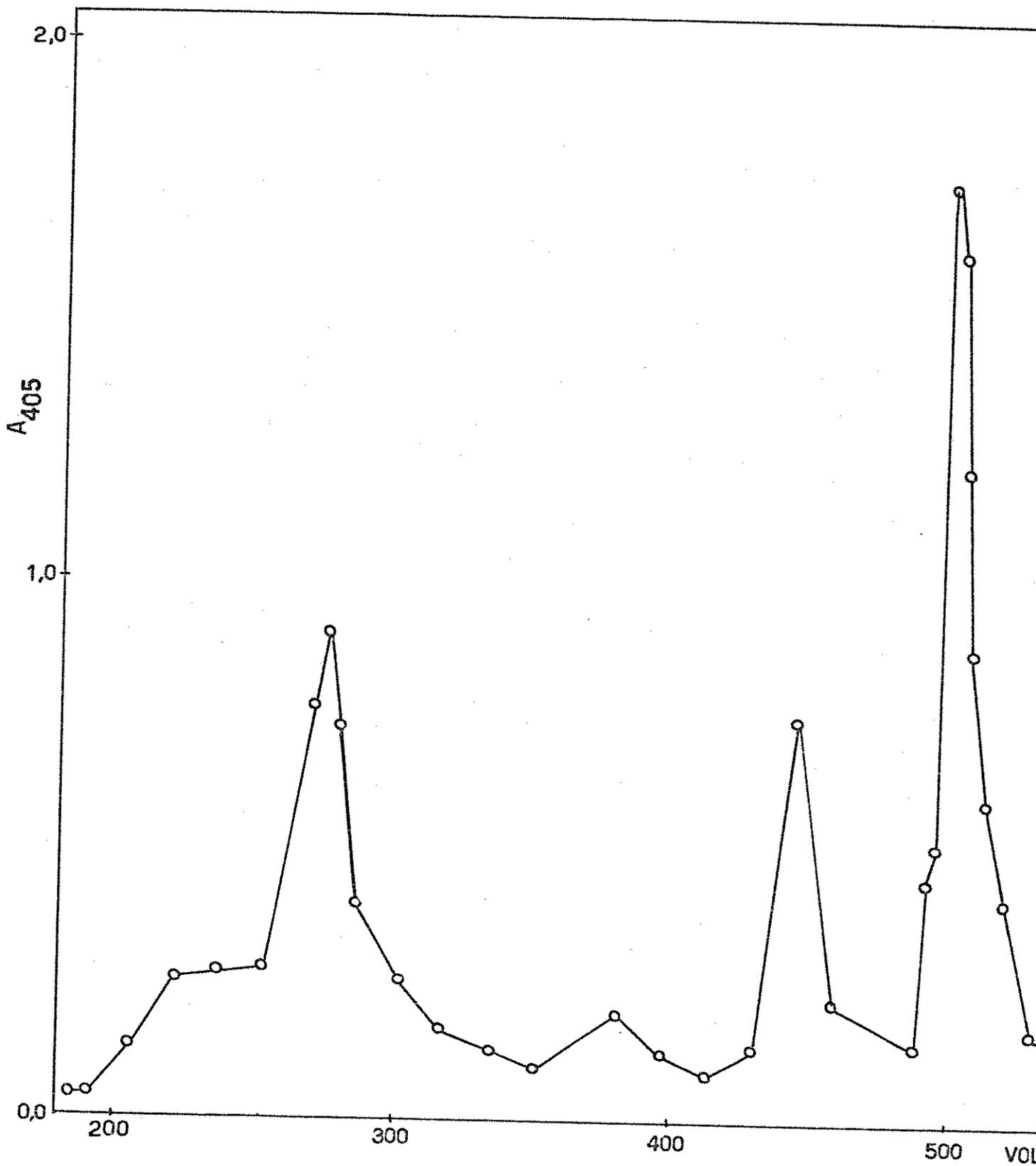


Fig.10 Cromatografia das hemoglobinas de L. miliaris em coluna de CM-celulose (19x1cm) num sistema de gradiente de pH.

de uma coluna de CM-celulose e os de L. miliaris numa coluna de DEAE Sephadex-A<sub>50</sub> num sistema de gradiente de pH, como descrito acima. Em nenhum dos casos, porém, houve separação satisfatória, razão pela qual utilizamos duas resinas diferentes para individualizar os diferentes componentes da hemoglobina das duas espécies de serpentes analisadas.

### 3.3. PROPRIEDADES DE OXIGENAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS DAS SERPENTES

#### H. modestus e L. miliaris

O estudo do efeito Bohr nas hemoglobinas de H. modestus e L. miliaris foi realizado com hemolisado total, hemolisado "stripped" e hemolisado contendo concentração saturante de ATP. Os dados de ligação da hemoglobina com oxigênio foram representados graficamente colocando num sistema de coordenadas cartesiano os valores de  $\log \bar{Y}/(1-\bar{Y})$  em ordenada e  $\log PO_2$  em abcissa. Neste gráfico, a afinidade pelo ligante é medida pelo valor de  $\log P_{50}$ , ou seja, o logaritmo da pressão ou concentração do ligante livre que corresponde a metade da saturação da hemoglobina ( $\bar{Y} = 0,5$ , portanto  $\bar{Y}/(1-\bar{Y}) = 1$ ).

Como mostram a TABELA II e Fig.11, no hemolisado "stripped" da espécie L. miliaris a curva de saturação da hemoglobina pelo oxigênio dependeu da concentração dos íons hidrogênio, enquan

TABELA II

Efeito Bohr e interação heme-heme no hemolisado "stripped" de L. miliaris e H. modestus em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M.

pH	<u>L. miliaris</u>		<u>H. modestus</u>	
	log P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	n
5,55			0,0953	1,62
6,00			0,0456	1,44
6,10	0,5060	1,34		
6,70	0,3068	1,56		
6,75			0,0416	1,66
7,00	0,0869	1,16		
7,15			-0,0178	1,24
7,50	0,0084	1,18	-0,0463	0,98
8,05	-0,1204	0,98		
8,40			-0,1804	1,01

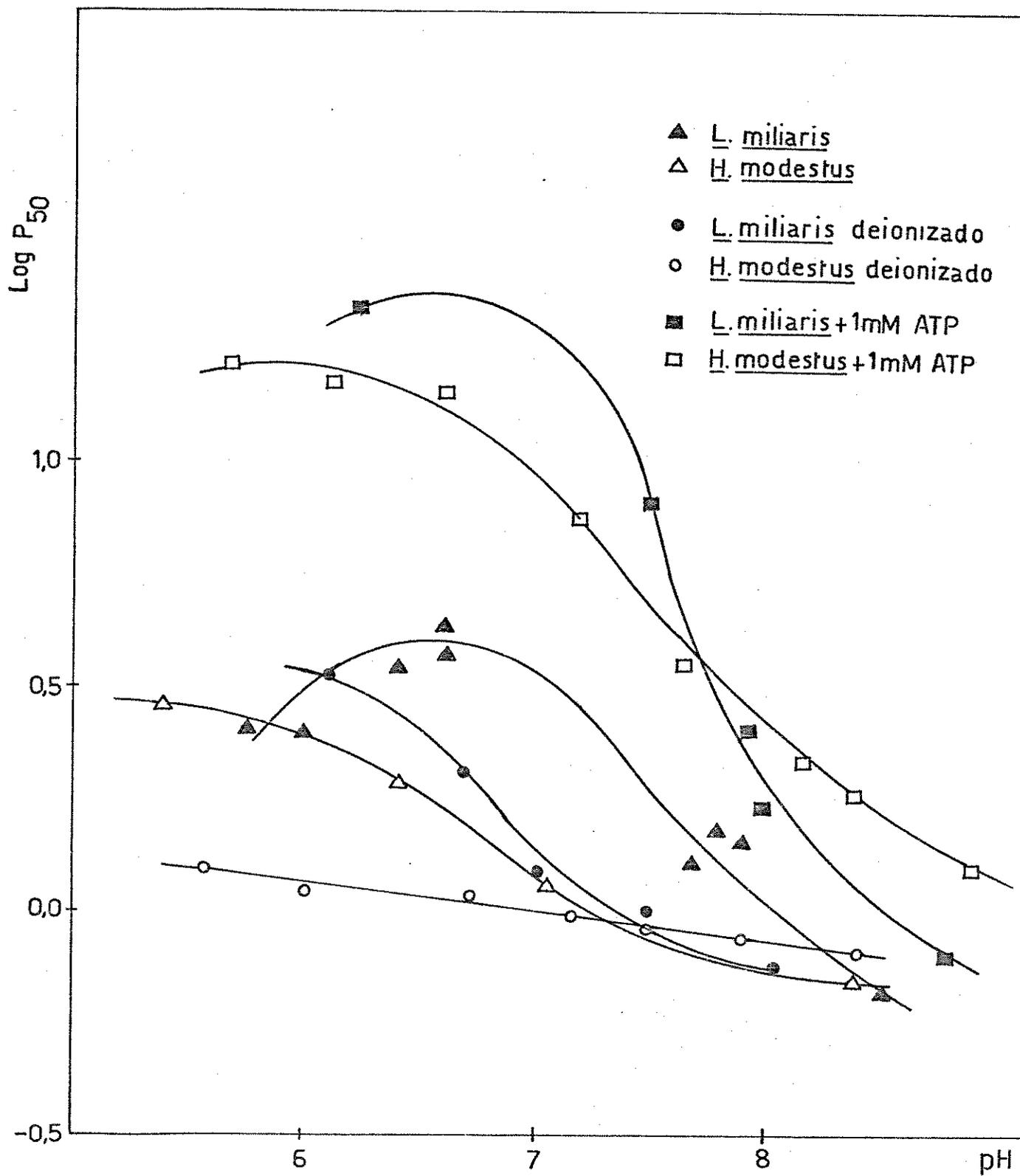


Fig.11 Efeito Bohr das hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M

to que na hemoglobina de H. modestus o efeito Bohr foi próximo de zero, sendo pois independente de pH:

Assim, a grandeza do efeito Bohr, que é expressa pelo valor de  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  foi -0,06 para H. modestus e -0,27 para L. miliaris entre pH 7,0 e 8,0.

Em ambas as espécies, o valor do coeficiente de Hill, n, que indica o grau de interação entre os sítios de ligação, variou de 0,98 a 1,60 no intervalo de pH estudado (5,6 a 8,4) e tenderam para o valor 1,0 em pH próximo a 8,0, indicando uma interação heme heme mínima, ou mesmo ausente neste pH.

### 3.4 EFEITO DO ATP SÔBRE A AFINIDADE DAS HEMOGLOBINAS DAS SERPENTES PELO OXIGÊNIO

Quando o hemolisado "stripped" estava em presença de ATP em concentração 1mM, ou seja, 20 ATP/heme(mol/mol) o valor do efeito Bohr das hemoglobinas de ambas as espécies estudadas tornou-se maior, isto é, -0,52 para H. modestus e -1,00 para L. miliaris conforme se observa na Fig.11. Ao mesmo tempo, os valores de  $P_{50}$  se revelaram mais altos indicando um efeito alostérico negativo elevado. Em pH próximo a 6,8 esse efeito foi máximo em ambas as espécies estudadas. Como observamos na TABELA II e III houve diferença

TABELA III

Efeito Bohr e interação heme-heme no hemolisado "stripped" de L. miliaris e H. modestus em presença de 1mM de ATP e tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M.

pH	<u>L. miliaris</u>		<u>H. modestus</u>	
	log P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	n
5,68			1,2283	1,35
6,10			1,1765	1,46
6,18	1,3310	1,69		
6,60			1,1525	1,55
6,75	1,3661	1,97		
7,20			0,8742	1,79
7,50	0,9030	2,19		
7,65			0,5997	1,67
7,95	0,4261	1,80		
8,00	0,2219	1,20		
8,15			0,3528	1,70
8,40			0,2671	1,66
8,80	-0,0980	1,02		
8,90			0,0898	1,54

considerável entre o grau de interação heme-heme nas hemoglobinas de ambas as serpentes em presença e em ausência do efector alostérico. Na espécie L. miliaris, o grau de cooperatividade da ligação com o oxigênio aumentou em presença de ATP e o pH ótimo para essa interação cooperativa foi próximo de 7,5 onde  $n = 2,19$  (TABELAS II e III), enquanto que na H. modestus o pH ótimo foi 7,2,  $n = 1,79$  (TABELAS II e III).

### 3.5 PROPRIEDADES DE OXIGENAÇÃO DOS HEMOLISADOS TOTAIS DOS ERITRÓCITOS

A curva do efeito Bohr no hemolisado total (TABELA IV e Fig.11) apresentou valores de  $P_{50}$  intermediarios entre os do hemolisado "stripped" e hemolisado contendo 1mM de ATP, tanto para L. miliaris como para H. modestus.

Assim os valores encontrados para o efeito Bohr entre os mesmos limites de pH (7,0 e 8,0) foi -0,2 na H. modestus e -0,5 na L. miliaris. Não houve entretanto diferença significativa no grau de interação heme-heme entre as hemoglobinas no hemolisado total e no hemolisado "stripped", em função do pH.

TABELA IV

Efeito Bohr e interação heme-heme no hemolisado total de eritrócitos de L. miliaris e H. modestus em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M ou tris-HCl 0,01M.

pH	<u>L. miliaris</u>		<u>H. modestus</u>	
	log P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	n
5,40			0,4651	1,64
6,00	0,3990	1,08		
6,40	0,5423	1,59	0,3676	1,62
6,60	0,6348	1,26		
6,62	0,5643	1,29		
7,05			0,0681	1,19
7,60	0,1248	1,19		
7,78	0,1843	1,18		
7,90	0,1601	1,19		
8,20			-0,1446	1,43
8,50	-0,1817	0,99		

### 3.6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP SÔBRE A AFINIDADE DAS HEMOGLOBINAS PELO OXIGÊNIO EM pH 6,8

Como observamos na Fig.12, quando o hemolisado "strip ped" de ambas as serpentes foi tratado por ATP em concentrações saturantes, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminuiu em quanto que o efeito Bohr aumentou, além de alterar a interação heme-heme, julgada pelos valores de  $n$ . Para se estudar o efeito da concentração do ATP sôbre a alteração da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi escolhido o pH em que o efeito alostérico desse fosfato orgânico era mais pronunciado.

Tanto na espécie H. modestus como na L. miliaris o estudo da variação da afinidade das hemoglobinas por diferentes concentrações de ATP foi feito em pH 6,8.

Conforme a TABELA V e Fig.12, nos ofídios de ambas as espécies, a concentração saturante de ATP foi em torno de 2,2 ATP/heme (mol/mol). Houve porém uma diferença acentuada nos valores de  $P_{50}$  entre as duas espécies confirmando a menor afinidade das hemoglobinas de L. miliaris pelo oxigênio nessas condições.

TABELA V

Efeito da concentração de ATP sôbre a afinidade da hemoglobina de L. miliaris e H. modestus com oxigênio em presença de tampão bis-tris-HCl 0,01M pH 6,8.

ATP/heme	<u>L. miliaris</u>		<u>H. modestus</u>	
	P <sub>50</sub> (mm Hg)	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub> (mm Hg)	log P <sub>50</sub>
0,18			3,32	0,5213
0,20	2,09	0,3293		
0,21			4,94	0,6936
0,63	4,71	0,6732		
1,63	13,48	1,1298		
1,77			6,59	0,8188
2,98			7,80	0,8921
4,22	16,80	1,2252		
4,51			10,64	1,0269
4,60			10,43	1,0183
4,78			8,98	0,9536
10,08			11,57	1,0638
10,44			10,60	1,0259
20,45			12,59	1,1005
22,73	20,05	1,3026		
25,34	19,70	1,2953		

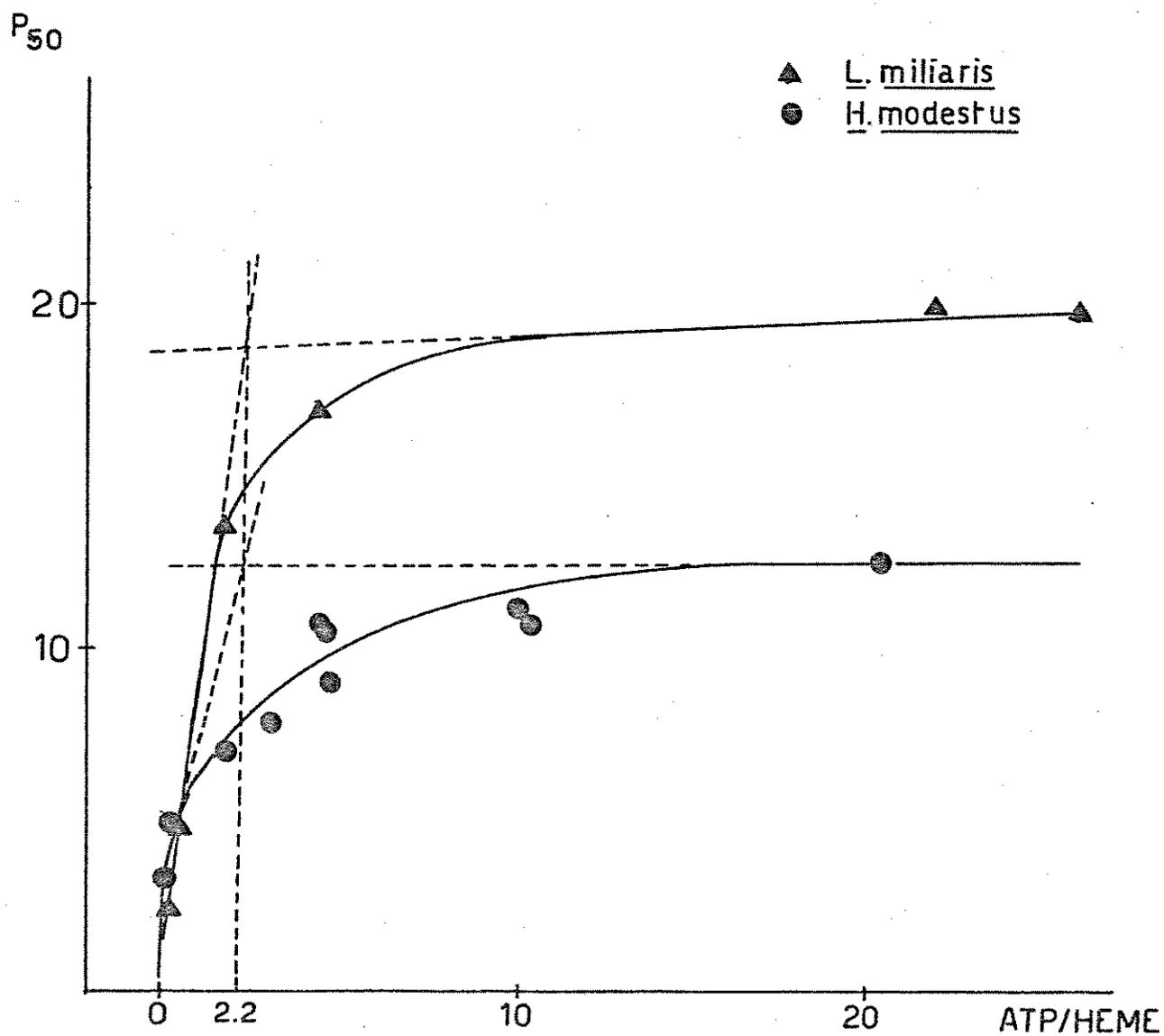


Fig.12 Efeito da concentração de ATP sôbre P<sub>50</sub> nas hemoglobi-  
nas de H. modestus e L. miliaris em presença de tampão  
bis-tris-HCl 0,01M pH 6,8

### 3.7. DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINAS, HEMATÓCRITO E NTP NO SANGUE

A concentração de hemoglobinas no sangue das duas espécies estudadas foram consideravelmente diferentes assim como o hematócrito. A espécie L. miliaris apresentou uma concentração de hemoglobina 6,74g/100ml de sangue e um hematócrito 24ml de hemácias/100ml de sangue.

A concentração de hemoglobina no sangue de H. modestus foi 9,83g/100ml de sangue e o hematócrito, 40ml de hemácias/100ml de sangue.

A dosagem de NTP no sangue foi efetuada pelo método enzimático, indicando que tanto no estado em repouso como após o estímulo, não houve alteração considerável nos níveis de nucleotídeos, mantendo-se nos limites de 2,65mM em L. miliaris e 2,84mM em H. modestus, os quais correspondem a uma razão ATP/hemoglobina, 2,51/1 e 1,84/1 respectivamente.

### 3.8. DETERMINAÇÃO DE LACTATO NO SANGUE

A determinação da concentração de lactato no sangue das serpentes foi realizada tanto com o animal em repouso como após

a estimulação até o esgotamento, isto é, período de atividade forçada de 7 minutos seguido de 8 minutos de repouso.

A L. miliaris exibiu no estado de repouso uma concentração que corresponde a 40,3mg de lactato/100ml de sangue, e após o estímulo, 228,4mg/100ml de sangue.

A H. modestus no estado de repouso não apresentou lactato estimável pelo método utilizado no sangue circulante, porém, após o estímulo, o seu nível passou a 147,0mg/100ml de sangue.

### 3.9. IDENTIFICAÇÃO DOS NTP POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Para se identificar os nucleotídeos presentes no sangue das serpentes utilizamos a técnica de cromatografia em papel de filtro Wattman nº 1, num sistema ascendente, como descrito em MÉTODOS (2.2.10). A Fig.13 mostra a presença de apenas um nucleotídeo, muito possivelmente o ATP, na espécie L. miliaris, enquanto que a H. modestus além do ATP exibiu um outro nucleotídeo, cujo Rf sugeriu tratar-se provavelmente de GTP, de acordo com os padrões cromatografados simultaneamente.

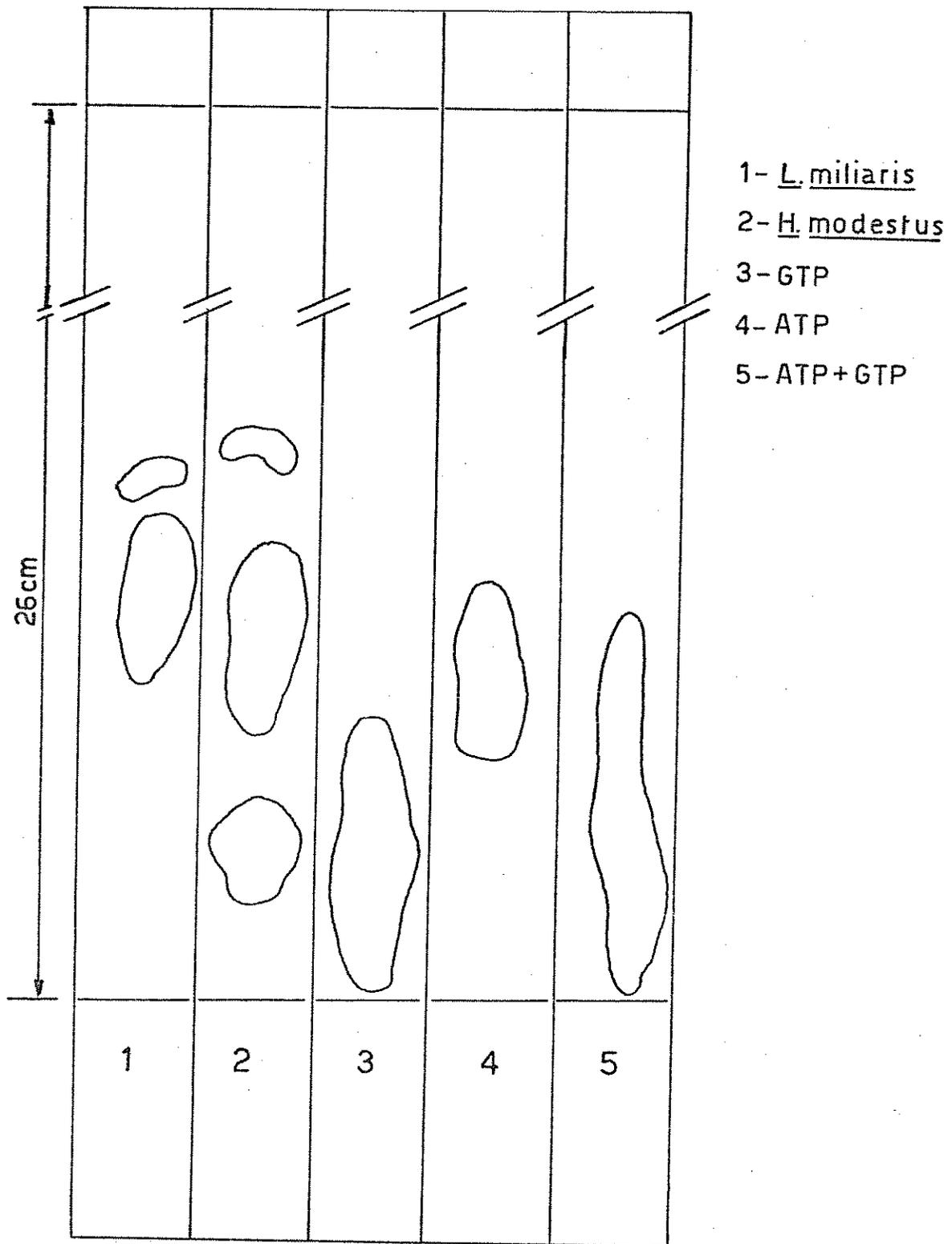


Fig.13 Identificação dos nucleosídeos trifosfatos no sangue de L. miliaris e H. modestus por cromatografia em papel.

3.10. DETERMINAÇÃO DO PÊSO MOLECULAR DAS HEMOGLOBINAS DE H. modestus e L. miliaris POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

A determinação do pêsso molecular das hemoglobinas foi efetuada a fim de verificar a possível existênciã de polímeros ou hemoglobinas dissociadas no hemolisado total.

As hemoglobinas de H. modestus e L. miliaris, obtidas como descrito na preparação do hemolisado total, apresentaram um único volume de exclusão de 625 e 630ml respectivamente conforme mostra a Fig.13. Os valores acima correspondem a  $K_{aV} = 0,252$ , tratando-se portanto de hemoglobinas homogêneas com pêsso molecular 64500 daltons.

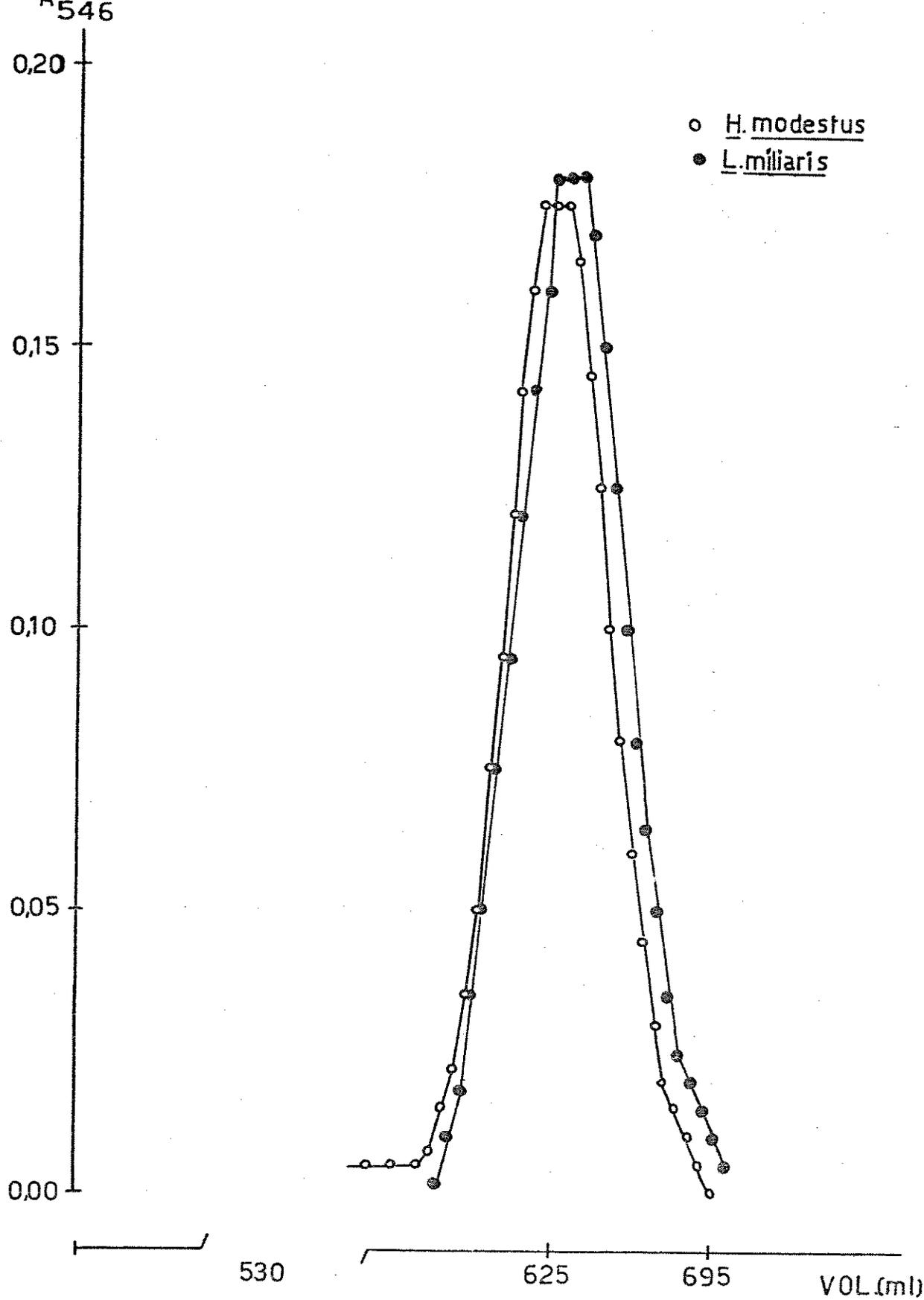


Fig.13 Cromatografia das hemoglobinas de H. modestus e L. miliaris em coluna de Sephadex G-100 (75x5cm).

#### 4. DISCUSSÃO

Resultados de diferentes pesquisadores tem mostrado cada vez mais uma correlação muito estreita entre multiplicidade de componentes de hemoglobinas e as condições ambientais em que vivem os animais. Em anfíbios, peixes e répteis esta multiplicidade é bem frequente quando comparada com mamíferos (GRATZER et al, 1960). Evidentemente este fenômeno deve conferir vantagem a esses animais no sentido de melhor adaptação às condições ambientais dos mesmos (BRUNORI et al, 1973).

Nossos estudos com hemoglobinas de H. modestus e L. miliaris por técnica de eletroforese e de cromatografia confirmam a multiplicidade de hemoglobina em ambas as espécies. Assim pela análise sistemática de indivíduos das duas espécies ficou afastada possibilidade de polimorfismo das hemoproteínas uma vez que variações individuais do perfil eletroforético não puderam ser observadas por esta técnica. Deve-se notar que este fato é mais ou menos raro entre animais selvagens, todavia nichos ecológicos relativamente restritos como os dos ofídios em estudo, devem contribuir para a aparente homogeneidade dos indivíduos destas espécies com relação às hemoglobinas.

Como ficou estabelecido em "INTRODUÇÃO" as duas serpen-

tes estudadas apresentam níveis de adaptação dos mais interessantes, tanto do ponto de vista anatômico como de atividade motora. Assim H. modestus, a mais lenta entre elas, é muito mais adaptada morfológicamente à vida aquática que a L. miliaris, serpente de movimentos rápidos e morfologia "generalizada" de serpente terrestre.

De início é possível inferir que a L. miliaris necessita de movimentos rápidos para sobreviver em ambiente para o qual não está naturalmente adaptada. Do exposto tornou-se de muito interesse o comportamento das hemoglobinas nas duas espécies principalmente em relação a sua capacidade de se combinar com oxigênio. Nossos resultados levaram a valores de  $P_{50}$  para H. modestus e L. miliaris respectivamente 1,19 e 3,31 mm de Hg em pH 7,0 demonstrando que hemoglobina de H. modestus possui maior afinidade pelo gás, visto que menores pressões parciais de oxigênio levaram a 50% de saturação das hemoglobinas pelo mesmo. Evidentemente uma maior capacidade para se combinar com o oxigênio é esperada na hemoglobina dessa espécie conquanto ela passa muito tempo submersa em meio relativamente pouco oxigenado.

Os valores de  $P_{50}$  refletem muito possivelmente os valores reais, isto é, os das hemoglobinas como elas se encontram no sangue das serpentes. Contudo maiores informações são necessárias sobre as propriedades funcionais destas proteínas uma vez que não é só a disponibilidade de oxigênio do meio que determina sua função. Alterações metabólicas, por exemplo, condicionam modificações

na sua afinidade pelo gás com consequências profundas na capacidade de oxigenação dos tecidos. Assim, quando as hemoglobinas foram tratadas de modo a eliminar a maior parte possível de substâncias que alteram sua afinidade, como fosfatos orgânicos e outros íons, os valores de  $P_{50}$  para H. modestus passou para 1,0mm de Hg enquanto que na L. miliaris o aumento de afinidade foi maior passando de 3,31 para 1,41mm de Hg em pH 7,0. Nas condições acima é possível estudar individualmente o efeito de vários ligantes sobre o equilíbrio da reação hemoglobina-oxigênio, sem interferência de outros efetores que poderiam levar a resultados pouco satisfatórios.

Sabe-se, por exemplo, de longa data que grande quantidade de ATP está presente nos eritrócitos de serpentes e outros animais (RAPOPORT et al, 1941) e de seu efeito heterotrópico sobre hemoglobinas (BENESCH et al, 1969).

No presente estudo, as hemoglobinas analisadas em presença de ATP em concentração maior que a saturante revelou que este fosfato orgânico interage com os pigmentos diminuindo sua afinidade pelo oxigênio. Assim a pressão parcial do gás que causou 50% de saturação das hemoglobinas, aumentou significativamente em presença de 1mM de ATP, e revelou valores de  $P_{50}$ , 8,91mm de Hg em H. modestus e 19,95mm de Hg em L. miliaris, em pH 7,0.

Destes resultados pode-se admitir que as hemoglobinas de L. miliaris são muito mais sujeitas à ação heterotrópica dos

nucleotídeos o que também poderia ser esperado, pois vivendo em maior abundância de oxigênio, a afinidade da hemoglobina pelo gás se tornaria mais baixa ainda pela presença do nucleotídeo, facilitando a oxigenação dos tecidos (maior descarga de oxigênio) nesta serpente com metabolismo aeróbico tecidual possivelmente elevado. Aliás, através das determinações de hemoglobina e ATP no sangue foi possível estimar um conteúdo maior de ATP por hemoglobina na L. miliaris (2,52 mol/heme) que na H. modestus (1,84 mol/heme) demonstrando que nucleotídeos devem contribuir mais para a diminuição de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio na serpente menos aquática, L. miliaris. Aliado ao grande efeito do ATP na hemoglobina desta serpente quando comparada com aquele sobre a H. modestus pode-se sugerir o substancial efeito modulador desta substância. Desta forma, a L. miliaris, serpente rápida e terrestre, vivendo em abundância de oxigênio, com metabolismo aeróbico preponderante, necessita controlar a descarga de oxigênio nos tecidos muito mais eficazmente e o faz através da afinidade baixa da hemoglobina pelo gás e do efeito alostérico negativo do ATP, sem citar os baixos valores encontrados para o hematócrito (24ml de hemácias/100 ml de sangue) e concentração de hemoglobina (6,74g/100 ml de sangue) os quais refletem na baixa capacidade de reserva de oxigênio. A H. modestus por outro lado, necessita dessa reserva para utilizá-la durante o mergulho, razão pela qual suas hemoglobinas devem ter-se adaptado aumentando a concentração (9,83g/100ml

de sangue) e o hematócrito ( 40ml de hemácias/100ml de sangue).

Evidentemente devido a sua grande atividade motora, a L. miliaris necessitaria maior oxigenação nos tecidos que proporcionaria maior rendimento energético em forma de ATP, que por sua vez facilitaria mais ainda a oxigenação tecidual. É interessante observar que embora a hemoglobina tanto de H. modestus como de L. miliaris possua o mesmo número de sítios para NTP (cerca de 2mol/heme), seu efeito heterotrópico sobre a hemoglobina de H. modestus é menor ( Figura 12).

Um outro ponto interessante em relação aos nucleotídeos presentes no sangue das serpentes é o fato da H. modestus conter tanto ATP quanto GTP nas hemácias enquanto que em L. miliaris só o ATP pode ser encontrado por cromatografia em papel, do hemolizado tratado. O quanto estes nucleotídeos possam contribuir em conjunto para regular a afinidade da hemoglobina de H. modestus pelo oxigênio será objeto de investigações futuras.

Os nucleotídeos GTP e ATP estão presentes em alta concentração em hemácias de peixes (BARTLETT, 1976), porém a sua presença em sangue de répteis é incomum, visto que, apenas ATP tem sido evidenciado em suas hemácias. Além do ATP somente o IHP foi detectado em uma espécie de tartaruga Chelydra serpentina ( SULLIVAN, 1974).

Embora o NTP tenha influência decisiva na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, outros fatores heterotrópicos também o

tem, e entre eles a concentração hidrogeniônica é das mais importantes. Neste contexto o chamado efeito Bohr que representa a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em função do pH é parâmetro relevante na avaliação da capacidade funcional dos pigmentos respiratórios nas mais variáveis condições de meio interno. As hemoglobinas de H. modestus apresentaram baixo efeito Bohr,  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  da ordem de -0,2 entre pH 7,0 e 8,0, enquanto que as de L. miliaris, serpente mais terrestre, apresentaram maior efeito, da ordem de -0,5. Estes dados por si, já sugerem que a espécie mais aquática sofre variações menos bruscas na sua capacidade de ligar oxigênio que a menos aquática, indicando que a H. modestus suporta variações de pH sem grande alteração nos valores de  $P_{50}$  das hemoglobinas. É interessante observar que na ausência de íons e pequenas moléculas que reconhecidamente alteram o efeito Bohr, os valores encontrados no hemolisado diminuíram, isto é, passaram de -0,2 para -0,06 na H. modestus e de -0,5 para -0,27 na L. miliaris. Estes resultados permitem inferir que "in vivo" as hemoglobinas desses ofídios por vários motivos e entre eles por efetores heterotrópicos, se encontram adaptados para melhor suportar as variações do meio interno.

Partindo-se da premissa que os NTP devem contribuir substancialmente para os valores do efeito Bohr encontrados nas hemácias, fizemos determinações desse efeito nas duas serpentes em presença de concentrações saturantes de ATP; nossos resultados revelaram que nestas condições as hemoglobinas de H. modestus passaram a

ter  $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = -0,27$  e as de L. miliaris  $-1,0$  demonstrando que na espécie mais rápida e mais terrestre, o ATP tem efeito heterotrópico muito mais acentuado, o que está de acordo com o metabolismo aeróbico da L. miliaris.

Neste contexto pode-se resumir os nossos resultados da seguinte forma: a L. miliaris, serpente rápida e terrestre possui alto efeito Bohr, sendo acentuado por ATP, enquanto a H. modestus, aquática e lenta tem efeito Bohr próximo a zero com acentuação não tão dramática pela presença do nucleotídeo.

Correlacionados com estes achados estão outros, como por exemplo, os níveis de lactato no sangue destes ofídios. A L. miliaris quando excitada mecanicamente tem seus níveis de ácido láctico bastante elevados, cerca de 230mg/100ml de sangue; na H. modestus estes são bem inferiores, cerca de 150mg/100ml de sangue.

Nestas condições, a espécie aquática pouco ativa mostra-se pouco excitável permanecendo em relativa tranquilidade durante a experiência, enquanto que a L. miliaris é bastante irritável e por excitação mecânica torna-se muito agitada, o que reflete nos níveis elevados que alcança o ácido láctico do sangue. Evidentemente esta última está sujeita a condições mais frequentes de acidose, e a oxigenação dos tecidos não estaria prejudicada pelo abaixamento do pH uma vez que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminuiria e sua liberação para os tecidos estaria facilitada.

A H. modestus, todavia, não suportaria tanto um abaixamento do pH sanguíneo causado pelo ácido lático, mas em contrapartida não haveria necessidade de suportá-lo pois esta situação seria de relativa raridade para a serpente.

É interessante notar que os nossos dados corroboram aqueles encontrados por RUBEN (1976), em que serpentes mais ativas apresentaram maior consumo de oxigênio e quando estimuladas recorreram a anaerobiose, aumentando a concentração de lactato a níveis mais elevados do que as espécies mais lentas estudadas pelo autor.

Quanto à afinidade das hemoglobinas pelo oxigênio, os nossos achados confirmam os dados da maioria dos pesquisadores que correlacionaram afinidade e comportamento de ofídios, os mais lentos tendem a exibir maior afinidade pelo gás (JOHANSEN et al, 1972; SEYMOUR et al, 1975). Altos níveis de atividade estão correlacionados com intenso transporte de oxigênio em lagartos (BENNETT, 1972). Desde que o transporte de oxigênio é facilitado pela diminuição da afinidade pelo gás, o animal mostrará alta capacidade ao metabolismo aeróbico.

O efeito Bohr é outro parâmetro que se relaciona com as necessidades respiratórias dos animais (RIGGS, 1976). De acordo com os autores, ANDERSEN (1966) e LENFANT et al (1970), esse efeito é vantajoso aos animais mergulhadores pois favorece a libera-

ção do oxigênio mesmo em alta  $PO_2$  no sangue circulante. Essa afirmação, contudo, parece difícil ser aplicada ao nosso caso, pois a H. modestus, espécie mais aquática, apresentou efeito Bohr menor do que a L. miliaris. Entretanto, os dados sobre serpentes são contrastantes (SULLIVAN et al, 1971). Por outro lado, JOHANSEN et al (1976), sugeriram que nenhuma característica de adaptação quanto ao efeito Bohr é detectável em mamíferos mergulhadores.

Os valores do coeficiente de Hill foram pequenos (TABELAS II, III e IV) quando comparados com de outras serpentes (SULLIVAN, 1974) e não se alteraram em grande proporção em função do pH, indicando que as interações homotrópicas não são tão importantes quanto as heterotrópicas.

A capacidade de oxigenação (GREENWALD, 1971) e concentração de hemoglobina (SHEELER et al, 1965) são diretamente proporcionais ao hematócrito, a menos que grande número de células imaturas estejam presentes no sangue circulante. Assim o alto valor do hematócrito bem como da concentração de hemoglobina do sangue de H. modestus sugerem que seus pigmentos respiratórios, além da função transportadora de oxigênio, poderiam servir também como reservatório do mesmo (MANWELL, 1960). O oxigênio armazenado seria então utilizado durante o mergulho, razão pela qual essa espécie resiste por tempo prolongado submerso em meio pobre do gás.

Os nossos resultados sugerem fortemente que as hemoglo-

binas de ambas as espécies de serpentes, H. modestus e L. miliaris, estão fisiologicamente adaptadas ao ambiente em que vivem, assim como ao modo de vida desses répteis, poupando ao máximo, o consumo de oxigênio através das diferenças nas propriedades funcionais desses pigmentos respiratórios.

## RESUMO

Algumas propriedades estruturais e funcionais em duas espécies de serpentes de hábitos semi-aquáticos, H. modestus e L. miliaris que apresentam diferentes graus de adaptação a esse ambiente foram examinados. Os hemolisados totais de ambos os ofídios apresentaram três componentes tanto por eletroforese como por cromatografia.

O estudo das propriedades funcionais de suas hemoglobinas revelou diferenças fundamentais: a afinidade pelo oxigênio foi maior na H. modestus enquanto que o efeito Bohr da L. miliaris exibiu valores mais elevados entre pH 7,0 e 8,0. O coeficiente de Hill, n, que reflete a interação heme-heme não se modificou em grande proporção, em função do pH em ambas as espécies e seus valores foram relativamente pequenos quando comparados com os de outras serpentes (SULLIVAN, 1974).

Os fosfatos orgânicos interagiram com as hemoglobinas de ambas as serpentes diminuindo sua afinidade pelo oxigênio, aumentando o efeito Bohr e alterando a interação heme-heme. A concentração saturante de ATP/heme foi aproximadamente 2,2 (mol/mol) em ambas as espécies embora o efeito do ATP na concentração maior que a saturante sobre a afinidade pelo oxigênio fosse mais acentuado em L. miliaris.

Os dois ofídios recorreram a anaerobiose quando estimulados, e nessas condições, o nível de lactato no sangue circulante foi maior em L. miliaris.

Finalmente foram discutidos os diferentes graus de adaptação funcional das hemoglobinas correlacionados ao habitat e atividade das espécies em estudo.

## 6. SUMMARY

Some structural and functional properties of two kind of water snakes H. modestus and L. miliaris, which show different degree of adaptation to the environment were analysed.

The hemolysate of both kind of snakes showed three components when analysed by either electrophoresis or chromatography.

Important points came out from the study of functional properties of their hemoglobin: thus, the oxygen affinity of H. modestus, the aquatic specie presented higher values than that of L. miliaris, although concerning the Bohr effect this species showed low value close to zero between pH 7,0 and 8,0.

The Hill coefficient did not show considerable variations with the pH in the snakes and their values were small compared with other species of snakes.

Organic phosphates interacted with hemoglobin of both kind of snakes decreasing their oxygen affinity, increasing the Bohr effect and changing the Hill coefficient values. The ATP/heme saturant concentration was apparently 2,2 (mol/mol) in both species of snakes though the effect of excess ATP on the oxygen affinity was more pronounced in L. miliaris.

Upon stimulation both snakes increased their anaerobic metabolism according to the high blood lactate level found which

was more pronounced in L. miliaris.

Finally the different degree of functional adaptation of hemoglobin related to the habitat and the activity of both kind of snakes were discussed.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN H. T. (1966) Physiological adaptations in diving vertebrates. Physiol. Rev. 46: 212-243.
- ANTONINI E. & BRUNORI M. (1971) The equilibrium of hemoglobin and myoglobin with ligands. In: Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands (Edited by NEUBERGER A. & TATUM E. L.) pp. 153-186. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. London.
- ANTONINI E. & BRUNORI M. (1966) Apud ANTONINI E. & BRUNORI M. (1971).
- ANTONINI E., WYMAN J., BRUNORI M., FRONTICELLI C., BUCCI E. & ROSSI-FANELLI (1965) Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. V. The influence of temperature on the Bohr effect in human and in horse hemoglobin. J. Biol. Chem. 240: 1096-1103.
- ARNONE A. (1972) X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human desoxyhaemoglobin. Nature 237: 146-149.

- BARTLETT G. R. (1976) Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. Comp. Physiol. 55A: 211-214.
- BENESCH R. & BENESCH R. E. (1969) Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. Nature 221: 618-622.
- BENESCH R. & BENESCH R. E. (1967) The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26: 162-166.
- BENNETT A. F. & LICHT P. (1972) Anaerobic metabolism during activity in lizards. J. Comp. Physiol. 81: 277-288.
- BENNETT A. F. (1973) Blood physiology and oxygen transport during activity in two lizards, Varanus gouldii and Sauromalus hispidus. Comp. Biochem. Physiol. 46A: 673-690.
- BENNETT A. F. & DAWSON W. R. (1976) Metabolism. In: Biology of the Reptilia (Edited by GANS, C. & DAWSON W. R.) Vol. V. pp. 127-223. Academic Press, London.

- BOHR C. K., HASSELBALCH & KROGH A. (1904) Ueber einen in biologischer beziehung wichtigen einfluss, den die kohlen-  
" säurespannung des blutes auf dessen säuerstoffbindung übt.  
Skand. Arch. Physiol. 16: 402.
- BOLTON W., COX M. J. & PERUTZ M. F. (1968) Structure and function of haemoglobin. J. Mol. Biol. 33: 283-297.
- BOLTON W. & PERUTZ M. F. (1970) Tridimensional Fourier Synthesis of horse desoxyhaemoglobin at 2,8A resolution.  
Nature 228: 551-552.
- BRUNORI M., BONAVENTURA C., GIARDINA B., BOSSA F. & ANTONINI E. (1973) Hemoglobins from trout: structural and functional properties. Molec. Cell. Biochem. 1: 189-196.
- BÜCHER T., BEISENHERZ G., BOLTZE H. J., CZOK R., GARBADE K. H., MEYER-ARENDE E. & PFLEIDERER G. Z. (1953) Apud LAMPRECHT W. & TRAUTSCHOLD I. (1965)
- CHANUTIN A. & CURNISH R. (1967) Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.  
Arch. Biochem. Biophys. 121: 96.

- CATÁLOGO P-L BIOCHEMICALS, inc. (1973) pp. 11.
- CHRISTIANSEN J., DOUGLAS C. C. & HALDANE J. S. (1914) The adsorption and dissociation of carbon dioxide by human blood. J. Physiol., 48: 244-277.
- CULLIS A. F., MUIRHEAD H., PERUTZ M. F. & ROSSMAN M. G. (1962) Three-dimensional Fourier synthesis at 5,5A resolution - description of the structure. Proc. Roy. Soc. B. 56: 161.
- DESSAUER H. C. (1970) Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In: Biology of the Reptilia (Edited by GANS C.) Vol. III pp. 1-72. Academic Press, London New York.
- GRATZER W. & ALLISON A. (1960) Multiple haemoglobins. Biol. Rev. 459-503.
- GREENWALD O. E. (1971) The effect of temperature on the oxygenation of gopher snake blood. Comp. Biochem. Physiol. 40A: 865-870.
- HENDERSON L. J. (1920) The equilibrium between oxygen and carbonic acid in blood. J. Biol. Chem. 41: 401-430.

HILL R. J., KONIGSBERG W., GUIDOTTI G. & CRAIG L. C. (1962)

The structure of human hemoglobin. I. The separation of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains and their amino acid composition. J. Biol. Chem. 237: 1549.

JOHANSEN K. & LENFANT C. (1972) A comparative approach to the

adaptability of  $O_2$ -Hb affinity. In: Oxygen Affinity of Hemoglobin and Red Cell Acid-base Status (Edited by RORTH M. & ÅSTRUP P.) Alfred Benson Symposium, Muncksgaard, Copenhagen.

JOHANSEN K. & WEBER R. E. (1976) On the adaptability of

haemoglobin function to environmental conditions. In: Perspectives in Experimental Biology (Edited by SPENCER DAVIES P.) Vol. I pp. 219-234. Pergamon Press. Oxford.

KENDREW J., DICKERSON R., STANDBERG B., HART R., DAVIES D.

PHILLIPS D. & SHORE V. (1960) Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2A resolution. Nature 185: 422.

KEILIN D. & HARTREE E. F. (1951) Purification of horse radish

peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. Addendum - Determination of sedimentation and diffusion constants of horse radish peroxidase. Biochem. J. 49: 88-106.

- KILMARTIN J. V. & ROSSI-BERNARDI L. (1973) Interaction of hemoglobin with hydrogen, ions, carbon dioxide and organic phosphates. Physiol. Rev. 46: 836-890.
- LAMPRECHT W. & TRAUTSCHOLD I. (1965) Adenosine-5'-triphosphate -Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Methods of Enzymatic Analysis (Edited by BERGMAYER H. U.) 2<sup>o</sup> ed. Verlag Chemie. Academic Press, pp. 543-551. New York. London.
- LENFANT C., JOHANSEN K., PETERSEN J. A. & SCHMIDT-NIELSEN K. (1970) Respiration in the fresh water turtle, Chelys fimbriata. Resp. Physiol. 8: 261-275.
- MANWELL C. (1960) In: Comparative Physiology: Blood Pigments. A. Rev. Physiol. 22: 191-244.
- MANWELL C. (1964) Chemistry genetic, and function of invertebrate respiratory pigments - configurational changes and allosteric effects. In: Oxygen in the Animal Organism (Edited by DICKENS F., NEIL E. & WIDDAS W. F.) pp. 49-119. Pergamon Press. London.

- MARBACH E. P. & WEIL M. H. (1967) Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Clin. Chem. 13: 314.
- MCCUTCHEON F. H. (1947) Specific oxygen affinity of hemoglobin in elasmobranchs and turtle. J. Cell. Comp. Physiol. 29: 333-344.
- McMENAMY R. H. (1964) A proposed mechanism for the Bohr effect. J. Mol. Biol. 9: 781-784.
- MUIRHEAD H. & PERUTZ M. F. (1963a) Structure of haemoglobin. A three dimensional Fourier synthesis of reduced human haemoglobin at 5,5A resolution. Nature 199: 633.
- MUIRHEAD H. & PERUTZ M. F. (1963b) Structure of reduced human hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 451.
- MUIRHEAD H., COX M., MAZZARELLA L. & PERUTZ M. F. (1967) Structure and function of hemoglobin. III. A three dimensional Fourier synthesis of human desoxyhemoglobin at 5,5A resolution. J. Mol. Biol. 28: 117-156.

MUIRHEAD H. & GREER H. (1970) Three dimensional Fourier synthesis of human desoxyhaemoglobin at 3,5A resolution. Nature 228: 516-519.

NOBLE B. & RIGGS A. (1976) In: Alpha Helix IV, Expedition. "Comunicação pessoal",

PERUTZ M. F., MUIRHEAD H., COX J. M. & GOAMAN L. C. G. (1968) Three dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2,8A resolution: II. The atomic model. Nature 219: 131-139.

PERUTZ M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Haem-haem interaction and the problem of allostery. The Bohr effect and combination with organic phosphates. Nature 228: 726-739.

POULIK M. D. (1957) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature 180: 1477-1479.

RAPOPORT S. & GUEST G. (1941) Distribution of the acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. J. Biol. Chem. 138: 269-282.

RIGGS A. (1959) Molecular adaptation in haemoglobin: nature of the Bohr effect. Nature 183: 1037-1038.

RIGGS A. (1976) Factors in the evolution of hemoglobin function. Fedn. Proc. 35: 2115-2118.

ROMER A. (1966) In: Vertebrate Paleontology. 3<sup>rd</sup> ed. Univ. of Chicago Press, Chicago. pp. 468.

ROSSI-BERNARDI L. & ROUGHTON F. J. W. (1967) The effect of temperature on the oxygen - linked ionizations of hemoglobin. J. Biol. Chem. 242: 784-792.

RUBEN J. A. (1976) Aerobic and anaerobic metabolism during activity in snakes. J. Comp. Physiol. 109: 147-157.

SCHWERT G. W., MILLAR D. B. S. & TAKENAKA Y. (1962) Preparation of crystalline lactic dehydrogenase from beef heart. J. Biol. Chem. 237: 2131-2134.

Seymour R. S. & WEBSTER M. E. D. (1975) Gas transport and blood acid-base balance in diving sea snakes. J. Exp. Zool. 191: 169-182.

SEYMOUR R. S. (1976) Blood respiratory properties in a sea snake and land snake. Aust. J. Zool. 24: 313-320.

SHEELER P. & BARBER A. A. (1965) Reticulocytosis and iron incorporation in the rabbit and turtle: a comparative study. Comp. Biochem. Physiol. 11: 139-145.

SULLIVAN B. (1974) Reptilian hemoglobin. In: Chemical Zoology (Edited by FLORKIN M. & BADLEY T.) Vol. IX pp. 377-398. Academic Press. New York.

SULLIVAN B. & RIGGS A. (1967b) Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. III. oxygenation properties. Comp. Biochem. Physiol. 23: 459-474.

SULLIVAN B. & RIGGS A. (1971) Data for constructing blood oxygen dissociation curves, In: Respiration and Circulation (Edited by ALTMAN P. L. & DITMER D. S.) Part. IV, pp. 189-191. F. A. S. E. B. Maryland.

WYMAN J. Jr. (1948) Heme proteins. In: Advances in Protein Chemistry (Edited by ANSON M. L. & EDSALL J. T.) Vol. IV pp. 410-531. Academic Press, New York.

WYMAN J. Jr. (1964) Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: a second look. In: Advances in Protein Chemistry (Edited by ANFINSON C. B. Jr., ANSON M. L., EDSALL J. T. & RICHARDS F. M.) Vol. XIX pp. 223-286. Academic Press, New York.