

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE  
HEMOGLOBINA DE LEPTODACTYLUS LABYRINTHICUS

AMORA ABREU BITTENCOURT LIMA  
TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR  
PROF. DR. ALDO FOCESI JÚNIOR

1979

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*A minha mãe e irmãos*

*Joaquim*

*Sanderson e Vanessa*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior, orientador desta tese, pela oportunidade, apoio e orientação desde o início da minha carreira científica.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte através do Departamento de Biologia e Laboratório central do Hospital das Clínicas pelo apoio na realização desta tese.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pela concessão da bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos aos professores: Dr Hiroshi Aoyama, Dra. Lucia P. S. Airoidi, Dra. Nilce C. Meirelles e Satie Hatsushika Ogo, pelo apoio e dedicação a este trabalho, su gestões e correções dadas a esta tese.

Ao Prof. Dr. Augusto S. Abe, pelas instruções e material

biológico conseguido para a realização deste trabalho científico.

Meus agradecimentos ao Prof. Ivan Sazima, pela identificação do animal.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica, em especial Maria S. Arita, Antonia Reis Figueira, Maria Regina V. Vaz e Thais P. C. Ferreira, pelo apoio e sugestões oferecidas durante todo este trabalho.

Meus saudosos agradecimentos a Profa. e amiga Tomhiko Sekino que contribuiu de diversas maneiras em algumas etapas deste trabalho.

Aos demais colegas e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram conosco na realização deste trabalho.

## ABREVIATURAS

ATP	-	Adenosina-5'-trifosfato
CM-celulose	-	Carboximetil-celulose
DPG	-	Difosfoglicerato
EDTA	-	Etileno-diamino-tetracético Ácido
IHP	-	Inositol hexafosfato
SDS	-	Sódio dodecil sulfato
TCA	-	Ácido tricloro Acético
TEMED	-	N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TRIS-HCl	-	Tris(hidroxi metil)-aminometano-HCl

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	13
2.1.1. Preparo dos hemolisados .....	13
2.1.2. Preparo dos hemolisados isentos de íons e moléculas pequenas .....	14
2.1.3. Separação dos componentes das hemoglobi- nas de Rã-pimenta .....	15
2.1.4. Separação eletroforética dos componen- tes das hemoglobinas de Rã-pimenta.....	16
2.1.5. Equilíbrio entre hemoglobina e ligantes	17
2.1.6. Estudo sobre o efeito Bohr .....	21
2.1.7. Avaliação dos parâmetros $\text{Log } P_{50}$ e do coeficiente de Hill (n) .....	22
2.1.8. Determinação do hematócrito e dosagem - de hemoglobina .....	27
2.1.9. Determinação do peso molecular .....	27
2.1.10. Preparação de globinas .....	28
2.1.11. Separação de cadeias $\alpha$ e $\beta$ .....	29

	Página
2.1.12. Equipamentos .....	31
2.1.13. Reagentes .....	32
3. RESULTADGS .....	33
3.1. Separação dos componentes das hemoglobinas ....	33
3.2. Comportamento eletroforético do hemolisado total de eritócitos da Rã-pimenta .....	33
3.3. Propriedades de oxigenação da hemoglobina de Rã-pimenta no hemolisado total .....	35
3.4. Efeito do fosfato inorgânico sobre a hemoglobina de Rã-pimenta .....	37
3.5. Efeito do ATP sobre a afinidade da hemoglobina de Rã-pimenta .....	40
3.6. Efeito Bohr e interação heme-heme no componente Hb <sub>1</sub> de Rã-pimenta .....	43
3.7. Efeito Bohr e interação heme-heme no componente Hb <sub>2</sub> de Rã-pimenta .....	46
3.8. Determinação de hemoglobina e hematócrito.....	46
3.9. Determinação do peso molecular por cromatografia de exclusão molecular .....	49
3.10 Separação das cadeias $\alpha$ e $\beta$ .....	49
4. DISCUSSÃO .....	55

5. RESUMO .....	62
6. SUMMARY .....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A transição da vida aquática para a terrestre entre os anfíbios tem sido objeto de muitos estudos e suas causas continuam essencialmente discutidas. Estas transições em anfíbios, ocorrem em semanas ou em meses, oferecendo oportunidade de avaliar o que deve ter ocorrido em outros animais durante milhares de anos (Going e Going, 1971).

As hemoglobinas de anfíbios são de interesse especial, pois de um lado elas podem ajudar a esclarecer uma transição evolucionária entre hemoglobinas de peixes e de vertebrados aéreos, por outro lado, como é sabido, durante a metamorfose de girinos a hemoglobina larval é substituída por hemoglobina adulta; esta mudança molecular pode ser comparada à substituição da proteína fetal para a adulta observada em mamíferos (Chauvet e Acher, 1971).

A hemoglobina é uma proteína de vital importância, pois transporta oxigênio dos pulmões para os tecidos especialmente para as mitocôndrias onde este gás é muito escasso. Como todas as proteínas, a hemoglobina é constituída de aminoácidos interligados em cadeias polipeptídicas. A hemoglobina humana é a que tem sido melhor estudada (Perutz, 1978); sendo constituída por quatro sub-unidade polipeptídicas, cada uma com peso molecular 16.000, formada por uma cadeia associada a um grupo prostético denominado heme, que consiste de um anel de protoporfirina IX contendo no centro um átomo

mo de ferro. Este átomo de ferro está coordenado aos quatro átomos de nitrogênio da protoporfirina, restando portando duas posições de coordenação livres, uma das quais pode captar o oxigênio. Duas dessas sub-unidades são denominadas cadeias alfa ( $\alpha$ ), cada uma constituída de 141 resíduos de aminoácidos; as outras duas denominadas cadeias beta ( $\beta$ ), contém cada uma 146 resíduos de aminoácidos. A molécula assim formada está intimamente ligada por interações não covalentes (Stryer, 1975), constituindo o tetrâmero.

Este pigmento respiratório de tão grande importância para os seres vivos não está localizado restritamente em determinados tecidos do organismo, embora sua distribuição preferencial pareça ser as células sanguíneas. Na maioria dos mamíferos a hemoglobina está localizada em eritrócitos nucleados ou não. Apesar de a sua distribuição ocorrer normalmente no citoplasma, tem sido evidenciada a sua presença em núcleos de eritrócitos de sapos (Davies, 1961) e de tritão (Tooze e Davies, 1963). Estudos de difração de raios X têm evidenciado a estrutura tridimensional de cadeias de globinas, muito semelhantes àquelas  $\alpha$  e  $\beta$  da humana, para Chironomus (inseto) (Huber e colab., 1971), Clycera (anelídeo) (Padlan e Love, 1968); bem como uma análise da seqüência de aminoácidos destas moléculas tem confirmado esta homologia (Dayhoff, 1972). Todos os anfíbios apresentam eritrócitos nucleados, e a concentração de hemoglobina nestas células, é geralmente menor que nos mamíferos; também tem sido evidenciada, particularmente para aqueles anfíbios adaptados à vida terrestre, a presença de eritrócitos anucleados,

se bem que numa proporção de 10% (Sullivan, 1974). Os eritrócitos anucleados apesar de consumirem menos oxigênio são melhores transportadores de oxigênio que os nucleados.

Dentre as sessenta famílias existentes de anuros, são conhecidos cerca de 218 gêneros e 2600 espécies (Porter, 1972). Apesar de morfologicamente similares, eles diferem entre si de acordo com a necessidade de suportar algumas condições características de habitat. Assim sendo, é óbvio que surjam algumas diversificações nos componentes da hemoglobina, como também que dentro de uma mesma espécie, ocorra alguma variação de componentes entre a fase larval e a fase adulta.

As hemoglobinas de anfíbios têm sido estudadas, por vários pesquisadores, com vistas a dois objetivos principais; a explanação do seu mecanismo fisiológico fundamental e a elucidação do fenômeno evolucionário. Assim sendo, Pringle (1958) realizou um trabalho no qual era observada uma comparação fisiológica deste pigmento. Manwell (1960) bem como vários outros investigadores, tem estudado as propriedades físico-químicas em certo grupo de animais, onde as características observadas têm sido: peso molecular, forma cristalina, afinidade pelo oxigênio, ponto isoelétrico, especificidade imunológica, bem como, estrutura e estabilidade química. Assim sendo, Sydentrycker (1956), Rodnan e Ebaugh (1957), Saha e Dutta (1957), Dessauer, Fox e Ramirez (1957), Buhler (1959) e Foreman (1960), tem efetuado estudos dessa natureza, usando as mais diversificadas técnicas, dentre as quais o método eletroforético tem si

do o mais utilizado. Dessauer, Fox e Ramirez (1957) trabalharam com hemoglobinas de 86 espécies de anfíbios usando eletroforese de papel e chegaram à conclusão de que a mobilidade eletroforética pode ser utilizada como característica na classificação de certas espécies. Rodnan (1957) efetuou a comparação do padrão eletroforético da hemoglobina de vários vertebrados. Mainardi (1957) também adotou este critério de comparação e concluiu que o modelo eletroforético varia de acordo com a posição sistemática da espécie, posteriormente ele pode confirmar suas conclusões utilizando testes imunológicos. Foreman (1960) após investigar hemoglobinas de 21 espécies de mamíferos, concluiu que o modelo eletroforético pode ser usado como critério de classificação quando duas espécies são morfologicamente difíceis de distinção. Bertini e Rathe (1962) trabalharam com hemoglobinas de diversas espécies de anuros e concluíram que o comportamento eletroforético pode ser considerado como uma característica bioquímica de individualidade específica.

Muitas vezes as hemoglobinas de algumas espécies de anfíbios podem sofrer polimerização por formação de pontes de dissulfeto (Riggs, 1964; Trader e Frieden, 1966). Assim sendo, estas hemoglobinas polimerizadas podem alterar as propriedades eletroforéticas que geralmente são interpretadas como polimorfismo. O termo polimorfismo, entretanto, é comumente aplicado incorretamente em dados de eletroforese; na realidade este termo seria corretamente descrito como uma variação genética em uma espécie, e não simplesmente aplicado àquela espécie, pelo fato de seu hemoli-

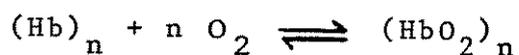
sado conter múltiplos componentes (Sullivan, 1974). O tratamento do hemolisado com mercaptoetanol e ditioneitol, em pH acima de 7,0, tem sido utilizado com a finalidade de reduzir as pontes de dissulfeto, impedindo assim a formação de polímeros (Sullivan, 1974). A polimerização não afeta as propriedades de oxigenação de Rana catesbeiana (Riggs, 1966).

Estudos funcionais e estruturais detalhados têm sido feitos mais freqüentemente com hemoglobina humana do que com outras proteínas. Três propriedades de particular interesse podem ser observadas no equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio: 1) a reversibilidade da ligação do oxigênio; 2) a forma sigmóide da curva de oxigenação; 3) a dependência da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, em função do pH (efeito Bohr) e de outros íons.

Tal como a maioria dos compostos que contêm ferro, o heme se combina com o oxigênio tão firmemente que a ligação assim formada é difícil de ser quebrada. Temos que levar em consideração que o ferro pode existir em dois estados de oxidação, assim sendo, o heme ferroso reage com o oxigênio irreversivelmente produzindo o heme férrico, entretanto, quando o heme ferroso está envolvido na cadeia da globina, ele é protegido e sua reação com o oxigênio é reversível. O efeito da globina na química do heme, somente recentemente tem sido explicado, com a evidência de que a oxidação irreversível do heme ocorre por um mecanismo que envolve um composto intermediário (Perutz, 1978), no qual uma molécula de oxigênio forma uma ponte através do átomo de ferro, entre dois hemes. A formação de tal

ponte pode ser justificada pelo fato de as cadeias polipeptídicas se dobrarem e isolarem cada heme separadamente. Na proteína, o ferro está coordenado ao nitrogênio do aminoácido histidina (através da sua quinta posição de coordenação) o qual confere carga negativa ao metal, permitindo a este formar uma ligação com o oxigênio.

A oxigenação da hemoglobina pode ser representada através da seguinte equação de equilíbrio (Riggs, 1951):



aplicando a lei da ação das massas a este equilíbrio, teremos:

$$K = \frac{(\text{HbO}_2)_n}{(\text{Hb}) (\text{PO}_2)^n}$$

ou de uma forma geral,

$$\frac{\bar{y}}{(1 - \bar{y})} = K (\text{PO}_2)^n$$

onde:

$\bar{y}$  = fração de hemoglobina oxigenada;

$(1 - \bar{y})$  = fração de hemoglobina não oxigenada;

$K$  = constante de equilíbrio;

$\text{PO}_2$  = pressão parcial de oxigênio;

$n$  = coeficiente de Hill.

Quando plotamos um gráfico da fração de hemoglobina oxigenada ( $\bar{Y}$ ), contra a pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), obtemos a curva de oxigenação da hemoglobina. O gráfico obtido é em forma de "S" (sigmoideal), que é a forma de curva ideal para a hemoglobina representar o papel fisiológico como transportador de oxigênio no sangue; e em termos moleculares esta forma da curva significa que a união do oxigênio à hemoglobina é cooperativa, isto é, a união do oxigênio a um heme facilita a união do oxigênio aos outros grupamentos heme. Esta união cooperativa é também chamada de interação heme-heme ou interação homotrópica.

A melhor demonstração para interação heme-heme, é apresentada por um gráfico de  $\log (\bar{Y} / (1-\bar{Y}))$  contra  $\log PO_2$ , que daria uma reta com inclinação " $n$ " (coeficiente de Hill), em homenagem ao fisiologista A.V. Hill, que foi o primeiro a tentar uma análise matemática do equilíbrio de oxigênio; (Brunori e colab., 1973). A observação desta curva apresenta a vantagem de permitir a comparação entre diferentes curvas de dissociação, como também dá uma descrição imediata do caráter do processo de ligação. Assim sendo, para  $n = 1$ , implica que, para sítios equivalentes, nenhum efeito de interação está presente e corresponde a uma curva de oxigenação hiperbólica;  $n > 1$  corresponde a uma curva de oxigenação de forma sigmoideal e aponta a presença de interação heme-heme positiva;  $n < 1$ , pode indicar a presença de sítios não equivalentes (hetero-

genicidade intramolecular) ou interação sítio-sítio negativa (não há cooperatividade).

Efetuando experimentos com hemoglobina humana, Bohr e colab., (1904), observaram que a posição da curva de oxigenação da hemoglobina, depende da pressão parcial de gás carbônico misturado com o oxigênio. E chegou a conclusão de que quanto maior é pressão parcial de  $\text{CO}_2$  mais deslocada para a direita estava a curva de oxigenação da hemoglobina. Posteriormente, Barcroft (1910), observou que a curva de oxigenação da hemoglobina era deslocada pela presença de qualquer ácido e não exclusivamente pelo gás carbônico. Assim sendo, o efeito Bohr atualmente pode ser descrito como o efeito do pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, isto significa que o fenômeno de ligação do oxigênio nos sítios de ligação (Heme), é afetado pela ligação de prótons em outros sítios (cadeia de aminoácidos na proteína).

As modificações na curva de oxigenação produzida pela presença de gás carbônico no sangue (efeito Bohr), é de grande importância fisiológica. Nos pulmões, onde existe bastante oxigênio e pouco  $\text{CO}_2$  o sangue tem mais afinidade pelo oxigênio. Quando o sangue chega nos tecidos, onde há bastante  $\text{CO}_2$  e pouco oxigênio, ocorre o fenômeno inverso, isto é, o oxigênio é facilmente liberado. Assim sendo o efeito Bohr permite que a hemoglobina fixe bastante oxigênio nos pulmões e o libere nos tecidos.

A grandeza do efeito Bohr pode ser avaliada através da expressão  $(\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH})$ . De acordo com o sentido deste proces

so, podemos observar o efeito Bohr normal ou alcalino quando a afinidade da hemoglobina aumenta com o aumento do pH, ou ainda efeito Bohr ácido ou reverso quando a afinidade da hemoglobina diminui com o aumento do pH. O efeito Bohr alcalino, contribue para modificações conformacionais intra-cadeias, assim sendo, tanto a cadeia alfa ( $\alpha$ ) como a cadeia beta ( $\beta$ ) participam na liberação de prótons envolvidos no processo. De forma que a combinação de estudos químicos e de difração de Raios-X, têm identificado a histidina 146 da cadeia beta ( $\beta$ ), e a valina 1 da cadeia alfa ( $\alpha$ ), como responsáveis pelo efeito Bohr alcalino, com uma contribuição de 75% e 25% respectivamente (Perutz e colab., 1968; Muirhead e colab., 1970).

Por outro lado, provavelmente grupos carboxílicos localizados na cadeia beta ( $\beta$ ), têm sido indicados como responsáveis pelo efeito Bohr ácido (Antonini e colab., 1965a; Rossi-Bernardi, e Roughton, 1967).

Em hemoglobinas de rãs também têm sido determinado o efeito Bohr, bem como têm sido pesquisados os grupos responsáveis por este efeito. Nos estudos de Witt e Ingram (1967), têm sido mencionado que metade dos grupos amino terminais são acetilados. Estes grupos são encontrados na cadeia alfa da Rana esculenta (Chauvet e Acher, 1968). Desde que o amino-grupo do resíduo N-terminal da cadeia alfa contribui com cerca de 1/4 dos prótons Bohr (Perutz e colab., 1969), o efeito Bohr seria reduzido na hemoglobina de rã. Ele tem uma grandeza de -0,28 comparado com -0,6 a -0,7 do

efeito Bohr da hemoglobina humana. Aproximadamente metade dos prótons Bohr vem da histidina C-terminal (146) da cadeia beta. Na deoxihemoglobina este resíduo forma ponte salina com o ácido aspártico 94 da cadeia beta. Nas duas rãs (R. catesbeiana e R. esculenta), o ácido aspártico é substituído por asparagina ou glicina. Apesar disso pode não diminuir o efeito Bohr pelo fato de ser a histidina desprotonada na conformação desoxigenada (Perutz, 1970). Também tem sido efetuados estudos com hemoglobina de girino de R. catesbeiana na fase larval (Riggs, 1951 e 1965; Hamada e colab., 1964, Aggarwal e Riggs, 1969). Apesar de ser comumente relatado que a hemoglobina de girino carece de efeito Bohr, dados mais precisos obtidos por Aggarwal e Riggs, indicam um efeito Bohr muito pequeno,  $-0,10$  comparado com  $-0,28$ , obtido para o animal adulto. Em informações particulares, Riggs revela que a presença ou ausência de efeito Bohr depende do tampão usado nos experimentos (Sullivan, 1974); e que a afinidade de eritrócitos ou hemolisados para diferentes espécies de girino são similares. Estudos da afinidade pelo oxigênio com o componente isolado da hemoglobina de diversas espécies de girinos, não tem sido efetuados pelo fato de que hemoglobinas de girinos se dissociarem rapidamente e sua afinidade pelo oxigênio depende muito da concentração (Riggs, 1964).

Estudos efetuados com curvas de oxigenação de hemoglobinas revelam que a afinidade do sangue pelo oxigênio aumenta quando as células vermelhas estão diluídas por hemólise. Este fato levou Barcroft a supor que alguma terceira substância estaria presente na

hemólise.

Uma série de investigações levou Chanutin e Curnish (1965), a demonstrar que o DPG pode formar complexos com a hemoglobina em soluções de baixa força iônica. Posteriormente, Benesch e Benesch (1967), descreveram o efeito deste composto na diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, este efeito foi em seguida confirmado por Chanutin e Curnish (1967). Assim sendo, estes estudos permitem admitir que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e por fosfatos orgânicos é recíproco, tal como o efeito Bohr (Benesch e Benesch, 1974). Logo é de se esperar que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varie inversamente com a concentração de DPG. Assim sendo, é quase certo que o DPG, uma vez que está diluído na hemólise, seja a terceira substância de Bancroft, responsável pela diminuição da afinidade da hemoglobina em células vermelhas intactas.

Dentre os fosfatos orgânicos, existentes nas células vermelhas, que podem diminuir a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, o DPG é o mais abundante, sua concentração em eritrócitos humanos é aproximadamente igual à da hemoglobina humana, isto é, cerca de 5 mM (Rapoport e Guest, 1941). O único outro fosfato intracelular, presente em concentração suficiente (cerca de 1,3 mM), para contribuir significativamente com a diminuição da afinidade pelo oxigênio, é o ATP, entretanto sua afinidade pelo íon magnésio intracelular é tão acentuada, que praticamente seu efeito de diminuir a afinidade pelo oxigênio é eliminado no hemolisado total, de

vido haver formação de complexo. Daí sentimos a necessidade de observarmos seu efeito com hemolisados desionizados. (Bunn 1971a).

Nosso objetivo, no presente trabalho, se prende à caracterização e identificação da hemoglobina de Leptodactylus labyrinthicus. Este anfíbio de habitat semi-aquático, é abundante na América do Sul e na Austrália, e as suas propriedades funcionais e estruturais permaneciam desconhecidas. Existem informações, oriundas da literatura (Darlington, 1957), de que a Rana catesbeiana habita regiões onde não existe a Leptodactylus labyrinthicus, sendo portanto sugerido que existe uma competição ecológica entre estas duas espécies, se bem que, há vários anos a Rana catesbeiana vem sendo aclimatada no Brasil.

Achamos portanto, de maior importância um estudo sistemático da Leptodactylus labyrinthicus, tendo em vista a sua exploração comercial aqui no Brasil, uma vez que se trata de uma espécie comestível que é popularmente conhecida como "Rã-pimenta", e encontrada facilmente nas proximidades de lagoas, pântanos ou qualquer outra fonte de água parada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais utilizados foram anfíbios brasileiros, Leptodactylus labyrinthicus (Sprix, 1824); trata-se de animais de grande porte, pertencentes à família Leptodactylidae, pesando aproximadamente 500g e coletados nas regiões próximas a Itapira - Sp. Esta espécie é das maiores do seu gênero, pois existem exemplares que chegam a pesar 900g e atingem até 20cm de comprimento. A região dorsal destes animais é de coloração escura enquanto a região ventral é mais clara. São dotados de glândulas que segregam uma substância que causa ardor quando em contato direto com a pele humana, daí serem conhecidos como Rã-pimenta. Todos os experimentos foram conduzidos com exemplares adultos recém capturados, a fim de evitar possíveis alterações metabólicas, que pudessem falsear os resultados.

#### 2.1.1 PREPARO DOS HEMOLISADOS

A coleta de sangue foi efetuada em animais previamente heparinizados, por meio de injeção de heparina (Liquemine, Roche) por via intramuscular, 15 minutos antes de serem sacrificados. Pos

teriormente os animais foram sangrados via arco sistêmico esquerdo; o material foi colhido sem emprego de anestésico, em seringas heparinizadas, e em seguida transferido para tubos de polietileno contendo 0,5ml de heparina (500UI/ml) e solução de NaCl 1,7%, contendo EDTA 1mM pH 7,0. Evitávamos assim a coagulação sanguínea e eventual polimerização das hemoglobinas.

As hemácias foram separadas do plasma por centrifugação (Centrífuga "Sorvall" modelo RC-2B) a 2000 r.p.m. durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e a lavagem das hemácias foi processada três vezes com a solução de  $\text{CaCl}_2$  1,7%, contendo EDTA 1mM pH 7,0. As hemácias obtidas destas lavagens foram hemolisadas com água destilada, na proporção de um volume de hemácias para três de água, e novamente centrifugadas, obtendo-se assim, um hemolisado límpido. Realizada a hemólise, o sangue hemolisado foi centrifugado; o precipitado desprezado e o sobrenadante estocado em geladeira para posterior utilização.

Todas as operações foram realizadas à baixa temperatura (4°C) logo após a coleta do material.

### 2.1.2 HEMOLISADOS ISENTOS DE ÍONS E MOLÉCULAS PEQUENAS

Para a preparação de hemoglobinas "stripped", isentas de íons e de moléculas pequenas como fosfatos orgânicos, foram utilizados métodos descritos por Noble e Riggs (1976).

Inicialmente, 10ml do hemolisado foram aplicados em uma coluna Sephadex G-25 (15x2cm), previamente equilibrada com solução de EDTA 1mM, pH 7,0 e eluídas na mesma solução. O eluato obtido, foi então submetido a uma série de colunas de troca iônica constituídas pelas seguintes resinas; Dowex 1- X<sub>8</sub> na forma de acetato (8x2cm); Dowex 50 W- X<sub>4</sub> na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (8x2cm) e uma resina mista, Amberlite IRC-50 na forma de H<sup>+</sup>; e IR-4B na forma de OH<sup>-</sup>, (20x2cm), todas elas também equilibradas com solução de EDTA 1mM pH 7,0.

### 2.1.3 SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA HEMOGLOBINA DE RÃ-PIMENTA

Para a separação dos componentes da hemoglobina da Rã-pimenta, o hemolisado total foi submetido à cromatografia em coluna de CM-celulose (34x2cm), equilibrada em tampão fosfato 10mM, EDTA 1mM pH 6,4. Para tal, esta resina foi ativada passando pelo seguinte processamento: inicialmente a CM-celulose foi deixada em água para entumescimento por várias horas. Logo em seguida, foram efetuadas lavagens na resina com trocas sucessivas de água para retirar as granulações mais finas, etapa que se estendeu por 24 horas. A CM-celulose foi submetida a leve agitação com sol. de NaOH 0,5M durante 1 hora, sendo então lavada várias vezes com água bidestilada até a mesma chegar a pH próximo a 7,0. Essa lavagem foi efetuada com auxílio de um funil de Buchner adaptado a uma bomba

de vácuo. Posteriormente a resina ficou em contato com sol. de  $H_3PO_4$  0,5N, em agitação durante 1 hora. Repetiram-se as lavagens até que o pH ficasse em torno de 6,0. Assim, a resina foi colocada em tampão fosfato 10mM - EDTA 1mM, chegando-se ao equilíbrio através de trocas sucessivas do tampão. A coluna foi montada mantendo-se a 4°C, através de circulação, de água refrigerada pela jaqueta da coluna de vidro.

O hemolisado total a ser colocado na coluna foi dialisado durante 12 horas a 4°C, em tampão fosfato 10mM, EDTA 1mM pH 6,4. A eluição foi feita no mesmo tampão em gradiente de pH linear entre 6,4 a 8,0. O material eluído foi recolhido em tubos com auxílio de um coletor de frações. A determinação da hemoglobina em cada tubo foi efetuada em 540nm; foram colocados num gráfico, absorbância, em função do volume de cada tubo.

#### 2.1.4 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS COMPONENTES DA HEMOGLOBINA

O comportamento eletroforético das hemoglobinas foi estudado através da eletroforese vertical em gel de amido em câmara, segundo esquema de Smithies (1959) com ligeiras modificações. Para a preparação do gel foi utilizado o amido hidrolisado (Poulik, 1957; Smithies, 1959) e o tampão contendo: Tris- hidroximetil aminometano 30,4mM, EDTA 1,2mM, ácido bórico 4,4mM, KCN 0,01% pH 8,7. Como tampão de corrida, foi utilizado borato na con

centração de 0,36M pH 9,1.

As amostras a serem analisadas foram dialisadas durante 12 horas no mesmo tampão usado para o gel. Minutos antes de serem aplicadas as amostras, foram adicionadas às mesmas 0,01ml de solução de KCN 2% pH 7,0, para conversão das hemoglobinas em cianohemoglobinas.

Aplicou-se então uma diferença de potencial de 7 V/cm durante 6 horas. Decorrido esse tempo o gel foi cortado longitudinalmente em duas partes, uma destas partes foi mergulhada em uma placa contendo: 0,25g de benzidina, 75ml de metanol, 0,5ml de ácido acético glacial, 0,1ml de peróxido de hidrogênio (130 volumes), e cerca de 10mg de nitroprussiato de sódio. A solução de benzidina foi recém-preparada e utilizada com a finalidade de individualizar as hemoglobinas pela sua atividade peroxidásica. Após 10 minutos de coloração, o gel foi lavado com uma solução, contendo: 50ml de éter sulfúrico, 25ml de metanol e 2ml de peróxido de hidrogênio (130 volumes).

A outra metade do gel foi corada com amido Black 10B para proteínas. Esta solução continha: 0,5g de amido black, 50ml de metanol e 10ml de ácido acético. Como descorante foi utilizado solução de ácido acético a 7%.

#### 2.1.5 EQUILÍBRIO ENTRE HEMOGLOBINA E LIGANTES

Para o estudo da afinidade das hemoglobinas com o oxigênio empregou-se o método espectrofotométrico (Antonini e Brunori, 1971). Este baseia-se nas diferenças espectrais entre as formas oxi e desoxihemoglobina, em diferentes comprimentos de onda. Apresenta vantagens sobre o método gasométrico, principalmente pela possibilidade de se construir uma curva de dissociação com grande variação da concentração de proteína, de 0,1 a 100mg/ml.

Geralmente, os estudos de equilíbrio da hemoglobina, são efetuados com o oxigênio como ligante devido não somente ao significado fisiológico, mas, também, devido à facilidade com que a curva de dissociação pode ser determinada. Em termos de equação de Hill, o equilíbrio do oxigênio é descrito como representando a cooperatividade ou não entre a proteína e o ligante.

Na análise espectrofotométrica das curvas de dissociação da hemoglobina, utilizou-se um tonômetro construído segundo as indicações de Riggs, com algumas modificações (Fig. 1), aparelho que se mostrou adequado para estas análises. O tonômetro consiste em um tubo de Thunberg modificado provido de uma cubeta óptica de vidro pyrex de capacidade para 4ml, com 1cm de caminho ótico, acoplada à uma câmara dupla de vidro com capacidade gasosa de aproximadamente 250ml, possuindo uma entrada na câmara menor e uma torneira com três saídas na câmara maior.

Experimentalmente, 2ml das soluções de hemoglobina em tampão fosfato 0,01M na concentração final de 0,7mg/ml, foram introduzidas no tonômetro. No caso do equilíbrio com ATP, a solução

Fig. 1. Tonômetro empregado para o estudo da afinidade da hemoglobina com o oxigênio.

de hemoglobina foi acrescida de ATP na concentração final de 1mM. Para o equilíbrio com a solução de hemoglobina "stripped", as amostras logo após serem deionizadas foram diluídas convenientemente e introduzidas, na cubeta do tonômetro; fazia-se passar nitrogênio gasoso através do aparelho, de forma que todo o oxigênio coordenado à hemoglobina fosse arrastado, e a deoxihemoglobina assim obtida, foi submetida a um banho a 24°C, sob agitação, durante 10 minutos.

O espectro foi registrado em comprimento de onda entre 500 a 600nm, com o auxílio de um espectrofotômetro (Espectrofotômetro Zeiss, modelo DMR 21, acoplado com registrador). Uma vez obtido o espectro da desoxihemoglobina, injetava-se no tonômetro, com o auxílio de uma seringa calibrada, volume conhecido de ar e após equilíbrio térmico a 24°C, registrava-se o espectro. Mais 4 adições de ar foram efetuadas e os respectivos espectros foram obtidos. A última operação consistia em se fazer passar uma corrente contínua de ar através do tonômetro, de forma a se obter completa oxigenação da hemoglobina e o espectro era registrado. Todo este processo foi efetuado para cada pH.

Os cálculos puderam ser realizados partindo-se das leituras das absorbâncias em três comprimentos de onda correspondendo às formas desoxigenadas em 555nm e oxigenadas das hemoglobinas, em 576 e 541 para a série de curvas obtidas. As pressões de oxigênio foram calculadas a partir da equação Boyle-Mariotti para transformações isotérmicas:

$$P_1 V_1 = P_2 V_2$$

onde  $P_1$  é a pressão parcial de oxigênio;  $V_1$  o volume do tonômetro;  $P_2$  a pressão parcial de oxigênio na atmosfera (156mm Hg) e  $V_2$  é o volume gasoso injetado no tonômetro.

Operações semelhantes foram efetuadas no hemolisado total, e no hemolisado "stripped", em presença de tampão fosfato 0,1M; no hemolisado "stripped" + ATP 1 mM e nos 2 componentes mais concentrados, ou seja  $Hb_1$  e  $Hb_2$  em presença de tampão fosfato e ATP 1mM.

#### 2.1.6 ESTUDO SOBRE O EFEITO DE BOHR

O efeito Bohr é determinado experimentalmente por método espectrofotométrico, fazendo-se uma avaliação do parâmetro  $\log P_{50}$  (responsável pela afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ligante) em função do pH, dentro de uma faixa de pH correspondente aos limites fisiológicos.

O estudo da curva de equilíbrio, com o ligante oxigênio, foi efetuado em presença de tampão tris-lactato 0,1M e numa faixa de pH de 6 a 8. Este método também fornece informações a respeito da interação heme-heme (interação homotrópica).

O efeito heterotrópico do ATP sobre as hemoglobinas: Hb<sub>1</sub>, Hb<sub>2</sub> e hemoglobina total, foi estudado através das curvas de equilíbrio com o oxigênio em presença de ATP 1mM, em cada um dos tampões: tris-lactato 0,1M e fosfato 0,1M numa faixa de pH de 6 a 8. Por outro lado, o efeito do fosfato inorgânico, foi estudado através das curvas de equilíbrio com o oxigênio em presença de fosfato 0,1M no tampão tris-lactato 0,1M em intervalo de pH correspondente aos limites fisiológicos.

O efeito Bohr é determinado graficamente, colocando-se em ordenadas os valores de log P<sub>50</sub> e nas abscissas os valores de pH. O coeficiente angular da reta obtida corresponde ao efeito de Bohr.

### 2.1.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS LOG P<sub>50</sub> E DO COEFICIENTE DE HILL(n)

A determinação dos valores dos parâmetros log P<sub>50</sub> e coeficiente de Hill (n), a partir dos dados experimentais de equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio como ligante, foi efetuada com o auxílio de uma calculadora Sharp provida de um programa de quadrados mínimos. Foram fornecidas à calculadora, os valores experimentais das absorvâncias das formas oxí e desoxihemoglobina, nos comprimentos de onda 541, 555 e 576nm, de forma que puderam ser obtidos os valores dos parâmetros log  $\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}$  onde  $\bar{Y}$  representa a fração da hemoglobina ligada ao oxigênio; posteriormente foram

TABELA I

Valores experimentais obtidos a partir da Fig. 2 para o cálculo do  $P_{50}$  e  $n$

Hb	V (AR)	V	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Δ <sub>1</sub>	Δ <sub>2</sub>	Δ <sub>3</sub>	ΣΔ	Y%	$\log \frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}$	log P <sub>O<sub>2</sub></sub>
DEOXI			0,546	0,638	0,528		0,127					
OXI			0,670	0,511	0,669	0,124	0,127	0,141	0,392			
1	20	20	0,570	0,599	0,598	0,024	0,039	0,070	0,133	33,93	-0,2894	1,0119
2	20	40	0,600	0,564	0,615	0,054	0,074	0,087	0,215	54,83	0,0842	1,3217
3	15	55	0,622	0,535	0,630	0,076	0,103	0,102	0,281	71,66	0,4029	1,4599
4	30	85	0,630	0,520	0,627	0,084	0,118	0,109	0,311	79,33	0,5840	1,6488

V<sub>ar</sub> = volume de ar adicionado à desoxihemoglobina (ml);

ΣΔ = somatória de V<sub>ar</sub> (ml);

A<sub>1</sub> = absorvância lida a 577 nm; A<sub>2</sub> = absorvância lida a 560nm; A<sub>3</sub> = absorvância lida a 541 nm;

Δ = diferenças de absorvância entre as formas oxi e desoxihemoglobina;

ΣΔ = somatória das diferenças de absorvância entre as formas oxi e desoxihemoglobina;

Y% = percentagem de saturação;

P<sub>O<sub>2</sub></sub> = pressão parcial de oxigênio

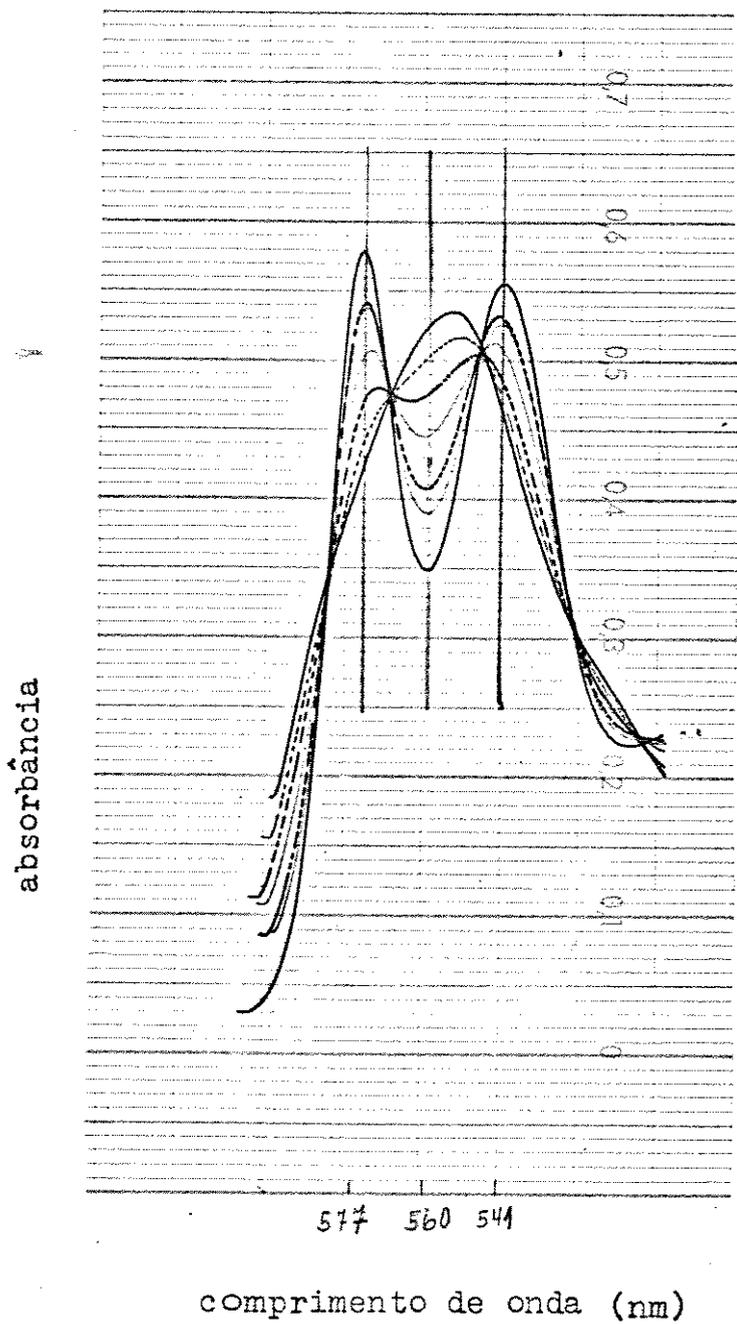


Fig. 2 - Curvas espectrais da hemoglobina em vários graus de oxigenação, em comprimento de onda entre 500 e 600 nm.

fornecidos os valores de  $\log PO_2$  correspondentes aos volumes de ar adicionados ao tonômetro. A relação linear entre  $\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}$  e  $\log PO_2$ , foi estabelecida através da calculadora que mediante o programa de quadrados mínimos, forneceu os valores do coeficiente angular (n) e do  $\log PO_2$  ( $\log P_{50}$ ), quando  $\bar{Y}$  é igual a 0,5 (Y=50%). A tabela I mostra os dados típicos obtidos para o experimento da Fig. 2. E na Fig. 3 estão plotados os valores de  $\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}$  contra  $\log PO_2$  (curva de oxigenação da hemoglobina) para aquele experimento.

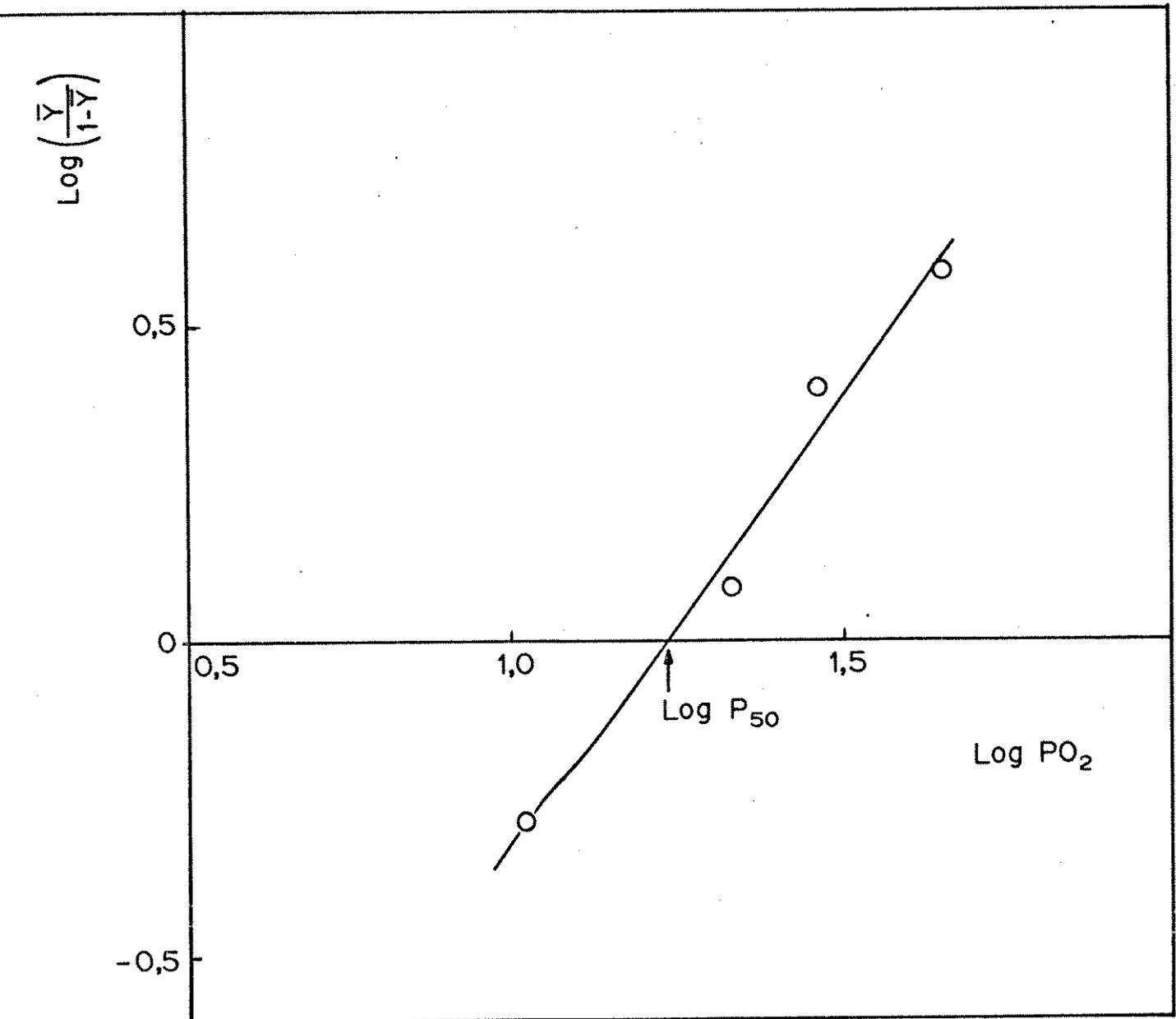


FIG. 3 - Curva da oxigenação da hemoglobina.

### 2.1.8 HEMATÓCRITO E DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A determinação do hematócrito foi efetuada com sangue recém-colhido e sem anticoagulante. As amostras de sangue foram introduzidas em tubos capilares heparinizados, que após serem vedados em uma das extremidades foram submetidas a centrifugação durante 5 minutos a 16000 rpm. O volume de células vermelhas sedimentadas foi expresso em termos de porcentagem por volume de sangue total.

A concentração total de hemoglobina no sangue foi determinada espectrofotometricamente segundo (Antonini e Brunori, 1966), utilizando o coeficiente de oxidação molar do grupo heme da oxihemoglobina humana, no comprimento de onda de 415nm.

Um volume correspondente a 0,1ml de sangue foi diluído adequadamente e em seguida hemolizado em água destilada e em solução 0,1M de carbonato de sódio, efetuando-se a leitura em 415nm. Os cálculos para a determinação total de hemoglobina foram então baseados no coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{415} = 125 \cdot 10^3$ ) do grupo heme da oxihemoglobina humana.

### 2.1.9 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular para as hemoglobinas foi determinado através de cromatografia por exclusão molecular. A amostra foi

aplicada a uma coluna de filtração em gel de Sephadex G-100 (75x5cm), previamente equilibrada com tampão fosfato 10mM e pH6,6, e eluída no mesmo tampão. A concentração de hemoglobina, no eluato, foi então determinada por leitura da absorbância em 415nm.

Considerando que o coeficiente de partição, entre a fase líquida e gel ( $K_{aV}$ ), é determinado pela equação

$$K_{aV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde  $V_e$  é o volume eluente, isto é, o volume de eluição de cada uma das frações cujos valores estão compreendidos entre  $V_o$  e  $V_t$ ;  $V_o$  é o volume total eluído com uma substância, que é completamente excluída do gel e  $V_t$  é o volume total do leito do gel. Conhecendo-se os valores dos coeficientes de partição ( $K_{aV}$ ) para várias substâncias de peso molecular já estabelecidos, pode-se construir uma curva de calibração para a coluna. Foram utilizadas as seguintes substâncias: mioglobina de cavalo (P.M. 16000); dímero de hemoglobina humana (P.M. 32250); tetrâmero de hemoglobina humana (64500) e hexoquinase de levedura (P.M. 102000), cujas  $K_{aV}$  eram, respectivamente, 0,536; 0,420; 0,252 e 0,116.

#### 2.1.10 PREPARAÇÃO DE GLOBINAS

As globinas foram preparadas pelo método descrito por

Rossi-Fonelli e colaboradores (1958), no qual a oxihemoglobina ou ferrihemoglobina são tratadas com acetona gelada ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) contendo 2 a 3ml de HCl 2N por litro. Um volume de 10ml de cada proteína, no caso Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub>, foi adicionada separada e lentamente sob rigorosa agitação, a cerca de 300ml da solução de acetona ácida gelada. As globinas precipitadas foram coletadas em baixa temperatura, lavada 2 vezes, com acetona ácida e então dissolvida em quantidade mínima de água destilada. As proteínas assim dissolvidas foram então dialisadas em baixa temperatura contra solução diluída de bicarbonato de sódio (aproximadamente 100 mg/l). Posteriormente procedeu-se outra diálise contra tampão fosfato 10mM pH 7 a 7,4. As soluções de globinas límpidas de coloração amareladas, na concentração de 1 a 3%, foram dialisadas em água destilada para remoção de fosfato, centrifugadas e posteriormente liofilizadas. Antes porém da liofilização, foram efetuados nos sobrenadantes, testes espectrofotométricos em comprimento de onda de 280 e 260nm, para determinar a concentração das proteínas.

#### 2.1.11 SEPARAÇÃO DE CADEIAS $\alpha$ E $\beta$

Para a análise eletroforética das globinas o método usado foi basicamente descrito por Orstein e Davis (1964) e Osborn e Weber (1969), em gel de poliacrilamida a 10%.

A utilização do gel de poliacrilamida em presença do de

tergente aniônico (SDS), apresentou uma melhor resolução para separação, de proteínas nas suas sub-unidades em função do peso molecular.

As globinas, em concentrações variadas, (0,2 a 0,6mg/ml) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0, 1% de SDS, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 6M de uréia, e incubadas a 37°C, durante 2h. Após a incubação, as soluções de proteínas foram dialisadas durante 16 horas, em temperatura ambiente contra tampão fosfato 0,01M pH 7,0, contendo 0,1% de SDS e 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol. O tampão para a eletroforese foi o mesmo para ambas as cubas, sendo constituído de: 7,8g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 38,6g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2g SDS para o volume de um litro, entretanto diluído 1:1 antes de ser usado.

Na preparação do gel foram utilizadas 3 soluções designadas "A", "B", "C" e EDTA 0,003 g/ml. A solução "A" era constituída de 22,2 g de acrilamida e 0,6g de Bis-acrilamida dissolvida em água destilada para o volume de 100ml. A solução "B", era constituída por 18,5% de tris, 0,4% de TEMED e 24ml de HCl 1N. A solução "C" continha somente persulfato de amônio 1,5%.

O gel foi preparado algumas horas antes de ser iniciada a eletroforese, na proporção de 2ml da solução "A", 2ml da solução "B", 4ml da solução "C" e 0,024mg de EDTA. Seis tubos foram usados na eletroforese sendo colocado 1ml da mistura para cada tubo. Os tubos após a polimerização dos geles foram inseridos na cuba; as amostras, previamente tratadas, em presença de glicerol, foram aplicadas na superfície do gel. Na cuba superior foi adicionado ao

tampão, 0,2ml de azul de bromofenol. Esta solução constituía a frente do corante e era composta de: azul de bromofenol 0,5%, 10ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 para um volume de 100ml.

Manteve-se a intensidade da corrente da ordem de 5mA por tubo, durante 2 horas.

Logo após a eletroforese, os geles foram removidos cuidadosamente dos tubos e colocados na solução de TCA 12,5%, durante 60 minutos, sendo então adicionado sobre eles gotas de comassie blue 0,3%. A coloração foi mantida por 2 horas. Os geles foram, em seguida, descorados com lavagens sucessivas de metanol 14% e ácido acético 7%, até visualização das bandas.

#### 2.1.12 EQUIPAMENTOS

Para as determinações espectrofotométricas e utilizou-se espectrofotômetro Beckman, modelo DU, espectrofotômetro Zeiss, modelo PMQ-II ou modelo DMR 21.

Para os experimentos de equilíbrio de oxigenação foram utilizados dois tonômetros conforme modelo Fig. 1.

Para efetuar os cálculos utilizamos a calculadora eletrônica Sharp, modelo Compet 364-III.

As centrifugações foram feitas em centrífugas Sorval modelo RC-2B e centrífuga Eppendorff 3200.

As pesagens foram efetuadas em balanças Metler, tipo SS

ou Sartorius, tipo 2443.

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

### 2.1.13 REAGENTES

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

Os demais reagentes foram produtos PA de procedência Sigma Mann, Merck, Baker ou equivalente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DAS HEMOGLOBINAS

O hemolisado total foi submetido a cromatografia em coluna de CM-Celulose, para a separação dos componentes da hemoglobina de Rã-pimenta.

Aproximadamente 10ml do hemolisado total, contendo de 30 a 40mg de hemoglobina, por ml., foi cromatografado em resina catiônica. O hemolisado, previamente dialisado contra tampão fosfato 10mM e EDTA 1mM em pH 6,4 foi eluído no mesmo tampão em sistema de gradiente de pH. A Fig. 4 permite-nos observar três picos, cujas proporções eram constantes em diferentes hemolisados de animais adultos individuais, submetidos a este fracionamento. O primeiro, Hb<sub>0</sub>, foi eluído em pH 6,5 e representou 10% do hemolisado total. O segundo, Hb<sub>1</sub>, eluído em pH 6,9, representava 60%, enquanto o terceiro pico, Hb<sub>2</sub>, eluído em pH 7,5, representava os 30% restantes do hemolisado total de eritrócitos de um animal adulto.

#### 3.2. COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO DO HEMOLISADO TOTAL DE ERITRÓCITOS DE RÃ-PIMENTA

O hemolisado total de eritrócitos, recém preparado, foi submetido a eletroforese em gel de amido a 13% e pH 9,1. Antes, porém, foi adicionada pequena quantidade de KCN neutralizada, com a finalidade de evitar polimerização das hemoglobinas. Após um pe-

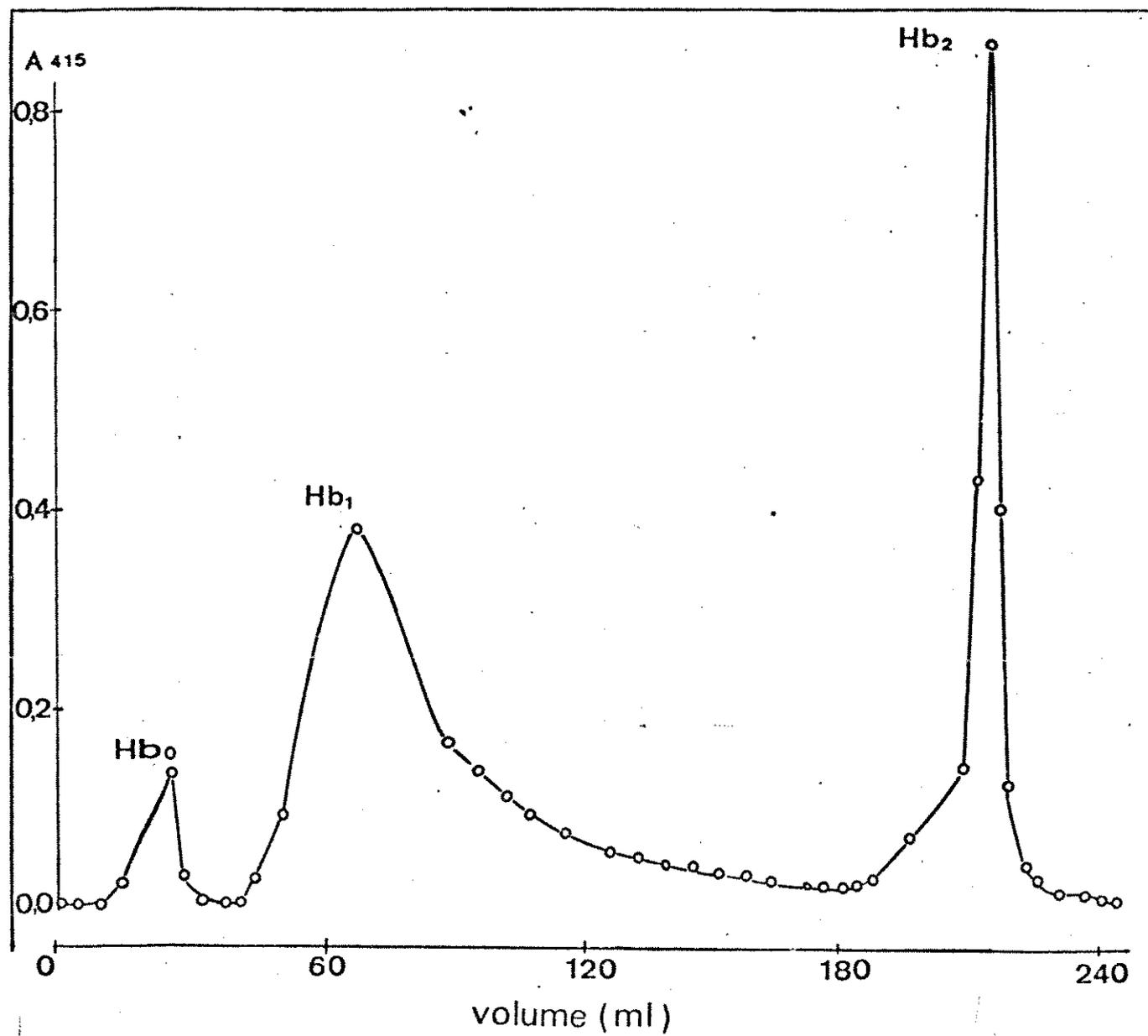


Fig. 4. Cromatografia das hemoglobinas de Rã-pimenta em coluna de CM-celulose, em gradiente de pH

riodo de 6 horas de migração eletroforética, o gel foi cortado longitudinalmente, conforme descrito, observando-se após coloração, a presença de três bandas diferentes, conforme a Fig. 5a. De acordo com a mobilidade anódica decrescente, estas bandas foram designadas como componentes  $Hb_0$ ,  $Hb_1$ ,  $Hb_2$ .

Após a separação dos componentes por cromatografia em CMC, foi feita nova eletroforese nas mesmas condições anteriores e os resultados mostram (Fig. 5b) que  $Hb_1$  apresenta só uma banda correspondente à proteína mais anódica e  $Hb_2$  também uma só banda com menor mobilidade eletroforética no gel de amido.

Em virtude de a hemoglobina designada de  $Hb_0$  apresentar-se em pequena quantidade, no hemolisado, cerca de apenas 10%, não foi possível realizar qualquer estudo funcional.

### 3.3 PROPRIEDADES DE OXIGENAÇÃO DA HEMOGLOBINA DE RÃ-PIMENTA NO HEMOLISADO TOTAL

O efeito Bohr na hemoglobina de Rã-pimenta, foi estudado com o hemolisado "stripped" em presença de tris-lactato 0,1M, hemolisado total em presença de fosfato 0,1M, hemolisado "stripped" com ATP 1 mM na presença de tampão tris-lactato 0,1M e na presença de tampão fosfato 0,1M. Os dados de ligação da hemoglobina com o oxigênio foram representados graficamente, colocando em um sistema de coordenadas cartesianas, os valores de  $\log \bar{Y}/(1-\bar{Y})$  em ordena

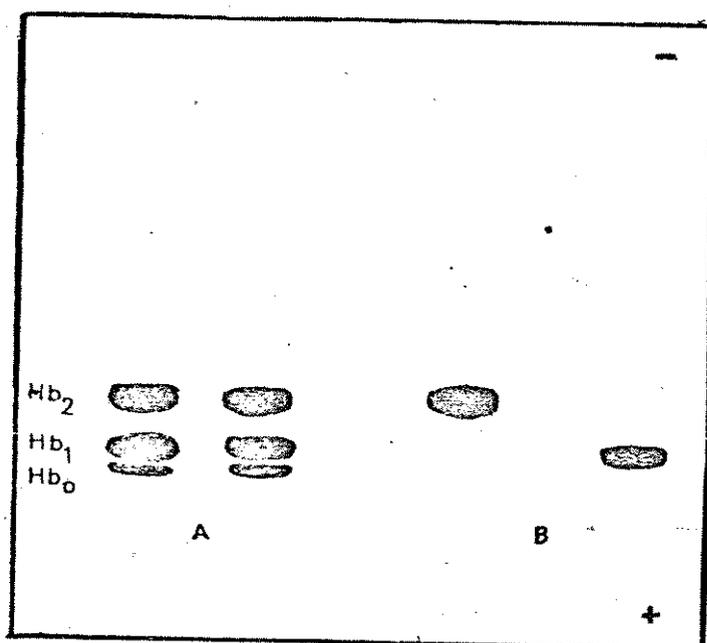


Fig. 5. A - Separação eletroforética em gel de amido do hemolisado total de Rã-pimenta.

B - Eletroforese em gel de amido dos componentes Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> separados por cromatografia em CM-celulose.

das e  $\log P_{O_2}$  nas abscissas. A afinidade pelo ligante, neste gráfico, é medida pelo valor de  $\log P_{50}$  ou seja, o log da concentração do ligante livre que corresponde à metade da saturação da hemoglobina ( $Y=0,5$ ), portanto  $(\bar{Y}/(1-\bar{Y}))=1$ .

A tabela II e Fig. 6, mostram que no hemolisado "stripped" da hemoglobina de Rã-pimenta, a curva de saturação da hemoglobina pelo  $O_2$  não depende da concentração dos íons hidrogênio. O efeito Bohr foi próximo de zero, sendo considerado inexistente.

Quando expressamos a grandeza do efeito de  $-0,07$  entre pH 7 e 8, calculando através dos valores de  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  cujos dados estão na tabela II.

O valor do coeficiente de Hill,  $n$ , que é relativo ao grau de interação entre sítios de ligação, estudado no intervalo de pH entre 6,0 e 8,05, variam de 1,42 a 2,14. Os valores de  $n$  chegaram a 2,0 em pH 7,5 indicando uma interação heme-heme positiva.

### 3.4 EFEITO DO FOSFATO INORGÂNICO SOBRE A HEMOGLOBINA DE RÃ-PIMENTA

No hemolisado total, e "stripped", foi estudado o efeito Bohr em presença de fosfato de sódio 0,1M. A grandeza deste efeito, entre pH 7 e 8, foi da ordem de  $-0,19$  para o hemolisado "stripped" e de  $-0,22$  para o hemolisado total. Estes resultados foram

TABELA II

Efeito Bohr e interação heme-heme no hemolisado "stripped" de eritrócitos de Rã-pimenta, em presença de tampão tris-lactato 0,1 M.

pH	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n
6,0	0,9562	9,04	1,53
6,4	1,0179	10,42	1,89
6,5	0,9465	8,84	1,78
6,8	0,9528	8,97	1,58
7,0	0,9899	9,77	1,42
7,5	0,9795	9,54	2,01
7,65	0,9809	9,57	2,08
7,8	1,0039	10,09	2,14
8,05	0,8949	7,85	1,85

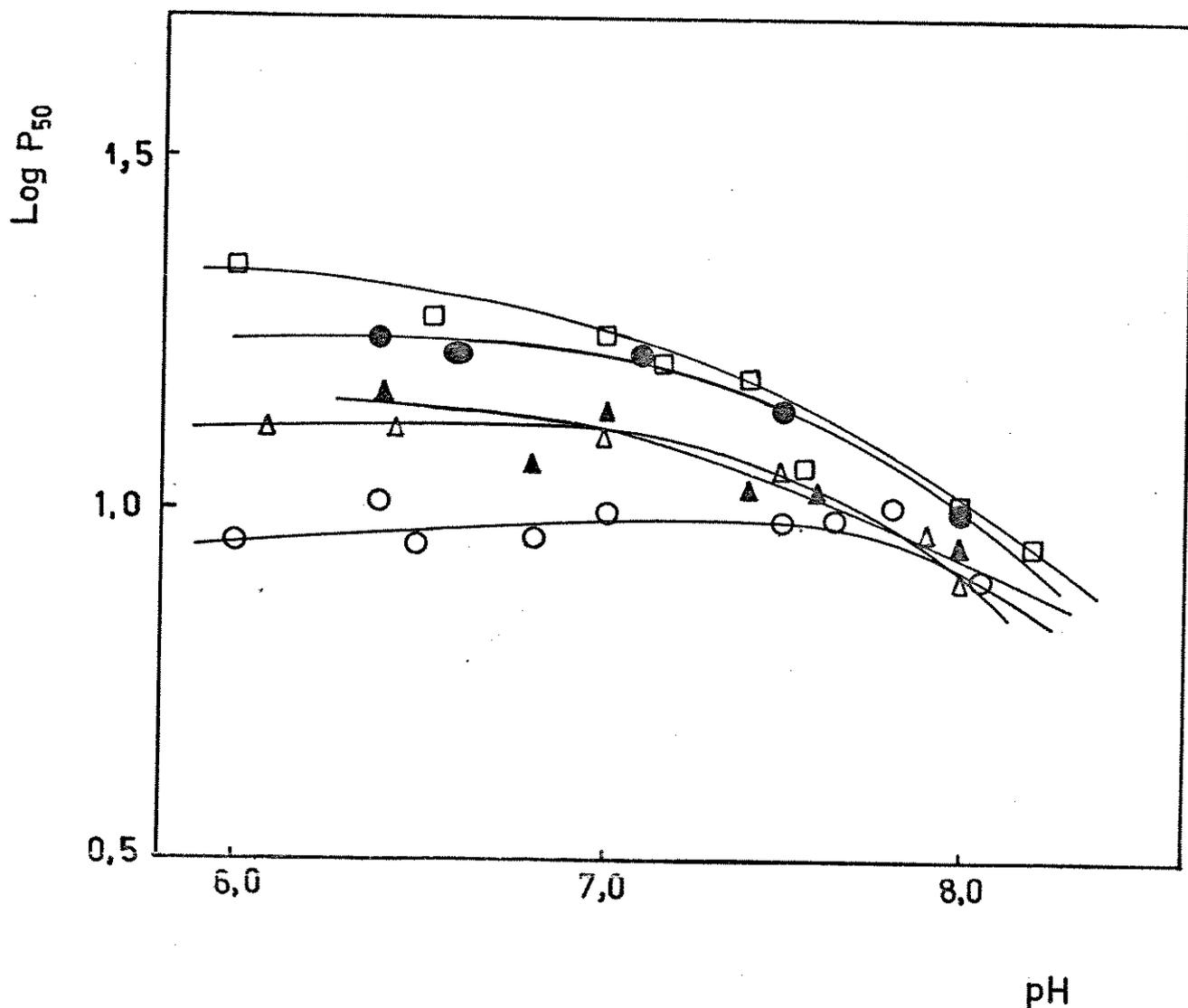


Fig. 6. Efeito Bohr do hemolisado total em presença de: (○) "stripped" tampão tris-lactato 0,1M; (●) tampão fosfato de sódio 0,1M; (▲) "stripped" tampão fosfato de sódio 0,1M; (△) "stripped" tampão tris-lactato 0,1M com ATP 1mM; (□) "stripped" tampão fosfato de sódio 0,1M com ATP 1mM.

obtidos através de dados da tabela III plotadas na Fig. 6.

Os valores de "n" (coeficiente de Hill) no hemolisado "stripped", variam de 1,10 a 1,72, apresentando o valor máximo correspondente ao grau máximo de interação heme-heme, em pH 6,8. Enquanto que o valor máximo observado para  $P_{50}$  foi de 13,88 mmHg, registrado em pH 7,0. Para o hemolisado total, tanto o coeficiente de Hill (n) como o  $P_{50}$  apresentaram valores máximos em pH 6,4, da ordem de 2,15 e 17,36mm Hg respectivamente.

### 3.5. EFEITO DO ATP SOBRE A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA DE RÃ-PIMENTA

Entre os fosfatos que contribuem significativamente para modificar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, estudamos o efeito do ATP. Quando o hemolisado "stripped" estava em presença de ATP 1mM, a grandeza do efeito Bohr foi da ordem de -0,22 (Fig. 6). Por outro lado, quando este estudo era efetuado em tampão fosfato de sódio 0,1M, o efeito Bohr apresentava uma pequena variação, isto é, da ordem de -0,24. O coeficiente de Hill (n) apresentou um valor máximo da ordem de 1,65 em pH 7,5, revelando uma interação heme-heme positiva.

Na Fig. 7 é apresentado um gráfico da percentagem de saturação da hemoglobina pelo oxigênio (%Y) versus a pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), onde se observa um deslocamento da curva para a direita, revelando uma diminuição da afinidade da hemoglobina pelo

TABELA III

Efeito Bohr e interação heme-heme no hemolizado total e stripped em presença e ausência de fosfato de sódio 0,1M e em presença e ausência de ATP 0,1M

pH	stripped tris-lac- tato 0,1M.			tampão fosfato 0,1M.			stripped fosfato 0,1M.			stripped (tris-lacta- to 0,1M) ATP 1mM.			stripped (fosfato 0,1M) ATP 1mM		
	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n
6,0	0,9562	9,04	1,53										1,3414	21,95	2,39
6,1							1,1106	12,90	1,20						
6,3										1,2007	15,85	1,45			
6,4	1,0179	10,42	1,89	1,2395	17,36	2,15									
6,45							1,1139	13,00	1,52						
6,5	0,9465	8,84	1,78										1,2702	18,63	1,72
6,55															
6,6				1,2167	16,47	1,73									
6,8	0,9528	8,97	1,58				1,0671	11,67	1,72						
7,0	0,9899	9,77	1,42				1,1424	13,88	1,38	1,1232	13,28	1,40	1,2400	17,38	2,22
7,1				1,2225	16,69	1,42									
7,15															
7,4							1,0233	10,55	1,31				1,2109	16,25	1,81
7,5	0,9795	9,54	2,01	1,1440	13,93	1,76				1,0538	11,32	1,65	1,1816	15,19	2,09
7,55													1,0565	11,39	2,02
7,6							1,0249	10,59	1,39						
7,65	0,9809	9,57	2,08												
7,8	1,0039	10,09	2,14												
7,9															
8,0				0,9997	9,97	1,86				0,9628	9,18	1,36			
8,05	0,8960	7,87	1,85				0,9435	8,78	1,39	0,8982	7,91	1,51	0,9890	9,75	1,59
8,2													0,9445	8,80	1,89

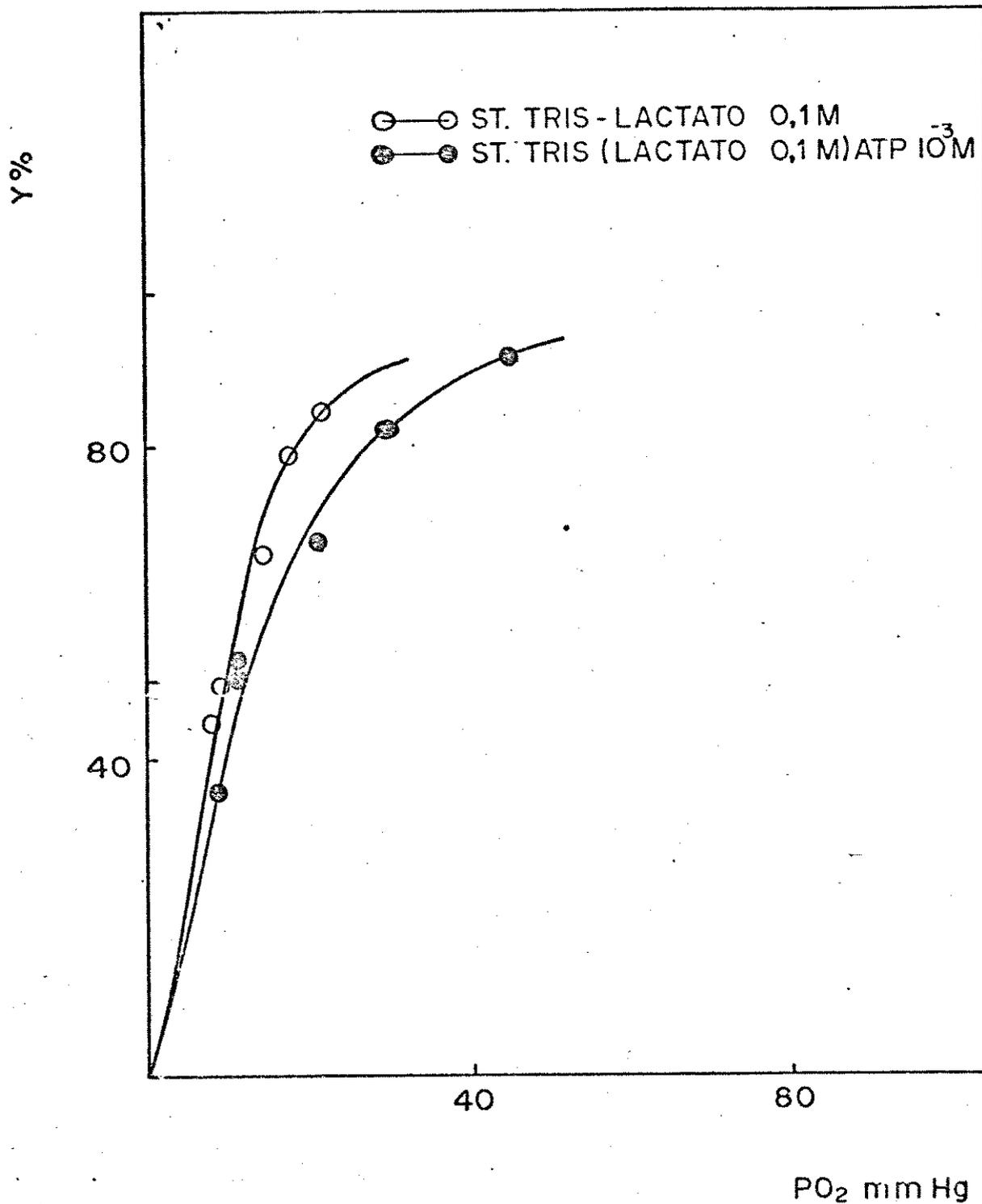


Fig. 7. Efeito do ATP no hemolisado "stripped" de R̄-pimenta

oxigênio causada pelo ATP.

### 3.6 EFEITO BOHR E INTERAÇÃO HEME-HEME NO COMPONENTE Hb<sub>1</sub> DE RÃ-PIMENTA

O componente Hb<sub>1</sub> que representou 60% do hemolisado total, apresentou, na curva de equilíbrio com o oxigênio quando ausente de moléculas e íons menores, em presença de tampão tris, da ordem de -0,05, muito baixo, portanto. Entretanto, os valores obtidos para o coeficiente de Hill (n), chegaram a variar de 1,54 a 2,55 entre valores de pH 6,0 e 8,05, indicando um efeito altamente cooperativo entre os grupos heme. Verificando estes dados na tabela IV, e Fig. 8, encontramos inclusive que o efeito Bohr, em presença de fosfato de sódio 0,1M, foi da ordem de -0,14. O coeficiente de Hill indicou uma união cooperativa positiva também em pH alcalino, precisamente em pH 7,5 o valor deste coeficiente foi de 2,27. Em "stripped", este componente com ATP 1mM, apresentou entre pH 7 e 8, um efeito Bohr da ordem de -0,15, enquanto que o coeficiente de Hill apresentou seu valor máximo (2,14), em pH 6,3. A tabela IV mostra estes resultados.

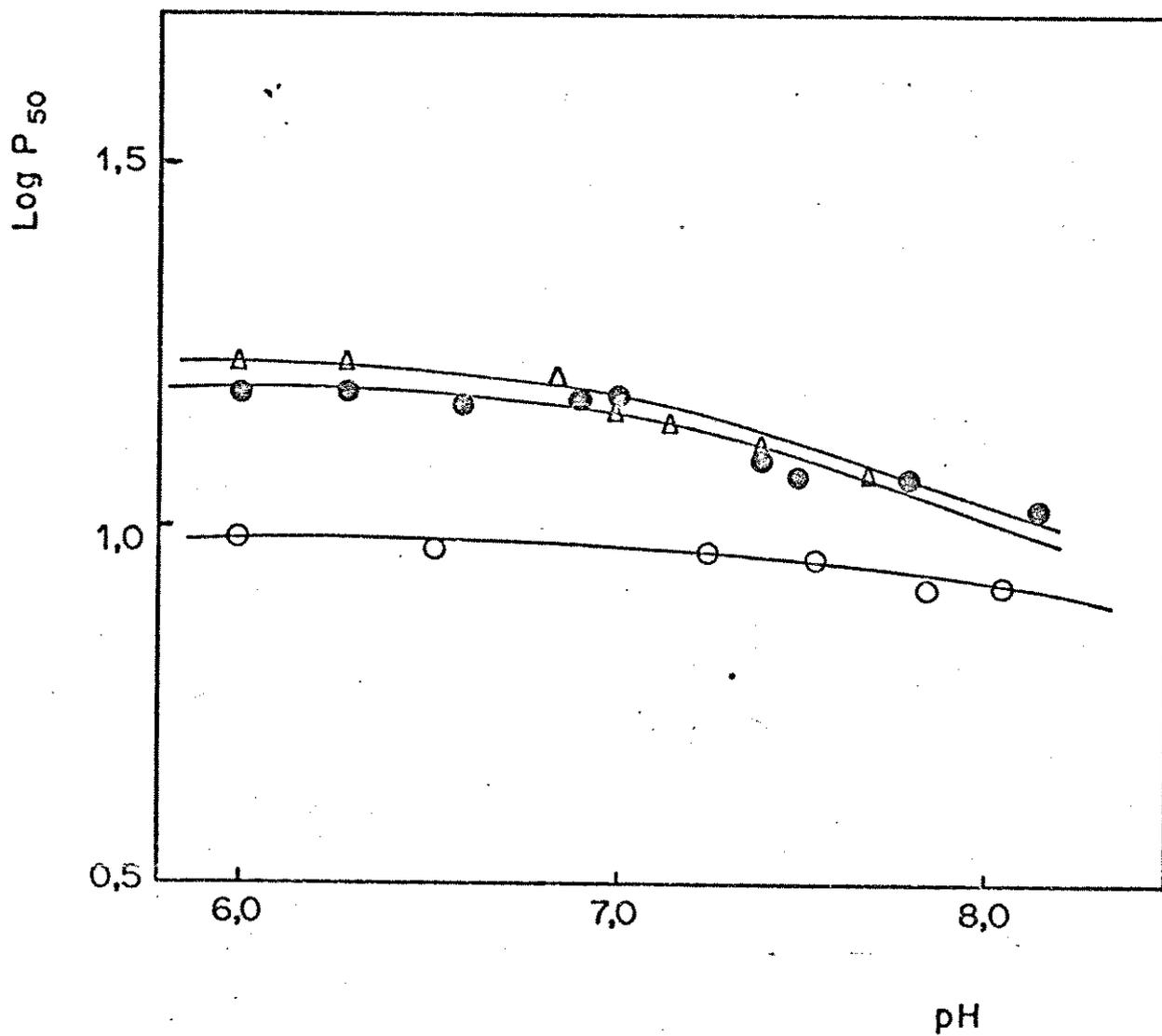


Fig. 8. Efeito Bohr do componente Hb<sub>1</sub> da hemoglobina de Rã-pimenta: "stripped" tampão tris-lactato 0,1M (○); "stripped" tampão tris-lactato 0,1M com ATP 1mM (Δ) e tampão fosfato 0,1M (●).

TABELA IV

Efeito Bohr e interação heme-heme para o componente Hb<sub>1</sub>

stripped tris-lactato 0,1 M.				tampão fosfato de sódio 0,1 M			stripped (tris-lactato 0,1M) ATP 1mM		
pH	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n
6,0	0,9727	9,39	1,94	1,1697	14,78	1,62	1,2119	16,29	1,64
6,3				1,1804	15,15	1,52	1,2214	16,65	2,14
6,55	0,9628	9,18	2,19						
6,62				1,1535	14,24	1,63			
6,85							1,1976	15,76	1,74
6,90				1,1741	14,93	1,97			
6,95	1,0048	10,11	1,67						
7,0				1,1767	15,02	1,68	1,1553	14,30	1,58
7,15							1,1471	14,03	2,05
7,25	0,9581	9,08							
7,4				1,0777	11,96	1,57	1,0864	12,20	1,52
7,5				1,0622	11,54	2,27			
7,55	0,9479	8,87	1,54						
7,7							1,0577	11,42	1,98
7,8				1,0577	11,42	1,93			
7,85	0,9079	8,09	2,55						
8,05	0,9106	8,14	1,89						
8,15				1,0224	10,53	1,44			

### 3.7 EFEITO DO pH E INTERAÇÃO HEME-HEME PARA O COMPONENTE Hb<sub>2</sub> NA CURVA DE EQUILÍBRIO COM LIGANTES

Pela Fig. 9 podemos observar que o componente Hb<sub>2</sub> correspondente a 30% do hemolisado total de Rã-pimenta, apresentou um efeito Bohr, entre pH 7 e 8, da ordem de -0,17, com "n" variando desde 1,35 a 1,57, em presença de stripped tris-lactato 0,1M revelando um efeito cooperativo positivo e apresentando seu valor máximo em pH 7,6, conforme tabela V.

Quando em presença de ATP, o efeito Bohr apresentou um valor de -0,26, correspondendo ao maior valor encontrado, para este efeito, entre todos os componentes. Os valores de "n" para este componente em presença de ATP, variaram de 1,26 a 2,32, apresentando a melhor condição para interação heme-heme em pH 7,05. Em tampão fosfato de sódio 0,1M, os valores de "n" oscilaram entre 1,45 a 1,89, sendo que em pH 7,2 é que observou-se o seu valor máximo.

### 3.8. DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINA E HEMATÓCRITO

As determinações de dosagens de hemoglobina e hematócrito foram sempre efetuadas cada vez que um animal era sacrificado. Utilizando-se o coeficiente de extinção milimolar do heme da hemoglobina humana em comprimento de onda de 415nm, a concentração de hemoglobina para a Rã-pimenta apresentou um resultado de 9g%.

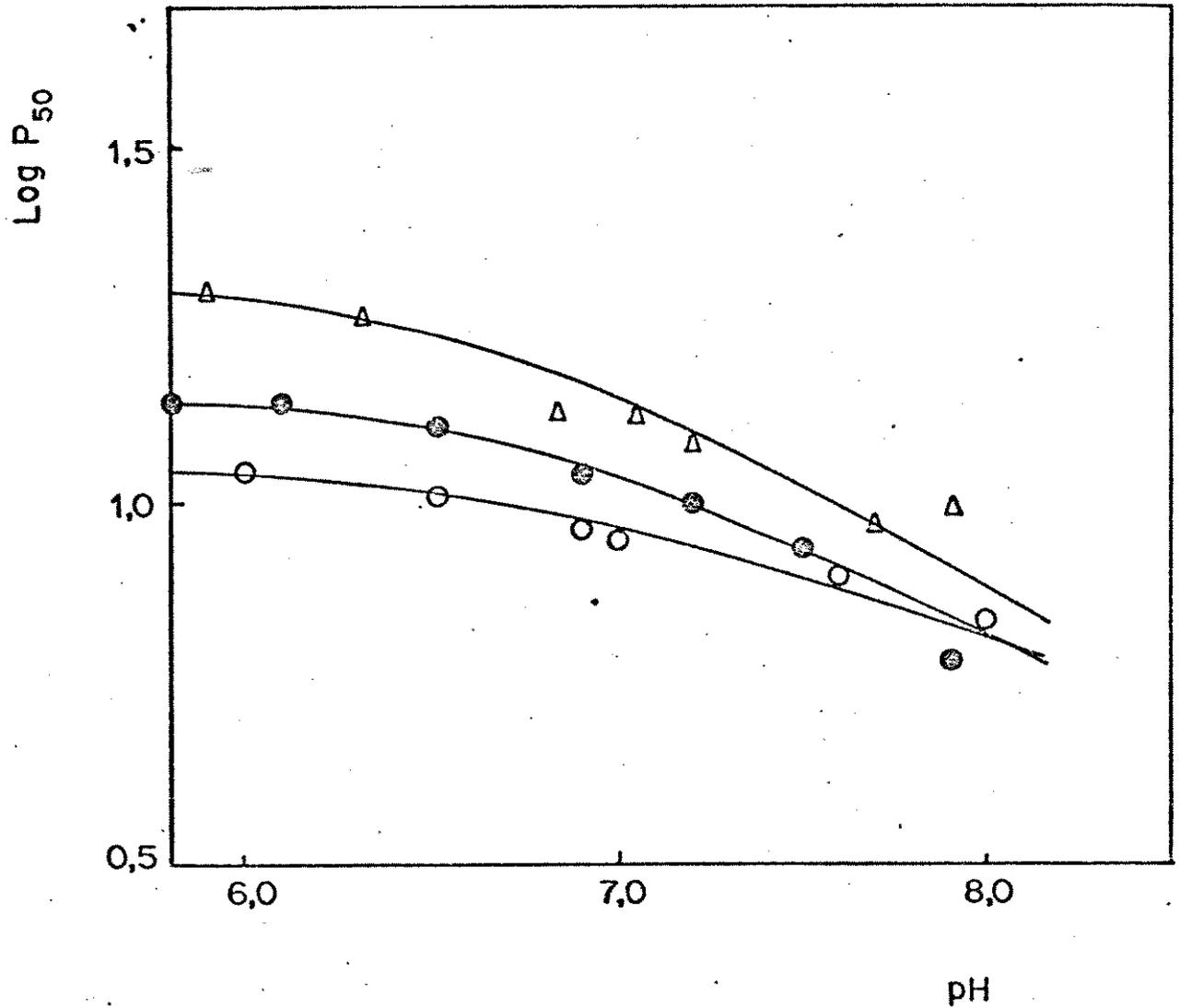


Fig. 9. Efeito Bohr do componente Hb<sub>2</sub> da hemoglobina de Rã-pimenta: "stripped" tampão tris-lactato 0,1M (O); "stripped" tampão tris-lactato 0,1M com ATP 1mM (Δ) e tampão fosfato 0,1M (●).

TABELA V

Efeito Bohr e interação heme-heme para o componente Hb<sub>2</sub>.

pH	stripped tris-lactato 0,1 M.			stripped (tris-lactato 0,1M) ATP 1mM.			tampão fosfato de sódio 0,1M.		
	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>	n
5,8							1,1443	13,94	1,61
5,9				1,2958	19,76	1,51			
6,0	1,0461	11,12	1,50						
6,1							1,1374	13,72	1,68
6,33				1,2577	18,10	1,79			
6,5	1,0120	10,28	1,35				1,1055	12,75	1,75
6,83				1,1255	13,35	1,85			
6,9	0,9680	9,29	1,44				1,0406	10,98	1,17
7,0	0,9533	8,98	1,48						
7,05				1,1199	13,18	2,32			
7,2				1,0799	12,02	2,11	1,0077	10,18	1,89
7,5							0,9345	8,60	1,71
7,6	0,9053	8,04	1,57						
7,71				0,9666	9,26	1,61			
7,9							0,7789	6,01	1,45
7,91				0,9978	9,95	1,26			
8,0	0,8338	6,82	1,38						

Para a determinação do hematócrito, o sangue recém coletado, foi centrifugado em tubo capilar conforme descrito anteriormente. O resultado obtido corresponde a um volume de 24% das células vermelhas sedimentadas. Para ambas avaliações foram efetuadas várias determinações paralelas, observando-se sempre os mesmos resultados.

### 3.9 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Como podemos observar na Fig. 10, a hemoglobina de Rã-pimenta apresenta um único volume de exclusão, correspondente a 650ml, que proporciona um peso molecular da ordem de 64.500. Foram utilizados como padrões referenciais: hemoglobina humana, miglobina de baleia, etc. conforme descrito anteriormente, podendo ser observado na Fig. 11. Os valores, acima citados, correspondem a um  $K_{av}$  da ordem de 0,286, indicando portanto a presença de hemoglobinas homogêneas. Assim sendo, podemos nos certificar que as hemoglobinas não se encontram dissociadas, ou polimerizadas.

### 3.10 SEPARAÇÃO DAS CADEIAS $\alpha$ E $\beta$

Com o objetivo de efetuar a separação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$

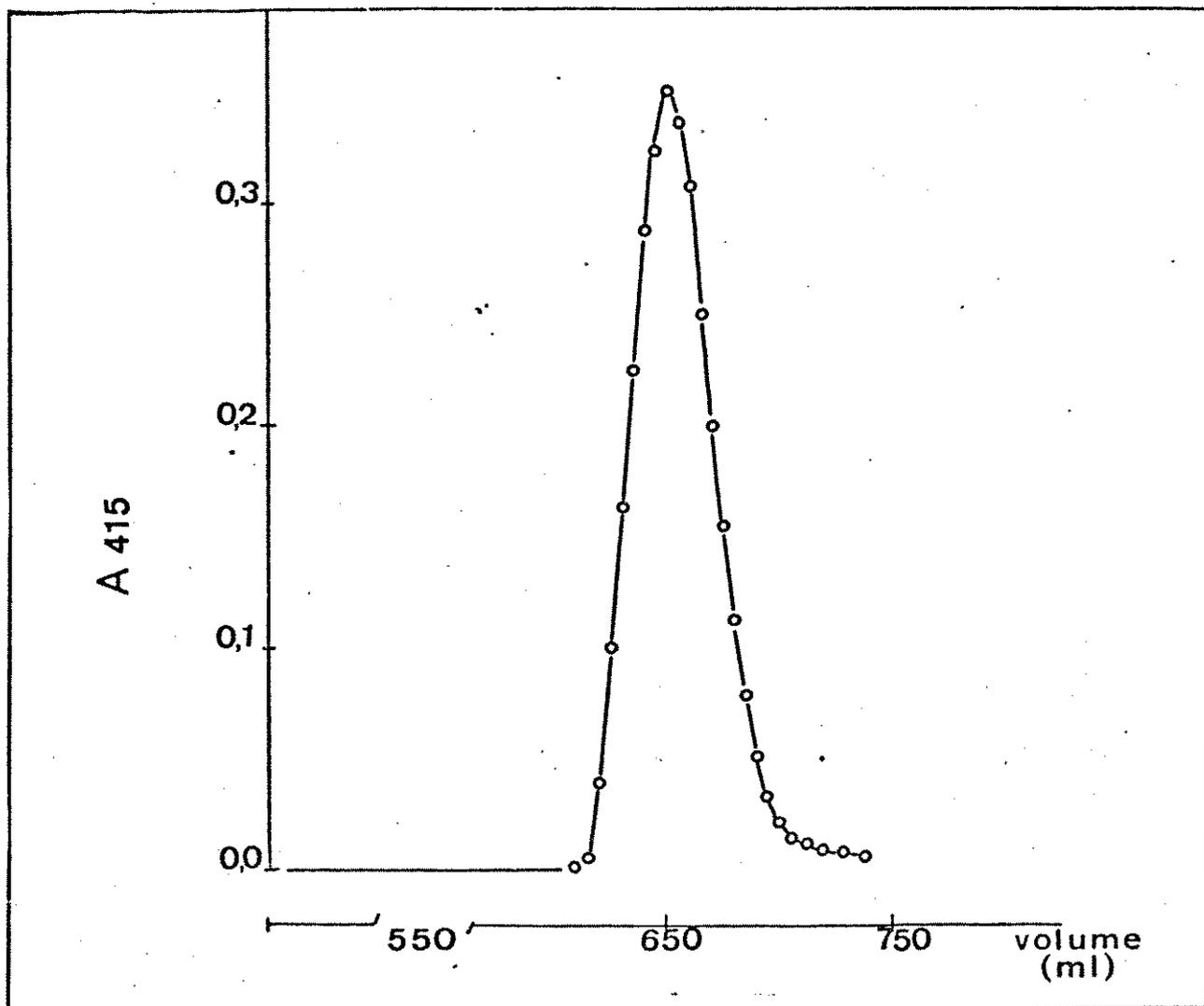


Fig. 10. Cromatografia da hemoglobina de Rã-pimenta em coluna de Sephadex G-100 (75 x 5cm).

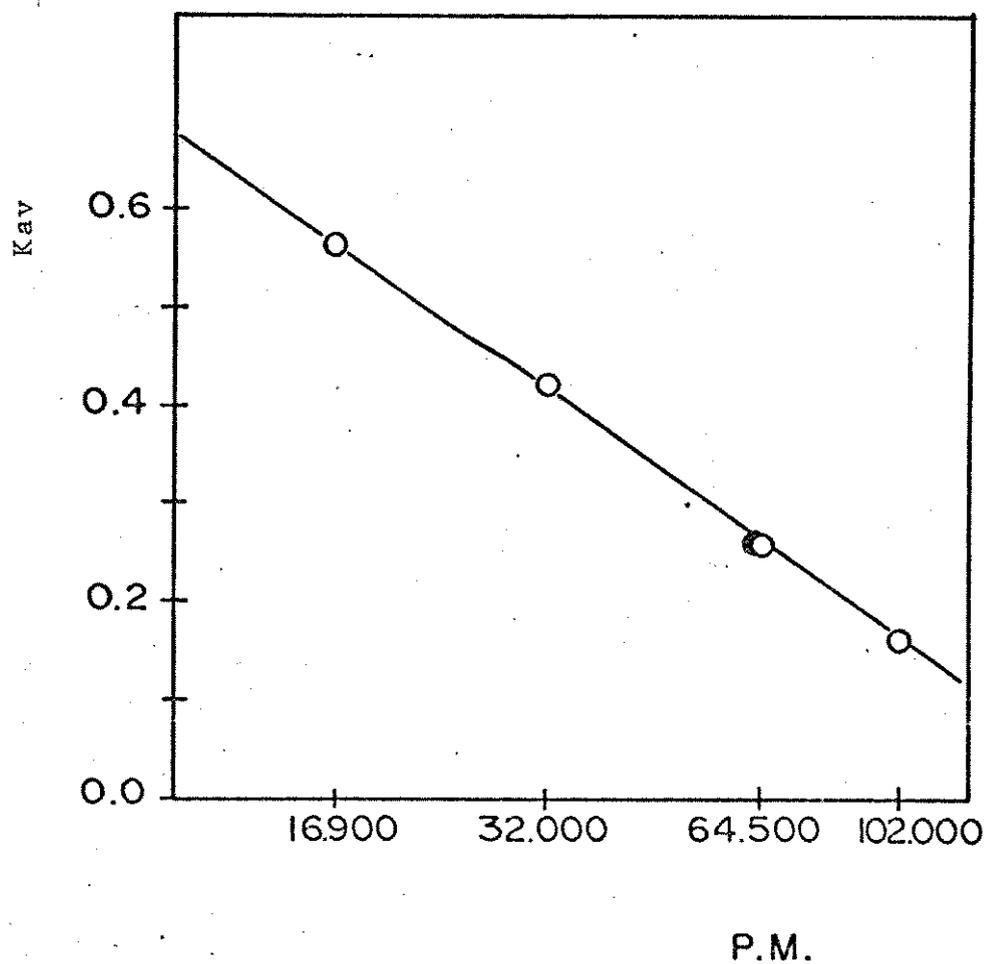


Fig. 11. Curva padrão em coluna de sephadex G.100, calibrada com os padrões: Blue dextran 2.000.000; he-  
xoquinase 102.000; hemoglobina 64.500; mioglobi-  
na 16.900; dímero de hemoglobina humana 32.250;  
hemoglobina de L. labyrinthicus 64.500.

das globinas dos componentes de Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> várias tentativas foram realizadas para chegarmos a obter resultados satisfatórios. Experimentalmente, chegamos a uma nítida separação das cadeias quando usamos as técnicas descritas por Ornstein (1964) e Osborn (1969), embora com modificações no gel de poliacrilamida a 10%.

As globinas correspondentes aos componentes Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> da hemoglobina de Rã-pimenta, após serem incubadas, foram dialisadas nas condições já descritas (Osborn 1969) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Cuidadosamente aplicadas em um único gel de poliacrilamida, as globinas foram submetidas a um campo elétrico de 5mA por tubo, durante duas horas. Após eletroforese, as frações Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> apresentaram duas bandas cada uma. Quando misturadas, as duas frações apresentaram apenas três bandas, como podemos observar na Fig. 12. As bandas correspondentes às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de cada fração migraram diferentemente. Na fração Hb<sub>1</sub> a banda correspondente à cadeia  $\alpha$  apresentou maior migração que aquela da fração Hb<sub>2</sub>, sendo portanto, a cadeia  $\alpha$  da Hb<sub>1</sub> de maior mobilidade anódica. A segunda banda das frações Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> correspondendo à cadeia  $\beta$ , também apresentaram mobilidades diferentes. A cadeia  $\beta$  da Hb<sub>1</sub>, migrou um pouco mais para o polo positivo.

Nos tubos referentes às misturas (Hb<sub>1</sub> + Hb<sub>2</sub>), observou-se que as duas primeiras bandas correspondentes às duas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , apresentaram mobilidades equivalentes àquelas das frações Hb<sub>1</sub> e

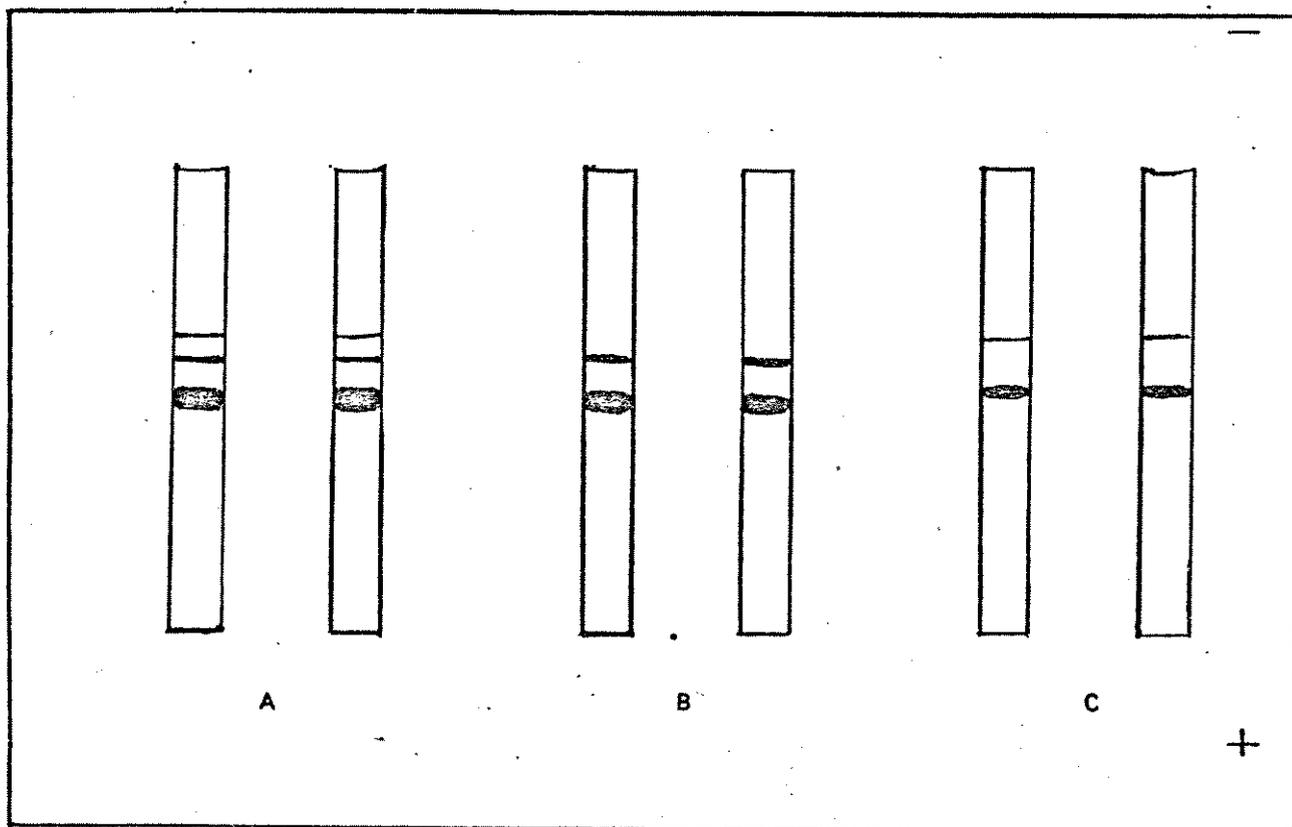


Fig. 12. Perfil Eletroforético da separação de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  em gel de poliacrilamida.

A - mistura das globinas.

B - cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das globinas correspondentes à Hemoglobina  $Hb_1$ .

C - cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das globinas correspondentes à Hemoglobina  $Hb_2$ .

e  $Hb_2$ . A terceira banda apresentou-se maior, acreditando-se que sejam as duas cadeias  $\beta$  associadas, uma vez que  $\beta_1$  e  $\beta_2$  apresentou praticamente a mesma mobilidade.

## 4. DISCUSSÃO

Estudos comparativos entre hemoglobinas de anfíbios tem se revelado muito úteis na elucidação de adaptações moleculares destas proteínas de acordo com o meio ambiente em que vivem os animais. Dentre os anfíbios há espécies muito terrestres e muito aquáticas com outras intermediárias e mesmo numa mesma espécie há fases de vida aquática (girinos) e terrestres (adultos). Desta forma as propriedades funcionais da hemoglobina devem estar adaptadas para cada uma destas situações e partindo-se da premissa que variações estruturais devem estar envolvidas nas variações funcionais e relação estrutura-função poderá ser delineada por estes estudos.

O fato das hemoglobinas destes e outros animais se apresentarem em formas múltiplas, pode parecer à primeira vista adaptações moleculares na proteína respiratória para exercer as funções em diferentes condições relacionadas com habitat. Contudo, o achado comum de grupos tióis acessíveis, por exemplo, poderia explicar esta multiplicidade de formas através de associação, dissociação moleculares, e um número alto de componentes poderia ser devido a hibridização molecular. É muito difícil decidir, pois, sobre multiplicidade de formas das hemoglobinas.

Em nosso estudo com Leptodactylus labyrinthicus anfíbio de habitat semi-aquático, através de técnicas de eletroforese e

cromatografia, encontramos multiplicidade de hemoglobinas. Os três componentes por nós caracterizados, apresentaram no seu conjunto mobilidade anódica maior que outras espécies do mesmo gênero caracterizadas também em eletroforese de gel de amido por Dessauer, Fox e Ramirez (1957). A variação no número de componentes em anfíbios está ainda concordante com várias observações na literatura (Dessauer, Fox e Ramirez, 1957). Assim, Meirelles, Ogo e Focesi (1976), em seus estudos com Pipa carvalhoi, anfíbio de habitat aquático, caracterizaram nas mesmas condições eletroforéticas, a presença de quatro componentes no hemolisado total. Baglioni e Sparks (1963) identificaram em girinos Rana catesbeiana, anfíbio de habitat terrestre, três componentes de hemoglobina por eletroforese em gel de amido, e concluíram que os hemolisados de girino não apresentaram os mesmos componentes que os do animal adulto.

A identificação do número de componentes de hemoglobinas, parece apresentar certa importância quando se deseja efetuar um estudo comparativo, desde que critérios sejam estabelecidos como: i) definição sistemática das espécies; ii) fase evolucionária; iii) o tratamento adequado das amostras, tais como, as condições de tamponamento a fim de se evitar principalmente a redução de pontes de dissulfeto que poderiam ser responsáveis por grandes modificações nas propriedades eletroforéticas como discutido, Riggs (1964), Trader, Wortham e Frieden (1963).

Outro aspecto interessante seria a possibilidade da mesma proteína se apresentar em múltiplas formas como discutido inclu

sive como dímeros, octâmeros, etc. Em nossos estudos com hemoglobina de L. labyrinthicus, constatamos a presença exclusiva da forma tetramérica com peso molecular por volta de 64.000 daltons. Estes resultados são compatíveis com aqueles obtidos para várias espécies adultas, tais como, Rana catesbeiana, R. grylio, R. pipens e T. temporaria, cujo peso molecular é cerca de 68.000 (Tentori, Vivaldi, Carta, Salvati, Sorcini e Velani, 1965).

Análises das alterações alostérica em hemoglobinas torna possível avaliar a influência de diferentes efetores na regulação das propriedades funcionais das diferentes hemoglobinas. O efeito regulador proporcionado por vários ânions tem sido investigado por muitos pesquisadores. Os fosfatos orgânicos, em particular, são conhecidos atualmente como importantes moduladores da função da hemoglobina (Benesch e Benesch, 1974). Esses efetores alostéricos diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio se ligando preferencialmente à conformação desoxigenada. No estudo de hemoglobinas de todos os vertebrados três tipos de fosfatos orgânicos têm sido considerados como estando presentes nos glóbulos vermelhos: DPG, ATP, IHP. Todos eles diminuem a afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio, e presumivelmente apresentam o mesmo mecanismo molecular de ação (Benesch e Benesch, 1974).

Analisando-se os resultados dos estudos de propriedades funcionais das hemoglobinas verificamos que a afinidade pelo oxigênio apresentada pelo hemolisado de L. labyrinthicus, em termos de pressão parcial de oxigênio para meia saturação ( $P_{50}$ ), em pH

7,0, apresenta para o hemolisado "stripped", um valor de 9,7mm Hg (tabela III). Quando a amostra, nas mesmas condições (Fig. 6), foi tratada por ATP em concentração saturante (1 mM), houve um acrêscimo no valor de  $P_{50}$  (13,28 mmHg), não tão significante como o observado em outras espécies (Meirelles, Ogo e Focesi)(1976). E, em presença de fosfato inorgânico, o valor de  $P_{50}$ , atingiu níveis ligeiramente superiores a 13,88 mmHg, mostrando um efeito heterotrópico positivo, efeito este que se acentua por ATP.

Outro parâmetro considerado em estudos comparativos de hemoglobinas é o efeito Bohr. Mais especificamente em hemoglobinas de mamíferos, tem-se investigado com maior intensidade este efeito, que consiste na variação da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em função da variação de pH. Consideram-se 2 tipos de efeito Bohr: um alcalino, normal expresso como  $-\Delta H$  (variação do conteúdo de prótons pela hemoglobina quando esta se liga ao oxigênio) e outro ácido ( $+\Delta H$ ) ou efeito Bohr reverso. No primeiro, grupos imidazóis da histidina próxima participam efetivamente, enquanto que no reverso aminoácidos carboxila terminal tem participação maior. Os nossos achados mostram que os valores do efeito Bohr entre pH 7 e 8 encontrados foram -0,07 e -0,22 (Fig. 6), respectivamente, para o hemolisado total "stripped" e na presença de ATP. A avaliação deste efeito para o componente 1 ( $Hb_1$ ) que se encontra na proporção de 60% do hemolisado, apresentou, nas mesmas condições experimentais descritas, valores de -0,05 e -0,15 respectivamente, enquanto que para o componente 2 ( $Hb_2$ ) que corresponde a 30% do hemo

lisado, este efeito foi de  $-0,17$  e  $-0,26$ . Os dados obtidos com os componentes  $Hb_1$  e  $Hb_2$  na forma "stripped"  $-0,05$  e  $-0,17$  comparados com aqueles do hemolisado total  $-0,07$  levam a conclusão óbvia que é o componente  $Hb_1$  que contribue mais para o efeito final do hemolisado total "stripped". Na presença do fosfato orgânico,  $Hb_1$  mostra um aumento de cerca de três vezes nos valores do efeito Bohr enquanto que para  $Hb_2$  a resposta no efeito Bohr é de apenas cerca de  $0,05$  que mostra mais uma vez a participação efetiva de  $Hb_1$  no hemolisado total. Lançando mão de dados oriundos da literatura para as hemoglobinas de Pipa carvalhoi, (Meirelles, 1976), observamos que os resultados concernentes ao efeito Bohr são da ordem de  $-0,06$  ("stripped") e de  $-0,46$  (com ATP); enquanto que dados relatados para a Rana catesbeiana, (Riggs, 1951), revelam valores do efeito Bohr de  $-0,29$  ("stripped") e  $-0,29$  (com ATP). Comparando estes dados com aqueles por nós obtidos para a Rã-pimenta, é possível observar que, em termos de efeito Bohr, o comportamento da hemoglobina de Rã-pimenta é semelhante ao da Pipa carvalhoi para o hemolisado "stripped" como também, que a ação do ATP em ambos os casos, conduz a um aumento (em termos absolutos) do efeito Bohr, se bem que para a Pipa este aumento é mais significativo. Entretanto, com relação aos dados da Rana catesbeiana observamos que o ATP não provoca qualquer alteração no efeito Bohr.

Se é possível aventar hipóteses com estes resultados poderíamos assumir que  $Hb_1$  de Rã-pimenta se aproxima em suas propriedades funcionais àquelas da hemoglobina de P. carvalhoi, isto é,

efeito Bohr quase nulo na forma "stripped" e resposta a fosfato significativa. O componente  $Hb_2$  por outro lado se assemelha mais a hemoglobina de Rana catesbeiana, isto é, possui pequeno efeito Bohr e quase ausência de resposta a fosfatos orgânicos. Sendo a Rã-pimenta, um anfíbio de habitat semi-aquático; poderíamos sugerir que a presença de dois componentes com propriedades funcionais distintas, isto é, um deles característico de animais de vida aquática e outro semelhante àquelas hemoglobinas de animais de vida terrestre, facilitaria ao animal a descarga de oxigênio tecidual em condições ambientais distintas, secas ou úmidas.

Finalmente, com a presente tese iniciamos estudos estruturais dos dois componentes  $Hb_1$  e  $Hb_2$  de Rã-pimenta procurando purificar as globinas destas proteínas. Pela análise eletroforética em gel de poliacrilamida das globinas de ambos componentes, pode ser observada a presença de cadeias de 2 tipos:  $\alpha$  e  $\beta$  (os símbolos  $\alpha$  e  $\beta$  foram utilizados convencionalmente) com mobilidade eletroforética distintas nas condições descritas. Assim, estruturalmente os dois componentes analisados seriam formados por dois tipos de cadeias,  $Hb_1$  por  $\alpha_1 \beta_1$  e a fração  $Hb_2$   $\alpha_2 \beta_2$ . Verificando os resultados apresentados na Fig. 11-B e 11-C notamos que a diferença de mobilidade eletroforética entre as cadeias  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  é bem mais acentuada que entre as cadeias  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , fato que se confirma ao realizarmos a eletroforese da mistura, onde no campo elétrico há nítida separação entre as cadeias  $\alpha$ , enquanto que as cadeias  $\beta$  se deslocam praticamente com mesma mobilidade dando origem a pra

ticamente uma só banda (Fig. 11-A). Pode-se discutir, a partir desses dados, a hipótese das cadeias " $\beta$ " serem estruturalmente semelhantes, ficando portanto, as diferenças de comportamento funcional discutidas no presente trabalho, relacionadas com as diferentes cadeias  $\alpha$ . Evidentemente para se elucidar melhor essa hipótese, é necessário efetuar estudos mais detalhados de estrutura, como mapeamento dos peptídeos obtidos por digestão trípica das globinas, análise dos aminoácidos N e C terminais, determinação da composição de aminoácidos, etc. Tais estudos especificamente estruturais estão em andamento e possivelmente contribuirão mais efetivamente para trazer a luz mais nuances na relação estrutura-função entre hemoglobinas.

## 5. RESUMO

Algumas propriedades estruturais e funcionais da hemoglobina de Leptodactylus labyrinthicus, anfíbio de habitat semi-aquático, foram estudadas tanto no hemolisado total como em componentes. A separação do hemolisado total foi obtida através de cromatografia em CM-celulose, identificando-se três componentes designados de Hb<sub>0</sub>, Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub>, correspondendo às proporções de 10, 60 e 30% respectivamente, resultados esses concordantes com aqueles posteriormente obtidos em gel de amido.

As propriedades de oxigenação foram avaliadas por método espectrofotométrico, e a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, expressa em termos da pressão parcial de oxigênio para meia saturação (P<sub>50</sub>). Foi observado que o hemolisado total não apresentou efeito Bohr, enquanto, dos dois componentes estudados somente, aquele correspondente a 30% (Hb<sub>2</sub>) apresentou efeito Bohr normal ou alcalino. O efeito causado pelos fosfatos, orgânicos e inorgânicos, foi observado tanto para o hemolisado total como para os componentes Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub>. Verificou-se que estes efetores provocaram um aumento no efeito Bohr e uma diminuição na afinidade pelo oxigênio, não afetando, entretanto, a interação heme-heme significativamente.

Um estudo estrutural foi iniciado, com a obtenção das globinas dos componentes Hb<sub>1</sub> e Hb<sub>2</sub> e posterior separação e comparação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  desses componentes através de eletroforese

em gel de poliacrilamida. Os resultados indicaram que possivelmente as cadeias  $\beta$  são similares.

## 6. SUMMARY

Some structural and functional properties of hemoglobin components of Leptodactylus labyrinthicus, a brazilian amphybian which lives in a semi-aquatic habitat, were studied in the present paper.

The total hemolysate was resolved into three components, in CM-celulose cromatography. These components were identified as Hb<sub>0</sub>, Hb<sub>1</sub> and Hb<sub>2</sub>, accordingly to the results in starch gel electrophoresis. The tree components are present in the proportion of 10, 60 and 30% respectively.

The oxygen binding properties were studied using spectrometric methods, and the oxygen affinity of the hemoglobin was expressed as the oxygen partial pressure to obtain 50% of saturation (P<sub>50</sub>). The total hemolysate didn't present Bohr effect, although Hb<sub>2</sub> (30% of the total hemolysate) showed a normal Bohr effect. Both major fractions Hb<sub>1</sub> and Hb<sub>2</sub> as well as the total hemolysate showed phosphate effect, either by organic or inorganic phosphates. This effect was an increase in Bohr effect with a decrease in oxygen affinity, without notable changes in heme-heme interactions.

A structural study was iniciated with the globins of the two major components Hb<sub>1</sub> and Hb<sub>2</sub>. The  $\alpha$  and  $\beta$  chains of these globins were separated in polyacrylamide gel electrophoresis and compared. The results indicated the possibility of the  $\beta$  chains were similar for both globins.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S.J. e RIGGS, A. (1969) The hemoglobins of the bull-frog, *Rana catesbeiana*-I. Purification amino acid composition, and oxygen equilibria. J. Biol. Chem., 244:2372-2383.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; FRONTICELLI, C.; BUCCI, E.; REICHLIN, M. e ROSSI, F.A. (1964) The oxygen Bohr effect of human fetal hemoglobin. Archs. Bioch. Biophys., 108:569-572.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. e ROSSI, F.A. (1965a) Studies on the relations between molecular and functional properties of hemoglobin. V. The influence of temperature on the Bohr effect in human and in horse hemoglobin. J. Biol. Chem., 240:1096-1103.
- ANTONINI, E.; WYMAN, Y.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; BRUNORI, M.; REICHLIN, M. e ROSSI, A. (1965b) The Oxygen equilibrium of the hybrids of canine and human hemoglobin. Biochim. Byphys. Acta., 104:160-166.
- ANTONINI, E. e BRUNORI, M. (1966) Apud Antonini, E. e Brunori, M. (1971) The equilibrium of hemoglobin and myoglobin with

ligands.

- ANTONINI, E. e BRUNORI, M. (1971) The equilibrium of hemoglobin and myoglobin with ligands. In: Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. (Edited by Newberger A. e Tatum E. L.) pp. 153-186. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- BAGLIONI, C. e SPARKS, C.E. (1963) A study of hemoglobin differentiation in *Rana catesbiana*. Dev. Biol., 8:272-285.
- BARCROFT, J.; HILL, A.V. (1910) J. Physiol. (London).
- BENESCH, R. e BENESCH, R.E. (1974) The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. Advances in Protein Chem. 28:211-237.
- BERTINI, F. e RATHE, G. (1962) Eletrophoretic Analysis of the hemoglobin of various species of anurans. Copeia(1), 181-185.
- BOHR, C.; HASSELBALCH, K. e KROGH, A. (1904) Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Eifluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf Sauerstoffbindung übt. Skand Arch. Physiol., 16:402.
- BRUNORI, M. (1966) The Carbon monoxide Bohr effect in hemoglo-

- bin from *Thunnus thynnus*. Archs. Biochem. Biophys., 114:195-199.
- BRUNORI, M.; NOBLE, R.W.; ANTONINI, E. e WYMAN, Jr. (1966). The reactions of the isolated and chains of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. J. Biol. Chem., 241:5238-5243.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; GIARDINA, B.; BOSSA F. e ANTONINI, E. (1973) Hemoglobin from trout structural and functional properties. Mol. Cel. Biochem., I:189-196.
- BUHLER, D.O. e WARREN, E.S. (1959) Multiple hemoglobins in fishes. Science, 129:899-900.
- BUNN, H.F.; RANSIL, B.J. e CHAO, A. (1971) apud Sullivan, B., 1974.
- BUNN, H.F.; RANSIL, B.J. e CHAO, A. (1971) The interation between erythrocyte organic phosphates magnesium ion, and hemoglobin. J. Biol. Chem., 246(17):5273-5279.
- CHANUTIN, A. e CURNISH, R.R. (1965) Apud Benesch, R.E. e Benesch, R., 1974.
- CHANUTIN, A. e CURNISH, R. (1967) Effect of Organic and inorganic phosphates on the Oxygen Equilibrium of human erythro-

- cytes. Arch. Biochem. Biophys., 121:96-102.
- CHAUVET, J.P. e ACHER, R. (1968) FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.)  
Lett. 5, 305.
- CHAUVET, J.P. e ACHER, R. (1971) Isolation of a frog hemoglobin (Rana esculenta). Purification, amino acid composition, and terminal sequences of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. J. Protein. Research III, 261-269.
- DARLINGTON, P.J. (1957) Zoogeography: the geographical distribution of animals. New York, Wiley e Sons, xi+675.
- DAVIES, H.G. (1961) Structure in nucleated erythrocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:671-687.
- DAVIS, B.J. (1964) Disc eletrophoresis-I. Background and Theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404.
- DAYHOFF, M. (1972) "Atlas of protein sequence and structure" vol. 5 National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- DESSAUER, H.C.; FOX, W. e RAMIREZ, J.R. (1957) Preliminary attempt to correlate paper eletrophoretic migration of

hemoglobins with phylogeny in amphibia and reptiles. Arch. Biochem. Biophys., 71:6-11.

DE WITT, W. e INGRAM, V.M. (1967) Acetylated peptide chains in bullfrog hemoglobins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 27:236 - 241.

FOREMAN, C.W. (1960) Electromigration properties of mammalian hemoglobin as taxonomic criteria. Am. Midland Nat., 64:177-186.

GOING, C.J. e GOING, G.O. Introduction to Herpetology. 2nd. ed. W.H. Freeman and Company San Francisco (1971).

HAMADA, K.; SAKAI, Y.; SHUJUYA, R. (1964) Biochemical metamorphosis of hemoglobin in Rana catesbiana. I Purification procedures and properties of hemoglobins from bullfrog and tadpole erythrocytes. J. Biochem., 55(6):636-642.

HUBER, R.; EPP, O.; STEIGEMANN, W. e FORMANEK, H. (1971) Apud Sullivan, B., 1974.

MAINARDI, D. (1957) L'evoluzione nei fringillidi concordanza fra un mapa serologico e i dati dell'analisi elettroforetica delle hemoglobine Rendiconti. Inst. Comb. Sc. Cett, Classe Scienze B 92:180-6.

- MANWELL, C. (1960) Comparative physiology: blood pigments. Ann. Rev. Physiol., 22:191-244.
- MEIRELLES, N.C.; OGO, S.H. e FOCESI, A.J. (1976) Bohr effect of *Pipa carvalhoi* hemoglobins. I.U.B. Abstracts, (04-7-378): 234.
- MORPURGO, G.; VACCARO, A.M.; RASCHETTI, R.; OCCHIONERO, C.; SARTOR P. e BENUCCI, A.M. (1973) A Factor which regulates Bohr effect in poikilotherms animals and man. Experientia, 29:1475-1477.
- NOBLE, B. e RIGGS, A. (1976) In: Alpha Helix IV, Expedition - "Comunicação pessoal".
- ORNSTEIN, L. e DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis - I Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:321-349.
- OSBORN, M. e WEBER, K. (1969) The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis. The Journal of Biological Chemistry, 244(16):4406-4412.
- PADLAN, E.A.; e LOVE, W.E. (1968) apud Sullivan, B., 1971.

PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; MAZZARELLA, L.; CROWTHER, R.A.; GREER, J. e KILMARTIN, J.V. (1969) apud Sullivan, B., 1974.

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

PERUTZ, M.F. (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. Scientific American, 239(6):68-86.

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

PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; MAZZARELLA, L.; CROWTHER, R.A.; GREER, J. e KILMARTIN, J.V. (1969) Nature (London), 222:1240(104).

PORTER, K.R. (1972) "Herpetology" Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

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

- PRINGLE, J.W.S. (1958) Comparative physiology of the nervous control of muscular contraction. Nature, 182:416.
- RAPOPORT, S. e GUEST, G.M. (1941) Distribution of the acid soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. J. Biol. Chem. 138:269-282.
- RIGGS, A. (1951) The metamorphosis of hemoglobin in the bull-frog. J. Gen. Physiol., 35:23-40.
- RIGGS, A. (1964) The relation between structure and function in hemoglobins. Can. J. Biochem. 42:763.
- RIGGS, A. (1966) In Int. Symp. Comp. Hemoglobin Struct. (A. Chistomonos and D.J. Polychronakos, eds.) pp. 126-128, Triantafyllo, Thessaloniki, Greece.
- RODNAN, G.P. and EBAUGH, F.G. (1957) Paper electrophoresis of animal hemoglobin. Soc. Expl. Biol. 94:397.
- ROSSI-BERNARDI L. e ROUGHTON F.J.W. (1967) The effect of temperature on the oxygen-linked ionizations of hemoglobin. J. Biol. Chem. 242:784-792.
- ROSSI-FANELLI, A., e ANTONINI, E. (1958) Studies on the

- structure of hemoglobin. I. Physicochemical properties of human globin. Biochem. Biophys. Acta. 30:608.
- SAHA, A.; DUTTA, R. e colaboradores (1957) Paper electrophoresis of Avian and mammalian hemoglobin. Sci., 125:3245.
- SMITH, D.B.; BRUNORI, M.; ANTONINI, E. e ROSSI, F.A. (1966) The oxygen Bohr effect in mouse hemoglobin. Archs. Biochem. Biophys. 113:725.
- SMITHIES, O. (1959) An improved procedure for starch-gel electrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem. J., 71:575-587.
- STRYER, L. (1975) "Bioquímica" W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- SULLIVAN, B. (1974) "Reptilian hemoglobins" In: Florkin, M. e Bradley, T. (eds. Chemical zoology, london, Academic Press, vol. IX. Amphibia and Reptilia p.377-398.
- SYDENSTRYCKER, I. (1956) Electrophoretic behavior of animal hemoglobin. Proc. Soc. Expl. Biol., 93:396.
- TENTORY, L.; VIVALDI, G.; CARTA, S.; SALVATI, A.M.; SORCINI, A.M. e

VELANI, S. (1965) The hemoglobin of Amphibia-II. Characterization of the hemoglobin of Rana esculenta L. Physicochemical - properties and amino acid composition. Arch. Biochem. Biophys. 109:404-414.

TOOZE, I. e DAVIES, H.G. (1963) apud Sullivan, B., 1974.

TRADER, C.D.; FRIEDEN, E. (1966) Dimerization and other chemical changes in amphibian hemoglobins during metamorphosis. J. Biol. Chem., 241:357-366.

TRADER, C.D., WORTHAM, J.S. and FRIEDEN, E. (1963) Hemoglobin: molecular changes during anuras metamorphosis. Science 139:918.