

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gustavo Fraga Landini

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

“PROPRIEDADES DISSOCIATIVAS DA HEMOGLOBINA DE
Tupinambis merianae (TEIU) E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA
PRIMÁRIA PARCIAL DAS CADEIAS GLOBÍNICAS”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GUSTAVO FRAGA LANDINI

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título
de Doutor em Bioquímica, na área
de Biologia Funcional e
Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Campinas 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L234p	<p>Landini, Gustavo Fraga, 1972- Propriedades dissociativas da hemoglobina de <i>Tupinambis merianae</i> (teiu) e determinação da estrutura primária parcial das cadeias globínicas / Gustavo Fraga Landini. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Réptil. 2. Dímero-tetrâmero. 3. Oxigênio. 4. Oxirredução. 5. Respiração. I. Bonafé, Carlos Francisco Sampaio, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Dissociative properties of hemoglobin from *Tupinambis merianae* (teiu) and partial primary globin structure determination

Palavras-chave em Inglês:

Reptile

Dimer-tetramer

Oxygen

Oxidation-reduction

Respiration

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Francisco Sampaio Bonafé [Orientador]

José César Rosa

Augusto Shynia Abe

José Camillo Novello

Cláudio Chrysostomo Wemeck

Data da defesa: 07-03-2007

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 7 de Março de 2007

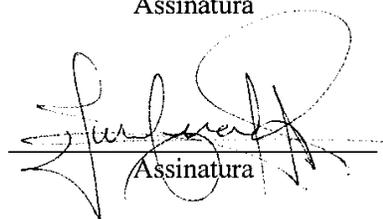
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. José César Rosa



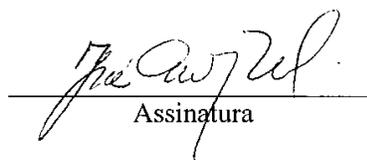
Assinatura

Prof. Dr. Augusto Shynia Abe



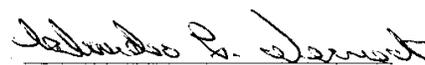
Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck



Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine



Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano



Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Galembeck



Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pela enorme oportunidade da sua orientação, pelas excelentes discussões acerca da bioquímica e termodinâmica, pelo companheirismo e dedicação à ciência nestes quatro anos, pela competência, e acima de tudo, pelo respeito e amizade.

À Prof. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, pelas incontáveis horas onde se dedicou à minha tese e pelas excelentes sugestões durante estes meses, pela confiança, companheirismo, e extremos profissionalismo e competência acerca de proteínas.

Ao Prof. Dr. José César Rosa, que não poupou seu tempo nem esforços para que este trabalho fosse realizado, e por ter aberto seu laboratório para que eu pudesse realizar grande parte dos experimentos. Agradeço o tempo dedicado às correções do trabalho, e é claro, pela enorme amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Augusto Shinya Abe, pelas discussões acerca dos répteis, assunto que plenamente domina, e por ter gentilmente cedido os teius desta tese, além de ter dedicado grande parte de seu tempo à confecção desta tese.

À banca julgadora, Prof. Dr. José Camillo Novello e Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, pelas sugestões à esta tese.

Aos meus amigos, Zé Luiz, Bispo, Douglas e Leonardo, pelo agradável tempo de convivência na Bioquímica.

À Juliana, técnica do laboratório, que nunca poupou esforços para que os nossos experimentos fossem realizados.

Ao casal Arno Rudi Schwantes e Maria Luiza Barcellos Schwantes, a dupla que me iniciou no mundo científico.

À Adriana Dibo da Cruz, que teve uma participação fundamental neste trabalho durante o tempo em que éramos namorados. Obrigado de coração.

Aos meus irmãos, Olavão e Afonso, que mesmo distantes, me ajudaram demais, vocês nem imaginam.

À minha mãe, Marisa, que se sacrificou toda vida pela educação dos filhos e pela constante dedicação. Você conseguiu!

Ao velho Daniel, *in memoriam*, tenho certeza que me acompanhou nestes anos, sempre me dando forças para continuar em frente.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Deus, acima de tudo.

"Aprender é a única de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

Leonardo da Vinci

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos.....	16
3.1 <i>Tupinambis merianae</i> (teiu).....	16
3.2 Obtenção de hemoglobina.....	17
3.3 Gel Filtração em coluna Sephadex-G25.....	19
3.4 Curvas de equilíbrio de oxigênio.....	20
3.5 Medidas do potencial de óxido-redução.....	21
3.6 Sistema automático de determinação potenciométrica.....	23
3.7 Determinação dos valores de E_h e de energia livre de óxido-redução.....	24
3.8 Determinação da massa molecular por gel filtração.....	25
3.9 Termoestabilidade da hemoglobina.....	26
3.10 Extração das globinas.....	27
3.11 Redução e carboximetilação das globinas.....	27
3.12 Separação das cadeias por cromatografia de alto desempenho.....	28
3.13 Análise por espectrometria de massas.....	29
3.13.1 Determinação da massa molecular das globinas isoladas.....	29
3.13.2 Determinação da massa molecular e sequenciamento de aminoácidos dos peptídeos obtidos por tripsina das cadeias de globinas por espectrometria de massas.....	30
3.14 Análise de aminoácidos pelo método de feniltiocarbamil-aminoácidos...31	
3.15 Determinação do N-terminal de cada cadeia por degradação automática de Edman.....	32
4. Resultados.....	33
4.1 Caracterização funcional da hemoglobina de <i>Tupinambis merianae</i>	33
4.1.1 Equilíbrio de oxigenação.....	33
4.1.2 Potencial de óxido-redução.....	35
4.1.3 Equilíbrio de oxigenação conforme variação de temperatura.....	37
4.1.4 Termo-desnaturação.....	37
4.2 Caracterização estrutural das cadeias de <i>Tupinambis merianae</i>	37
4.2.1 Determinação da massa molecular por gel filtração.....	37
4.2.3 Separação das cadeias de globina por HPLC em fase reversa.....	41
4.2.4 Determinação da massa molecular das cadeias de globina.....	43
4.3 Análise de aminoácidos por PTC-AA e Sequenciamento de aminoácidos do N-terminal de cada cadeia por degradação de Edman.....	46
4.3.1 Determinação da composição em aminoácidos das cadeias de globina.....	46
4.3.2 Determinação da seqüência N-terminal das cadeias de globina por degradação de Edman.....	49
4.4 Caracterização parcial da estrutura primária interna de peptídeos tripsínicos das cadeias de globina de teiú por espectrometria de massas e alinhamento das seqüências de aminoácidos N-terminal e internas pelo programa Fasts3 (EMBL).....	55

5. Discussão.....	71
6. Perspectivas futuras.....	84
7. Bibliografia.....	85
8. Anexos.....	93

Resumo

A hemoglobina (Hb) representa um excelente modelo para a análise de cooperatividade e alosterismo, processos fundamentais em biologia. A instabilidade na forma tetramérica da Hb de animais ectotérmicos, como serpentes, já foi evidenciada em vários trabalhos, sendo que a titulação potenciométrica se mostrou como método apropriado para demonstrar a dissociação da heme proteína. A dissociação pode ser atribuída a duas substituições de aminoácidos nas cadeias β , as quais resultam em perda de duas cargas negativas na interface $\alpha_1\beta_2$, facilitando a dissociação do tetrâmero em dímeros, confirmado pela massa molecular obtida em gel filtração. O objetivo desse projeto foi o de analisar as propriedades dissociativas das Hbs de lagarto através do estudo da curva de titulação potenciométrica de suas Hbs, e o efeito de ATP e pH nestes processos, confirmando-se ao mesmo tempo as propriedades de equilíbrio com oxigênio e a sequência dos aminoácidos desta proteína. Estes animais apresentaram o mesmo comportamento dissociativo de algumas espécies de serpentes (*Liophis miliaris* e *Helicops modestus*) com importantes implicações termodinâmicas, fisiológicas e evolutivas. Com estes resultados será muito favorecida a ampliação deste fenômeno também para outros grupos de ectotérmicos.

Abstract

The studies of functional and structural properties of hemoglobin from lizard, *Tupinambis meriana* showed that the protein stripped of allosteric phosphate modulators, dissociates into dimers, present high affinity for oxygen, the absence of cooperative oxygen binding ($n = 1$) and no Bohr effect. The molecular weight determination gave a values compatible with dimer of hemoglobin. This combination of characteristics is unique, since all other terrestrial vertebrates, including other reptiles, have sigmoidal binding curves with $n = 2$. However, the allosteric properties could be restore by the addition of ATP to the hemoglobin, where the oxygen affinity decreases about 10-fold, and the protein becomes cooperative ($n = 2$) at pH lower than 7.8 and return to $n = 1$ at higher pH values, when the electrostatic interaction between amino acids residues contributing to organic phosphates binding site and ATP becomes weaker and the hemoglobin undergoes dissociation with dimer formation. The absence of cooperativity in the stripped hemolysate suggests that this feature of the oxygen dissociation resides in the molecular structure of the hemoglobin, some substitutions in the beta chain.

1. Introdução

A respiração, em termos moleculares, é um fenômeno fundamental nas espécies atuais, e depende da disponibilidade de oxigênio a nível tecidual. Nos animais em geral, a hemoglobina desempenha o transporte eficiente de oxigênio para permitir a respiração. As hemoglobinas de vertebrados, proteínas tetraméricas que possuem como grupo prostético ligante de oxigênio o heme, constituem modelos por excelência para a elucidação de uma variedade de fenômenos bioquímicos, tais como cooperatividade e alosterismo, interações entre as subunidades em proteínas, modulações por componentes do solvente e combinações com ligantes. Essa proteína está dentro de células presentes no sistema circulatório (eritrócitos), e isso facilita o controle de suas propriedades através de alterações intracelulares de concentração de efetores alostéricos. Considerando a variedade de espécies que possuem hemoglobina, inclusive em bactérias, protozoários e diversas plantas, torna-se óbvio a importância destas biomoléculas para a sobrevivência da maioria dos seres vivos (Wakabayashi, et al., 1986; Bogusz, et al., 1988; Iwaasa, et al., 1989).

Para desempenharem sua função primordial para o transporte dos gases, as hemoglobinas devem ter sofrido excepcional pressão evolucionária para adaptar suas propriedades funcionais às mais diversas condições ambientais através da aquisição de diferentes sequências de suas cadeias polipeptídicas.

Outra heme proteína muito estudada é a mioglobina, que ocorre no tecido muscular, servindo de suprimento e reserva de oxigênio, facilitando a respiração local. É constituída apenas de uma cadeia polipeptídica, portanto sem estrutura quaternária, e conseqüentemente não apresenta propriedades de cooperatividade ou alostéricas, possuindo alta afinidade pelo ligante oxigênio, com curva de ligação hiperbólica.

A molécula de hemoglobina humana caracteriza-se por ser grosseiramente esférica, com um diâmetro de 55Å, podendo ser separada em uma parte protéica (globina) e outra parte não protéica (heme). As quatro cadeias polipeptídicas são semelhantes entre si e arranjadas em um tetraedro regular, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β), cada uma possuindo massa molecular aproximada de 16 kDa (Fig. 1). O que diferencia as cadeias α das cadeias β é o número de resíduos (aminoácidos), 141 resíduos na cadeia α e 146 resíduos na cadeia β . Na hemoglobina humana, por exemplo, existe grande contato entre cadeias α e β , porém pouco contato entre cadeias semelhantes (Antonini & Brunori, 1974; Perutz, 1982). A cadeia alfa contém sete segmentos de estrutura em alfa-hélice, com interrupções não helicoidais, enquanto a cadeia beta contém oito segmentos. Cada região em alfa hélice é definida como hélice A, B, até H, ou de A a G para as cadeias alfa e beta, respectivamente, e os segmentos não helicoidais são denominados AB, BC, e assim por diante (Nichols, et al., 1997). As globinas estabelecem contatos entre si por meio de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio e salinas, as quais são responsáveis pela estabilidade da conformação oligomérica da hemoglobina (Brittain, 2002).

A molécula de hemoglobina humana é constituída de dois dímeros $\alpha\beta$ idênticos, que formam o tetrâmero simétrico. Os dois diferentes tipos de subunidades, α e β , são necessários para o desempenho apropriado da função da molécula de hemoglobina (Perutz, 1970).

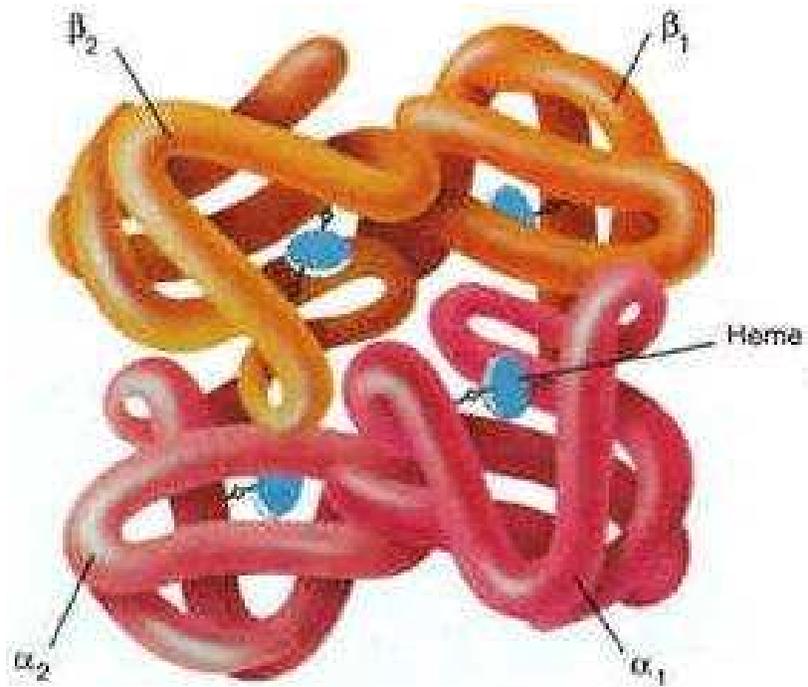


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da hemoglobina. As quatro cadeias de globinas são apresentadas em diferentes cores, sendo cada uma ligada a um grupo heme. Fonte: www.daviddarling.info/.../H/hemoglobin.html

A parte “não protéica” da hemoglobina (grupo prostético), o grupo heme (Fig. 2), é constituído de uma parte orgânica (grupo tetrapirrólico, especificamente a protoporfirina IX) e um átomo de Fe^{+2} o qual se liga a quatro nitrogênios no centro do anel da protoporfirina. Observa-se estado ferroso durante os processos de oxigenação e desoxigenação. A oxidação de Fe^{+2} (ferroso) para Fe^{+3} (férrico) resulta na formação de metahemoglobina, forma incapaz de realizar o transporte de oxigênio (Keilin & Hartree, 1951; Braunitzer et al., 1961; Karplus, 1982; Perutz, 1982; Dickerson & Geis, 1983). As globinas desempenham um papel essencial no transporte de oxigênio, uma vez que coloca o heme em ambiente hidrofóbico, evitando a oxidação, permitindo assim o transporte reversível de oxigênio.

A associação das subunidades α e β é feita por interações não covalentes através da interface $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ resultando em dímeros $\alpha\beta$, e da interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$), que correspondem a interação entre os dímeros para formar o tetrâmero.

Ao contrário da hemoglobina humana, hemoglobinas de répteis são constituídas por quatro diferentes cadeias, duas do tipo α e duas do tipo β (Abassi & Braunitzer, 1991; Matsuura et al., 1999; Eguchi & Eguchi, 2001; Leclercq et al., 1981; Fushitani et al., 1996). Embora a sequência dessas cadeias sejam diferentes, comparando-se à cadeia α e à cadeia β da hemoglobina humana, os números de resíduos são iguais (141 para as cadeias α e 146 para as cadeias β) (Naqvi, 1983; Matsuura et al., 1999; Eguchi & Eguchi, 2002).

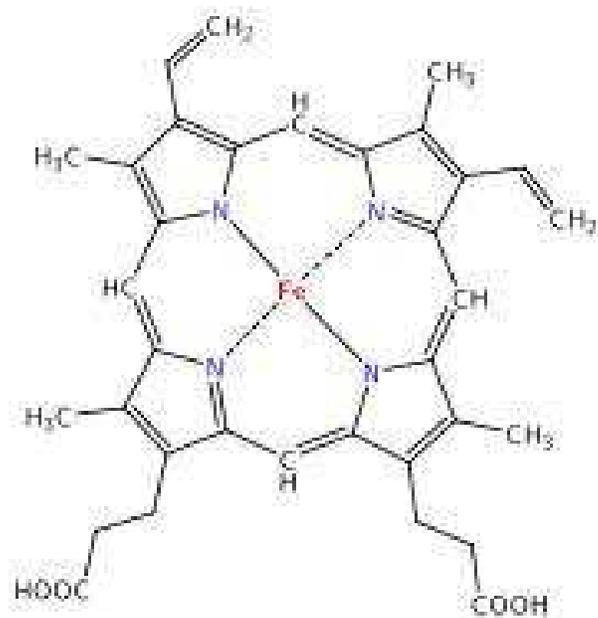


Figura 2: Representação esquemática da estrutura do grupo heme. Observa-se a protoporfirina IX, que possui quatro anéis pirrólicos, ligada a um átomo de ferro central. (Dickerson & Geis, 1983).

Como mencionado, a hemoglobina possui comportamento bem mais complexo que a mioglobina, e isso está relacionado à sua estrutura quaternária, inexistente na mioglobina. As hemoglobinas também transportam CO_2 , na forma de compostos carbamínicos e H^+ .

A curva de ligação da hemoglobina com o oxigênio apresenta uma forma sigmoide, com menor afinidade por este gás quando comparada com a mioglobina. Este aspecto de curva representa, em termos moleculares, a cooperatividade, e corresponde a um aumento de afinidade por oxigênio após o mesmo se ligar nos primeiros sítios. Assim, é um efator homotrópico (atua no local de entrada do ligante) positivo (aumenta a afinidade da proteína pelo ligante).

A cooperatividade na ligação com O_2 pela hemoglobina é uma propriedade termodinâmica da macromolécula que se origina das interações entre as subunidades. A conservação estrutural das regiões de contatos $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_1\beta_2$ é essencial para a afinidade normal da hemoglobina pelo O_2 e para a cooperatividade. A dissociação do tetrâmero em “meias moléculas” diméricas elimina a cooperatividade das interações das hemoglobinas (Hewitt et al., 1972; Ackers et al., 1992). Na verdade, a cooperatividade está relacionada à mudança conformacional da hemoglobina quando a mesma é oxigenada. Certas ligações na interface são desfeitas, e a entrada das últimas moléculas de oxigênio não precisam romper outras ligações, significando aumento de afinidade pelo ligante.

Outra propriedade fundamental da hemoglobina, que é bastante relacionada à cooperatividade, é o alosterismo. Podemos considerar que o efator alostérico atua numa região diferente do sítio de entrada do ligante (daí o nome alosterismo), e estabiliza a hemoglobina, por exemplo, na forma deoxi. Nesse caso ocorre deslocamento para a direita na curva de oxigenação. Como veremos, a hemoglobina apresenta OH^+ , e

fosfatos orgânicos (além de CO_2) como principais efetores alostéricos (Esses compostos estabilizam a hemoglobina na forma deoxi, diminuindo sua afinidade pelo oxigênio, portanto são efetores alostéricos negativos).

Atualmente existem dois principais modelos matemáticos que representam o alosterismo, o modelo de dois estados, de Monod, Wyman e Changeaux (MWC) (Monod et al., 1965) e o seqüencial descrito adiante. No modelo MWC, cada molécula protéica se encontra em apenas uma das duas formas possíveis em solução, na forma tensa (T), de baixa afinidade pelo oxigênio, e na forma relaxada (R), com alta afinidade. Na ausência de substrato (ou ligante), a forma T é predominante, e todos os sítios de ligação na molécula são equivalentes, e apresentado a mesma constante de afinidade pelo substrato, baixa na forma T.

A hemoglobina tetramérica é mantida através de algumas ligações restritivas (restrição quartenária) que favorecem na sua forma tensa. Na entrada de O_2 , a forma R torna-se energeticamente mais favorável sendo que esta transição $T \leftrightarrow R$, de forma brusca, rompe as restrições quartenárias, e o tetrâmero converte-se na forma relaxada, de alta afinidade pelo oxigênio. Nestes estados, a ligação de O_2 à molécula é completamente não cooperativa, e a única diferença entre estes estados é que na forma R, a afinidade pelo O_2 é muito maior que na forma T. Essa não cooperatividade é resultante do modelo alostérico que prevê que qualquer molécula de hemoglobina em um dado instante deve apresentar todas as subunidades em um estado ou em outro, exclusivamente, isto é, deve ser simétrico.

O modelo MWC, portanto, descreve somente a cooperatividade positiva e desconsidera as estruturas mistas, além de não permitir formas intermediárias, como as identificadas posteriormente por métodos físico-químicos (Daugherty et al., 1991; Marden

et al., 1991; Schumacker et al., 1995). Esse modelo possui, portanto, uma visão restritiva do mecanismo alostérico, porque utiliza o conceito de simetria como consideração inicial.

O modelo sequencial de Koshland, Némethy e Filmer (KNF) (Koshland, Némethy & Filmer, 1966) faz considerações muito semelhantes às encontradas no modelo MWC, mas admite as alterações nas estruturas terciárias da hemoglobina, não em resposta às mudanças ocorridas na simetria do tetrâmero, mas através de uma série de interações moleculares que ocorrem quando há ligação do oxigênio. São as alterações na estrutura terciária e nas interfaces inter e intradiméricas, iniciadas pela ligação do substrato à molécula, que promovem a alteração da estrutura quaternária.

Em relação a efetores alostéricos importantes, podemos mencionar o efeito Bohr, que foi originalmente descrito como uma diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio causado pela pressão de CO_2 (Bohr et al., 1904). Posteriormente descobriu-se que esse efeito poderia ser atribuído à presença de ácido carbônico (H_2CO_3) como o doador de prótons no lugar do dióxido de carbono.

Nos tecidos ocorre hidratação do CO_2 através de uma reação catalizada pela anidrase carbônica, formando íons bicarbonato e H^+ , ocorrendo diminuição do pH do meio, e isso modula negativamente a afinidade da hemoglobina pelo O_2 , liberando-o mais facilmente aos tecidos. Esse é o conhecido efeito Bohr, ou, efeito de pH sobre a afinidade da hemoglobina pelo O_2 . Uma observação importante é a que a reversibilidade da ligação com o H^+ permite à hemoglobina um tamponamento eficaz para o sangue (Jensen & Weber, 1985a, b; Weber & Jensen, 1988.)

Os fosfatos orgânicos influenciam na fisiologia respiratória também diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio através da sua ligação com a desoxihemoglobina, em resíduos carregados positivamente (sítio alostérico para estes

fosfatos). Este efeito revela-se de grande importância quando o organismo requer uma maior quantidade de energia, pois o aumento da presença de fosfato orgânico promove a liberação do oxigênio para os tecidos mais rapidamente. Nos humanos, o 2,3 bifosfoglicerato (2,3 BPG) corresponde ao fosfato orgânico que atua nesse sentido.

A afinidade da hemoglobina ao oxigênio é compatível com os parâmetros físicos e químicos de seus ambientes, sendo modulada alostericamente por H^+ , Cl^- , fosfatos orgânicos e CO_2 . A conformação "T" apresenta uma afinidade alta por esses ligantes heterotrópicos, enquanto que, na conformação "R" estas afinidades são inversas. A estrutura do estado tenso "T" (desoxihemoglobina) contém vários contatos diretos entre as subunidades, através das pontes de hidrogênio que são quebradas e expostas ao solvente passando para o estado relaxado "R" (oxihemoglobina). Esta diferença na estrutura implica na diferença de hidratação ou ligação da água entre essas duas conformações (Perutz, 1970; Imai, 1982; Colombo et al., 1992).

Sob condições físicas constantes e na ausência de moléculas modificadoras, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, depende primariamente da natureza hidrofóbica do seu grupo heme e dos papéis específicos dos resíduos aminoacídicos que, direta ou indiretamente afetam essa afinidade. Obviamente, uma vez que a sequência de aminoácidos das cadeias de globinas são geneticamente codificados, a afinidade intrínscica Hb- O_2 encontra-se determinada geneticamente (Powers, 1985). Uma mutação leva a alterações no material genético, podendo ocasionar mudanças em aminoácidos pertencentes a cadeias polipeptídicas e conseqüentemente podem alterar as propriedades funcionais da proteína (Avisé, 1983).

No desenvolvimento eritroblastário, as cadeias α e β recém sintetizadas ligam os grupos heme, e então combinam-se para formar um dímero $\alpha\beta$ estável através da

interface $\alpha_1\beta_1$ que se forma pela atração eletrostática entre as subunidades α , que se apresentam positivamente carregadas, e subunidades β , negativamente carregadas, permanecendo praticamente constante durante a oxigenação da hemoglobina ou durante a dissociação do tetrâmeros em dímeros (Mrabet et al., 1986). Entretanto, a interface $\alpha_1\beta_2$, move-se substancialmente durante a transição $T \leftrightarrow R$ da proteína a qual modula a afinidade do grupo heme pelo oxigênio molecular dependente do heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$, sendo responsável pelo desencadeamento dos fenômenos alostéricos, assim como pela integridade do tetrâmero (Perutz, 1970; Perutz & Brunori, 1982; Mrabet et al., 1986; Rao & Acharya, 1992). Assim, as alterações estruturais nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ podem levar mais facilmente à dissociação do tetrâmero em dímeros, eliminando a interação cooperativa entre subunidades, com conseqüente perda das propriedades alostéricas das hemoglobinas (Hewitt et al., 1972; Brittain, 1991; Speros et al., 1991; Ackers et al., 1992).

Durante a evolução, as hemoglobinas desenvolveram um mecanismo molecular comum, baseado no princípio da mudança conformacional de sua estrutura oligomérica. Entretanto, diferentes hemoglobinas adquiriram propriedades peculiares em resposta às diferentes necessidades internas e externas. Dentro desse contexto (relação entre meio ambiente e requerimento metabólico), os estudos das hemoglobinas de ectotérmicos despertam particular interesse, desde que o seu metabolismo é muito mais afetado pela variação da temperatura ambiental comparando-se aos mamíferos e, também, por apresentarem sistema homeostático mais “flexível” que outros vertebrados, podendo apresentar variações consideráveis nos valores de pH sanguíneo.

Neste contexto, a hemoglobina de répteis, incluindo as espécies de répteis terrestres, revelam ser um excelente modelo, pois podem apresentar hemoglobinas dissociadas a dímeros, e um comportamento alostérico que não pode ser

adequadamente enquadrados nos modelos e parâmetros desenvolvidos baseando-se nas hemoglobinas dos mamíferos. Desta forma, torna-se razoável esperar que novas informações sobre as relações entre estrutura e função possam ser obtidas dos estudos das estruturas primária e terciária, e das propriedades alostéricas de hemoglobinas de répteis em comparação com as de hemoglobina humana.

Nos mamíferos em geral, as hemoglobinas são tetraméricas. Entretanto existem mutações descritas que podem promover a desestabilização da forma tetramérica, como por exemplo a hemoglobina Rothschild em humanos. Esta apresenta uma substituição na posição beta Trp 37 por Arg (Abraham et al., 1997). Essa posição corresponde à interface $\alpha_1\text{-}\beta_2$, e a substituição desestabiliza localmente essa interação (Nagai et al., 1995). Em lampréia e peixe-bruxa, a hemoglobina é monomérica quando oxigenada e tetramérica quando desoxigenada (Brittain, et al., 1989; Briehl, 1963).

Recentemente foi demonstrado que as hemoglobinas das serpentes *Liophis miliaris* e *Helicops modestus* são tetraméricas na forma deoxihemoglobina, em presença de seu efetor alostérico ATP, porém se dissociam em dímeros quando ligadas ao oxigênio ou na ausência de ATP (Matsuura et al., 1987; Matsuura et al., 1989; Bonafe et al., 1999). Estes resultados sugeriram que a dissociação pode ter importante papel fisiológico, pois pode representar reserva de oxigênio em condições adversas, como no caso de mioglobinas de cetáceos.

A determinação da estrutura primária da *L. miliaris* mostrou que a dissociação pode ser explicada através de duas substituições nas cadeias β , CD2 Glu-43 \rightarrow Thr e D3 Glu-101 \rightarrow Val, as quais resultam em perda de duas cargas negativas na interface $\alpha_1\beta_2$, favorecendo a dissociação do tetrâmero (Matsuura et al., 1989; Bonafe et al., 1999). A

proteína desta, quando desprovida de fosfatos, apresenta alta afinidade pelo O₂ (P₅₀= 1mmHg), ausência de cooperatividade na ligação do O₂ (n_H= 1,0), ausência de efeito Bohr e massa molecular de 32000 Da (valor compatível com o dímero de hemoglobina), comportando-se como proteína não alostérica. Ao mesmo tempo as propriedades alostéricas podem ser restauradas pela adição de ATP, o principal componente intra-eritrocitário que ocorre em *L. miliaris* (Ogo et al., 1984), resultando uma diminuição significativa da afinidade pelo O₂ (P₅₀= 10 mmHg). Com a adição de ATP, a proteína torna-se cooperativa com valor de n_H= 2,0 em valores de pH inferiores a 7,8, retornando ao valor de n_H= 1,0 em valores de pH próximos, ou acima do valor do ponto isoelétrico da proteína, pI= 8,1 (Matsuura et al., 1987)

A seqüência primária de hemoglobinas de vários grupos de animais ectotérmicos apresentam substituições semelhantes, nas mesmas posições, acima mencionadas para a hemoglobina de *L. miliaris* (Maruyama et al., 1980; Abbasi et al., 1988; Rucknagel et al., 1988; Abbasi et al., 1991; Gorr et al., 1991) sugerindo que este comportamento dissociativo pode ocorrer nesses grupos.

Um alto grau de homologia nas seqüências de aminoácidos, e substituições na região de contato $\alpha_1\beta_2$ nas mesmas posições nas globinas de *L. miliaris*, foram encontrados em outros ofídios como em *H. modestus*, e nos lagartos, *Sphenodon punctatus* (Abbas et al., 1988), *Iguana iguana* (Rucknagel et al., 1988) e *Varanus exanthematicus albigularis* (Abbas et al., 1991). Comparando-se a seqüência das cadeias de diferentes grupos de répteis, por exemplo, considerando-se a cadeia α de *Iguana iguana*, observam-se 53% de identidade com a de víbora (*Vipera aspis*), 49-52% com a de tartaruga (*Chrysemys picta bellii*) e 54% com a de crocodilos (*Caiman crocodylus*) (Bordin et al., 1997; Rucknagel et al., 1988; Rucknagel, et al., 1984; Leclercq

et al., 1981). Tal fato nos leva a possibilidade da extensão, também para a ordem Squamata, de tais propriedades peculiares do mecanismo de transição entre duas formas moleculares (dímero \leftrightarrow tetrâmero) para o transporte de O₂.

Além das possíveis consequências a nível fisiológico, o aspecto evolutivo envolvido pode ser de grande relevância, pois a dissociação sugere uma origem termodinâmica da cooperatividade (Bonafe, 1999). A titulação potenciométrica é um método bastante adequado para demonstrar a dissociação em hemoglobinas. Esta metodologia é baseada na adição gradual de um agente oxidante, ferricianeto de potássio, sendo a formação de metahemoglobina monitorada através do potencial de óxido-redução do sistema. Esta oxidação simula a ligação de oxigênio, possibilitando o acesso a informações complementares à oxigenação. Esta metodologia permitiu ainda demonstrar a dissociação da hemoglobina de serpente em pH alcalino ou em ausência de ATP (Bonafe, et al., 1999) .

As propriedades funcionais da hemoglobina humana são apropriadas à demanda fisiológica da respiração humana. As propriedades alostéricas são uma consequência da estrutura primária das cadeias que, através de alterações conformacionais, comunicam-se com outras subunidades como resultado da estrutura quaternária (Perutz, 1990). Em comparação com as hemoglobinas de mamíferos, as de répteis têm diferentes propriedades funcionais e alostéricas, resultado de requerimentos metabólicos incomuns. Deste modo, espera-se que novas informações sobre as relações estrutura-função possam ser obtidas dos estudos das estruturas primária e terciária e das propriedades alostéricas das hemoglobinas de répteis em comparação com a humana.

Desta forma, esse trabalho propõe realizar experimentos funcionais e estruturais da molécula de hemoglobina de uma espécie de lagarto brasileiro (*Tupinambis merianae*)

para correlacionar os dados funcionais com a transição da estrutura quaternária, tanto na ausência quanto na presença de ATP e, conseqüentemente obter subsídios para uma melhor compreensão e elucidação do possível mecanismo atípico de transporte de oxigênio molecular. Isso permite verificar se o mecanismo pode ocorrer nesse outro grupo de répteis, e sugerir mais fortemente a generalização de ocorrência de dissociação fisiológica de hemoglobina, com as conseqüências no mecanismo de transporte molecular de oxigênio.

2. Objetivos

A hemoglobina há décadas é um excelente modelo de cooperatividade e alosterismo, processos fundamentais em biologia. Em hemoglobinas de serpentes, como *L. miliaris* e *H. modestus*, o comportamento dissociativo leva a importantes implicações termodinâmicas, fisiológicas e evolutivas relacionadas a essa proteína clássica. O nosso primeiro objetivo foi investigar se tal fenômeno se aplica a outros grupos de ectotérmicos, no caso em lagartos, estudando as propriedades dissociativas da hemoglobina do lagarto teiu (*Tupinambis merianae*, Teiidae) através do estudo da curva de titulação potenciométrica em diferentes pHs em presença ou não de ATP. Além disso, objetivou-se comparar esses resultados a propriedades funcionais de oxigenação nessas condições de pH e presença ou ausência de ATP.

Embora já houvesse indícios que as substituições importantes presentes em serpentes, responsáveis pelas propriedades dissociativas já conhecidas (Matsuura et al., 1989; Bonafe et al., 1999), já deviam estar presentes nesse lagarto (Maruyama et al., 1980; Abbasi et al., 1988; Rucknagel et al., 1988; Abbasi et al., 1991; Gorr et al., 1991),

um outro importante aspecto que propomos responder foi se realmente tais mutações estão presentes na hemoglobina do teiu. Assim, foi realizado o sequenciamento parcial das cadeias de globinas para estudar a homologia com hemoglobina de outros grupos, inclusive a humana. A importância desse estudo se refere a uma possível confirmação de aspectos estruturais que explicam os achados funcionais.

3. Material e Métodos

3.1 *Tupinambis merianae* (Teiu).

Nesta espécie (Fig. 3) ocorre na Argentina, Uruguai e em todas as regiões do Brasil, exceto na Floresta Amazônica. Pode ser encontrada em áreas abertas de cerrado, mas também em bordas de matas-de-galeria e dentro de matas. É uma espécie que vive no chão, podendo ser observada em áreas ensolaradas, com capim baixo ou com pedras. Costuma frequentar áreas antrópicas, onde às vezes invade galinheiros para comer ovos e pintinhos. A dieta é muito variada, incluindo vertebrados, partes vegetais, moluscos e artrópodos e freqüentemente pode se alimentar de carniça, portanto são onívoros.

Possui corpo cilíndrico, membros e cauda longos e robustos. O comprimento rostro-anal em machos adultos, que são maiores que fêmeas adultas, pode chegar a 50 cm, que se somados à cauda dá o comprimento total de 160cm. O dorso apresenta barras negras transversais que se alternam com faixas mais claras, com pontos negros e cinzas. Os flancos são mais claros, com barras negras menos distintas e pequenos círculos brancos espalhados. O ventre é claro, com barras negras transversais e irregulares. Pode ser confundida com *T.*

rufescens, da qual se distingue pela coloração negra do dorso (avermelhada em *T. rufescens*) e por possuir mais de 25 poros femorais (menos de 20 em *T. rufescens*).

A reprodução desta espécie ocorre ao final da estação seca, sendo que o tamanho da ninhada pode variar de 13 a 29 ovos. É uma espécie diurna, heliófila e ativa durante todo o dia. Passa a maior parte do tempo em movimento à procura de presas que localiza com o auxílio da língua comprida e bífida. A temperatura corporal média é de 37°C. Quando se sente ameaçado, o teiu pode ficar imóvel e tentar se camuflar em meio ao ambiente, fugir rapidamente ou até mesmo atacar.

Realiza uma estivação sazonal durante os meses mais frios do ano (entre Maio e Setembro), onde se entoca e retorna apenas quando se dá o aumento da temperatura em função do início da primavera.



Figura 3. Imagens de exemplares adultos do gênero *Tupinambis*.

3.2 Obtenção de hemoglobina

Os exemplares de *Tupinambis merianae* (teiú) nos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Augusto Shynia Abe, da Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP, Rio Claro), o qual é responsável por um programa de reprodução em cativeiro da espécie em estudo. Estes animais foram mantidos em caixas de plástico aeradas, com dimensões que permitissem a movimentação do animal, junto com água e alimento, até o momento da extração do sangue. O método de extração do sangue foi submetido ao comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas e foi considerado aprovado sob o número de protocolo 116/03. O sangue humano usado para controle foi coletado no próprio laboratório.

A extração do sangue dos animais foi realizada por uma cânula que foi cirurgicamente introduzida na artéria femoral do animal. Esta técnica permitiu a sobrevivência do animal mesmo após alguns ciclos de extração de sangue. Seringas heparinizadas foram acopladas na extremidade da cânula, sendo sempre preenchida com solução fisiológica, para evitar a coagulação em seu interior. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas ao laboratório para purificação e início de experimentos. A cânula foi retirada após extração do sangue.

Logo após a coleta de sangue dos animais, assim como na amostra do sangue humano, foi adicionada solução salina 1,6% na proporção de 1:10 (sangue/salina, v:v). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 2000 **g** 10 °C por 3 minutos. O sobrenadante (plasma e células brancas) foi descartado e

o precipitado (hemácias) lavado por mais três vezes, sendo a primeira com solução salina 1,6%, e as outras lavagens com solução salina 1,0%.

Às hemácias precipitadas, foi adicionado 1 volume de tampão Tris-HCl 1 mM, pH 8,5, para hemólise. Após homogeneização, o hemolisado total foi centrifugado a 15000 **g** por 20 min a 4°C para a retirada do estroma. O sobrenadante (solução de hemoglobina) foi estocado a 4°C por até 10 dias durante a realização dos experimentos. Adicionalmente manteve-se a papa de hemácias estocadas a -20 °C durante 8 semanas, assim como na forma de hemolisado desionizado e guardadas a 4 °C por 4 semanas, para experimentos utilizando potencial redox e equilíbrio de oxigenação.

3.3 Gel Filtração em coluna Sephadex-G25

Essa metodologia permite a obtenção de uma solução de hemoglobina livre de pequenas moléculas contaminantes (hemoglobina stripped), principalmente de fosfatos intraeritrocitários (Riggs, 1981). Foi utilizada uma coluna (90cm de comprimento por 2cm de largura), preenchida com resina cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-25, sendo esta compactada e equilibrada em tampão Tris-HCl 5mM pH 8,8 a temperatura de 20°C, e fluxo de 1 mL/min. Todas as soluções e tampões foram confeccionados com água Milli-Q®.

Antes da gel filtração foi adicionado Tris sólido na solução de hemoglobina até que o valor do pH da amostra atingisse aproximadamente 8,5. Esse procedimento garantiu a manutenção durante toda a gel filtração, de um valor de

pH acima do ponto isoelétrico da proteína, permitindo deste modo a liberação de fosfatos orgânicos durante o processo. A gel filtração foi realizada a 20°C. As alíquotas inicial e final não foram utilizadas, devido à baixa concentração da proteína nessas frações. Assim, obteve-se hemoglobina em concentração relativamente alta, o que aumentou a durabilidade da proteína até a realização dos experimentos.

3.4 Curvas de equilíbrio de oxigênio

Os equilíbrios de oxigenação da hemoglobina foram realizados por espectrofotometria, utilizando um tonômetro, assim como descrito por Riggs & Wolbach (1956). Esse método se baseia nas mudanças espectrais que ocorrem na faixa de luz visível durante a passagem do estado desoxi para o oxigenado.

Nesta metodologia utilizamos 4,0mL de amostra de hemoglobina 100 μ M (em relação ao heme) na forma *stripped*, em tampão Tris-HCl ou Bis-Tris propano 50mM em diferentes valores de pH, na ausência ou presença de ATP 1mM, e em 4 temperaturas diferentes, 10, 20, 35 e 40°C. A porcentagem de metahemoglobina foi quantificada através do método de cianometahemoglobina (Tomita, et al., 1968), e amostras com valores acima de 3% foram descartadas. A amostra de hemoglobina foi desoxigenada por arraste dentro de um tonômetro através de agitação em corrente contínua de nitrogênio gasoso. O espectro de absorção da desoxihemoglobina foi monitorado entre 500 e 600 nm em espectrofotômetro, Beckman, DU 640. Em seguida foram adicionadas quantidades crescentes e conhecidas de ar atmosférico através de uma seringa, equilibrando por cerca de

10 minutos em temperatura constante e controlada. Após cerca de quatro injeções, a amostra foi exposta ao ar ambiente, sendo equilibrada e monitorada espectrofotometricamente a 100% de oxigenação. Ao final do processo, o pH final da amostra foi anotado.

Através do gráfico de $\log P_{O_2}$ vs $\log Y/1-Y$ (sendo Y o valor da saturação parcial da Hb) foi determinado o valor do $\log P_{50}$, e o coeficiente de Hill (n) foi calculado através da declividade da reta obtida. O efeito Bohr foi avaliado através da variação de $\log P_{50}$ com o pH.

3.5 Medidas do potencial de óxido-redução

As curvas de equilíbrio de óxido-redução foram realizadas em amostras de hemoglobina *stripped* na presença de 1 mM de ATP ou na ausência do mesmo. Além da hemoglobina de teiu, foram também estudadas as curvas de equilíbrio de óxido-redução de hemoglobina humana para obtenção de maior segurança quanto à metodologia, pois os resultados puderam ser comparados com dados já descritos na literatura.

A titulação potenciométrica foi realizada através da metodologia originalmente descrita por Antonini et al. (1964), porém em sistema automatizado (ver item 3.6). Foram utilizados 4 mL de solução de hemoglobina em concentração de 140 μ M em tetrâmero (ou 3,5 mg/mL de proteína), em presença de tampão Tris HCl 100 mM, e em diferentes valores de pH na faixa de 6,0 a 9,0, tanto na forma *stripped* como na presença de ATP 1 mM. As amostras não continham, no início da titulação, valores acima de 4% de metaHb.

Os experimentos foram realizados em uma câmara de vidro com uma jaqueta de refrigeração, com manutenção de temperatura constante, e um sistema

que permite inserir simultaneamente o eletrodo de platina, o eletrodo de referência, a entrada de ferricianeto de potássio e a entrada e a saída de nitrogênio. Em cada análise, a amostra foi desoxigenada num tonômetro por fluxo contínuo de nitrogênio. Em seguida a mesma foi transferida anaerobicamente através de uma cânula, à câmara de vidro hermeticamente fechada e saturada de nitrogênio puro, tomando-se cuidado para não ocorrer nessa transferência, a contaminação da amostra pelo oxigênio. Previamente à adição da solução de desoxihemoglobina, colocou-se na câmara de vidro o composto tionina, previamente pesado, de modo a se obter concentração final de 3 % em relação molar à hemoglobina.

As titulações potenciométricas foram obtidas adicionando-se, progressivamente, 40 μ L de uma solução desoxigenada de ferricianeto de potássio 5 mM à desoxiHb em agitação contínua. Em cada uma das adições, o sistema automatizado registrou o valor do potencial redox no momento de seu equilíbrio, que ocorreu em aproximadamente 60 minutos, dependendo do pH da amostra. Foi considerado o equilíbrio quando o potencial redox ficasse constante por, pelo menos, 25 minutos. Após aproximadamente oito adições, atingiu-se total oxidação. Os valores de potenciais de 50% para $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$, E' , foram expressos tomando como referência o eletrodo padrão de hidrogênio (Eh), descontando para cada medida o valor do potencial do eletrodo de calomelano de 0,246V.

3.6 Sistema automático de determinação potenciométrica

Uma grande desvantagem do sistema de determinação potenciométrica manual é o tempo necessário para se fazer o experimento, geralmente entre 18 e

20 horas, contando o tempo necessário para a sua montagem. A principal razão para esse longo tempo é a necessidade de aguardar o estado de equilíbrio após cada adição de oxidante, com estabilização do potencial. Em função disso, foi desenvolvido em nosso laboratório um sistema automatizado capaz de realizar titulação potenciométrica de muitas horas, sem a intervenção humana. Esse sistema é controlado por um microcomputador, consistindo de uma seringa acoplada a motor de passo e válvula solenóide de três vias, com monitorização do potencial de oxi-redução. O computador recebe dados provenientes das medidas potenciométricas, controlando o motor de passo e a válvula solenóide através de adições de titulante quando ocorre o equilíbrio de oxi-redução. Para isso foi desenvolvido um programa computacional em Linguagem C utilizando-se o ambiente LINUX 2.2.

O computador inicialmente faz a leitura do potencial proveniente do eletrodo de platina e do eletrodo de calomelano (referência). Após a primeira leitura, é realizada a adição do titulante (40 μ l de ferricianeto de potássio 5mM) através do acionamento do motor de passo pelo computador, considerando que o número de passos definirá o volume adicionado.

Ao se obter a estabilização do valor do potencial medido pelo eletrodo de platina, utilizando um intervalo definido no programa computacional, outra amostra é adicionada. Estas etapas se repetiram até o final da titulação.

Caso toda solução titulante de dentro da seringa seja totalmente consumida durante uma titulação, a válvula solenóide é acionada, de modo a permitir a entrada de mais solução titulante contida no reservatório através do motor de passo, acionado nessa etapa também pelo computador.

Durante toda a titulação, os dados coletados são armazenados no disco rígido do computador, minimizando-se o risco de perda de dados. O sistema foi descrito em trabalho prévio (Bispo et al., 2004)

3.7 Determinação dos valores de E_h e de energia livre de óxido-redução

A expressão para a determinação do potencial redox é dada por (Clark, 1960):

$$E_h = (E_o' + 2,303 RT / nF) * \log [\text{oxidado}]/[\text{reduzido}]$$

onde

E_h = potencial em referência ao eletrodo normal de hidrogênio

E_o' = potencial do eletrodo quando a relação $Fe^{+3} / Fe^{+2} = 1$

F = constante de Faraday, 23,062 cal/V equiv.

n = número de elétrons transferidos

R = constante real dos gases, 1,987 cal/mol

T = temperatura em Kelvin

A diferença de potencial detectada na mudança química de oxidação da hemoglobina pelo ferricianeto de potássio foi relacionada com a energia livre através da seguinte equação:

$$\Delta G^\circ = - nFE_h$$

3.8 Determinação da massa molecular por gel filtração

A determinação da massa molecular foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando resina Sephadex-G100 (Pharmacia) previamente hidratada em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0, durante 48 horas à temperatura constante. A coluna de Sephadex (2x90 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,5 contendo EDTA 1 mM por 12 horas, na presença ou ausência de ATP 1mM. O fluxo durante a estabilização da coluna foi mantido constante em 1 mL por minuto e a 20°C e as corridas cromatográficas mantiveram os mesmos parâmetros. Em cada experimento, foram aplicados 4,0 mL da solução de oxi ou desoxihemoglobina contendo 2,5 mg de proteína por mL.

A filtração em Sephadex-G100 equilibrada com tampão de equilíbrio contendo ATP 1 mM foi realizada utilizando a forma desoxigenada da proteína. A hemoglobina foi colocada dentro de um tonômetro e o oxigênio foi retirado lentamente por arraste com nitrogênio de alto grau de pureza. A solução de desoxihemoglobina foi aplicada cuidadosamente no topo da coluna, evitando-se o contato com o oxigênio atmosférico. O tampão de eluição foi previamente degazeificado por intenso borbulhamento de nitrogênio. Nessas condições, a hemoglobina permaneceu na forma desoxigenada durante todo o processo cromatográfico.

O volume de exclusão da coluna foi determinado utilizando-se Blue Dextran 2000 da Pharmacia. A coluna foi calibrada com mioglobina (17 kDa) e hemoglobina humana (64 kDa) como padrões de peso molecular.

3.9 Termoestabilidade da hemoglobina

Os experimentos de termoestabilidade da hemoglobina foram realizados como descrito originalmente por Borgese et al., 1981. A solução de hemoglobina foi diluída para uma concentração final de 3,5 mg/mL em tampão Tris- HCl 0,1 M, pH 7,4. Esta foi dividida em cinco alíquotas idênticas de 4 mL, colocadas em diferentes tubos de ensaio e seladas para evitar a auto-oxidação durante a exposição ao ar atmosférico. Um dos tubos foi utilizado para controle a 25 °C e os restantes para os testes em diferentes temperaturas (40, 45, 50 e 60 °C). Cada tubo foi então colocado em banho maria nas diferentes temperaturas e incubados por 20, 40 e 60 minutos. Ao final da incubação, 1 mL de cada tubo foi retirado e colocado em gelo fundente por 5 minutos e então centrifugados a 10000 *g* por 5 minutos. A concentração de hemoglobina restante não desnaturada foi determinada através da adição de 250 µL do sobrenadante em 3,0 mL de solução de Drabkin e a absorbância medida em 419 nm. A quantidade de hemoglobina restante no sobrenadante foi expressa como a porcentagem de proteína não desnaturada usada como controle. Além da hemoglobina *stripped*, foi adicionado 1 mM de ATP a cada temperatura para verificar a possível influência do efector alostérico na estabilidade da proteína.

3.10 Extração das globinas

A extração das globinas foi realizada pelo método acetona ácida. A uma solução de 300 mL de acetona foram colocados 3 mL de ácido clorídrico fumegante, e mantendo-se a -10 °C através de banho em gelo fundente com sal comercial. A esta solução foi adicionada lentamente a hemoglobina *stripped*, até a formação de um precipitado branco. O sobrenadante (acetona ácida e grupos

heme) foi descartado e o precipitado consistiu apenas das globinas. Após a remoção do heme, as globinas foram lavadas duas vezes com a acetona ácida (-10°C), dissolvidas em água Milli-Q, dializadas exaustivamente contra água Milli-Q e posteriormente contra uma solução de ácido acético 5%. As globinas purificadas foram então liofilizadas para posterior redução e carboximetilação.

3.11 Redução e carboximetilação das globinas

As globinas foram reduzidas e carboximetiladas segundo o protocolo experimental descrito por Crestfield et al., 1963, e modificado por Fushitani (Fushitani, et al., 1988). A amostra protéica contendo 29,6 mg foi diluída em 5 mL de solução tamponante de Tris HCl 1 M pH 8,2, contendo 2 mM de EDTA. Esta solução ficou sob fluxo contínuo de nitrogênio por 5 minutos, quando então foram adicionados 2,87 mL de cloridrato de guanidíneo 6M. Não foi necessário centrifugar as amostras, pois estas ficaram sob corrente de nitrogênio por mais 5 minutos. Adicionou-se 0,2 mL de solução de Ditioneitol (DTT) 0,05 M diluído em solução tamponante de Tris-HCl 1 M pH 8,2. Após mais 5 minutos em corrente de nitrogênio, as amostras foram incubadas à temperatura constante por 4 horas para redução e em seguida adicionou-se 0,2 mL de ácido iodoacético 0,05 M dissolvido em Tris-HCl 1M pH 8,2. As amostras foram então agitadas e fechadas sob nitrogênio e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz para que a reação de alquilação ocorresse. A reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL de DTT 0,05 M.

Após a alquilação, as amostras foram transferidas para sacos de diálise e exaustivamente dializadas a 4°C contra água deionizada para a remoção do conteúdo salino e dos reagentes. Em seguida foi realizada outra diálise contra

uma solução de ácido acético 5% por 3 horas e depois por 12 horas contra água Milli-Q ultrapura. Após a diálise, as amostras foram então liofilizadas.

3.12 Separação das cadeias por cromatografia de alto desempenho (HPLC)

As cadeias de *T. merianae* foram isoladas através de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC). As cadeias reduzidas e carboximetiladas foram dissolvidas em solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v, Pierce Chem.Co.) e isoladas em coluna de fase reversa Vydac C4 (250 x 4,6mm). Para a separação foram preparadas duas soluções eluentes: A, solução aquosa de TFA 0,1% e acetonitrila (ACN) 20% (v/v); B, solução aquosa de TFA 0,09% e ACN 80% (v/v). A resolução da mistura das quatro cadeias foi realizada com um gradiente crescente de ACN de 50 a 75% de solução B em 35 minutos e fluxo de 1,0 mL/min (Fushitani, et al., 1988; Matsuura, et al., 1990). Foram aplicadas amostras de 20 µL diluídas em 80 µL de solução A, totalizando 100 µL. O efluente foi monitorado em dois comprimentos de onda, 220 e 280 nm. As cadeias isoladas foram secadas em rotavapor SpeedVac e preparada em solução apropriada para posterior determinação da massa molecular e demais análises.

3.13 Análise por espectrometria de massas.

3.13.1 Determinação da massa molecular das globinas isoladas

As cadeias de globina (A, B, C e D) obtidas por HPLC foram submetidas à espectrometria de massas para determinação da massa molecular. As amostras foram dissolvidas em 200 µL de água Milli-Q e submetendo-se a mais dois ciclos de secagem para a eliminação total de ácido trifluoracético residual. As amostras

foram dissolvidas em 50% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,2%. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno, mantido a 3,0-4,0 kVolts, 40 V no cone de entrada e à temperatura de 100° C. As amostras foram infundidas por meio de uma bomba do tipo seringa (Harvard, Inc, EUA) a um fluxo de 300 nL por minuto. As coletas de dados de massa utilizaram varredura em MS1 (400-2000 u.m.a.) para coleção dos íons originados das cadeias intactas. Os espectros de massa foram coletados na forma de média acumulada de *scans* (15-30 *scans*) e devidamente processados com o *software* MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK) pelo algoritmo MaxEnt1 para de-convolução das cargas dos íons para massa molecular.

3.13.2 Determinação da massa molecular e sequenciamento de aminoácidos dos peptídeos obtidos por tripsina das cadeias de globinas por espectrometria de massas.

A digestão enzimática por tripsina das globinas (A, B, C e D) isoladas por HPLC foi preparada em 200 µL de bicarbonato de amônio 0,1M, sendo adicionado tripsina 1:50 e incubadas a 37 °C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico e preparadas para espectrometria de massas.

Cada cadeia de globina (A, B, C e D) submetida à tripsina foi de-salinizada em *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, EUA). O *micro-tip* foi previamente tratado com 100 µL de metanol e equilibrado com ácido fórmico 0,2% (v/v) (3x100µL). As amostras foram aplicadas no *micro-tip* e os eluentes descartados. Os *micro-tips* foram lavados com 3 alíquotas de 100 µL

0,2% (v/v). A mistura de peptídeos tripsínicos de globina foi eluído da resina com 30 µL de uma solução de metanol a 60% contendo ácido fórmico 5%. Esse eluato foi diretamente infundido no espectrômetro de massa, via bomba injetora.

Os íons peptídicos foram detectados por varredura em MS1 gerando o mapeamento dos peptídeos tripsínicos por massa (*peptide mass fingerprint*) na faixa de 400-1500 u.m.a. coletados na forma de média acumulada de *scans* (15-30 *scans*). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*) que promove a fragmentação do íon selecionado originando fragmentos de íons tipo *b* e *y*, fragmentos esses que foram utilizados para a dedução das respectivas seqüências de aminoácidos dos peptídeos.

3.14 Análise de aminoácidos pelo método de feniltiocarbamil-aminoácidos.

Para a determinação do conteúdo de aminoácidos de cada cadeia coletada, utilizamos o método feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC). O método do PTC fornece dois resultados distintos: a composição relativa dos aminoácidos presentes na amostra e o teor de proteínas.

A composição dos aminoácidos foi determinada nas amostras previamente hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) bi-destilado 6N, em fase vapor por 24 horas a 110°C (Bidingmeyer, Cohen & Travis, 1984) seguida de derivação dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em coluna de fase reversa C-18 (Pico-Tag – 3,9x150mm) com monitoração em comprimento de onda em 254 nm. A quantificação dos aminoácidos foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico de uma mistura padrão de

aminoácidos com concentrações conhecidas, que foi derivada à fenitiocarbamil-aminoácidos nas mesmas condições das amostras de globinas de teiu. As análises foram realizadas em duplicatas de hidrólise e cromatografia. Para determinar o teor protéico (massa total de proteínas), multiplicou-se o valor em picomol de cada aminoácido pela massa molecular desidratada dos aminoácidos e ao final, os valores encontrados foram somados. O cálculo para o número de resíduos estimados (mol/mol) de cada cadeia de globina foi baseado na normalização para massa molecular de 16 kDa para todas as cadeias. Não foram consideradas perdas durante hidrólise e não foram computados resíduos de cisteínas, por serem instáveis durante o processo de derivação a PTC.

3.15 Determinação do N-terminal de cada cadeia por degradação automática de Edman.

As cadeias de globinas (A, B, C e D) isoladas por HPLC foram submetidas à sequenciamento por degradação automática de Edman em um sequenciador de aminoácidos Procise modelo 491 (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando reagentes e programa de sequenciamento em *gas-phase blot* fornecidos pelo fabricante. Os derivados fenitiohidantoína dos aminoácidos de cada ciclo de degradação de Edman foi analisado por HPLC, identificados e quantificados contra um padrão de aminoácidos fenitiohidantoínas contendo 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas.

4. Resultados

4.1 Caracterização funcional da hemoglobina de *Tupinambis merianae*

4.1.1 Equilíbrio de oxigenação

Os experimentos em equilíbrio de oxigenação em hemoglobina *stripped*, na presença e ausência de ATP, são mostrados na Figura 4, juntamente com os resultados obtidos em cooperatividade. Na Figura 4A, podemos notar a dependência da afinidade Hb-O₂ em função do pH e da presença de ATP. A hemoglobina *stripped* teve seus valores bastante constantes e próximos a 0,2 independente do pH, indicando alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio sob estas condições.

Entretanto, adição de 1 mM de ATP à hemoglobina *stripped* de *T. merianae*, tornou evidente o efeito Bohr, onde ocorreu um aumento de afinidade Hb-O₂ em pHs mais alcalinos. Há de se notar aqui que os valores de hemoglobina *stripped* + ATP se igualaram aos valores *stripped* acima do pH 7,5 momento no qual o ATP se desliga completamente da molécula adquirindo características de hemoglobina sem moduladores orgânicos.

A Figura 4B, mostra os valores de cooperatividade obtidos em hemoglobina de teiu. Nesta, podemos verificar que os valores de cooperatividade em hemoglobina *stripped* se mantiveram próximos a 1,2 demonstrando baixa cooperatividade. A adição de ATP aumentou significativamente os valores de *n*, com exceto acima de pH 7,8, onde estes se aproximaram dos valores da hemoglobina *stripped*, com cooperatividade muito baixa.

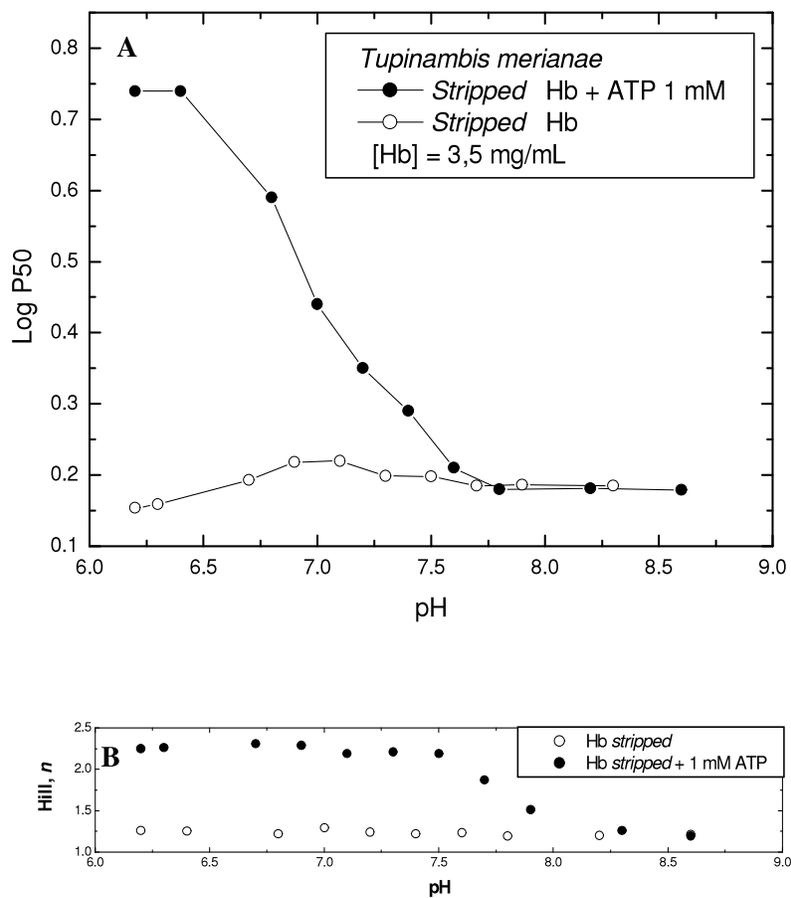


Figura 4. (A) Curvas de equilíbrio de oxigenação na ausência e presença de ATP expressas em LogP50 para *T. meriana* à 20°C. (B) Valores obtidos em cooperatividade nas mesmas condições. Soluções de Hb a 110 μ M (em heme) ou 3,5 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,1M.

4.1.2 Potencial de óxido-redução

Os resultados obtidos em potencial de óxido-redução para a hemoglobina *T. merianae* na ausência e presença de ATP em função do pH são mostrados na Figura 5. Na figura 5A, podemos notar que na forma *stripped* a hemoglobina teve perfil mais semelhante à mioglobina não exibindo transição da forma T para a forma R. Entretanto, na presença de 1 mM de ATP, a hemoglobina de *T. merianae* mostrou a transição da forma T para a forma R acima de pH 7,6. Esse resultado foi semelhante ao obtido para a hemoglobina humana (dados não mostrados).

A Figura 5B mostra os resultados em cooperatividade, índice de Hill (n), em função do pH para a hemoglobina de *T. merianae*. Podemos verificar que os valores de hemoglobina *stripped* se mantiveram aproximadamente em 1,2 sugerindo baixa cooperatividade. Entretanto, na presença de ATP, os valores de cooperatividade se mantiveram em torno de 2,5 até pH 7,5 e em pHs mais alcalinos, os valores de n se aproximaram a valores obtidos para a hemoglobina *stripped*, perto de 1,2, condição que ocorreu a liberação do ATP.

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados de potencial de óxido-redução, tão pouco nas propriedades de ligação ao oxigênio, após o congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou na estocagem a baixa temperatura. Portanto, para a hemoglobina de *Tupinambis merianae*, o congelamento e a estocagem na forma *stripped* propiciou estabilidade das propriedades funcionais.

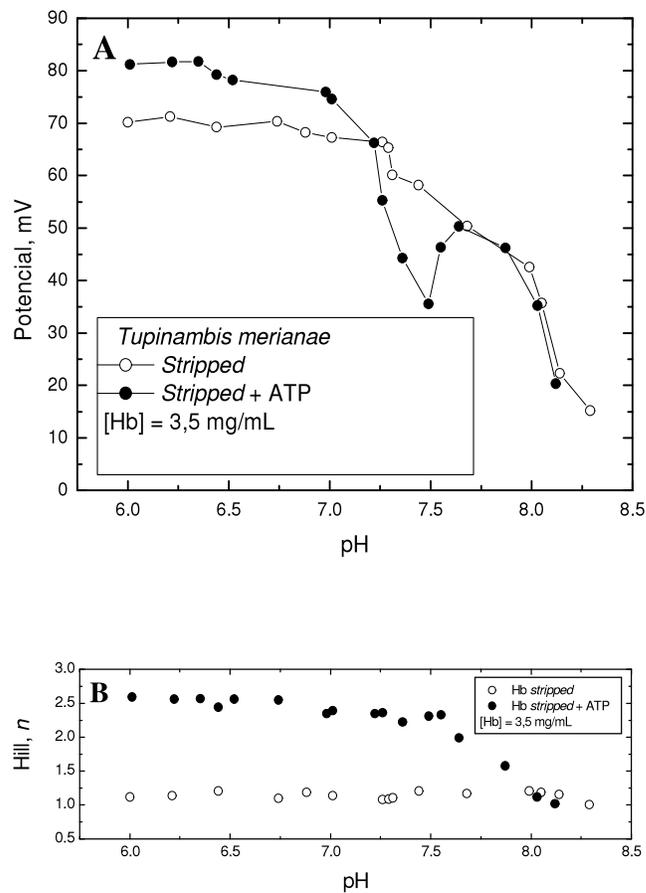


Figura 5. (A) Curva de equilíbrio de óxido-redução expressa em mV em função do pH para a Hb de *Tupinambis merianae* a 20°C na ausência e presença de 1mM de ATP. Mediador: tionina. (B) Cooperatividade (n) obtida em função do pH. Soluções de Hb a 110 μ M (em heme) ou 3,5 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,1M.

4.1.3 Equilíbrio de oxigenação conforme variação de temperatura.

Os experimentos em equilíbrio de oxigenação em três temperaturas diferentes em função do pH para a Hb *stripped* de *T. merianae* são mostrados na Figura 6. Observa-se que a afinidade Hb-O₂ tem estrita relação com a temperatura, ocorrendo aumento da afinidade da hemoglobina por oxigênio com a temperatura.

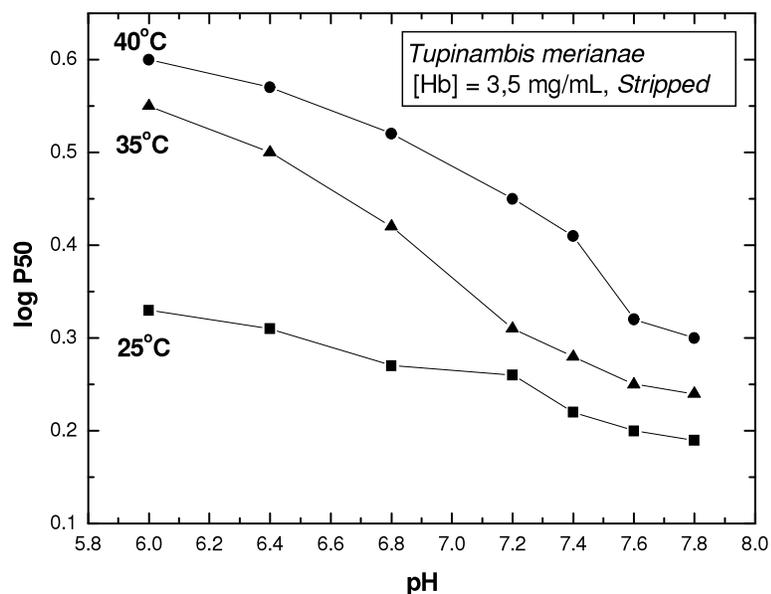
4.1.4 Termo-desnaturação

Os resultados em termodesnaturação da hemoglobina de teiu podem ser vistos na figura 7, onde podemos verificar a grande estabilidade desta proteína a 40°C, mesmo durante 60 minutos de incubação. Situação bem diferente foi obtida na incubação a 60°C, onde a resistência à desnaturação foi inferior. Após 20 minutos a 60 °C, permaneceu menos de 50% da concentração inicial da hemoglobina em solução, demonstrando a alta taxa de desnaturação nesta temperatura. A 70 °C, a desnaturação foi instantânea. A adição de ATP 1 mM, não alterou os tempos de desnaturação em nenhuma das temperaturas analisadas.

4.2 Caracterização estrutural das cadeias de globina de *Tupinambis merianae*

4.2.1 Determinação da massa molecular por gel filtração

A Figura 8 mostra os resultados obtidos em gel filtração para a hemoglobina de *T. merianae* em duas condições distintas: na condição *stripped* oxigenada, onde pode-se verificar a massa obtida foi compatível com a forma dimérica da molécula; e na condição onde a amostra foi eluída com 1 mM de ATP.



Ambas condições foram comparadas com os padrões, hemoglobina humana (64 kDa) e mioglobina (16 kDa).

Figura 6. Curvas de equilíbrio de oxigenação para Hb *stripped* de *T. merianae* em três temperaturas diferentes, 25, 35 e 40°C. Soluções de Hb a 110 μ M (em heme) ou 3,5 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,1M.

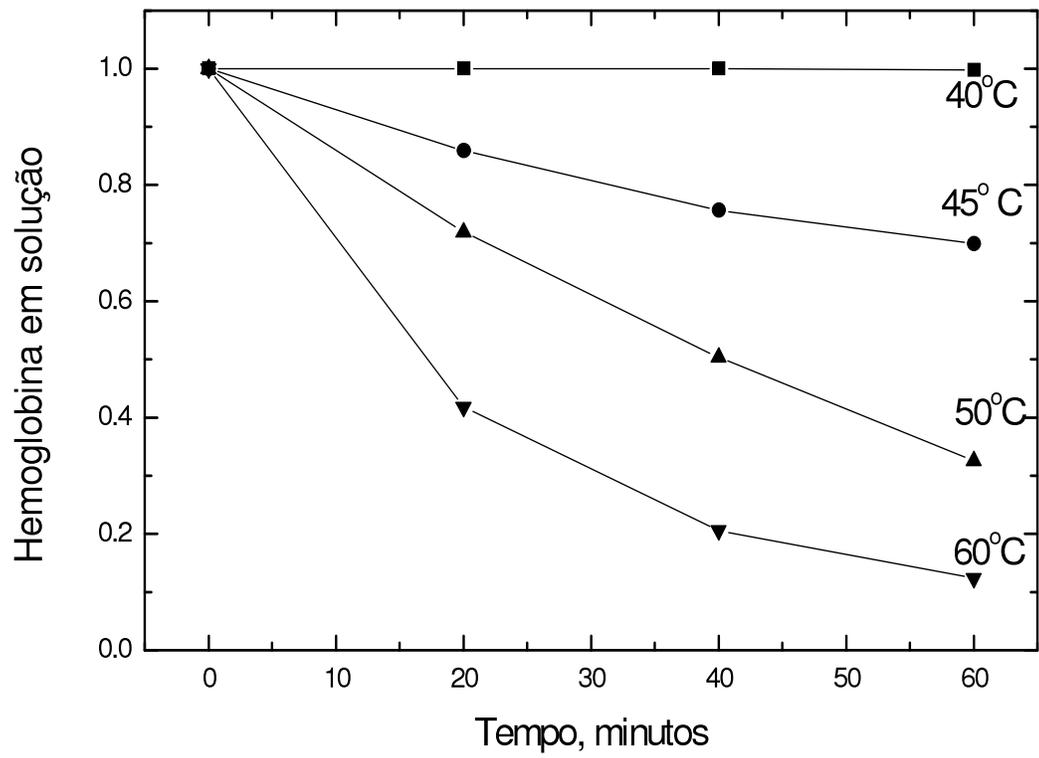


Figura 7. Termodesnaturação da Hb de teiu em diferentes temperaturas. Soluções de Hb a 140 μ M (em heme) ou 3,5 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,1M.

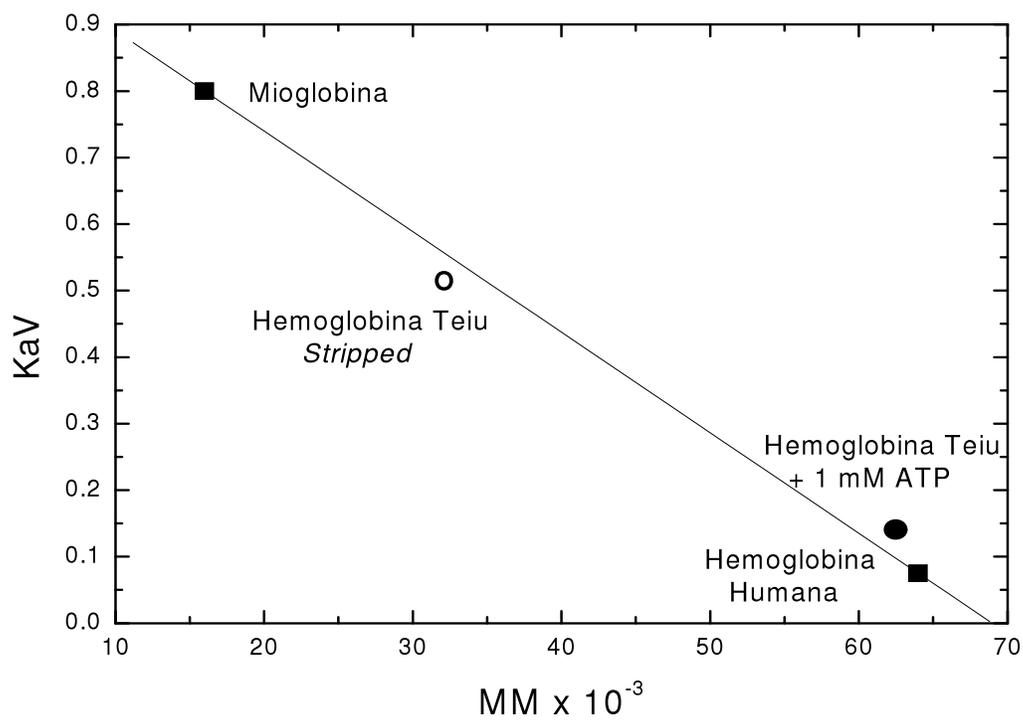


Figura 8. Gel filtração da hemoglobina de *T. merianae* em Sephadex G-100 (2 x 90) cm equilibrada em Tris HCl, na ausência ou presença de ATP 1 mM. O coeficiente de partição (K_{av}) entre a fase líquida e sólida em função da massa molecular obtida (Matsuura et al., 1987).

4.2.3 Separação das cadeias de globina por HPLC em fase reversa.

A Figura 8 mostra o perfil cromatográfico obtido das globinas reduzidas e carboximetiladas de *T. merianae*. As globinas presentes no hemolisado de *T. merianae* foram reduzidas e carboximetiladas segundo a descrição na seção “Material e Métodos” e a mistura foi resolvida por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) com a utilização de coluna de fase reversa Vydac C4 em sistema acetonitrila-TFA 0,1%. Pode-se verificar a presença de 4 cadeias equimolares com diferentes tempos de eluição, sugerindo heterogeneidade das cadeias de globina para a espécie.

As cadeias foram denominadas A, B, C e D de acordo com a ordem de eluição na cromatografia. A sequência dos resíduos N-terminal das cadeias determinadas por degradação de Edman apresentou os seguintes resultados: as cadeias A e D apresentaram nos três primeiros resíduos de aminoácidos Val-Leu-Thr e foram caracterizadas como sendo do tipo alfa; cadeias B e C apresentaram Val-His-Trp foram caracterizadas como cadeias do tipo beta, de acordo com convenção estabelecida por Matsuura e col. (1989) para *Liophis miliaris*. A caracterização completa das cadeias de globina estão demonstradas nas tabelas 1 (massa molecular por MS); 2 (análise de aminoácidos); e 3, 4, 5 e 6 (sequenciamento de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman).

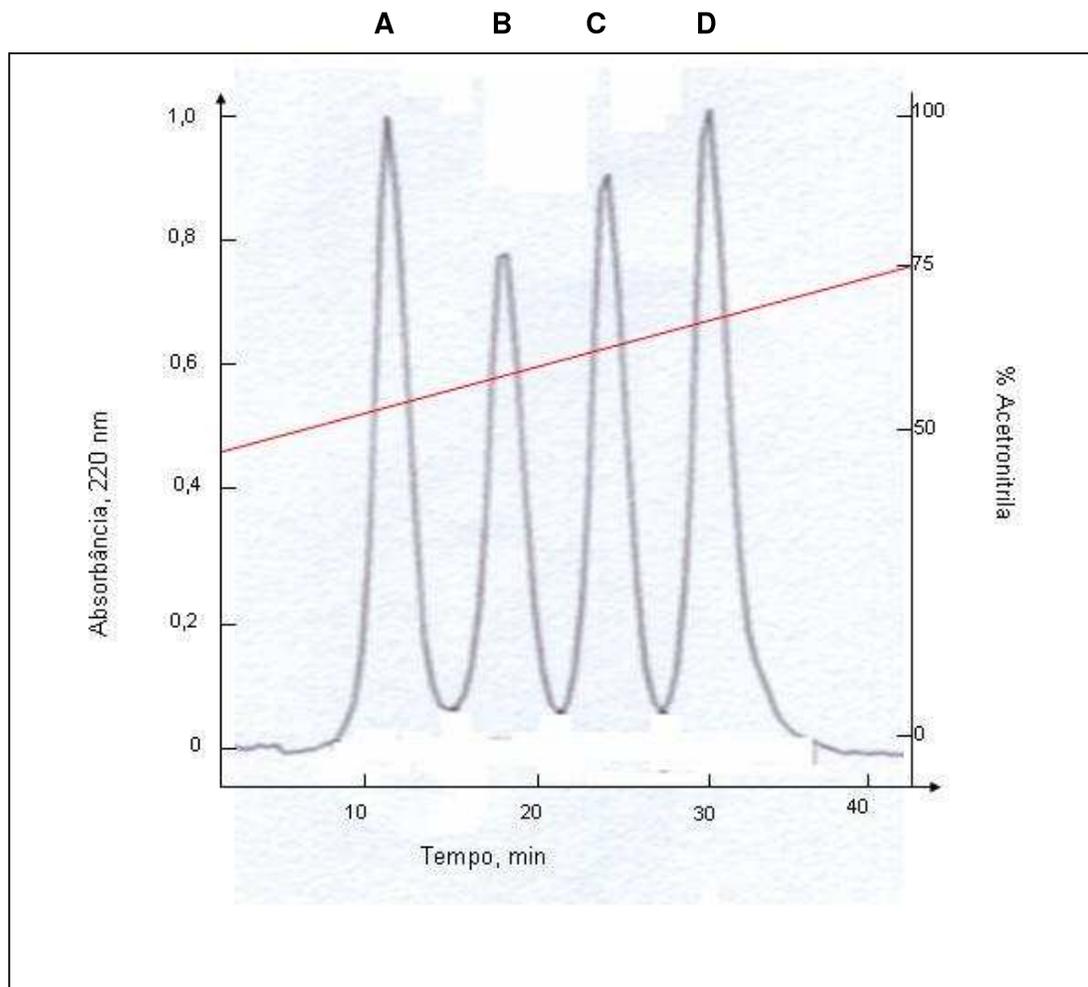


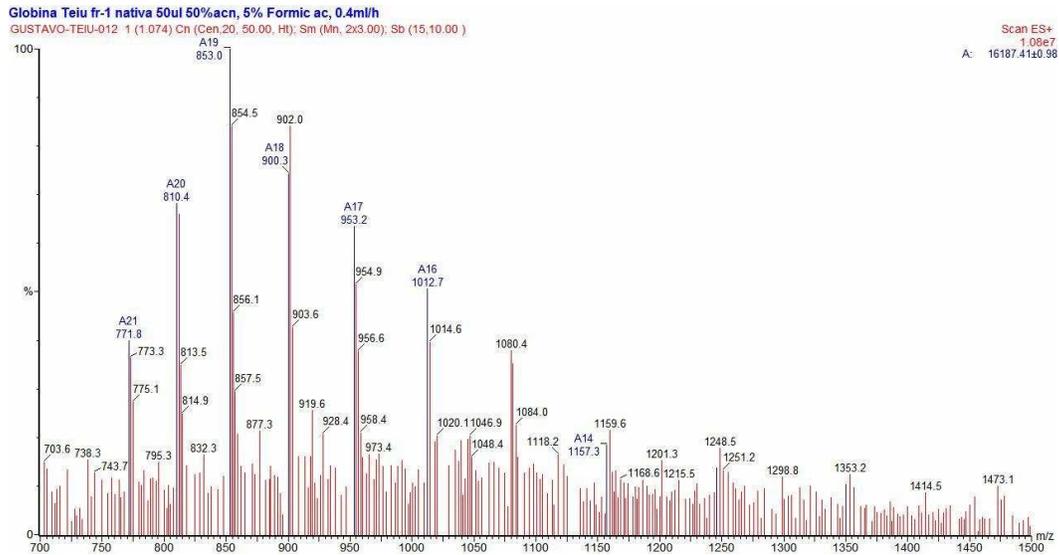
Figura 9. Separação cromatográfica das cadeias reduzidas e carboximetiladas de *Tupinambis meriana*. A separação foi realizada por RP-HPLC em coluna Vydac C4 (250 x 4,6mm) com gradiente crescente de 50 a 75% em acetronitrila, TFA a 0,1% (Linha vermelha). Eluição dos picos cromatográficos foram monitorados a 220 nm.

4.2.4 Determinação da massa molecular das cadeias de globina.

As massas moleculares de cada cadeia isolada foram determinadas por espectrometria de massas em um espectrômetro do tipo Eletrospray Triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) nas condições descritas em Material e Métodos e a proporção de aminoácidos de cada cadeia foi determinado pelo método feniltiocarbamil-aminoácidos. As Figuras 10 e 11 mostram a comparação das massas obtidas para as diferentes cadeias, onde podemos verificar uma pequena diferença das massas entre as cadeias alfa e beta, confirmando o fato deste animal possuir quatro cadeias diferentes entre si.

A Tabela 1 mostra as massas moleculares determinadas para cada cadeia por espectrometria de massas. Os dados obtidos foram coerentes com outros descritos na literatura acerca da heterogeneidade da hemoglobina em répteis.

Cadeia A (α)



Cadeia D (α)

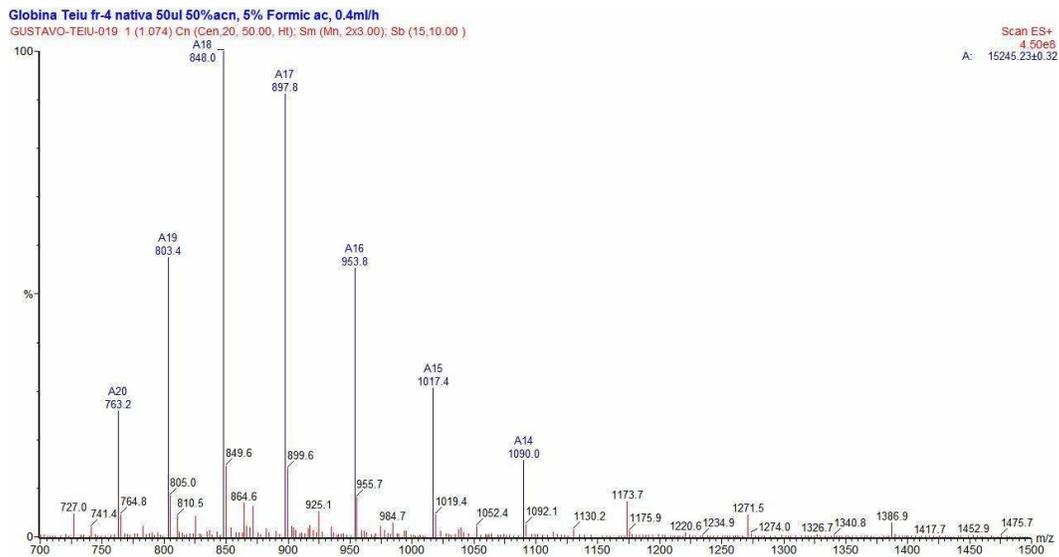
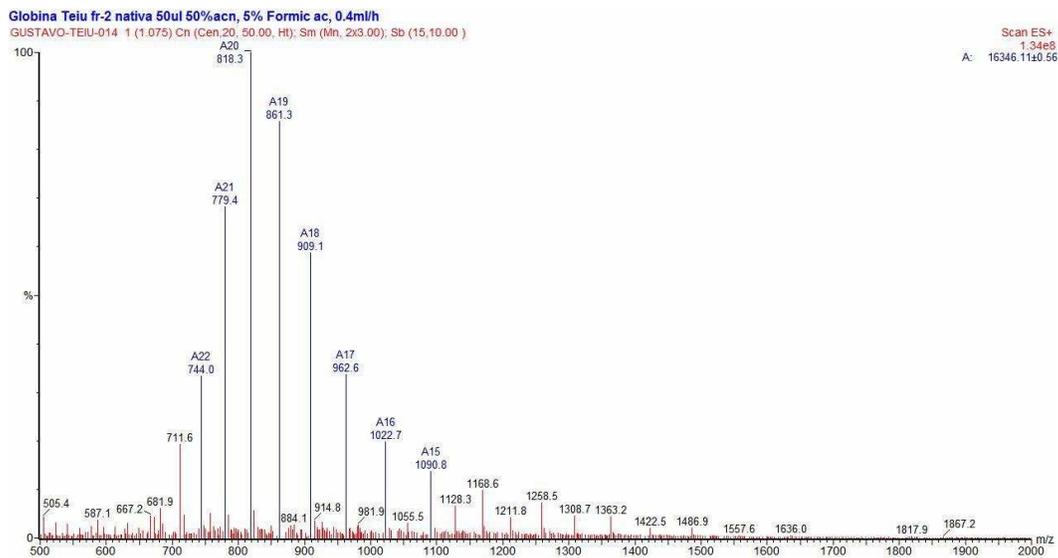


Figura 10. Espectro de massa para a determinação da massa molecular das cadeias α (A e D) obtidas por espectrometria de massa das cadeias de globina separadas por HPLC. A determinação da massa molecular (A= 16187 e D= 15245) foi realizada com 1 pmol de amostra e a deconvolução realizada utilizando o programa MassLynx. O rótulo A (número de cargas: 20, 19, 18...,etc.) indica o valor m/z de cada íon detectado e foram integralizados para a obtenção da massa molecular.

Cadeia B (β)



Cadeia C (β)

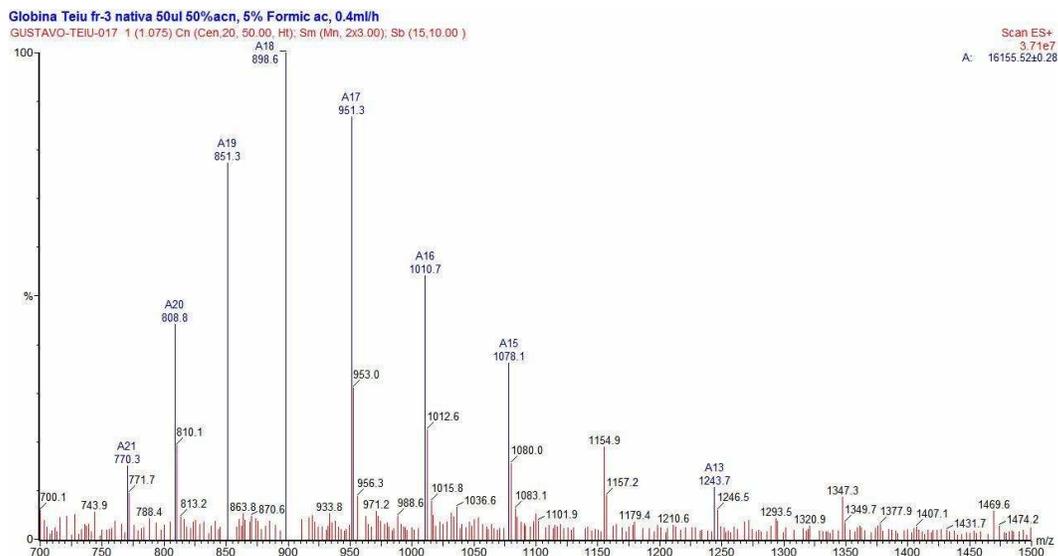


Figura 11. Espectro de massa para a determinação da massa molecular das cadeias β (B e C) obtidas por espectrometria de massa das cadeias de globina separadas por HPLC. A determinação da massa molecular (B= 16346 e C= 16155) foi realizada com 1 pmol de amostra e a de-convolução realizada utilizando o programa MassLynx. O rótulo A (número de cargas: 20, 19, 18...,etc.) indica o valor m/z de cada íon detectado e foram integralizados para a obtenção da massa molecular.

Tabela 1. Massas obtidas para cada cadeia isolada com seus respectivos desvios.

	Cadeia A (α)	Cadeia B (β)	Cadeia C (β)	Cadeia D (α)
Massa Molecular	16187,41 \pm 0,98	16346,11 \pm 0,56	16155,52 \pm 0,28	15245,23 \pm 0,32

4.3 Análise de aminoácidos por PTC-AA e Sequenciamento de aminoácidos do N-terminal de cada cadeia por degradação de Edman.

4.3.1 Determinação da composição em aminoácidos das cadeias de globina.

Na tabela 2 estão demonstrados os resultados obtidos para a análise de composição de aminoácidos obtidos pelo método de PTC conforme descrito em Materiais e Métodos, para as cadeias de globina separadas por HPLC (Fig. 9).

Tabela 2. Composição de aminoácidos das cadeias de globinas separadas por HPLC.

	Globin a A mol/mo 	Globin a B mol/mo 	Globin a C mol/mo 	Globin a D mol/mo
ASX	17,1	15,7	15,1	16,9
GLX	12,6	9,0	10,3	11,9
SER	7,8	6,6	9,1	7,5
GLI	5,6	9,0	9,4	5,9
HIS	9,4	11,3	9,1	9,8
ARG	5,2	4,1	3,4	5,0
THR	6,1	7,0	7,7	6,3
ALA	11,4	14,2	16,7	12,0
PRO	6,1	4,5	6,0	7,0
TYR	5,9	3,1	3,3	5,6
VAL	9,4	12,6	13,6	9,0
MET	0,2	0,1	0,1	0,1
CYS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ILEU	1,8	6,2	4,3	2,2
LEU	23,1	18,9	16,3	22,7
PHE	6,8	8,6	9,6	6,9

LYS 10,7 13,5 12,8 9,7

* n.d. – não determinado ** Não houve correções para destruição durante hidrólise ácida.

*** Os valores obtidos para mol/mol de globina representam a média de duplicatas de análise e foram calculados para uma massa molecular média de 16 kDa para todas as cadeias.

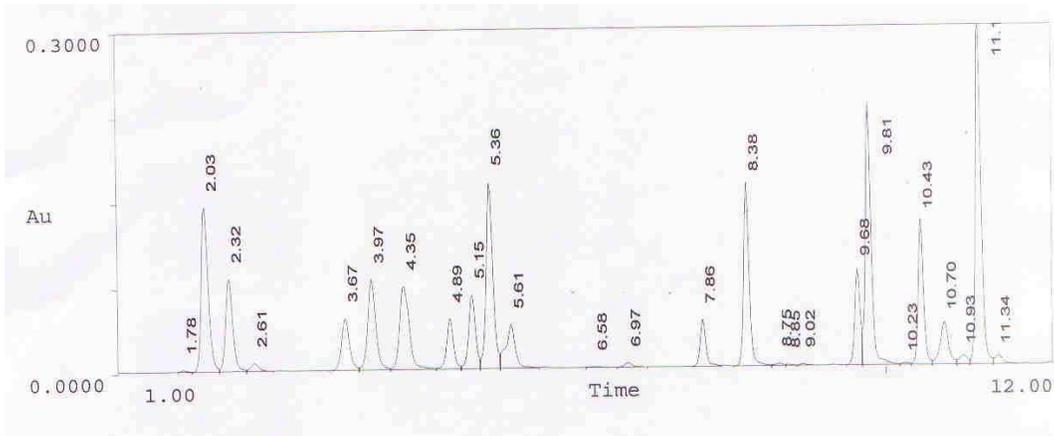


Figura 12. Perfil de PTC-aminoácidos separados por HPLC para a análise de composição em aminoácidos da cadeia de globina A. A ordem de eluição dos aminoácidos estão de acordo com aquele listado na tabela 2.

4.3.2 Determinação da seqüência N-terminal das cadeias de globina por degradação de Edman.

As cadeias de globina separadas por HPLC-fase reversa (Fig. 9) foram submetidas ao sequenciamento automático por degradação de Edman resultando ao redor de 30 a 40 resíduos de aminoácidos seqüenciados. Os dados de sequenciamento estão resumidos nas tabelas 3, 4, 5 e 6. Esses dados de

estrutura primária foram utilizados para pesquisa de hemoglobinas homólogas, através do Blast (NCBI) e fasta (EMBL).

Tabela 3 - Sequenciamento de aminoácidos da cadeia de globina A (alfa) por degradação automática de Edman.

CICLOS	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Sequência
1	1.30	6.44	5.36	0.89	7.98	0.72	0.54	1.55	0.71	0.47	9.14	1.44	9.42	2.64	11.36	7.51	75.10	0.00	1.44	V
2	3.40	5.55	1.43	0.00	2.64	0.00	0.57	0.52	72.81	0.15	1.21	1.78	1.86	2.10	0.81	0.71	2.36	0.00	2.13	L
3	2.17	5.40	1.41	1.17	2.44	0.00	1.27	1.13	3.73	0.04	0.79	2.07	0.81	4.41	1.01	44.22	2.66	0.00	1.99	T
4	66.15	5.94	1.85	0.81	1.73	0.00	1.72	0.65	1.07	0.06	1.07	2.99	0.64	1.77	0.00	2.47	1.99	0.00	1.34	A
5	5.67	42.23	1.53	2.81	1.96	0.00	1.15	0.88	1.17	0.05	0.71	2.75	0.60	1.44	0.58	0.99	1.18	0.00	1.35	D
6	1.60	18.80	53.48	2.88	1.44	0.00	0.86	1.02	1.40	0.03	3.14	1.92	0.83	0.94	2.54	0.62	1.02	3.23	3.20	E
7	2.80	6.88	8.35	2.87	1.89	0.04	0.72	1.19	2.01	0.26	0.56	1.53	65.15	1.09	0.92	0.74	0.82	1.09	2.85	Q
8	2.98	5.29	2.38	3.19	1.70	0.00	0.03	45.88	1.94	0.24	0.44	1.19	0.00	1.07	12.01	1.00	0.77	0.41	1.90	K
9	2.17	6.30	1.53	3.66	1.80	1.23	1.09	11.29	45.02	0.03	0.46	1.15	1.17	0.00	3.41	0.62	0.76	0.82	3.32	L
10	1.73	5.33	1.24	2.08	2.61	0.00	0.58	3.02	58.02	0.11	0.44	1.32	1.00	1.02	2.13	0.61	1.11	0.38	2.76	L
11	1.84	7.60	1.11	2.06	3.06	39.12	0.75	2.09	13.70	0.08	1.70	1.30	1.05	1.09	1.00	0.76	0.93	0.70	1.90	H
12	1.53	5.88	1.11	1.44	2.43	10.86	0.57	1.46	4.82	0.01	0.47	1.22	0.73	1.23	8.60	0.74	1.05	0.67	2.21	S
13	1.38	9.76	2.13	1.56	6.59	3.40	0.69	1.43	3.48	0.05	11.37	1.29	6.99	2.19	22.93	25.24	1.38	0.65	2.99	T
14	1.32	8.97	0.99	1.63	2.43	1.60	0.82	1.51	3.02	0.03	2.82	1.26	0.93	1.55	0.82	5.58	1.27	18.83	2.27	W
15	1.55	6.88	0.97	1.25	2.37	1.40	0.64	1.54	2.67	0.04	0.57	1.11	0.66	1.32	4.83	1.88	1.30	4.59	1.60	S
16	1.71	10.86	2.23	2.64	7.03	1.19	1.68	16.18	3.62	0.02	12.60	1.28	8.14	1.49	16.78	9.88	4.30	3.18	1.92	K
17	1.72	5.73	1.06	1.84	3.21	1.16	1.07	7.02	16.35	0.04	0.66	1.02	1.13	1.34	0.69	1.34	1.18	1.79	1.41	L
18	1.78	9.37	1.11	1.90	19.57	1.38	0.93	3.84	8.98	0.05	4.05	1.11	1.57	1.40	0.38	0.80	1.37	1.59	1.34	G
19	1.81	6.69	2.81	1.35	7.64	1.54	0.65	2.64	5.75	0.01	0.65	1.08	14.80	1.59	0.57	0.00	1.34	0.95	1.25	Q
20	1.98	4.79	1.98	2.28	4.87	13.49	1.11	2.53	5.20	0.00	0.62	1.12	6.99	1.76	0.72	1.12	1.42	1.38	1.07	H
21	1.88	4.89	1.57	2.14	3.50	6.71	1.09	2.33	14.83	0.03	0.63	1.28	3.78	2.00	1.12	0.96	1.35	1.20	1.13	L
22	2.01	5.77	8.91	2.25	2.70	3.60	0.96	2.27	8.92	0.11	0.60	1.58	2.60	2.03	0.53	0.91	1.43	1.21	0.88	E
23	1.87	10.94	4.90	1.44	2.40	2.28	0.56	1.95	6.02	0.01	0.63	1.62	2.12	1.78	0.75	0.96	0.05	0.00	1.08	D
24	2.07	8.55	2.76	2.15	2.34	1.84	1.00	2.35	14.24	0.00	0.70	1.52	1.90	2.06	0.69	0.86	1.56	0.00	1.36	L
25	2.46	6.38	2.01	2.16	8.82	1.88	0.91	2.20	9.15	0.00	0.69	1.52	1.57	1.87	0.36	0.77	1.56	0.00	1.28	G
26	2.69	6.97	1.81	2.15	9.49	1.73	0.88	2.01	6.41	0.02	0.71	1.29	1.57	1.67	0.66	0.96	1.54	0.00	1.16	G
27	2.70	6.33	8.28	2.23	6.38	0.00	0.92	2.04	5.63	0.00	0.75	1.40	1.42	1.79	0.59	1.05	1.58	0.00	1.20	E
28	9.88	5.75	5.03	1.65	4.04	1.66	0.58	1.73	5.29	0.01	0.79	1.34	1.47	2.00	0.79	1.05	1.59	0.00	1.43	A
29	6.36	6.22	2.90	2.15	2.91	0.00	0.84	1.80	11.62	0.02	0.77	1.32	1.49	1.76	0.66	1.10	1.66	0.00	1.24	L
30	4.34	6.30	2.12	2.26	2.47	1.77	0.74	1.70	8.48	0.04	0.81	1.38	1.39	2.52	0.67	4.69	1.73	0.00	1.49	T

Tabela 4 - Sequenciamento de aminoácidos da cadeia de globina B (beta) por degradação de Edman.

ciclos	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Sequência
1	1.24	1.20	0.87	0.53	1.41	0.92	0.54	1.04	0.83	0.51	0.82	1.79	0.78	0.38	1.23	0.96	135.63	0.41	0.82	V
2	2.78	0.71	0.67	0.92	1.21	113.52	0.59	0.60	7.02	0.06	1.52	1.99	0.46	1.67	0.89	0.59	17.03	0.00	3.74	H
3	2.87	1.70	1.20	0.93	1.89	22.76	0.75	1.02	2.23	0.00	3.59	1.31	0.00	1.58	0.90	4.42	8.44	38.45	1.29	W
4	8.16	2.98	1.72	2.45	2.93	5.55	0.80	1.42	1.88	0.02	4.57	1.26	1.60	1.58	3.45	73.66	3.30	6.68	1.76	T
5	106.69	6.91	1.92	2.92	1.90	2.89	1.12	2.61	2.28	0.00	1.62	1.33	0.00	1.41	1.10	17.91	2.85	1.71	1.07	A
6	30.88	3.88	99.24	2.81	1.89	2.80	1.46	2.00	3.40	0.03	1.98	1.27	0.00	0.89	0.79	5.02	3.20	1.03	1.00	E
7	10.63	2.88	113.83	2.43	1.60	1.83	1.14	2.97	4.14	0.05	1.76	1.39	0.69	1.26	6.06	1.95	2.86	0.56	1.23	E
8	5.71	1.51	34.71	4.20	2.39	1.23	1.06	91.08	4.62	0.01	2.20	1.31	1.17	1.33	2.43	1.21	2.58	0.99	1.25	K
9	4.22	3.72	21.53	3.26	2.93	2.03	1.46	32.15	5.72	0.05	2.12	1.54	73.06	1.39	1.05	0.00	2.87	0.59	1.33	Q
10	4.02	5.89	9.22	2.89	3.97	2.03	1.93	11.45	76.05	0.00	7.59	1.71	27.88	2.07	5.05	2.84	3.49	0.69	1.26	L
11	3.99	5.81	5.57	3.10	4.21	3.78	78.31	0.00	31.69	0.06	8.07	1.71	10.20	2.07	5.10	3.12	3.40	0.82	1.38	I
12	4.02	35.42	41.01	3.18	4.54	2.87	26.80	3.89	12.89	0.01	8.35	1.65	5.55	2.58	4.87	4.88	3.32	0.59	1.43	D/E
13	4.38	16.01	18.23	3.56	4.88	56.73	10.30	3.86	8.38	0.00	8.81	1.76	4.06	2.48	5.49	6.15	3.81	0.62	1.80	H
14	4.25	7.53	6.41	3.35	2.89	24.37	63.87	0.00	6.55	0.00	3.10	1.74	1.28	2.53	0.82	1.94	4.00	1.08	1.68	I
15	4.54	5.83	3.77	3.45	3.11	9.93	28.15	3.38	6.75	0.00	3.98	1.71	1.05	2.51	0.96	1.73	4.53	10.98	1.68	W
16	5.28	9.61	3.25	4.35	4.42	4.97	11.84	5.68	6.81	0.01	52.64	1.77	2.85	1.81	4.90	3.92	4.36	5.13	1.49	N
17	6.18	8.12	2.79	4.90	4.59	3.81	6.30	51.43	8.44	0.03	30.10	1.74	2.66	2.36	5.22	3.36	5.49	2.83	1.41	K
18	6.10	7.95	2.49	4.75	5.19	3.92	4.55	27.11	7.81	0.00	16.40	1.91	2.71	2.49	4.67	3.51	44.54	1.42	1.45	V
19	6.83	52.33	3.58	5.37	6.28	3.20	4.14	13.32	8.15	0.03	12.49	2.02	4.00	2.08	5.54	4.40	27.21	1.24	1.40	D
20	6.96	27.59	2.11	5.14	4.31	3.83	3.69	7.68	7.71	0.02	5.16	1.92	1.34	2.53	0.91	1.59	49.19	0.92	1.57	V
21	44.92	13.15	2.18	5.38	4.19	3.41	3.41	6.09	8.20	0.02	4.89	2.03	1.15	2.71	1.16	1.74	27.88	0.94	1.55	A
22	62.67	10.05	3.98	4.29	6.19	3.13	3.25	5.05	7.60	0.02	9.05	1.84	3.17	2.47	5.84	4.30	14.46	0.15	1.40	A
23	34.59	7.57	2.77	5.22	4.86	3.14	36.75	4.85	7.59	0.00	3.81	1.88	0.95	2.57	1.06	1.71	9.48	0.73	1.64	I
24	19.02	8.21	3.93	5.85	34.22	2.90	21.81	4.79	7.97	0.05	9.16	1.88	3.14	2.68	0.96	4.60	7.32	0.87	1.55	G
25	12.53	5.97	2.88	5.79	46.90	3.12	10.81	4.73	8.46	0.02	3.99	2.12	0.90	2.25	1.38	1.85	6.73	0.85	1.60	G
26	11.00	7.35	22.64	5.43	27.68	3.06	6.17	4.98	7.92	0.01	9.18	2.11	2.82	2.91	5.88	4.22	6.25	0.00	1.66	E
27	38.67	7.28	15.50	5.69	15.48	3.00	4.49	4.72	8.53	0.02	9.31	2.09	2.88	2.76	5.84	4.60	6.00	0.65	1.69	A
28	26.57	5.24	7.22	5.68	8.83	3.51	3.89	4.69	34.21	0.00	3.66	2.07	0.93	2.13	1.19	1.84	6.21	0.78	1.57	L
29	16.07	5.19	4.48	4.99	6.75	3.48	2.99	4.63	24.42	0.01	3.74	2.03	0.94	2.77	1.35	2.33	30.77	0.00	1.88	V
30	11.52	5.34	3.32	5.79	5.86	3.40	3.28	5.05	15.80	0.03	3.93	1.94	0.87	2.57	1.45	18.05	20.55	0.71	1.68	T
31	9.39	5.02	2.70	5.67	5.26	3.29	3.22	4.62	33.26	0.01	3.65	2.13	0.82	3.10	1.26	10.98	11.57	0.74	1.50	L
32	8.53	6.82	2.96	4.97	6.54	3.95	3.02	4.51	44.84	0.04	9.30	1.98	2.67	3.05	5.51	8.81	8.26	0.00	1.70	L
33	8.40	6.69	2.56	6.20	5.83	3.29	24.82	4.75	28.98	0.00	8.37	2.08	2.46	2.93	5.43	5.64	7.25	0.84	1.70	I
34	8.32	4.90	2.28	5.41	4.84	3.81	16.20	4.69	17.18	0.00	3.86	2.10	1.22	0.47	1.31	2.89	26.11	0.40	2.04	V
35	7.77	6.79	2.63	5.92	5.71	3.42	8.72	4.82	12.37	0.00	9.09	2.36	2.99	2.26	5.72	4.71	18.69	0.75	19.36	Y
36	8.00	5.38	2.09	5.83	4.51	3.24	5.54	4.87	10.95	0.00	3.65	15.85	0.99	2.95	1.09	2.25	11.59	0.81	13.70	P
37	8.22	5.31	2.06	6.07	4.47	3.66	4.22	4.96	10.12	0.05	4.06	13.09	1.04	3.22	1.14	2.46	8.37	4.98	7.36	W
38	8.25	5.14	1.91	5.94	4.85	3.44	3.84	4.95	9.65	0.00	3.55	8.48	1.11	3.23	1.10	10.27	7.16	3.97	4.17	T
39	8.05	5.33	2.06	5.88	4.59	4.12	3.16	5.03	9.09	0.03	3.81	5.34	1.19	15.62	1.42	8.36	8.46	2.41	3.11	R
40	8.53	6.79	3.33	6.86	6.27	3.89	3.39	5.64	9.54	0.01	9.09	3.82	3.11	25.35	6.18	9.31	8.13	1.72	2.34	R
41	7.87	5.07	1.85	16.08	4.30	4.25	3.02	5.16	8.91	0.08	3.82	3.20	0.97	20.93	1.32	4.04	5.88	1.26	2.35	F
42	7.81	6.92	2.61	23.25	5.86	3.77	2.91	5.19	8.72	0.00	8.54	2.88	2.89	12.91	5.45	5.58	5.56	1.26	2.05	F

Tabela 5 - Sequenciamento de aminoácidos da cadeia de globina C (beta) por degradação de Edman.

ciclos	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Sequência
1	1.02	1.20	0.57	1.29	1.10	0.80	0.85	1.45	1.12	0.80	0.81	1.35	0.57	0.46	0.70	0.75	78.27	0.94	0.75	V
2	1.91	0.90	1.30	1.00	1.65	67.09	0.43	0.44	6.64	0.02	6.03	1.32	2.28	0.31	3.86	2.12	15.90	0.29	0.78	H
3	3.01	0.90	0.89	0.81	0.98	16.15	0.88	0.00	0.94	0.00	0.84	0.75	0.00	0.65	0.35	2.88	3.21	41.21	0.54	W
4	5.13	0.90	1.89	1.14	1.19	3.45	0.28	0.58	0.79	0.00	0.75	0.75	0.16	0.64	0.53	27.70	1.63	17.85	0.40	T
5	45.82	1.30	1.86	1.83	2.58	1.88	0.62	1.66	2.29	0.02	5.81	0.69	1.87	0.41	4.12	16.31	1.00	4.93	0.32	A
6	23.95	1.10	40.17	2.09	2.15	0.94	1.95	1.31	3.14	0.00	6.12	0.85	2.13	0.22	3.87	7.30	1.22	2.29	0.30	E
7	9.21	0.98	52.74	2.38	0.76	0.75	0.52	2.43	2.52	0.07	0.73	1.00	0.29	0.19	2.73	1.85	0.88	0.85	0.27	E
8	4.83	0.95	28.31	2.09	2.25	0.57	0.70	40.77	2.66	0.00	6.22	0.89	2.25	0.44	7.01	3.01	2.00	0.81	0.27	K
9	3.11	0.94	15.08	1.54	2.28	1.20	0.58	23.56	4.51	0.00	6.41	0.89	27.39	0.32	4.45	2.64	1.19	0.54	1.22	Q
10	2.58	1.00	7.39	1.43	2.12	0.77	1.00	10.43	32.41	0.00	5.62	1.63	17.22	0.29	3.88	2.52	1.89	0.47	0.50	L
11	2.54	1.21	3.29	1.23	1.13	1.60	27.02	5.34	19.62	0.00	1.09	1.24	5.83	0.28	0.45	0.53	1.43	0.88	0.49	I
12	2.98	1.24	2.11	1.51	1.11	1.13	18.25	3.22	9.81	0.00	0.93	1.12	2.86	0.27	0.60	13.96	1.45	0.84	0.42	T
13	2.62	0.98	1.57	1.59	1.10	1.21	8.73	2.44	5.68	0.00	0.92	1.00	1.54	2.43	4.78	9.40	2.01	0.71	0.75	S
14	2.46	1.22	1.46	1.34	2.18	0.80	19.30	1.89	3.83	0.02	4.72	1.07	2.70	1.24	6.21	8.80	1.71	1.00	0.70	I
15	2.86	1.23	0.94	2.11	1.12	0.76	14.83	1.83	3.62	0.00	1.01	1.11	0.76	0.60	1.85	2.59	1.93	8.52	0.74	W
16	14.84	1.40	1.17	2.55	2.16	0.73	8.29	2.50	3.48	0.01	6.10	1.11	2.76	0.62	3.63	3.51	1.89	6.62	0.72	A
17	12.15	0.99	0.76	1.86	1.41	0.57	4.86	14.29	3.83	0.02	1.07	1.19	0.71	0.30	0.59	1.05	1.99	2.84	0.72	K
18	7.77	0.98	0.83	2.13	1.70	0.80	3.53	12.01	3.65	0.00	1.12	1.28	0.98	0.33	0.33	0.89	12.24	2.28	0.58	V
19	5.31	12.53	0.80	2.23	1.61	0.82	2.62	7.22	3.47	0.00	0.99	1.22	1.08	0.37	0.45	0.84	10.53	1.58	0.65	D
20	4.13	10.00	0.75	2.33	1.66	1.09	2.30	4.66	3.43	0.00	1.02	1.29	0.92	0.37	0.47	0.92	15.53	1.34	0.62	V
21	3.69	4.29	0.79	2.32	1.63	0.96	1.87	3.50	3.52	0.01	1.07	1.22	0.75	0.74	2.06	0.79	12.14	1.15	0.63	X
22	3.57	2.05	1.06	2.38	1.63	0.86	1.84	2.94	3.76	0.00	1.83	1.54	0.84	0.24	2.08	0.65	15.56	1.00	0.69	V
23	3.17	2.10	0.89	2.36	1.62	0.85	1.84	2.52	3.43	0.00	1.10	1.42	0.85	0.70	1.49	0.93	16.17	0.83	0.73	V
24	2.88	2.11	0.77	2.40	5.42	0.87	1.78	2.17	3.47	0.03	1.11	1.50	0.74	0.38	1.08	0.84	12.30	0.77	0.66	G
25	2.83	1.98	0.71	2.49	5.50	0.73	1.71	2.15	3.66	0.00	10.23	5.03	0.69	0.46	0.46	0.76	8.51	0.66	0.65	N
26	3.04	2.20	0.82	2.39	4.35	0.82	1.36	6.12	3.37	0.04	1.10	5.62	0.65	0.38	0.59	0.86	5.99	0.76	0.57	K

Tabela 6 – Sequenciamento de aminoácidos da cadeia de globina D (Alfa) por degradação de Edman.

CICLOS	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Sequência
1	1.05	2.59	0.49	0.77	1.22	0.42	0.85	1.14	0.99	0.45	1.81	1.47	1.23	1.14	1.09	1.08	165.61	1.76	0.75	V
2	3.86	3.02	1.47	0.48	1.47	2.39	0.44	0.92	157.83	0.10	0.17	1.98	0.76	0.89	0.37	0.86	6.32	0.15	1.75	L
3	1.79	3.83	0.51	1.43	2.37	0.99	0.31	1.34	8.88	0.02	0.92	2.46	0.43	7.93	0.16	78.41	1.65	1.62	0.89	T
4	3.55	4.70	115.40	1.88	1.19	0.75	1.18	1.67	1.84	0.00	0.74	1.80	0.38	1.63	0.20	12.30	1.25	1.54	1.11	E
5	3.73	102.95	23.40	1.81	1.63	1.22	1.18	3.04	1.28	0.02	0.85	1.47	0.35	0.53	0.11	3.56	1.14	1.29	0.87	D
6	4.31	126.88	8.55	2.78	5.00	1.81	0.87	1.90	1.06	0.02	7.52	1.32	4.31	0.19	6.40	7.82	1.15	0.37	0.00	D
7	3.82	35.79	3.78	1.00	1.67	1.74	4.33	108.47	0.00	0.04	0.57	1.35	0.40	0.11	0.31	1.30	1.12	0.40	1.12	K
8	86.99	13.61	3.03	3.71	1.80	1.22	1.82	37.65	2.29	0.01	0.82	1.29	0.38	1.80	0.83	0.95	1.81	0.39	0.49	A
9	37.51	4.80	2.24	3.11	1.70	79.66	1.23	14.20	2.07	0.00	0.82	1.27	1.14	1.65	0.47	0.98	1.57	0.00	0.65	H
10	16.88	5.30	1.76	3.19	1.81	37.10	1.25	6.46	3.57	0.07	0.80	1.41	1.14	0.28	0.21	0.85	61.72	0.40	0.99	V
11	7.32	4.82	1.09	6.84	1.98	15.02	3.78	74.23	3.79	0.03	0.85	1.34	0.95	0.00	0.47	0.68	31.68	0.00	0.00	K
12	63.57	5.16	0.82	5.33	1.73	6.08	3.67	39.87	3.97	0.00	0.83	1.38	0.77	1.05	0.77	0.89	14.82	0.88	0.94	A
13	37.59	4.86	0.75	5.47	1.79	3.80	3.68	20.25	4.12	0.02	0.86	1.35	0.68	0.99	0.54	1.10	55.53	0.00	0.97	V
14	20.40	4.37	0.85	4.23	1.97	3.42	3.12	10.09	3.71	0.00	0.77	1.48	0.94	1.26	0.85	1.25	34.19	34.50	1.06	W
15	57.08	4.76	0.82	3.97	2.05	2.32	3.73	6.27	3.51	0.00	0.88	1.41	1.05	0.85	0.82	1.13	16.80	22.52	1.03	A
16	38.91	4.01	5.84	3.18	2.16	2.11	3.21	4.70	3.45	0.00	0.79	1.50	54.88	0.05	0.89	1.12	9.11	9.00	0.91	Q
17	21.85	6.41	4.05	0.00	0.00	2.21	3.43	57.60	3.18	0.00	2.43	1.47	20.45	0.80	0.59	1.12	5.68	4.89	0.94	K
18	13.75	4.49	6.80	0.87	1.99	2.31	3.41	41.69	3.28	0.00	0.84	1.34	64.09	0.77	0.49	1.15	4.44	2.58	0.92	Q
19	10.30	4.62	4.42	1.30	2.37	2.13	3.69	21.10	0.00	0.02	0.75	1.58	35.00	0.05	0.85	41.48	4.52	0.00	0.00	T
20	8.06	9.24	3.01	3.27	4.32	2.31	8.96	3.30	3.23	0.00	8.16	1.87	25.67	1.97	12.61	19.09	3.97	0.85	1.37	Q
21	29.28	5.45	1.41	3.96	2.32	2.40	5.96	3.58	3.44	0.00	0.75	2.00	7.17	1.80	2.77	11.33	3.83	0.00	1.24	A
22	23.80	6.44	1.00	3.93	2.36	2.66	4.78	3.50	3.56	0.00	0.83	13.31	4.28	1.57	1.75	6.83	3.79	0.00	1.27	P
23	15.47	16.47	0.82	3.47	2.67	2.74	4.11	2.93	3.51	0.00	0.86	15.58	2.67	1.26	1.29	4.23	3.61	0.00	0.88	D
24	11.40	17.90	0.73	4.66	2.50	2.76	12.74	3.33	3.83	0.00	0.93	10.48	2.00	1.17	0.79	2.56	3.65	0.00	1.01	I
25	9.17	16.37	0.88	10.12	2.59	2.13	13.48	2.58	3.38	0.00	2.43	7.39	1.59	0.72	0.86	2.20	3.52	0.00	0.80	F
26	15.07	14.90	0.76	13.29	2.89	2.36	13.70	3.04	4.11	0.00	2.03	6.02	1.37	1.17	0.71	1.88	3.41	1.35	0.93	A
27	17.43	9.92	6.40	13.06	2.97	2.50	11.81	3.50	3.91	0.00	1.08	4.83	1.11	0.99	0.51	1.60	3.28	2.92	0.57	E
28	24.03	5.94	8.90	12.00	2.56	2.54	9.40	4.01	4.98	0.00	1.13	3.58	0.97	1.17	0.82	1.75	3.38	3.37	1.10	A
29	24.67	5.87	8.38	8.70	2.83	2.59	6.99	3.33	10.00	0.00	1.04	3.18	0.99	1.16	0.83	1.76	3.38	1.27	1.12	L
30	20.72	5.55	6.64	11.91	2.64	2.62	5.83	3.15	12.14	0.00	1.09	2.80	0.82	1.29	0.54	1.64	3.25	1.12	1.16	F
31	17.87	5.22	4.81	13.32	2.50	2.85	5.16	3.46	11.77	0.00	1.01	2.43	0.78	7.27	0.65	1.49	3.10	2.14	1.10	R
32	14.22	3.46	0.02	12.89	4.05	2.62	4.90	3.39	15.93	0.00	1.08	2.65	1.07	11.06	1.09	3.48	3.33	0.00	1.32	L
33	12.26	4.04	2.41	15.59	2.70	3.01	4.88	3.26	15.95	0.00	1.16	2.46	0.68	10.71	0.83	1.41	0.00	0.00	1.29	X
34	10.92	4.64	1.82	15.30	2.92	3.04	4.29	3.11	19.10	0.00	1.12	2.53	0.68	9.11	0.57	1.47	3.21	0.00	0.96	L
35	13.74	4.15	1.45	14.64	2.64	3.14	4.44	3.81	19.21	0.00	1.11	2.19	0.67	7.12	0.62	1.31	3.42	0.00	1.16	X
36	15.88	4.20	1.21	12.07	2.87	7.20	4.16	3.27	16.94	0.00	1.15	2.26	0.67	5.58	0.67	1.43	3.66	0.55	1.15	H

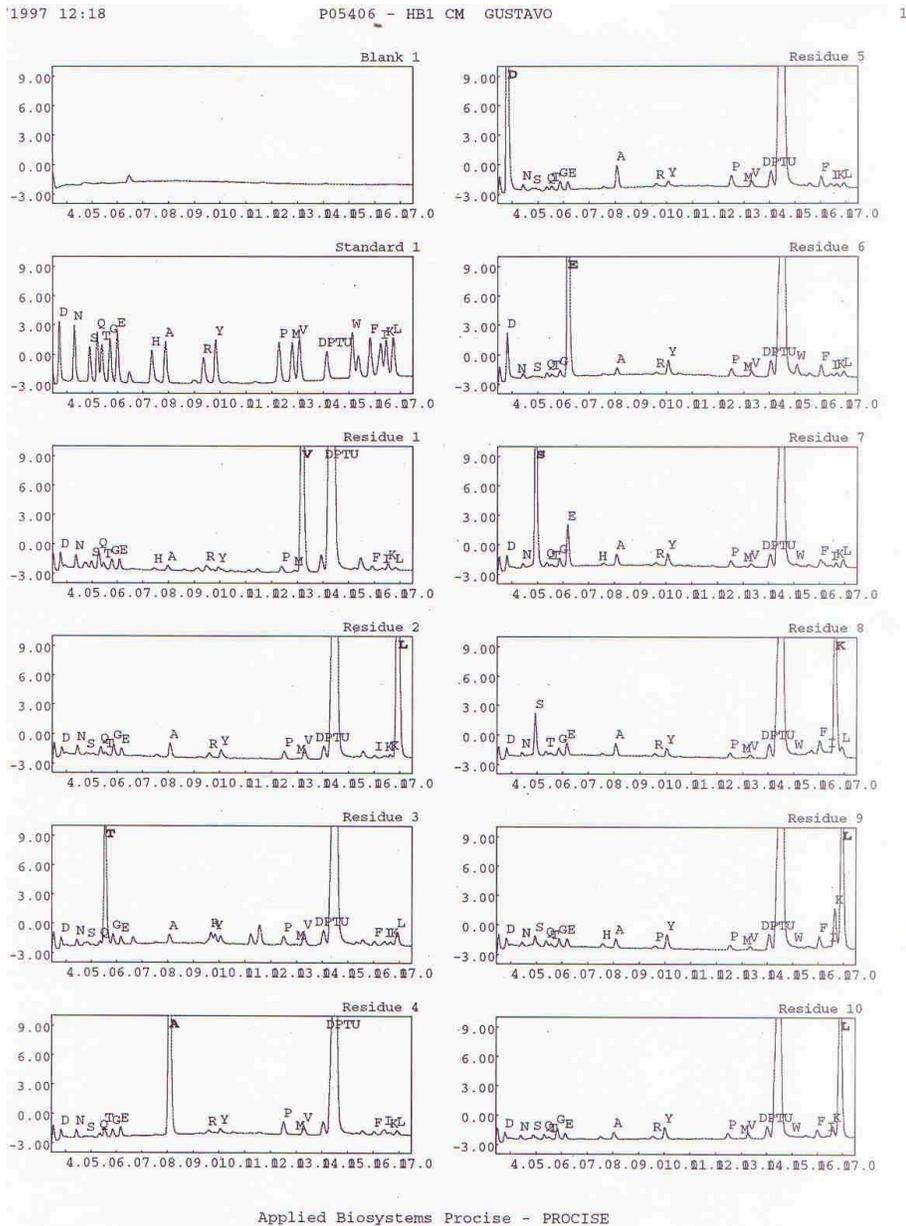


Figura 13. Seqüenciamento de aminoácidos da cadeia A por degradação de Edman. Estão representados os cromatogramas de derivados feniltioindantóinas-aminoácidos (PTHAA) detectados durante os 10 primeiros ciclos de reação de degradação de Edman.

4.4 Caracterização parcial da estrutura primária interna de peptídeos tripsínicos das cadeias de globina de teiú por espectrometria de massas e alinhamento das seqüências de aminoácidos N-terminal e internas pelo programa Fasts3 (EMBL).

Os peptídeos tripsínicos de cada cadeia foram primeiramente mapeados por espectrometria de massa em modo MS1 e cada íon detectado foi selecionado para espectro de fragmentação utilizando dissociação por colisão induzida (CID-MS/MS). MS1 fornece a massa dos peptídeos e CID-MS/MS produz informações estruturais através da dedução da seqüência de aminoácidos pela interpretação dos íons fragmentos do tipo *b* e *y*. O espaçamento entre cada série de íons representa a massa residual de cada aminoácido participando da seqüência (Anexo I). A massa residual representa a massa molecular do aminoácido subtraído de uma molécula de água. A figura 14 apresenta o mapeamento peptídico tripsínico obtido por espectrometria de massa de cada cadeia de globina (A, B, C e D). Conforme o perfil de íons detectados para cada cadeia pode-se afirmar que existe diferenças nas estruturas primárias entre as cadeias α (A e D), bem como entre as cadeias β (B e C), e também entre si, cadeias α e β . Portanto, podemos concluir que a hemoglobina de teiú é composta de quatro cadeias diferentes que contribuem para formar a estrutura quaternária tetramérica e a determinação das combinações entre as cadeias α e β para a formação dos respectivos dímeros poderão ser estabelecidas quando as seqüências de aminoácidos de todas as cadeias for completada. As tabelas 7, 8, 9 e 10 demonstram os resultados dos íons detectados. As tabelas 7 e 8 apresentam o seqüenciamento *de novo* para diversos peptídeos tripsínicos e foram utilizados

para alinhamento com outras cadeias de globina utilizando o programa Fasts3 (EMBL) que ordena do N-terminal para C-terminal os peptídeos contendo resíduos de aminoácidos emparelhados a seqüência de outras globinas baseado em similaridades e conservação evolutiva de resíduos de aminoácidos.

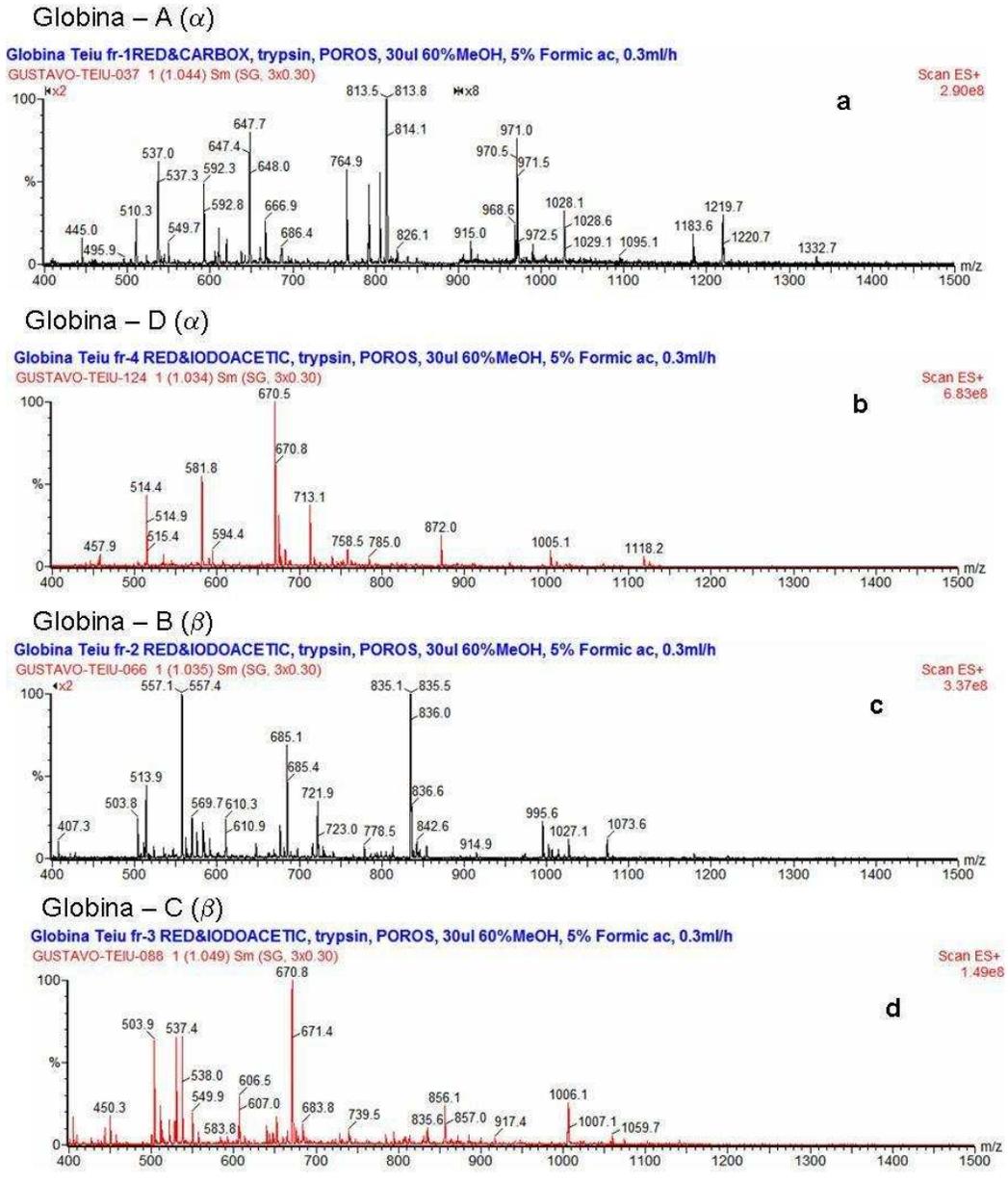


Figura 14. Mapeamento peptídico obtido por espectrometria de massas das cadeias de globina A, B, C e D. Os peptídeos foram obtidos por hidrólise enzimática de cada cadeia isolada com tripsina. As cadeias de globina foram isoladas por HPLC fase reversa após redução com DTT e alquilação com ácido iodoacético. a e b) Comparação entre as cadeias de globina α e c e d) Comparação entre as cadeias de globina β .

Tabela 7. Mapeamento dos peptídeos da cadeia de globina A (α) por espectrometria de massas. A Cadeia de globina A foi purificada por HPLC-fase reversa, e submetida à hidrólise enzimática com tripsina

m/z red. & alq.	[H ⁺]	M+H ⁺	m/z nativa	[H ⁺]	M+H ⁺	Mr mono-isotópica	Seqüência de aminoácidos CID-MS/MS
			409,8	+2	818,6	817,42	VDPVNFK
445,0	+3	1333,0					
			471,1	+3	1411,3		
			486,4	+2	971,8	970,52	LxLxHSTWSK
510,3	+3	1528,9					
537,0	+3	1609,0	537,0	+3	1609,0		
549,7	+3	1647,1	549,7	+3	1647,1		
592,3	+2	1183,6				1182,6	LxFQVYASVEK
			705,8	+2	1410,6	1409,6	FFHEVAFGLxSEK
647,7	+3	1941,1					
666,9	+2	1332,8					...HVTLGADXR
764,9	+2	1528,8				1527,7	FFHEVQHAGLSEK
791,9	+2	1582,8	791,5	+2	1582,0	1580,7	[AE]YNPLxVYLxAEGDK
			805,0	+2	1609,0		XXXHLxEDGW[ALx]TR
813,2	+3	2437,6	813,2	+3	2437,6		HLxPVFQDTLxADLxSDLxNNT GVLxR
970,5	+2	1940,0					
1027,6	+2	2054,2	1027,6	+2	2054,2		
1183,6	+1	1183,6					
1219,2	+2	2437,4	1219,2	+2	2437,4		
1332,	+1	1332,					

Nota: Lx (Ile ou Leu) e resíduos entre colchetes [] significa que a ordem não pode ser estabelecida a partir do espectro de massa de fragmentação (cid-ms/ms).

A seqüência de aminoácidos N-terminal da cadeia A foi determinada por degradação automática de Edman (Procise 491) resultando em identificação da posição de 30 resíduos de aminoácidos de um cadeia α de globina estimada em 141 resíduos totais:

VLTADESKLLHSTWSKLGQHLEDLGGEALT

A cadeia de globina A (alfa) de teiú contendo N-terminal e peptídeos tripsínicos deduzidos a partir de cid-ms/ms foi submetido a alinhamento automático utilizando o programa Fasts3 (<http://www.ebi.ac.uk/c>). O resultado do alinhamento está demonstrado na figura 15 indicando que 58 resíduos de aminoácidos sobrepuseram a cadeia α de globina de *Liophis miliaris* com 65% de similaridade. A cadeia alfa de *L.miliaris* possuem 141 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 15889 (alquilada com ácido iodoacético) comparada a massa molecular determinada por MS para a cadeia A de globina de Teiú que foi de $16187 \pm 0,98$. Quando somente os 30 primeiros resíduos de aminoácidos do N-terminal de teiú foram alinhados à cadeia α de *L. miliaris*, isso correspondeu a 50% de similaridade. Isso sugere uma grande heterogeneidade entre essas duas cadeias alfa de globinas e talvez possa refletir em diferenças sutis na função da hemoglobina e sua estabilidade.

```

>>UNIPROT:HBAD_LIOMI P16417 Hemoglobin subunit alpha-D ( 141 aa)
  initn: 254 initl: 118 opt: 254 Z-score: 60.0 bits: 74.3 E(): 3.5e-12
Smith-Waterman score: 254; 55.172% identity (65.517% similar) in 58 aa overlap (1-58:1-139)

      10      20      30
Hb    VLTADESKLLHSTWSKLGGHLEDLGGEALT-----
      ::::.. ::  :::  :::::  :::
UNIPRO VLTAE DRRLQASV GKLGRLEDIGADALNRL LITFPQSKTYF SHFNLSPGSKDIHQGE
      10      20      30      40      50      60

      40
Hb    -----VDPVNFK-----HVTLGADXR-----
      :::::..  :: :  .:
UNIPRO KVGKALDSALKHLDDIRGTLSQLSDLHAYNLRVDPVNFQLLSKCIHVSLATHLRNEYSAS
      70      80      90      100     110     120

      50
Hb    -----FFHEVAFGLSEK
      :  ::  :::
UNIPRO VTLAWDKFLELVADVLSEKYR
      130     140

```

Figura 15. Alinhamento do N-terminal da cadeia de globina A (α) de Teiú e seqüências de aminoácidos internas obtidas por hidrólise com tripsina.

Tabela 8. Mapeamento dos peptídeos da cadeia de globina B (β) por espectrometria de massas. A Cadeia de globina B foi purificada por HPLC-fase reversa e submetida à hidrólise enzimática com tripsina.

m/z red. & alq.	[H ⁺]	M+H ⁺	m/z nativa	[H ⁺]	M+H ⁺	Mr mono-isotópica	Seqüência de aminoácidos CID-MS/MS
407,3	+3	1219,9	407,3	+3	1219,9		
513,9	+3	1539,7					
			503,9	+2	1006,8	1005,53	VLxASFGDAVK
			534,9	+2	1068,8	1067,56	LxHVDPVNFK
557,1	+3	1669,3	557,1	+3	1669,3		
			583,9	+2	1166,8		
590,9	+2	1180,8	590,9	+2	1180,8	1179,56	QLxLxEDYTGNK
610,3	+2	1219,6	610,4	+2	1219,8	1218,59	[EF]TPAHYVQK
			629,4	+3	1886,2		
			646,0	+2	1291,0		
			676,7	+3	2029,1		
685,1	+3	2053,3					
721,9	+2	1442,8	722,0	+2	1443,0	1441,79	[VGD]LxTTLxRVHFGK
778,5	+2	1556,0	778,5	+2	1556,0		
			794,4	+1	794,4		
835,1	+2	1669,2	835,1	+2	1669,2	1667,95	LxLxGDVLxTTLxLxAAHFGK
995,0	+2	1989,0	995,0	+2	1989,0		
1002,1	+2	2003,2					
1006,6	+1	1006,6	1006,6	+1	1006,6		
1014,1	+2	2027,2	1014,0	+2	2027,0		
1026,7	+2	2052,4					
1073,2	+2	2145,4					

Nota: Lx (Ile ou Leu) e resíduos entre colchetes [] significa que a ordem não pode ser estabelecida a partir do espectro de massa de fragmentação (cid-ms/ms).

A seqüência de aminoácidos N-terminal da cadeia B foi determinada por degradação automática de Edman (Procise 491) resultando em identificação da posição de 42 resíduos de aminoácidos da cadeia de globina estimada em 146 resíduos totais:

VHWTAEKQLIEHIWNKVDVAAIGGEALVLLIVYPWTRRF

A cadeia de globina B (β) de teiú contendo N-terminal e peptídeos tripsínicos deduzidos a partir de cid-ms/ms foi submetido a alinhamento automático utilizando o programa Fasts3 (<http://www.ebi.ac.uk/c>). O resultado do alinhamento está demonstrado na figura 16 indicando que 87 resíduos de aminoácidos sobrepuseram a cadeia β de globina de *Iguana iguana* com 75% de similaridade e 80% de similaridade com *L. miliaris* com 77 resíduos de aminoácidos sobrepostos. A cadeia β de *I. iguana* e de *L. miliaris* contem 146 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 16338 e 16052 baseado na seqüência de aminoácidos (alquilação com ácido iodoacético), comparada a massa molecular determinada por MS para a cadeia B de globina de Teiú que foi de $16346 \pm 0,56$. Quando somente os 42 primeiros resíduos de aminoácidos do N-terminal de teiú foram alinhados à cadeia β de *I. iguana* e de *L. miliaris*, as mesmas proporções de similaridade são mantidas indicando uma conservação maior das cadeias de globina do tipo β entre essas espécies.

```

>>UNIPROT:HBB1\_IIGUIG\_P18987 Hemoglobin subunit beta-1 (H (146 aa)
  initn: 643 init1: 328 opt: 643 Z-score: 167.5 bits: 181.6 E(): 1.5e-44
  Smith-Waterman score: 643; 73.563% identity (75.862% similar) in 87 aa overlap (1-87:1-130)

      10      20      30      40
hb  VHWTAEEKQLIEHIWNKVDVAAIGGEALVLLIVYPWTRRRF-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
UNIPRO VHWTAEEKQLITQVWGKIDVAQIGGETLACLLVVYPWTQRFFPDFGNLSNAAAICGNAKV
      10      20      30      40      50      60

      50      60      70
hb  -----VLASFGDAVK-----LHVDPVNFKLLGDVLTLLAAHFGK
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
UNIPRO KAHGKVLISFGDAVKNLDNIKDTFAKLSLHCDKLVDPVNFRLGNVMITRLAAHFGK
      70      80      90      100     110     120

      80
hb  EFTP AHYVQK
      . : : : .
UNIPRO DFTPACHAAFQKLTGAVAHALARRYH
      130     140

>>UNIPROT:HBB\_LIOMI\_P16418 Hemoglobin subunit beta (Hemo (146 aa)
  initn: 642 init1: 339 opt: 642 Z-score: 167.2 bits: 181.3 E(): 1.9e-44
  Smith-Waterman score: 642; 80.519% identity (80.519% similar) in 77 aa overlap (1-77:1-120)

      10      20      30      40
hb  VHWTAEEKQLIEHIWNKVDVAAIGGEALVLLIVYPWTRRRF-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
UNIPRO VHWTAEEKSAITAIWGKVDVAAIGGEALCRLIVYPWTQRFFTSFGNLSNAAAIQSNAQV
      10      20      30      40      50      60

      50      60      70
hb  -----VLASFGDAVK-----LHVDPVNFKLLGDVLTLLAAHFGK
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
UNIPRO KAHGKVFVTAFGDAVKNPEGVKDTFAKLSLHCDKLVDPVNFKLLGQILITVLAHFGK
      70      80      90      100     110     120

UNIPRO DFTPNVQAAYQKLVSVVAHALAHQYH
      130     140

```

Figura 16. Alinhamento do N-terminal da cadeia de globina B (β) de Teiú e seqüências de aminoácidos internas obtidas por hidrólise com tripsina determinadas por sequenciamento *de novo* por espectrometria de massas.

Tabela 9. Mapeamento dos peptídeos da cadeia de globina C (β) por espectrometria de massas. A Cadeia de globina C foi purificada por HPLC-fase reversa e submetida à hidrólise enzimática com tripsina

m/z red. & alq.	[H ⁺]	M+H ⁺	m/z nativa	[H ⁺]	M+H ⁺
404,7	+3	1212,1			
450,3	+2	899,6			
457,4	+2	913,8			
503,9	+2	1006,8			
510,9	+2	1020,8			
530,4	+2	1059,8			
537,4	+2	1073,8			
549,9	+2	1098,8			
606,5	+2	1212,0			
670,8	+3	2010,4	670,1	+3	2008,3
683,4	+3	2048,2	682,8	+3	2046,4
			712,9	+3	2136,7
			740,0	+2	1479,0
			758,6	+1	758,6
			785,0	+2	1569,0
			872,0	+2	1743,0
835,1	+2	1669,2			
856,1	+2	1711,2			
885,1	+2	1769,2			
899,7	+1	899,7			
1005,6	+2	2010,2			
1059,7	+1	1059,7			

A seqüência de aminoácidos N-terminal da cadeia C foi determinada por degradação automática de Edman (Procise 491) resultando em identificação da posição de 26 resíduos de aminoácidos da cadeia de globina estimada em 146 resíduos totais:

VHWTAEKQLITSIWAKVDVXVVGNK

```

>>SW:HBB2_NAJNA P22743 Hemoglobin subunit beta-2 (Hemogl (146 aa)
  initn: 136 initl: 136 opt: 136 Z-score: 268.3 bits: 53.1 E(): 1.1e-07
Smith-Waterman score: 136; 83.333% identity (91.667% similar) in 24 aa overlap (1-24:1-24)

      10      20
Sequen VHWTAEEKQLITSIWAKVDVXVVGNK
      .....:
SW:HBB VHWSAEEKQLITSLWAKVDVPEVGAATLGKMMVMYPWTQRFFAHFGNLSGPSALCGNPQV
      10      20      30      40      50      60

>>SW:HBB1_IGUIG P18987 Hemoglobin subunit beta-1 (Hemogl (146 aa)
  initn: 131 initl: 131 opt: 131 Z-score: 258.8 bits: 51.4 E(): 3.5e-07
Smith-Waterman score: 131; 65.385% identity (92.308% similar) in 26 aa overlap (1-26:1-26)

      10      20
Sequen VHWTAEEKQLITSIWAKVDVXVVGNK
      .....:
SW:HBB VHWTAEEKQLITQVWGKIDVAQIGGETLACLLVVPWTQRFFPDFGNLSNAAAICGNAKV
      10      20      30      40      50      60

>>SW:HBB1_VAREX P18993 Hemoglobin subunit beta-1 (Hemogl (146 aa)
  initn: 131 initl: 131 opt: 131 Z-score: 258.8 bits: 51.4 E(): 3.5e-07
Smith-Waterman score: 131; 65.385% identity (92.308% similar) in 26 aa overlap (1-26:1-26)

      10      20
Sequen VHWTAEEKQLITSIWAKVDVXVVGNK
      .....:
SW:HBB VHWTAEEKQLICSLWGKIDVGLIGGETLAGLLVIYPWTQRQFSHFGNLSPTAIAGNPRV
      10      20      30      40      50      60

```

Figura 17. Alinhamento do N-terminal da cadeia de globina C (β) de Teiú utilizando o algoritmo do programa FASTA (EMBL). Conforme observado a cadeia C apresenta 92% de similaridade com a cadeia beta de globina de *I. iguana*.

A cadeia C de teiú foi submetida a alinhamento da porção N-terminal utilizando o programa FASTA (EMBL), que demonstrou que a seqüência N-terminal é similar à porção N-terminal de *Iguana iguana* (92%); *Varanus exanthematicus albigularis* (92%) e de *Naja naja* (91%). Estes dados devem permitir uma melhor correlação evolutiva das hemoglobinas em espécies relacionadas.

Tabela 10. Mapeamento dos peptídeos da cadeia de globina D (α) por espectrometria de massas. A Cadeia de globina D foi purificada por HPLC-fase reversa, e submetida à hidrólise enzimática com tripsina

m/z red. & alq.	[H ⁺]	M+H ⁺	m/z nativa	[H ⁺]	M+H ⁺
457,9	+2	914,8	457,9	+2	914,8
514,4	+2	1027,8	514,4	+2	1027,8
581,8	+3	1743,4	581,8	+3	1743,4
594,4	+3	1781,2			
670,5	+3	2009,5	670,1	+3	2008,3
674,8	+3	2022,4			
			682,8	+3	2046,4
713,1	+3	2137,3	712,9	+3	2136,7
739,9	+2	1478,8	740,0	+2	1479,0
758,2	+3	2272,6	758,6	+1	758,6
785,0	+2	1569,0	785,0	+2	1569,0
872,0	+2	1743,0	872,0	+2	1743,0
1004,6	+2	2008,2	1004,7	+2	2008,4
			1068,7	+2	2136,4
1118,2	+2	2235,4	1118,2	+2	2235,4

A seqüência de aminoácidos N-terminal da cadeia D foi determinada por degradação automática de Edman (Procise 491) resultando em identificação da posição de 30 resíduos de aminoácidos da cadeia de globina estimada em 141 resíduos totais:

VLTEDDKAHVKAVWAQIQSTAPDIFAEALF

A seqüência N-terminal da globina cadeia D (α) foi submetida à pesquisa no programa FASTA (EMBL), onde foi encontrada uma similaridade com hemoglobina de *I. iguana* (86%), *Uromastix hardwickii* (83%) e *Varanus*

exanthematicus albigularis (82%). Isso sugere que mesmo em espécies do mesmo gênero ocorreram variações na estrutura primária de cada uma das subunidades, indicando talvez uma pressão evolutiva independente em cada um dos genes correspondentes para cada cadeia de globina. Uma análise do habitat de cada uma

```

>>SW:HBA1_UROHA P18979 Hemoglobin subunit alpha-1 (Hemog (90 aa)
  initn: 103 initl: 103 opt: 109 Z-score: 204.3 bits: 40.8 E(): 0.00038
  Smith-Waterman score: 109; 54.839% identity (83.871% similar) in 31 aa overlap (1-30:1-30)

      10      20      30
Sequen VLTEDDKAHVKAVWAQIQSTAPDIF-AEALF
      :::::  :::::  :::  .  .  .  :::::
SW:HBA VLTDDDKNHVRAIWGHV-SNNPEAFGAELYLFTAHPASKTYFSSHFDLHNSAQIRXXX
      10      20      30      40      50

SW:HBA XKVVDALTQAVNNLDDLSGAIKLSDLHAEK
      60      70      80      90

>>SW:HBA2_VAREX P18981 Hemoglobin subunit alpha-2 (Hemog (141 aa)
  initn: 107 initl: 107 opt: 107 Z-score: 197.7 bits: 40.2 E(): 0.0009
  Smith-Waterman score: 107; 55.172% identity (82.759% similar) in 29 aa overlap (1-29:1-29)

      10      20      30
Sequen VLTEDDKAHVKAVWAQIQSTAPDIFAEALF
      :::::  :::::  :::  .  :::
SW:HBA VLTEDDKNHVKGLWAHVHDHIDEIAADALTRMFLAHPASKTYFAHFDLSPDNAQIKAHGK
      10      20      30      40      50      60

>>SW:HBA1_IGUIG P18974 Hemoglobin subunit alpha-1 (Hemog (141 aa)
  initn: 97 initl: 97 opt: 100 Z-score: 185.4 bits: 37.9 E(): 0.0043
  Smith-Waterman score: 100; 50.000% identity (86.667% similar) in 30 aa overlap (1-29:1-29)

      10      20      30
Sequen VLTEDDKAHVKAVWAQIQSTAPDIFA-EALF
      :::::  :::::  :::  .  .  :::
SW:HBA VLTEDDKNHIRAIWGHVDNN-PEAFGVEALTRLFLAYPAIKTYFAHFDLNPQSAQIKAHG
      10      20      30      40      50

```

Fig. 18. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da porção N-terminal da cadeia de globina D de Teiú utilizando o programa Fasta (EMBL).

A utilização da espectrometria de massas (MS) para explorar similaridades entre proteínas está bem estabelecida na literatura, e é base do novo campo da

química de proteínas, a proteômica. A utilização de MS em conjunção a dados de seqüência de ácidos nucléicos, banco de dados genômicos, já é considerado rotina. Quando essa informação ainda não está disponível, o sequenciamento *de novo* se faz necessário, o que implica em um grande desafio, pois a interpretação dos espectros de fragmentação pode levar a alguns enganos e parte da seqüência de aminoácidos pode ser mau interpretado, requerendo extrema habilidade pessoal na dedução dessa seqüência. Porém com a exploração das similaridades entre massas de cada uma das subunidades e em conjunção com as seqüências de aminoácidos N-terminal obtidas por método clássico de degradação de Edman foi possível neste trabalho identificar cada cadeia quanto à pertencente ao tipo α ou β e caracterizar parcialmente cada uma delas. Esses resultados abrem a possibilidade do sequenciamento de aminoácido completo da hemoglobina do teiú que deverá ser realizado por degradação de Edman e poderão ter impacto na comparação com hemoglobina de outras espécies quanto ao aspecto funcional e evolutivo.

α		10		20		30																									
cadeia		V	L	T	A	E	S	K	L	L	H	S	T	W	S	K	L	G	Q	H	L	E	D	L	G	G	E	A	L	T	
Cadeia		V	L	T	E	D	D	K	A	H	V	K	A	V	W	A	Q	I	Q	S	T	A	P	D	I	F	A	E	A	L	R
Consensus		V	L	T	a	D	#	k	a	h	l	h	a	t	W	a	q	i	q	h	a	e	D	i	g	a	E	A	L	r	

β		10		20		30																													
Cadeia		V	H	W	T	A	E	E	K	Q	L	I	E	H	I	W	N	K	V	D	V	A	A	I	G	G	E	A	L	V	T	L	L	I	V
cadeia		V	H	W	T	A	E	E	K	Q	L	I	T	S	I	W	A	K	V	D	V	S	V	V	G	P	K	K	L	A	A	L	L	F	V
Consensus		V	H	W	T	A	E	E	K	Q	L	I	e	h	I	W	a	K	V	D	V	a	a	!	G	g	e	a	L	a	L	L	i	V	

Figura 19. Alinhamento das sequências das cadeias α e β de teiú utilizando o programa Multalign. Os caracteres marcados em rosa e letra maiúsculas mostram resíduos conservados. Esses dados de alinhamento demonstram uma maior conservação da estrutura primária das cadeias β s.

5. Discussão

Os répteis constituem uma classe de vertebrados com enormes diferenças quanto ao habitat e comportamentos. Dentre eles, os pertencentes à ordem Squamata (cobras e lagartos) possuem uma ampla distribuição geográfica, e podem sobreviver sob condições de hipóxia, constituindo em notáveis vertebrados da fauna terrestre (Abbasi & Brawnitzer, 1991).

Para compreensão das propriedades funcionais da hemoglobina, é de fundamental importância entendermos como o fosfato orgânico atua, relacionando-os às propriedades alostéricas das hemoglobinas (Ogo, et al., 1984). O ATP está presente nos eritrócitos de todos os grupos de vertebrados, desde agnatas até mamíferos (Bartlett & Borgese, 1976; Isaacks et al., 1978; Bartlett, 1982; Maginniss, 1985). Eritrócitos de anfíbios podem apresentar altas concentrações de 2,3 BPG (Bartlett, 1976), enquanto que em grande número de espécies de peixes essas células possuem abundância de GTP. Aves embrionárias possuem 2,3 BPG como efetor alostérico principal até a eclosão, momento no qual há o decréscimo deste efetor e o aumento vertiginoso de inositol penta e hexafosfato, presentes a partir daí em toda vida adulta do animal (Bartlett, 1982). Os crocodilianos possuem o bicarbonato de sódio como efetor alostérico, e gatos possuem hemoglobinas insensíveis a qualquer tipo de fosfato (Nikinmaa, 1990).

Os fosfatos orgânicos apresentam, de modo geral, afinidade preferencial pela deoxihemoglobina, e sua ligação confere maior estabilidade da conformação T da hemoglobina tetramérica (Perutz & Brunori, 1972). Além dos fosfatos orgânicos, os prótons também desempenham um importante papel no controle da função da hemoglobina na maioria dos vertebrados (Nikinmaa, 1990). Outros

fatores, tais como o dióxido de carbono, íons bicarbonato e cloreto, podem alterar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, mas geralmente seus efeitos são menos intensos.

Conforme mencionado anteriormente em hemoglobinas de serpentes observou-se um comportamento dissociativo importante quando as mesmas encontram-se no estado *stripped*, ou mesmo na presença de ATP em pH alcalino acima de 7,6, o qual o mesmo não se liga. Esses dados foram mostrados através de gel filtração, estudo com potencial redox e através de equilíbrio com o oxigênio. Como era de se esperar, a forma dissociada, dimérica não apresenta cooperatividade e apresenta altíssima afinidade por oxigênio. Além disso, observou-se nessas mesmas espécies que a forma oxihemoglobina também se encontra na forma dissociada, mesmo em altas concentrações de ATP, em qualquer pH. As repercussões fisiológicas, termodinâmicas e evolutivas, obviamente, foram consideradas importantes (Bonafe et al., 1999). Substituições em dois resíduos da interface $\alpha\beta$ explicam estruturalmente tais achados. Tudo isso motivou o presente trabalho, pois equivalentes substituições são observadas em vários grupos de ectotérmicos.

Deste modo, foram realizados experimentos para se analisar as propriedades da hemoglobina do lagarto teiu (*Tupinambis merianae*) como o estudo da curva de titulação potenciométrica, o efeito de ATP e pH, além das propriedades de equilíbrio com o oxigênio em diferentes temperaturas e termoestabilidade da proteína. Para se estabelecer uma correlação estrutura-função foi feito um estudo das sequências das cadeias isoladas das globinas desse lagarto.

Os experimentos de potencial de óxido-redução confirmam praticamente a ausência de cooperatividade para a hemoglobina *stripped* deste animal, sem a transição da forma T para a R, comportamentos características de mioglobina ou de hemoglobina dissociada (Hewitt et al., 1972; Speros et al., 1991).

Os experimentos em equilíbrio de oxigenação realizados a temperatura constante, indicam que o ATP age intensamente como efetor alostérico neste tipo de hemoglobina, diminuindo a afinidade pelo oxigênio e agindo como um importante ligante heterotrópico. Além disso, os experimentos em equilíbrio de oxigenação em diferentes temperaturas, sugerem que pode ocorrer uma diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em temperaturas altas, como 40° C, o que facilitaria o descarregamento mais eficiente do gás nos tecidos metabolicamente ativos, nos casos onde o animal encontra-se em atividade e/ou exposto ao sol, pois os lagartos são heliófilos e ativos por natureza (Abe, 1977; Andrade et al., 2004). Os resultados em termoestabilidade da proteína sugerem que, pelo menos *in vitro*, a hemoglobina de *T. merianae* é relativamente estável a altas temperaturas. Considerando que a média de temperatura corporal deste animal durante a atividade pode alcançar 38°C, a hemoproteína foi considerada estável, pois após uma hora de incubação a 40°C, ainda manteve suas propriedades funcionais relativamente sem alterações. A realização deste experimento com a adição de 1 mM de ATP, não alterou a estabilidade da proteína. A hemoglobina humana, por se manter em uma faixa de temperatura bem mais limitada do que em répteis, se desnatura em menores variações de temperatura do que estas encontradas para *T. merianae* (Schwantes, A.R, comunicação pessoal).

A hemoglobina da maioria dos vertebrados é caracterizada funcionalmente por apresentar efeitos alostéricos homotrópicos (cooperatividade de ligação com o O₂) e heterotrópicos (efeito Bohr, efeito de fosfatos orgânicos, efeito de CO₂ etc). A presença simultânea destas duas interações apresentam vantagens para a molécula de hemoglobina, possibilitando-lhe a realização do transporte de O₂ em condições metabólicas das mais adversas. Assim, estas proteínas ilustram, não somente as possíveis variações dentro do aspecto geral dos mecanismos alostéricos, como também, representam um caso típico de adaptação molecular aos diferentes requerimentos fisiológicos.

Estruturalmente, a hemoglobina humana é constituída de quatro cadeias polipeptídicas, 2 α e 2 β , as quais estão associadas não-covalentemente junto a duas superfícies distintas, designadas interfaces $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_1\beta_2$, formando um tetrâmero que apresenta peso molecular de 64 KDa.

A interface $\alpha_1\beta_1$, formada pela atração eletrostática entre as subunidades α , positivamente carregadas, e β , negativamente carregadas, (Mrabet et al., 1986), permanece praticamente constante durante a oxigenação da hemoglobina ou durante a dissociação do tetrâmero em dímeros. Entretanto, a interface $\alpha_1\beta_2$, move-se substancialmente durante a transição T \leftrightarrow R da proteína, a qual modula a afinidade do grupo heme pelo oxigênio molecular dependente do heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$, sendo responsável pelo desencadeamento dos fenômenos alostéricos, assim como pela integridade do tetrâmero (Perutz, 1970; Perutz et al., 1982; Perutz & Brunori, 1982; Mrabet et al., 1986; Rao & Acharya, 1992).

Assim, as alterações estruturais nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ podem levar à dissociação do tetrâmero em dímeros, eliminando a cooperativa interação entre subunidades, com conseqüente perda das propriedades alostéricas das hemoglobinas (Hewitt et al., 1972; Brittain, 1991; Speros et al., 1991; Ackers et al., 1992; Shih et al., 1985).

Acerca desse assunto, os estudos das propriedades funcionais e estruturais de hemoglobina mostraram que os resultados são consistentes com a presença de subunidades diméricas nos eritrócitos de *Tupinambis merianae*. A proteína isenta de ânions apresenta alta afinidade pelo O_2 ausência de cooperatividade ($n_H = 1$) e insensível à concentração de íons H^+ comportando-se como proteína não alostérica. A determinação da massa molecular por gel filtração em resina Sephadex G-100 apresentou um valor compatível com dímero de hemoglobina (32 000 Da).

Esta combinação de características é única, uma vez que a hemoglobina do espécime em questão apresenta, em experimentos de oxigenação na ausência de moduladores, valores de coeficiente de Hill igual a 1 ($n_H = 1$). Entretanto, as propriedades alostéricas podem ser restauradas pela adição de ATP à hemoglobina, o principal nucleotídeo intra-eritrocitário em *T. merianae*, onde se verificou-se uma diminuição significativa da afinidade pelo oxigênio. Neste caso, a proteína tornou-se cooperativa novamente em valores de pH inferiores a 7,8, retornando ao valor de $n_H = 1$ em valores de pH próximo ou acima do valor do ponto isoelétrico da proteína.

Neste sentido, a determinação da massa molecular da hemoglobina, na forma desoxigenada e em presença de fosfato orgânico ATP, por filtração em gel de Sephadex G-100 em pH 8,0 revelou ser tetramérica (≈ 64000 Da). No entanto, quando a hemoglobina foi aplicada nas mesmas condições experimentais, porém na forma oxigenada, emergiu da coluna em um volume compatível com forma dimérica (≈ 32000 Da).

A perda das propriedades alostéricas em valores de pH acima de 7,8 se deve, muito provavelmente, ao enfraquecimento das interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos e o ATP, o que deve levar à dissociação do tetrâmero em dímeros (Matsuura et al., 1987), uma vez que o sítio de ligação de fosfatos encontra-se no eixo de simetria entre as duas cadeias do tipo β .

Nossos resultados sugerem que no mecanismo de transporte de oxigênio pela hemoglobina, há a transição oxidímero \leftrightarrow desoxitetramero e isso pode ocorrer em grande parte dos ectotérmicos, independentemente do habitat e de seu grau evolutivo, uma vez que foi evidenciado tanto em espécies consideradas mais primitivas como jibóia, *Boa constrictor*, quanto nas mais evoluídas como urutu, *Bothrops alternatus* (Focesi et al., 1992; Oyama et al., 1993). Assim, a hemoglobina na forma desoxigenada, apresentaria forma tetramérica em conformação T, e a adição de oxigênio molecular a dissociaria em dímeros, sem a passagem pela conformação R.

Alternativamente, a presença de hemoglobina dimérica desoxigenada no lagarto poderia conferir a capacidade de ligar oxigênio com alta afinidade, mesmo em condições de baixa tensão de oxigênio, por exemplo durante a estivação, podendo realizar função análoga à mioglobina, porém dentro dos eritrócitos.

Assim, no sangue deste lagarto a ocorrência de hemoglobina dimérica não-cooperativa, em condições de demanda metabólica muito baixa, pode ter relevância fisiológica. O efetor alostérico principal, o ATP, pode fornecer a capacidade de adaptação às mudanças nas condições ambientais através da passagem da forma dimérica para tetramérica, modulando a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, através de alterações nos níveis intra-eritrocitários de polifosfatos orgânicos, ou de afinidade dos mesmos à hemoglobina, em alterações importantes de pH.

De fato, estas duas alternativas podem ser propostas para explicar os resultados obtidos: I) formação de tetrâmero pela desoxigenação dos dímeros, ou seja, a forma dimérica existiria apenas na forma oxigenada e passaria à forma tetramérica pela retirada de O_2 ou, II) existência de dímeros desoxigenados que se tornariam tetraméricos somente em presença de fosfatos orgânicos. Até o presente momento, foi evidenciada, por cromatografia em filtração em gel, a transformação de hemoglobina oxigenada dimérica em hemoglobina desoxigenada tetramérica, porém quando em presença de ATP que apresenta afinidade pela molécula desoxigenada, diminui cerca de 10 vezes a afinidade da hemoglobina pelo O_2 . Entretanto, ainda não tinha sido possível obter dados experimentais para a comprovação da ocorrência de dímeros desoxigenados na ausência de ATP, devido a alta afinidade da forma dimérica pelo O_2 .

Os resultados levam à hipótese de que haveria um dímero oxigenado, de alta afinidade por este ligante, que passaria para a forma tetramérica somente em presença de um efetor alostérico, neste caso apresentando uma baixa afinidade por este ligante.

Tais características se tornam essenciais quando consideramos o habitat e condições de vida para tais Squamatas na natureza. Existiria uma hemoglobina dimérica capaz de se ligar muito fortemente à moléculas ligantes, armazenando-as até o momento em que fossem necessárias ao organismo, tornando-se tetraméricas pela ação de um dos produtos formados pelo metabolismo celular (ATP), facilitando a liberação deste oxigênio às células. A

disponibilidade de oxigênio e sua utilização, variam extremamente entre os répteis, devido à grande variedade de ambientes onde vivem. A classe apresenta formas terrestres, aquáticas subterrâneas e arborícolas. A possível presença de uma forma dimérica encontrada na hemoglobina de *Tupinambis merianae*, e também encontrada em outras espécies (Matsuura et al., 1987; Bonafé et al., 1999), nos despertou atenção, pois dentro do modelo dímero-tetrâmero proposto nesta tese, torna-se incontestável que o surgimento dos répteis constituiu-se num dos grandes eventos na história da vida na face da terra.

Considerando que os répteis foram um dos primeiros vertebrados essencialmente terrestres, onde também não mais dependiam da água para a reprodução (como no caso dos anfíbios), eles conseguiram seu sucesso evolutivo enfrentando enormes variações no oxigênio ambiental e suportando intensas variações climáticas. Deste modo, foram inúmeros os mecanismos de adaptação que os répteis tiveram que “lançar mão” para contornar tais condições oscilantes e poderem ser encontrados atualmente em inúmeros habitats nos dias atuais. Dentre estes mecanismos de adaptação molecular, a evolução da molécula de hemoglobina deve ter sido importante. Deste modo, acredito ser da mais alta

relevância o conhecimento da estrutura primária da hemoglobina que será posteriormente correlacionada com dados funcionais.

Uma descrição da molécula de hemoglobina de *T. merianae* necessita da análise conjunta da estrutura e função da proteína, que é essencialmente diferente daquelas encontradas em aves, peixes e vertebrados superiores. Tal diferença justificaria o melhor entendimento da estrutura molecular, já que o comportamento funcional é bem diferente do encontrado para outros grupos de vertebrados. Na intenção de melhor conhecermos, em base estrutural, as suas características funcionais peculiares, passamos a determinar a estrutura primária das globinas, o que é muito importante para uma futura interpretação cristalográfica desta proteína.

A despeito de algumas variações, a primeira configuração da cadeia polipeptídica descoberta em mioglobina de cachalote (Kendrew, 1960) foi considerada como comum para todas as hemoglobinas, o que atualmente é considerado correto, pois existem inúmeras semelhanças estruturais encontradas entre as moléculas de hemoglobina nos diferentes grupos de animais. Portanto, uma comparação das sequências primárias entre os diferentes grupos de animais, incluindo humanos, nos permite antecipar certas conclusões a respeito da relação entre estrutura e função.

Após a remoção do grupo heme por acetona ácida e a análise dos componentes do hemolisado de *T. merianae* por cromatografia de líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), verificou-se a presença equimolar de quatro cadeias polipeptídicas que foram caracterizadas arbitrariamente pelas

letras A, B, C e D de acordo com a ordem de eluição em gradiente crescente de acetronitrila (Matsuura et al., 1989).

A análise do conteúdo de aminoácidos em cada uma das quatro cadeias polipeptídicas demonstrou composições bem diferentes entre elas (dados não mostrados), sugerindo a heterogeneidade das cadeias, fato posteriormente confirmado por experimentos em seqüenciamento N-terminal individual.

A determinação da seqüência dos primeiros resíduos do amino-terminal de cada globina, mostrou a existência de duas cadeias do tipo alfa e duas cadeias do tipo beta, por analogia às cadeias alfa diferentes, e betas, também diferentes, encontradas na hemoglobina de *Liophis miliaris* (Matsuura et al., 1989). Deste modo, após a classificação arbitrária, o tetrâmero de *Tupinambis merianae* não teria a forma $\alpha_2\beta_2$ apresentada pela hemoglobina humana e a maioria das hemoglobinas de vertebrados superiores, mas sim a forma $\alpha_{1a}\alpha_{2a}\beta_{1a}\beta_{2a}$, onde os índices subscritos significam quatro cadeias diferentes, em comparação à hemoglobina humana.

O fato do hemolisado de *Tupinambis merianae* apresentar quatro globinas quimicamente diferentes (duas cadeias alfa distintas e duas betas também distintas), pode acarretar uma grande complexidade para a proporção das estruturas tetraméricas e diméricas, porque as globinas podem apresentar pelo menos nove combinações diferentes para a conformação tetramérica e quatro para a dimérica. Caracterizar os diferentes componentes torna-se um pouco complicado, pois pode haver um equilíbrio entre todas as conformações possíveis e as formas intermediárias podem se interconverter umas nas outras, e portanto, as características funcionais e alostéricas encontradas para este animal, devem

ser o resultado do somatório entre as estruturas diméricas e tetraméricas (Perutz, 1990).

Ainda não se esclareceram as razões pelas quais existem quatro cadeias diferentes nestes animais. A causa mais provável que uma das cadeias alfa e/ou uma das betas sejam remanescentes embrionárias e que estas tiveram uma grande importância em estágios anteriores à vida adulta do animal (Matsuura et al., 1989). Pelas diferentes homologias encontradas entre as cadeias α e β de *T. merrianae* (30 e 65%, respectivamente) acredito que as cadeias β sejam embrionárias e ainda estejam sendo sintetizadas no adulto. Para o embrião seria mais vantajoso possuir cadeias diferentes entre si, e provavelmente com diferentes funções, do que cadeias mais semelhantes que possam ter a mesma funcionalidade, para poderem compensar as possíveis flutuações ambientais a que podem ser sujeitas.

Se realmente alguma cadeia for embrionária, as razões da permanência destas hemoglobinas no lagarto adulto ainda continuam incertas. Humanos adultos ainda possuem traços de hemoglobina embrionária (E) em suas hemácias, apesar da síntese destas cadeias serem diminuídas no momento do nascimento, em detrimento das adultas. Após o nascimento a hemoglobina que predomina (97%) é a hemoglobina A1 (alfa 2 : beta 2), seguida da hemoglobina A2 (alfa 2 : delta 2), com concentração em torno de 2%, e da hemoglobina fetal (alfa 2 : gama 2) com concentração em torno de 1%.

Outra possibilidade se baseia no fato de que todos os arranjos moleculares têm a mesma probabilidade de ocorrerem em solução, mas algumas formas não poderiam estar em concentrações altas por razões termodinâmicas. Por exemplo,

em peixes ósseos há a multiplicidade de componentes hemoglobínicos, que mesmo não tendo propriedades funcionais distintas, os múltiplos componentes poderiam ter um importante papel na manutenção da solubilidade do sistema, evitando assim, a precipitação de um componente, pois a hemoglobina existe dentro do eritrócito, no limite da sua solubilidade, 5 mM (Perutz, 1970). Especificamente no caso de hipóxia decorrente da estivação sazonal que os répteis sofrem, somado ao padrão de alternância da respiração durante a dormência (Abe et al., 1999), pode ocorrer o aumento da quantidade de desoxihemoglobina que é menos solúvel. Neste caso os vários componentes diferentes em solução poderiam dificultar a precipitação de algum deles dentro do eritrócito, favorecendo deste modo, a eficiência da respiração (Perutz, 1982).

Na impossibilidade de determinarmos a sequência completa das globinas do teiu, os resíduos responsáveis pela propriedades dissociativas da hemoglobina de *T. merianae* não puderam ser determinados. Consideramos importantes os resíduos que fazem contato com o grupo heme, no caso a posição 58 da cadeia, e aqueles responsáveis pelo efeito Bohr alcalino, na posição 122. Mas encontramos uma substituição importante: uma das cadeias α possui na posição 7 o aminoácido Serina (S) ao invés de Lisina (K), o que se era praticamente invariável em todos os vertebrados estudados. Em *Liophis miliaris* esta posição também é substituída por Arg (R), porém essa substituição é bem menos importante, pois a natureza dos aminoácidos é muito semelhante.

A análise dos alinhamentos nos permite verificar algumas substituições nas cadeias. O resíduo $\alpha 30$ apresenta a substituição E (Glu) \rightarrow T (Thr) e o resíduo 6, considerado invariável, tem a substituição D (Asp) \rightarrow E (Glu). Nas cadeias β , 16

G (Gly) → N (Asn) e 38 T (Thr) → R (Arg). Estas posições, por serem consideradas invariáveis nos animais analisados, certamente possuem uma função importante na hemoglobina de teiu ou nas características peculiares encontradas em outros animais (Matsuura et al., 1999).

6. Perspectivas futuras

Em função dos dados peculiares obtidos e a possibilidade concreta da inclusão de mais um grupo de animais naqueles que possuem uma instabilidade tetramérica, faz-se necessária a completa elucidação da sequência primária desta hemoglobina. Esta sequência facilitará a futuros estudos em cristalografia e em modelagem molecular, metodologias adequadas para confirmar a dissociação da hemoglobina em dímeros.

Como este estudo levantou a possível presença de hemoglobinas embrionárias em *Tupinambis merianae*, futuramente pretendemos realizar a análise funcional e estrutural deste tipo de proteína, e poder comparar com sequências obtidas em outras hemoglobinas embrionárias pertencentes a répteis ou não.

7. Bibliografia

- ABBASI, A., WELLS, R.M.G., BRITTAIN, T. & BRAUNITZER, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **369**: 755-764.
- ABBASI, A. & BRAUNITZER, G. (1991) Primary structure of hemoglobin from monitor lizard (*Varanus exanthematicus albigularis* – Squamata). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **372**: 473 – 479.
- ABE, A.S. (1977) Adaptações respiratórias e tolerância a variações de alguns fatores ambientais extrínsecos em *Helicops modestus* (GUNTER, 1861) e *Liophis miliaris* (LINNAEUS, 1758), serpentes de hábitos aquáticos (serpentes: Colubridae) São Paulo, pp.191. (Tese de doutoramento) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.
- ABRAHAM, D.J., KELLOGG, G.E., HOLT, J.M. & ACKERS, G.K. (1997) Hydropathic analysis of the non-covalent interactions between molecular subunits of structurally characterized hemoglobins. *J. Mol. Biol.* **272**: 613 –
- ACKERS, G.K., DOYLE, M.L., MYERS., D., DAUGHERTY, M.A. (1992)- Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*, 255, 54-63.632.
- ANDRADE, D.V., BRITO, S.P., TOLEDO, L.F., ABE, A.S. (2004) Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 140(2):197-208.

- ANDRADE, D.V., ABE, A.S. (1999) Gas exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis meriana*. *J. Exp. Biol.* 24: 3677-85
- ANTONINI, E., WYMAN, J., BRUNORI, M., TAYLOR, J.F., ROSSI-FANELLI, A. & CAPUTO, A. (1964b) Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. *J. Biol. Chem.* **239**: 907-912.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. (1974). Transport of oxygen: respiratory proteins. In: O. Hayashi (ed.). *Molecular oxygen in biology: topics in molecular oxygen research*. North-Holland - Company, Amsterdam
- AVISE, J.P. (1983). Protein variation and phylogenetic reconstruction. In G. S. OXFORD and D. ROLLISON (ed). *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. Academic Press, London. *Comp Biochem Physiol A.* 1976;55(3):207-10
- Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchling. Bartlett GR, Borgese TA.
- BARTLETT, G.R. (1976). Phosphate compounds in the cells of reptiles, amphibians and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55A: 211-214.
- BARTLETT, G.R. (1982) Developmental changes of phosphates in red cells of the emu and rhea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73: 129-134.
- BARTLETT, G.R. (1982) Phosphates in red cells of a hagfish and a lamprey. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73: 141-145.
- BISPO, J.A., LANDINI, G.F., SANTOS, J.L., NORBERTO, D.R., BONAFE, C.F. (2005) Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. *Comp. Biochem. Physiol.* 141(4):498-504.
- BOGUSZ D., APPLEBY, C.A., LANDSMANN. J., DENNIS, E.S., TRINICK., M.J., PEACOCK., W.J. (1988) Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature.* 331(6152):178-80
- BOHR, C., HASSELBACH, K.A. & KROGH, A. (1904). Über einen in biologischer beziehung wichtigen einfluss, den die kohlenaurespannung des blutes auf dessen saurestoffbindung ubt. *Skand. Arch. Physiol.*, **16**: 402 - 412.

- BONAFE, C.F.S, MATSUKUMA, A.Y. & MATSUURA, M.S.A. (1999) ATP-induced tetramerization and cooperativity in hemoglobin of lower vertebrates. *J. Biol. Chem.* **274 (3)**: 1196-1198.
- BORDIN, S., MEZA, A.N., SAAD, S.T.O., OGO, S.H. & COSTA, F.F. (1997) cDNA-derived maino-acid sequence of a land turtle (*Geochelonia carbonaria*) β -chain hemoglobin. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **42(2)**: 255-260.
- BRAUNITZER, G.R., GEHRING-MULLER, N., ILSHANN, K., HILSEN, G., HOBOM, V., RUDLOFF, N. & WITHMANN-LIEBOLD, B. (1961). *Die konstitution des normalen adulten human haemoglobins. Z. Physiol. Chem.*, **323**: 283.
- BRIEHL, R. (1963) The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **238**: 2361-2666.
- BRITTAIN, T. (1991). Cooperative and allosteric regulation in non-mammalian vertebrate haemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **99B (4)** : 731- 740.
- BRITTAIN, T., O'BRIEN, A.J., WELLS, R.M.G. & BALDWIN, J. (1989) A study of the role of subunit aggregation in the expression of co-operative ligand binding in the haemoglobin of the lamprey *Mordacia mordax*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B(3)**: 549-554.
- BRITTAIN, T (2002) Molecular aspects of embryonic hemoglobin function. *Mol. Asp. Med.* **23**: 293-342.
- CLARK, W.M. (1960) Oxidation-reduction potentials of organic systems. Williams & Williams Baltimore.
- COLOMBO, M. F., RAU, D. C. & PARSEGIAM, V. A. (1992). Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, **256**: 655 - 659.
- CRESTFIELD AM, STEIN WH, MOORE S. Alkylation and identification of the histidine residues at the active site of ribonuclease. *J Biol Chem.* 1963 Jul;238:2413-9
- DAUGHERTY, M.A., SHEA, M.A., JOHNSON, J.A., LICATA, V.J., TURNER, G.J., ACKERS, G.K. (1991) Identification of the intermediate allosteric species in

- human hemoglobin reveals a molecular code for cooperative switching. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(4):1110-4.
- DICKERSON, R.E. & GEIS, I (1983). Haemoglobin: structure , function, evolution and pathology. Benjamin/Cummings Publishing, Massachusetts.
- EGUCHI, Y. & EGUCHI, T. (2002) Amino acid sequence of the α - and β -globin chains of the Hiroo Sea Snake (*Laticauda laticaudata*). *J. Prot. Chem.* **21(3)**: 215 – 221.
- EGUCHI, Y. & EGUCHI, T. (2001) Amino acid sequence of Kalinowski's Tinamou (*Nothoprocta kalinowskii*) hemoglobin and the rate of evolution of bird alpha(D)-globin. *J. Prot. Chem.* **20(7)**: 543-549.
- FOCESI JR. A., BONILLA, G.O., NAGATOMO C.L. and MATSUURA, M.S.A. (1992) Dimer tetramer transition in hrmoglobin from *Liophis miliaris*. III. The phenomenon in snake species of different evolutionary levels. *Comp. Bioch. Physiol.*, 103B: 985-989.
- FUSHITANI, K., HIGASHIYAMA, K., MORIYAMA, E.N., IMAI, K. & HOSOKAWA, K. (1996) The amino acid sequences of two α chains of hemoglobins from komodo dragon *Varanus komodoensis* and phylogenetic relationships of amniotes. *Mol. Biol. Evol.* **13(7)**: 1039-1043.
- FUSHITANI, K., MATSUURA, M.S., RIGGS, A.F. (1988) The amino acid sequences of chains a, b, and c that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. *J Biol Chem.* 263(14): 6502-17
- GORR, T., KLEINSCHMIDT, T., & SGOUROS, J.G. (1991) A "living fossil" sequence: primary structure of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) hemoglobin – Evolutionary and functional aspects. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **372**: 559-612.
- HEWITT, J.A. KILMARTIN, J.V., TEN EYCK, L.F. and PERUTZ, M.F. (1972) Noncooperative of the alfabeta dimer in reaction of hemoglobin with oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69(1): 203-207.

- IMAI, K. (1982). Thermodynamic aspects of homotropic and heterotropic ligand binding by hemoglobin. In. C. HO.; W.A. EATON; J. P. COLLAN; Q.H. GIBSON; J. S. LEIGH Jr.; E. MARGOLIASH; K. MOFFAT & W.R. SCHEIDT (Ed.). Hemoglobin and oxygen binding. Elsevier North Holland, pp. 169 - 175.
- ISAACKS, R.E., HARKNESS, D.R., WITHAM, P.R. (1978) Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and oxygen affinity of whole blood in the loggerhead (*Caretta caretta*) and the Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) during development. 62(2):344-53.
- IWAASA, H., TAKAGI, T., SHIKAMA, K. (1989) Protozoan myoglobin from *Paramecium caudatum*. Its unusual amino acid sequence. *J Mol Biol.* 1989 208(2):355-8.
- JENSEN, F.B. & WEBER, R.E. (1985a). Kinetics of the acclimational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia I Respiratory responses. *J. Comp. Physiol.*, **156B**: 197 -203.
- JENSEN, F.B. & WEBER, R.E. (1985b). Kinetics of the acclimational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia II Extra and intracellular acid - base status in the blood. *J. Comp. Physiol.*, **156B**: 205 - 211.
- KARPLUS, M. (1982). Heme-iron ligand binding. In. C. HO; W.A. EATON; J.P. COLLMAN; Q.H. GIBSON; J.S. LEIGH Jr.; E. MARGOLIASH; K. MOFFAT and W.R. SCHEIDT (Ed.). Hemoglobin and oxygen binding. Elsevier North Holland, pp 3-11.
- KEILIN, D., HARTREE, E.F. (1951) Relationship between haemoglobin and erythrocyte. *Nature*, 168(4268):266-9.
- KENDREW J.C. (1960) Structure of myoglobin – a three dimensional fourier synthesis at 2 resolution. *Nature, Lond.*, 185: 422-427.
- KOSHLAND, D.E. Jr., NEMETHY, G., FILMER, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* 5(1):365-85.

- LECLERCQ, F., SCHNEK, A.G., BRAUNITZER, G., STANGL, A. & SCHRANK, B. (1981) Direct reciprocal allosteric interactions of oxygen and hydrogen carbonate. Sequence of hemoglobins of Caiman (*Caiman crocodylus*), the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) and the Mississippi crocodile (*Alligator mississippiensis*). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**: 1151-1158.
- MAGINNISS, L.A. (1985) Red cell organic phosphates and Bohr effects in house sparrow blood. *Resp. Physiol.*, 59: 93-103.
- MARDEM, M.C., KIGER, L., KISTER, J., BOHN, B., POYART, C. (1991) Coupling of ferric iron spin and allosteric equilibrium in hemoglobin. *Biophys J.*, 60(4):770-6
- MARUYAMA, T., WATT, K.W.K. & RIGGS, A. (1980) Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog *Rana catesbeiana* – amino-acid sequence of the alpha chain of a major component. *J. Biol. Chem.* **255(8)**: 3285-3293.
- MATSUURA, M.S.A., FUSHITANI, K. & RIGGS, A.F. (1989) The amino acid sequences of the α and β chains of hemoglobin from the snake, *Liophis miliaris*. *J. Biol. Chem.* **264**: 5515-5521.
- MATSUURA, M.S.A., OGO, S.H. & FOCESI, Jr. A. (1987) Dimer-tetramer transitions in haemoglobins from *Liophis miliaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **86**: 683-687.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J. Mol. Biol.*, **12**: 88- 118.
- MRABET, N. T., McDONALD, M.J., TURCI, S., SARKAR, R., SZABOS, A. & BUNN, H-F. (1986). Electrostatic attraction governs the dimer assembly of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **261** : 5222-5228.
- NAGAI, M., KAMINAKA, S. & OHBA, Y. (1995) Ultraviolet resonance raman studies of quaternary structure of hemoglobin using a tryptophan beta-37 mutant. *J. Biol. Chem.* **270(4)**: 1636-1642.
- NAQVI, S., ZAIDI, Z.H., BAHR-LINDSTROM, H., CARLQUIST, M. & JORNVALL, H. (1983) Characterization of hemoglobin from the lizard *Uromastix hardwickii*. *FEBS Letters*, **162(2)**: 290-295.

- NICHOLS, W.L., ZIMM, B.H. & EYCK, L.F.T. (1997) Conformation-invariant structures of the $\alpha 1\beta 1$ human hemoglobin dimer. *J. Mol. Biol.* **270**: 598-615.
- NIKINMAA, M. Vertebrate red blood cells. New York: Springer, 1990.
- OGO, S.H., MATSUURA, M.S.A. and FOCESI Jr., A (1984). Content of organic polyphosphates and their allosteric on haemoglobin from the water snakes *Helicops modestus* and *Liophis miliaris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 18A: 587-589.
- OYAMA, Jr A., NAGATOMO, C.L., BONILLA, G.O., MATSUURA, M.S.A. and FOCESI, J.A. (1993) *Bothrops alternatus* hemoglobin components. Oxygen binding properties and globin chain hydrophobic analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B: 271275.
- PERUTZ, M.F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* (London), **228**: 762-739.
- PERUTZ, M.F. (1982). Control of oxygen affinity of the heme by the structure of the globin in hemoglobin. In. C. HO.; W.A. EATON; J.P. COLLMAN; H.Q. GIBSON; J. S. LEIGH Jr.; E. MARGOLIASH; K. MOFFAT and W.R. SCHEIDT (Ed.). *Haemoglobin and oxygen binding*. Elsevier North Holland, pp 113-118.
- PERUTZ, M.F. (1990) Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Annu Rev Physiol.*;52:1-25
- PERUTZ, M.F. & BRUNORI, M. (1972) Stereochemistry of cooperative effects in fish an amphibian haemoglobins. *Nature* (London). **299**: 421-426.
- POWERS, D.A. (1985). Molecular and cellular adaptations of fish hemoglobin - oxygen affinity to environmental changes. In J. LAMY, J. TRUCHOT & R. GILLES (eds). *Respiratory pigments in animals (Relation , Structure - Function)*. Springer-Verlag, Berlin, pp 95-140.
- RAO, M.J., ACHARYA, A.S. (1992) Contribution of the gamma-carboxyl group of Glu-43(beta) to the alkaline Bohr effect of hemoglobin A. *Biochemistry.*;31(32):7231-6

- RIGGS, A. (1981) Preparation of vertebrate blood hemoglobins. *Methods Enzymol.* **76**: 5-29.
- RIGGS, A.F. & WOLBACH, R.A. (1956) Sulphydryl groups and the structure of hemoglobin. *Gen. Physiol.* **39**: 585-609.
- RUCKNAGEL, K.P., BRAUNITZER, G. & WIESNER, H. (1988) The primary structures of the α^I - and β^I - chains of common iguana (*Iguana iguana*) hemoglobin. *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* **369**: 1143-1150.
- RUCKNAGEL, K.P., REISCHL, E. & BRAUNITZER, G. (1984) Hemoglobins of reptiles. Expression of alpha-D-genes in the turtles, *Chrysemys picta bellii* and *Phrynops hilarii* (Testudines). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**: 1163-1171.
- SCHUMACHER, M.A., DIXON, M.M., KLUGER, R., JONES, R.T., BRENNAN, R.G. (1995) Allosteric transition intermediates modelled by crosslinked haemoglobins. *Nature*. 375(6526):84-7.
- SHIH, D.T., JONES, R.T., IMAI, K., TYUMA, I. (1985) Involvement of Glu G3(101)beta in the function of hemoglobin. Comparative O₂ equilibrium studies of human mutant hemoglobins. *J Biol Chem.* 260(10):5919-24.
- SPEROS, P.C. LI CATA, V.J., YONETANI, T. and ACKERS, G.K. (1991) Experimental resolution of cooperative free energies for the tem ligation species of cobalt (II) / iron (II) - CO hemoglobin. *Biochemistry*, **30**: 7254-7262.
- TOMITA, S., ENOKI, Y., SANTA, M., YOSHIDA, H. & YASUMITSU, J. (1968) Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Method Enzimol.* **76**: 23-24.
- WAKABAYASHY, S., MATSUBARA, H., WEBSTER, D.A. (1986) Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*. 322(6078):481-3.
- WEBER, R. E. & JENSEN, F. B. (1988). Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.*, **50**: 161 -179.

Anexo I

As figuras suplementares S1 a S13 apresentam os espectros de massa CID-MS/MS dos íons de peptídeos detectados em MS1 para as cadeias de globinas A, B, C e D de teiú após hidrólise com tripsina e descritos nas tabelas 7 e 8. Os íons foram selecionados e fragmentados em um espectrômetro de massas do tipo *electrospray triple-quadrupole*, mantendo-se fixo a pressão parcial de gás argônio de 4×10^{-3} mBar e energia de colisão variável entre 22 e 35 eV, dependente da resistência do peptídeo sendo fragmentado.

A interpretação do espectro de massa foi realizado utilizando o programa Biolynx parte do software MassLynx v. 3.3 com ajuste manuais quando necessário. A seqüência de aminoácidos de cada peptídeo demonstrados nas figuras suplementares foi efetuada pela dedução entre os espaçamentos dos íons-fragmentos do tipo *b* e *y*, que correspondem ao lado N-terminal e C-terminal do peptídeo respectivamente.

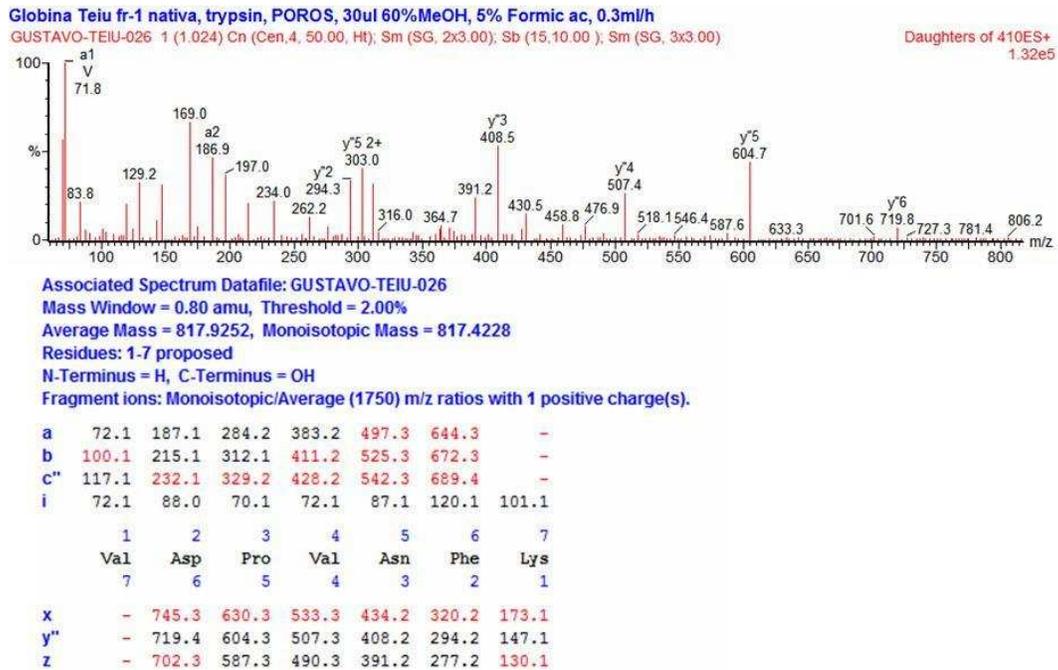


Figura S1. CID-MS/MS do íon 410 [M+2H⁺] da cadeia A

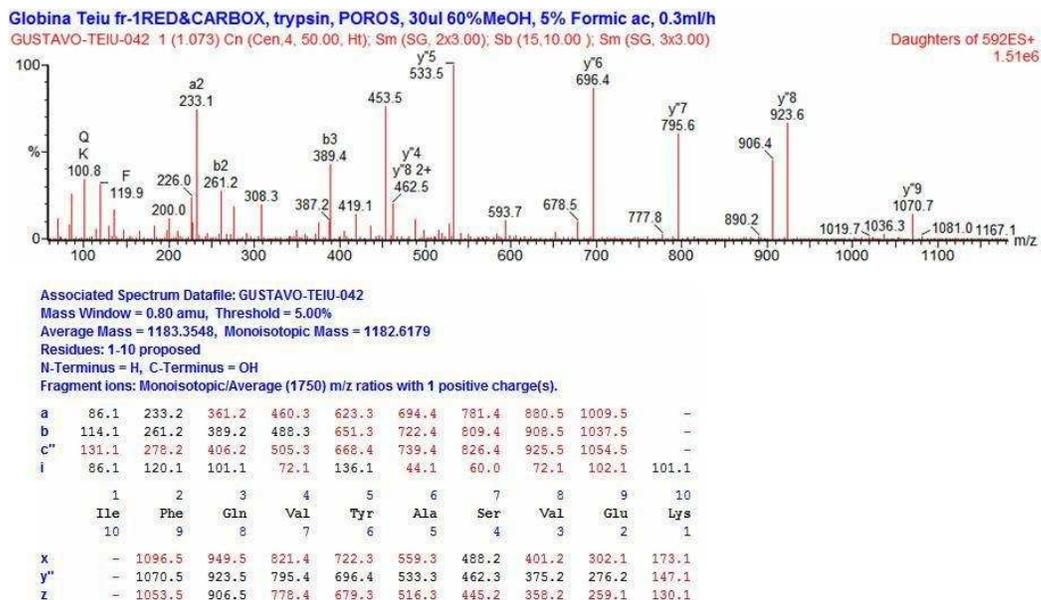


Figura S2. CID-MS/MS do íon 592 [M+2H⁺] da cadeia A

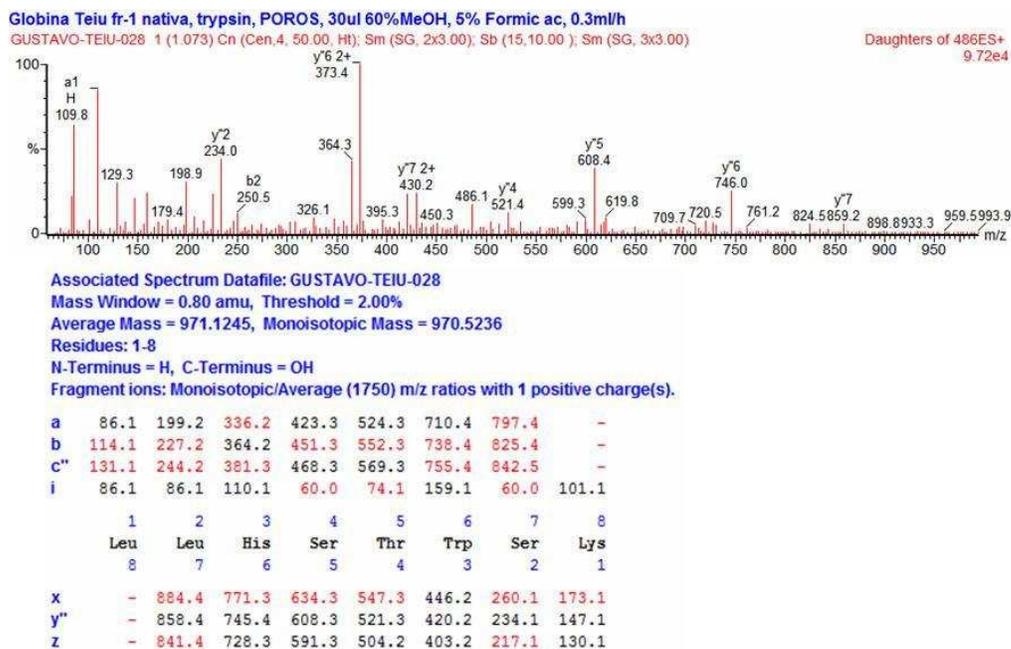
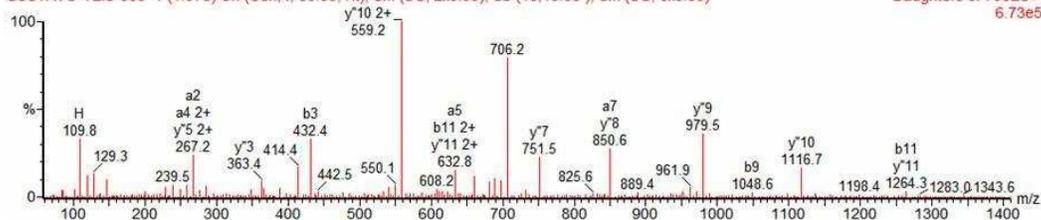


Figura S3. CID-MS/MS do íon 486 [M+2H⁺] da cadeia A

Globina Teiu fr-1 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h

GUSTAVO-TEIU-030 1 (1.073) Cn (Cen,4, 50.00, Ht); Sm (SG, 2x3.00); Sb (15,10.00); Sm (SG, 3x3.00)

Daughters of 706ES+
6.73e5



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-030

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%

Average Mass = 1410.5773, Monoisotopic Mass = 1409.6874

Residues: 1-12 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

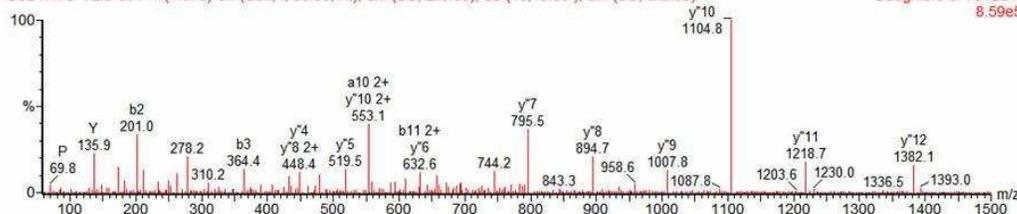
a	120.1	267.1	404.2	533.2	632.3	703.3	850.4	907.4	1020.5	1107.6	1236.6	-
b	148.1	295.1	432.2	561.2	660.3	731.3	878.4	935.4	1048.5	1135.5	1264.6	-
c"	165.1	312.2	449.2	578.3	677.3	748.4	895.4	952.5	1065.5	1152.6	1281.6	-
i	120.1	120.1	110.1	102.1	72.1	44.1	120.1	30.0	86.1	60.0	102.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Phe	Phe	His	Glu	Val	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Glu	Lys
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1289.6	1142.5	1005.5	876.4	777.4	706.3	559.3	502.2	389.2	302.1	173.1
y"	-	1263.6	1116.6	979.5	850.5	751.4	680.4	533.3	476.3	363.2	276.2	147.1
z	-	1246.6	1099.5	962.5	833.4	734.4	663.3	516.3	459.2	346.2	259.1	130.1

Figura S4. CID-MS/MS do íon 706 [M+2H⁺] da cadeia A

Globina Teiu fr-1 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h

GUSTAVO-TEIU-031 1 (1.073) Cn (Cen,4, 50.00, Ht); Sm (SG, 2x3.00); Sb (15,10.00); Sm (SG, 3x3.00)

Daughters of 791ES+
8.59e5



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-031

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%

Average Mass = 1581.7277, Monoisotopic Mass = 1580.7617

Residues: 1-14 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	44.0	173.1	336.1	450.2	547.2	660.3	759.4	922.5	1035.5	1106.6	1235.6	1292.6	1407.7	-
b	72.0	201.1	364.1	478.2	575.2	688.3	787.4	950.5	1063.5	1134.6	1263.6	1320.6	1435.7	-
c"	89.1	218.1	381.2	495.2	592.3	705.3	804.4	967.5	1080.6	1151.6	1280.6	1337.7	1452.7	-
i	44.1	102.1	136.1	87.1	70.1	86.1	72.1	136.1	86.1	44.1	102.1	30.0	88.0	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Ala	Glu	Tyr	Asn	Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Ala	Glu	Gly	Asp	Lys
	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1536.7	1407.7	1244.6	1130.6	1033.5	920.4	821.4	658.3	545.2	474.2	345.1	288.1	173.1
y"	-	1510.7	1381.7	1218.6	1104.6	1007.5	894.5	795.4	632.3	519.2	448.2	319.2	262.1	147.1
z	-	1493.7	1364.7	1201.6	1087.6	990.5	877.4	778.4	615.3	502.2	431.2	302.1	245.1	130.1

Figura S5. CID-MS/MS do íon 791 [M+2H⁺] da cadeia A

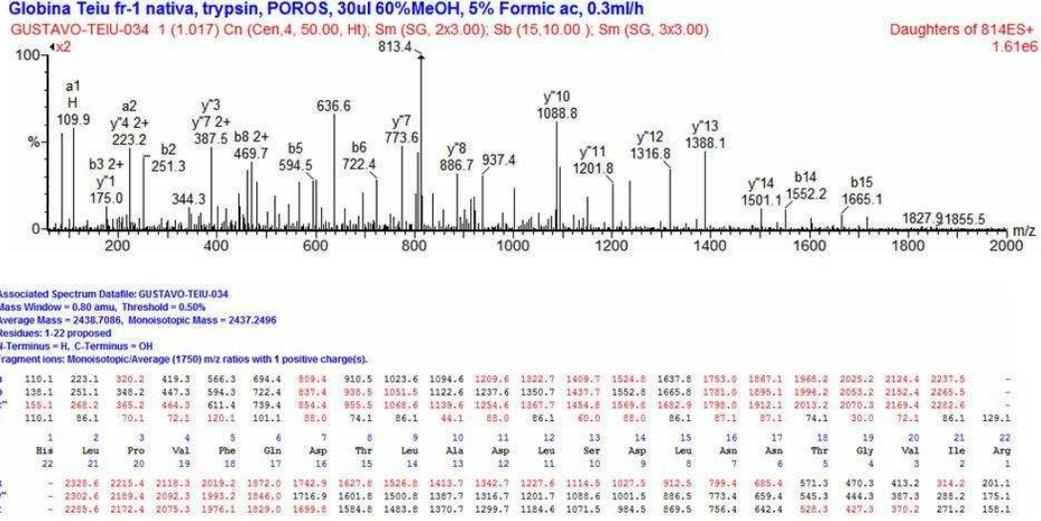


Figura S6. CID-MS/MS do íon 814 [M+3H⁺] da cadeia A

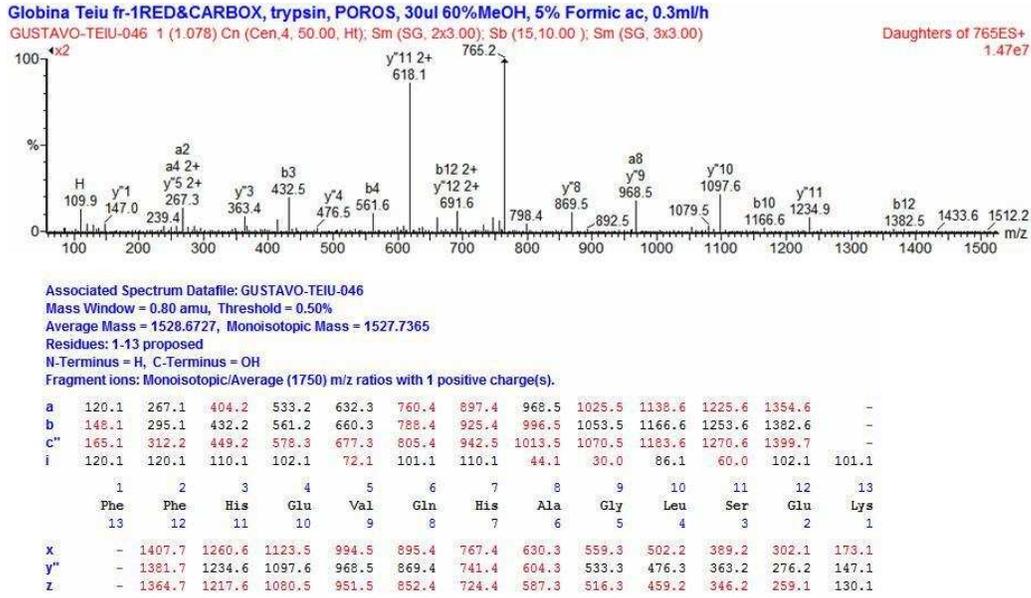
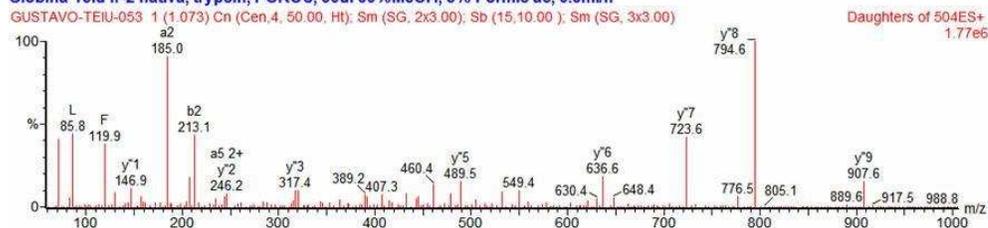


Figura S7. CID-MS/MS do íon 765 [M+2H⁺] da cadeia A

Globina Teiu fr-2 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-053

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 1.00%

Average Mass = 1006.1520, Monoisotopic Mass = 1005.5389

Residues: 1-10 proposed

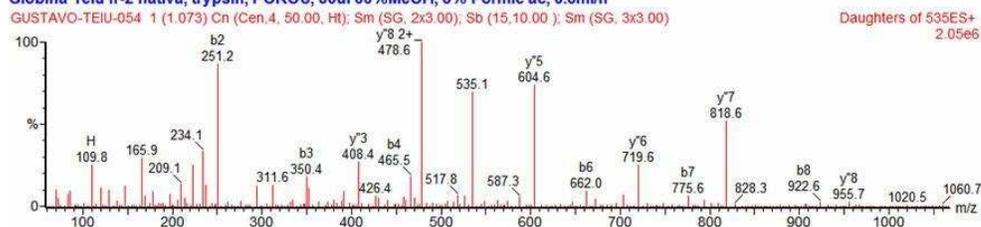
N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	72.1	185.2	256.2	343.2	490.3	547.3	662.3	733.4	832.4	-
b	100.1	213.2	284.2	371.2	518.3	575.3	690.3	761.4	860.4	-
c"	117.1	230.2	301.2	388.2	535.3	592.3	707.4	778.4	877.5	-
i	72.1	86.1	44.1	60.0	120.1	30.0	88.0	44.1	72.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Val	Leu	Ala	Ser	Phe	Gly	Asp	Ala	Val	Lys
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	933.5	820.4	749.3	662.3	515.2	458.2	343.2	272.2	173.1
y"	-	907.5	794.4	723.4	636.3	489.3	432.2	317.2	246.2	147.1
z	-	890.5	777.4	706.3	619.3	472.2	415.2	300.2	229.2	130.1

Figura S8. CID-MS/MS do ion 504 [M+2H⁺] da cadeia B

Globina Teiu fr-2 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-054

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 1.00%

Average Mass = 1068.2259, Monoisotopic Mass = 1067.5658

Residues: 1-9 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

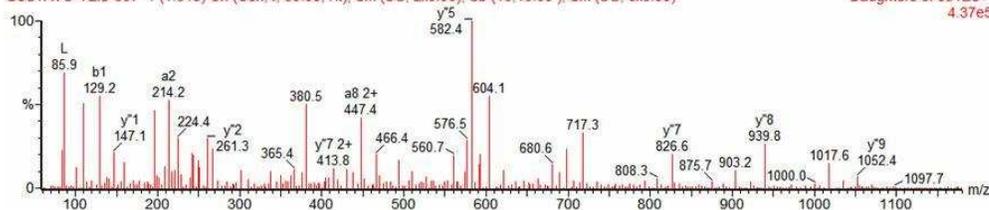
a	86.1	223.1	322.2	437.2	534.3	633.4	747.4	894.5	-
b	114.1	251.1	350.2	465.2	562.3	661.4	775.4	922.5	-
c"	131.1	268.2	367.2	482.3	579.3	678.4	792.4	939.5	-
i	86.1	110.1	72.1	88.0	70.1	72.1	87.1	120.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Leu	His	Val	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Lys
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	981.5	844.4	745.3	630.3	533.3	434.2	320.2	173.1
y"	-	955.5	818.4	719.4	604.3	507.3	408.2	294.2	147.1
z	-	938.5	801.4	702.3	587.3	490.3	391.2	277.2	130.1

Figura S9. CID-MS/MS do ion 535 [M+2H⁺] da cadeia B

Globina Teiu fr-2 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h

GUSTAVO-TEIU-057 1 (1.018) Cn (Cen.4, 50.00, Ht); Sm (SG, 2x3.00); Sb (15,10.00); Sm (SG, 3x3.00)

Daughters of 591ES+
4.37e5



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-057

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 1.00%

Average Mass = 1180.2651, Monoisotopic Mass = 1179.5666

Residues: 1-10 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

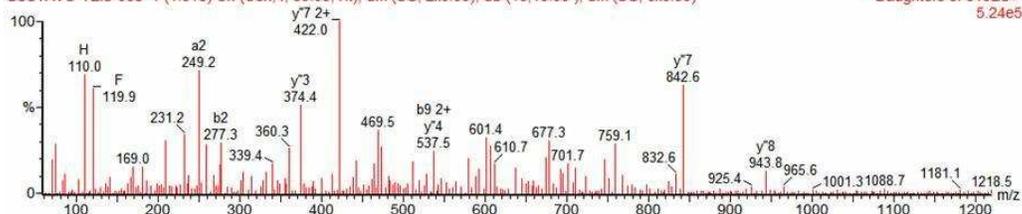
a	101.1	214.1	327.2	456.3	571.3	734.4	835.4	892.4	1006.5	-
b	129.1	242.1	355.2	484.3	599.3	762.4	863.4	920.4	1034.5	-
c''	146.1	259.2	372.3	501.3	616.3	779.4	880.4	937.5	1051.5	-
i	101.1	86.1	86.1	102.1	88.0	136.1	74.1	30.0	87.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Tyr	Thr	Gly	Asn	Lys
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1078.5	965.4	852.3	723.3	608.3	445.2	344.2	287.1	173.1
y''	-	1052.5	939.4	826.4	697.3	582.3	419.2	318.2	261.2	147.1
z	-	1035.5	922.4	809.3	680.3	565.3	402.2	301.1	244.1	130.1

Figura S10. CID-MS/MS do ion 591 [M+2H⁺] da cadeia B

Globina Teiu fr-2 nativa, trypsin, POROS, 30ul 60%MeOH, 5% Formic ac, 0.3ml/h

GUSTAVO-TEIU-058 1 (1.018) Cn (Cen.4, 50.00, Ht); Sm (SG, 2x3.00); Sb (15,10.00); Sm (SG, 3x3.00)

Daughters of 610ES+
5.24e5



Associated Spectrum Datafile: GUSTAVO-TEIU-058

Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 5.00%

Average Mass = 1219.3476, Monoisotopic Mass = 1218.5928

Residues: 1-10 proposed

N-Terminus = H, C-Terminus = OH

Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	102.0	249.1	350.2	447.2	518.3	655.3	818.4	917.4	1045.5	-
b	130.0	277.1	378.2	475.2	546.2	683.3	846.4	945.4	1073.5	-
c''	147.1	294.1	395.2	492.2	563.3	700.3	863.4	962.5	1090.5	-
i	102.1	120.1	74.1	70.1	44.1	110.1	136.1	72.1	101.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	His	Tyr	Val	Gln	Lys
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1116.5	969.5	868.4	771.4	700.3	563.3	400.2	301.1	173.1
y''	-	1090.6	943.5	842.4	745.4	674.4	537.3	374.2	275.2	147.1
z	-	1073.5	926.5	825.4	728.4	657.3	520.3	357.2	258.1	130.1

Figura S11. CID-MS/MS do ion 610 [M+2H⁺] da cadeia B

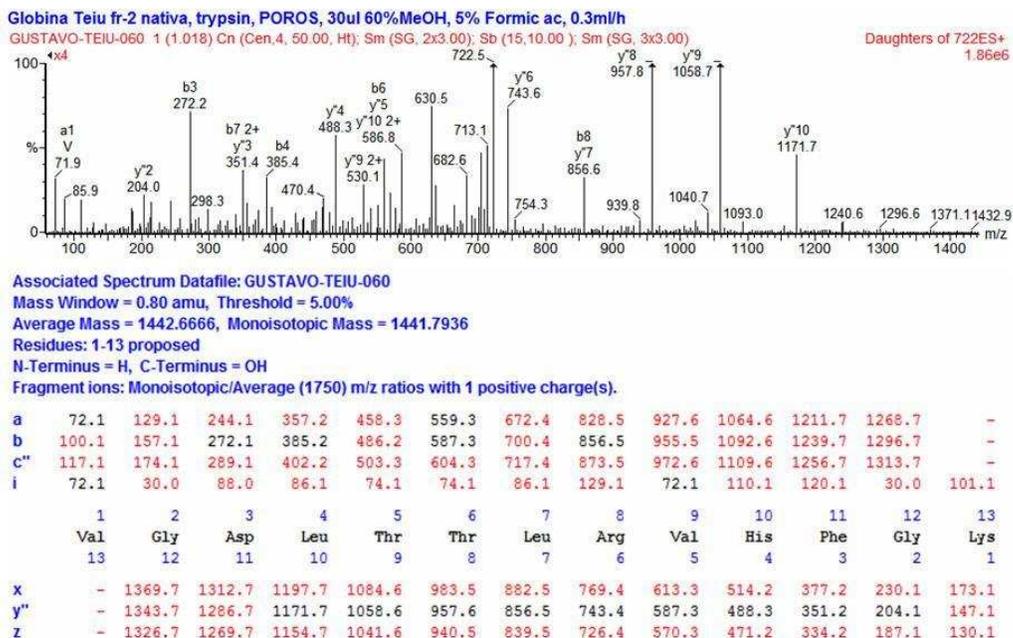


Figura S12. CID-MS/MS do ion 722 [M+2H⁺] da cadeia B

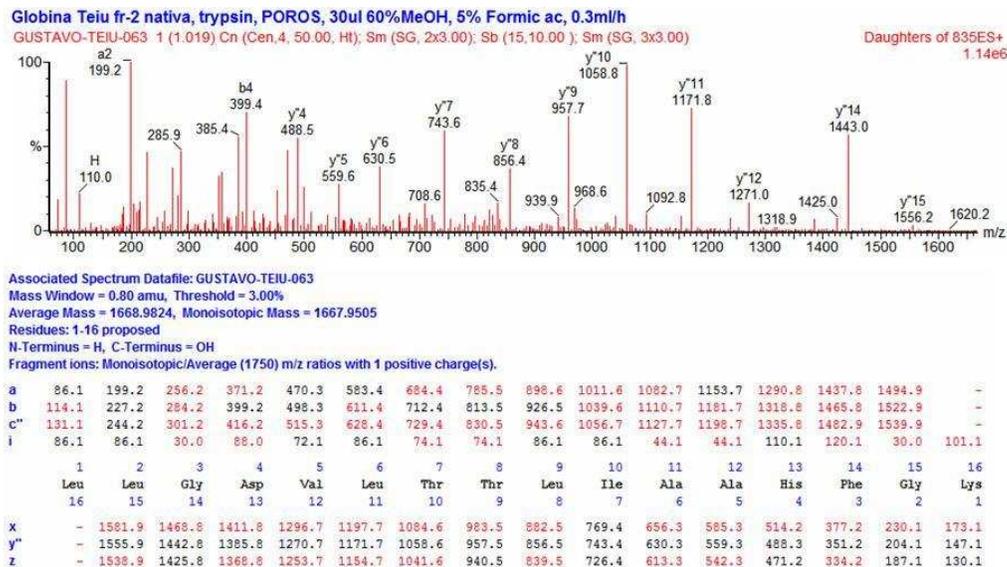


Figura S13. CID-MS/MS do ion 835 [M+2H⁺] da cadeia B