

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MUDANÇAS CONFORMACIONAIS DE HEMOGLOBINAS DE SERPENTES SEMI-AQUÁTICAS *Helicops modestus* E *Liophis miliaris*, POR MODULADORES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS.

TESE DE DOUTORAMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. ALDO FOCESI JR.

SATIE HATSUSHIKA OGO

- 1982 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, esposo e filhos,
nosso agradecimento pelo estímulo,
compreensão e segurança que
transmitiram, principalmente nos
momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. nosso
profundo reconhecimento e gratidão
pelo apoio, incentivo e confiança
que despertaram nosso interesse pe
la ciência e sobretudo pela amiza
de e dedicação com que orientou
esta tese.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas; ao Prof. Dr. Clodowaldo Pavan, DD. Diretor do Instituto de Biologia; ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Prof. Titular do Depto. de Histologia; ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, chefe do Depto. de Bioquímica pelo apoio no desenvolvimento das pesquisas realizadas neste departamento.

Aos Professores Dr. Ibrahim Felipe Heneine, Prof. Titular do Depto. de Fisiologia e Biofísica - Universidade Federal de Minas Gerais, Dr. Arno Rudi Schwantes, Prof. Titular do Depto. de Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Carlos, Dr. Pierre Charles Georges Montouchet, Prof. Assistente Doutor do Depto. de Zoologia - UNICAMP, pela análise criteriosa deste trabalho e sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. Paulo de Toledo Artigas, Prof. Titular do Depto. de Parasitologia - UNICAMP, pelo espírito de colaboração científica, doação e classificação das serpentes utilizadas neste trabalho.

Aos Professores Dr. Anibal Eugênio Vercesi, Dra. Lúcia Pereira da Silva Airoidi, Dra. Nilce Correa Meirelles, Professores Colaboradores do Depto. de Bioquímica - UNICAMP, pela revisão da presente tese, com muitas sugestões úteis e acima de tudo pela amizade e espírito de colaboração que têm demonstrado.

À Professora Maria Sumiko Arita Matsuura do Depto. de Bioquímica - UNICAMP, pela valiosa colaboração científica, atenção e sugestões que nos auxiliaram de muitas maneiras.

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

À Sra. Anna Gagliardi, Bibliotecária-chefe do Instituto de Biologia - UNICAMP, pela atenção e esmero na revisão e organização das referências bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisa, pelo apoio recebido.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Biologia UNICAMP, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A B R E V I A T U R A S

ADP - Adenosina 5'-difosfato

AMP - Adenosina 5'-monofosfato

ATP - Adenosina 5'-trifosfato

Bis-tris - Bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil) metano

CM-celulose - Carboximetil-celulose

DEAE-Sephadex - Dietilamino-etil-Sephadex

2,3DPG - 2,3 dífosfoglicerato

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

GTP - Guanosina 5'-trifosfato

IHP - Inositol hexafosfato

IPP - Inositol pentafosfato

NTP - Nucleosídeo trifosfato

PCMB - Para-cloromercuribenzoato

4-PDS - 4-4' dipiridinodissulfeto

4-TP - 4-tiopiridona

TCA - Ácido tricloracético

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

Tris - Tris (hidroximetil)-amino metano

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	12
Material biológico	12
Preparo do hemolisado total e do hemolisado isento de íons orgânicos e inorgânicos	12
Determinação do pH isoiônico	13
Eletroforese em disco de poliacrilamida	14
Focalização isoeletrica em disco de poliacrilamida ...	16
Separação de componentes de hemoglobina por focali- zação isoeletrica em gradiente de sacarose	17
Imunodifusão dupla	19
Determinação de grupos sulfidrilas reativos de hemoglobina com 4-PDS	20
Cinética de reação de grupos sulfidrilas reativos de hemoglobina com 4-PDS	22
Propriedade de ligação do ligante oxigênio	23
Determinação de nucleotídeos em eritrócitos	25
Efeito de agentes desnaturantes sobre hemoglobina ...	27
 RESULTADOS	
Separação de componentes, determinação de pH isoeletricos em disco de poliacrilamida e determinação de pH isoiônico	29
Separação de componentes de hemoglobina por	

focalização isoelétrica em gradiente de sacarose	29
Imunodifusão dupla	31
Determinação de grupos sulfidrilas reativos das hemoglobinas com 4-PDS	35
Cinética de reação de grupos tióis reativos das hemoglobinas com 4-PDS	38
Equilíbrio da hemoglobina com oxigênio	40
Identificação de nucleotídeos em eritrócitos	49
Efeito de agentes desnaturantes sobre hemoglobina	50
DISCUSSÃO	56
RESUMO	70
SUMARY	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

I N T R O D U Ç Ã O

Os conhecimentos atuais sobre a estrutura tridimensional da hemoglobina, bem como os mecanismos envolvidos em sua função, resultam praticamente de estudos em hemoproteínas de mamíferos pois, somente mais recentemente, é que estudos em pigmentos respiratórios de vertebrados inferiores tem despertado interesse. Como resultado, o conhecimento das propriedades de tais moléculas nesses animais é ainda relativamente escasso sendo contudo, de grande interesse pois, não só permite a comparação com o que se conhece sobre hemoglobinas de mamíferos, mas pode ainda fornecer informações sobre os mecanismos pelos quais cada espécie tem se desenvolvido para satisfazer suas necessidades respiratórias individuais. Por outro lado, hemoglobinas de animais inferiores podem fornecer modelos para estudos de correlação entre estrutura e função, graças às propriedades peculiares encontradas em algumas de tais proteínas.

As necessidades respiratórias de vertebrados inferiores variam muito de acordo com o meio onde eles vivem; esse fato dá origem a várias adaptações interessantes como acontece, por exemplo, com um peixe da Antártica, *Antarctic chaenichthyidae*, que possui sangue incolor, desprovido de hemoglobina, uma vez que o requerimento de oxigênio para satisfazer as necessidades metabólicas é tão baixo que a presença do pigmento se torna desnecessária, pois oxigênio dissolvido fisicamente é suficiente para atender sua finalidade (RUUD, 1954). Evidentemente esse caso extremo não invalida a afirmação de ser o transporte de oxigênio pela hemoglobina do sangue, essencial para a vida de todos os vertebrados.

Observações sobre a composição química e propriedades funcionais das hemoglobinas de vários vertebrados (anfíbios, peixes, répteis e aves) indicam que basicamente tais moléculas são semelhantes às dos mamíferos, porém cada vertebrado pode apresentar características que lhe são peculiares. Neste contexto, o grupo prostético, heme, é provavelmente identico em todas as hemoglobinas, de modo que as diferenças entre elas devem ser conferidas pelas cadeias polipeptídicas e suas interações no tetrâmero (ANSON et alii, 1924; KORZHUEV & KRUGLOVA, 1957; RAMIREZ & DESSAUER, 1957). De fato, as propriedades do pigmento podem ser influenciadas por pequenas alterações nas cadeias polipeptídicas como por exemplo, no caso clássico de anemia falciforme em que a substituição de um amino ácido pode converter hemoglobina humana normal em hemoglobina S (siclemia) (INGRAM, 1961). Dessa forma é possível que existam diferentes tipos de hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais numa grande variedade de vertebrados, devido a variabilidade que possa ocorrer na globina, sem contudo, a hemoglobina perder sua identidade funcional principal.

O transporte de oxigênio, função primária da hemoglobina, depende de sua capacidade de se combinar reversivelmente com o gás (ANTONINI & BRUNORI, 1971). Do ponto de vista fisiológico, os parâmetros que influenciam o equilíbrio da hemoglobina pelo oxigênio são: i) forma da curva de dissociação do oxigênio, que pode se apresentar sigmóide, hiperbólica ou ondulante; ii) efeito de pH ou CO_2 (efeito Bohr); iii) afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, usualmente expresso em termos de pressão de oxigênio necessária para oxigenar 50% da proteína (P_{50} ou $P_{1/2}$); iv) temperatura; v) interação com moduladores heterotrópicos, íons e moléculas existentes nas hemácias que

podem alterar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; a evolução ontogênica de tais substâncias pode desempenhar papel básico na determinação da adaptação funcional. Esses cinco parâmetros determinam a quantidade de oxigênio transportado pela hemoglobina (RIGGS, 1970).

Comparando os resultados disponíveis na literatura, SMITH et alii, 1966, concluíram que os mecanismos que controlam a reação de oxigenação nas hemoglobinas de vertebrados em geral são os mesmos e propuseram que essas hemoproteínas estão rigorosamente adaptadas às necessidades respiratórias de cada espécie, de sorte que animais completamente aquáticos teriam adaptações funcionais e estruturais mais profundas do que as denominadas espécies semi-aquáticas, em resposta às demandas respiratórias num meio pobre em oxigênio. Assim, répteis, anfíbios, bem como peixes, geralmente tem grande multiplicidade de componentes de hemoglobina quando comparados com mamíferos (RIGGS, 1970); isto poderia refletir alguns fatores fisiológicos importantes relacionados com a vantagem que tal multiplicidade pode conferir ao animal em resposta às alterações ambientais (BRUNORI et alii, 1973b). Também os animais poiquiloterms estão constantemente sujeitos à grande variabilidade de temperatura e pressão de oxigênio ambiental e assim, é possível que as hemoglobinas sejam selecionadas de forma que tenham diferentes propriedades ou talvez, em decorrência da considerável oscilação da velocidade metabólica, os animais necessitem de hemoglobinas múltiplas com propriedades funcionais também múltiplas (RIGGS, 1970).

A grande diversidade de animais encontrada entre os répteis, torna esse grupo de grande utilidade para se estudar adaptações fisiológicas de suas hemoglobinas. Em nenhum ou-

tro grupo de vertebrados encontra-se tal variedade de "habitat", atividade e metabolismo. Flutuações na pressão osmótica, pH e composição de eletrólitos do sangue que seriam letais para outros vertebrados, são perfeitamente normais para muitos répteis (WOOD & LENFANT, 1976).

Diversos pesquisadores chamam a atenção na correlação que existe entre metabolismo em estado fisiológico e o modo de vida dos répteis (BENNET, 1973; BENNET & DAWSON, 1976), porém continuam escassas as informações sobre esta correlação entre as serpentes (OGO, 1977). Entretanto esse grupo de réptil é particularmente interessante visto que dos vertebrados terrestres, os ofídios sofreram as mais extensas adaptações em contraste com a extinção ou aparente estagnação evolucionária de muitos répteis (ROMER, 1966). Existem cerca de 300 gêneros, e 2700 espécies de serpentes, sendo dois terços pertencentes ao grupo Colubridae (RUBEN, 1976). Estas ocorrem nos mais variados "habitat" quais sejam, fossial, arboreal, terrestre ou aquático e exibem comportamentos variados durante predação e defesa e como fontes de energia para atividade, metabolismo aeróbico e anaeróbico (RUBEN, 1976).

Tem sido nossa preocupação há alguns anos, estudos de propriedades funcionais de hemoglobinas de duas espécies de serpentes pertencentes ao grupo Colubridae: *Helicops modestus* Günther, 1861 e *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758), relacionando-as com o "habitat" e comportamento, e a guisa de esclarecimento procuramos descrever o que foi acumulado neste assunto em comparação com outras espécies conhecidas.

Ambas serpentes são espécies semi-aquáticas; entretanto, *H. modestus*, serpente menos ativa, é mais adaptada à

vida aquática do que a espécie *L.miliaris* que se caracteriza por apresentar maior grau de atividade (ABE, 1977). *H.modestus* apresenta caracteres típicos de serpentes Colubridae aquáticas e é considerada vivípara (FITCH, 1970), forma de reprodução vantajosa para a espécie, pois poupa-lhe o retorno à terra por ocasião da reprodução (NEILL, 1964). *L.miliaris* apresenta morfologia de serpentes terrestres (RABB & MARX, 1973) e vive sempre próximo à coleção de água. É uma espécie ovípara e mais anfíbia que *H.modestus*.

A estrutura pulmonar de *L.miliaris* é mais complexa e contém maior número de alvéolos do que *H.modestus*; portanto, deve apresentar maior superfície respiratória, o que lhe confere maior superfície para troca gasosa (ABE, 1977). A serpente *H.modestus* frequentemente permanece imersa na água durante 15 a 20 minutos (o tempo máximo de mergulho voluntário observado foi 64 minutos a 25°C). Quando sobe à superfície, geralmente expõe apenas as narinas e olhos para fora do filme d'água, respira durante alguns minutos e mergulha novamente. Por outro lado, o tempo de mergulho de *L.miliaris* é menor que 4 minutos e menos frequente, e ao submergir quase sempre se locomove no fundo do recipiente. O tempo máximo de submersão observado foi de 10 minutos e raramente elimina ar pelas narinas (ABE, 1977). O tegumento altamente vascularizado ocorre em ambas as espécies e esse fato deve ser de importância fisiológica na veiculação e eliminação de CO₂, principalmente quando o animal se encontra mergulhado (ABE, 1977), a exemplo de outras espécies observadas por HEATWOLE & SEYMOUR, 1976.

Outro fator determinante de mudanças estruturais e funcionais em hemoglobinas é a taxa metabólica. Serpentes al-

tamente ativas que fogem a alta velocidade quando ameaçadas, utilizam energia que provém da via aeróbica e anaeróbica (RUBEN, 1976; OGO & FOCESI, 1979). Estudando o comportamento e variabilidade metabólica de serpentes, exemplificados por *Coluber constrictor* Linnaeus (Colubridae), cascavel, *Crotalus viridis* Rafinesque (Crotalidae) e *Lichanura roseofusca* Cope (Boidae), RUBEN, 1976, demonstrou que *C.constrictor*, serpente altamente ativa, é capaz de exibir velocidade de metabolismo anaeróbico aproximadamente duas e quatro vezes maior que *C.viridis* e *L.roseofusca* respectivamente, após estimulação. Entre as serpentes examinadas por OGO & FOCESI, 1979, *H.modestus*, espécie mais lenta e mais adaptada à vida aquática, apresenta nível de ácido láctico mais baixo em condições de repouso (10 mg%) que se eleva mediante estimulação (150 mg%), enquanto que *L.miliaris*, espécie mais ativa possui nível de ácido láctico, em condições de repouso, 40 mg% e responde à estimulação elevando seu conteúdo a 230 mg%.

A elevada concentração de hemoglobina em mamíferos e aves mergulhadoras tem função de reserva de oxigênio, (ANDERSEN, 1966) mas isto é difícil generalizar para répteis devido a sua alta variabilidade (DESSAUER, 1970). Além disso, significativa concentração de metahemoglobina ocasionalmente observada em serpentes, reduz a capacidade de reserva de oxigênio do sangue. PRADO, 1946, reportou 17% de metahemoglobina em *Bothrops jararaca* e POUGH, 1969, de 14 a 21% em outras espécies de serpentes.

Em serpentes aquáticas, durante o mergulho voluntário, a concentração de lactato permanece baixa, indicando que a maior parte do metabolismo é aeróbico e não ocorre acúmulo de

CO₂ devido à capacidade que possuem tais animais em eliminá-lo por via cutânea (GRAHAM, 1974; HEATWOLE & SEYMOUR, 1975).

SEYMOUR, 1976, procurou estabelecer diferenças entre as propriedades do sangue de cobras aquáticas e terrestres. Dentre as espécies examinadas, observou que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio era ligeiramente maior nas cobras marinhas que são espécies estritamente aquáticas, do que em serpentes terrestres. Seus resultados corroboraram os encontrados por GREENWALD, 1971; HEATWOLE & SEYMOUR, 1975, mas não puderam ser comparados com aqueles obtidos por MacMAHON & HAMER, 1975 porque embora empregassem os mesmos métodos experimentais, esses últimos autores não mencionaram o pH no qual o equilíbrio foi realizado. Por outro lado, JOHANSEN & LENFANT, 1972, verificaram que o sangue da serpente aquática *Acrochordus javanicus* tem afinidade pelo oxigênio muito maior do que as espécies terrestres. OGO et alii, 1979, estudando a afinidade das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* pelo oxigênio encontraram valores de P₅₀ menores na espécie *H.modestus* que é mais adaptada à vida aquática, corroborando os achados de HEATWOLE & SEYMOUR, 1975. Os padrões de atividade, mais que o comportamento ao mergulho, parecem estar correlacionados com a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em serpentes: espécies mais lentas tendem a ter maior afinidade (JOHANSEN & LENFANT, 1972; SEYMOUR & WEBSTER, 1975; OGO et alii, 1979). Uma vez que o transporte é facilitado pela baixa afinidade da hemoglobina, pois permite o desligamento a alto PO₂, conclui-se que serpentes mais ativas com hemoglobinas de baixa afinidade pelo gás, terão maior capacidade de metabolismo aeróbico (SEYMOUR, 1976).

O efeito Bohr, isto é, a diminuição da afinidade

da hemoglobina pelo oxigênio, pela ligação de prótons, facilita a liberação de oxigênio a nível dos tecidos. O sangue de cobras marinhas mostra pequena ou nenhuma diferença nos valores de P_{50} pela alteração de pH (SEYMOUR & WEBSTER, 1975). Em contraste às cobras marinhas, efeito Bohr extremamente elevado foi encontrado em *Acrochordus javanicus* que se caracteriza por longo período de submersão (JOHANSEN & LENFANT, 1972). ANDERSEN, 1966, sugeriu que o efeito Bohr é vantajoso aos animais mergulhadores, pois facilita o desligamento de oxigênio e assegura sua maior utilização. Embora o efeito Bohr tenda a ser maior em tartarugas aquáticas (SULLIVAN & RIGGS, 1967b; LENFANT et alii, 1970) os dados sobre ofídios são contrastantes (SULLIVAN & RIGGS, 1971). Contudo SEYMOUR & WEBSTER, 1975, consideram que efeito Bohr tenha pequena consequência em répteis devido a pequena diferença de PCO_2 artério-venoso, pois estes animais tem a capacidade de eliminar CO_2 pela pele (GRAHAM, 1974).

Em diversas classes de vertebrados inclusive no homem, é conhecido existir diferenças nos padrões eletroforéticos e propriedades de oxigenação de hemoglobinas ao longo do desenvolvimento ontogênico (POUGH, 1971; COOPER & HOOGLAND, 1972; SULLIVAN, 1974b). Na classe dos répteis, variação ontogênica foi descrita em lagartos (POUGH, 1969), em tartarugas (McCHUTCHEON, 1947) e em serpentes (MANWELL; 1955, 1960; POUGH, 1971, 1977). MANWELL, 1960 reportou mudança ontogênica na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em serpentes *Thamnophis sirtalis*. POUGH, 1971, confirmou essas observações e relacionou-as com mudanças qualitativas e quantitativas na hemoglobina. A afinidade do sangue pelo oxigênio diminui com o aumento do tamanho corpóreo em diversas famílias de serpentes (POUGH, 1977). Esta correlação

contrasta com a reportada em mamíferos (SCHMIDT - NIELSEN & LARIMER, 1958) e em lagartos (BENNET, 1973). STEEN, 1971, sugeriu que o aumento aparente na afinidade do sangue com o aumento do tamanho corpóreo dos vertebrados seria um artefato produzido pela medida de afinidade a valores de PCO_2 inadequados. Os animais maiores apresentam menor eficiência na ventilação alveolar e portanto, alto PCO_2 . Assim a afinidade do sangue seria a mesma para os animais desde que fosse determinada a PCO_2 apropriado para cada espécie.

Sendo um dos assuntos da presente tese, o efeito de diferentes moduladores alostéricos sobre as hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, procuramos nos estender mais profundamente em tal efeito, descrito para outras espécies de vertebrados. MANWELL, 1955, propôs que alguma característica intracelular era responsável pela variação ontogênica da afinidade observada nas serpentes. SULLIVAN, 1974b, relatou a possibilidade da ocorrência de alteração no conteúdo de ânions polifosfatos com o desenvolvimento da serpente ou a síntese de novos componentes que respondem diferentemente aos ânions polifosfatos, no decorrer do desenvolvimento. Os eritrócitos de répteis não contêm DPG ou inositol polifosfato, com exceção de algumas tartarugas que contêm o mesmo derivado inositol encontrado nos pássaros (BARTLETT, 1978). O ATP foi o único nucleosídeo trifosfato encontrado em concentração significante em eritrócitos de serpentes (RAPOPORT & GUEST, 1941). Outros modificadores de afinidade da hemoglobina não foram estudados em répteis (POUGH, 1971). ISAACS et alii, 1976; BORGESE & LAMPERT, 1975; BORGESE & NAGEL, 1977, descreveram mudança ontogênica de ânions polifosfatos em diversas aves. BARTLETT, 1976, descreveu que 2,3 DPG de

eritrócitos de tartarugas marinhas jovens é substituído por inositol polifosfato durante o primeiro ano de vida. Está claro atualmente, que muitos resultados anteriores a 1966, sobre a ligação de efetores, foram obtidos com solução de hemoglobina contendo quantidades desconhecidas de fosfatos orgânicos. Diálise contra água destilada que era comumente usada como etapa final na purificação de hemoglobina, não é efetiva para separação desses compostos (BENESCH et alii, 1968). Aliás, só a partir de 1965, se conhece que 2,3 DPG pode formar complexo com hemoglobina em solução (CHANUTIN & CURNISH, 1965) e de 1967, como descrito por BENESCH & BENESCH, o dramático efeito desse composto em diminuir a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Desde então, grande número de trabalhos sobre o assunto têm sido publicado, empregando-se hemoglobinas de vários animais inclusive répteis, anfíbios e peixes. Atualmente sabe-se que além do 2,3 DPG, o ATP, o GTP ou o IHP interagem com a hemoglobina, modificando sua propriedade funcional, (BENESCH & BENESCH, 1974). Dentre os fosfatos orgânicos que atuam como reguladores no transporte de oxigênio no homem, 2,3 DPG é o mais importante e está presente no eritrócito numa razão de aproximadamente 1 mol de 2,3 DPG por mol de hemoglobina (BENESCH & BENESCH, 1974). Nos peixes, o ATP e o GTP (GILLEN & RIGGS, 1971; BARTLETT, 1976; GEOGHEGAN & POLUHOWICH, 1974; WEBER et alii, 1976), nas aves e algumas espécies de tartarugas, o IPP e nos répteis, incluindo as serpentes, o ATP são os mais importantes moduladores da função da hemoglobina (BARTLETT, 1978).

A maior parte dos estudos fisiológicos sobre o transporte de oxigênio pelo sangue em serpentes não distingue adequadamente entre as propriedades intrínsecas da hemoglobina

e modificações dessas propriedades por íons e moléculas presentes nos eritrócitos, especialmente os ânions polifosfatos.

Foi estabelecido que as propriedades funcionais do sangue são dependentes do estado do eritrócito e as interpretações fisiológicas devem ser baseadas no estudo do sangue total (GRIGG, 1974). Na hemoglobina em solução, a afinidade é usualmente maior (GRIGG, 1969); o efeito Bohr é frequentemente reduzido ou eliminado (BLACK et alii, 1966) e a interação heme-heme, maior do que nos eritrócitos (MANWELL et alii, 1963).

O presente trabalho que procurou estabelecer bases fisiológicas do transporte de oxigênio pelas hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*, foi realizado tanto com solução de hemoglobina desionizada quanto em presença de reguladores alostéricos da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, do tipo ânion polifosfato ou ainda em presença de sais. Além disso, procuramos estabelecer algumas propriedades estruturais das hemoglobinas através de estudos de grupos sulfidrila e cinéticas de desnaturação, tanto no hemolisado como no componente preparado por focalização isoelétrica. Algumas propriedades imunológicas foram também apreciadas. Os resultados nos possibilitaram conhecer algumas propriedades funcionais e intrínsecas da molécula, bem como suas interações com íons e moléculas normalmente presentes nos eritrócitos, esclarecendo parte dos mecanismos desenvolvidos pelas serpentes para melhor atender a demanda de oxigênio necessária para desempenhar seus processos metabólicos.

M A T E R I A L E M É T O D O S

Material biológico

Os animais utilizados na elaboração deste trabalho foram serpentes adultas de ambos os sexos, das espécies *Helicops modestus* e *Liophis miliaris* pertencentes ao grupo Colubridae. Ambas são espécies aquáticas, com diferentes graus de adaptação morfológica a este ambiente. Todos os experimentos foram realizados com exemplares recém-capturados, doados e classificados por Dr. Paulo de Toledo Artigas. Os animais da espécie *H.modestus* pesavam entre 40 e 50 gramas e os de *L.miliaris* entre 100 e 130 gramas. *H.modestus* ocorre no sudoeste brasileiro (ROSSMAN, 1970) e *L.miliaris* desde o nordeste da Argentina até o Amapá, sendo comum no sudoeste brasileiro (GANS, 1964; CUNHA & NASCIMENTO, 1970).

Preparo do hemolisado total e do hemolisado isento de íons orgânicos e inorgânicos.

Para obtenção do hemolisado total, as serpentes foram injetadas com heparina (100 µl de heparina 500 UI/ml por animal) e após 5 minutos, sangradas por punção cardíaca ou via arco sistêmico esquerdo, sendo o sangue coletado num tubo contendo NaCl 1,7% (p/v) e EDTA 1mM pH 7,0. Após centrifugação numa centrífuga "Sorvall" modelo RC-2B a aproximadamente 500 g durante 5 minutos, as hemácias foram separadas do plasma e lavadas por três vezes com solução de NaCl 1,7%, contendo EDTA

1mM, pH 7,0. A hemólise foi realizada por tratamento dos eritrócitos com 3 volumes de EDTA 1mM pH 7,0 e o estroma removido mediante centrifugação a 1000 g durante 5 minutos. Todas as operações foram realizadas a 4°C (FOCESI et alii, 1979). A concentração da hemoglobina foi determinada espectrofotometricamente a 415nm. Para obtenção do hemolisado isento de íons orgânicos e inorgânicos bem como de moléculas pequenas, a solução de hemoglobina acima foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex G-25 (20x1cm) e em seguida num sistema de 3 colunas contendo as seguintes resinas de troca iônica: Dowex 1-X₈ (acetato⁻) (5x2cm), Dowex 50W-X₄ (NH₄⁺) (5x2cm) e Amberlite IRC-50 (H⁺) /IR-4B (OH⁻) (20x2cm) ou numa coluna (20x2cm) contendo Mixed Bed Resin A-501-X₈, Bio Rad, Dowex 1-X₈ + 50W-X₈ (BRUNORI et alii, 1979).

Imediatamente após a eluição, foi determinada a condutividade da solução (aproximadamente 2µS/cm) e então adicionado volume adequado de EDTA 0,1M pH 7,0 para se obter concentração final 1 mM em EDTA.

Determinação do pH isoiônico

O pH isoiônico das soluções de hemoglobina foi obtido pela determinação do pH de uma solução exaustivamente desionizada pela passagem sucessiva da mesma através de colunas contendo Sephadex G-25 (20x1cm) e Mixed Bed Resin A-501-X₈ (D), Bio Rad, Dowex 1-X₈ (20x2cm) até condutividade constante, da ordem de 1,5 a 2,0 µS/cm, medido num condutivímetro "Radiometer" (Copenhagen) tipo CMD 2b (AIROLDI et alii, 1981).

Eletroforese em disco de poliacrilamida

O teste de pureza dos componentes obtidos da focalização isoelétrica foi realizado inicialmente através da eletroforese em disco de poliacrilamida, segundo o método descrito por ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964. Entretanto, devido as dificuldades de se obter separação nítida dos componentes e à pequena reprodutibilidade dos resultados, reservamos essa técnica para testar a pureza das hemoglobinas em relação às outras proteínas. O gel para eletroforese em poliacrilamida era constituído de duas camadas: a primeira, formada por gel de resolução continha mistura de 3 soluções estoques: A, B e C nas seguintes proporções: 1:1:2, respectivamente. O gel de concentração que constituia a camada superior era formado das seguintes soluções estoques: D, E e C, nas proporções 2:1:2, respectivamente. Cada 100ml da solução estoque continha: Solução A: 30g de acrilamida, 0,8g de bis-acrilamida; Solução B: 24ml de HCl 1N, 18,15g de tris, 0,4ml de TEMED; Solução C: persulfato de amônio 0,1%; Solução D: 5,0g de acrilamida, 1,25g de bis-acrilamida; Solução E: 12,8ml de H_3PO_4 1N, 2,85g de tris, 0,1ml de TEMED.

Volumes da ordem de 1ml foram distribuídos em tubos de vidro de 0,3cm de diâmetro por 10cm de comprimento e guardados ao abrigo da luz por 1 hora, aproximadamente. Sobre esta camada polimerizada foram colocados 0,2ml de gel de concentração. Após polimerização, os tubos foram inseridos numa câmara de eletroforese e sobre o gel foram depositados 100 μ l de amostra de hemoglobina preparada da seguinte forma: 20 μ l de solução de oxihemoglobina (absorbância a 580nm=1,0), 40 μ l de tampão de eletrodo superior, 20 μ l de glicerol, 20 μ l de tampão de

eletrodo superior contendo 0,1M de β -mercaptoetanol e alguns cristais de dititionito de sódio. Esta solução foi gaseada com CO.

O tampão de eletrodo superior era constituído de 6,32g de tris, 3,94g de glicina, completando-se o volume a 1000 ml com água destilada; pH 8,9; o tampão de eletrodo inferior continha 12,1g de tris, 50ml de HCl 1N completando-se o volume a 1000ml com água destilada; pH 8,1. Neste tampão foram adicionadas algumas gotas de azul de bromofenol que serviram como marcador. Os eletrodos foram conectados à fonte elétrica de corrente contínua, de forma que o polo negativo fosse ligado ao eletrodo superior e o polo positivo, ao inferior. A eletroforese foi desenvolvida a 2mA por tubo, por uma ou duas horas. Os géis foram removidos dos tubos de vidro e mergulhados em solução de ácido tricloracético 12% durante duas horas, sendo então corados ou para hemoglobina ou para proteína.

A solução corante para proteína foi preparada dissolvendo-se 1,25g de comassie blue numa mistura de 250ml de metanol, 250ml de água destilada e 46ml de ácido acético. Algumas gotas dessa solução foram adicionadas diretamente ao tubo que continha o gel em ácido tricloracético; depois de 12 a 24 horas foram descoradas com a seguinte solução: metanol 14% e ácido acético 7%.

A solução corante para hemoglobina foi preparada com 1g de benzidina, 75ml de metanol, 0,5ml de ácido acético, 3 gotas de água oxigenada 130 volumes, e alguns cristais de nitroprussiato de sódio. Deixou-se o gel na solução recém-preparada, durante 10 a 20 minutos, lavando-se em seguida, com solução descorante que continha 25ml de metanol, 50ml de éter sulfúrico e 1ml de água oxigenada (MEIRELLES, 1975).

Focalização isoelétrica em disco de poliacrilamida

A focalização isoelétrica oferece um método alternativo para se separar proteínas, baseando-se em sua carga de superfície e permite separação de moléculas cujos pH isoelétricos são muito próximos. A separação dos componentes de hemoglobina de *H.modestus* e *L.miliaris* e determinação de seus pH isoelétricos foram realizados por focalização isoelétrica em disco de poliacrilamida, segundo DRYSDALE et alii, 1971. O gel foi preparado misturando-se 5g de acrilamida, 0,05ml de TEMED, 0,2g de bis-acrilamida, 5ml da solução estoque de anfólito, intervalo de pH entre 3,5 e 10 (Ampholine, LKB Instruments) e completando-se o volume a 100ml com água destilada. A mistura foi desoxigenada sob vácuo por alguns segundos e distribuída em tubos de vidro de 10cm de comprimento por 0,3cm de diâmetro interno, selados numa das extremidades com parafilm. Os géis foram cuidadosamente recobertos com 0,2ml de água destilada para se obter superfície homogênea, e guardados ao abrigo da luz, por duas horas. A amostra de hemoglobina foi preparada adicionando-se a 100µl de uma solução de oxihemoglobina desionizada, na concentração 4mg/ml, 100µl de β-mercaptoetanol 0,1M e alguns cristais de dititionito de sódio. Esta solução de desoxihemoglobina foi convertida em carbomonóxihemoglobina mediante passagem de CO e aplicado em solução saturada de sacarose (50µl/tubo) nos tubos contendo o gel polimerizado.

A solução de eletrodo inferior foi constituída de H_3PO_4 0,02M pH 2,2 e a superior de NaOH 0,01M pH 12,0. O eletrodo superior foi então conectado ao polo negativo de uma fonte elétrica a voltagem constante, e o eletrodo inferior ao polo

positivo. A focalização isoelétrica foi realizada à corrente inicial de 5mA por gel, que durante a experiência caiu gradativamente até 0,5mA/gel. A focalização isoelétrica geralmente se completou no tempo de 1 hora a 150V. Os géis foram então removidos dos tubos de vidro e colocados em uma solução contendo 57,7g de TCA e 17,25g de ácido sulfanílico, a fim de remover o anfólito, com excessão de uma ou duas tiras que foram cortadas em porções de 0,5cm e eluidas com 1,0ml de água destilada. A determinação do gradiente de pH do gel de poliacrilamida foi feita no eluato aquoso após 2 horas, medindo-se o pH a 25°C.

As bandas foram coradas adicionando-se sobre os géis mergulhados na solução de TCA 12%, algumas gotas de comassie blue e descoradas com a solução descorante, preparada conforme descrito. Os géis em duplicatas foram corados com solução recém-preparada de benzidina 1%. Deixou-se corar 10 a 20 minutos e lavou-se com solução descorante (MEIRELLES, 1975).

Separação de componentes de hemoglobina por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose

10 ou 15ml de uma solução de oxihemoglobina desionizada na concentração da ordem de 1,5mg/ml a 3,5mg/ml preparada conforme descrito anteriormente foi submetida à focalização isoelétrica em coluna (LKB 8100 Ampholine Electrofocusing Column, capacidade 440ml) em gradiente de densidade, conforme descrito pelo manual LKB, utilizando-se 10 a 12ml de anfólito no intervalo de pH entre 7 e 9 (PALÉUS et alii, 1971). O gradiente de densidade foi aplicado a fim de se prevenir movimen-

tos de convecção na solução analisada, bem como para evitar que as bandas de proteínas separadas se misturassem novamente durante a eluição. Em nosso experimento utilizamos como meio estabilizante, sacarose pura. O gradiente de sacarose foi preparado empregando-se solução densa e solução leve de gradiente de densidade, com auxílio de "Ampholine Gradient Mixer" e de LKB 8123-1 "Ampholine Stirrer Motor" que constituem acessórios do aparelho de focalização isoelétrica e proporcionaram distribuição adequada do gradiente de sacarose na coluna.

A solução de hemoglobina a ser ensaiada foi introduzida na coluna, dissolvida na solução densa (3/4 da amostra) e leve (1/4 da amostra) de gradiente de sacarose. A solução densa consistia de 107,5g de sacarose, 8 a 9ml de anfólito, 3/4 da amostra de hemoglobina e água destilada para completar o volume a 215ml; a solução leve era constituída de 10,5g de sacarose, 2 a 3ml de anfólito, 1/4 da amostra de hemoglobina e completando-se o volume a 215ml com água destilada.

A solução do catodo consistia de 48g de sacarose, 30ml de água destilada e 20ml de NaOH 1N e a solução do anodo, de 6ml de H_3PO_4 1M e 34ml de água destilada. Estas soluções foram convenientemente introduzidas na coluna, conectando-se então o "High Voltage Power Supply" Savant Instruments, Inc, aos eletrodos de modo que o polo positivo da fonte elétrica estivesse em contacto com o eletrodo imerso na solução de H_3PO_4 e o polo negativo, no eletrodo imerso na solução de NaOH. A corrente aplicada no início do processo foi de 30mA, correspondendo a uma voltagem de 1600V. Durante toda a operação as amostras de hemoglobina foram mantidas a 4°C através da circulação de água refrigerada na coluna, com auxílio do "Recirculating Water

Cooler", Savant Instruments, Inc.

Após 60 horas de focalização, a corrente elétrica era estável a 7mA, e várias linhas de separação de hemoglobinas foram evidenciadas. O conteúdo foi coletado por gravidade pelo orifício inferior da coluna em alíquotas de 2ml, onde foram determinadas a absorbância a 415nm e pH correspondentes. As frações individuais de hemoglobina foram reunidas e dialisadas contra tampão tris-maleato 0,05M e pH 7,0 2x300ml por 48 horas, a fim de se remover os anfólitos e a sacarose utilizados na separação. Para se controlar a pureza dos componentes foram utilizadas eletroforese em gel de poliacrilamida e técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose.

Imunodifusão dupla

As técnicas de imunodifusão dupla foram realizadas em gel de agarose a 1% em salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2, segundo o método descrito por OUCHTERLONY, 1958.

A análise imunológica foi feita sobre lâminas de vidro (5x11cm) recoberto com uma camada de gel de agarose (aproximadamente 12ml/lâmina) sobre a qual foram feitos orifícios padronizados onde foram introduzidos os materiais a serem analisados, isto é, os componentes de hemoglobinas obtidos pela focalização isoelétrica em coluna, numa concentração de 1 a 4mg/ml e uma canaleta central, onde foi colocado o antisoro anti-Hb de *H.modestus* ou de *L.miliaris*. Os antisoros anti-Hb de *H.modestus* e de *L.miliaris* foram gentilmente cedidos por MARIA SUMIKO ARITA MATSUURA.

As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, em câmara úmida por aproximadamente 24 horas e em seguida, a 4°C por 48 horas para que se processasse reação entre antígeno e anticorpo. As lâminas foram então lavadas com solução de NaCl 0,15M durante 7 dias e desidratadas à temperatura ambiente. O gel foi corado com solução de negro de amido a 2%, sendo o excesso lavado com solução descorante contendo metanol 1,4% e ácido acético 7%.

Determinação de grupos sulfidrila reativos de hemoglobina com 4,4'-dipiridinodissulfeto (4-PDS)

A determinação de grupos sulfidrila reativos foi feita segundo o método descrito por GRASSETTI & MURRAY, 1967, que se baseia na formação de 4-tiopiridona, mediante a reação de 4-PDS com grupos tióis livres das globinas. A 4-TP possui espectro de absorção característica no U.V. e é diferente daquele do 4-PDS, o que permite acompanhar o desenvolvimento da reação, espectrofotometricamente.

A solução de hemoglobina desionizada foi submetida a cromatografia em DEAE-Sephadex (20x1cm), utilizando como eluente, tampão tris-maleato 0,05M pH 7,5. O pico de eluição foi empregado para determinação de grupos sulfidrila livres. Como critério de pureza, o eluato foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo corado por benzidina e por comassie blue para se certificar que o pico de eluição era constituído de apenas hemoglobina.

A titulação de grupos -SH reativos foi realizada

preparando-se 1,2ml da solução de hemoglobina na concentração da ordem de $3 \cdot 10^{-5}$ M em tampão tris-maleato 0,1M pH 7,0 em duas cubetas de quartzo. Após o estabelecimento do zero de absorvância a 324nm, foi adicionado 0,2ml de NaCl 0,15M à referência e 0,2ml de 4-PDS 1mM em NaCl 0,15M à cubeta da reação. O valor da absorvância (A_{∞}) foi anotado ao final da reação, que oscilava entre 30 e 120 minutos dependendo da hemoglobina e da presença ou não de ATP. Nesse ponto, o acréscimo na absorvância era menor que 0,05 por minuto.

A concentração da hemoglobina foi determinada utilizando-se a solução referência da reação acima e lendo-se a absorvância contra uma solução contendo 1,2ml do tampão tris-maleato 0,1M pH 7,0 e 0,2ml de NaCl 0,1M a 540nm. Conhecendo-se o coeficiente de extinção milimolar em heme ($\epsilon=13,8$) pode-se calcular a concentração da hemoglobina na solução. Dividindo-se o valor encontrado por 4, obteve-se a concentração da hemoglobina tetramérica. Para eliminar o erro devido ao excesso de 4-PDS, determinou-se a absorvância de uma solução contendo 1,2ml de tampão tris-maleato 0,1M pH 7,0 e 0,2ml de 4-PDS 1mM, no comprimento de onda 324nm, cujo valor foi descontado da absorvância do 4-TP no final da reação.

Cálculos: o acréscimo na absorvância a 324nm convenientemente corrigido para o excesso de 4-PDS, foi devido à formação de 4-TP. A 4-TP que apresenta coeficiente de extinção molar $\epsilon=1,98 \cdot 10^4$ (GRASSETTI & MURRAY, 1967) é equivalente ao -SH que reagiu.

$$\text{Molaridade -SH} = \frac{A_{324} - \text{absorvância do excesso de 4-PDS}}{1,98 \cdot 10^4}$$

$$\text{Molaridade de Hb} = \frac{\text{Absorbância a } 540\text{nm}}{13,8 \cdot 4 \cdot 10^3}$$

$$\text{-SH/mol de Hb} = \frac{\text{Molaridade -SH}}{\text{Molaridade Hb}}$$

Cinética de reação de grupos sulfidrilas reativos da hemoglobina com 4-PDS

A cinética de reação de grupos sulfidrilas com 4-PDS foi determinada conforme o método descrito por AMPULSKI et alii, 1969. Esta se baseia na formação de um complexoproteico e de 4-TP, mediante a reação de grupos -SH da proteína com 4-PDS. O estudo cinético foi realizado utilizando-se 1,2ml da solução de hemoglobina em concentração 0,6 a 0,8mg/ml em tampão tris-maleato 0,1M pH 6,8 à temperatura de 25°C.

A solução de hemoglobina empregada foi previamente submetida a várias etapas de purificação conforme descrito na determinação de grupos sulfidrilas reativos, bem como à eletroforese em gel de poliacrilamida, como critério de pureza. Depois de estabelecer o zero do aparelho com a solução de hemoglobina a 0,6 a 0,8mg/ml a 324nm, adicionou-se à cubeta de referência 0,2ml de NaCl 0,15M e à cubeta de reação, 0,2ml de 4-PDS 1mM em NaCl 0,15M. Após rápida agitação, a reação foi acompanhada num espectrofotômetro. A curva de titulação de grupos -SH é bifásica. Os primeiros minutos de reação (aproximadamente 2 minutos) correspondem à fase rápida, linear, característica de reação de pseudo primeira-ordem. Para efeito de cálculo a absor

bância nesse tempo foi considerada Af.

As constantes cinéticas foram calculadas mediante a equação de pseudo primeira-ordem:

$$k = \frac{1}{t} \times \ln \frac{A_f}{A_f - A} \quad \text{onde:}$$

A é a absorbância a 324nm da 4-TP formada na reação, no tempo t; Af é a absorbância a 324nm, no final da primeira fase da reação.

Nos experimentos em presença de ATP, esse nucleotídeo foi adicionado à solução de oxihemoglobina ou desoxihemoglobina para conter 1mM de ATP. Os estudos cinéticos da reação de grupos tióis livres da desoxihemoglobina com 4-PDS foi feita num tonômetro que contém acoplada uma cubeta de 3ml.

A desoxihemoglobina foi obtida através da passagem sucessiva de nitrogênio gasoso sobre a solução de oxihemoglobina. O oxigênio dissolvido nas soluções de 4-PDS e de NaCl foi analogamente eliminado por arraste com nitrogênio gasoso.

Propriedades de ligação do ligante oxigênio.

As propriedades de ligação da hemoglobina com oxigênio foram determinadas espectrofotometricamente pelo método de ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958, a 25°C ± 0,5, geralmente a uma concentração de proteína de 0,6 a 0,8 mg/ml num dos seguintes tampões: bis-tris HCl, bis-tris maleato ou tris maleato 0,01M pH entre 6,0 e 8,5. Este método baseia-se no princípio de que o oxigênio se liga ao Fe(II) do heme na proporção de 1:1. As propriedades espectrais da hemoglobina são diferentes quando

o heme está livre, parcialmente saturado ou completamente saturada com o ligante. As curvas de ligação do oxigênio foram determinadas num tonômetro que consiste de um tubo Thunberg modificado, contendo uma cubeta Pyrex de caminho óptico 1cm, soldado na extremidade do tubo.

O equilíbrio com o oxigênio foi determinado em: i) hemoglobina isenta de íons e moléculas pequenas (desionizada) às quais foi adicionado EDTA 0,1mM; ii) em hemoglobina desionizada contendo EDTA 0,1mM e ânions polifosfatos tais como ATP, 2,3 DPG, GTP, ou IHP em concentração 1mM; iii) em hemoglobina desionizada contendo EDTA 0,1mM e sais como NaCl, KCl, CaCl_2 , citrato de sódio em concentração 5mM; iv) em hemoglobina desionizada contendo EDTA 1mM ou 5mM.

Os valores de pH foram medidos imediatamente após a determinação da curva de oxigenação. O espectro foi traçado num registrador XY acoplado a um espectrofotômetro digital, nos comprimentos de onda entre 500 e 600nm, sendo os valores de absorbância nos comprimentos de onda 540, 560 e 576nm registrados para cada espectro. A desoxihemoglobina foi obtida a partir da oxihemoglobina por borbulhamento de nitrogênio gasoso e esta foi convertida a oxihemoglobina pela adição de pequenos volumes conhecidos de oxigênio, por meio de uma seringa calibrada. Para reduzir o perigo de alteração das proteínas durante o experimento, a curva de equilíbrio foi traçada com apenas poucos pontos. As preparações de hemoglobina que continham quantidade significativa de metahemoglobina (10%) não foram utilizadas para os experimentos. Às soluções de hemoglobina desionizadas contendo EDTA 0,1mM foram adicionadas soluções de sais ou ânions polifosfatos imediatamente antes da determinação da curva de equilíbrio.

Os experimentos foram realizados a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

A curva de ligação do ligante foi representada pelo gráfico de Hill, de acordo com a equação:

$$K (P)^n = \frac{Y}{1 - Y} \quad \text{onde:}$$

P é a pressão parcial de oxigênio; K é a constante de equilíbrio; Y é a saturação parcial da hemoglobina pelo oxigênio e n é a constante de interação empírica de Hill (WYMAN, 1948e1964).

O gráfico $\log Y/(1-Y)$ em função de $\log P\text{O}_2$ nos fornece uma linha reta cuja inclinação n representa a cooperatividade da reação. O valor de $\log P\text{O}_2$, isto é, logaritmo da pressão parcial de oxigênio em que 50% das hemoglobinas estão na forma oxigenada e o valor do coeficiente de Hill, n , foram determinados numa calculadora "Sharp", modelo Compet 364 PIII, programada para receber os valores de absorvância nos três comprimentos de onda (540, 560 e 576nm) das formas desoxihemoglobina, oxihemoglobina e das saturações parciais obtidas mediante adições de pequenos volumes conhecidos de ar.

O efeito Bohr que expressa a dependência da forma da curva de oxigenação em função do pH ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$), foi determinada entre pH 7,0 e 8,0. O efeito dos moduladores heterotrópicos, ATP, 2,3 DPG, GTP e IHP sobre a afinidade da hemoglobina de serpentes foi analisado em pH 7,0 onde o efeito desses ânions polifosfatos era acentuado. O experimento forneceu também informações a respeito da interação heme-heme em função do pH.

Determinação de nucleotídeos em eritrócitos

A determinação de nucleotídeos por cromatografia em coluna de troca iônica foi descrita por BARTLETT, 1968; BARTLETT & BORGESSE, 1976. O sangue das serpentes foi coletado em heparina e centrifugado a 500g à temperatura de 4°C a fim de se remover o plasma. As células foram adicionadas lentamente sobre ácido tricloracético 10%, na proporção de 1:2, em banho de gelo. O precipitado formado foi centrifugado e o resíduo, lavado por duas vezes com ácido tricloracético 5%, sendo os extratos tricloracético reunidos, neutralizados com KOH e extraídos com cerca de 2 volumes de éter, quatro vezes. O éter foi evaporado em corrente de nitrogênio gasoso e a solução residual, diluída com 1ml de água destilada. Esta foi então submetida a cromatografia em coluna de Dowex 1-X₈ (200mesh) previamente ativado com HCl 1M e lavado exaustivamente com água destilada. A eluição foi realizada à temperatura ambiente com 500ml de um gradiente linear crescente de 0 a 5M de formiato de amônio (ácido fórmico-formiato de amônio 4:1 v/v). As dimensões da coluna eram 1x15cm para aproximadamente 1,5ml de sangue.

Alíquotas de 2ml foram coletadas automaticamente num coletor de frações e analisadas num espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm para se determinar os picos de eluição dos nucleotídeos. A identificação dos nucleotídeos foi feita pelos seus volumes de eluição e pela análise de cada pico de eluição, por cromatografia em papel (Catálogo P.L. Biochemicals, 1977).

A coluna de Dowex 1-X₈ empregada foi previamente calibrada nas mesmas condições descritas anteriormente com 2ml

de uma solução padrão contendo a mistura de 20 μ mol de cada um dos compostos: ATP, ADP, AMP e GTP (BARTLETT & BORGESE, 1976).

A análise cromatográfica em papel foi realizada com os picos de eluição de cada nucleotídeo. Estes foram concentrados e submetidos a cromatografia em papel Wattman nº 1, ao lado dos respectivos padrões (100 a 200 μ gramas de cada nucleotídeo padrão). O sistema de solvente empregado foi ácido isobutírico/hidróxido de amônio/água, na proporção de 60/1/33, pH 3,7.

Efeito de agentes desnaturantes sobre hemoglobina de *H.modestus* e *L.miliaris*

À uma solução de oxihemoglobina desionizada na concentração da ordem de 0,8mg/ml em tampão tris-HCl 0,01M pH 7,0 foi adicionada NaOH 0,1M para se elevar o pH a 11,4. A velocidade de desnaturação da oxihemoglobina foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro, através do decréscimo da absorbância a 573nm, num intervalo de tempo que variou de 1 a 10 minutos dependendo da amostra estudada. Empregou-se como referência a solução tampão tris-HCl 0,01M pH 7,0 (AIROLDI et alii, 1978). O experimento foi repetido em presença de ATP 1mM.

Efeito desnaturante de benzoato de sódio e de uréia foram determinados através do tratamento da oxihemoglobina desionizada aproximadamente 0,8mg/ml, com benzoato de sódio 1M ou uréia 7M, em tampão tris-HCl 0,01M pH 7,0. Os experimentos foram repetidos em presença de ATP 1mM.

A desnaturação da hemoglobina foi expressa como uma reação de pseudo primeira-ordem e a constante cinética foi

calculada através da equação:

$$k = 1/t \times \ln (A_0 / A_0 - A) \quad \text{onde:}$$

A é a absorbância a 573nm da solução de hemoglobina a 25°C, no tempo t; A₀ é a absorbância no tempo zero.

Os cálculos foram feitos com auxílio de uma calculadora "Sharp" modelo Compet 365PIII.

R E S U L T A D O S

Separação de componentes e determinação dos pH isoelétricos por focalização isoelétrica em disco de poliacrilamida e determinação de pH isoiônico

Uma das indicações preliminares das características da proteína foi dada pelo seu pH isoelétrico. A separação e determinação de pH isoelétrico dos componentes das hemoglobinas foram realizadas por focalização isoelétrica em disco de poliacrilamida contendo anfólito no intervalo de pH entre 3,5 e 10,0. Quatro componentes foram obtidos no hemolisado de *H.modestus* cujos pH isoelétricos aparentes corresponderam a 8,1 7,95 7,8 e 7,7. Com hemolisado de *L.miliaris*, foram obtidos 6 componentes correspondendo a pH isoelétricos aparentes de 8,3 8,1 7,95 7,9 7,85 e 7,7. As hemoglobinas foram previamente convertidas em carbomonóxihemoglobina através de gaseificação com CO sobre a forma desoxigenada (Fig. 1).

O pH isoiônico foi também determinado em solução de hemoglobina das serpentes *H.modestus* e *L.miliaris* obtendo-se valores de 7,35 e 7,30 respectivamente; esses valores foram obtidos em três determinações independentes, de cada espécie.

Separação de componentes de hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose

As dificuldades de se conseguir condições ótimas

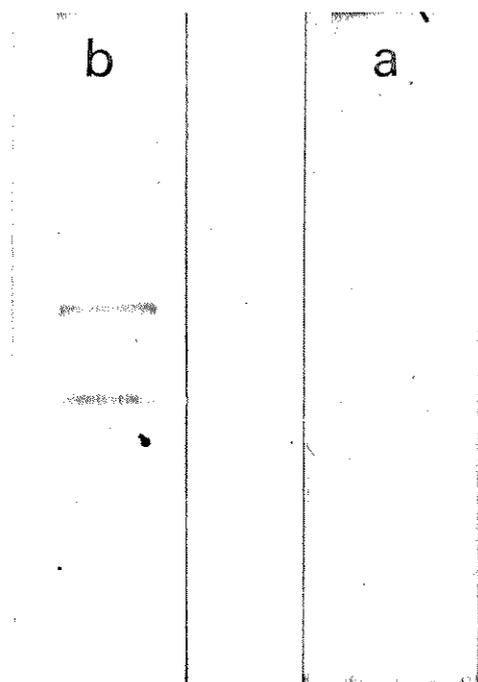


Fig. 1 Separação de componentes de hemoglobina em disco de poliacrilamida, por focalização isoelétrica.

a. *H.modestus*

b. *L.miliaris*

para fracionamento das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* em seus componentes por cromatografia em coluna de troca iônica utilizando-se resinas como CM-celulose ou DEAE-Sephadex, levaram nos a recorrer à separação por focalização isoelétrica, que também nos forneceu o pH isoelétrico aparente dos vários componentes. O hemolisado desionizado foi aplicado na coluna sob forma de oxihemoglobina, utilizando-se gradiente de sacarose e anfólito no intervalo de pH entre 7,0 e 9,0 (PALÉUS et alii, 1971). Após 60 horas de focalização, evidenciaram-se 3 faixas principais em *H.modestus*. A eluição foi feita por gravidade e em cada alíquota de 2ml, foram determinadas absorbância a 415nm e o pH correspondente e então a proporção relativa de cada fração. Os componentes foram designados de acordo com os pI aparentes decrescentes em componentes I, II e III, conforme a Tabela Ia e a Fig. 2a.

No hemolisado de *L.miliaris*, foram encontrados 5 componentes principais que foram designados de acordo com os pI aparentes decrescentes em componentes I, II, III, IV e V (Tabela Ib e Fig. 2b). Além desses componentes principais, em ambas as espécies, foram observados na coluna, durante a focalização isoelétrica, outros ainda menores que parecem constituir uma pequena fração da hemoglobina total e foram, portanto, ignorados. As frações de hemoglobina coletadas da coluna foram dialisadas contra tampão tris-HCl 0,05M pH 7,0.

Imunodifusão dupla

A análise dos componentes de hemoglobina de ambas

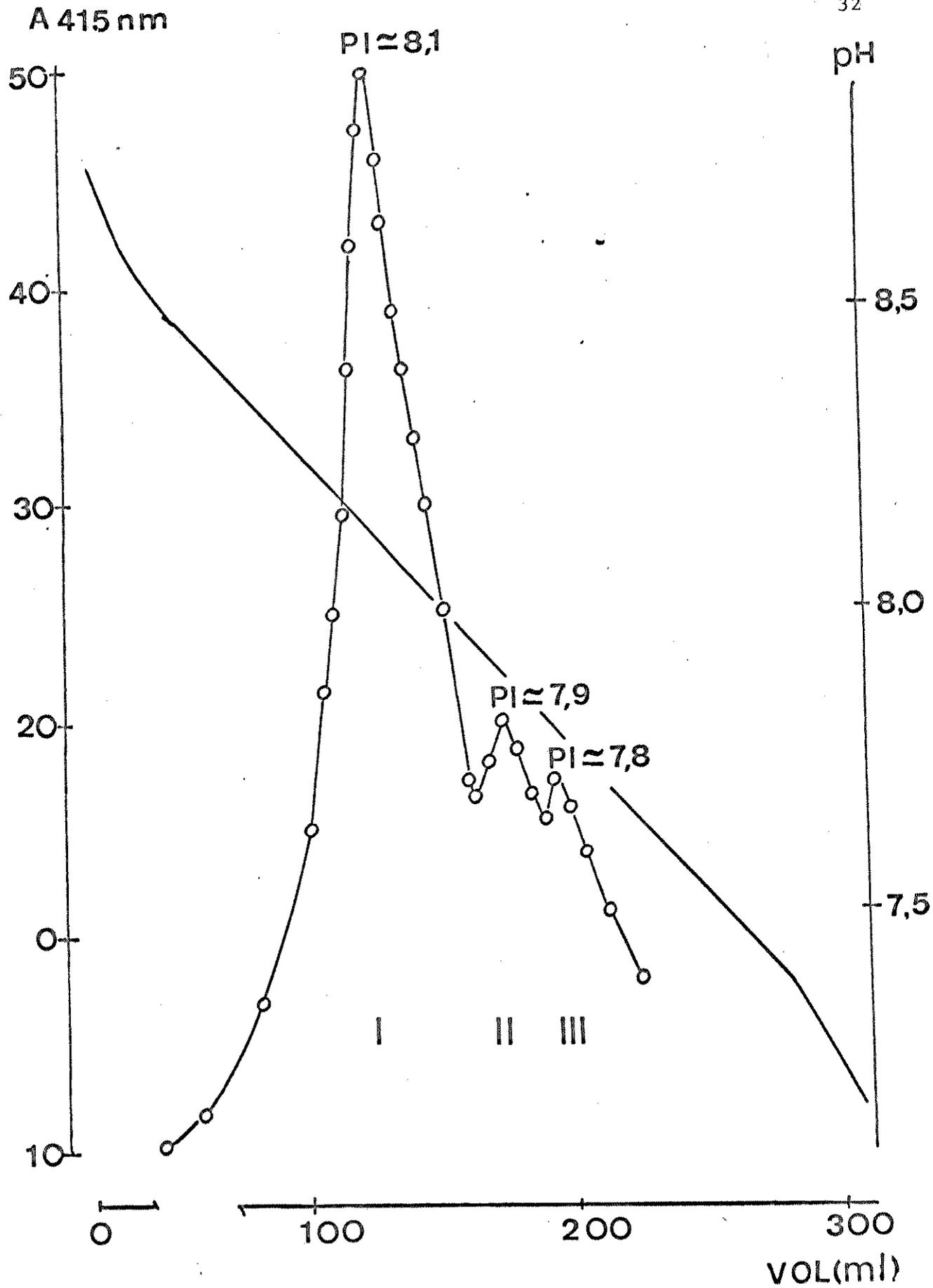


Fig. 2a Perfil de eluição dos componentes de hemoglobina de *H. modestus* por focalização isoelétrica, em gradiente de sacarose.

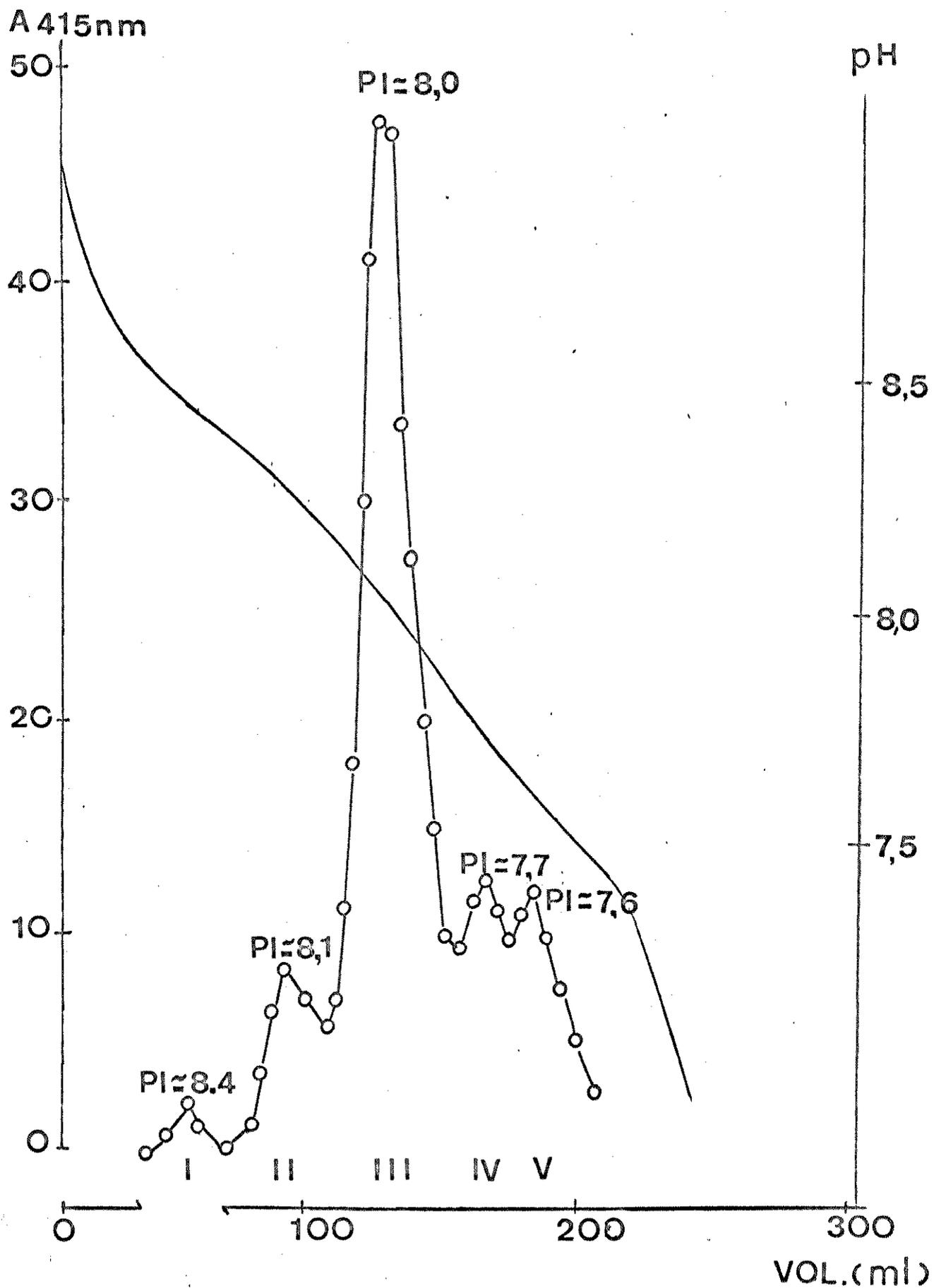


Fig. 2b Perfil de eluição dos componentes de hemoglobina de *L. miliaris* por focalização isoelétrica, em gradiente de sacarose.

TABELA Ia

Componentes de hemoglobina de *H.modestus* obtidos por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose

Componente	Porcentagem	pI aparente
I	80	8,1
II	15	7,9
III	5	7,8

TABELA Ib

Componentes de hemoglobina de *L.miliaris* obtidos por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose

Componente	Porcentagem	pI aparente
I	2	8,4
II	6	8,2
III	85	8,0
IV	5	7,7
V	2	7,6

as serpentes foi realizada pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e pela reação entre antígeno e anticorpo através da imunodifusão dupla em gel de agarose 1% em salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2, segundo o método descrito por OUCHTERLONY, 1958. A eletroforese em gel de poliacrilamida que é normalmente utilizada, revelou ser inadequada no presente estudo visto que os resultados não se revelaram repetitivos.

Dos testes de imunodifusão dupla, resultou que quando o antissoro homólogo era testado contra os componentes de *H.modestus*, havia identidade total, conforme Fig. 3a. Entretanto quando o antissoro anti-Hb de *L.miliaris* foi testado contra os componentes de *L.miliaris* obtidos da focalização isoelétrica, revelou-se uma reação de identidade parcial entre o componente III e os demais. Os componentes menores I, II, IV e V revelaram reação de identidade total entre si (Fig. 3b).

As frações de maior concentração obtidas da focalização isoelétrica de ambas as serpentes, foram utilizadas para o estudo das propriedades funcionais.

Determinação de grupos sulfidrila reativos das hemoglobinas com 4-PDS

A determinação de grupos sulfidrila reativos das hemoglobinas com 4-PDS baseia-se na formação de 4-TP que absorve no comprimento de onda 324nm, ao contrário do reagente 4-PDS.

Em *H.modestus*, foram determinados 11 grupos -SH por tetrâmero, enquanto que em *L.miliaris*, foram titulados 8 grupos -SH por tetrâmero, em hemoglobinas desionizadas.

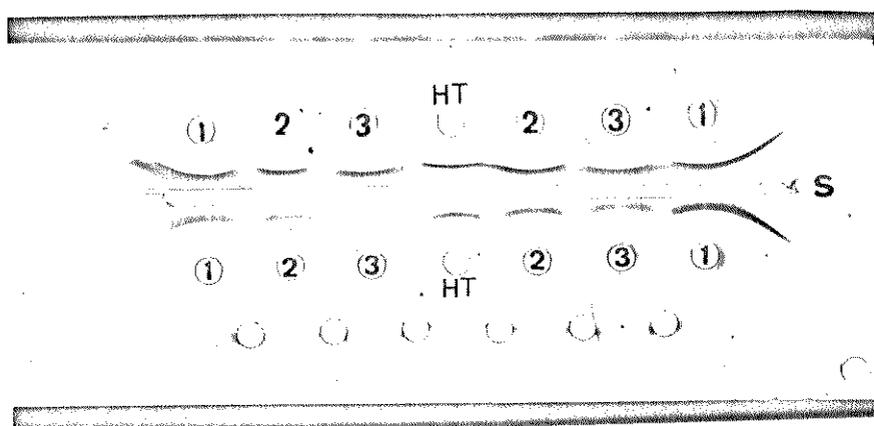


Fig. 3a Imunodifusão dupla em gel de agarose dos componentes de hemoglobina de *H.modestus*, obtidos por focalização isoelétrica em coluna, revelados com sêro de rato anti-Hb de *H.modestus*. (S)- sêro de rato anti-Hb de *H.modestus*; (1)-componente I; (2)-componente II; (3)-componente III (HT)-hemolisado total de *H.modestus*.

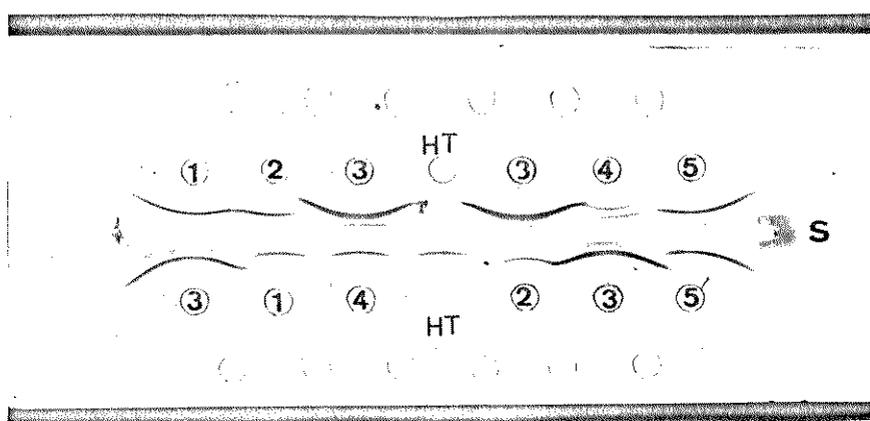


Fig. 3b Imunodifusão dupla em gel de agarose dos componentes de hemoglobina de *L.miliaris*, obtidos por focalização isoelétrica em coluna, revelados com sêro de rato anti-Hb de *L.miliaris*. (S)-sêro de rato anti-Hb de *L.miliaris* ; (1)-componente I; (2)-componente II; (3)-componente III (4)-componente IV; (5)-componente V; (HT)-hemolisado total de *L.miliaris*.

A determinação de grupos -SH reativos foi também realizada em presença de ATP, encontrando-se para *H.modestus*, 8 grupos -SH por tetrâmero e para *L.miliaris*, 5 -SH por tetrâmero. Através da titulação em desoxihemoglobinas em presença de ATP, determinaram-se 5 e 4 grupos -SH por tetrâmero.

Cinética de reação de grupos tióis reativos das hemoglobinas com 4-PDS

Para a determinação das constantes cinéticas, hemoglobinas recém coletadas foram desionizadas e purificadas por cromatografia de troca iônica. A reação da proteína com 4-PDS foi acompanhada a 324nm e as constantes cinéticas foram determinadas através da equação de pseudo primeira-ordem:

$$k = 1/t \cdot \ln A_f / (A_f - A)$$

O valor das constantes $k = 0,00166 \text{ s}^{-1}$ foi encontrado com hemoglobina de *H.modestus* e $k = 0,0023 \text{ s}^{-1}$ com hemoglobina de *L.miliaris*. O efeito do ATP sobre a velocidade aparente da reação de pseudo primeira-ordem entre 4-PDS e hemoglobina na forma oxigenada ou desoxigenada foi estudado, obtendo-se $k = 0,0132 \text{ s}^{-1}$ com *H.modestus* e $k = 0,0038 \text{ s}^{-1}$ com *L.miliaris*, independente da presença ou não do ligante na molécula de hemoglobina (Fig. 4).

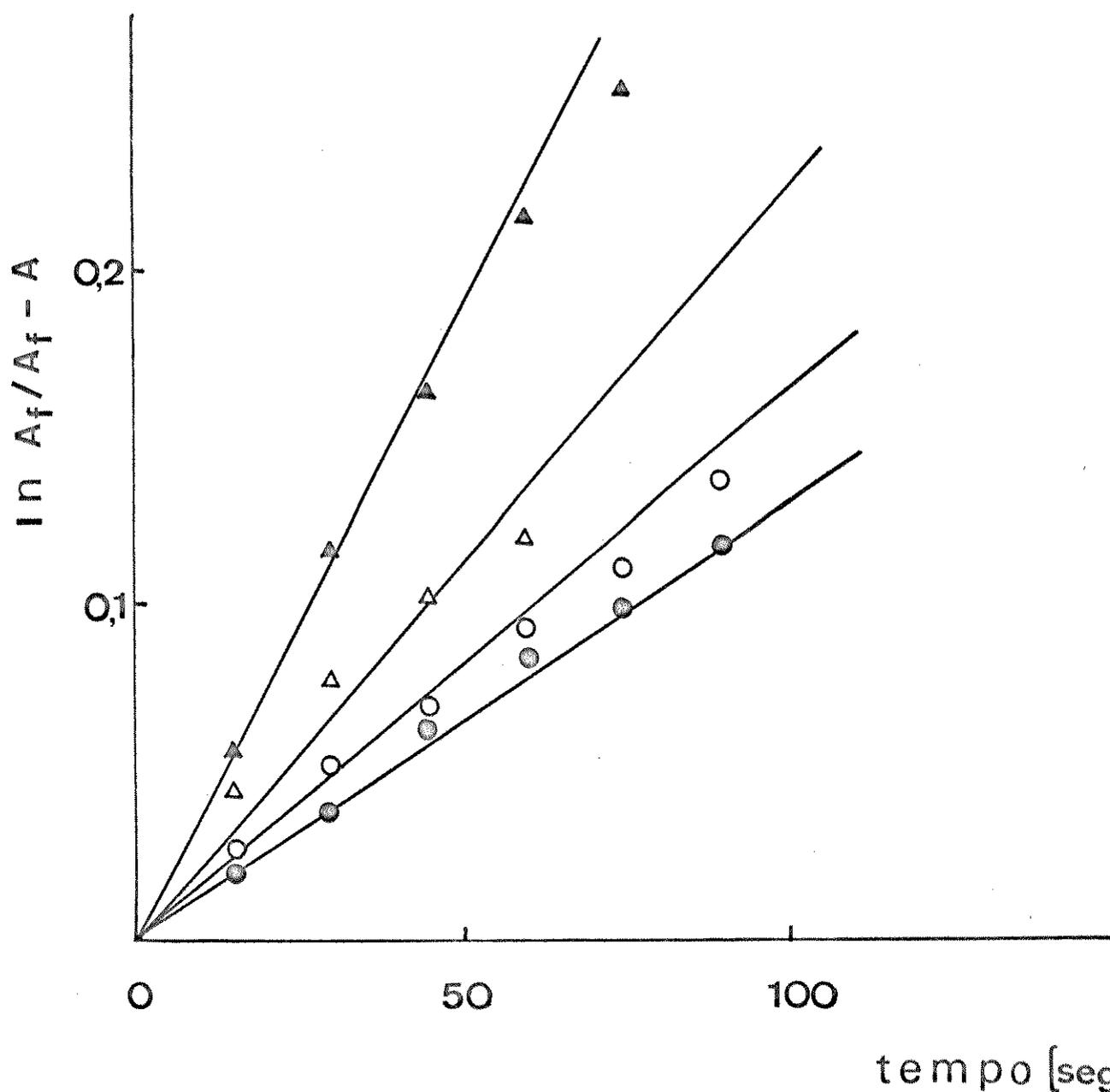


Fig. 4 Efeito de ATP 1mM sobre a velocidade de reação de pseudo primeira ordem da hemoglobina de *H. modestus* e *L. miliaris* com 4-PDS. Temperatura: 25°C Solvente: Tampão tris 0,1M pH 6,8. (\blacktriangle) hemoglobina de *L. miliaris* + ATP 1mM; (\triangle) hemoglobina de *L. miliaris* desionizada; (\bullet) hemoglobina de *H. modestus* + ATP 1mM; (\circ) hemoglobina de *H. modestus* desionizada.

Equilíbrio da hemoglobina com oxigênio

Estudos de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foram realizados tanto com o hemolisado total quanto com o maior componente obtido da focalização isoeletrica das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*. Os experimentos de equilíbrio com oxigênio foram feitos a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, num limite de pH entre 6,0 e 8,5, em ausência e em presença de ânions polifosfatos tais como ATP, GTP, 2,3 DPG e IHP, na concentração 1mM e na presença de sais como NaCl, CaCl_2 , KCl, EDTA e citrato de sódio, na concentração 5mM. Os resultados com o maior componente e com o hemolisado total revelaram-se muito semelhantes; as propriedades de oxigenação das hemoglobinas em ausência de íons e moléculas pequenas (hemoglobinas desionizadas) de *H.modestus* e *L.miliaris* apresentaram alta afinidade nos pH maiores que 7,0 e diminuíram substancialmente à medida que se acidificou o meio, conforme observamos nas Figs. 5a, 5b e 6. Em pH 7,0, por exemplo, a hemoglobina desionizada de *H.modestus* mostrou maior afinidade pelo oxigênio do que de *L.miliaris*, cujos valores de P_{50} foram 1,0mm de Hg e 1,41mm de Hg respectivamente. Quando a afinidade foi analisada em presença de ATP 1mM, os valores de P_{50} encontrados em pH 7,0 foram 8,91mm de Hg e 17,80mm de Hg em *H.modestus* e *L.miliaris* respectivamente (Figs. 5a, 5b e 6). De acordo com as Figs. 5a, 5b e 6 o efeito de 2,3 DPG foi menor do que de GTP e IHP 1mM. Os valores de P_{50} encontrados foram 4,16mm de Hg na *H.modestus* e 9,11mm de Hg em *L.miliaris*. A GTP teve efeito similar ao ATP nas duas serpentes; P_{50} encontrados foram 10,0mm de Hg na *H.modestus* e 16,98mm de Hg na *L.miliaris*. O modulador heterotrópico que atuou mais intensamente sobre a afinidade foi

IHP; os valores de P_{50} encontrados foram 15,84mm de Hg em *H.modestus* e 25,7mm de Hg em *L.miliaris*. As hemoglobinas de *L.miliaris* não foram afetadas pelo NaCl e KCl; por outro lado, $CaCl_2$ e EDTA mostraram efeitos distintos: o EDTA deslocou a curva de oxigenação para a direita, diminuindo significativamente a afinidade pelo oxigênio; o $CaCl_2$ aumentou ligeiramente a afinidade da hemoglobina pelo gás em relação à hemoglobina desionizada; o citrato de sódio teve efeito semelhante ao do EDTA. O efeito dos sais foi tanto maior quanto mais ácido o pH do meio (Fig. 7b). As hemoglobinas de *H.modestus* foram afetadas pelos sais no sentido de diminuir a afinidade. Dentre os ensaiados, os que demonstraram maior efeito foram EDTA e citrato de sódio, sendo seguidos por $CaCl_2$, KCl e NaCl que tiveram efeitos similares entre si, nos limites de pH estudados, isto é, entre pH 6,0 e 7,2 conforme observamos na Fig. 7a.

O coeficiente de Hill (n) que expressa o grau de interação entre sítios de ligantes na molécula de hemoglobina (WYMAN, 1948; 1964) variou de 0,98 a 1,56 na hemoglobina desionizada de *L.miliaris* e de 0,98 a 1,66 na hemoglobina de *H.modestus*, no intervalo de pH estudado, conforme Fig. 8. Em pH maiores que 7,0, tanto com hemoglobina desionizada quanto na presença dos sais NaCl, KCl, $CaCl_2$, EDTA e citrato de sódio, os valores de n oscilaram em torno de 1,0 em ambas as espécies, indicando ausência de interação entre os sítios de ligação de oxigênio. Entretanto, na presença de ânions polifosfatos, o mesmo não ocorreu, tendo os valores de n aumentados, oscilando ao redor de 1,5 a 2,0 dependendo do pH e do ânion presente (Fig. 8).

Conforme observamos na Tabela II e nas Figs. 5a e 5b, o efeito Bohr, calculado pela diferença dos valores de P_{50}

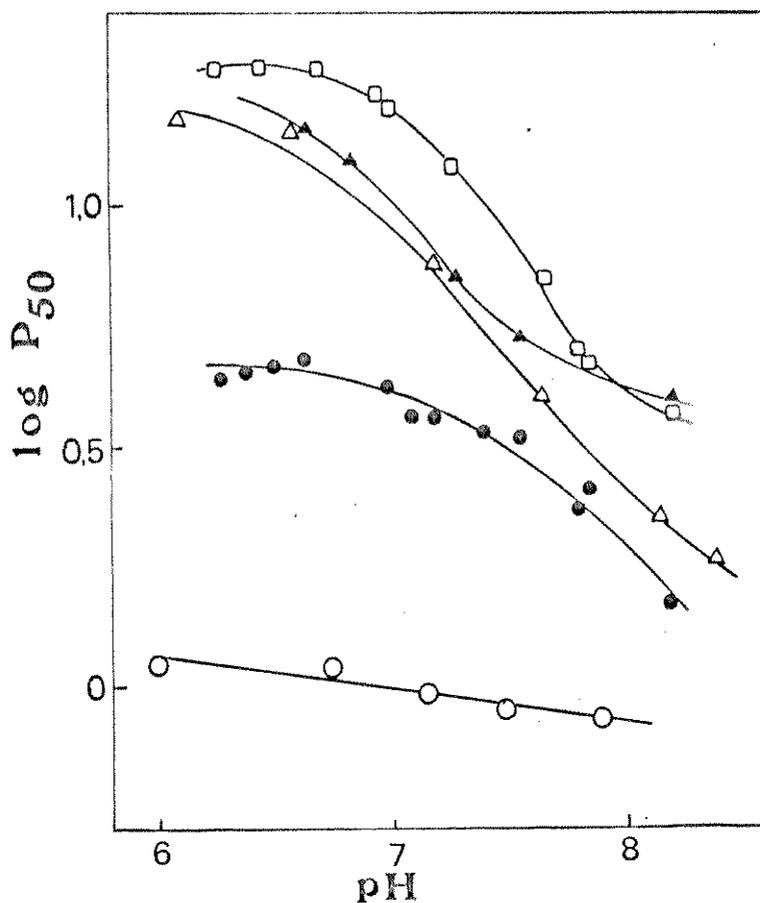


Fig. 5a Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% de hemoglobina (P_{50}) do hemolisado total de *H. modestus* em função do pH, em presença e em ausência de ânions polifosfatos: (O) hemoglobina desionizada; (●) hemoglobina + 2,3 DPG 1mM; (Δ) hemoglobina + ATP 1mM; (▲) hemoglobina + GTP 1mM; (□) hemoglobina + IHP 1mM. Solvente: tampão bis-tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM. Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8 mg/ml

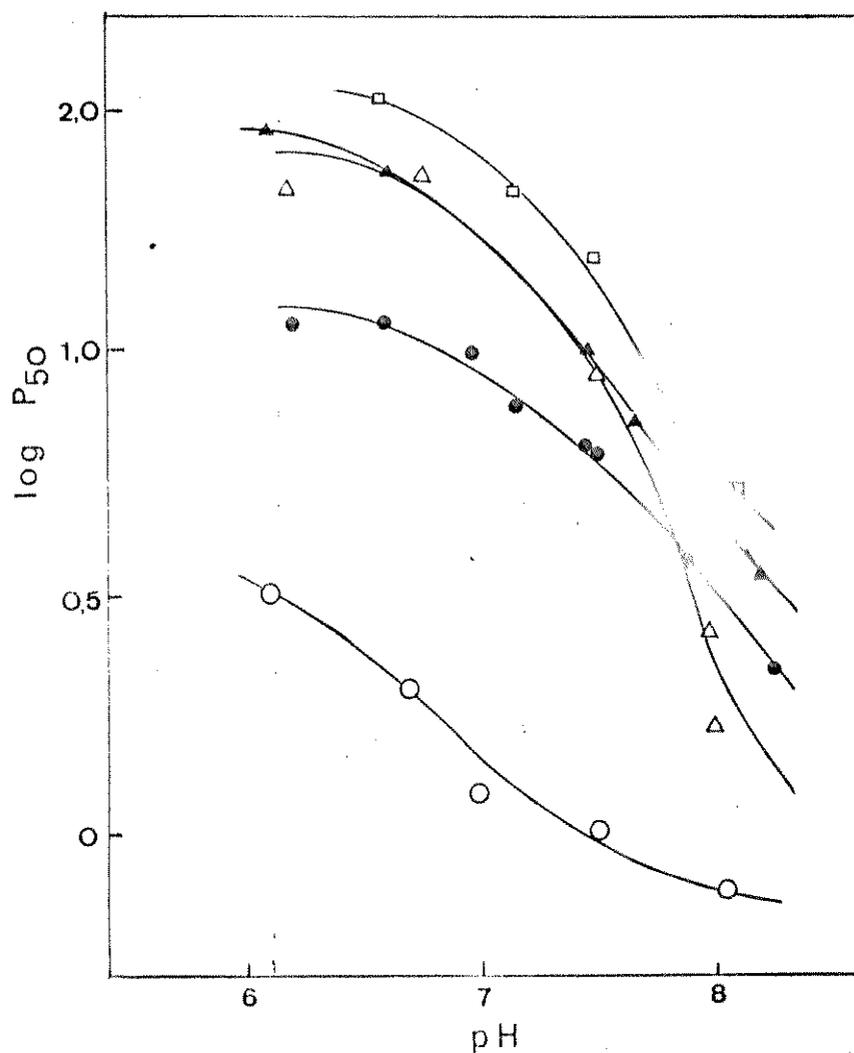


Fig. 5b Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% de hemoglobina (P_{50}) do hemolisado total de *L. miliaris* em função do pH, em ausência e em presença de ânions polifosfatos: (O) hemoglobina desionizada; (Δ) hemoglobina + ATP 1mM; (\blacktriangle) hemoglobina + GTP 1mM; (\bullet) hemoglobina + 2,3 DPG 1mM; (\square) hemoglobina + IHP 1mM; Solvente: tampão tris ou bis-tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM. Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8mg/ml.

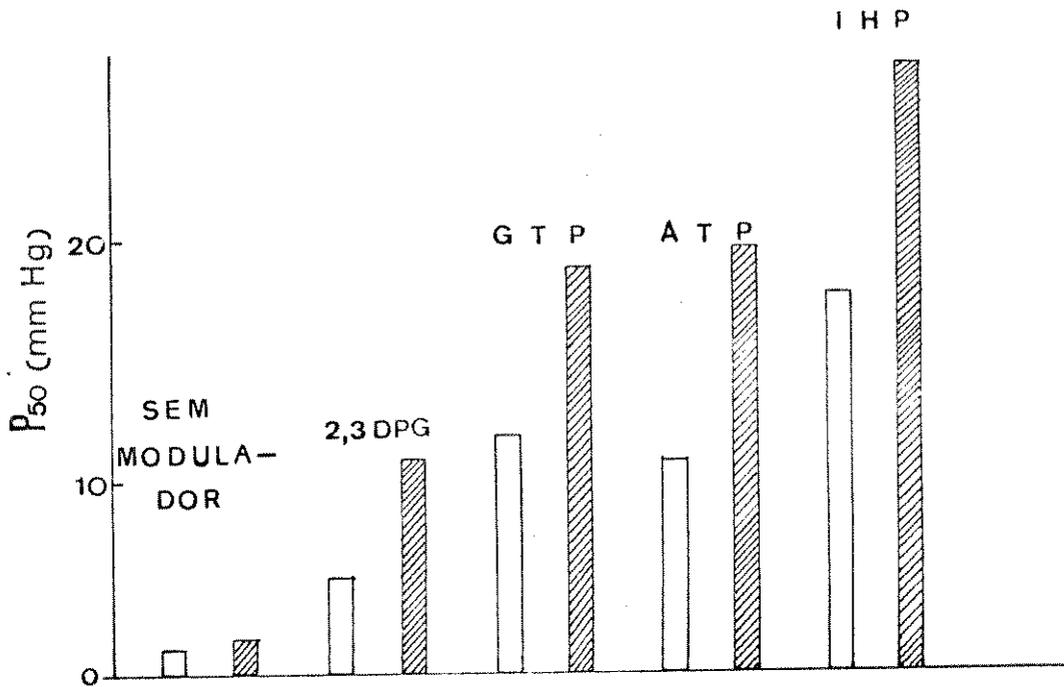


Fig. 6 Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% das hemoglobinas (P_{50}) do hemolisado total de *H. modestus* e *L. miliaris* em ausência e em presença de ânions polifosfatos. (□) *H. modestus*; (▨) *L. miliaris*. Solvente: tampão tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM, pH 7,0. Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8mg/ml.

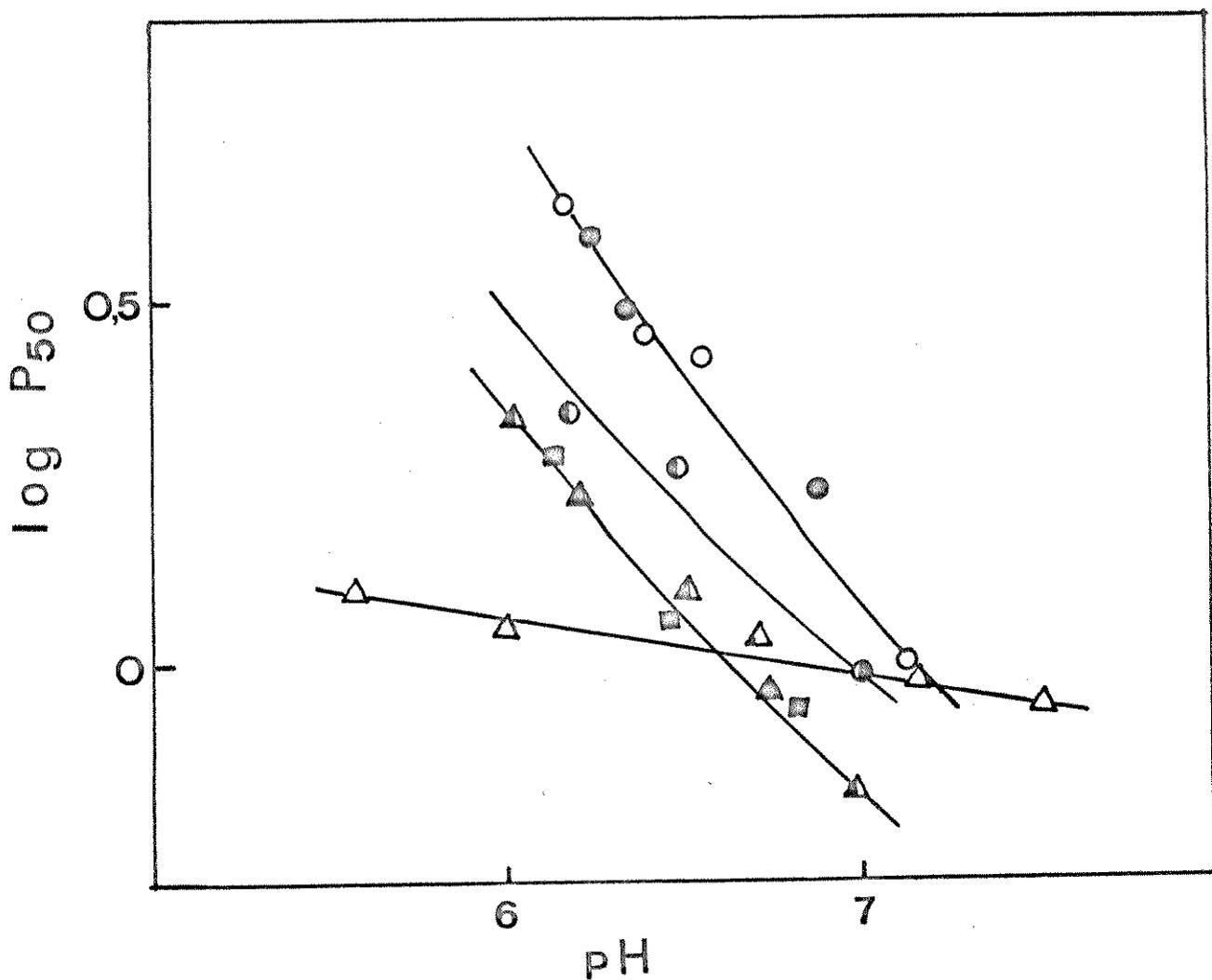


Fig. 7a Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% das hemoglobinas (P_{50}) do hemolisado total de *H. modestus* em função do pH, na presença de: (■) NaCl 5mM; (▲) KCl 5mM; (△) $CaCl_2$ 5mM; (●) citrato de sódio 5mM; (○) EDTA 5mM; (⊙) EDTA 1mM; (△) hemoglobina desionizada. Solvente: tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM. Temperatura: $25^{\circ}C \pm 0,5$. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8mg/ml.

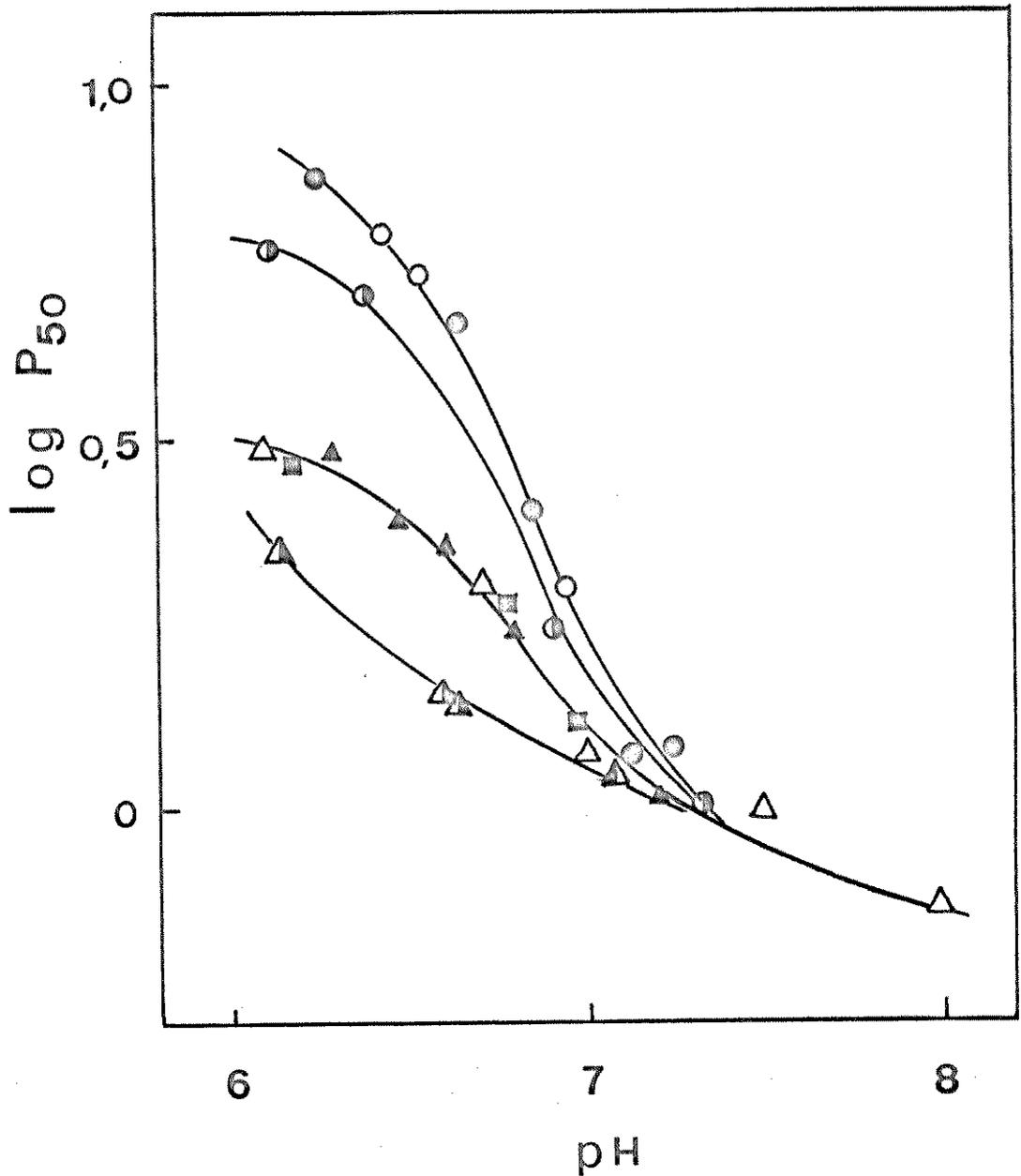


Fig. 7b Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% das hemoglobinas (P_{50}) do hemolisado total de *L. miliaris* em função do pH, na presença de: (■) NaCl 5mM; (▲) KCl 5mM; (▲) $CaCl_2$ 5mM; (●) citrato de sódio 5mM; (○) EDTA 5mM; (○) EDTA 1mM; (△) hemoglobina desionizada. Solvente: tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM. Temperatura: $25^{\circ}C \pm 0,5$. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8mg/ml.

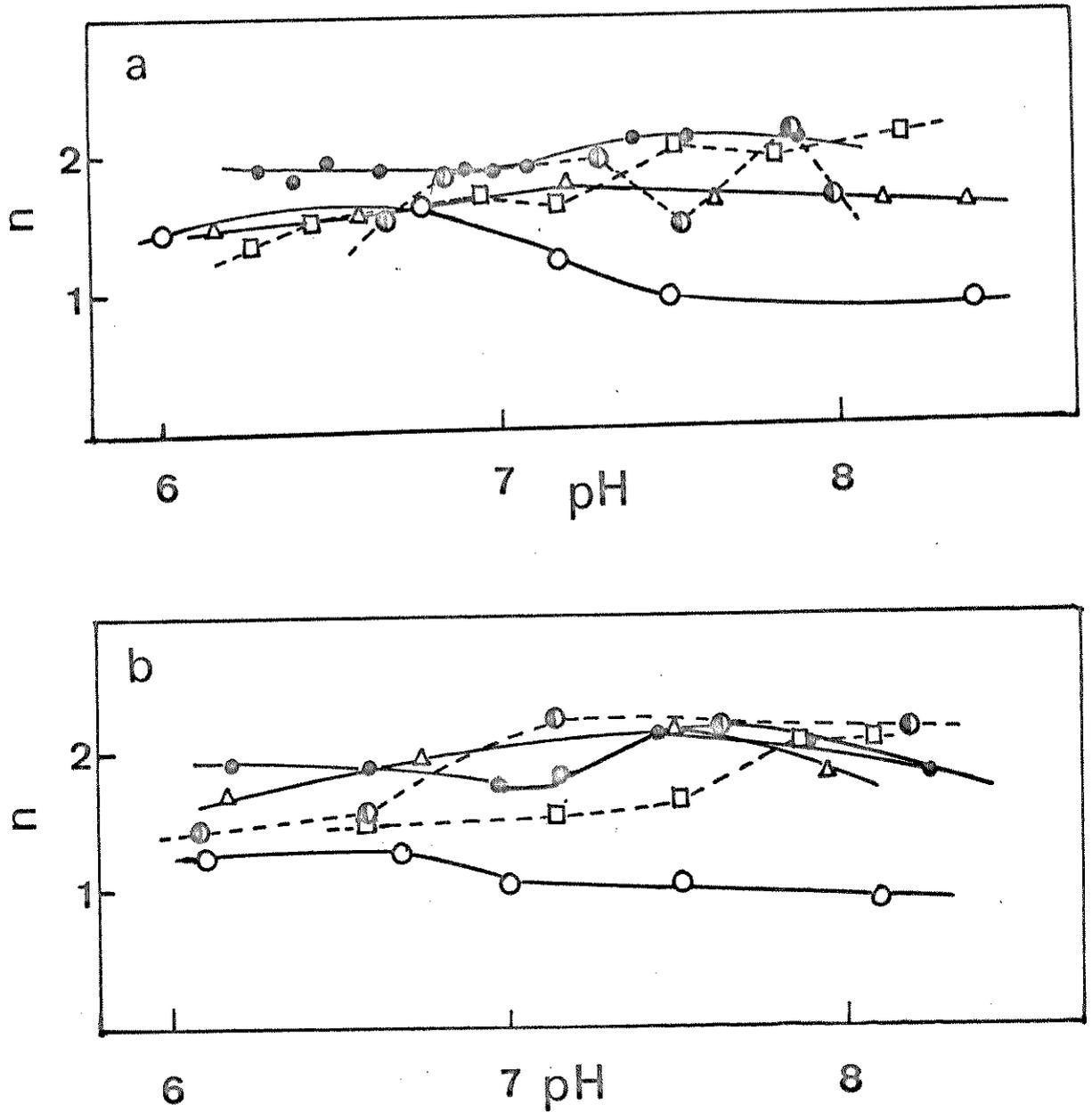


Fig. 8 Interação heme-heme, em função do pH, na ausência e em presença de ânions polifosfatos. (O) hemoglobina desionizada; (Δ) hemoglobina + ATP 1mM, (●) hemoglobina + GTP 1mM; (◐) hemoglobina + 2,3 DPG 1mM; (◑) hemoglobina + IHP 1mM; Solvente: tampão tris ou bis-tris, força iônica 0,05 e EDTA 0,1mM. Temperatura: 25°C ± 0,5. Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8mg/ml.

a. *H. modestus*

b. *L. miliaris*

TABELA II

Valores de efeito Bohr da hemoglobina de *H.modestus* e *L.miliaris* em presença de moduladores alostéricos, concentração 1mM, pH entre 7,0 e 8,0.

Solvente: tampão tris, força iônica 0,05, EDTA 0,1mM.

Temperatura: 25°C ± 0,5.

Concentração de hemoglobina: 0,6 a 0,8 mg/ml.

Modulador alostérico (1mM)	$\Delta \log P_{50} / \Delta pH$	
	<i>H.modestus</i>	<i>L.miliaris</i>
Ausente	-0,07	-0,30
2,3 DPG	-0,34	-0,45
GTP	-0,38	-0,60
ATP	-0,55	-0,90
IHP	-0,58	-0,66

no intervalo de pH entre 7,0 e 8,0, através da equação $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$, foi menor em *H.modestus* (-0,07) que em *L.miliaris* (-0,30), na forma desionizada. Pela adição de ATP 1mM, esses valores aumentaram para -0,55 para *H.modestus* e -0,90 para *L.miliaris*. Na presença de GTP, 2,3 DPG e IHP 1mM, os valores de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ encontrados em *H.modestus* foram -0,38, -0,34 e -0,58 e em *L.miliaris*, -0,60, -0,45 e -0,66.

Identificação de nucleotídeos em eritrócitos de *H.modestus* e *L.miliaris*

Dada a importância dos nucleotídeos na regulação da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, experimentos foram realizados para determinação qualitativa e quantitativa dos nucleotídeos nos eritrócitos das serpentes, em coluna cromatográfica de Dowex 1-X₈, utilizando-se extrato tricloracético de células vermelhas de *H.modestus* e *L.miliaris*, essencialmente segundo o método descrito por BARTLETT & BORGESE, 1976; BARTLETT, 1968. A coluna cromatográfica de Dowex 1-X₈ (1cm x 15cm) foi padronizada com uma solução contendo a mistura de AMP, ADP, ATP e GTP, os quais foram eluídos nos seguintes volumes: 25ml, 150ml, 230ml e 300ml respectivamente. O eluente empregado foi 500ml de um gradiente linear 0 - 5M formiato de amônio. Uma vez padronizada, a coluna foi ensaiada com extrato tricloracético neutralizado com KOH, de hemácias de *H.modestus* e *L.miliaris*, obtendo-se volumes de eluição de 25ml, 150ml, 220ml, 300ml e 20ml, 160ml, 230ml e 290ml respectivamente. Os nucleotídeos isolados foram identificados pelos seus volumes de eluição e confirmados

pela análise dos picos de eluição em cromatografia em papel (Catálogo P.L. Biochemicals Inc, 1977). A análise do perfil indicou que na espécie *H.modestus* é o ATP o nucleotídeo presente em maior concentração (56%), enquanto que na espécie *L.miliaris* é o GTP (41%). As proporções dos demais nucleotídeos foram: GTP (20%), ADP (18%) e AMP (6%) para *H.modestus* e ADP (27%), ATP (23%) e AMP (9%) na *L.miliaris* (Figs. 9a e 9b).

Efeito de agentes desnaturantes: benzoato de sódio, uréia e álcali, em ausência e em presença de ATP 1mM, sobre hemoglobina de *H.modestus* e *L.miliaris*

A velocidade de desnaturação das oxihemoglobinas de serpentes *H.modestus* e *L.miliaris* em presença de uréia 7M, benzoato de sódio 1M e NaOH 0,1M em ausência e em presença de ATP 1mM, foi determinada pelo método espectrofotométrico (AIROLDI et alii, 1978). A desnaturação foi expressa como reação de pseudo primeira-ordem e a constante cinética foi calculada pela equação:

$$k = 1/t \cdot \ln A_0/(A_0-A)$$

As constantes cinéticas de desnaturação de hemoglobina de *H.modestus* e *L.miliaris* encontram-se na Tabela III e Figs. 10a e 10b.

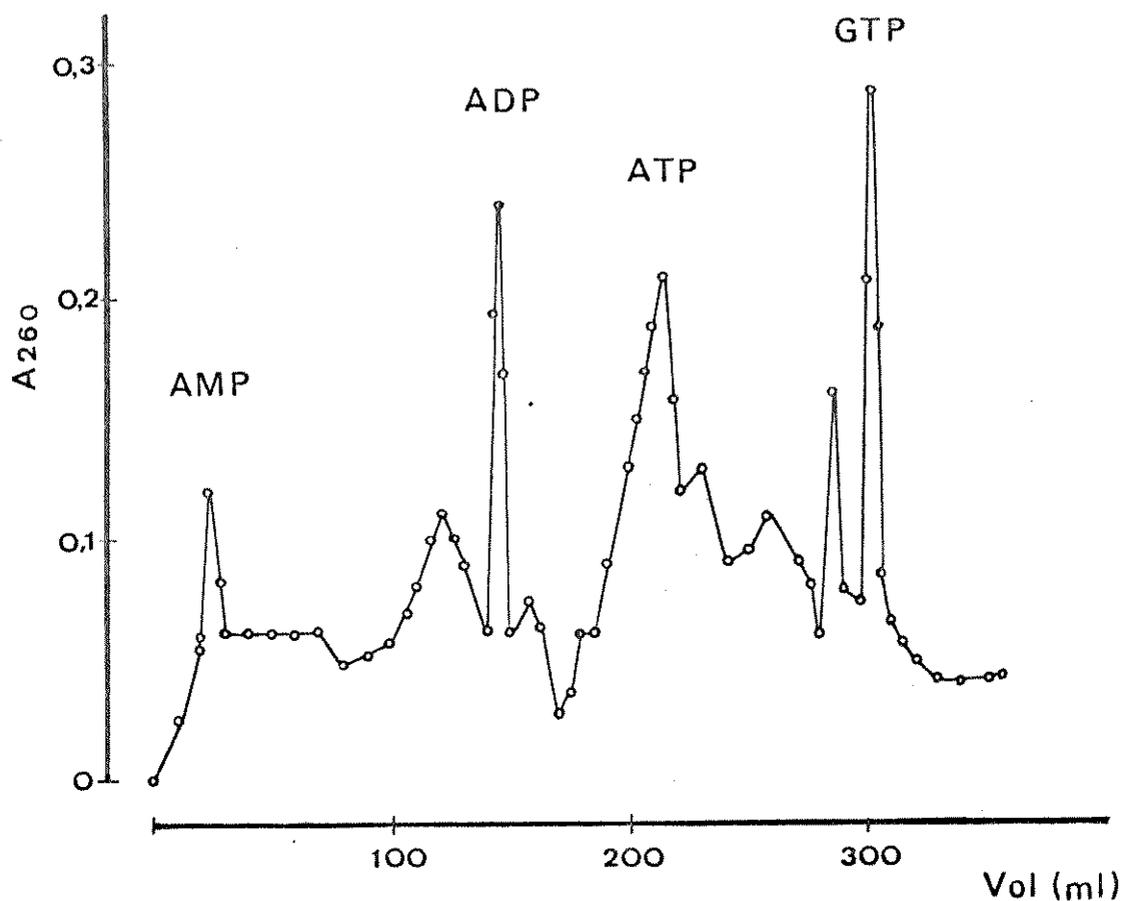


Fig. 9a Perfil cromatográfico de eluição dos nucleotídeos de eritrócitos de *H. modestus*. Extrato de ácido tricloroacético de 0,6ml de células vermelhas, cromatografado em coluna (1x15cm) de Dowex 1-X₈ (200-400mesh) eluido com 500ml de gradiente linear 0-5M formiato de amônio (4 partes de ácido fórmico e 1 parte de formiato de amônio); absorvância: 260nm.

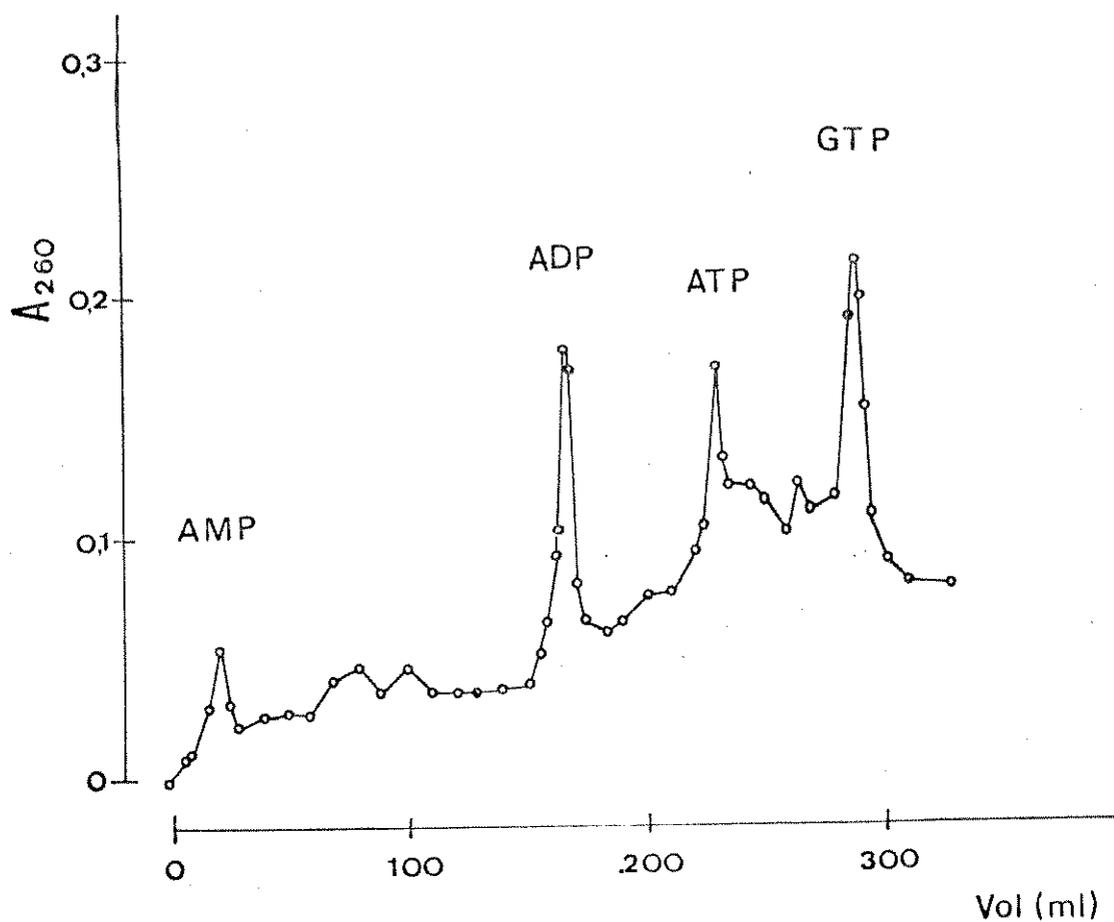


Fig. 9b Perfil cromatográfico de eluição dos nucleotídeos de eritrócitos de *L.miliaris*. Extrato de ácido tricloracético de 0,36ml de células vermelhas, cromatografado em coluna (1x15cm) de Dowex 1-X₈ (200-400mesh) eluído com 500ml de gradiente linear 0-5M formiato de amônio (4 partes de ácido fórmico e 1 parte de formiato de amônio); absorvância: 260nm.

TABELA III

Constante cinética de reação de pseudo primeira-ordem (k') de desnaturação das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* em ausência e em presença de ATP, com diferentes agentes desnaturantes.

Agente desnaturante	Modulador alostérico (1mM)	k' (min^{-1})	
		<i>H.modestus</i>	<i>L.miliaris</i>
NaOH	ausente	2,920	2,000
NaOH	ATP	3,400	3,222
Benzoato 1M	ausente	1,066	1,300
Benzoato 1M	ATP	1,066	1,200
Uréia 7M	ausente	0,120	0,606
Uréia 7M	ATP	0,194	0,120

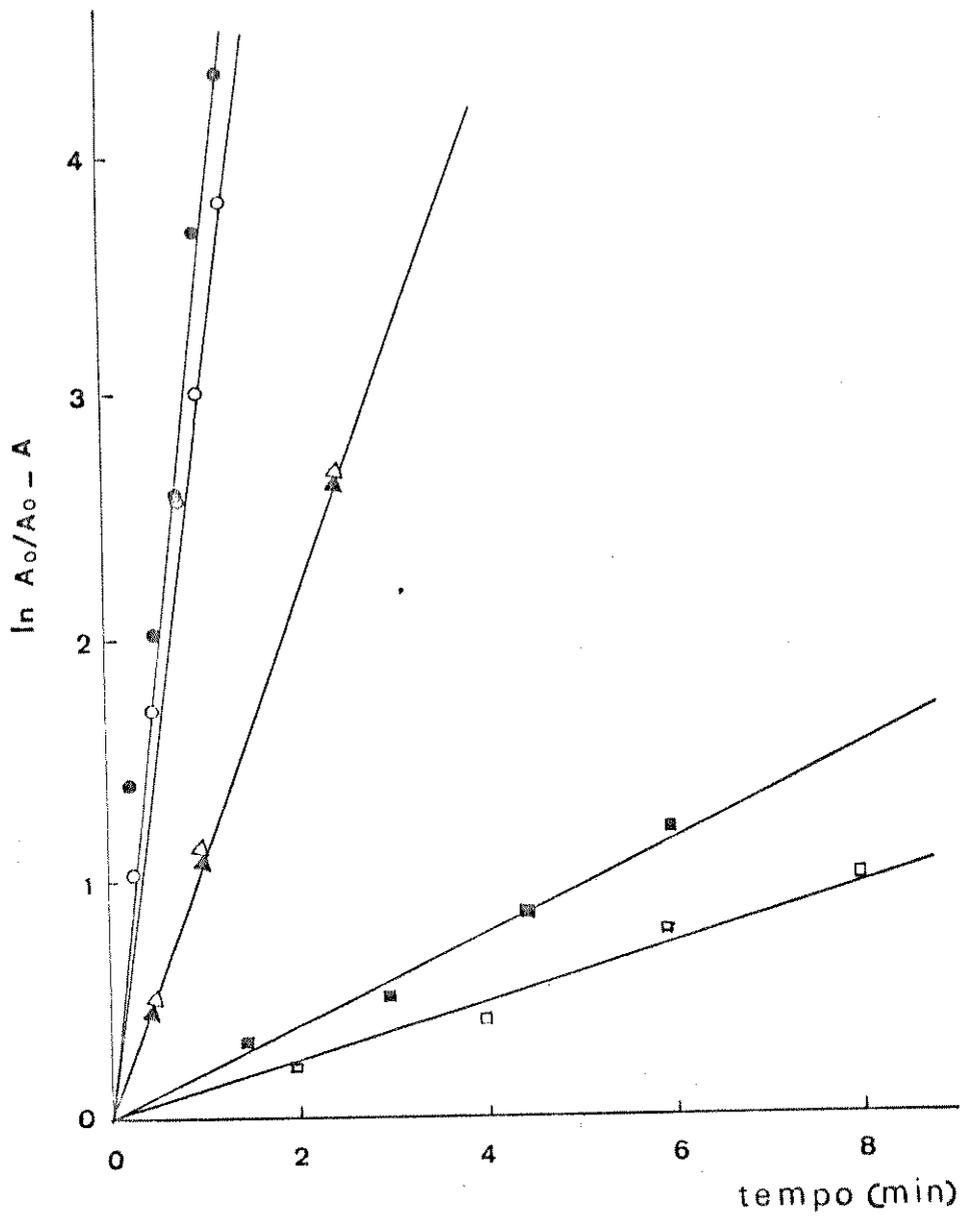


Fig. 10a Cinética de desnaturação da hemoglobina de *H. modestus*:
 (●●) álcali; (△△) benzoato de sódio 1M; (□■) uréia 7M.

(○ △ □) hemoglobina desionizada

(● ● ▲ ■) hemoglobina contendo ATP 1mM.

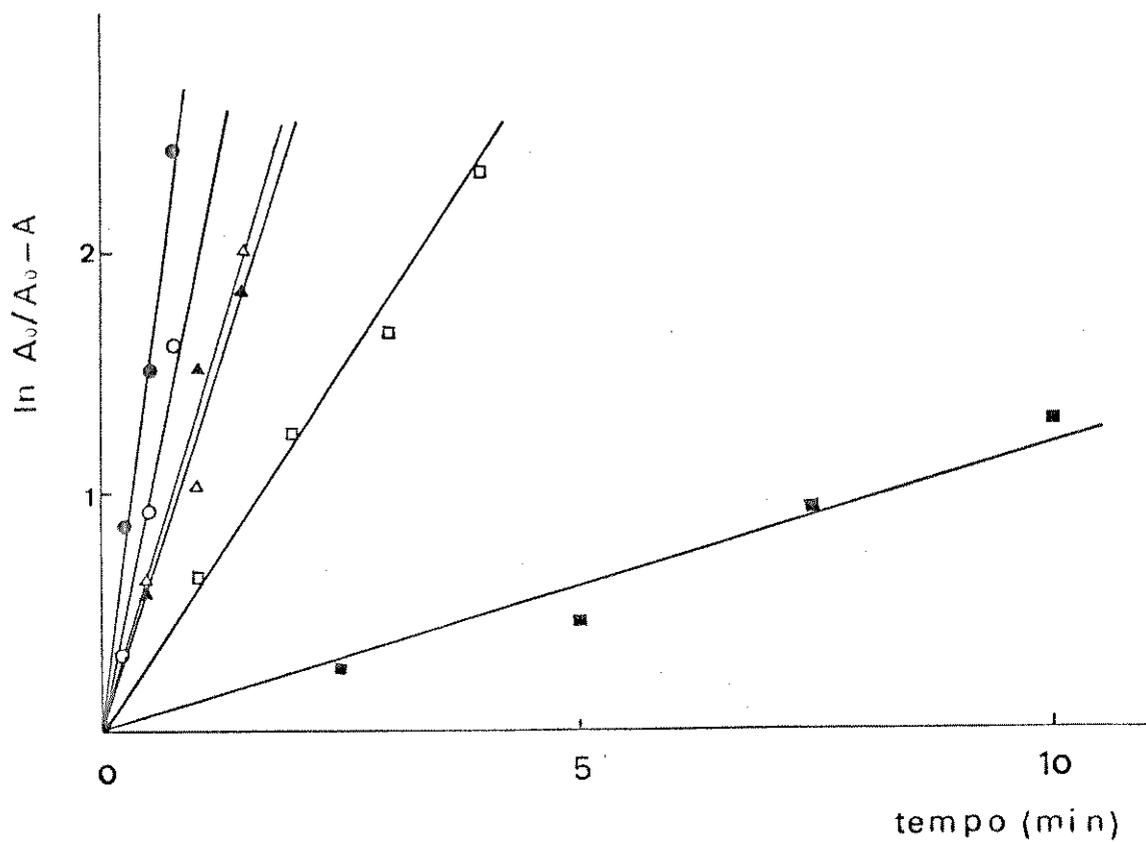


Fig. 10b Cinética de desnaturação da hemoglobina de *L. miliaris*:
 (O●) álcali; ($\Delta\Delta$) benzoato de sódio 1M; ($\square\square$) uréia 7M.

(O Δ \square) hemoglobina desionizada

(● \blacktriangle \blacksquare) hemoglobina contendo ATP 1mM.

D I S C U S S Ã O

As necessidades de oxigênio dos animais inferiores são bastante variadas, dando origem a adaptações respiratórias das mais diversas (BRUNORI et alii, 1973a). Os répteis estão entre aqueles animais que variam amplamente tanto do ponto de vista do comportamento quanto na seleção do "habitat" incluindo espécies exclusivamente aquáticas e aquelas extremamente terrestres (WOOD & JOHANSEN, 1974). Assim, os répteis mergulhadores e os que vivem em tocas estão expostos a níveis baixos de oxigênio por período prolongado (ANDERSEN, 1966). Os crocodilos, lagartos, ofídios e tartarugas, por exemplo, conseguem sobreviver cêrca de 45 minutos a 22°C em completa ausência de oxigênio. Além disso, os animais poiquiloterms estão sujeitos a grande diversidade de temperatura e portanto, à oscilação na velocidade metabólica. Dessa forma, é possível que uma das adaptações que suas hemoglobinas tenham sofrido em resposta a essa diversidade de "habitat" e temperatura, seja a multiplicidade de componentes, na verdade muito comum entre os répteis (SULLIVAN, 1977; WEBER et alii, 1975).

Em nosso trabalho com hemoglobina das serpentes *H.modestus* e *L.miliaris*, separamos 3 e 5 componentes respectivamente, empregando-se a técnica de isoeletrofocalização em gradiente de sacarose, conforme comentamos acima. Contudo tal multiplicidade pode resultar de interferências de diversos mecanismos (RIGGS, 1970), entre eles, a combinação das moléculas proteicas com outras moléculas, produzindo alteração na conformação ou até no estado de agregação das subunidades da hemoglobina, tendo

consequentemente marcado efeito na mobilidade eletroforética. Assim, a agregação de tetrâmero ($\alpha_2\beta_2$ que tem peso molecular 65000) a agregados maiores (peso molecular 130000) ocorre frequentemente em hemolisado de répteis e anfíbios (SVEDBERG & HEDENIUS, 1934; SULLIVAN, 1974a e 1974b). A presença desses polímeros que parecem envolver ligação -SS- intermolecular poderia ser uma das causas da multiplicidade de componentes hemoglobinas (SULLIVAN & RIGGS, 1967a). Os grupos -SH de hemoglobina de animais mais evoluídos como os vertebrados, por exemplo, seguem uma tendência termodinâmica, oxidando-se espontaneamente a -SS- com o tempo (NASCIMENTO et alii, 1982).

Em nossos estudos, procuramos evitar essas interferências, trabalhando com hemoglobinas +EDTA e controlando frequentemente o peso molecular onde foram evidenciadas, exclusivamente, espécie molecular cujo peso molecular era da ordem de 64000 daltons. Conforme nossos resultados através de testes imunológicos, das 5 frações de hemoglobinas separadas em *L.miliaris*, apenas 1 se revelou antígenicamente diferente dos demais. Já em *H.modestus* todos os componentes separados foram antígenicamente semelhantes. Por outro lado, não foi possível separar de forma sistemática, as diversas frações do hemolisado nessas serpentes por técnicas usuais como cromatografia em resina de troca iônica ou eletroforese, possivelmente devido a grande proximidade dos pI dos diversos componentes. Não obstante o número de componentes presentes, os estudos funcionais de hemoglobina tanto do hemolisado total como do componente de maior concentração obtido por focalização isoelétrica revelaram-se semelhantes em ambas as serpentes, dentro das limitações de nossas medidas. Por essa razão, passamos a utilizar apenas o hemolisado total

na realização dos experimentos. Isso, evidentemente, não significa que as propriedades funcionais dos diversos componentes não sejam distintas, mas devido às suas pequenas concentrações em relação ao maior componente (cerca de 10% do hemolisado total) suas participações seriam imponderáveis em termos de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, em relação ao hemolisado total.

Como ficou estabelecido no trabalho de OGO et alii, 1979, as duas serpentes tem adaptações motoras e anatômicas diferentes: *H.modestus*, a serpente mais lenta é mais adaptada à vida aquática do que *L.miliaris* que é mais ativa e tem morfologia de serpentes terrestres. Essas diferenças em "habitat" e comportamento podem induzir adaptações nas moléculas de hemoglobinas para que, através de suas propriedades funcionais, possam melhor atender às necessidades metabólicas de cada animal (BONAVENTURA et alii, 1975). Nesse contexto, é de interesse conhecer-se as propriedades funcionais das hemoglobinas e suas interações com íons e moléculas que estão normalmente presentes nos eritrócitos.

A maior parte dos estudos de transporte de oxigênio em serpentes relatados na literatura, foi realizada ou com eritrócitos lavados ou com solução de hemoglobina; faltam, entretanto, distinguir adequadamente entre propriedades intrínsecas da molécula de hemoglobina e as modificações dessas propriedades determinadas pela interação das proteínas com o meio intra-eritrocítico. Os nossos estudos, realizados com solução de hemoglobinas, demonstraram que as propriedades de transporte de oxigênio se alteram sempre que as proteínas interagem com ânions polifosfatos, tanto em *H.modestus* quanto em *L.miliaris*. Assim,

de RAPOPORT & GUEST, 1941. De acordo com esses estudos, o 2,3 DPG, o ânion polifosfato de maior concentração em hemácias de mamíferos, não estava presente nos eritrócitos de aves e serpentes e o IPP estava presente em altas concentrações em hemácias de aves e ausente em répteis, com algumas exceções como em certas espécies de tartarugas. Assim, dentre os fosfatos orgânicos presentes normalmente em eritrócitos de vertebrados, apenas ATP e GTP parecem ser fisiologicamente importantes na regulação da afinidade das hemoglobinas pelo oxigênio nas serpentes. Conforme descrito acima, na presença de ATP e GTP, a curva de dissociação da hemoglobina desloca-se para a direita em ambas as serpentes, e o acréscimo do valor de P_{50} em pH 7,0 foi menor em *H.modestus* do que em *L.miliaris*, passando de 1,0mm de Hg a 8,91mm de Hg e 10mm de Hg em presença de ATP e GTP respectivamente. Em *L.miliaris*, o aumento de P_{50} foi de 1,41mm de Hg a 17,81mm de Hg e a 16,98mm de Hg em presença dos moduladores. Esses resultados estão de acordo com o padrão de atividade em ambas as cobras. *L.miliaris* que tem maior nível de excitabilidade, tem maior necessidade de oxigênio, e devido a baixa constante de afinidade pelo oxigênio, a hemoglobina oferece maior capacidade de liberar o gás para os tecidos. *H.modestus*, serpente com menor capacidade de reagir a estímulos mecânicos tem constante de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio maior (OGO et alii, 1979). Embora o 2,3 DPG e IHP não tenham sido encontrados integrando as hemácias de serpentes (BARTLETT, 1978), esses ânions polifosfatos também atuam como moduladores no transporte de oxigênio, diminuindo a afinidade da proteína pelo gás, do mesmo modo que o ATP ou GTP, em ambas as serpentes. Assim, em *H.modestus*, os valores de P_{50} encontrados em pH 7,0 foram 4,16 mm

de Hg em presença de 2,3 DPG e 25,48mm de Hg em presença de IHP e em *L.miliaris*, 9,11mm de Hg e 25,70mm de Hg respectivamente. É muito possível que o sítio específico de ligação dos fosfatos orgânicos estudados, sejam comuns na molécula proteica, como nas hemoglobinas humana e de galinha (BRYGIER et alii, 1975).

Além dos nucleotídeos, outros íons moduladores como prótons, tem papel relevante na avaliação da capacidade funcional da proteína nas condições do meio interno. Nossos estudos revelaram que fosfatos orgânicos aumentam o efeito de prótons sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; na hemoglobina desionizada, o efeito Bohr que pode ser expresso pela razão $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$, de -0,07 em *H.modestus*, passou a -0,55 na presença de ATP e a -0,38, -0,34 e -0,58 na presença de GTP, 2,3 DPG e IHP respectivamente. Em *L.miliaris*, $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ encontrados foram -0,30, -0,90, -0,60, -0,45 e -0,66 na hemoglobina desionizada e em presença de ATP, GTP, 2,3 DPG e IHP respectivamente, indicando que o pigmento respiratório da espécie menos aquática, *L.miliaris*, mostra efeito Bohr mais pronunciado nas condições estudadas, do que *H.modestus*. O maior efeito Bohr encontrado em hemoglobina de *L.miliaris* permitiria, portanto, a descarga adequada de oxigênio aos tecidos mesmo em condições de relativa acidose devido a sua baixa afinidade pelo oxigênio em pH baixo, condição esta que pode ser alcançada pela serpente em estado de "stress", revelada pelo conteúdo de ácido lático no sangue. A hemoglobina de *H.modestus* que tem menor efeito Bohr não poderia utilizar semelhante vantagem nas mesmas proporções em condições de acidose. Contudo o conteúdo de ácido lático encontrado no sangue desta serpente submetida a estimulação, é menor, sugerindo menor nível de excitabilidade na mesma. *L.miliaris*

está sujeita mais frequentemente a condições de acidose e a oxigenação tecidual não estaria prejudicada pela diminuição de pH uma vez que a afinidade da hemoglobina pelo gás diminui e a sua liberação para os tecidos estaria facilitada (OGO et alii, 1979). É interessante observar que os nossos resultados corroboram aqueles encontrados por RUBEN, 1976, nos quais as cobras mais ativas tendem a apresentar maior consumo de oxigênio e quando estimuladas, os níveis de lactato se elevam mais do que nas espécies mais lentas estudadas pelo autor. Uma vez que o transporte de oxigênio é facilitado pela diminuição da afinidade da proteína pelo oxigênio a pH baixo, o animal mostra maior capacidade de metabolismo aeróbico. O efeito Bohr é, pois, um parâmetro que se relaciona de modo fundamental com as necessidades respiratórias dos animais (RIGGS, 1970). Existem, entretanto, como vimos, discórdia entre pesquisadores, com referência ao valor adaptativo do efeito Bohr em vertebrados mergulhadores.

Do mesmo modo que o efeito Bohr e o efeito de fosfatos orgânicos, a cooperatividade na ligação de oxigênio originado da interação homotrópica é relevante no transporte eficiente de oxigênio pela hemoglobina. A cooperatividade na ligação de oxigênio nas proteínas respiratórias das serpentes estudadas não foi significativamente influenciada por prótons; o valor do coeficiente de Hill, n , variou de 1,0 a 1,6 em ambas as espécies entre pH 6,0 e 8,0, quando as hemoglobinas estavam desionizadas. As proteínas tornaram-se mais cooperativas na presença de fosfatos orgânicos, tendo os valores de n aumentados, isto é, oscilando entre 1,5 e 2,0. Isso sugere a possibilidade de ligação e desligamento de oxigênio da hemoglobina quando ocorre pequena mudança na pressão do gás, efeito classicamente

conhecido como efeito homotrópico.

É conhecido por mais de uma década que ânions monovalentes como cloretos tem influência sobre a curva de dissociação da hemoglobina humana, diminuindo sua afinidade pelo oxigênio e aumentando o efeito Bohr alcalino (BUNN & GUIDOTTI, 1972; BENESCH et alii, 1969). O íon Cl^- tem maior afinidade pelo oxigênio quando a hemoglobina está sob a forma desoxigenada (CHIANCONE et alii, 1972) e a afinidade Hb-O_2 diminui com o acréscimo na concentração do íon (BUNN & GUIDOTTI, 1972; BENESCH et alii, 1969). Foi demonstrado que não somente a afinidade, mas também o número de prótons dissociado com a oxigenação é fortemente dependente de íons cloreto (ROLLEMA et alii, 1975). Na presente tese, apresentamos os resultados preliminares referentes a influência de íons cloreto sobre a afinidade das hemoglobinas de serpentes pelo oxigênio e sobre o efeito Bohr. As medidas foram realizadas utilizando-se vários sais de cloreto, isto é, NaCl , KCl e CaCl_2 , em concentração 5mM. Em *H.modestus* esses sais diminuíram a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio entre pH 6,0 e 7,0. O efeito Bohr nesse intervalo de pH foi normal, da ordem de -0,50. Em *L.miliaris*, a curva de dissociação da hemoglobina bem como o efeito Bohr não foram significativamente influenciados por NaCl e KCl nos limites de pH estudados. O CaCl_2 deslocou a curva de dissociação ligeiramente para a esquerda, aumentando a afinidade pelo oxigênio. Essa diferença funcional observada entre as hemoglobinas das duas serpentes pode sugerir diferenças conformacionais, isto é, a nível de estrutura terciária-quaternária, entre as duas proteínas, no sítio de ligação do ânion, uma vez que um dos principais amino ácidos envolvido na ligação de cloretos, a valina 1α (VAN BEEK & DE BRUIN,

1980) está presente na molécula de hemoglobina de ambas as espécies estudadas (MATSUURA, 1982).

Outro aspecto relativo aos estudos funcionais de hemoglobinas das serpentes é o que diz respeito ao efeito de quelantes. Como nos referimos, os processos de purificação e coleta de materiais foram realizados em presença de EDTA 1mM.

SANNES & HULTQUIST, 1979, observaram que EDTA em concentração 0,5mM estimula a redução de metahemoglobina em 60% a 70% no hemolisado de eritrócitos humanos. O EDTA pode também agir removendo ou inibindo cátions ou formando complexo que é capaz de sofrer reação de oxidação. Um possível complexo é aquele formado entre o ferro presente no hemolisado e EDTA (complexo Fe-EDTA). De acordo com SHIMIZU & BUCCI, 1974, o EDTA pode, além disto, atuar como modulador alostérico de hemoglobina da mesma forma que os fosfatos orgânicos, diminuindo a afinidade pelo oxigênio. Os nossos estudos sobre a influência do EDTA na curva de oxigenação das serpentes revelaram que altas concentrações de EDTA (1mM ou mais) aumentam significativamente os valores de P_{50} bem como o efeito Bohr na região ácida (pH 6,0 a 7,0). Entretanto, não foi possível estudar a afinidade da hemoglobina de serpentes em ausência de EDTA devido a oxidação e precipitação da proteína durante o experimento. Portanto, para reduzir tanto quanto possível o efeito do quelante, trabalhamos em presença de 0,1mM de EDTA, isto é, 10 vezes mais diluído que o utilizado pela maioria dos pesquisadores. O citrato de sódio, que também tem efeito quelante de cátions, influencia a curva de dissociação do pigmento de ambas as serpentes de maneira semelhante ao EDTA.

IMAIZUMI et alii, 1979, descreveram que íons Ca^{++}

e Mg^{++} atuam sobre a molécula de hemoglobina humana, aumentando a dissociação em dímeros, efeito esse, diversas vezes maior do que aquele apresentado pelo NaCl ou KCl. O aumento da afinidade pelo oxigênio em presença de $CaCl_2$ 5mM, observado na hemoglobina da serpente *L.miliaris*, não pode ser explicado pelo mecanismo de dissociação, uma vez que a concentração de Ca^{++} estava muito aquém daquela necessária para dissociar a molécula (maior que 0,3M). Por outro lado, todo o estudo de afinidade foi realizado em presença de EDTA 0,1mM e conhecendo-se o efeito do quelante sobre as propriedades funcionais da hemoglobina, é possível que o efeito de EDTA tenha sido anulado pela reação entre Ca^{++} e o quelante, deslocando a curva de dissociação para a esquerda.

Em *H.modestus*, tanto o íon cloreto quanto o EDTA influenciam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumentando o valor de P_{50} . Como proposto em *L.miliaris*, a presença de Ca^{++} eliminaria o efeito do EDTA sobre a molécula proteica e a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio seria maior devido ao íon cloreto presente como $CaCl_2$; os valores de P_{50} continuariam elevados, numericamente intermediários entre aqueles encontrados com hemoglobinas desionizadas e com hemoglobinas contendo KCl ou NaCl. É interessante observar que em pH 7,0 ou mais alto, a curva de dissociação da hemoglobina em presença de sais na concentração 5mM se aproxima daquela da mioglobina e o efeito cooperativo entre os hemes tende a desaparecer, sugerindo dissociação das subunidades. Foi descrito por RIGGS, 1965, que sob determinadas condições, como por exemplo, pH extremos, alta concentração de sais ou diluição extrema, tendem a alterar o equilíbrio da constante de dissociação da hemoglobina, modificando

o grau de agregação das subunidades e conseqüentemente a afinidade pelo oxigênio e o efeito Bohr. Entretanto em HbI de truta, o efeito de sais, estudado em presença de concentração crescente de NaCl, citrato de sódio e dextran sulfato de sódio (entre 0 e 0,5M) não mostrou nenhum efeito de dissociação do tetrâmero, e o valor de n manteve-se próximo a 2,0 (AIROLDI et alii, 1981). Desde que a tendência das hemoglobinas de diferentes animais em se dissociar nas respectivas subunidades varia grandemente (RIGGS, 1965), é possível que nas serpentes, as unidades tetraméricas sejam mais susceptíveis à dissociação. Pelos resultados, observamos que os valores de n , mesmo em hemoglobinas desionizadas de ambas as serpentes, variam em torno de 1,0 em pH acima de 7,0. Pode-se conjecturar, então, que o comportamento dessas hemoglobinas pode resultar, simplesmente, de uma mudança no arranjo e contacto entre as subunidades da macromolécula quando ocorre a ligação de ligantes homotrópicos. Dessa forma, dissociação ou associação de subunidades poderiam estar afastadas (WYMAN, 1979).

Os fosfatos orgânicos que influenciam as propriedades alostéricas das hemoglobinas diminuindo sua afinidade pelo oxigênio, alteram reversivelmente a reatividade dos grupos -SH da proteína com a oxigenação e desoxigenação (RIGGS, 1961; BENESCH & BENESCH, 1962); foi, pois, interessante correlacionar mudanças conformacionais que ocorrem na molécula proteica durante a ligação de ligantes e alteração na reatividade de grupos -SH. Nas hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* foram determinados 11 e 8 grupos -SH por tetrâmero, através de reação com 4-PDS. Os mesmos resultados foram encontrados por MATSUURA, 1982, através da titulação de grupos tióis acessíveis com PCMB.

A determinação de grupos sulfidrila reativos em hemoglobinas desoxigenadas e desionizadas de *H.modestus* e *L.miliaris* em presença de ATP 1mM, revelaram 8 e 5 -SH por tetrâmero respectivamente. Na hemoglobina desoxigenada contendo ATP 1mM, 5 e 4 -SH por tetrâmero foram titulados.

Em vista desses resultados podemos sugerir que a ligação de moduladores como fosfatos orgânicos, determina mudanças conformacionais na molécula, alterando a acessibilidade dos grupos tióis tituláveis. Essas mudanças conformacionais estão associadas a uma diminuição na disponibilidade de grupos tióis, a exemplo da hemoglobina humana, quando ocorre transição reversível entre as formas T e R (TAKETA & MORELL, 1969). Analisando-se as constantes cinéticas das reações de pseudo primeira-ordem das hemoglobinas das serpentes com 4-PDS, podemos concluir que no caso das serpentes por nós estudadas, não houve alteração na disponibilidade de -SH entre as formas desoxigenadas e oxigenadas das hemoglobinas, quando em presença de ATP.

Outra característica peculiar intrínseca da molécula de hemoglobina consiste na estabilidade da molécula frente a agentes desnaturantes como uréia, benzoato de sódio e álcali. SULLIVAN & RIGGS, 1967a, sugeriram que qualquer condição que tende a imobilizar a estrutura tetramérica da proteína, aumentaria a resistência a desnaturação. A formação de polímeros seria uma dessas condições, mas certamente não a única.

As velocidades de desnaturação das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* com agentes oxidantes como álcali, benzoato de sódio e uréia nos mostraram que existe pequena diferença entre a labilidade das hemoglobinas de ambas as serpentes à desnaturação em ausência ou em presença de ATP. As velo-

idades de autoxidação das hemoglobinas das serpentes em alta concentração de uréia e benzoato de sódio mostraram que ao contrário dos resultados da desnaturação alcalina, as hemoproteínas de ambas as espécies são mais resistentes, tanto na forma desionizada quanto em presença de ATP, estabilidade esta maior em uréia 7M do que em benzoato de sódio 1M. Grande estabilidade da hemoglobina de peixes elasmobranquios em alta concentração de uréia foi descrito por BONAVENTURA et alii, 1974. Tais hemoglobinas teriam desenvolvido grande estabilidade estrutural frente ao desnaturante devido à sua exposição constante ao mesmo, uma vez que o sangue desses peixes contém uréia. Esta hipótese foi, contudo, contestada por EDELSTEIN et alii, 1976. As vantagens fisiológicas da estabilidade das hemoglobinas das duas serpentes semi-aquáticas em presença de uréia não são conhecidas e deverão ser esclarecidas.

A autoxidação por benzoato de sódio parece mais relacionada com a reação da classe I, de acordo com a classificação de WALLACE et alii, 1978, onde o ânion atuaria como agente nucleófilo, ligando-se ao ferro hemínico, induzindo a transferência de um elétron do ferro ao O_2 , com subsequente deslocamento de O_2 como superóxido O_2^- . A autoxidação da classe I de reação é muito mais lenta, como ocorre com a desnaturação observada com benzoato de sódio.

Os estudos realizados na presente tese como por exemplo, cinética de desnaturação da hemoglobina com agente desnaturante de proteínas (álcali, benzoato de sódio e uréia), cinética de reação dos grupos tióis reativos com 4-PDS, estudos funcionais da proteína respiratória em ausência e em presença de vários ligantes fisiológicos e não fisiológicos, determinação

de pI aparente de vários componentes de hemoglobina, determinação de pH isoiônico da proteína, etc forneceram algumas características e propriedades no transporte de oxigênio pelas hemoglobinas de serpentes *H.modestus* e *L.miliaris*. Embora trabalhos dessa natureza possam fornecer informações valiosas a respeito do papel dos ligantes homotrópicos e heterotrópicos e da cooperatividade nas hemoproteínas em geral, a ação de ligantes individuais foram analisadas separadamente. Recentes estudos indicam que ligação de cada ligante heterotrópico está associada não somente a oxigenação, mas também à ligação de outros moduladores heterotrópicos, alguns dos quais competem entre si pelos mesmos sítios na molécula de hemoglobina (BENESCH et alii, 1969; KILMARTIN et alii, 1980). Assim, o efeito desses ligantes não pode ser tratado separadamente (IMAIZUMI et alii, 1979). Além disso, algumas das propriedades funcionais de hemoglobinas caracterizadas nas serpentes não podem ser extrapoladas, sem restrições, nas interpretações dos fenômenos fisiológicos porque conforme preconiza GRIGG, 1974, a função do transporte de oxigênio "in vivo", resulta da ação conjunta de vários íons, moléculas e proteínas respiratórias. Nesse sentido, estudos futuros devem ser cuidadosamente elaborados para melhor conhecimento das funções das hemoglobinas "in vivo", não na molécula em solução; mas como um dos membros integrantes do organismo como um todo.

R E S U M O

O estudo de hemolisados de *H.modestus* e *L.miliaris*, duas serpentes aquáticas com diferentes graus de adaptação a esse ambiente mostraram por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose (intervalo de pH do anfólito: 7,0 - 9,0), 3 e 5 componentes de hemoglobina. A pureza dos componentes foi controlada por técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose.

As propriedades funcionais foram estudadas com solução de hemoglobina, em ausência e em presença de ligantes fisiológicos e não fisiológicos. Na ausência de moduladores, as hemoglobinas de *H.modestus* apresentaram maior afinidade pelo oxigênio do que de *L.miliaris*, tendo valores de P_{50} , 1,0mm de Hg e 1,41mm de Hg respectivamente, em pH 7,0. Em presença de fosfatos orgânicos tais como ATP, GTP, 2,3DPG e IHP, esses valores tornaram-se maiores: 8,95, 10,0, 4,16 e 25,48mm de Hg em *H.modestus* e 17,81, 16,98, 9,11 e 25,70mm de Hg em *L.miliaris*, indicando menor afinidade Hb-O₂. O efeito Bohr passou de -0,07 na hemoglobina desionizada de *H.modestus* a -0,38 e a -0,55 na presença de GTP e ATP respectivamente e na *L.miliaris*, de -0,30 na hemoglobina desionizada a -0,60 na presença de GTP e a -0,90 na presença de ATP.

Entre os ânions polifosfatos, apenas o ATP e o GTP parecem ser fisiologicamente importantes nas serpentes, visto que apenas esses nucleosídeos trifosfatos foram encontrados no sangue das serpentes, em nossas determinações por cromatografia em Dowex 1-X₈. Em *H.modestus*, o nível de ATP (56%) foi maior que em *L.miliaris* (23%), ao contrário do GTP cujas proporções

relativas foram 20% em *H.modestus* e 41% em *L.miliaris*. Os demais nucleotídeos identificados foram ADP e AMP.

Efeito de sais como NaCl, KCl, CaCl₂, EDTA e citrato de sódio sobre as propriedades funcionais das hemoglobinas foi também estudado. O íon cloreto não teve qualquer influência sobre a afinidade da Hb-O₂ em *L.miliaris*; contudo, em *H.modestus* a afinidade tornou-se menor, em pH abaixo de 7,0. O EDTA e o citrato de sódio diminuíram a afinidade Hb-O₂ em ambas as serpentes.

Determinação de grupos tióis na oxi e desoxihemoglobina, na ausência e na presença de moduladores heterotrópicos foi realizada. Na oxihemoglobina desionizada foram titulados 8 -SH/Hb em *H.modestus* e 11 -SH/Hb, em *L.miliaris*; na presença de fosfatos orgânicos foram titulados 8 e 5 -SH/Hb respectivamente e na desoxihemoglobina, 5 e 4 -SH/Hb.

Os valores das constantes cinéticas de desnaturação (k) da hemoglobina por NaOH, benzoato de sódio e uréia, na ausência e na presença de ATP foram diferentes em ambas as serpentes, sugerindo que a presença de moduladores determina mudanças conformacionais na molécula de hemoglobina.

S U M M A R Y

The study of the hemolysate of *H.modestus* and *L.miliaris*, two water snakes with different degrees of aquatic adaptations, by isoelectric foccusing using a pH gradient between 7,0 and 9,0 showed 3 and 5 haemoglobin components respectively. The homogeneity of the components was checked by double immunodifusion in agarose gel. The functional properties were studied with haemoglobin solutions either in the presence or not of physiological and non physiological ligands. Stripped haemoglobin of *H.modestus* presented higher oxygen affinity than that of *L.miliaris*, where P_{50} values found were 1,0mm Hg and 1,41mm Hg respectively, in pH 7,0. In the presence of organic phosphates such as ATP, GTP, 2,3DPG and IHP, these values increased, showing lower oxygen affinity: 8,95mm Hg, 10,0mm Hg, 4,16mm Hg and 25,48mm Hg respectively in *H.modestus* and 17,81mm Hg, 16,98mm Hg, 9,11mm Hg and 25,70mm Hg in *L.miliaris*. The Bohr effect increased from -0,07 to -0,38 and -0,55 in the presence of GTP and ATP in *H.modestus* and from -0,30 in stripped haemoglobin to -0,60 in the presence of GTP and to -0,90 in the presence of ATP in *L.miliaris*.

Among polyphosphate anions studied, ATP and GTP seems to be physiologically important, since only these nucleotides were found by Dowex 1-X₈ chromatography determination. In *H.modestus*, the ATP levels (56%) was higher than in *L.miliaris* (23%); conversely, the GTP levels were about 20% in *H.modestus* and about 41% in *L.miliaris*. ADP and AMP were also identified in the erythrocytes.

NaCl, KCl, CaCl₂, EDTA and sodium citrate effect on haemoglobin functional properties were also analysed. Chloride ions showed no influence on haemoglobin oxygen affinity in *L.miliaris*; nevertheless in *H.modestus* the Hb-O₂ affinity decreased. Concerning to EDTA and sodium citrate a lower Hb-O₂ affinity in both species were also found.

Thiol groups determination in stripped oxyhaemoglobin, showed 8 -SH/Hb in *H.modestus* and 11 -SH/Hb in *L.miliaris*. In the presence of ATP, has been determined 8 and 5 -SH/Hb in oxyhaemoglobin of *H.modestus* and *L.miliaris* respectively and in desoxyhaemoglobin, 5 and 4 -SH/Hb.

Haemoglobin denaturation kinetic values in the presence or not of ATP were different in both species, showing conformational changes in the molecule by ligand binding.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. S. Adaptações respiratórias e tolerância a variações de alguns fatores extrínsecos em *Helicops modestus* Gunter, 1861 e *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758, serpentes de hábitos aquáticos (Serpentes: Colubridae). São Paulo, 1977 161p. (Tese - Doutorado) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.
- AIROLDI, Lucia P. S.; VIEIRA, H. F.; MEIRELLES, Nilce C. & FOCESI Jr., A. *Pipa carvalhoi* haemoglobins. IV. Effect of denaturing agents. I.R.C.S. med. Sci., 6:227, 1978.
- _____ ; BRUNORI, M. & GIARDINA, B. Properties of trout HbI in water and ligand linked binding of Na⁺. Febs lett., 129 (2):273-6, 1981.
- AMPULSKI, R. S.; AYERS, V. E. & MORELL, S. S. Determination of the reactive sulfhydryl groups in heme proteins with 4,4-dipyridinedisulfide. Analyt. Biochem., 52:163-9, 1969.
- ANDERSEN, H. T. Physiological adaptations in diving vertebrates. Physiol. Rev., 46:212-43, 1966.
- ANSON, M. L.; BARCROFT, J.; MIRSKY, A. E. & OINUMA, S. On the correlation between the spectra of various hemoglobins and their relative affinities for oxygen and carbon monoxide. Proc. R. Soc.: Serie B., 97:61-83, 1924.

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

BARTLETT, G. R. Phosphorus compounds in the human erythrocyte. Biochim. biophys. Acta, 156:221-30, 1968.

_____ Phosphate compounds in the cells of reptiles, amphibians and fish. Comp. Biochem. Physiol., 55A:211-4, 1976.

_____ & BORGESE, T. A. Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchingling. Comp. Biochem. Physiol., 55A:207-10, 1976.

_____ Phosphate compounds in reptilian and avian red blood cells; developmental changes. Comp. Biochem. Physiol., 61A:191-202, 1978.

BENESCH, Ruth E. & BENESCH, R. The influence of oxygenation on the -SH groups of hemoglobin. Biochemistry, 1:735, 1962.

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

_____ ; _____ & YU, G. I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. natn. Acad. sci. U.S.A., 59:526-32, 1968.

_____ ; _____ & _____ The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength and hemoglobin concentration. Biochemistry, 8(6):2567-71, 1969.

_____ & _____ The mechanism of interaction of red cell organic phosphate with hemoglobin. Adv. Protein Chem., 28: 211-37, 1974.

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

_____ & DAWSON, W. R. Metabolism. In: GANS, C. & DAWSON, W. R., ed. Biology of the reptilia. London, Academic 1976. p.127-223.

BLACK, E. C.; KIRKPATRICK, D. & TUCKER, H. H. Oxygen dissociation curves of the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) acclimated to summer and winter temperatures. J. Fish Res. Bd Can., 23:1-13. 1966.

BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, Celia & SULLIVAN, B. Urea tolerance of elasmobranch hemoglobins. Science, 186:57-9, 1974.

_____ ; _____ & _____ Hemoglobins and hemocianins: comparative aspects of structure and function. J. exp. Zool., 104:155-74, 1975.

BORGESE, T. A. & LAMPERT, L. M. Duck red cell 2,3-diphosphoglycerate: its disappearance in the adult. Biochem. biophys. Res. Commun., 65:822-7, 1975.

_____ & NAGEL, R. L. Differential effects of 2,3-DPG, ATP and inositol pentaphosphate (IP₅) on the oxygen equilibria of duck embryonic, fetal and adult hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 56A:539-43, 1977.

BRUNORI, M.; BONAVENTURA, Celia; GIARDINA, B.; BOSSA, F. & ANTONINI, E. Hemoglobin from trout: structural and functional properties. Mol. cell. Biochem., 1:189-96, 1973a.

_____ ; GIARDINA, B.; BONAVENTURA, J.; BARRA Donatella & ANTONINI, E. Properties of fish hemoglobins: the hemoglobin system of trout (*Salmo irideus*) In: Bolis, K. et alii, eds. Comparative physiology Amsterdam, North-Holland, 1973. p.477-492.

_____ ; BONAVENTURA, J.; FOCESI jr., A.; GALDAMES-PORTUS, Maria Isabel & WILSON, M. T. Separation and characterization of the hemoglobin components of *Pterygoplichthys pardalis*, the acaribodo. Comp. Biochem. Physiol., 62A:173-7, 1979.

- BRYGIER, J.; De BRUIN, S. H.; VAN HOOF, H. R. B. & ROLLEMA, H. S.
The interaction of organic phosphates with human and chicken hemoglobin. Eur. J. Biochem., 60:379-83, 1975.
- BUNN, H. F. & GUIDOTTI, G. Stabilizing interaction in hemoglobin. J. biol. Chem., 247:2345-50, 1972.
- CATALOGO P. L. Biochemicals Inc., 1977 p.12.
- CHANUTIN, A. & CURNISH, R. R. Effect of inorganic and organic phosphates on formation of hemoglobin-phosphate complexes as determined by electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 120:291-301, 1965.
- CHIANCONE, Emilia; NORME, J. E.; FORSEN, S.; ANTONINI, E. & WYMAN Jr., J. Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of chloride binding to human oxy and desoxihaemoglobin. J. mol. Biol., 70:675-88, 1972.
- COOPER, H. A. & HOOGLAND, H. C. Fetal hemoglobin: review. May. Clin. Proc., 47:402-14, 1972.
- CUNHA, O. R. & NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazonia. II. *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758) na Amazonia norte oriental (Território Federal do Amapá) (Ophidia, Colubridae). Boln. Mus. Paraense Emílio Goeldi, 10:1-6, 1970.

- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.
- DESSAUER; H. C. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: GANS, C. & DAWSON, T. S. ed. Biology of the reptilia. New York, Academic, 1970, v.3 p.1-72.
- DRYSDALE, J.W.; RIGHETTI, P. & BUNN, H.F. The separation of human and animal hemoglobin by isoelectric foccusing in polyacrylamide gel. Biochim. biophys. Acta, 229:42-50, 1971.
- EDELSTEIN, S. J.; McEWEN, B. & GIBSON, Q. H. Subunit dissociation of fish hemoglobin. J. biol. Chem., 251:7632-7, 1976.
- FITCH, H. S. Reproductive cycles in lizards and snakes. Misc. Publs. Mus. Nat. Hist. Univ. Kans., 52:1-247, 1970.
- FOCESI Jr. A.; BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; WILSON, M. T. & GALDAMES-PORTUS, Maria Isabel Effect of pH on the kinetics of oxygen and carbon monoxide reactions with hemoglobin from the air-breathing fish, *Loricariichthys*. Comp. Biochem. Physiol., 62A:169-71, 1979.
- GANS, C. A redescription of geographic variation on *Liophis miliaris* Linné, the common water snake of southern south America. Am. Mus. Novit., 2178:1-58, 1964.

- GEOGHEGAN, W. D. & POLUHOWICH, J. J. The major erythrocyte organic phosphates of the American eel *Angilla rostrata*. Comp. Biochem. Physiol., 49B:281-90, 1974.
- GILLEN, R. G. & RIGGS, A. The hemoglobin of a fresh-water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird and Girard)- I. The effect of phosphorylated organic compounds upon the oxygen equilibria. Comp. Biochem. Physiol., 38B:585-95, 1971.
- GRAHAM, J. B. Aquatic respiration in the sea snake *Pelamis platurus*. Respir. Physiol., 21:1-7, 1974.
- GRASSETTI, D. R. & MURRAY Jr., J. F. Determination of sulphhydryl groups with 2,2' or 4,4'-dithiodipyridine. Archs. Biochem. Biophys., 119:41-9, 1967.
- GREENWALD, O. E. The effect of temperature on the oxygenation of gopher snake blood. Comp. Biochem. Physiol., 40A:865-70, 1971.
- GRIGG, G. C. Temperature-induced changes in the oxygen equilibrium curve of the blood of the brown Bullhead, *Ictalurus nebulosus*. Comp. Biochem. Physiol., 28:1203-23, 1969.
- _____ Respiratory function of blood in fishes. In: FLORKIN, M. & SCHEEN, B. ed. Chemical Zoology. New York, Academic, 1974. v.8, p.331-367.

- HEATWOLE, H. & SEYMOUR, R. S. Diving physiology. In: DUNSON, W. A. ed. Biology of sea snakes. Maryland University Park, 1975, p.289-327.
- HEATWOLE, H. & SEYMOUR, R. S. Respiration of marine snakes. In: HUGHES, G. M. ed. Respiration of amphibious vertebrates. London, Academic, 1976. p.375-389.
- IMAIZUMI, K.; IMAI, K. & TYUMA, I. The linkage between the four-step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin. J. Biochem., 86:1829-40, 1979.
- INGRAM, V. M. Hemoglobin and its abnormalities. Springfield, C. Thomas, 1961.
- ISAAKS, R. E.; HARKNUS, D. R.; SAMPSELL, R. N.; ADLER, J. L.; KIN, C. Y. & GODMAN, P. Studies on avian erithrocyte metabolism. IV. Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediate and oxygen affinity of whole blood in adults and embryos in several galliforms. Comp. Biochem. Physiol., 55A:29-33, 1976.
- JOHANSEN, K. & LENFANT, C. A comparative approach to the adaptability of O₂-Hb affinity. In: ASTRUP, P. & RORTH, M., ed. Alfred Benson Symposium; O₂ affinity of hemoglobin and red cell and acid-base status, 4., Munksgaard, Copenhagen, 1972. p.750-780.

- KILMARTIN, J. V.; FOGG, J. H. & PERUTZ, M. F. Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. Biochemistry, 19:1389-93, 1980.
- KOLOUTIAN, K. V. & POLUHOWICH, J. J. The role of organic phosphate in modulating the oxygenation behaviour of eel hemoglobin. Comp. Biochem. Physiol. 53A:245-8, 1976.
- KORZHUEV, P. A. & KRUGLOVA, G. V. Muscle hemoglobin of the desert tortoise. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 108:1173-5, 1956.
- LENFANT, C. J. K., PETERSEN, J. A. & SCHMIDT-NIELSEN, K. Respiration in the fresh water turtle, *Chelys fibriata*. Respir. Physiol., 8:261-75, 1970.
- McCHUTCHEON, F. H. Specific oxygen affinity of hemoglobins in elasmobranchs and turtles. J. cell. Comp. Physiol., 29:333-44, 1947.
- MacMAHON, J. A. & HAMER, A. Effects of temperature and other blood parameters of the sidewinder (*Crotalus cerastes*): adaptative significance. Comp. Biochem. Physiol., 51A:59-70, 1975.
- MANWELL, C. P. A study of the hemoglobin of some snakes of the genus *Thamnophis*. Washington, 1955. (master's thesis) University of Washington.
- MANWELL, C. P. Comparative physiology: blood pigments. A. Rev. Physiol., 22:191-244, 1960.

MANWELL, C. P., BAKER, C. M. A. & CHILDERS, W. The genetics of hemoglobin in hybrids. I. A molecular basis for hybrid vigor. Comp. Biochem. Physiol., 10:103, 1963.

MEIRELLES, Nilce C. Estudos sobre hemoglobinas de *Pipa carvalhoi*. Campinas, 1975. 73p. (Tese - Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

NASCIMENTO, Maria C. S., DANIEL, J. P. & HENEINE, I. F. The hemoglobin of the snail *biomphalaria glabrata*. The absence of sulphhydryl groups (SH), presence of disulfide bonds (SS) and their relation to ligand properties. Comp. Biochem. Physiol. 1982 (no prelo).

NEILL, W. T. Viviparity in snakes: some ecological and zoogeographical considerations. Am. Nat., 98 (898):35-55, 1964.

OGO, Satie H. Propriedades funcionais de hemoglobinas de serpentes com diferentes graus de adaptação morfológica ao ambiente aquático. Campinas, 1977. 79p. (Tese -Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

_____, ABE, A. S. & FOCESI Jr., A. Oxygen dissociation constant in hemoglobin of *Helicops modestus* and *Liophis miliaris*, two water-snakes with different morphological adaptations to their environment. Comp. Biochem. Physiol., 63A:285-9, 1979.

_____, & FOCESI Jr., A. Bohr effect and lactic acid content of the blood of 2 water-snakes with different degrees of aquatic adaptation. Experientia, 35:862-3, 1979.

- ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:321-49, 1964.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Aller., 5:78, 1958.
- PALÉUS, S., VESTERBERG, O. & LIEJEQVIST, G. The hemoglobins of *Myxine glutinosa* L. I. Preparation and Crystalization. Comp. Biochem. Physiol., 39B:551-7, 1971.
- POUGH, F. H. Environmental adaptations in the blood of lizards. Comp. Biochem. Physiol., 31:885-901, 1969.
- _____ Ontogenic changes in oxygen transport properties of blood of garter snakes, *Thamnophis s. sirtalis*. Am. Zool., 11(4):657, 1971.
- POUGH, F. H. Oxygen affinity of snakes blood in relation to body size. Physiol. Zool., 50(2):77-87, 1977.
- PRADO, J. L. Inactive (non-oxygen combining) hemoglobin in ophidia and dogs. Science, 102:406, 1946.
- RABB, G. B. & MARX, H. Major ecological and geographic patterns in the evolution of colubrid snakes. Evolution, 27:69-83, 1973.
- RAMIREZ, J. R. & DESSAUER, H. C. Isolation and characterization of two hemoglobins found in the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 96:690-94, 1957.

- RAPOPORT, S. & GUEST, G. M. Distribution of the acid-soluble phosphates in the blood cells of various vertebrates. J. biol. Chem., 138:269-82, 1941.
- RIGGS, A. The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect upon the oxygen equilibrium. J. biol. Chem., 236:1948-54, 1961.
- RIGGS, A. Functional properties of hemoglobin. Physiol. Rev., 45:619-73, 1965.
- RIGGS, A. Properties of fish hemoglobin. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J., ed. Fish Physiology. New York, Academic, 1970. v.4, p.209-251.
- ROLLEMA, H. S.; DE BRUIN, S. H.; JANSSEN, L. H. & VAN OS, G. A. G. The effect of potassium chloride on the Bohr effect of human hemoglobin. J. biol. Chem., 250:1333-9, 1975.
- ROMER, A. S. Vertebrate paleontology. 3 ed. London, Chicago Univ., 1966. 468p.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Archs. Biochem. Biophys., 77:428-92, 1958.
- ROSSMAN, D. A. *Helicops*. Bull. natn. Mus. U.S.A., (297):122-5, 1970.

- RUBEN, J. A. Aerobic and anaerobic metabolism during activity in snakes. J. Comp. Physiol., 109:147-57, 1976.
- RUUD, J. J. Vertebrates without erythrocytes and blood pigments. Nature Lond., 173:847-50, 1954.
- SANNES, L. J. & HULTQUIST, D. E. The basis for EDTA-stimulation of methemoglobin reduction in hemolysates of human erythrocytes. Biochem. biophys. Res. Commun., 91(4):1309-13, 1979.
- SCHWANTES, A. S., SCHWANTES, Maria Luiza, BONAVENTURA, Celia, SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J. Hemoglobins of *Boa constrictor amarali*. Comp. Biochem. Physiol., 54B:447-50, 1976.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. & LARIMER, J. L. Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size. Am. J. Physiol., 195:424-8, 1958.
- SEYMOUR, R. S. Blood respiratory properties in a sea snake and land snake. Aust. J. Zool., 24:313-20, 1976.
- _____ & WEBSTER, M. E. D. Gas transport and blood acid-base balance in diving sea snake. J. exp. Zool., 191(2):169-82, 1975.
- SHIMIZU, K. & BUCCI, E. Allosteric effectors of hemoglobin interaction of human adult and fetal hemoglobin with poly (carboxylic acids). Biochemistry, 13:809-14, 1974.

SMITH, D. B., BRUNORI, M. ANTONINI, E. & WYMAN, J. The oxygen Bohr effect in mouse hemoglobin. Archs. Biochem. Biophys., 113:725-9, 1966.

STEEN, J. B. Comparative physiology of respiratory mechanisms. New York, Academic, 1971. 182p.

SULLIVAN, B. & RIGGS, A. Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. II. Electrophoretic studies. Comp. Biochem. Physiol., 23:449-58, 1967a.

_____ & _____ Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. III. Oxygen properties. Comp. Biochem. Physiol., 23:459-74, 1967b.

_____ & _____ Data for constructing blood oxygen dissociation curves. In: ALTMAN, P. L. & DITTMER, D. S., ed. Respiration and circulation. Maryland, F.A.S.E.B., 1971. pt.4, p.189-91.

_____ Amphibian hemoglobins. In: FLORKIN, M. & SCHEER, B. T., eds. Chemical Zoology. New York, Academic 1974a, v.9, p.77-118.

_____ Reptilian hemoglobins. In: FLORKIN, M. & SCHEER, B. T., eds. Chemical Zoology. New York, Academic 1974b. v.9, p.353-74.

_____ Hemoglobin and its significance in fish. In: US-USSR workshop on physiology and biochemistry of aquatic animals. Georgetown, 1977. Meeting.

- SVEDBERG, T. & HEDENIUS, A. The sedimentation constant of the respiratory proteins. Biol. Bull., 66:191-223, 1934.
- TAKETA, F. & MORELL, S. A. Changes in the 4-PDS reactive -SH groups of hemoglobin associate with the binding of phosphates and ligands. Analyt. Biochem., 32:169-74, 1969.
- VAN BEEK, G. G. M. & DE BRUIN, S. H. Identification of the residues involved in the oxygen linked chloride-ion binding sites in human hemoglobin. Eur. J. Biochem., 105:353-60, 1980.
- WALLACE, W. J., HOUTCHENS, R. A., HOLT, J. M. & CAUGHEY, W. S. Mechanisms for hemoglobin oxidation: The response of abnormal human and other hemoglobins to different oxidative pathways. In: CAUGHEY, W. S., ed. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities. New York, Academic, 1978. p.475-93.
- WEBER, R. G., LYKKEBOE, G. & JOHANSEN, K. Biochemical aspects of the adaptation of hemoglobin - oxygen affinity of cells to hypoxia. Life Sci., 17:1345-50, 1975.
- _____ ; _____ & _____ Physiological properties of eel hemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity. J. exp. Biol., 64:75-88, 1976.
- _____ & WOOD, S. C. Effects of erythrocytic nucleoside triphosphates on oxygen equilibria of composite and fractioned hemoglobins from the facultative air-breathing Amazonia catfish, *Hypostomus* and *Pterygoplicht*. Comp. Biochem. Physiol., 62A:179-83, 1979.

WOOD, S. C. & JOHANSEN, K. Respiratory adaptation to diving in the Nile monitor lizard, *Varanus niloticus*. J. Comp. Physiol., 89:145-58, 1974.

_____ & LENFANT, C. J. M. Respiration: mechanics, control and gas exchange. In: GANS, C. & DAWSON, W. R., eds. Biology of the Reptilia. London, Academic, 1976. v.5, p.225-74.

WYMAN jr., J. Heme proteins. Adv. Protein Chem., 4:410-531, 1948.

_____ Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: a second look. Adv. Protein Chem., 9:223-86, 1964.

_____ Variations on a theme: a comparative study of fish hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol., 62A:9-12, 1979.