

MARCIO ALBERTO TORSONI

Envolvimento de grupos tióis de hemoglobina na proteção do eritrócito contra agentes oxidantes

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora
Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo
Departamento de Bioquímica-IB
UNICAMP

ste exemplar corresponde à redação final
ia tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Marcio Alberto Torsoni</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

04/03/99

Satie Ogo

Campinas
UNICAMP

1999

7900483

UNIDADE	12 C
N.º CHAMADA	12 C
V.	Es.
TOMBO BC	37498
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/99
N.º CPD	

CM-00122827-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Torsoni, Marcio Alberto

T638e Envolvimento de grupos tióis de hemoglobina na proteção do eritrócito contra agentes oxidantes/Marcio Alberto Torsoni. -- Campinas, SP:[s.n.],1999.
108f.:ilus.

Orientadora: Satie Hatsushika Ogo

**Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.**

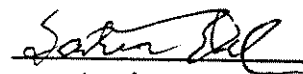
1. Hemoglobina. 2. Oxidação. 3. Agentes oxidantes. I. Ogo, Satie Hatsushika. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 04 de março de 1999

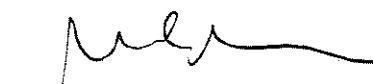
BANCA EXAMINADORA

TITULARES

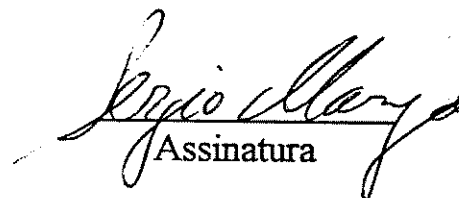
Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP


Assinatura

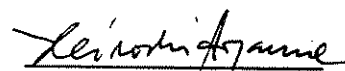
Profa. Dra.: Nilce Correa Meirelles
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP


Assinatura

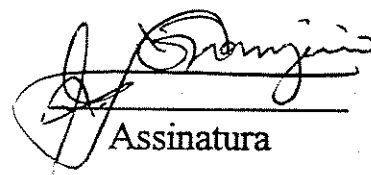
Prof. Dr. Sergio Marangoni
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP


Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP


Assinatura

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Depto de Bioquímica/FOB/USP


Assinatura

SUPLENTE

Prof. Dr. José Camillo Novello
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP

Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula
Depto Bioquímica/IB/UNICAMP

Assinatura

A minha mãe, *Dionis* e meus irmãos, *Marsal, Rodrigo e Vanessa*;

A *Mario, Silvia, Angélica, Neto, Ondina e Marli*;

pelo incentivo e carinho;

A *Adriana*, minha esposa, pelo amor, compreensão e apoio;

dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Satie H. Ogo pela orientação e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo pela amizade.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa (processo n. 96/8997-1) e do fundo de reserva técnica.

A CAPES pelo apoio através da bolsa concedida no início do doutorado.

A Sub-comissão de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Aos Professores Dra. Nilce Correa Meirelles, Dr. Hiroshi Aoyama e Dr. Sergio Marangoni pela contribuição na banca prévia

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela disposição e pela amizade durante estes anos.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pela amizade e colaboração.

A Ana Lúcia, Graziela, Maristela, Renata e Brígida pelas momentos de descontração e pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Deus pela minha saúde

SUMÁRIO

Resumo	01
Lista de Abreviaturas	03
1-Introdução	04
1.1-Sistema antioxidante eritrocitário	08
1.1.1-Superóxido dismutase	08
1.1.2-Catalase	08
1.1.3-Glutationa peroxidase	09
1.1.4-Glutationa redutase	09
1.1.5-Glutationa –S-transferase	10
1.2-Oxidação da Hemoglobina	15
1.3-Peroxidação lipídica	20
1.4-Oxidação de grupos tióis de proteína	23
1.5-Presença de grupos tióis reativos na hemoglobina	25
2-Publicações referentes ao projeto de tese	34
2.1-“Effect of thiol reagents on functional properties and heme oxidation in the hemoglobin of <i>G. carbonaria</i> ”	34
2.2-“Involvement of available SH groups in the heterogeneity of hemoglobin from the tortoise <i>G. carbonaria</i> ”	45

2.3-“Sulphydryl groups and their relation to antioxidant enzymes of chelonian red blood cells”	56
--	----

2.4-“High reactive thiol of <i>G. carbonaria</i> Hb can diminish oxidative damage on the erythrocyte membrane”	67
--	----

3-Discussão	83
-------------	----

4-Summary	96
-----------	----

5-Bibliografia	97
----------------	----

RESUMO

Hemoglobinas de várias espécies de vertebrados apresentam capacidade polimerizar-se através da formação de pontes de disulfeto. Nestas espécies, a hemoglobina apresenta grupos tióis reativos, os quais levam também a formação de pontes de disulfeto mistas com a glutathione. Muitos autores tem relacionado a presença destes grupos tióis na hemoglobina a resistência do animal a hipóxia. Outros estudos tem também relacionado estes grupos a um mecanismo adicional de participação da Hb em processos de proteção celular contra agentes oxidantes.

Dentre os grupos de vertebrados, os répteis destacam-se por apresentarem muitas espécies com hemoglobinas ricas em grupos tióis reativos. O jabuti *Geochelone carbonaria*, pertencente a família Testudinidae, apresenta cerca de 4 SH reativos na hemoglobina, e um complexo padrão eletroforético, o qual foi demonstrado ser uma consequência da intensa formação de disulfetos. Outra espécie pertencente ao mesmo gênero, *Geochelone denticulata*, apresenta apenas 2 grupos tióis reativos/Hb e um padrão eletroforético do hemolisado comparativamente mais simples.

Os estudos de susceptibilidade da Hb stripped da 2 espécies a oxidação mostraram que a Hb de *G. denticulata* é mais susceptível, provavelmente devido ao menor número de grupos tióis reativos na Hb. A modificação da hemoglobina de *G. carbonaria* por diamida ou GS-SG não induziu significativa alteração nas propriedades funcionais da hemoglobina de *G. carbonaria*. Por outro lado, a susceptibilidade da hemoglobina à oxidação foi sensivelmente alterada pelas mesmas modificações. A peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos humanos na presença destas hemoglobinas modificadas ou não, mostraram também que as alterações na molécula induziam a perda da capacidade da hemoglobina de prevenir a peroxidação. O mesmo comportamento não foi observado para a hemoglobina tratada com diamida.

Adicionalmente foi determinada a atividade das enzimas que fazem parte do sistema antioxidante das 2 espécies de quelônios. A glutathione peroxidase e a glutathione redutase foram mais ativas na espécie *G. denticulata*, enquanto que a superóxido

dismutase e catalase foram mais ativas na espécie *G. carbonaria*. A titulação da concentração de GSH no eritrócito de *G. carbonaria* mostrou que esta é cerca de 2 vezes maior que na espécie *G. denticulata*. Portanto, a espécie *G. carbonaria* apresenta maior poder redutor no interior do eritrócito e a presença de tióis reativos na hemoglobina pode ser um mecanismo adicional de proteção celular.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada)
GR	Glutathione redutase
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GS-SG	Glutathione oxidada
GS-SHb	Glutathionil hemoglobina
Hb	Hemoglobina
HbS-SHb	Hemoglobina polimerizada
IAA	Iodoacetamida
MDA	Malondialdeído
NEM	n-Etilmaleimida
nH	Coeficiente de Hill (cooperatividade)
O₂⁻	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxil
P₅₀	Pressão necessária para saturar de oxigênio 50% da hemoglobina (afinidade)
PS-SP	Proteína polimérica
SOD	Superóxido dismutase
T_½	Tempo necessário para oxidar 50% da hemoglobina
t-BOOH	terc-Butil hidroperóxido

1-INTRODUÇÃO

Hemoglobina é uma hemoproteína essencial para a vida de todos os vertebrados, ocorrendo também em alguns invertebrados, nódulos de algumas plantas leguminosas, assim como leveduras, protozoários ciliados, crustáceos e anelídeos. A hemoglobina humana normal é constituída por 4 cadeias polipeptídicas (subunidades), sendo 2 cadeias α com 141 resíduos de aminoácidos e 2 cadeias β que apresentam 146 resíduos de aminoácidos. O conjunto das 4 subunidades possui massa molecular de 64 kDa. Cada subunidade possui um grupo heme inserido em uma fenda hidrofóbica; o grupamento heme é constituído por um átomo de ferro II (Fe^{2+}) que ocupa a posição central do anel da porfirina. O ferro possui 6 sítios de coordenação dos quais 4 são ocupados pelos átomos de nitrogênio pirrólico do anel porfirínico e o quinto ligante é o átomo de nitrogênio de um imidazol da histidina proximal (F8) que, provavelmente, ancora o heme na proteína. O sexto sítio está livre para ligar um ligante extra (ANTONINI & BRUNORI, 1975).

O estado reduzido do ferro no grupamento heme (Fe^{2+}) é fundamental para a realização do transporte do oxigênio. Alguns resíduos invariáveis, de natureza hidrofóbica são responsáveis pela manutenção do ambiente não polar em torno do sítio de ligação do oxigênio e que é a base para a estabilidade do complexo ferro-oxigênio (ANTONINI & BRUNORI, 1975). Qualquer alteração no ambiente do heme pode levar à formação de metahemoglobina (Hb Fe^{3+}). A hemoglobina férrica liga-se

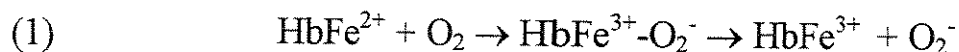
preferencialmente a ânions. Em meio ácido a metahemoglobina apresenta a sexta coordenação do ferro ocupada pela H_2O que, em meio alcalino, passa a ser ocupada pelo íon hidroxil (ANTONINI & BRUNORI, 1975).

Adicionalmente, as características funcionais da hemoglobina como cooperatividade na ligação do oxigênio, efeito Bohr e efeito de polifosfatos orgânicos são de grande importância para a realização do transporte do oxigênio. A importância de alguns aminoácidos para a função da proteína foi demonstrada por CAUGHEY (1967) que, estudando hemoglobinas anormais onde a histidina distal está substituída por outros resíduos, determinou que a velocidade de autooxidação é maior, caracterizando assim, a importância deste aminoácido na estabilidade na interação da hemoglobina com o oxigênio.

Quando a hemoglobina liga-se ao oxigênio, um elétron é polarizado do ferro para o oxigênio, formando momentaneamente a forma férrica ($HbFe^{3+}$). Em condições normais este elétron é devolvido ao ferro no momento em que o oxigênio é liberado, restabelecendo sua forma ferrosa ($HbFe^{2+}$).

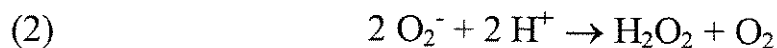
Em indivíduos normais, aproximadamente 3% da hemoglobina total circulante é convertida a metahemoglobina diariamente. Fisiologicamente, a metahemoglobina ($HbFe^{3+}$) presente na célula é reduzida pela enzima metahemoglobina redutase que utiliza o NADPH como fonte de poder redutor (KURATA *et al.*, 1993). Com a

formação da metahemoglobina ocorre simultaneamente a formação do ânion superóxido (O_2^-) de acordo com a reação (1):



Sendo assim, devido ao processo contínuo de oxigenação e desoxigenação da Hb, o ânion superóxido é continuamente gerado no interior do eritrócito. É conhecido que este radical livre (O_2^-) pode atacar direta ou indiretamente o DNA, hormônios e membranas (KURATA *et al.*, 1993; MARTINEZ-CAYUELA, 1995). No eritrócito, o O_2^- promove grandes danos quando interage com o peróxidos, produzindo intermediários altamente reativos, como por exemplo, o radical hidroxil (THOMAS *et al.*, 1978). Os radicais produzidos podem, então, atacar os lipídios e as proteínas da membrana resultando em hemólise e perda da função celular.

O ânion superóxido, quando não reage com macromoléculas celulares, pode, por processo de dismutação (reação 2), gerar peróxido de hidrogênio. Esta reação pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase, como será descrito em detalhes posteriormente (MISRA & FRIDOVICH, 1972; WINTERBOURN *et al.*, 1976).



Em adição à capacidade da hemoglobina de gerar o ânion superóxido, os processos oxidativos, no interior dos eritrócitos, são favorecidos devido às características estruturais como, (i) alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados

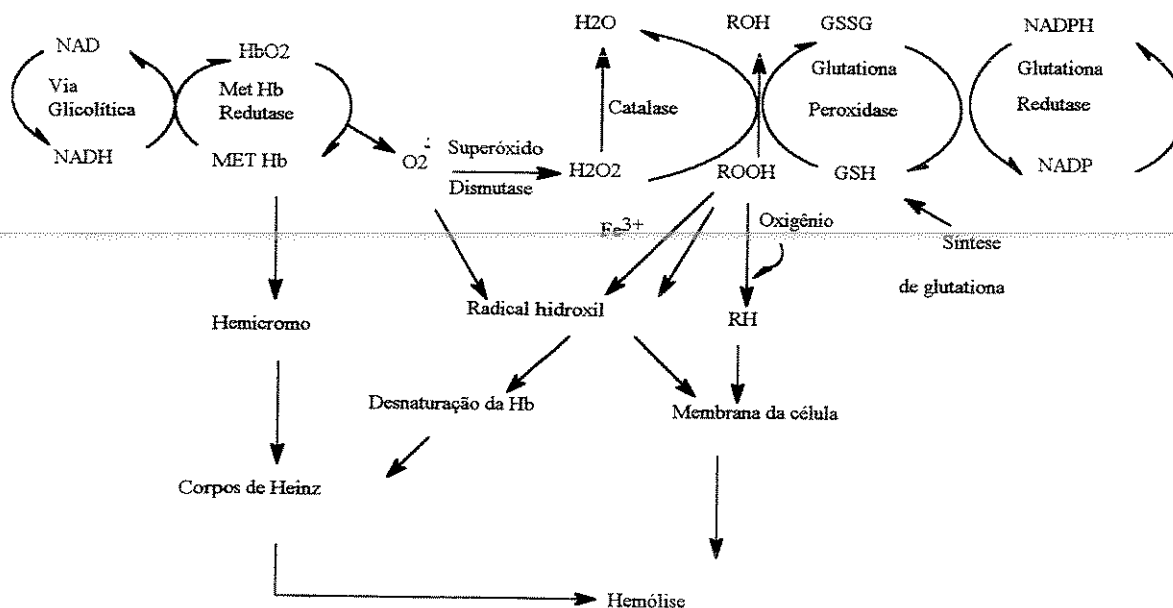
na membrana citoplasmática, (ii) rico suprimento de oxigênio e (iii) a presença de metais de transição. A hemoglobina por apresentar ferro em sua estrutura pode ainda comportar-se como um reagente biológico de Fenton, sendo assim, uma molécula com grande potencial promotor de processos oxidativos (SADRAZADEH *et al.*, 1984; CLEMENS & WALLER, 1987 PUPPO & HALLIWELL, 1988). Além disto, o eritrócito maduro é anucleado, portanto, incapaz de substituir componentes celulares danificados por processos oxidativos.

É conhecido que, em condições de intenso estresse oxidativo, os radicais livres e espécies oxidantes podem atacar as principais classes de moléculas presentes na célula como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios, levando a sérios danos à célula (KURATA *et al.*, 1993). Os danos oxidativos da hemoglobina podem levar à perda de função e precipitação no interior da célula como corpos de Heinz, provocando a prematura morte celular. No entanto, em condições fisiológicas, o eritrócito humano apresenta um tempo de vida médio de cerca de 120 dias em um ambiente, como descrito anteriormente, propício aos processos oxidativos. Durante este período o eritrócito desenvolve suas funções sem aparente dano peroxidativo (CHIU *et al.*, 1982). Isto deve-se a uma eficiente compartimentalização celular e à presença de um sistema antioxidante formado por enzimas e compostos antioxidantes.

1.1.5 - Glutathiona-S-transferase

Esta enzima catalisa a reação da GSH com uma variedade de compostos eletrofilicos e tem importante papel de detoxificação no fígado. A glutathiona-S-transferase encontrada no eritrócito tem sido classificada diferentemente da glutathiona-S-transferase encontrada no fígado sob o ponto de vista imunológico, fisicoquímico e eletroforeticamente (MARCUS *et al.*, 1978; BOARD, 1981a.; SUZUKI *et al.*, 1987).

Entretanto, estas enzimas atuam conjuntamente com as enzimas metahemoglobina redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), responsável pela redução do NADP^+ . Assim, este sistema antioxidante é capaz de prevenir os danos oxidativos sobre a membrana, hemoglobina e outros constituintes celulares, como demonstrado pelo esquema abaixo (CHIU *et al.*, 1982).



Auxiliando na detoxificação celular, existem pequenas moléculas largamente distribuídas em sistemas biológicos que podem atuar por outro mecanismo, que não enzimático, sobre radicais livres. Dentre estes compostos a GSH, a vitamina C, a vitamina E e o ácido úrico são os mais conhecidos. A GSH, como descrito anteriormente, pode reduzir o peróxido de hidrogênio formando H_2O em uma reação catalisada pela enzima glutathione peroxidase. A GSH também reage diretamente com os radicais ($R\bullet$) formando o radical tiil ($GS\bullet$) e, posteriormente, a glutathione oxidada ($GS-SG$) (FREEMAN & GRAPO, 1982; MEISTER & ANDERSON, 1983; CADENAS, 1989) (reação 7 e 8)



A vitamina C, assim como a GSH, podem reduzir radicais de oxigênio. O deidroascorbato formado pela reação do ácido ascórbico com os radicais livres pode, por sua vez, ser reduzido pela GSH. O ácido úrico, como descrito por vários autores, tem um importante papel contra processos oxidativos no plasma (AMES, 1983; SEVANI *et al.*, 1985; AMES & SAUL, 1986; DAVIES *et al.*, 1986). A vitamina E desempenha importante papel antioxidante na célula. Devido ao caráter lipofílico de sua estrutura, a vitamina E é responsável, principalmente, pela defesa da membrana

celular contra a ação do ânion superóxido e de hidroperóxidos como demonstrado pela reação 9 (FEE & TEITELBAUN, 1972).



O radical $\alpha\text{-T}^\bullet$ produzido pela oxidação da vitamina E é estável devido ao elétron desemparelhado do átomo de oxigênio estar em ressonância no anel aromático da estrutura. A redução do radical formado ($\alpha\text{-T}^\bullet$) é realizada pelo ascorbato aumentando, portanto, a capacidade antioxidante da vitamina E na presença da vitamina C (CHIU *et al.*, 1982).

Durante o processo de envelhecimento celular várias mudanças bioquímicas foram observadas como, por exemplo, mudanças no conteúdo de lipídios e proteínas da membrana, atividade enzimática, permeabilidade iônica, tamanho e deformabilidade celular (WESTERMAN *et al.*, 1963; CLARK & SHOHET, 1985). A longevidade e a alteração dos parâmetros descritos acima em eritrócitos de mamíferos são inversamente relacionadas à taxa metabólica basal e à auto-oxidação dos tecidos (CUTLER 1984a; 1984b; 1985).

Dentre as mudanças observadas durante o processo de envelhecimento, a alteração da atividade de várias enzimas tem sido utilizada como referência para a determinação da idade dos eritrócitos (KURATA *et al.*, 1993). Usando técnicas de separação em gradiente de densidade de Percoll, IMANISHI *et al.* (1986),

descreveram valores menores de atividade das enzimas G6PD, GSH-Px e GR em função do envelhecimento do eritrócito. Resultados similares também foram observados por SUZUKI *et al.* (1984ab) e SPODARYK (1990), analisando a atividade da GR. Posteriormente, FAZI *et al.* (1991), sugeriram que o envelhecimento da célula vermelha estava associado com a redução da capacidade de detoxificação. Os mecanismos que levam ao decréscimo da atividade enzimática são pouco conhecidos, contudo, este tem sido atribuído às alterações na estrutura quaternária das moléculas (PAGLIA & VALENTINE, 1970).

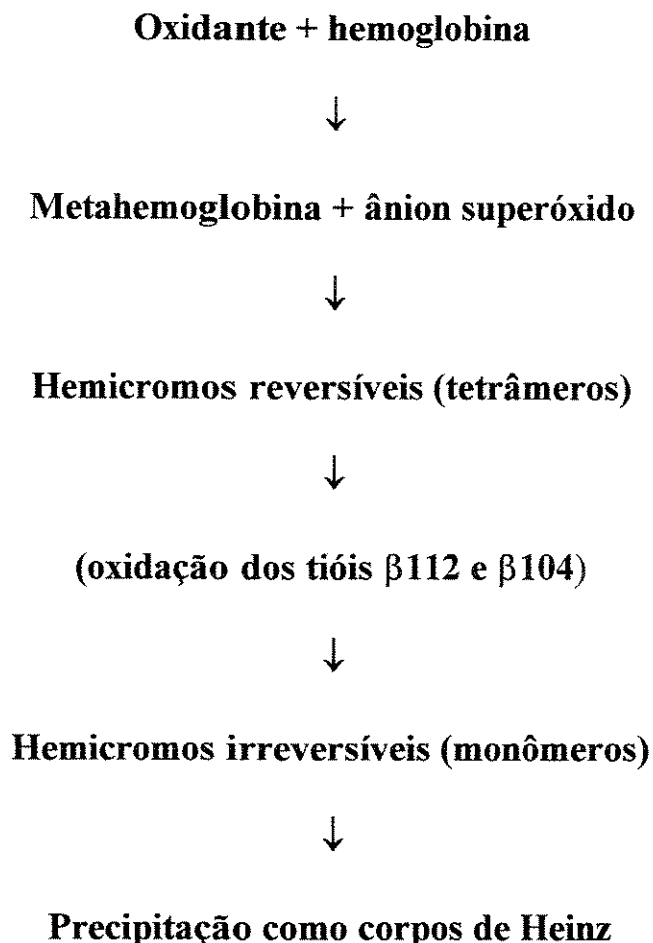
As alterações nos sistemas enzimáticos e conseqüentemente, no metabolismo celular, levam a uma diminuição da capacidade redutora celular e a uma maior susceptibilidade ao ataque de radicais livres e compostos oxidantes. Quando a capacidade antioxidante da célula é superada pelo nível de oxidação, um estado de estresse oxidativo é instalado. A toxicidade dos radicais livres foi descoberta somente a poucas décadas, mas hoje a sua produção tem sido relacionada ao desenvolvimento de muitas patologias tais como, inflamação, envelhecimento celular, carcinogênese e toxicidade de drogas (SIES, 1985; McCORD, 1985; FLOHE, 1988).

No eritrócito algumas patologias são conhecidas devido aos danos oxidativos provocados pela depleção do sistema redutor. A deficiência do sistema redutor celular pode ser causado pela ausência ou baixa atividade de enzimas antioxidantes e enzimas que fazem parte da via que fornece poder redutor para a célula, como por exemplo o

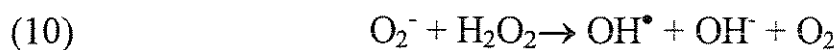
metabolismo anormal da glutathione, baixa produção de NADPH e deficiência na atividade da catalase (CARSON *et al.*, 1961; LOOS *et al.*, 1976; SPILBERG *et al.*, 1978). Por outro lado, as alterações na estrutura da hemoglobina, muitas vezes, estão relacionadas com a sua maior susceptibilidade aos processos de desnaturação. Neste contexto, CHIU *et al.* (1996) demonstraram que hemoglobinas anormais tanto induziram maior peroxidação em células vermelhas quanto maior era a sua tendência em liberar o heme da estrutura. Adicionalmente estes autores demonstraram que o ferro hemínico apresentava maior poder de induzir a peroxidação lipídica em membranas de eritrócitos que o ferro não hemínico. Portanto, eritrócitos de indivíduos que apresentam patologias ligadas a alterações estruturais da hemoglobina como β -talassemia e anemia falciforme, também mostraram maior susceptibilidade a danos oxidativos (MENGEL *et al.*, 1967; LUX *et al.*, 1976; CHIU *et al.*, 1979). Muitas vezes a prematura destruição celular estava associada à deficiência nutricional, como a carência em vitamina e o aumento da susceptibilidade celular à peroxidação lipídica (DODGE *et al.*, 1967; GORDON-SMITH & WHITHE, 1974; CHIU & LUBIN, 1979).

1.2 - OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA

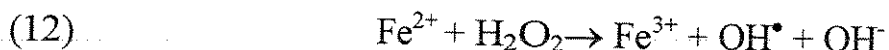
No eritrócito, a principal proteína citoplasmática é a hemoglobina e suas características estruturais, bem como a presença do grupo heme, tornam esta proteína o principal alvo do ataque de compostos oxidantes. O processo oxidativo da hemoglobina leva à produção de formas oxidadas que podem promover danos à célula. Esta hemoproteína, na presença de compostos oxidantes, produz a metahemoglobina e o ânion superóxido através do mecanismo descrito anteriormente. A metahemoglobina (HbFe^{3+}) pode converter-se a hemicromo após sofrer adicional processo de oxidação que leva à desestabilização da globina. Neste estado a histidina distal ou um outro ligante ocupa a sexta coordenação do ferro hemínico. A formação do hemicromo e sua precipitação no interior da célula também tem sido atribuída a oxidação de grupos tióis da hemoglobina. Primeiramente são oxidadas as Cis $\beta 93$ que leva à dissociação da hemoglobina, formando um estado reversível de hemicromo. A exposição e oxidação de grupos tióis extras (Cis $\beta 112$ e Cis $\beta 104$) que não estão acessíveis sobre condições fisiológicas, leva à formação do hemicromo irreversível e sua precipitação (KELLET & SCHACHMAN, 1971; BIRCHMIER *et al.*, 1973). Este mecanismo de formação dos corpos de Heinz pode ser esquematicamente representado como segue:



No mecanismo descrito acima, com a constante formação do ânion superóxido e uma deficiência no sistema antioxidante celular, o superóxido, por dismutação espontânea, pode gerar peróxido de hidrogênio. Na presença de ambos, íon superóxido e peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) pode ser gerado através da reação de Harber-Weiss (reação 10).



Na presença de um catalisador metálico, como o ferro, esta reação ocorre muito mais rapidamente (reações 11 e 12).



A reação (12) é conhecida como Reação de Fenton e segundo alguns autores a hemoglobina poderia participar da mesma como um reagente biológico de Fenton fornecendo ferro hemínico, promovendo, assim, maior formação de radicais hidroxila (SADRAZADEH *et al.*, 1984; GUTTERIDGE, 1986; PUPPO & HALLIWELL, 1988) e radical ferril ($\text{HbFe}^{4+}\text{-OH}$) (GIULIVI & DAVIES, 1990). À hemina também tem sido atribuídos efeitos deletérios na célula como perda de potássio, fragilidade osmótica e eventualmente hemólise (KIRSCHNER-ZILBER *et al.*, 1982; FITCH *et al.*, 1983). Na membrana, a hemina promove a dissociação das proteínas do citoesqueleto (espectrina) e associação com a proteína 4.1 (LIU *et al.*, 1985; SOLAR & SHAKLAI, 1989).

Quando a oxidação da hemoglobina no eritrócito é induzida *in vitro* por hidroperóxidos orgânicos, como t-BOOH (reação 13 e 14) os radicais t-butilalcoxil (t-BO•) e t-butilperoxil (t-BOO•) são formados e os mesmos podem atuar sobre lipídios e proteínas da membrana e enzimas citoplasmáticas (THORNALLEY *et al.*, 1983; VAN DER ZEE *et al.*, 1989).

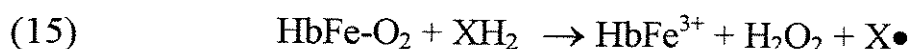


Estudos realizados por VAN DER ZEE *et al.* (1989), mostraram que em um sistema contendo eritrócitos e t-BOOH, o radical t-butilalcoxil foi responsável pelo desencadeamento da reação em cadeia da peroxidação lipídica, enquanto que o t-butilperoxil promoveu a perda de potássio da célula.

Por outro lado, quando a hemoglobina interage com radicais livres ou com compostos oxidantes como o H_2O_2 , podem-se formar os radicais hidroxil e ferril, como demonstrado por SADRAZADEH *et al.* (1984) e PUPPO & HALLIWELL (1988). Estes autores demonstraram que a reação da metahemoglobina com H_2O_2 , em excesso, produziu radicais hidroxil. Este radical foi formado pela interação do H_2O_2 com o ferro liberado da hemoglobina. Nestes estudos, a detecção do radical hidroxil foi realizada através da degradação da desoxirribose e por cromatografia líquida de alta pressão que possibilitou a identificação da fenilalanina hidroxilada pelo radical hidroxil. Por outro lado, o radical ferril-hemoglobina, por outro lado, é formado em condições onde o peróxido de hidrogênio está em excesso em relação a concentração de hemoglobina (GIULIVI & DAVIES, 1990; EVERSE & HSIA, 1997). Segundo GIULIVI & CADENAS (1998), através de estudos realizados com a mioglobina, o radical ferril ($HbFe^{4+}$) reage com os aminoácidos vizinhos ao grupo heme produzindo um radical secundário. Um desses radicais seria o radical de tirosina formado pela redução do radical ferril. Este, através de um processo de transferência de elétrons, dá origem a

outros radicais de aminoácidos. Este mesmo mecanismo pode ser aplicado à hemoglobina considerando a similaridade estrutural desta molécula com a mioglobina.

Adicionalmente, a hemoglobina pode também interagir com outros compostos como xenobióticos redutores (XH_2) e metabólitos que darão origem a radicais livres (reação 15). Estes, por sua vez, iniciam uma série de reações gerando outros radicais e espécies oxidantes que podem produzir desnaturação oxidativa da hemoglobina (WINTERBOURN, 1990).



Como o eritrócito e, conseqüentemente, a hemoglobina estão distribuídos por todos os tecidos através do sistema vascular, os radicais formados no interior desta célula podem promover danos em diferentes tecidos do corpo. Quando o nível de estresse oxidativo é alto nos eritrócitos, o rompimento da membrana celular leva à liberação da hemoglobina. Esta hemoproteína livre no meio extracelular é rapidamente degradada produzindo grande quantidade de hemina e ferro livre. É conhecido que a hemina em grande quantidade é extremamente tóxica e o ferro livre pode participar da reação de Fenton produzindo radicais hidroxil.

Recentemente, vários estudos foram realizados procurando produzir hemoglobinas modificadas por reagentes químicos que possibilitem a administração extracelular desta proteína. Todas as hemoglobinas testadas produziram severos efeitos colaterais como vasoconstrição e conseqüente aumento da pressão sangüínea,

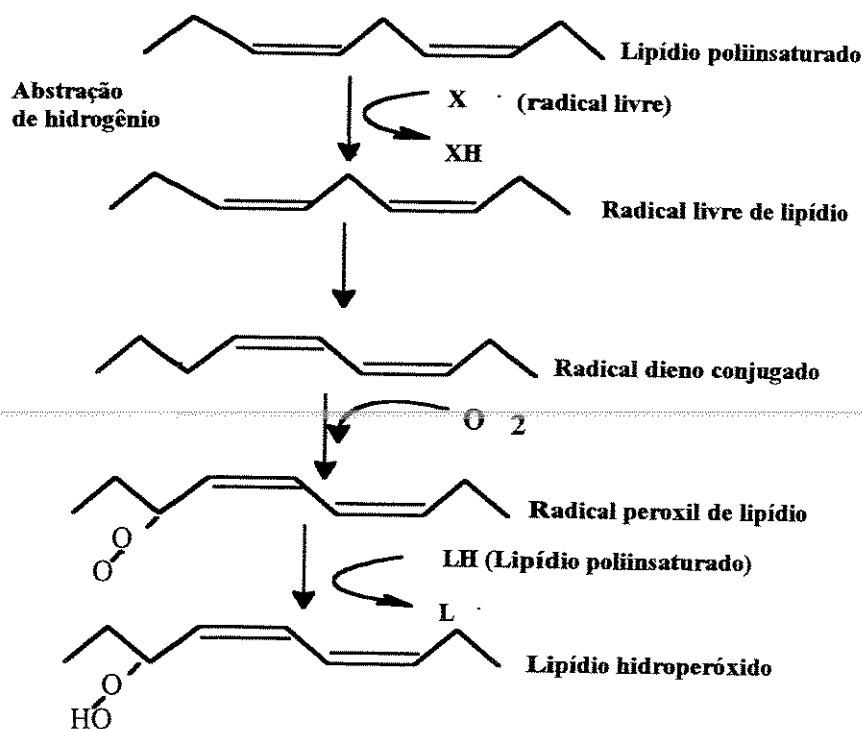
danos hepáticos e renais, ativação de macrófagos e neutrófilos, agregação plaquetária e outros (EVERSE & HSIA, 1997). A modificação química da hemoglobina pode minimizar alguns efeitos colaterais, mas o nível de oxidação do heme e o envolvimento da hemoglobina em mecanismos de geração de radicais no meio extracelular, necessitam de estudos adicionais. O potencial oxidante de derivados de hemoglobina é de extrema relevância para o desenvolvimento de uma forma modificada que possa ser administrada livre da célula. Vários estudos tem demonstrado que tanto a hemoglobina presente no interior do eritrócito como a hemoglobina livre produzem danos generalizados como inativação enzimática e peroxidação lipídica em diferentes tecidos (THORNALLEY *et al.*, 1983; RICE-EVANS & BAYSAL, 1987; VAN DER ZEE *et al.*, 1989).

1.3 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A membrana de células e das organelas são constituídas principalmente de lipídios e proteínas. Compostos oxidantes e/ou radicais livres de oxigênio podem atacar os ácidos graxos presentes na membrana, iniciando um processo de reação em cadeia denominado peroxidação lipídica. Os danos oxidativos, ocorrem preferencialmente, sobre ácidos graxos poliinsaturados na membrana devido a baixa energia de dissociação de seus hidrogênios alílicos (CLEMENS & WALLER, 1987).

Estudos realizados com lipossomas preparados na presença de hemoglobina mostraram que a peroxidação lipídica ocorre mais rapidamente em lipossomas constituídos de lipídios insaturados do que de lipídios saturados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

No processo de peroxidação lipídica o radical livre primário retira um átomo de hidrogênio da ponte metilênica da cadeia de carbonos, produzindo um radical centrado no carbono. Através de um arranjo molecular o radical é estabilizado na forma de um dieno conjugado, o qual facilmente reage com o oxigênio molecular formando o radical peroxil (MARTINEZ-CAYUELA, 1995).



A peroxidação lipídica, uma vez iniciada, pode propagar-se por si, produzindo alterações nas propriedades da membrana.

O envolvimento da hemoglobina no processo de peroxidação lipídica em eritrócitos foi estudado por MACCORD & DAY (1978), AMBRUSO & JOHNSTON (1981) e SADRAZADEH *et al.* (1984). Estes estudos sugeriram o envolvimento de proteínas que apresentavam ferro ou grupo heme, como a lactoferrina, a transferrina e a hemoglobina, como catalisadores da reação de Fenton (Reação 8), gerando radicais que promoveriam a peroxidação lipídica. GUTTERIDGE (1986) demonstrou que a peroxidação de micelas de ácido linolêico na presença da hemoglobina, é significativamente inibida pela haptoglobina mas não é inibida pela transferrina ou desferoxamina. Estes resultados demonstraram que a hemoglobina está também envolvida na peroxidação lipídica do eritrócito em condições de estresse oxidativo. O radical ferril formado pela interação da hemoglobina com hidroperóxidos ataca a membrana dando origem a radicais de lipídios (VAN DER BERG *et al.*, 1992; EVERSE & HSIA, 1997). No entanto, estudos anteriores realizados por CLEMENS *et al.* (1985) demonstraram que eritrócitos contendo cerca de 40% de metahemoglobina são menos susceptíveis a peroxidação lipídica e que o ferro somente no seu estado reduzido, pode catalisar a peroxidação lipídica. Estes autores mostraram que a hemoglobina no estado oxidado (HbFe^{3+}) comporta-se como um antioxidante, sequestrando intermediários da peroxidação lipídica.

1.4 - OXIDAÇÃO DE GRUPOS TIÓIS DE PROTEÍNA

A oxidação de grupos tióis ou grupos sulfidrilas e a formação de dissulfetos reversíveis é uma resposta celular aos processos oxidativos (CHAI *et al.*, 1994a; 1994b; RAVICHANDRAN *et al.*, 1994; THOMAS *et al.*, 1995). A mudança no estado redox dos grupos sulfidrilas pode promover sinais que afetam a atividade biológica de enzimas, receptores, transportadores e fatores de transcrição. Na célula, os tióis podem ser agrupados em 2 classes: os tióis de baixa massa molecular (glutathiona reduzida, glutathiona oxidada, cisteína e cistina) e os tióis de alta massa molecular, como os tióis protéicos (ROSSI *et al.*, 1995). O principal tiol não protéico presente intracelularmente é a glutathiona (GSH) cuja concentração pode variar de 2 a 10 mM. Por outro lado, a concentração da sua forma oxidada (GS-SG) é de 10 a 100 vezes menor sob condições fisiológicas. Da mesma maneira são encontradas altas concentrações de tióis protéicos na célula, como por exemplo em eritrócitos, onde a concentração pode variar entre 15 e 25 mM (JOCELYN, 1972).

Os grupos sulfidrilas de proteínas (PSH) podem estar localizados na superfície da molécula e, portanto, serem reativos formando pontes de dissulfeto entre proteínas diferentes e entre grupos sulfidrilas de uma mesma proteína (PS-SP). Adicionalmente os tióis reativos de proteínas podem reagir com dissulfetos de baixa massa molecular, como por exemplo a glutathiona oxidada (GS-SG), dando origem a dissulfetos mistos (PS-SG), de acordo com a reação 16:



A glutationa, no entanto, pode reduzir dissulfetos de proteínas (PS-SP) originando um grupo sulfidrila livre na proteína e um dissulfeto misto (reação 17).



As reações 16 e 17 podem ocorrer espontaneamente ou serem enzimaticamente catalisadas (FREEDMAN, 1979). Alguns autores acreditam que a formação de pontes de dissulfetos mistas pode ter como funções a proteção de grupos tióis específicos contra reações não desejadas ou, ainda, a geração de GSH a partir de PS-SG e modulação da atividade de várias enzimas, como glicose-6 fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase, frutose-1,6-bifosfatase, através da formação de pontes de dissulfetos nos sítios alostéricos (ZIEGLER, 1985).

O metabolismo, em geral, é afetado por mudanças no estado da GSH e, conseqüentemente, no conteúdo de dissulfetos mistos. A concentração de dissulfetos mistos aumenta quando órgãos ou células são expostos a condições oxidantes

(DELUCIA *et al.*, 1975; KEELING *et al.*, 1982; DI SIMPLICIO & ROSSI, 1994).

Vários tecidos de roedores apresentaram maior concentração de dissulfetos mistos após estresse oxidativo (BRIGELIUS *et al.*, 1982; BELLOMO *et al.*, 1987). Estudos realizados por SRIVASTAVA *et al.* (1974) demonstraram que a concentração GSH ligada à proteínas específicas de eritrócitos aumentou de 0,004 M para 0,248 M após

tratamento com diamida, um oxidante específico de grupos tióis. Adicionalmente, o tratamento do eritrócito com t-BOOH induziu aumento significativo na concentração de dissulfetos mistos. As proteínas de eritrócitos humanos submetidos ao tratamento com t-BOOH apresentaram mobilidade eletroforética alterada em decorrência da ligação de GSH a estas proteínas (LII & HUNG, 1997). A modificação da mobilidade eletroforética destas proteínas ocorreu principalmente pela formação de dissulfetos mistos e dissulfetos entre proteínas. Em condições oxidantes, as proteínas da membrana podem polimerizar-se formando agregados que são revertidos por agentes redutores, como DTT. Sob condições oxidantes a espectrina, principal proteína da membrana do eritrócito, apresenta-se associada principalmente à hemoglobina levando à alterações nas propriedades da membrana. Este comportamento foi primeiramente observado por TROTTA et al. (1981) através de estudos realizados com eritrócitos incubados na presença de t-BOOH. Mesmo após exaustivas lavagens, as membranas (“ghost”) permaneciam escurecidas sugerindo que derivados oxidados da hemoglobina permaneciam ligados.

1.5 - PRESENÇA DE GRUPOS TIÓIS REATIVOS NA HEMOGLOBINA

A hemoglobina humana normal apresenta 6 resíduos de cisteína/tetrâmero. Em sua conformação nativa, entretanto, apenas 2 grupos tióis são acessíveis, os das Cis 93 das duas cadeias β (KLEINSCHMIDT & SGOUROS, 1987). Estes resíduos

encontram-se em uma região importante que está envolvida na estabilização do estado T (Tenso) e também muito próximo da região de contato entre as subunidades no tetrâmero. Devido a sua localização e seu papel na estrutura da proteína, estes resíduos foram conservados em diferentes espécies animais. Portanto, a presença de grupos tióis reativos na hemoglobina não é uma característica exclusiva da hemoglobina humana. Em hemoglobina de vertebrados em geral, o número de resíduos de cisteína pode variar de 2 a 18 por tetrâmero (SULLIVAN & RIGGS, 1967; FYHN & SULLIVAN, 1975; REISCHL & DAFRÉ, 1992). O padrão de ocorrência de grupos tióis adicionais em hemoglobinas de vertebrados indica que estes devem ter um significado fisiológico importante para o eritrócito (REISCHL, 1989; DAFRÉ & RESICHL, 1990; TORSONI *et al.*, 1996). A presença de grupos tióis reativos no hemolisado de diferentes espécies animais está associada a presença de um grande número de bandas de hemoglobinas em eletroforese, em decorrência do processo de polimerização e formação de dissulfetos mistos.

A polimerização de hemoglobinas (HbS-SHb) após a hemólise, através da formação de pontes de dissulfeto, é um fenômeno frequentemente encontrado em espécies de elasmobrânquios, anfíbios e répteis (SVEDBERG & HEDENIUS, 1934; SULLIVAN, 1974ab; FYHN & SULLIVAN, 1975). A reversibilidade intracelular da polimerização foi descrita por SULLIVAN & RIGGS (1964) em estudos realizados com hemoglobina de tartaruga. As espécies que apresentam hemoglobinas ricas em

grupos tióis reativos, a formação de pontes de dissulfetos pode ocorrer entre os tióis da proteína e tióis de baixa massa molecular, como a glutathione (GSH), dando origem aos dissulfetos mistos (HbS-SG). Em hemoglobina humana, a formação de dissulfetos mistos induz uma maior afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e reduz a cooperatividade e o efeito Bohr (HUISMAN & DOZY, 1962). Entretanto, em eritrócitos humanos, a glutathione não está ligada à hemoglobina em significativa quantidade devido a baixa concentração da sua forma oxidada (GS-SG) no interior do eritrócito.

Estudos eletroforéticos em hemolisado de aves e tubarão, demonstraram que a formação dos dissulfetos mistos também levam a uma maior heterogeneidade eletroforética. A ligação de uma molécula de glutathione à hemoglobina adiciona uma carga positiva à proteína e, portanto, altera a sua mobilidade eletroforética (REISCHL & DAFRÉ, 1990; DAFRÉ & REISCHL, 1992). Este comportamento foi descrito em hemoglobinas de diferentes espécies quando expostas a condições que favorecem a formação de pontes de dissulfeto com glutathione. KOSOWER *et al.*, (1977) demonstraram que o tratamento de eritrócitos de ratos e humanos com diamida, um reagente oxidante de tióis, promoveu a completa oxidação da GSH à GS-SG. Estes mesmos autores demonstraram que em eritrócitos humanos, a GSH foi totalmente recuperada após tratamento com agente redutor. Adicionalmente, no eritrócito de rato, a GSH não foi oxidada a GS-SG, entretanto, a dosagem dos grupos tióis reativos na

hemoglobina após o tratamento com a diamida, revelou menor concentração de tióis reativos por molécula. Estes resultados sugeriram a formação de pontes de dissulfetos mistas entre a GSH e os tióis presentes na hemoglobina de rato. Recentemente, DI SIMPLICIO & ROSSI (1994) demonstraram que o eritrócito e o sangue de ratos, quando submetidos ao tratamento com agente oxidante (t-BOOH), apresentaram intensa oxidação da GSH a GS-SG este último posteriormente formou pontes de dissulfetos mistos na célula.

Nos répteis, em particular no quelônio da espécie *G. carbonaria*, as bandas eletroforéticas derivadas da ligação da glutathione à hemoglobina estavam presentes mesmo quando a hemólise era realizada com um agente alquilante. Estes resultados sugeriram a presença intracelular destes derivados (TORSONI *et al.*, 1996). A polimerização da hemoglobina nesta espécie, no entanto, somente foi observada quando o hemolisado foi estocado. A formação de polímeros é reversível pelo tratamento com um agente redutor (SULLIVAN & RIGGS, 1964; 1967; REISCHL, 1986).

A presença de grupos tióis reativos em hemoglobina de algumas espécies tem sido relacionado à resistência do animal à hipóxia. Estes grupamentos, em conjunto com a glutathione (GSH) e outros grupos tióis não protéicos, ofereceriam uma capacidade de tamponamento redox superior e/ou detoxificação de excesso de cátions metálicos (REISCHL, 1986; DAFRÉ & REISCHL, 1990).

Assim, espécies que apresentam hemoglobina rica em grupos tióis, capacidade de polimerização e formação de dissulfetos mistos podem estar refletindo um processo evolutivo que levou à seleção destas características. A presença de proteínas ricas em grupos tióis reativos no interior do eritrócito poderiam fornecer adicional poder redutor para a célula como citado acima. No entanto, não se conhece sobre existência da relação entre presença dos tióis reativos na hemoglobina e o maior poder redutor nestes eritrócitos.

Os estudos eletroforéticos do hemolisado das 2 espécies de tartarugas (*G. carbonaria* e *G. denticulata*) demonstraram diferenças na capacidade de polimerização das hemoglobinas e no número de bandas de hemoglobina em eletroforese em condições não desnaturantes (TORSONI *et al.*, 1996; 1998c). Enquanto no hemolisado da espécie *G. denticulata* apenas 2 bandas principais de hemoglobinas foram evidenciadas (Hb1 e Hb2), na espécie *G. carbonaria* pudemos distinguir 7 bandas. A estocagem do hemolisado em condições não redutoras por 7 dias a 4°C levou a uma maior heterogeneidade eletroforética. O mesmo comportamento não foi observado para o hemolisado de *G. denticulata* que mesmo após a estocagem mostrou o mesmo número de bandas. O perfil eletroforético do hemolisado em condições desnaturantes demonstrou que ambas as espécies apresentavam 3 tipos de cadeias de globina (G1, G2 e G3) (TORSONI *et al.*, 1998a; 1998b). Portanto, a heterogeneidade eletroforética do hemolisado de *G. carbonaria* é

proveniente da presença de grupos sulfidrilas reativos na hemoglobina confirmado pela titulação que demonstrou a presença 4 e 1,5 SH reativos/tetrâmero de Hb em *G. carbonaria* e *G. denticulata*, respectivamente.

A hipótese anteriormente citada, da participação de tióis de proteínas na detoxificação celular de agentes oxidantes fornecendo poder redutor ou GSH à célula é dependente de que as reações de óxido/redução dos grupos tióis das proteínas não altere as suas funções (DAFRÉ & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRÉ, 1992; DI SIMPLICIO & ROSSI, 1994; DI SIMPLICIO *et al.*, 1998). Muitas enzimas, quando formam dissulfetos mistos, tem sua atividade catalítica reduzida, devido a um mecanismo fisiológico de modulação da enzima. Para a hemoglobina, o papel na detoxificação celular, seria uma função adicional e, portanto, esta não deveria acarretar alterações significativas em suas características funcionais e conformacionais.

O hemolisado não modificado por reagentes de tióis das 2 espécies de tartarugas as quais apresentam diferenças no número de tióis reativos na hemoglobina foi analisado com relação às propriedades funcionais como a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, o efeito de polifosfatos orgânicos e o efeito do pH. Diferenças importantes entre as 2 espécies foram observadas: a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio demonstrada pelos valores de P_{50} (pressão de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios de ligação na hemoglobina) foi menor na espécie *G. denticulata*. Da mesma maneira, a hemoglobina de *G. denticulata* foi mais sensível a

presença de efetores alostéricos como ATP ou IHP. No entanto, similar efeito de pH (efeito Bohr) foi observado para as 2 espécies (TORSONI *et al.*, 1997; 1998c).

De acordo com os resultados descritos acima foi possível observar que a modificação da hemoglobina de *G. carbonaria* com a iodoacetamida promoveu significantes alterações nas propriedades funcionais, como efeito Bohr e afinidade pelo oxigênio. No entanto, o tratamento com glutathiona oxidada (GS-SG), que induz a formação de dissulfetos mistos com glutathiona (PS-SG), ou o tratamento com diamida, que induz principalmente a formação de polímeros de hemoglobina, não alterou significativamente os parâmetros como afinidade pelo oxigênio, efeito Bohr e cooperatividade (TORSONI *et al.*, 1996). Por outro lado, estas mesmas hemoglobinas modificadas apresentaram importantes alterações na susceptibilidade do heme à oxidação. A hemoglobina modificada por IAA ou GS-SG apresentou maior susceptibilidade a oxidação induzida por t-BOOH. A forma polimérica da hemoglobina apresentou, contudo, similares níveis de oxidação daquela não tratada com reagentes de tióis. Estes resultados sugerem que a hemoglobina em condições de estresse oxidativo, pode sofrer oxidação de seu grupos tióis e formar polímeros ou dissulfetos mistos sem que isto leve a uma alteração significativa da função. Contudo, a ligação da glutathiona a hemoglobina tornou a proteína mais susceptível à oxidação.

A modificação da hemoglobina nas 2 espécies também foi analisada com relação ao seu efeito em potencializar a peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos

humanos induzida por t-BOOH. A forma não tratada da hemoglobina de *G. carbonaria* mostrou um pequeno efeito antioxidante em baixas concentrações. Este efeito foi totalmente abolido quando a hemoglobina foi modificada por reagentes tióis, como IAA e NEM que potencializaram o efeito oxidante do t-BOOH sobre a membrana dos eritrócitos. Entretanto, a modificação da hemoglobina por diamida resultou em similar efeito ao demonstrado para a hemoglobina não modificada. As hemoglobinas humana e de *G. denticulata* não induziram significativa alteração. A dosagem dos grupos sulfidrila livres na hemoglobina após o tratamento com os reagentes tióis mostrou que apenas a IAA é capaz de reagir com todos os tióis na hemoglobina, enquanto que a diamida e a GS-SG promoveu apenas a oxidação parcial dos tióis reativos da hemoglobina (TORSONI *et al.*, 1996). Isto nos levou a sugerir que radicais formados pela interação da hemoglobina com o oxidante tem papel fundamental no processo de peroxidação lipídica em eritrócitos. A interação do heme com hidroperóxidos e a posterior formação de radicais que podem atacar membranas e outros componentes celulares foram sugeridos por VAN DER ZEE *et al.* (1989) e VAN DER BERG *et al.* (1992)

A atividade das enzimas glutathione redutase, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase foi determinada nos eritrócitos das 2 espécies de tartarugas (TORSONI *et al.*, 1998b). Os resultados demonstraram que as enzimas relacionadas com a manutenção da razão GSH/GS-SG na célula foram mais ativas na espécie *G.*

denticulata e as enzimas superóxido dismutase e catalase foram mais ativas na espécie *G. carbonaria*. Da mesma maneira na espécie *G. carbonaria* foi observada maior razão entre a glutathiona reduzida e a hemoglobina (1:1), enquanto que na espécie *G. denticulata* a razão foi de 0.5:1. Estes resultados sugerem que o sistema antioxidante do eritrócito de *G. carbonaria* tem maior capacidade de atuar sobre radicais formados pela autoxidação da hemoglobina (reação 1) e ainda, como sugerido por REISCHL *et al.* (1986) e DAFRÉ & REISCHL (1990), a presença de grupos tióis reativos em proteínas poderia oferecer um tamponamento redox adicional a célula.

2-PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PROJETO DE TESE

2.1-“EFFECT OF THIOL REAGENTS ON FUNCTIONAL PROPERTIES AND HEME OXIDATION IN THE HEMOGLOBIN OF *G. CARBONARIA*”

Biochem. Mol. Biol. Int. 40(2):355-364, (1996)

Resumo

A reação de reagentes tióis com a hemoglobina de *G. carbonaria* foi estudada e o equilíbrio com oxigênio e a cinética de oxidação dos derivados, determinadas. A afinidade pelo oxigênio e a cinética de oxidação dos derivados de hemoglobina foram modificadas com diferentes intensidade dependendo da natureza do reagente de tiol utilizado. A diamida produziu aproximadamente 80% de hemoglobina polimérica, embora não tenha levado a alteração da cinética de oxidação e as propriedades funcionais ($T_{1/2}=10$ min; $P50=5.0$ mmHg em pH 7,4; efeito Bohr alcalino=-0,64). Iodoacetamida não modificou significativamente padrão eletroforético, embora todos os grupos tióis livres da hemoglobina tivessem sido alquilados. Um $P50$ de 2,5 mm Hg em pH 7,4 e efeito Bohr de -0,15 foram obtidos; o $T_{1/2}$ de cerca de 6,4 min foi menor que aquele determinado para a hemoglobina não modificada. Similares $T_{1/2}$ foram obtidos para a hemoglobina tratada com glutathione oxidada, que produziu hemoglobina polimérica e glutathionil-hemoglobina. As características da ligação com a oxigênio mostraram que ambos derivados da hemoglobina, glutathionil-hemoglobina e hemoglobina polimérica, conservaram sua capacidade de transportar o gás.

EFFECT OF THIOL REAGENTS ON FUNCTIONAL PROPERTIES AND HEME
OXIDATION IN THE HEMOGLOBIN OF *Geochelone carbonaria*

Torsoni, M.A.; Viana, R.I.; Barros, B.F.; Stoppa, G.; Cesquini, M. and Ogo, S.H.

Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Received June 24, 1996

Received after revision August 6, 1996

SUMMARY: The reaction of thiol reagents with *G. carbonaria* hemoglobin was studied, and the oxygen equilibrium and kinetic of oxidation of derivatives determined. The oxygen affinity and kinetic of oxidation of hemoglobin derivatives were modified to various extents depending on the nature of thiol reagents used. Diamide yielded approximately 80% polymeric hemoglobin, although the oxidation kinetic, and the functional properties, were practically invariant ($T_{1/2}$ = 10.0 min.; $P50$ = 5.0 mm Hg at pH 7.4; alkaline Bohr effect = -0.64). Iodoacetamide did not modify the electrophoretic pattern significantly, although all the free SH groups of hemoglobin were alkylated. A $P50$ of 2.5 mmHg at pH 7.4 and the Bohr effect of -0.15 were obtained; the $T_{1/2}$ of about 6.4 min. was shorter than that for un-modified Hb. Similar $T_{1/2}$ were obtained for Hb treated with oxidized glutathione, which produced polymeric Hb and glutathionyl-Hb. The oxygen binding characteristics showed that both of Hb derivatives, glutathionyl-Hb and polymeric Hb, maintain the capacity to transport the gas.

Key Words: *Geochelone carbonaria*, polymeric hemoglobin, available SH groups, functional properties, glutathionyl-Hb.

INTRODUCTION

Considerable attention has been focused on reactive sulphydryl groups of Hb. Several reports have described the effect of thiol reagents on human hemoglobin (1,2,3) and thiol radical generation in rat erythrocytes treated with oxidizing agents (4,5). Different thiol reagents showed different rates of reaction with hemoglobin, as well as modifications of functional properties. The rate of oxidation of heme in hemoglobin modified by thiol reagents seems to be faster than that in un-modified hemoglobin (2).

Human hemoglobin contains cysteine $\beta 93$ residues which provide the only two accessible thiol groups at the surface of the molecule ($\alpha_2\beta_2$). Husmain & Dozy (6) demonstrated a highly increased oxygen affinity, a reduced cooperativity and a reduced alkaline Bohr effect in glutathionyl-Hb (HbS-SG). The Cys $\beta 93$ is located close to the subunits contact region within the tetramer and is very important in the stabilization of T state. The oxidation of this group promotes changes in the functional properties and leads to the dissociation of human hemoglobin (3). Hemoglobins of certain animal species present additional cysteine residues other than $\beta 93$, which may have physiological significance (7). SH rich hemoglobin is found in

various species of elasmobranchs, amphibians and reptiles (8,9,10,11), and the oxidation of these groups may lead to the formation of disulfide bridges either between tetrameric hemoglobin molecules or between hemoglobin and glutathione (glutathionyl-Hb or mixed disulfide), thus promoting electrophoretic heterogeneity (12,13,14). The formation of glutathionyl-Hb has also been reported in rat erythrocytes under oxidative stress conditions (15) and "in vitro" experiments with chicken Hb treated with oxidized glutathione (GSSG) (13). The formation of mixed disulfides "in vivo" may be related to regulatory and defensive processes (5,16), although the effect of thiol reagents on the functional properties of SH-rich Hb is almost unknown.

The hemoglobin of *G. carbonaria* provides an excellent model for studying the effect of thiol reagents on the functional properties of modified hemoglobin because it possesses approximately four available SH/tetramer, as well as a high level of polymerization and significant electrophoretic heterogeneity. This heterogeneity is a consequence of oxidation of available SH groups, producing mainly glutathionyl-Hb and polymers of Hb that may be present "in vivo" (12). Another interesting approach to be considered is the redox-state of red blood cells. According to Reglinsky et al. (17), the redox state of a cell can be transferred to other cell through the plasma membrane; hence, the thiol groups of hemoglobin in the reduced state could augment the redox buffer capacity not only of red blood cells, but also of the entire body, as happens with the acid-base balance.

In this context, we report here the functional behavior of glutathionyl-Hb and polymers of Hb that were obtained by treatment with oxidized glutathione (endogenous thiol reagent) and diamide (specific thiol reagent), respectively. The data obtained with these derivatives that seem to occur "in vivo" (12) are compared with un-modified Hb and with alkylated Hb (treated with iodoacetamide). The reaction of thiol reagents with hemoglobin was analyzed by: i- hemoglobin electrophoretic patterns; ii- changes in molecular mass of hemoglobin; iii- remaining thiol groups in the Hb after reaction with thiol reagents and iv- susceptibility of the Fe²⁺ heme of hemoglobin to oxidation. As model oxidant, we used, *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH), a simple organic hydroperoxide that may produce *t*-butoxy (RO[•]) or *t*-butylperoxy (ROO[•]) radicals.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: Diamide, oxidized glutathione (GSSG), *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH), Tris, Sephadex G-25 and G-100, Monobed MB-3 Amberlite, DTNP (2,2'-dithiobis[5-nitropyridine]), heparin and iodoacetamide (IAA) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Preparation of erythrocytes and hemoglobin solutions: Whole blood was drawn by cardiac puncture from adult specimens of *G. carbonaria*, using heparin (5,000 IU/ml) as an anticoagulant. The blood was centrifuged, the buffy coat removed and the red blood cells were washed twice with cold 1% NaCl. The total hemolysate was obtained by lysing the cells in distilled water and centrifuging out the cell membranes (2,500 g). The supernatant was freed of salts and small organic molecules by passage through a Sephadex G-25 column (2 X 25 cm)

equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer at pH 9.0 and on monobed resin (2 X 15 cm), obtaining the stripped hemoglobin.

Modified hemoglobin: The stripped hemoglobin of *G. carbonaria* was modified by mixing with iodoacetamide (molar ratio 1:200), or diamide (molar ratio 1:5); both mixtures were incubated at 25°C for 1 h. GSSG (molar ratio 1:1) was allowed to react for only 15 min. at 25°C, in order to avoid the formation of methemoglobin. Following incubation, the samples were passed through a Sephadex G-25 column. All procedures were performed in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4.

Protein thiol titration: A 30 μ l sample of 10 mM DTNP solution (3.1 mg/ml in ethanol) was added to 3 ml of hemoglobin solution at a concentration of 10 μ M (as heme) in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0. After 20 min., the A_{386} was measured against the blank consisting of hemoglobin at the same concentration and 30 μ l of ethanol. The absorption of DTNP was also subtracted, and the thiol concentration determined using an ϵ_{386} (mM) value of 14.0 (18).

Oxygen dissociation measurements: The oxygen dissociation curves of stripped and modified hemoglobin were determined in a Hitachi U2000 spectrophotometer at 25°C by tonometric method (19). The hemoglobin (50-60 μ M heme) were brought to 0.05 M ionic strength in Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA, in a pH range of 7.0-8.0. Oxygen binding curves were determined for stripped hemoglobin, as well as for stripped hemoglobin pre-treated with diamide, iodoacetamide or GSSG. The Bohr effect was expressed as $\Delta\text{LogP50}/\Delta\text{pH}$ between pH 7.0 and 8.0. Methemoglobin formation during Hb-O₂ affinity determinations was not significantly modified in samples treated with thiol reagents, remaining at a level below 10% (Table I).

The hemoglobin concentration of the hemolysate was estimated spectrophotometrically using extinction coefficient for human hemoglobin A (ϵ_{mM} of 13.8 cm^{-1} at 541 nm) (20) or as cyanomet-Hb by Drabkin reagent (100 mg NaCN and 300 mg K₃FeCN₆/L) (21). The hemoglobin solution was dissolved in Drabkin reagent to a concentration of 0.5-1.0 mg/ml and the absorbance (at 540 nm) after 20 min. determined against a Drabkin solution blank. Calculation of hemoglobin concentration was made using an ϵ_{mM} of 11.5 cm^{-1} at 540 nm (21).

The kinetics of oxidation of un-modified Hb and hemoglobin modified by thiol reagents were determined by the addition of 3.3 μ M t-BOOH. The hemoglobin concentrations were 40 μ M as heme. Determination of oxyhemoglobin, methemoglobin and hemicrome concentrations was performed measuring the absorbance of the solution at 560, 577, and 630 nm according to the method described by Winterbourn (21).

Gel filtration: Polymeric Hb and subunit dissociated Hb were determined by gel filtration on a Sephadex G-100 (94 X 2.5 cm) column previously equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, at 25°C. A sample containing approximately 12 mg of protein was applied to the column and the flow rate was maintained at about 12 ml/h. The Hb was eluted with the same buffer. The absorbance of the eluate was read at 541 nm.

PAGE: Electrophoresis was carried out under non-denaturant conditions at room temperature (22, 23) in 7.5% (for resolution gel) and 3.5% polyacrylamide (for stacking gel). 0.05 M Tris-HCl, pH 8.1, was used as anodic buffer and 0.05 M Tris-glycine, pH 9.0, as the cathodic buffer; the current was maintained constant throughout the experiment (1.5 mA/sample). Both control samples and those treated with a reducing agent (dithiothreitol), each containing about 40 μ g of protein, were applied; staining of the gel was performed with 0.05% Coomassie Brilliant Blue dissolved in a solution of 7% acetic acid and 14% methanol

RESULTS AND DISCUSSION

All three of the thiol reagents analyzed reacted at least partially with the hemoglobin of *G. carbonaria* as seen in the electrophoretic pattern (Fig. 1) and by the fact that there were thiol groups remainder (Table I). The hemoglobin treated with GSSG showed a modified electrophoretic pattern, with higher mobility bands in the direction of the anode as compared to un-modified Hb (Fig. 1A, B). Oxidized glutathione reacted partially with available SH groups of hemoglobin forming glutathionyl-Hb, derivatives from original bands 3 and 6, (Fig. 1B); similar phenomenon was previously described for chicken Hb (13). Nevertheless, reactive thiol groups of the protein were still present after incubation with GSSG (2.9 SH/Hb tetrameric) (Table I).

In samples treated with diamide (Fig. 1C), the band 5 and the polymeric band with little anodic mobility (band 7) became more evident. In a GSH-free solution of *G. carbonaria* Hb, the specific thiol oxidizing reagent, diamide, yielded approximately 80% polymeric Hb after 1 h. of reaction, and about 1.6 SH/tetrameric Hb remained intact (Fig. 1C, and Table I). When GSH was present, the introduction of diamide promoted the formation of not only polymeric Hb, but also mixed disulfides, corroborating previous data (15).

Treatment with IAA (Fig. 1D) did not produce any significant alterations in electrophoretic pattern, except that bands 1 and 2 became somewhat weaker. No remnant reactive thiol groups were observed (Table I) indicating that IAA, a non-charged molecule, reacted completely with

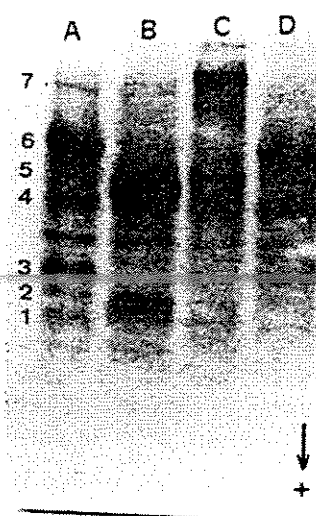


Fig. 01: Electrophoretic pattern of *Geochelone carbonaria* Hb at pH 8.9 treated with thiol reagents. The gels were stained with Coomassie Blue. (A): Un-modified hemoglobin (control); (B): Hemoglobin treated with GSSG; (C): Hemoglobin treated with diamide; (D): Hemoglobin treated with IAA.

Table I- Summary of oxygen equilibria and kinetics of oxidation of *Geochelone carbonaria* hemoglobin expressed as T_{1/2}.

Compound	P50mmHg (at pH7.4)	Bohr effect (pH 7.0-8.0)	nH (at pH7.4)	T _{1/2} (min.) n=5	Polymer *	SH/Hb tetrameric remnant	% ** HbFe ³⁺
None (control)	6.3	-0.55	1.5	12.6 ±1.0	6%	4.1	5
Diamide	5.0	-0.64	1.5	10.0±0.8	80%	1.6	8
IAA	2.5	-0.15	1.5	6.4±0.5	4%	0	8
GSSG	15.1	-0.70	1.2	5.0 ±0.5	24%	2.9	7

* obtained from Fig. 2.

** % metHb at beginning of equilibrium experiments.

hemoglobin, although it did not markedly modify the surface charge of the molecule. Garel et al. (2) pointed out that the treatment of a suspension of red blood cell with IAA also leads to complete modification of human hemoglobin.

The data on molecular mass determination on Sephadex G-100 enable the verification of the presence of subunits or polymers in the Hb solution (Fig.2). At pH 7.4 essentially all unmodified Hb was eluted as a single peak with an elution volume (Fig. 2A) corresponding to the tetrameric form, according to the calibration curve. The treatment of hemoglobin with GSSG, IAA and diamide failed to induce much dissociation, although the hemoglobin did react with diamide (Fig.2C), resulting in a substantial increase in the polymeric fraction (about 80%) which eluted at a lower elution volume. The polymeric fraction detected by gel filtration in the Hb treated with GSSG (Fig.2D) was probably formed during the experiment, since it was not detected by electrophoresis (Fig. 1B).

A study of the oxidation of hemoglobin promoted by t-BOOH made it possible to establish the time required to oxidize 50% of hemoglobin (T_{1/2}). The rate of oxidation was greater for modified Hb than for un-modified control: 50% of the alkylated hemoglobin and hemoglobin pre-treated with GSSG were oxidized in 6.4 min. and 5.0 min. respectively, while for un-modified hemoglobin, this took 12.6 min. (Figs. 3A, 3C, 3D and Table I). These increases in the rate of oxidation were probably due to conformational alterations of Hb exposing the Fe²⁺ heme to oxidation (2).

The modification of proteins in the cell by the attack of oxidant agents may increase hydrophobicity, thus leading to Hb denaturation (24). However, certain thiol oxidants like diamide can modify the functional properties of hemoglobin without denaturation and proteolysis (2, 25). In fact, the kinetic of oxidation (Figs.3A, 3B and Table I) as well as the

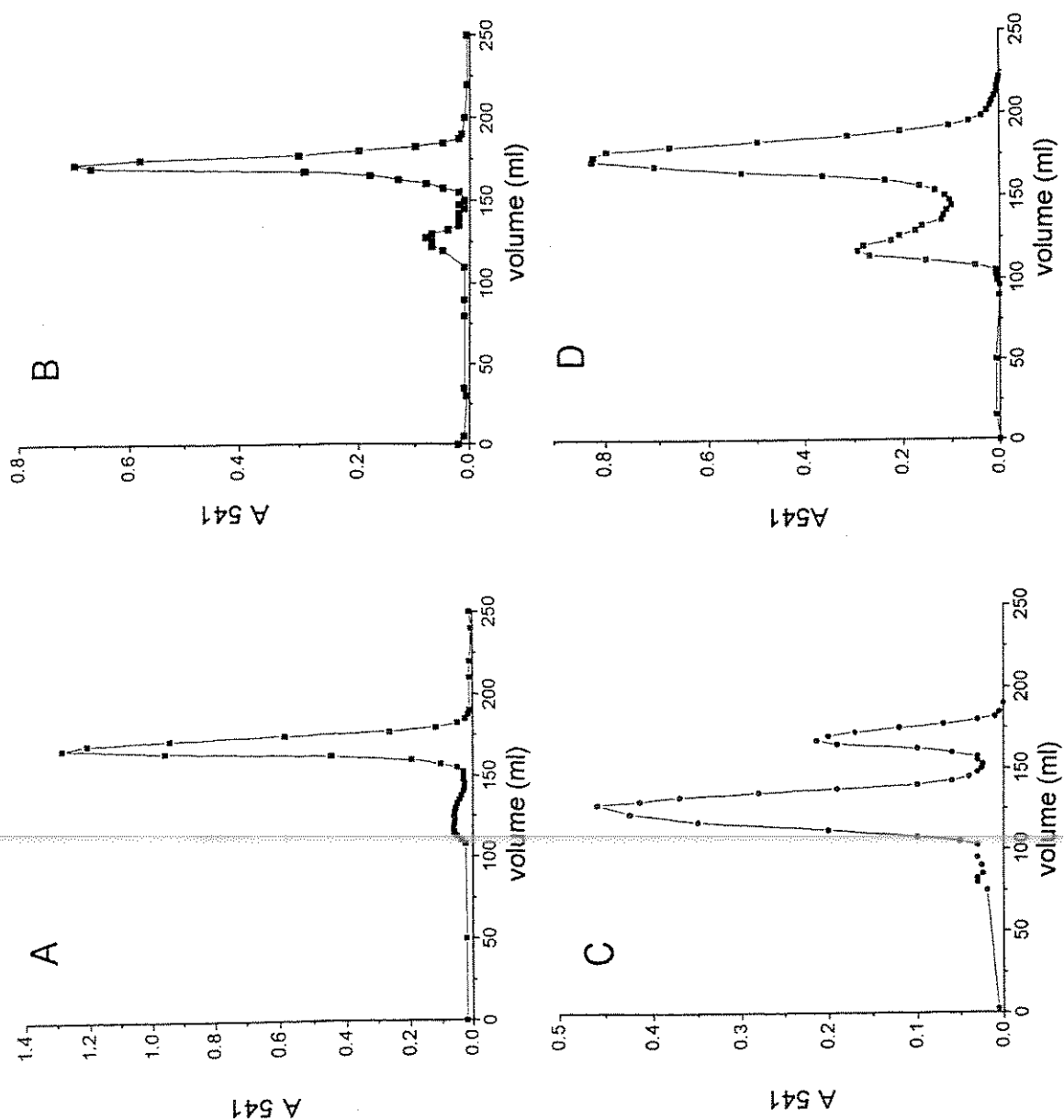


Fig. 02: Gel filtration pattern of *Geochelone carbonaria* Hb on Sephadex G-100. (A): Unmodified hemoglobin (control); (B): Hemoglobin treated with IAA; (C): Hemoglobin treated with diamide; (D): Hemoglobin treated with GSSG. All samples were eluted with 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA, at 25°C. All

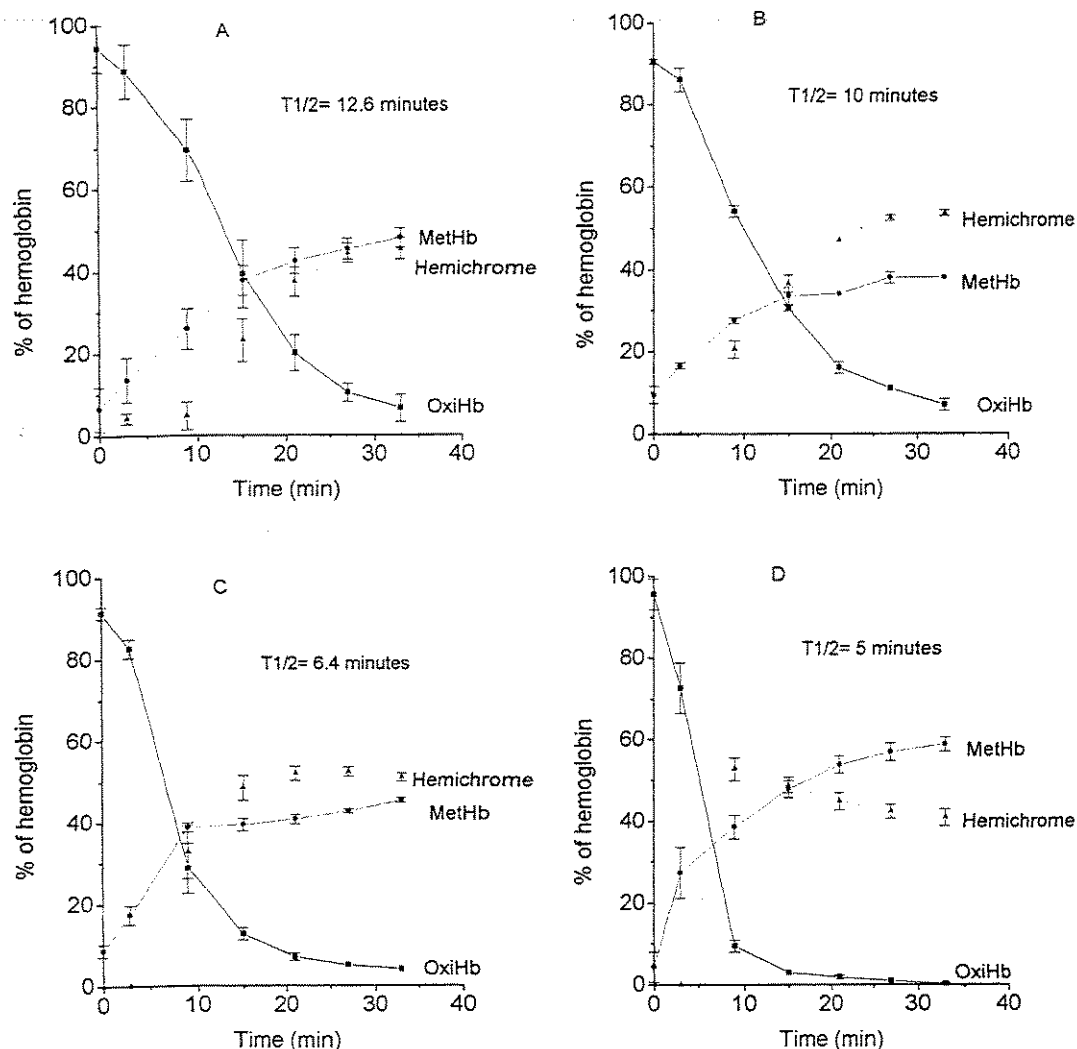


Fig. 03. Kinetics of oxidation of *Geochelone carbonaria* Hb by t-BOOH (■). Oxyhemoglobin (●) Methemoglobin; (▲) Hemichrome. A: Un-modified hemoglobin (control); B: hemoglobin treated with diamide; C: hemoglobin treated with IAA; D: hemoglobin treated with GSSG. Experimental conditions are given in Material and Methods.

functional properties (Fig. 4A, 4B) of polymeric Hb, that was obtained by reaction with diamide, were similar to those of stripped un-modified monomeric Hb ($\alpha_2\beta_2$), indicating that the protein treated with diamide, did not undergo denaturation process.

The oxygen affinity of hemoglobin was modified with thiol reagent like iodoacetamide (Fig. 4A; Table I). The stripped hemoglobin (un-modified) revealed a P50 of 6.3 mmHg at pH 7.4, whereas the alkylated Hb (treated with IAA) showed a P50 value of 2.5 mmHg. In

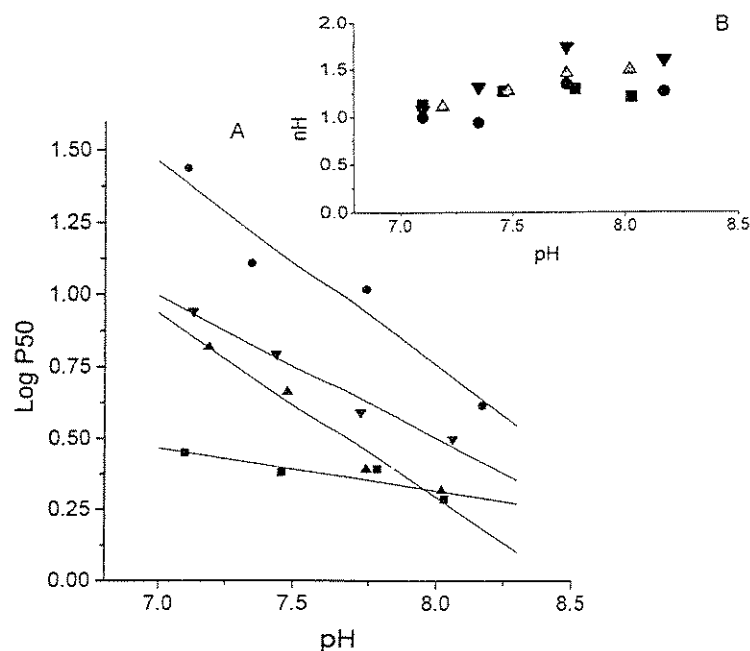


Fig. 04. Oxygen affinity expressed by Log P50 and nH values as a function of pH of *Geochelone carbonaria* Hb, at 25°C. The solutions were buffered against 0.05 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA. (▼) Un-modified hemoglobin (control); (■) Hb treated with IAA; (▲) Hb treated with diamide; (●) Hb treated with GSSG

glutathionyl-Hb obtained by treatment with GSSG (1:1 molar ratio), this value increased to 15.1 mmHg. The nH values (cooperativity) of modified hemoglobins remained low of about 1.5 in the range of pH studied (Fig. 4B; Table I). The alkaline Bohr effect (between pH 7.0-8.0) observed in hemoglobin modified by GSSG and diamide was -0.70, -0.64, respectively, similar to un-modified Hb (control). Samples treated with IAA, however, revealed a significant reduction of the Bohr effect (-0.15) (Table I). Therefore, the alkylated derivative with a greatly increased oxygen affinity and a reduced Bohr effect, suggest that the alkylation of thiol groups promotes the destabilization of the protein. The hypothesis of dissociation was eliminated by molecular mass determinations that revealed essentially tetrameric forms (Fig. 2B). It should be emphasized that Hb derivatives, glutathionyl-Hb and polymeric Hb, maintain the reversible Hb-O₂ binding properties, as indicated by data of functional properties (Fig. 4). As suggesting by Torsoni et al., (12,) these products of oxidation of the Hb available SH groups seem to occur in the blood of *G. carbonaria*, under oxidative stress condition.

Some authors related the presence of free thiol groups in hemoglobin and the capacity to forming mixed disulfides to mechanism of cellular protection. The formation of this component (HbS-SG) in erythrocytes could prevent the accumulation of GSSG in the cell (7), thus avoiding the deleterious effect of oxidized glutathione on cellular function.

Under physiological conditions the reduced thiol exceeds the oxidized forms, thus maintaining a low polymer or glutathionyl-Hb content. Under condition of oxidative stress, however the oxidized forms of thiol (polymeric Hb and mixed disulfide) should increase avoiding the accumulation of intracellular GSSG. This may be part of the defense mechanism of the cell, since the SH groups of Hb seem to have a direct participation in the detoxification process of erythrocyte environment (16).

GSH is the most important non-protein thiol source and plays an essential role in the maintenance of redox status and antioxidant defense (26). In *G. carbonaria* blood 1.08 GSH/Hb (tetramer) were found for every 4.1 Hb-SH/Hb (tetramer) (12). This ratio and the high reactivity of Hb-SH suggest that thiol groups of Hb may be relevant as a reservoir of reduced power in the blood. Both glutathionyl-Hb and polymeric Hb prevent the accumulation of intracellular GSSG or avoid the extrusion by ATP dependent translocase (27). If the oxidized glutathione is not reduced to GSH or extruded into extracellular space, it might interact with enzymes, and transport system activities and membrane proteins, causing disturbance of the proteins function during oxidative stress and leading to cytotoxicity (28).

Although the thiol oxidation may be one of the first steps in the degradation process of the protein, it seems that the reactions leading to the formation of polymers and glutathionyl-Hb are reversible; thus, monomeric Hb ($\alpha_2\beta_2$) and GSH can be recuperated (5). The oxygen binding properties of *G. carbonaria* Hb were not substantially modified in either the polymeric form of Hb nor the glutathionyl-Hb, thus indicating that the protein is still in the native form. Therefore, reversibility of the reaction forming polymers and mixed disulfide of Hb means that the protein is available to fulfill its function even under oxidative stress condition.

ACKNOWLEDGMENTS: The present work was supported by grants from the following Brazilian Agencies: FAPESP (94/0174-6), CNPq (520110/94-3) and FAEP (0534/93). The first author is a doctoral student in the Department of Biochemistry of the Institute of Biology at the State University of Campinas (UNICAMP), supported by a CAPES fellowship.

REFERENCES

1. Taylor, J. F.; Antonini, E.; Brunori, M. and Wyman, J. (1966) J. Biol. Chem. 241, 241-248.
2. Garel, M. C. Beuzard, Y.; Thillet, J.; Domenget, C.; Martin, J.; Galacteros, F. and Rosa, L. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 513-519.
3. Garel, M. C., Domenget, C.; Martin, J. C.; Prehu, C.; Galacteros, F. and Beuzard, Y. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14704-14709.
4. Kelman, D. J. and Mason, R. P. (1993) Arch. Biochem. Biophys. 306, 439-442.
5. Maples, K. R.; Kennedy, C. H.; Jordan, S. J. and Mason, R. P. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 277, 402-409.
6. Huisman, T. H. J. and Dozy, A. M. (1962) J. Lab. Clin. Med. 60, 302-319.
7. Reischl, E. (1989) In Non-mammalian animal models for biomedical research (Edited by Woodhead A. D.) Chap. 18, 309-318.

8. Sullivan, B. (1974a) Amphibian Hemoglobins. In Chemical Zoology (Edited Florkin, M. and Schefer, B.T.) vol. 9, pp. 77-118. Academic Press, New York.
9. Sullivan, B. (1974b) Reptilian Hemoglobins. In Chemical Zoology (Edited Florkin, M. and Schefer, B.T.) vol. 9, pp. 353-374. Academic Press, New York.
10. Fyhn, U.E. and Sullivan, B. (1975) *Comp. Biochem. Physiol.*, 50B, 119-129.
11. Reischl, E.; Hampe, O. G. and Crestana, R. H. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 207-210.
12. Torsoni, M. A. and Ogo, S. H. (1996) *J. Comp. Physiol.* (Submitted).
13. Reischl, E. and Dafré, A. L. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 102B, 849-853.
14. Dafré, A. L. and Reischl, E. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 215-219.
15. Kosower, N. S.; Kosower, E. M. and Koppel, R. L. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 529-534.
16. Brigelius, R. (1985) In oxidative stress (Edited by Sies H.) 243-272.
17. Reglinski, J., Hoey, S., Smith, W.E and Surrock, R.D. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 12367-12366.
18. Grassetti, D. R. and Murray, J. F. (1969) *J. Chromatogr.* 41, 121-123.
19. Riggs, A. and Wolbach, R. A. (1956) *J. Gen. Physiol.* 39, 584-605.
20. Antonini, E. and Brunori, M. (1971) In Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands (Neuberger, A. and Tatum, E. L. eds.) 13-39, Elsevier, Amsterdam.
21. Winterborn, C. C. (1990) *Meth. Enzymol.* 186, 265-272.
22. Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
23. Ornstein, L. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321-349.
24. Martinez-Cayuela, M. (1995) *Biochimie* 77, 147-161.
25. Bellomo, G.; Mirabelli, F.; Dimonte, D. Richelmi, P.; Thor, H.; Orrenius, C. and Orrenius, S. (1987) *Biochemical Pharmacol.* 36, 1313-1320.
26. Sies, H. (1985) In oxidative stress (H. Sies, ed.) 75-90, Academic Press, London.
27. Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) *Ann. Rev. Biochem.*, 52:711-760.
28. Srivastava, S and Beutler, E. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 9-16.
29. Nicotera, P., Moore, M., Bellomo, G., Mirabelli, F. and Orrenius, S. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 1999.

2.2-"INVOLVEMENT OF AVAILABLE SH GROUPS IN THE HETEROGENEITY OF HEMOGLOBIN FROM THE TORTOISE *G. carbonaria*"

Biochem. Mol. Biol. Int. 44(4):851-860, (1998)

Resumo

A hemoglobina de *G. carbonaria* foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e purificada por cromatografia de troca iônica em CM-celulose. Sete frações foram obtidas usando hemoglobina recém coletada. A cromatografia em CM-celulose da hemoglobina reagida com iodoacetamida mostrou um componente menor (HbI) e uma maior (HbII). A análise da massa molecular da hemoglobina recém coletada e da hemoglobina estocada determinada por filtração em gel mostrou que a polimerização aumentou com a duração da estocagem. A reação com a glutathiona oxidada mudou o padrão eletroforético da hemoglobina e aumentou as bandas que correspondiam a glutathionil-hemoglobina. A presença destas bandas na hemoglobina recém coletada e as amostras alquiladas sugerem que elas podem ocorrer in vivo. PAGE em condições dissociantes mostrou que o hemolisado continha 3 diferentes tipos de cadeias de globina (G1, G2 e G3). Ambos os componentes apresentam a globina G1, contendo o componente HbI, as globinas G1 e G2 e o componente HbII, G1 e G3.

INVOLVEMENT OF AVAILABLE SH GROUPS IN THE HETEROGENEITY OF
HEMOGLOBIN FROM THE TORTOISE *Geochelone carbonaria*

M. A. Torsoni, A. Souza-Torsoni and S. H. Ogo*

Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas,
SP, Brasil.

Received December 18, 1997

Received after revision, December 18, 1997

SUMMARY

Geochelone carbonaria hemoglobin (Hb) was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and purified by ion exchange chromatography on CM-cellulose. Seven fractions were obtained using fresh Hb preparations. CM-cellulose chromatography of Hb reacted with iodoacetamide, showed one minor (HbI) and one major band (HbII). Analysis of the molecular masses of recently collected Hb and of aged solutions determined by gel filtration showed that polymerization increased with the duration of storage. The reaction with oxidized glutathione changed the electrophoretic pattern of Hb, and highlighted the bands corresponding to glutathionyl-Hb. The presence of these bands in fresh Hb solutions and in alkylated preparations suggests that they may occur *in vivo*. PAGE under dissociating conditions showed that the hemolysate contained 3 different polypeptide chains (G₁, G₂ and G₃). Both Hb components shared the G₁ globin chain with HbI containing G₁ and G₂ and HbII, G₁ and G₃ chains.

Key words: Tortoise, *Geochelone carbonaria*, Hb heterogeneity, Sulphydryl groups, Polymerization, Hb-mixed disulfide.

INTRODUCTION

The diversity in the structure and function of Hb reflects the remarkable variation in morphology and adaptation among members of the animal kingdom. Multiple Hbs frequently occur in vertebrate red blood cells (1-6). The physiological significance of this heterogeneity has been hypothesized to represent an adaptation to cope with a variable environment (4,5). Many vertebrate groups such as elasmobranchs, reptiles and amphibians display Hbs that polymerize under oxidizing conditions or upon storage to form aggregates of tetramers (4-8). These Hbs contain reactive sulphydryls and polymerize through disulfide bridges, thereby generating a complex electrophoretic pattern that is frequently difficult to interpret.

* To whom all correspondence should be addressed

The occurrence of SH groups in Hb and their physiological significance have been extensively studied (9-12). A possible role of Hb as an auxiliary mechanism for protection against reactive oxygen and other oxidant molecules has been proposed. In this case, the Hb would function as a redox buffer of red blood cells, thereby augmenting the resistance of the animal to hypoxia.

We have investigated the occurrence of reactive SH groups in the Hb of *G. carbonaria*, as well as this protein's capacity to polymerize and to form mixed disulfide bonds with glutathione. Torsoni et al. (13), demonstrated that *G. carbonaria* erythrocytes have a SH/Hb ratio of 4.1 and a GSH/Hb ratio of around 1.0. To examine contribution of the reactive thiol groups in this Hb to the electrophoretic heterogeneity of the hemolysate, disulfide bridge formation was prevented by the sulphhydryl reagent, iodoacetamide (IAA). The results suggest that disulfide bridges involving two or more Hb molecules and Hb/non-protein SH groups are responsible for the complex electrophoretic pattern observed. This interaction may represent a strategy for avoiding the accumulation of GSSG in erythrocytes, since oxidized glutathione is known to have deleterious effects (14).

MATERIAL AND METHODS

Specimens of the terrestrial tortoise *G. carbonaria* (1.5 to 2.5 Kg) (15) used in the present investigation were supplied by the Bosque dos Jequitibás, Campinas, and were kept in the laboratory for approximately one month. Blood obtained by cardiac puncture was collected into a cooled syringe containing 100 µl of sodium heparin (5000 IU/ml). Prior to sampling, the puncture site was disinfected with ether and a local anesthetic (lidocaine) was applied at a low dose that had no systemic effects (16). Using this technique, blood could be drawn aseptically from a conscious tortoise within a few minutes.

Preparation of Hb solutions: Red blood cells were washed three times in 10 vol. of cold NaCl (1.7% w/v), containing 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and then lysed in 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5, as previously described (17). The mixture was centrifuged at 2,500 x g for 15 min to remove cellular debris. The supernatant was stripped of salts and small molecules by passing through a 2.0 cm x 25 cm column of Sephadex G-25 equilibrated with 50 mM Tris and 1 mM EDTA, followed by chromatography on a column of MB-3 Amberlite (2.0 cm x 20 cm).

Hb concentrations were estimated spectrophotometrically using the mM extinction coefficient for human Hb A (18), or as cyanomethHb using Drabkin reagent (100 mg NaCN and 300 mg K₃FeCN₆ dissolved in 1 liter of water). Total conversion was ensured by adding a known volume of blood (25-50 µl) to 1 ml Drabkin's solution (19). The purified Hb was used as soon as possible after preparation and was not frozen.

Modified Hb: The reaction of Hb with oxidized glutathione (GSSG) was performed at a final Hb:GSSG ratio of 1:10. The reaction was allowed to proceed for 60 min at 25°C, pH 7.5 and the formation of glutathionyl-Hbs was subsequently monitored by PAGE at alkaline pH.

The reaction of SH groups with iodoacetamide (IAA) (20) was carried out by incubating freshly prepared hemolysate (1.3 mM) with IAA (0.38 M) for 1 h at 25 °C or by incubating 0.3 ml of washed packed red blood cells with 2 ml of 0.10 M IAA. The solutions were dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 6.5, containing 1 mM EDTA, for 20 h at 4°C.

Ion exchange chromatography: The stripped Hb was dialyzed against 25 mM Tris-HCl plus 1 mM EDTA, pH 6.0, and applied to a column (1.8 cm x 20 cm) of CM-cellulose equilibrated with the above buffer. The column was washed with this same buffer and the first peak eluted immediately. Subsequent fractions were eluted by changing the pH from 6.0 to 8.0 in a gradient fashion. The last component was eluted by changing the pH of the buffer to 9.0. The separation was carried out at 20°C and the elution monitored at 541 nm. The fractions thus obtained were checked by PAGE.

Hemolysate treated with IAA was chromatographed on a 2.5 cm x 15 cm column of CM-cellulose equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 6.5, containing 1 mM EDTA. The Hb fractions were eluted with a pH gradient from pH 6.5 to 8.0.

PAGE: Identification of the Hb components was achieved by slab polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at room temperature using stacking gel of 3.5% acrylamide and running gels of 7.5% acrylamide. All gels were run at 1.5 mA/sample for about 4 h using 50 mM Tris-glycine, pH 8.9, in the upper buffer reservoir and 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, in the lower buffer reservoir (21,22). The samples for electrophoresis were prepared by mixing 20 µl of Hb solution (about 50 µg of protein), 20 µl of upper electrode buffer, 20 µl of glycerol and 20 µl of lower electrode buffer. The Hb bands were detected using 0.05% Coomassie Brilliant Blue R in an acetic acid : methanol : water solution (1:2:4, v/v) and destained in a solution containing 7% acetic acid and 14% methanol.

Globin chains in 30 µg samples of Hb were separated by a modification of the method described by Alter et al. (23) using electrophoresis on 12% polyacrylamide gels containing 6 M urea and 2% Triton X-100 in 5% acetic acid. The gels were run at 10 mA for 15 h and then stained for 24 h in 0.05 % Coomassie Blue followed by destaining in a 7% acetic acid and 30% methanol solution.

Gel filtration: The molecular masses of the Hbs were determined by gel filtration on a column (2.5 cm x 100 cm) of Sephadex G-200 equilibrated at 20° C with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA. Samples of Hb (2.0 ml, 12 mg/ml) were applied and the absorbance of the eluate was read in a Hitachi spectrophotometer at 541 nm. The void volume (V_o) was determined using blue-dextran. The column was calibrated with dimeric *L. miliaris* Hb, 32 KDa (24), tetrameric human Hb, 64 KDa and catalase, 240 KDa. The parameters V_o , V_t and V_e were used to calculate the constant K_{av} , as described by Laurent and Killander (25). The data were plotted as K_{av} of the marker proteins and unknown samples vs molecular mass.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrophoretic analysis of hemolysates from *G. carbonaria* indicated the presence of multiple Hb components (Fig. 1A). In agreement with this, fresh Hb solutions could be separated into 7 fractions by chromatography. (Fig. 1B). An additional band (number 8) appeared following storage of the Hb (Fig. 1A). PAGE of hemolysates treated with the reducing agent β -mercaptoethanol (24 mM) yielded three main Hb bands: 3, 4, and 6, thus indicating that bands

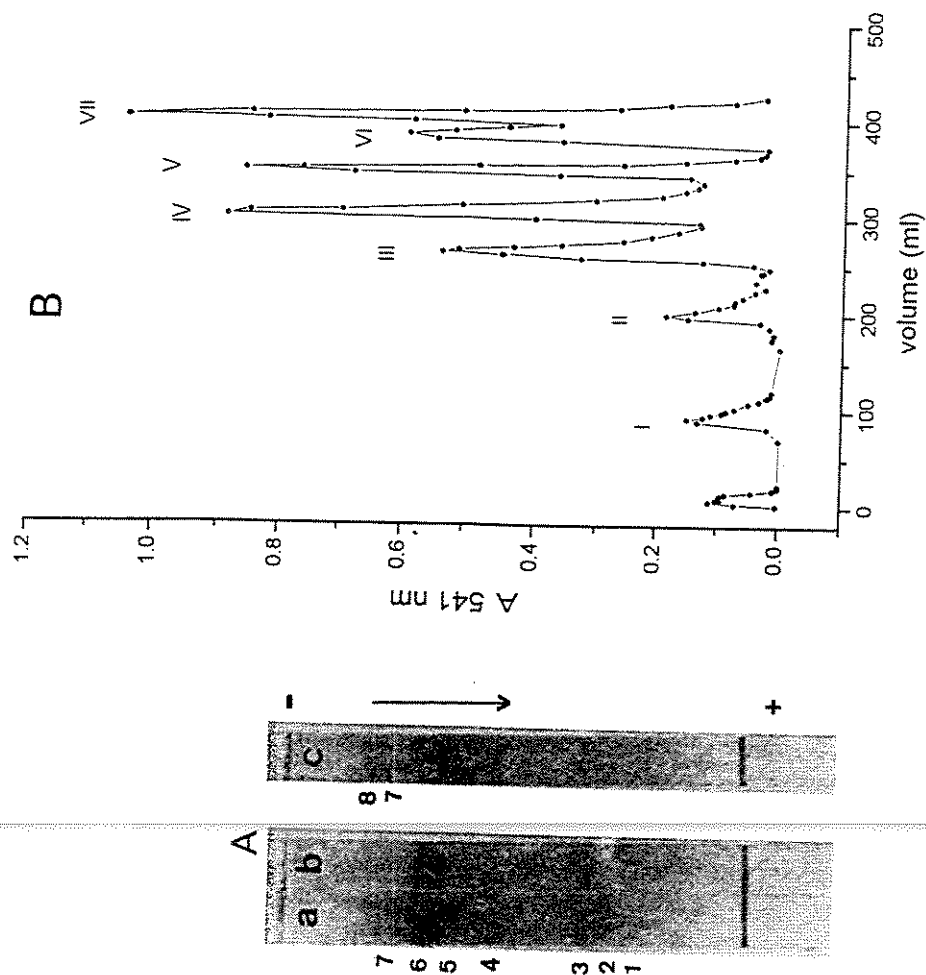


Fig. 1: (A) PAGE profiles of *G. carbonaria* Hb at pH 8.9. (a) freshly collected hemolysate, (b) freshly collected hemolysate treated with 24 mM β -mercaptoethanol, and (c) aged Hb (10 days after hemolysis). The gels were stained with Coomassie blue. (B) Elution profile of fresh stripped hemolysate following chromatography on CM-cellulose. The proteins were eluted with 25 mM Tris-HCl, containing 1 mM EDTA, and a pH gradient 6.0-9.0. The absorbances were determined at 541 nm. The eluted fractions (I-VII) were named according their order of elution.

1,2,5 and 7 were disulfide bond products (Fig. 1A). Sullivan and Riggs (3) have reported that the Hb of many turtle species can show varying degrees of polymerization.

The treatment of fresh hemolysates with GSSG in equimolar amounts lead to the formation of more mixed disulfides (HbS-SG), thus intensifying the bands 2 and 4 (Fig. 2). Thus, bands 1 and 2, and bands 4 and 5 appear to originate from bands 3 and 6, respectively, through the binding of different amounts of glutathione. Reischl and Dafré (12) observed that the reaction of chicken Hb with GSSG increased the electrophoretic mobility of the Hb through the formation of glutathionyl-Hb, in which each glutathionyl residue bound added two negative charges to the Hb molecule at the specified pH and ionic strength.

The glutathionyl-Hb of *G. carbonaria* can be partially reduced by DTT although the original electrophoretic profile can be recovered as shown in figure 2.

To avoid the oxidation of thiol groups, alkylation with IAA was carried out. The elution profile of alkylated Hb revealed a minor (34%, Hb1), and a major (66%, Hb2) component (Fig. 3A). PAGE of the alkylated preparations showed several small components in addition to Hb1 and Hb2, probably resulting from glutathionyl-Hb formation (Fig. 3B). Although the reaction with

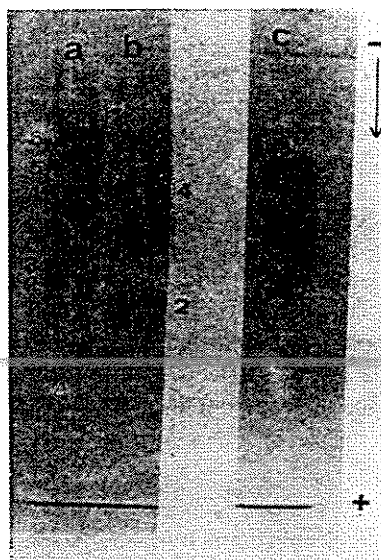


Fig. 2: PAGE profile (pH 8.9) of *G. carbonaria* Hb reacted GSSG. (a) Total hemolysate, (b) Hb reacted with GSSG (1:10) for 15 min at 25°C, pH 8.9, and (c) Hb reacted with GSSG (1:10) for 15 min. at 25°C, pH 8.9, and then reduced with 24 mM DTT. The gels were stained with Coomassie blue.

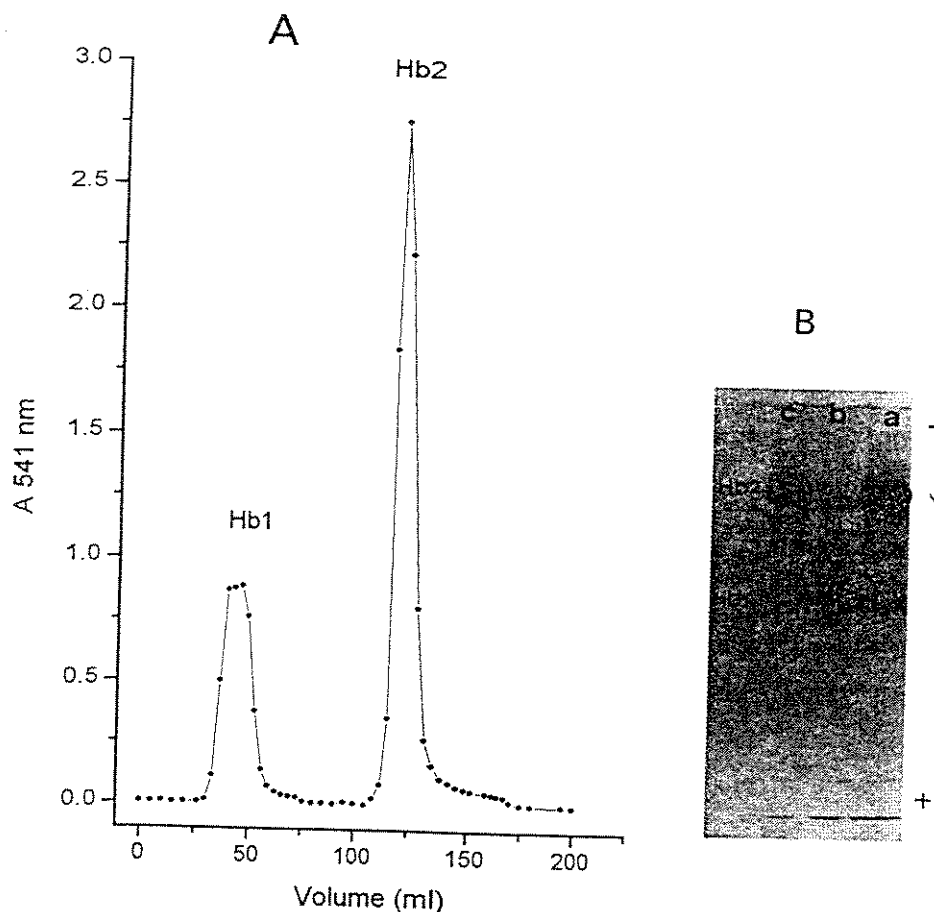


Fig. 3: (A) Elution profile of IAA-treated *G. carbonaria* Hb from a column of CM-cellulose using 50 mM Tris-HCl, containing 1 mM EDTA, and a pH gradient 6.5 - 8.0. The sample was prepared by lysing 2 ml of washed, packed red blood cells with 2 ml of 0.1 M IAA and dialyzing against 50 mM Tris-HCl, pH 7.0. The absorbances were determined at 541 nm and the eluted fractions named Hb1 and Hb2 according to their order of elution. **(B)** PAGE profile (pH 8.9) of IAA-treated *G. carbonaria* Hb. The gels were stained with Coomassie blue. (a) IAA-treated total hemolysate, (b) component Hb1, and (c) component Hb2 from CM-cellulose chromatography of the IAA-treated hemolysate.

IAA was performed soon after blood collection by hemolysis in a 100 mM IAA solution, the above heterogeneity was still seen. We, therefore, hypothesized that glutathionyl-Hb was present *in vivo*.

PAGE under dissociating conditions showed three distinct polypeptide subunits (G_1 , G_2 and G_3) in the total hemolysate (Fig. 4A). The alkylated components Hb1 and Hb2, isolated by chromatography contained $G_1 + G_2$ and $G_1 + G_3$ globin chains, respectively (Fig. 4B). Other

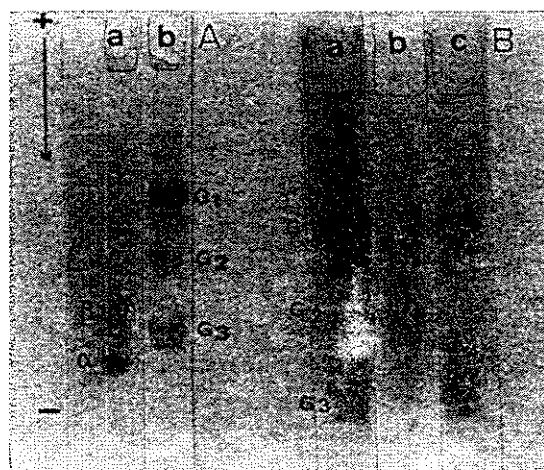


Fig. 4: PAGE of the globin chains of *G. carbonaria* Hb in the presence of Triton X-100 and Urea, at acid pH. The gels were stained with Coomassie blue. (A) non-alkylated Hb: (a) human Hb, (b) *G. carbonaria* Hb. (B) Alkylated Hb: (a) total Hb, (b) component Hb1, and (c) component Hb2.

turtle species have a similar composition. Thus, *Chrysemis picta bellii* and *Phrynops hilarii* (26) possess two Hb components and three types of polypeptide chains. In these case, the β chain was common to both components (HbA and HbD), whereas the α^A chain present in HbA (the major component) was substituted by an α^D chain in HbD (the minor component). The α^D chain has been reported to occur only in birds and turtles and is considered to represent embryonic gene expression that persists in adult (27).

As mentioned above, the multiple Hb components with molecular masses ≥ 65 KDa present in *G. carbonaria* hemolysates may be attributed to the presence of polymer and mixed disulfide Hb. The capacity for polymerization involving disulfide bridges was examined by gel filtration on Sephadex G-200. Polymerization increased with the duration of storage as freshly prepared hemolysate contained little polymer. After 210 days of storage at 4°C, 73% of the total hemolysate was consisted of Hb molecules of 256 KDa. Similar findings have been reported for Hb from several elasmobranch (6) and numerous turtle (9,28) species. The electrophoretic profile of hemolysate stored for 210 days, as well as the monomeric and polymeric fractions obtained by gel filtration, are shown in figure 5A. The distribution of globin chains in the monomeric (1x tetramer) and in the polymeric (4x tetramer) fractions is shown in figure 5B. In the monomeric fraction, G_1 and G_3 polypeptide chains were present, whereas in the polymeric fraction, the globin chains G_1 , G_2 and G_3 were present, thus indicating that Hb1 and Hb2, participated in the polymerization.

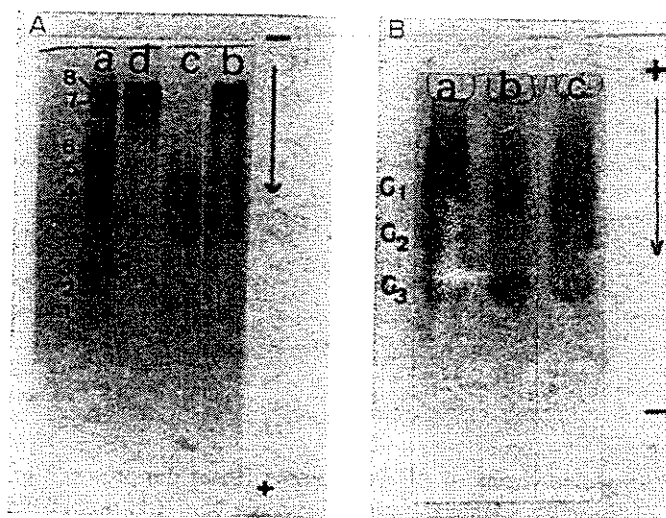


Fig. 5: (A) PAGE of fractions obtained by chromatography of *G. carbonaria* Hb on Sephadex G-200. The gels were stained with Coomassie blue. Hb stored for (a) 15 days and (b) 210 days; (c) monomeric and (d) polymeric Sephadex G-200 fractions of Hb stored for 210 days. **(B)** PAGE of the globin chains of monomeric and polymeric fractions from *G. carbonaria* Hb stored for 120 days. The electrophoresis was carried out in the presence of Triton X-100 and urea at acid pH. (a) total hemoglobin; (b) monomeric fraction; (c) polymeric fraction. The gels were stained with Coomassie blue.

The ability of turtle and shark Hb to polymerize and to form mixed disulfides has also been reported by others (11,29). Such a capacity indicates the presence of externally positioned, highly reactive SH groups that are able to interact extensively.

The presence of SH groups allows the polymerization of Hb to produce aggregates larger than the tetramer. In the presence of non-protein SH groups, Hb can also form mixed disulfide bridges that result in a high level of heterogeneity as evidenced by PAGE and chromatography (Figs. 1A and 1B). The great majority of Hbs appear to polymerize by forming intermolecular disulfide bonds; this is the case for mouse Hb (30) and for various elasmobranchs (6). The Hb of *G. carbonaria* has been shown to possess 4.1 available SH groups (13).

SH rich Hb is often found in animal species that are highly resistant to hypoxia. *Chrysemis picta belli* and several other fresh water turtle species are highly resistant to hypoxia, being able to survive under hypoxic conditions for more than half a year (31). The sluggish terrestrial tortoise *G. carbonaria* rarely experiences such extreme conditions of hypoxia. Thus, the presence of 4.1 SH groups/Hb tetramer (13) must provide this species with some advantage, perhaps

through the ability of SH groups to participate in the oxidation-reduction mechanism of heme coupled to thiol disulfide exchange reactions. SH rich Hb has also been suggested to be involved in protecting the organism from the deleterious actions of reactive oxygen and non-oxygen free radicals, metal cations and other toxic molecules (10). In this regard, it is interesting that a small proportion of the available SH groups in *G. carbonaria* Hb was oxidized at the time of hemolysis soon after blood collection. Following reduction with DTT and subsequent filtration on Sephadex G-25, the number of SH groups/Hb tetramer increased from 4.1 to 4.7 (data not showed). This difference of 0.6 SH groups/Hb tetramer represents the content of very reactive SH groups already involved in disulfide bridge formation in the red blood cells. If the function of highly reactive thiol is to prevent the oxidation of Hb and other macromolecules in erythrocytes, then cells with a reduced content of such SH groups should exhibit a greater susceptibility to the deleterious effects of oxidant compounds.

Reischl and Dafré (12) have emphasized that mixed disulfides may be of particular value in conditions of mild oxidative stress. Thus the mixed disulfide-Hb present in *G. carbonaria* erythrocytes may protect the cells by preventing the intracellular accumulation of GSSG and minimizing its extrusion by ATP-dependent translocase (32). If not reduced to GSH or if extruded into the extracellular space, GSSG could interact with other proteins to form glutathione mixed disulfides with enzymes or membrane components, thereby modifying their functions.

In summary, hemolysates from *G. carbonaria* contain two main components that are able to form disulfide bridges with glutathione or between molecules of Hb. The highly reactive SH groups of Hb may have an important role in protecting Hb, membrane proteins and other macromolecules against oxidative damage.

ACKNOWLEDGEMENTS: The present work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP (94/0174-6), CNPq (520110/94-3) and FAEP (0534/93). M. A. T. is a PhD student in the Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, and was supported by CAPES fellowship.

REFERENCES

1. Dessauer, H. C., Fox, W. and Ramirez, J. R. (1957) Arch. Biochem. Biophys., **71**, 11-16.
2. Gratzer, W. B. and Allison, A. C. (1960) Biol. Rev., **35**, 459-506.
3. Sullivan, B. and Riggs, A. (1967b) Comp. Biochem. Physiol., **23**, 449-458.
4. Sullivan, B. (1974a) In Chemical Zoology (Florkin, M. and Schefer, B.T. Eds.) vol. **9**, pp. 77-118. Academic Press, New York.

5. Sullivan, B. (1974b) In Chemical Zoology (Florkin, M. and Schefer, B.T. Eds.) vol. 9, pp. 353-374. Academic Press, New York.
6. Fyhn, U. E. and Sullivan, B. (1975) *Comp. Biochem. Physiol.*, **50B**, 119-129.
7. Svedberg, T. and Hedenius, A. (1934) *Biol. Bull.*, **66**, 191-223.
8. Riggs, A., Sullivan, B. and Agee, J. R. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **51**, 1127-1134.
9. Reischl, E., Hampe, O. G. and Crestana, R. H. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**, 207-210.
10. Reischl, E. (1989) In Non-mammalian animal models for biomedical research (Woodhead, A. V. Ed.) pp 309-318, CRC Press, Boca Raton.
11. Dafré, A. L. and Reischl, E. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**, 215-219.
12. Reischl, E. and Dafré, A. L. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 849-853.
13. Torsoni, M. A., Viana, R.I., Barrros, B.F., Stoppa, G., Cesquini, M. and Ogo, S.H. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **40**: 355-364.
14. Bellomo, G., Mirabelli, H. F., DiMonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C. and Orrenius, S. (1987) *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1313-1320.
15. Spix, J. (1924) *Species novae Testudinatum Brazilian Monachii*, 24 pp
16. Stephens, G. S. and Greekmore, J.S. (1982) *Copeia*, **2**, 522-523.
17. Ogo, S. H., Abe, A. S. and Focesi Jr., A. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.*, **63A**, 285-289.
18. Antonini, E. and Brunori, M. (1971) In Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands (Neuberger, A. and Tatum, E.L. Eds) pp. 13-39, Elsevier, Amsterdam.
19. Winterbourn, C. C. (1990) *Meth. Enzymol.*, **186**, 265-272.
20. Sullivan, B. and Riggs, A. (1964) *Nature*, **204**, 1098-1099.
21. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
22. Ornstein, L. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349.
23. Alter, B. P., Goff, S. C., Efremov, G. D., Gravely, M. E. and Huisman, T. H. (1980) *Br. J. Haematol.*, **44**, 527-534.
24. Matusuura, M.S.A., Ogo, S.H., Focesi Jr., A. and Say, A.C. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.*, **86A**, 683-687.
25. Laurent, T. C. and Killander, J. (1964) *J. Chromatogr.*, **14**, 317-325.
26. Rucknagel, K. P., Reischl, E. and Braunitzer, G. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 1163-1171.
27. Rucknagel, K. P. and Braunitzer, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 123-131.
28. Sullivan, B. and Riggs, A. (1967a) *Comp. Biochem. Physiol.*, **23**, 437-447.
29. Reischl, E. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.*, **85B**, 723-726.
30. Riggs, A. (1965) *Physiol. Rev.*, **45**, 619-673.
31. Ultsch, G. R., Herbert, C. V. and Jackson, D. C. (1984) *Physiol. Zool.*, **57**, 620-631.
32. Srivastava, S. and Beutler, E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 9-16.

2.3-“SULPHYDRYL GROUPS AND THEIR RELATION TO ANTIOXIDANT ENZYMES OF CHELONIAN RED BLOOD CELLS”

Biochem. Mol. Biol. Int. 46(1):147-156, (1998)

Resumo

A concentração dos grupos tióis de hemoglobina e glutathiona do sangue mostraram ser maior em *Geochelone carbonaria* que em *Geochelone denticulata*. Exposição da hemolisado “stripped” de ambas os jabutis ao t-butil hidroperóxido resultou em maior oxidação do ferro hemínico da hemoglobina de *G. denticulata*. Neste caso a glutathiona redutase e a glutathiona peroxidase não estavam ativas devido a ausência da GSH e do NADPH, sugerindo que os grupos tióis da hemoglobina de *G. carbonaria* atuaram como antioxidantes, de maneira similar ao GSH. No hemolisado total, entretanto, onde as enzimas antioxidantes estão ativas, ambas as espécies mostraram nível similar de oxidação da hemoglobina, indicando que o efeito protetor dos grupos tióis da hemoglobina é menos significativo sobre a proteção do heme. A glutathiona redutase e glutathiona peroxidase foram mais ativas no eritrócito de *G. denticulata* ao passo que catalase e superóxido dismutase, nos eritrócitos de *G. carbonaria*. A contribuição dos grupos tióis reativos das proteínas parecem ser importantes para minimizar os efeitos deletérios de agentes oxidantes sobre a célula.

SULPHYDRYL GROUPS AND THEIR RELATION TO THE ANTIOXIDANT ENZYMES OF CHELONIAN RED BLOOD CELLS.

M.A. Torsoni, R.I. Viana and S.H. Ogo*.

Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Received March 30, 1998

Received after revision, May 20, 1998

SUMMARY

Thiol groups of hemoglobin and blood glutathione are higher in *Geochelone carbonaria* than in *Geochelone denticulata*. Exposure of stripped hemolysate of both tortoises to *tert*-butyl hydroperoxide, resulted in a higher ferroheme oxidation of *G. denticulata* hemoglobin. In this example glutathione reductase and glutathione peroxidase, were not active due to the absence of GSH and NADPH, suggesting that the thiol groups of *G. carbonaria* hemoglobin act as antioxidant, similar to GSH. In the total hemolysate, however, where the antioxidant enzymes are active, both species showed similar levels of hemoglobin oxidation, suggesting that the protective effect of thiol groups of hemoglobin are less effective for heme protection. The activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase was higher in erythrocytes of *G. denticulata* and the activity of catalase and superoxide dismutase was higher in erythrocytes of *G. carbonaria*.

Key words: hemoglobin, thiol groups, antioxidant enzymes, erythrocytes, reactive oxygen species, lipid peroxidation.

INTRODUCTION

The toxic effects of ROS have been recognized in the past few decades (1). A stable, intracellular oxireductive state is of vital importance since any disturbance of the cell redox state may impair physiological functions and lead to extensive tissue damage. To protect against ROS-induced damage, prokaryotic and eukaryotic cells maintain enzymatic and chemical systems which scavenge reactive species thereby arresting the propagation of injury. Erythrocytes possess an antioxidant system that diminishes the toxic effects of ROS (2).

Abbreviations: CAT, catalase; DTNB, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); DTNP, 2,2'-dithio-bis(5-nitropyridine); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG, oxidized glutathione; HbS-SHb, polymeric Hb; HbS-SG, glutathionyl-Hb; HPX, hypoxanthine; MDA, malondialdehyde; NBT, nitroblue tetrazolium; NPSH, non-protein sulphhydryl; $O_2^{\bullet-}$, superoxide anion; $OH^{\bullet}$, hydroxyl radical; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBA, 2-thiobarbituric acid; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; XO, xanthine oxidase.

*To whom correspondence should be addressed

During the life-span of erythrocytes, various changes are known to occur (3). Nakai *et al.* (4); Jain (5) demonstrated significant lipid peroxidation in the erythrocyte during aging *in vivo*. Sohal *et al.* (6) showed a positive correlation between life expectancy and the level of antioxidant defenses and a negative correlation between the former and the levels of ROS.

Hb of some species of reptiles is rich in reactive sulphydryl groups, so that this protein is able to form disulfide bridges such as HbS-SHb and HbS-SG (7). The role of disulfides in protecting erythrocytes from oxidative stress has been suggested (8). Some workers (7, 9) have associated the presence of reactive thiol groups with the resistance to anoxia, detoxification of ROS and excess metal cations, in some species.

DiSimplicio and Rossi (10) observed the formation of reversible mixed disulfides in rat erythrocytes subjected to oxidative stress. Thus, mixed disulfides could avoid the accumulation of oxidized glutathione within the cell (10,11). The concentration of GSSG may be also decreased by glutathione reductase or by cellular extrusion (12). The rate of GSSG and mixed disulfide formation has been proposed to represent an index of free-radical-induced oxidative stress (13).

In a previous study of *Geochelone carbonaria* (tortoise) Hb was showed that mixed disulfides occur upon hemolysis (14). In this paper the antioxidant system of two species of tortoise, that have different numbers of Hb reactive thiol groups was compared. The activities of glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and the level reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocytes of both species in order to examine the relationship between reactive thiol groups of Hb and the antioxidant system. The susceptibility to lipid peroxidation and Hb oxidation in both species of turtle was also investigated, as was the contribution of reactive thiol groups from proteins in minimizing the deleterious effects of oxidant compounds on Hb and cell membranes.

MATERIALS AND METHODS

Specimens of *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata* were obtained from the Bosque dos Jequitibás, Campinas. Blood was sampled by cardiac puncture and drawn into a cold heparinized syringe (100 µl of sodium heparin, 5000 IU/ml). The blood was centrifuged for 5 min at 1100 g and the plasma removed. The red cells were washed three times in 10 volumes of 0.9% NaCl and resuspended in 0.1 M phosphate buffered-saline or lysed with distilled water obtaining the total hemolysate. The stripped Hb solution was achieved by passage through a 2.0 cm x 25 cm column of Sephadex G-25 equilibrated with 0.1 M phosphate buffer.

GSH determination: The non-protein sulphydryl (NPSH) concentration was assayed using 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (15). 200 µl of a cell suspension (containing 2 mM Hb) was mixed with 2 ml of distilled water and 0.2 ml of this lysate was used to determine the Hb concentration. 3 ml of precipitating solution (one hundred milliliter contain 1.67 g of glacial

metaphosphoric acid, 0.2 g of disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and 30 g of NaCl in 100 ml of distilled water) was added to 2 ml of hemolysate. After standing for 5 min, the mixture was centrifuged. NPSH was assayed in the clear supernatant fluid. The reaction cuvette contained 0.2 M Na_2HPO_4 , pH 8.0, 0.5 mM DTNB (2 mg in 10 ml of 1% sodium citrate solution), and the sample in a final volume of 2 ml. The absorbance was read at 412 nm against a blank containing 2 ml of 0.2 M Na_2HPO_4 . The concentration of NPSH was expressed as the number SH/tetrameric Hb. An ϵ_{412} (mM) value of 13.6 was used to calculate the NPSH concentration.

Protein thiol titration: A 30 μl sample of 10 mM 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) solution (3.1 mg/ml in ethanol) was added to 3 ml of Hb solution (10 μM , as heme) in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0. After 20 min, the A_{386} was measured against the blank consisting of Hb at the same concentration and 30 μl of ethanol. The absorption of DTNP was subtracted, and the thiol concentration determined using an ϵ_{386} (mM) value of 14.0 (16). Thiol groups of Hb were also determined in a hemolysates obtained with 1 mM dithiothreitol (DTT) and passed through a 2.0 cm x 25 cm column of Sephadex G-25.

Catalase activity: The breakdown of H_2O_2 by catalase was followed by monitoring the absorbance at 230 nm. The reaction cuvette contained 9 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-HCl, and 0.25 mM EDTA. The mixture was incubated at 37°C for 10 min before the addition of different concentrations of hemolysate (15). An ϵ_{230} (mM) value of 0.071 was used to calculate the enzyme activity.

Glutathione reductase activity: The activity of this enzyme was measured by following the oxidation of NADPH spectrophotometrically at 340 nm according to (15). The activity was assayed in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.25 mM EDTA, 9 μM FAD, 3.3 μM GSSG, 0.1 mM NADPH and hemolysate (1:20) at 37°C. No GSSG was present in the blank cuvette. The activity of the enzyme was expressed as μmoles of NADPH consumed/min/g of Hb.

Glutathione peroxidase activity: The enzyme activity was measured by following the reduction of GSSG by GR, using NADPH. The reaction cuvette contained 2 mM GSH, 0.6 mM NADPH, 0.1 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, and 1 U GR/ml. The mixture was incubated at 37°C for 10 min and 0.07 mM t-BOOH was added in the reaction cuvette. The oxidation of NADPH was followed according to (15). An ϵ_{340} (mM) value of 6.22 was used to calculate the enzyme activity.

Superoxide Dismutase activity: SOD activity was determined by reduction of NBT (nitro blue tetrazolium) by superoxide anion generated through the hypoxanthine (HPX)/xanthine oxidase (XO) system, at 37°C. The inhibition of the above reaction by SOD was followed spectrophotometrically by monitoring the formation of formazan at 560 nm. The following reagents were added to the reaction cuvette: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.07 U of XO/ml, 100 μM HPX, 600 μM NBT and varying concentrations of hemolysate (17).

Hb oxidation: The Hb oxidation was determined by adding different concentrations of t-BOOH to Hb solutions (40 μM as heme). The oxidation was followed for 15 min at 37°C. OxyHb, metHb and hemichrome concentrations were measured spectrophotometrically according to (16).

Lipid peroxidation: The lipid peroxidation of erythrocytes was assessed as described by (18). The experiments were carried out in a suspension of cells containing 1 mM of Hb, in the presence of t-BOOH (0.1 to 2 mM). After 30 min at 37°C, 500 μl of 25% trichloroacetic acid (TCA) was added to 1 ml of suspension. The mixture was centrifuged at 1100 g for 5 min. To 1 ml of the resulting supernatant fluid was added 1 ml of 1% 2-thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 M NaOH followed by boiling for 15 min. The malondialdehyde (MDA) concentration was determined using an ϵ_{532} (mM) of 156.

RESULTS AND DISCUSSION

The GSH titration indicated the presence of 0.6 GSH/Hb (tetramer) in *G. denticulata* erythrocytes, a value approx. half that of *G. carbonaria* (14). The reduced glutathione concentrations were expressed as the number of GSH per tetrameric Hb because of the wide variation of hematocrit and Hb concentration in erythrocytes of the two species. In addition to the lower level of GSH, the Hb of *G. denticulata* possessed one third of the available SH groups present in *G. carbonaria* Hb. Titration of the reactive thiol groups of *G. carbonaria* Hb obtained by hemolysis in the presence of a reducing agent such as DTT, revealed a 22% increase in SH groups (4.9 SH/tetrameric Hb) in comparison to that in hemolysates prepared without DTT. Similar treatment of a *G. denticulata* hemolysate did not change the number of reactive thiol groups (Table I), suggesting that HbS-SG is present *in vivo* in *G. carbonaria*. Oxidation of the thiol groups of both Hb and GSH resulted in the polymerization of Hb and the formation of glutathionyl-Hb. As a consequence, *G. carbonaria* Hb showed complex chromatographic and electrophoretic profiles (14), in which the multiple components are the product of Hb polymerization and Hb-mixed disulfides formation. The HbS-SG components had higher electrophoretic mobilities (9). Although the physiological significance of this reaction is not understood, some authors have suggested that protein-bound glutathione may serve as an reserve pool of glutathione (19). The reduced glutathione is a NPSH, one of the main reductants found in the erythrocyte (20). The chemical properties of NPSH allow it to serve as a nucleophile and as an effective reductant by interacting with numerous electrophilic agents and oxidant compounds such as H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\text{OH}^{\cdot}$ (21). In this context, the presence of reactive thiol groups in the Hb of *G. carbonaria* may provide an additional mechanism for protecting erythrocytes through HbS-SG and polymer formation. Torsoni *et al.* (14) reported that glutathionyl-Hb and polymeric Hb have similar functional properties to unmodified Hb in *G. carbonaria*. Thus even under conditions of oxidative stress oxygen transport should not be impaired in this species. As previously mentioned, the presence of multiple Hb components detected by electrophoresis suggests extensive oxidation of Hb sulphhydryl groups.

In conditions of oxidative stress induced by t-BOOH in stripped hemolysates, the level of ferroheme oxidation was lower in *G. carbonaria* Hb (Fig. 1A), although no difference was found in the total hemolysate of both species (Fig. 1B). The latter observation suggests that in the presence of an antioxidant system consisting of GSH-Px; GR, CAT, SOD, NADPH and GSH (Fig. 1B), both species have similar levels of Hb oxidation. In the stripped hemolysate, the

Table I- Hematological parameters and the number of reactive thiols in Hb (SH/Hb) from *G. carbonaria* and *G. denticulata* erythrocytes. Each point represents the mean $\pm$ SD of 9 experiments.

	Hematocrit (%)	[Hb] in the blood (mM)	SH/Hb	SH/Hb* after DTT
<i>G. carbonaria</i>	24 $\pm$ 0.7 ^a	3.0 $\pm$ 0.2 ^a	4.1 $\pm$ 0.5 ^c	4.9 $\pm$ 0.1
<i>G. denticulata</i>	32 $\pm$ 0.2 ^b	5.7 $\pm$ 0.2 ^b	1.5 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2

*Number of SH/Hb determined in the hemolysate obtained by lysis with 1 mM DTT

a (28); b (29); c (14).

enzymes related to the detoxification of t-BOOH (GSH-Px, GR) should be non-active since the reducing substrates (GSH and NADPH) have been eliminated. However, the available SH groups in *G. carbonaria* Hb minimized the oxidant effect of t-BOOH through a mechanism similar to that mediated by GSH.

The Hb SH groups also reduced the level of membrane damage when added to the cell suspension. The addition of stripped hemolysate from *G. carbonaria* to human erythrocytes prevented membrane lipid peroxidation by t-BOOH by approx. 16% (Fig. 2), possibly through the reducing activity of Hb-SH groups. In contrast, *G. denticulata* Hb showed no such protection. High concentrations of Hb from both species increased the level of MDA formation (Fig. 2), suggesting that excessive production of ferryl-Hb may promote the oxidative damage of membranes through the withdrawal of an electron from unsaturated fatty acids or via a fatty acid hydroperoxide resulting in the formation of fatty acid radicals, which, in the presence of oxygen could lead to lipid peroxidation (22).

The antioxidant enzymes related to thiol groups were more active in *G. denticulata* erythrocytes (Table II). GSH-Px was approx. twice as active in *G. denticulata* than in *G. carbonaria*. Similar behavior was observed for GR activity (Table II). Thus, the lower concentrations of GSH and Hb reactive thiol groups in *G. denticulata* erythrocytes required more active GSH-Px and GR in order to maintain a high GSH/GSSG ratio. The data agree with those of (23,24) who demonstrated a close correlation between the intracellular GSH/GSSG ratio and the level of the mixed disulfide.

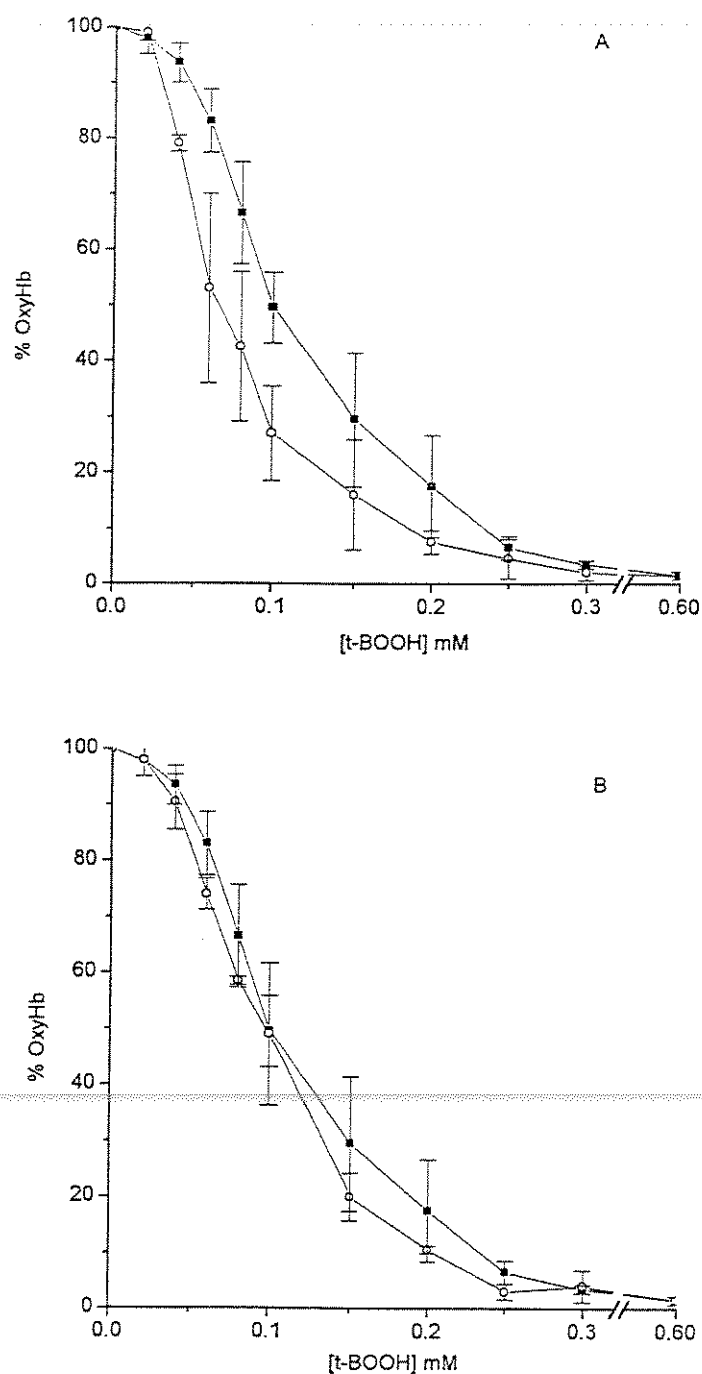


Fig. 1: Oxidation of stripped Hb (A) and total hemolysate (B) from *G. carbonaria* (■) and *G. denticulata* (○) by t-BOOH. The samples were incubated with different concentrations of t-BOOH for 15 min at 37°C. Each point represents the mean $\pm$ SD of 8 experiments. The experimental conditions are described in Materials and Methods.

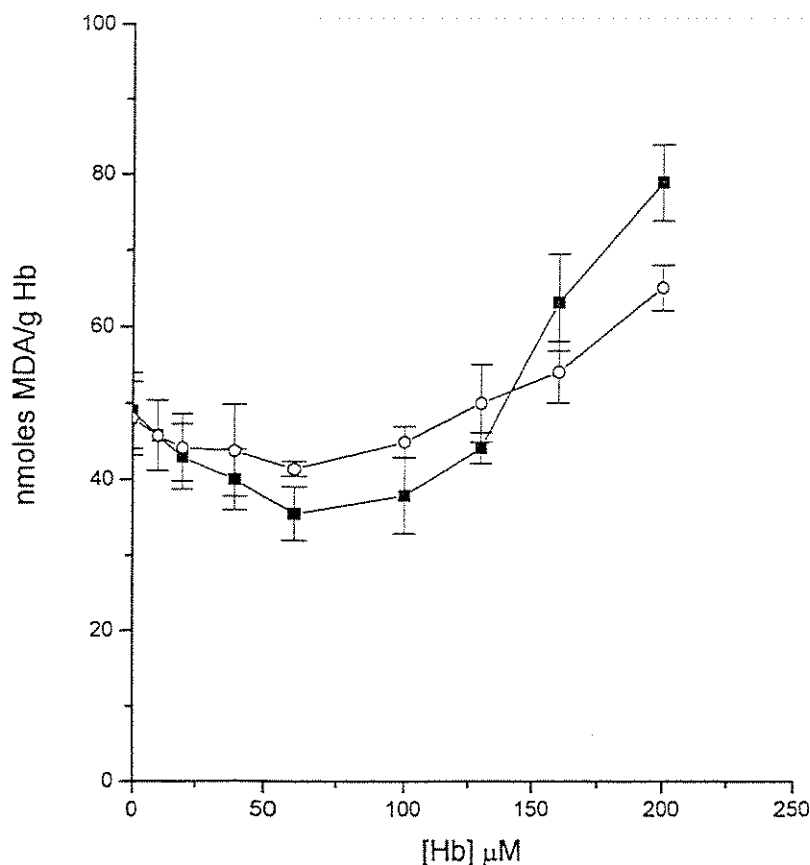


Fig. 2: Effect of Hb from *G. carbonaria* (■) and *G. denticulata* (○) on the lipid peroxidation of human erythrocytes. Lipid peroxidation was induced by 1 mM t-BOOH. Each point represents the mean $\pm$ SD of 5 experiments. The experimental conditions are described in Materials and Methods.

The higher activities of GSH-Px and GR in *G. denticulata* erythrocytes apparently does not interfere with the membrane lipid peroxidation induced by t-BOOH. According to (25), cumene hydroperoxide (or t-BOOH) promote damage by initially attacking the membrane, such that the intracellular antioxidant enzymes or chemical antioxidants are unable to prevent membrane damage induced by this kind of oxidant. The data presented here show slightly greater resistance by *G. denticulata* erythrocyte membranes to peroxidation by t-BOOH (Fig. 3), where the MDA content was lower, consistent with membrane fragility (not shown).

The enzymes not related to thiol groups, (SOD and CAT) but which are important in attenuating oxidative damage *in vivo*, were more active in *G. carbonaria* erythrocytes (Table II).

Table II- Activity of antioxidant enzymes in the erythrocytes of *G. carbonaria* and *G. denticulata*. Each point represents the mean $\pm$ SD of 9 experiments.

	GSH-Px (IU/mg Hb)	GR (IU/mg Hb)	CAT ($\times 10^3$ IU/mg Hb)	SOD (IC ₅₀ *)
<i>G. carbonaria</i>	30.4 $\pm$ 4.6	24.7 $\pm$ 4.2	65.7 $\pm$ 2.2	0.38
<i>G. denticulata</i>	67 $\pm$ 3.6	36 $\pm$ 6.7	24.2 $\pm$ 4.3	0.54

*IC₅₀= concentration of Hb (mg/ml) necessary to inhibit the reduction of NBT by 50%.

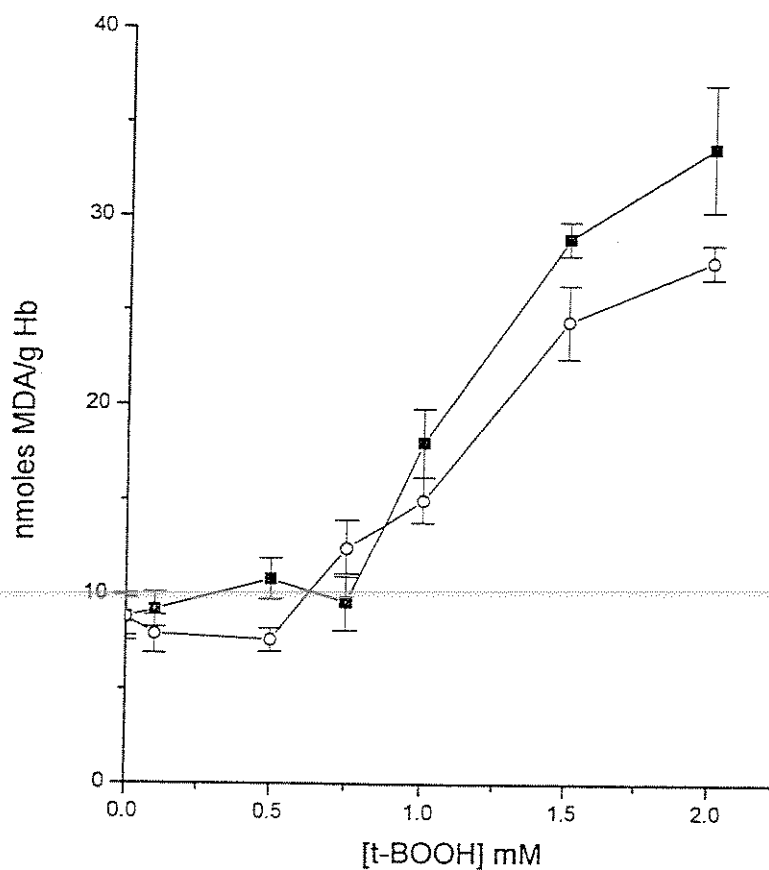


Fig. 3: MDA formation in a suspension of erythrocytes from *G. carbonaria* (■) and *G. denticulata* (○). Lipid peroxidation was induced by incubating the cells with different concentrations of t-BOOH for 30 min at 37°C. Each point represents the mean $\pm$ SD of 8 experiments. The experimental conditions are described in Materials and Methods.

SOD has a central role in the metabolism of ROS. SOD converts superoxide, a species with relatively low reactivity that does not freely cross membranes, into hydrogen peroxide, which is freely permeable. In the presence of heavy metals such as Fe, hydrogen peroxide is nonenzymatically converted into hydroxyl radicals (Fenton reaction). Yim *et al.* (26) reported that CuZn-SOD catalyzes the production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide. Thus, the product of the SOD reaction is potentially more deleterious than the superoxide anion itself. A common assumption is that any significant increase in SOD activity must be accompanied by a comparable increase in CAT and/or GSH-Px activity in order to prevent excessive build up of hydrogen peroxide (27). The SOD in *G. carbonaria* erythrocytes was approx. two folds more potent at inhibiting (NBT) reduction than that of *G. denticulata* and, accordingly, CAT was also approximately 25% more active in *G. carbonaria* (Table II), thereby preventing the accumulation of hydrogen peroxide in these cells.

In this report, the available thiol groups of Hb are shown to be as important as GSH, in protecting erythrocytes against oxidative damage. The principal mechanism involved appears to be the oxidation of SH groups to form polymers of Hb or mixed disulfides between Hb and GSH. Consequently, the enzymes related to GSH metabolism (GR and GSH-Px), participate of the process. An identification of these enzymes in the erythrocytes of the two related turtles indicates that a correlation must exist between the intracellular SH level and the activity of these enzymes.

In conclusion, thiol-rich Hb, in addition to GSH, acts as a reducing agent under conditions of mild oxidative stress and acts to diminish the deleterious effects of the oxidant compounds in the cell. The resulting disulfides (polymeric Hb or HbS-SG) do not appear to suffer conformational changes and retain their oxygen transport ability. The enzymes related to GSH metabolism are important in the formation of disulfide bridges under conditions of stress as well as in the restoration of the free thiol groups in the absence of stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from CNPq (520184.96.3) and FAPESP(94/0174-6) M.A.T. is a doctoral student supported by FAPESP (96/08987-1). The authors thank Dr. Stephen Hyslop (Departamento de Farmacologia, FCM, UNICAMP) for revising the English of the text.

REFERENCES

1. DiGuseppi, J. and Fridovich, I. (1984) Crit. Rev. Toxicol. 12: 315-342.
2. Stern, A. (1985) In Oxidative Stress (H. Sies, ed.) 331-349, Academic Press, London.
3. Kurata, M., Suzuki, M. and Agar, N.S. (1993) Comp. Biochem. Physiol. 106B: 477-487.

4. Nakai, T., Imanishi, H. and Takino, T. (1984) *Acta Haematol. Jpn.* 47: 1230-1234.
5. Jain, S. K (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 937: 205-210.
6. Sohal, R. S., Farmer, K. J. and Allen, R. G. (1987) *Mech. Ageing Dev.* 40: 171-179.
7. Dafré, A.L. and Reischl, E. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: 215-219.
8. Brigelius, R. (1985) In *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.) 243-272, Academic Press, London.
9. Reischl, E. and Dafré, A. L. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 849-853.
10. Di Simplicio, P and Rossi, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1119: 245-252.
11. Bellomo, G., Mirabelli, F., Dimonte, D., Richelmi, P., Orrenius, C. and Orrenius, S. (1987) *Biochem. Pharmacol.* 36: 1313-1320.
12. Sies, H. (1985) In *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.) 75-90, Academic Press, London.
13. Lauterberg, B.H, Smith, C. V., Huges, H. and Mitchell, J. R (1981) *J. Clin. Invest.* 73:124-133.
14. Torsoni, M.A., Viana, R.I., Barros, B.F., Stoppa, G., Cesquini, M. and Ogo, S.H. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 40: 355-364.
15. Beutler, E. (1975) In *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 2nd ed. New York: Grune and Stratton.
16. Winterbourn, C.C. (1990) *Meth. Enzymol.* 186: 265-272.
17. Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M. and Carrell, R.W. (1975) *J. Lab. Clin. Med.* 85: 337-341.
18. Stoks, J. and Dormandy, T. L. (1971) *Br. J. Haematol.* 20: 95-111.
19. Kosower, H. S. and Kosower, E. (1978) *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
20. Siegers, T. (1989) *Progr. Pharmacol. Clin. Pharmacol.* 7: 171-180.
21. Yu, B. P. (1994) *Physiol Rev.*, 74: 139-162.
22. Everse, J. and Hsia, N. (1997) *Free Rad. Biol. Med.* 22: 1075-1099.
23. Brigelius, R.; Lenzen, R. and Sies, H. (1982) *Biochem. Pharmacol.* 31: 1637-1641.
24. Brigelius, R., Muckel, C., Ackerboom, T. P. M. and Sies, H. (1983) *Biochem. Pharmacol.*, 32: 2529-2534.
25. Van Der Berg, J.J.M., Op den Kamp, J.A.F., Lubin, B.H., Roelofsen, B. and Kuypers, F.A. (1992) *Free Rad. Biol. Med.* 12: 487-498.
26. Yim, M.B., Chock, P.B. and Stadtman, E.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5006-5010.
27. Warner, H.R. (1994) *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 249-258.
28. Torsoni, M.A., Viana, R.I., Stoppa, G.R., Cesquini, M., Barros, B.F. and Ogo, S.H. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 679-684.
29. Torsoni, M.A., Stoppa, G. and Ogo, S.H. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (Submitted).

2.4- HIGH REACTIVE THIOLS OF *GEOCHELONE CARBONARIA* Hb CAN REDUCE OXIDATIVE DAMAGE IN ERYTHROCYTE MEMBRANE.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (submetido)

Resumo

Oxidantes tais como t-BOOH e H_2O_2 , são capazes de oxidar o grupo heme e os grupos tióis da Hb. H_2O_2 causou maior oxidação do heme em baixas concentrações, embora a oxidação dos grupos tióis tenha sido similar para ambos oxidantes. Hb de *G. carbonaria* inibiu a formação de malondialdeído em eritrócitos humanos expostos ao t-BOOH em cerca de 30%. Este decréscimo foi menor (10% de inibição) quando na presença da hemoglobina de *G. denticulata*. Com concentrações maiores que 150 μM ambas as hemoglobinas potencializaram o efeito do t-BOOH, possivelmente através da formação de outros radicais (t-BO• e t-BOO•). O tratamento da hemoglobina de *G. carbonaria* com reagentes de tióis como, diamida, iodoacetamida e glutathiona oxidada diminuiu o efeito antioxidante desta proteína, indicando o envolvimento dos grupos tióis na proteção contra a peroxidação lipídica.

High reactive thiols of *Geochelone carbonaria* Hb can reduce oxidative damage in erythrocyte membrane.

Torsoni, M. A. and Ogo, S. H

Departamento de Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP, Brasil.

Address for correspondence: Satie Hatsushika Ogo, Departamento de Bioquímica, IB,
UNICAMP, CP 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil, Tel.55-19-7887572, Fax. 55-
19-2893124

e-mail: torsoni@obelix.unicamp.br

ABSTRACT

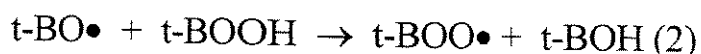
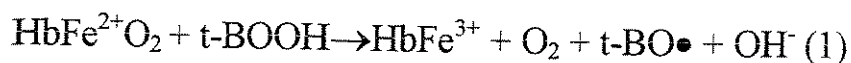
Oxidants such as t-BOOH and H₂O₂, are capable of oxidizing heme and thiol groups of Hb. H₂O₂ caused greater oxidation of heme at a lower concentration, although the oxidation of thiol groups was similar for both oxidants. *Geochelone carbonaria* Hb inhibited the malondialdehyde formation of human erythrocytes exposed to t-BOOH by about 30%; this decrease was smaller (10% inhibition) with *Geochelone denticulata* Hb. At concentrations > 200 µM both Hbs potentiated the effect of t-BOOH, possibly through the production of other radicals (t-BO• and t-BOO•). The treatment of *G. carbonaria* Hb with thiol reagents decreased the antioxidant action of this protein, indicating the involvement of thiol groups in the protection against lipid peroxidation.

INTRODUCTION

The sulphhydryl groups of Hb have been associated with mechanisms of cellular protection (1-3). Hb rich in thiol groups is found in many species of elasmobranchs, amphibians and reptiles (4-7) and the oxidation of these groups may lead to the formation of disulfide bridges within tetrameric Hb or between Hb and glutathione to yield glutathionyl-Hb or mixed disulfide. The formation of mixed disulfide has been described in mouse erythrocytes exposed to oxidative stress (8,9). Several studies have examined the effects of thiol reagents on human Hb (10, 11) as well as the generation of thiol radicals in mouse erythrocytes treated with oxidant agents (12, 13). Torsoni et al. (14) demonstrated that modification of Hb by thiol reagents such as iodoacetamide and oxidized glutathione increased the oxidation of heme, whereas treatment with diamide, which causes Hb polymerization, did not significantly alter the susceptibility of heme to oxidation. Polymeric Hb has similar functional properties to non-polymeric Hb, which suggests that the thiol groups of Hb may be oxidized without alterations in the function of the protein. This property should increase the redox capacity in red blood cells.

Hb can serve as a source for radical formation through the oxidation of heme by organic hydroperoxides, such as *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH). This oxidant requires metal ions to cause oxidation in the cell membrane, mainly through the production of the radicals t-BOO• (*tert*-butyl peroxy) and t-BO• (*tert*-butyl alkoxy). Hb

which is susceptible to oxidation may behave as a catalyst for reactions that produce free radicals, as shown in equations 1 and 2 (15, 16).



In the present paper, we have investigated the direct involvement of SH containing Hb in the inhibition of lipid peroxidation. The modification of SH groups of Hb by thiol reagents potentiated peroxidation by t-BOOH of membrane lipid, probably as a result of the increased susceptibility of Hb to oxidation (see equation 1).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals: Diamide, oxidized glutathione (GSSG), terc-butyl hydroperoxide (t-BOOH), iodoacetamide (IAA), Sephadex G-25, 2,2'-dithiobis[5-nitropyridine] (DTNP), n,n-ethylmaleimide (NEM) and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO). 2-thiobarbituric acid (TBA) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Blood: Specimens of *Geochelone carbonaria* and *Geochelone denticulata* were obtained from the Bosque dos Jequitibás, Campinas. Blood obtained by cardiac puncture was drawn into a cold, heparinized syringe (100 µl of sodium heparin, 5000 IU/ml). The blood was centrifuged for 5 min at 1100 g and the plasma removed. The red cells were washed three times in 10 volumes of 0.9% NaCl and lysed with distilled water to produce

a total hemolysate. A stripped Hb solution was obtained by passing hemolysate through to 2.0 cm x 25 cm column of Sephadex G-25 equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4.

Preparation of modified Hb: Stripped Hb from *G. carbonaria* was modified by mixing with IAA or NEM (molar ratio 1:200) or diamide (molar ratio 1:5) followed by incubation at 25°C for 1 h. GSSG (molar ratio 1:1) was reacted with Hb for only 15 min at 25°C in order to avoid the formation of methemoglobin (14).

Hemoglobin thiol titration after treatment with oxidant: The Hb solution (40 μ M of heme) in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, was incubated with different concentrations of t-BOOH or H₂O₂. After 5 min, 30 μ l of 10 mM DTNP solution (3.1 mg/ml in ethanol) was added to the solution and the A₃₈₆ was measured against a blank consisting of Hb at the same concentration and 30 μ l of ethanol. The absorption of DTNP was subtracted, and the thiol concentration determined using an ϵ_{386} (mM) of 14.0 (18).

~~Hb oxidation: The oxidation of Hb was measured by incubating different~~
concentrations of t-BOOH or H₂O₂ with Hb (40 μ M of heme) for 5 min at 37°C. The oxyHb, metHb and hemichrome concentrations were measured spectrophotometrically as described by Winterbourn (18).

Lipid peroxidation: The peroxidation of erythrocyte lipids was assessed as described by Stocks and Dormandy (19). The experiments were carried out with a suspension of

human erythrocytes containing 1 mM of Hb, in the absence or presence of modified Hb and t-BOOH (1 mM). After 30 min at 37°C, 500 μ l of 25% TCA was added to 1 ml of suspension. The mixture was centrifuged at 1100 g for 5 min. To 1 ml of the resulting supernatant, 1 ml of 1% TBA in 0.05 M NaOH was added followed by boiling for 15 min. The malondialdehyde (MDA) concentration was determined using an ϵ_{532} (mM) of 156.

RESULTS AND DISCUSSION

Several studies have suggested the involvement of the thiol groups of proteins in protecting cells against oxidant agents (1-3, 20). These thiol groups may participate in disulfide formation (9), which in turn may serve as a reservoir of reducing power and a source of GSH.

G. carbonaria erythrocytes contain thiol-rich Hb. The thiol groups promote intense polymerization and the formation of mixed disulfides *in vivo* (14); and therefore play a role similar to glutathione as scavengers of free radicals produced within erythrocytes (21, 22). The importance of Hb thiols in providing protection against oxidant agents was evaluated by examining the effect of oxidants on the sulphhydryl groups and heme of Hb. The titration curves of the free thiol groups of Hb before and after treatment with different concentrations of t-BOOH or H₂O₂, are shown in the Figures 1 and 2. The H₂O₂ needed a concentration about 5 times smaller than t-BOOH to oxidize the similar number of thiol groups in Hb. In the presence of 1,5 mM t-BOOH or 0,3 mM H₂O₂ the number of reactive thiol groups diminished to about 1,0 SH/tetrameric Hb. It is important to emphasize that both oxidants, t-BOOH and H₂O₂, oxidized the thiol groups; these results suggest that the hydroperoxides may be reduced by reactive thiols of Hb preventing their direct attack to cellular components. These experiments showed also that the heme oxidation promoted by t-BOOH was sensibly smaller than by H₂O₂ (Fig. 1 and 2).

The antioxidant property of reactive thiols of Hb was further examined using the peroxidation human erythrocytes membrane lipid in the presence 1 mM t-BOOH, as model of cellular damage. *G. carbonaria* and *G. denticulata* Hb which possess four and two reactive SH groups, respectively, were used in these experiments (14, 23). The lipid peroxidation of human erythrocyte studied in the absence or presence of each Hb showed that when a low concentration of *G. carbonaria* Hb was added to a suspension of human erythrocytes, the level of MDA was approximately 30% lower than the control (absence of Hb). It was not observed significant antioxidant effect with a similar concentration of *G. denticulata* Hb (23). Higher concentrations of either un-modified and modified *G. carbonaria* Hb (200 μ M) increased MDA production (Fig. 3), probably as a result of increased alcoxyl radical formation (equation 1) (17). It is known that heme of modified *G. carbonaria* Hb is more susceptible than un-modified Hb to oxidation (14).

The modification of *G. carbonaria* Hb by GSSG or IAA abolished its antioxidant effect (Table I). GSSG promoted the total and IAA, the partial (1,2 SH/Hb) oxidation of thiol groups in the Hb (14). These modifications increased the susceptibility of heme to oxidation (14) raising the formation of free radicals derived from interaction between heme and t-BOOH (15-17). The modification of Hb by diamide did not influence the protein ability to inhibit the lipid peroxidation by t-BOOH (Table I). Although some thiols (2,5 SH/Hb) of Hb were involved in disulfide bridges formation the susceptibility of heme to oxidation was not altered (14). In this context, we believe that reduced state

of thiol groups in the hemoglobin may participate in process of cellular protection. Rossi et al (24) recently demonstrated that thiol groups of rat Hb intercept damaging species more efficiently than glutathione. The capacity of heme to generate oxidant species (through equations 1 and 2) may overcome the reducing power of reactive thiols of Hb at high protein concentrations. In this condition, the participation of heme in reaction leading to radical formation may stimulate oxidation. Depending on the oxidation state of the heme iron, Hb can release iron and/or hemin that may participate in the Fenton reaction, thereby generating hydroxyl radical (17). This is particularly important in oxidative stress process since significant modification of the protein may occur. Therefore, *G. carbonaria* Hb may participate effectively, through thiol, in the reduction of hydroperoxides and other oxidants within the RBC, avoiding oxidative damage during mild oxidative stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from CNPq (520184.96.3) and FAPESP (94/0174-6). M.A.T. is the supported by a studentship from FAPESP (96/08987-1). The authors thank Dr. Stephen Hyslop (Department of Pharmacology, FCM, UNICAMP) for correcting the English of the MS.

REFERENCES

1. Reischl, E., and Dafre, A. L. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 849-853.
2. Dafre, A. L., and Reischl, E. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**, 215-219.
3. Brigelius, R. (1985) in *Oxidative Stress* (Sies, H., Ed.), pp. 243-272, Academic Press, San Diego, CA.
4. Sullivan, B. (1974a) in *Chemical Zoology* (Florkin, M., and Schefer, B. T., Eds.), vol. 9, pp.77-118, Academic Press, New York.
5. Sullivan, B. (1974b) in *Chemical Zoology* (Florkin, M., and Schefer, B. T., Eds.), vol. 9, pp. 353-374, Academic Press, New York.
6. Fyhn, U. E., and Sullivan, B. (1975) *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**, 119-129.
7. Reischl, E., Hampe, O. G., and Crestana, R. H. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 207-210.
8. Kosower, N. S., Kosower, E. M., and Koppel, R. L. (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 529-534.
9. Di Simplicio, P., and Rossi, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* **1199**, 245-252.
10. Garel, M. C., Beuzard, Y., Thilet, J., Domenget, C., Martin, J. C. Galacteros, F., and Rosa, L. (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 513-519.
11. Garel, M. C., Domenget, C., Martin, J. C., Prehu, C., Galacteros, F. and Beuzard, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14704-14709.

12. Kelman, D. J., and Mason, R. P. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 439-442.
13. Maples, K. R., Kennedy, C. H., Jordan, S. J. and Mason, R. P. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 402-409.
14. Torsoni, M. A., Viana, R. I., Barros, B. F., Stoppa, G., Cesquini, M., and Ogo, S. H. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**, 355-364.
15. Thornaley, P. J., Trotta, R. J., and Stern, A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **759**, 16-22.
16. Van der Zee, J., Van Steveninck, J., Koster, J. F. and Dubbelman, T. M. A. R. (1989) *Biochim Biophys Acta* **980**, 175-180.
17. Gutteridge, J. M. C. (1986) *FEBS Lett.* **201**, 291-295.
18. Winterbourn, C.C. (1990) *Meth. Enzymol.* **186**, 265-272.
19. Stocks, J. and Dormandy, T. L. (1971) *Br. J. Haematol.* **20**, 95-111
20. Rossi, R., Cardioli, E., Scaloni, A., Amiconi, G., and Di Simplicio, P. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1243**, 230-238.
21. Cadenas, E. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 79-110.
22. Martinez-Cayuela, M. (1995) *Biochimie*, **77**, 147-161.
23. Torsoni, M. A., Viana, R. I., and Ogo, S. H. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 147-156.
24. Rossi, R., Barra, D., Bellelli, A., Boumis, G., Canofeni, S. Di Simplicio, P., Lusini, L., Pascarella, S., and Amiconi, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **24**, 19198-19206.

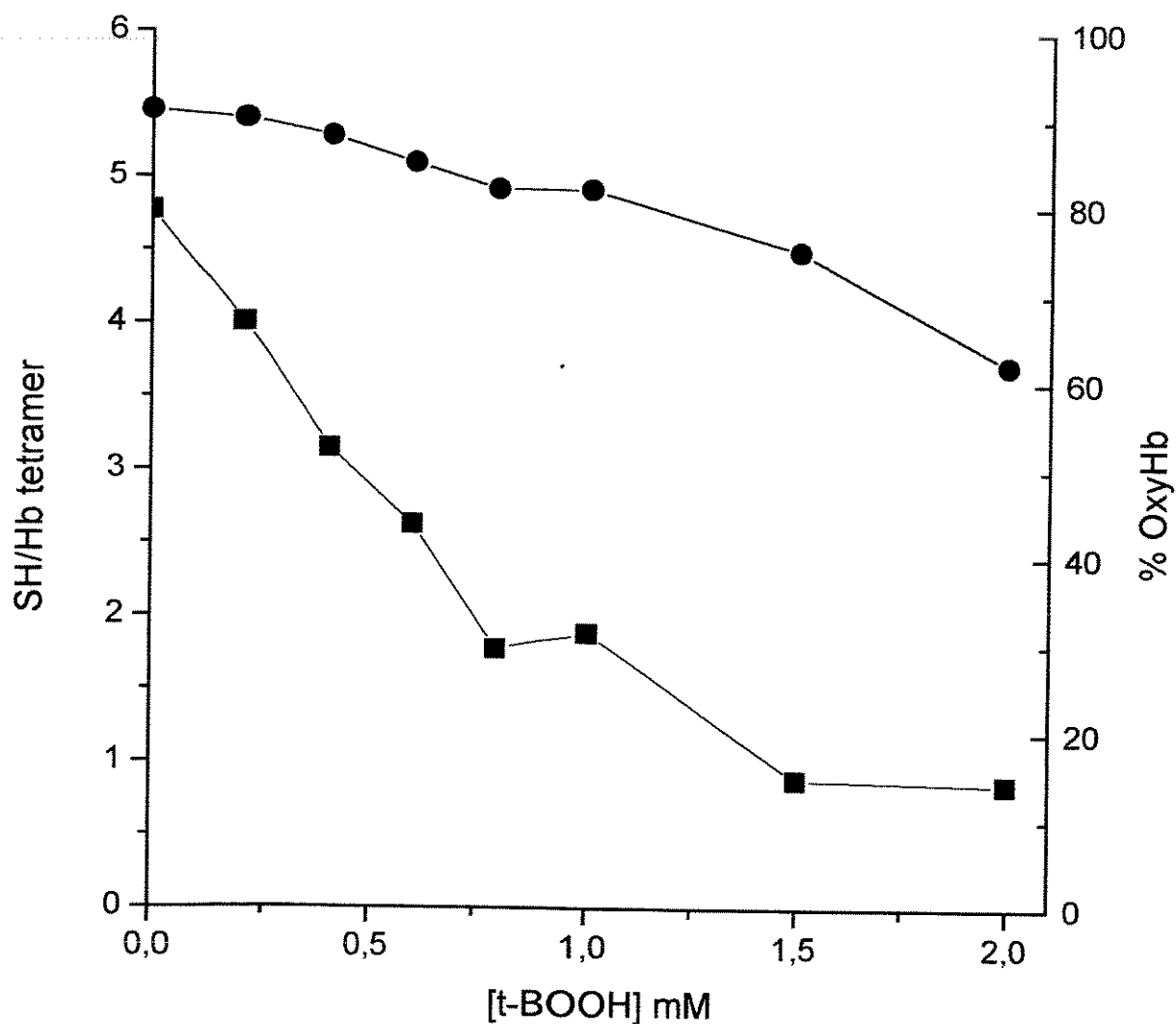


Fig. 1 - The oxidation of heme (●) and reactive thiols (■) of *G. carbonaria* Hb by t-BOOH. The OxyHb concentration and number of reactive thiols were determined after incubation of Hb (40 μ M) with t-BOOH for 5 min at 37°C.

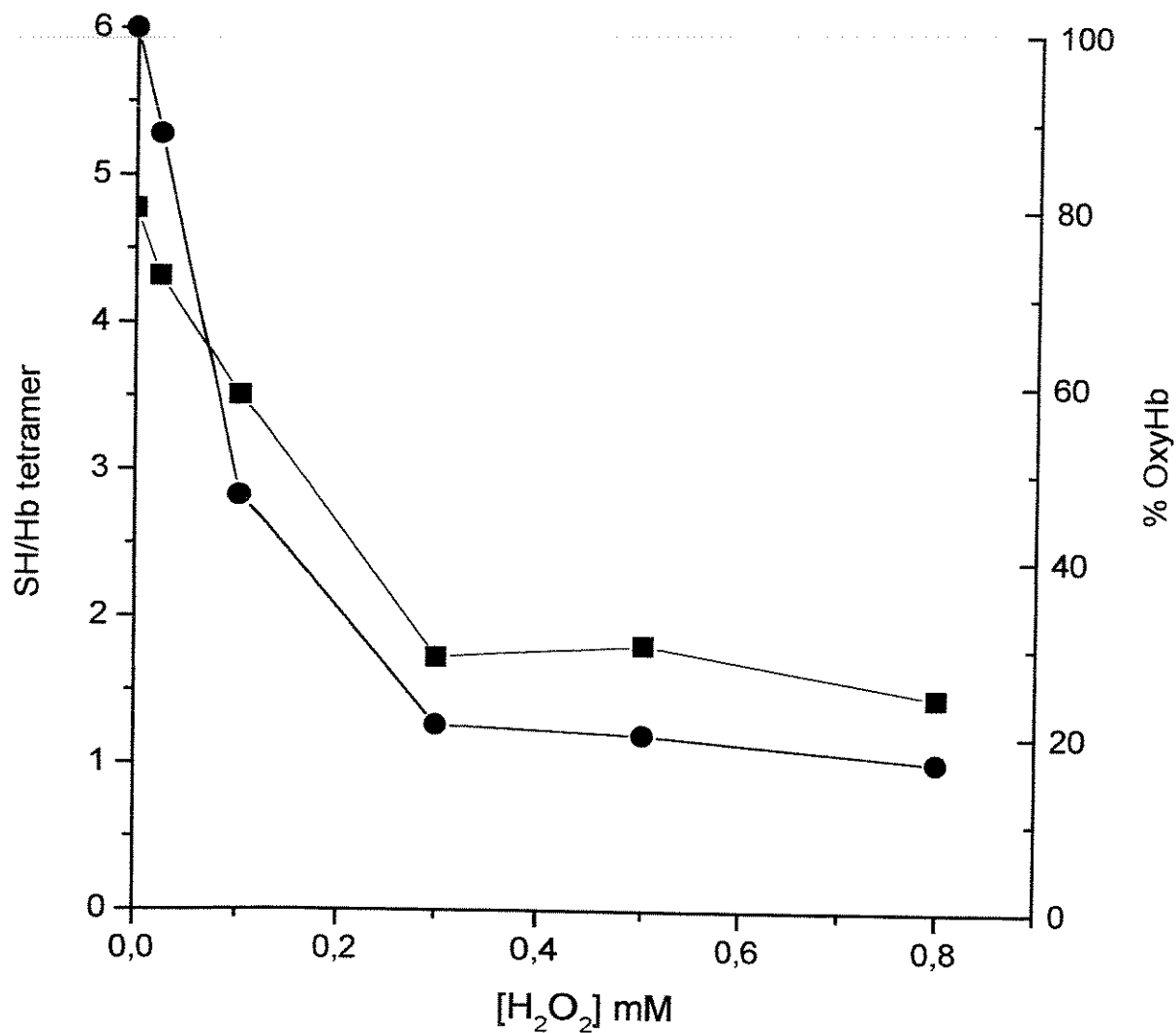


Fig. 2 - The oxidation of heme (●) and reactive thiols (■) of *G. carbonaria* Hb by H_2O_2 . The OxyHb concentration and number of reactive thiols were determined after incubation of the Hb (40 μ M) with H_2O_2 for 5 min at 37°C.

Table I - Lipid peroxidation in human erythrocytes in the absence or presence of *G. carbonaria* Hb (50 μ M) before or after modification by thiol reagents. The lipid peroxidation was quantified in a suspension of human erythrocytes (containing 1 mM of Hb) incubated with 1 mM t-BOOH for 30 min at 37°C.

Conditions	nmoles MDA/g Hb	Relative lipid peroxidation (%)
(1) Suspension of human RBC + t-BOOH	61 $\pm$ 3.6	100%
(1) + un-modified <i>G. carbonaria</i> Hb	45 $\pm$ 2.0	73%
(1) + <i>G. carbonaria</i> Hb modified by diamide	46 $\pm$ 1.4	75%
(1) + <i>G. carbonaria</i> Hb modified by IAA	58 $\pm$ 0.5	95%
(1) + <i>G. carbonaria</i> Hb modified by GSSG	55 $\pm$ 2.0	90%

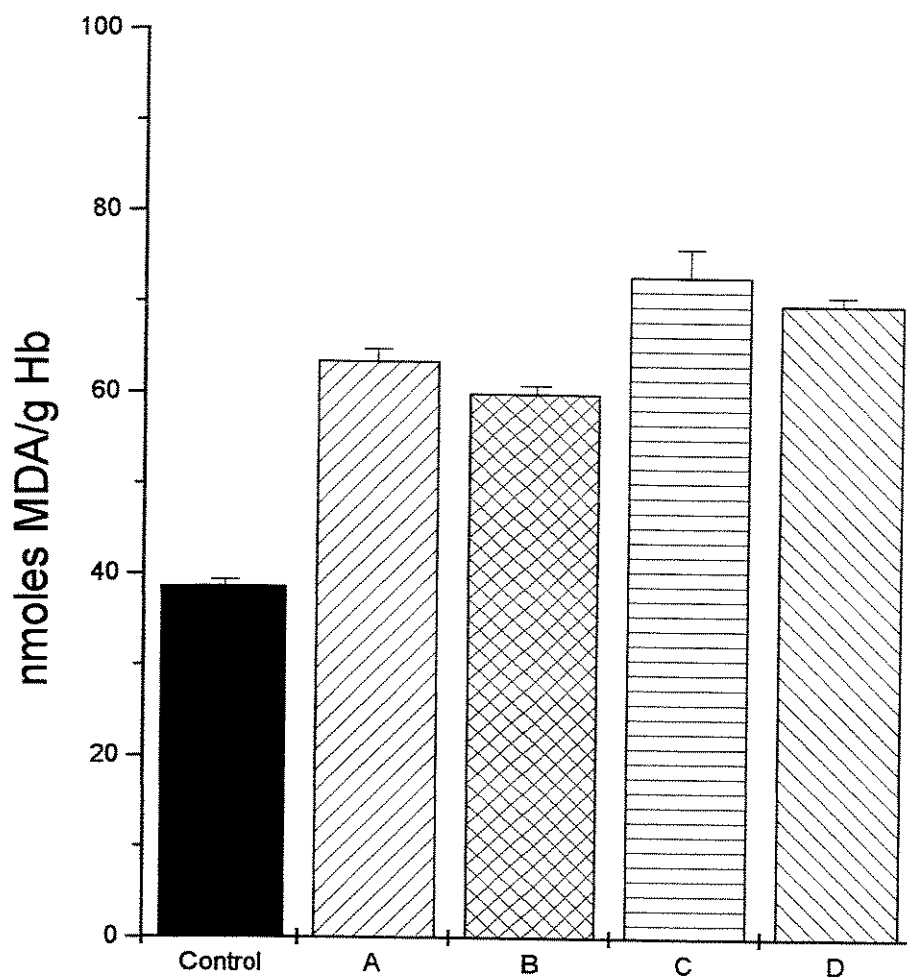


Fig. 3 - Effect of *G. carbonaria* and *G. denticulata* Hb (200 μ M) on the lipid peroxidation of human erythrocytes. (A) *G. carbonaria* stripped Hb, (B) *G. denticulata* stripped Hb, (C) *G. carbonaria* Hb modified by iodoacetamide and (D) *G. carbonaria* Hb modified by NEM. The cells were incubated with 1 mM t-BOOH in the absence (control) or presence of non-modified or modified Hbs for 30 min at 37°C.

3-DISCUSSÃO

As propriedades funcionais e estruturais da hemoglobina de 2 espécies de tartarugas foram estudadas e mostraram diferenças quanto a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio no hemolisado e também no número de bandas em eletroforese (TORSONI & OGO, 1994; TORSONI *et al.*, 1997; 1998a; 1998c). A presença de uma grande heterogeneidade eletroforética no hemolisado tem sido associada a 2 mecanismo principais: (i) a presença de várias cadeias de globinas que poderiam se combinar gerando diferentes hemoglobinas, ou então (ii) a presença de tióis protéicos acessíveis que levariam a formação de pontes de dissulfeto gerando derivados de hemoglobinas, como polímeros e dissulfetos mistos (DAFRE & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRE, 1992; DI SIMPLICIO & ROSSI, 1994; DI SIMPLICIO *et al.*, 1998).

Nas 2 espécies estudadas o número de cadeias de globinas presente no hemolisado não possibilita a formação de inúmeras bandas em eletroforese, como observado no hemolisado de *G. carbonaria* (TORSONI *et al.*, 1998a; 1998c). Portanto, foi investigada para a espécie *G. carbonaria* que apresenta grande heterogeneidade eletroforética, a possibilidade da heterogeneidade ter sido gerada pela presença de tióis reativos na hemoglobina. É conhecido que diferentes espécies de vertebrados apresentam hemoglobinas ricas em grupos tióis reativos, que sob condições oxidantes ou após estocagem, podem polimerizar-se ou formar pontes de

dissulfeto mistas (SULLIVAN, 1974a; 1974b; DAFRE & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRÉ, 1992).

A ocorrência de grupos tióis reativos em hemoglobina e seu papel fisiológico têm sido intensivamente investigado (BRIGELIUS, 1985; DAFRE & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRÉ, 1992). A participação destas hemoglobinas como um mecanismo auxiliar de proteção celular contra espécies reativas de oxigênio e outros oxidantes tem sido proposta. Neste caso, a hemoglobina poderia participar como um tampão redox das células vermelhas, aumentando, portanto, a resistência do animal à hipóxia (REISCHL, 1986; DAFRE & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRÉ, 1992).

No hemolisado de *G. carbonaria* a titulação dos grupos tióis da hemoglobina e de tióis não protéicos mostraram, que nesta espécie, a hemoglobina apresenta 4.1 SH/tetrâmero e que existe cerca de 1 molécula de GSH/Hb no interior do eritrócito (TORSONI *et al.*, 1996). Estudos adicionais realizados com este hemolisado mostraram que a hemoglobina apresenta capacidade de polimerizar-se e de formar pontes de dissulfeto mistas com a glutathiona. Para examinar a contribuição dos grupos sulfidrila da hemoglobina na heterogeneidade eletroforética do hemolisado, a formação de pontes de dissulfeto foi prevenida através da hemólise em presença de iodoacetamida (IAA). Os resultados mostraram que os polímeros formados pelas pontes de dissulfetos entre 2 ou mais moléculas de hemoglobinas eram responsáveis pela heterogeneidade e que a formação da glutathionil-Hb também contribuía

efetivamente para o complexo padrão eletroforético observado. A exposição do hemolisado a altas concentrações de glutathiona oxidada (GS-SG) levou a um aumento da concentração das bandas que correspondiam ao glutathionil-Hb (TORSONI *et al.*, 1998a).

O tratamento do hemolisado com agente redutor logo após a hemólise e subsequente filtração em Sephadex G-25, produziu um aumento no número de grupos tióis reativos na hemoglobina de cerca de 4.1 para 4.7 SH/Hb. Este resultado sugeriu-nos que alguns tióis poderiam estar envolvidos na formação de pontes de dissulfetos no interior do eritrócito (TORSONI *et al.*, 1998a). Esta hipótese foi posteriormente comprovada através da hemólise em presença de IAA. Com este tratamento os grupos tióis foram alquilados, impossibilitando a formação de pontes de dissulfetos adicionais após a hemólise. No entanto, o complexo padrão eletroforético do hemolisado de *G. carbonaria* não mudou após este tratamento, sugerindo que este tenha sido formado antes da hemólise. Outros estudos mostraram que o hemolisado de *G. carbonaria* apresenta apenas 3 principais cadeias de globina, o que possibilita a formação de 2 tipos de hemoglobina. Outras espécies de tartarugas também apresentam similar composição de globina e apenas 2 tipos de hemoglobinas. Nas espécies *Chrysemis picta belli* e *Phrynops hilarii* as 2 hemoglobinas presentes no hemolisado são chamadas de HbA e HbD (RUCKNAGEL *et al.*, 1984). Concluindo, a heterogeneidade eletroforética do hemolisado de *G. carbonaria* teve origem da

formação de pontes de dissulfeto, produzindo bandas a partir das 2 principais hemoglobinas, como descrito por TORSONI *et al.* (1998a).

De acordo com DI SIMPLICIO *et al.* (1998) e BRIGELIUS (1985), a presença de grupos tióis reativos na hemoglobina é particularmente importante em situações de moderado estresse oxidativo. Portanto, em *G. carbonaria*, nessa condição de estresse oxidativo, os dissulfetos mistos presentes nos eritrócitos poderiam proteger as células prevenindo o acúmulo de GS-SG e minimizando a exportação de GS-SG por translocases dependentes de ATP (SRIVASTAVA & BEUTLER, 1969). O acúmulo do GS-SG no interior do eritrócito pode promover a sua ligação inclusive às proteínas de membrana e enzimas citoplasmáticas, alterando as suas funções.

Para que as proteínas possam participar em processos de oxido/redução e conseqüente formação de polímeros ou dissulfetos mistos na célula, é imprescindível que as características funcionais destas proteínas não sejam alteradas. Neste sentido, muitos estudos tem procurado produzir hemoglobinas que possam ser utilizadas como substitutos do sangue. Entretanto, muitos problemas tem surgido principalmente, devido ao aumento na susceptibilidade do heme à oxidação. O uso de hemoglobinas extracelular leva à geração de muitos radicais, devido a rápida oxidação do heme e conseqüentemente, a grande liberação de ferro.

É conhecido que em sistemas oxidantes os grupos tióis de proteínas são o alvo primário e a sua oxidação, como discutido anteriormente, leva à formação de

dissulfetos. Para que fosse possível conhecer o efeito da polimerização e/ou da formação de pontes de dissulfeto mistas, foram realizadas avaliações do comportamento funcional, susceptibilidade do heme a oxidação, nível de polimerização e dissociação das hemoglobinas modificadas pelos reagentes de tióis (TORSONI *et al.*, 1996). A susceptibilidade do heme à oxidação foi analisada através da incubação destas hemoglobinas com t-BOOH. A formação de metaHb e hemicromo foi acompanhada em função do tempo de exposição ao oxidante. A partir destes estudos foi possível determinar o tempo necessário para a oxidação de 50% da hemoglobina ($T_{1/2}$). As hemoglobinas modificadas por IAA e GS-SG foram mais susceptíveis a oxidação que a hemoglobina não modificada. Enquanto as hemoglobinas modificadas por IAA e GS-SG apresentaram $T_{1/2}$ de 6,4 e 5,0 min, respectivamente, a hemoglobina não modificada apresentou um $T_{1/2}$ de 12,6 min. Estes resultados sugerem que a modificação tanto por IAA como por GS-SG, promoveu a alteração conformacional da hemoglobina, modificando o ambiente do heme e expondo o Fe^{2+} a oxidação pelo t-BOOH, como sugerido por GAREL *et al.* (1982) para a hemoglobina humana.

A hemoglobina polimérica, obtida através do tratamento com diamida, no entanto, não apresentou significativa alteração da susceptibilidade do heme a oxidação. A hemoglobina tratada com diamida apresentou um valor de $T_{1/2}$ (10 min) próximo ao valor observado para a hemoglobina não modificada ($T_{1/2}=12,6$ min). A polimerização

da hemoglobina não induziu mudanças significativas no ambiente hidrofóbico em que está inserido o heme. É conhecido que a oxidação de proteínas pode expor regiões hidrofóbicas da molécula que a tornam alvo de proteases diminuindo o tempo de vida do eritrócito na circulação (GAREL *et al.*, 1982; BELLOMO *et al.*, 1987).

Adicionalmente, a susceptibilidade da hemoglobina de ambas as espécies, *G. denticulata* e *G. carbonaria*, à oxidação por t-BOOH foi estudada. O nível de oxidação da hemoglobina “stripped” foi menor na espécie *G. carbonaria*, embora nenhuma diferença tenha sido observada quando as medidas foram realizadas no hemolisado total em ambas as espécies. A última observação sugere que, na presença de um sistema antioxidante consistindo de GSH-Px, GR, CAT, SOD, NADPH e GSH, ambas as espécies tem similar nível de oxidação da hemoglobina. No entanto, o hemolisado “stripped” apresenta as enzimas relacionadas com a detoxificação do t-BOOH (GSH-Px e GR) inativas devido a ausência de substratos redutores, os quais foram eliminados no momento em que a cromatografia em Sephadex G-25 foi realizada. Nestas condições, o efeito oxidante do t-BOOH no hemolisado “stripped” de *G. carbonaria* foi minimizado pela presença de grupos tióis reativos na hemoglobina que podem atuar reduzindo o nível dos compostos oxidantes (TORSONI *et al.*, 1998b).

Os estudos funcionais e estruturais das hemoglobinas modificadas tornaram-se importantes considerando que a oxidação do heme na forma polimérica da

hemoglobina é similar a oxidação observada para a hemoglobina não modificada. Neste contexto, primeiramente, foi determinada a taxa de polimerização ou dissociação das hemoglobinas através da cromatografia em Sephadex G-100. Em pH 7,4 toda hemoglobina não modificada eluiu com um volume correspondente ao tetrâmero de acordo com a curva de calibração. O tratamento destas hemoglobinas com GS-SG e diamida não induziu dissociação, embora o hemolisado que reagiu com diamida apresentava cerca de 80% de hemoglobina polimérica, que eluiu com um volume menor. Para as amostras tratadas com GS-SG foi observada uma fração polimérica que correspondia a 24% do total de hemoglobina aplicada na coluna. Esta provavelmente foi formada durante a realização da cromatografia, desde que esta fração não foi detectada em eletroforese.

Os estudos funcionais das hemoglobinas modificadas mostraram que a forma polimérica tem similar comportamento em relação à hemoglobina não modificada. No entanto, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi sensivelmente modificada pela IAA. Enquanto a hemoglobina não modificada apresentou valor de P_{50} de 6,3 mmHg em pH 7,4 a hemoglobina alquilada (tratada com IAA) revelou um valor de P_{50} de 2,5 mmHg. Para a hemoglobina modificada por GS-SG, por outro lado, o valor de P_{50} foi 15,1 mmHg. A cooperatividade na ligação do oxigênio pelas hemoglobinas modificadas foi similar à observada para a hemoglobina não modificada. Em todos os valores de pH estudados os valores de nH permaneceram próximos de 1,5.

O efeito Bohr entre pH 7,0-8,0, no entanto, foi sensivelmente menor em hemoglobinas modificadas por IAA. Enquanto que as hemoglobinas não modificadas, modificadas por GS-SG e modificadas por diamida apresentaram valores de efeito Bohr de -0,55, -0,70 e 0,64, respectivamente, a hemoglobina modificada por IAA apresentou o valor de -0,15. Apesar do tratamento com IAA não ter induzido a dissociação da hemoglobina, este pode ter promovido a desestabilização da proteína, o que explicaria a sua maior susceptibilidade à oxidação por t-BOOH e as alterações significativas nas propriedades funcionais da proteína.

É importante enfatizar que a glutathionil-Hb e a forma polimérica da Hb de *G. carbonaria* mantiveram as principais propriedades funcionais, como, a reversibilidade da ligação com oxigênio, efeito Bohr e cooperatividade. Neste contexto, o hemolisado, ou, mais precisamente, a hemoglobina, seria uma proteína com propriedades antioxidantes em potencial.

A presença de um mecanismo adicional de proteção na célula pode refletir numa menor susceptibilidade do eritrócito a danos oxidativos ou então numa maior resistência a processos oxidativos devido a presença de mecanismos redutores adicionais. As 2 possibilidades foram investigadas através da determinação da atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias. Adicionalmente à *G. carbonaria* a espécie *G. denticulata* foi estudada como parâmetro para comparação. A segunda espécie de tartaruga, ao contrário da espécie *G. carbonaria*, apresenta Hb com apenas

cerca de 1.5 SH/Hb e o número de GSH/Hb, aproximadamente a metade do observado para a espécie *G. carbonaria* (TORSONI *et al.*, 1998a; 1998b). A capacidade da célula de realizar a detoxificação enzimática foi investigada através da determinação da atividade das enzimas GSH-Px, GR, SOD e CAT no eritrócito das 2 espécies. As enzimas relacionadas aos grupos tióis estavam mais ativas no eritrócito de *G. denticulata*. A GSH-Px foi cerca de 2 vezes mais ativa nesta espécie. Similar comportamento foi observado para a atividade da enzima GR, sugerindo que a alta atividade destas enzimas pode ser reflexo da baixa concentração de GSH na célula. Desta maneira, a célula necessitaria de maior atividade da glutathione redutase para manter a razão GSH/GS-SG elevada. Segundo BRIGELIUS *et al.* (1982) a formação de dissulfetos mistos na célula está diretamente relacionada com a razão GSH/GS-SG.

As enzimas não relacionadas aos grupos tióis, SOD e CAT, mas importantes em atenuar os danos oxidativos *in vivo*, foram mais ativas no eritrócito de *G. carbonaria* (TORSONI *et al.*, 1998b). A SOD converte o ânion superóxido, uma espécie com relativamente baixa reatividade e sem a capacidade de atravessar a membrana livremente, em peróxido de hidrogênio. Este composto oxidante pode passar através da membrana e na presença de metais como Fe^{2+} , o peróxido de hidrogênio pode ser quimicamente convertido em radical hidroxil, que é extremamente reativo (reação de Fenton). Portanto, o produto da reação catalisada pela SOD é potencialmente mais deletério que o ânion superóxido. Segundo WARNER (1994) um aumento na atividade

da SOD deve ser acompanhado por similar aumento na atividade da CAT e GSH-Px a fim de prevenir a excessiva produção de peróxido de hidrogênio. Este comportamento foi observado ocorrer em ambas as espécies. A atividade da SOD foi cerca de 25% maior no eritrócito de *G. carbonaria*, que também apresentou maior atividade da CAT. Portanto, nestas células, as enzimas parecem oferecer uma eficiente proteção contra o acúmulo de peróxido de hidrogênio (TORSONI *et al.*, 1998b).

Apesar das diferenças no sistema antioxidante das 2 espécies de tartarugas, a susceptibilidade do eritrócito à peroxidação lipídica induzida por t-BOOH foi similar. Isto indica que apesar do elevado número de grupos tióis na hemoglobina e alta concentração de GSH por hemoglobina no eritrócito de *G. carbonaria* a peroxidação lipídica foi a mesma para ambas as espécies devido alta atividade das enzimas GSH-Px e GR no eritrócito de *G. denticulata*, minimizando o efeito deletério dos oxidantes.

A participação dos grupos tióis de proteínas na proteção celular contra agentes oxidantes tem sido sugerida por vários autores (BRIGELIUS, 1985; DAFRE & REISCHL, 1990; REISCHL & DAFRE, 1992; ROSSI *et al.*, 1995). Estes estudos têm demonstrado que os tióis protéicos presentes na célula podem participar de reações de formação de dissulfeto (DI SIMPLICIO & ROSSI, 1994; DI SIMPLICIO *et al.*, 1998), comportando-se como um reservatório de poder redutor e fonte de GSH.

O envolvimento direto dos grupos tióis de hemoglobina na redução de compostos oxidantes foi primeiramente avaliado através do efeito de oxidantes sobre os grupos

sulfidrilas e sobre o heme da hemoglobina. A titulação dos grupos tióis livres da hemoglobina antes e após o tratamento com diferentes concentrações de t-BOOH ou H_2O_2 , mostrou que os grupos sulfidrilas são oxidados de maneira dependente da concentração do oxidante, assim como a oxidação do heme da hemoglobina. Estes resultados sugerem que os hidroperóxidos são reduzidos pelos tióis reativos da hemoglobina, diminuindo seu efeito sobre os componentes celulares.

Esta hipótese foi avaliada através da peroxidação lipídica da membrana em uma suspensão de eritrócitos humanos, na presença de t-BOOH (1mM). Para isto foram utilizadas a hemoglobina de *G. carbonaria*, que apresenta 4 SH/Hb, e a hemoglobina de *G. denticulata* que apresenta apenas 1.5 SH reativos por molécula de Hb (TORSONI *et al.*, 1996; 1998b; 1998d). A peroxidação lipídica na suspensão de eritrócitos foi induzida na ausência ou presença de ambas as hemoglobinas. Quando a suspensão de eritrócitos humano estava na presença de baixa concentração de hemoglobina de *G. carbonaria*, a concentração de MDA formado foi cerca de 30% menor, enquanto que, na presença da mesma concentração a hemoglobina de *G. denticulata*, não apresentou significativo efeito antioxidante. Concentrações crescentes de hemoglobina, tanto de *G. carbonaria* como de *G. denticulata*, induziram um aumento na produção de MDA de maneira concentração dependente. Este efeito provavelmente ocorreu devido ao aumento na produção de radical alcóxil, peróxil

(reação 13 e 14) e ferril-Hb ou ainda devido a liberação do ferro, que podem promover danos adicionais à membrana (GUTERIDGE, 1986; EVERSE & HSIA, 1997).

A modificação da hemoglobina de *G. carbonaria* por IAA levou ao desaparecimento do efeito antiperoxidativo devido a alquilação dos grupos tióis e o aumento da susceptibilidade do heme a oxidação (TORSONI *et al.*, 1996). Por outro lado, a modificação da hemoglobina pela diamida não alterou a capacidade da hemoglobina de inibir parcialmente a peroxidação lipídica induzida pelo t-BOOH, embora alguns de seus tióis tivessem sido comprometidos na formação de pontes dissulfeto (TORSONI *et al.*, 1996). No entanto, o tratamento da hemoglobina de *G. carbonaria* com GS-SG, apesar de cerca de 3 SH/Hb tetramérica ainda permanecer na forma livre, a glutatona oxidada aumentou a exposição do heme ao t-BOOH (TORSONI *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que os grupos sulfidrila da hemoglobina tem importante papel na susceptibilidade do heme à oxidação. Isto nos leva a acreditar que o grupo sulfidrila da hemoglobina de *G. carbonaria* pode participar na redução de hidroperóxidos e outros compostos oxidantes na célula, mas a participação do heme em reações de formação de radicais pode, contudo, potencializar os processos oxidantes. Segundo GUTTERIDGE (1986) dependendo do estado de oxidação do ferro heme da hemoglobina, esta pode liberar o ferro e/ou a hemina, que participam da reação de Fenton, gerando radical hidroxil. Este último, pelo seu alto

potencial oxidativo poderia oxidar lipídios da membrana iniciando o processo de peroxidação.

Assim acreditamos que os grupos tióis da hemoglobina, em adição a GSH, podem agir como agentes redutores sob condições de estresse oxidativo suave. Os dissulfetos formados não parecem promover mudanças conformacionais e portanto a Hb permanece capaz de transportar oxigênio. Neste contexto, as proteínas-tióis presentes no interior da célula ou livres no plasma seriam antioxidantes em potencial, desde que a oxidação de seus grupos sulfidrilas não leve a mudanças em seu comportamento funcional. A propriedade adicional de proteínas-tióis no plasma é muito significativa considerando-se que através do sangue estas proteínas podem atuar em diferentes tecidos oferecendo um tamponamento redox adicional (REISCHL *et al.*, 1986) e DAFRÉ & REISCHL 1990).

4- SUMMARY

Several species of vertebrates present Hb which is capable to polymerize through disulfide bridges. In these species, hemoglobin shows reactive thiol groups, which lead to formation of polymerized Hb as well as mixed disulfides with glutathione. Many authors have been related the presence of reactive thiol in the Hb to resistance of animal to hypoxia. Others studies have been related these groups to additional mechanism of cellular protection. Among vertebrates, the reptiles present many species with sulphhydryl rich Hb. The tortoise, *G. carbonaria*, belonging to Testudinidae family presents approximately 4 reactive thiols in its Hb and a complex electrophoretic pattern. The specie *G. denticulata*, on the other hand, presents only 2 reactive thiols in its Hb and a simpler electrophoretic pattern. This study is attempt to investigate the involvement of these Hb in antioxidant mechanisms. Comparative studies of oxidation of stripped Hb of both species showed that the *G. denticulata* Hb is mores susceptible to oxidation, probably due the small number of reactive thiols. The modification of *G. carbonaria* Hb by diamide or GSSG did not induce significant alteration in the functional properties. However, Hb-O₂ binding properties was sensibly altered when the modification was promoted by IAA and GSSG. The studies of lipid peroxidation from human erythrocytes in the absence or presence of these modified and non-modified Hbs showed that *G. carbonaria* stripped Hb (non-modified Hb) diminished the lipid peroxidation. This protective effect was abolished in the presence of modified hemoglobin. This results suggests that involvement of sulphhydryl groups of Hb in the prevention of lipid peroxidation. The antioxidant enzymes were also analyzed in these 2 species of tortoises. GSH-Px and the GR were more active in the specie *G. denticulata*, whereas the SOD and the CAT were more active in the *G. carbonaria*. Titration of GSH showed that the number of GSH/Hb was two times higher in *G. carbonaria* erythrocyte than in *G. denticulata*. Thus, the specie *G. carbonaria* present higher reducing power into RBC and the presence of thiol groups in its Hb is a additional mechanism of cellular protection.

5-BIBLIOGRAFIA

- AMBRUSO, D. R. & JOHNSTON, R. B. Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by neutrophils, neutrophils particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, 67:352-360 (1981)
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. *Science* 221:1246-1264 (1983).
- AMES, B. N. & SAUL, R. L. Oxidative DNA damages related to cancer aging. In genetic toxicology of environmental chemicals (Ramel, C.; Lambert, B. & Magnusson, B. eds) Alan R. Liss, New York (1986).
- ANTONINI, E & BRUNORI, M. In The red blood cell. Hemoglobin and methemoglobin, 753-797. Academic Press, London (1975).
- BELLOMO, G.; MIRABELLI, F.; DI MONTE, D.; RICHELMI, P.; THIOR, H.; ORRENIUS, C. & ORRENIUS, S. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulphides during stress oxidative. A study with isolated hepatocytes and menadione. *Biochem. Pharmacol.* 36: 1313-1320 (1987).
- BEUTLER, E. Effects of flavin compounds on glutathione reductase activity: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Invest.* 48: 1957-1966 (1969).
- BIRCHMIER, W.; TUCHSCHMID, P. E. & WINTERHALTER, K. H. Comparison of human hemoglobin A carrying glutathione as a mixed disulphide with the naturally occurring human hemoglobin A₃. *Biochemistry*, 12:3667-3667 (1973)
- BOARD, P. G. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *Am. J. Hum. Genet.* 33:36-43 (1981)

- BRIGELIUS, R.; LENZEN, R. & SIES, H. Increased in hepatic mixed disulphide and glutathione disulphide level elicited by paraquat. *Biochem. Pharmacol.* 31:1637-1641 (1982)
- BRIGELIUS, R. In oxidative stress (Edited by Sies H.), pp 243-272, 1985.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 51:79-110 (1989).
- CARSON, P. E.; BREWER, G. J. & ICKES, C. Decreased glutathione reductase with susceptibility to hemolysis. *J. Lab. Clin. Invest.* 58: 804-804 (1961)
- CAUGHEY, W. S. Porphyrin proteins and enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 36:611-644 (1967)
- CHAI, Y.C. ASHRAF, S. S.; ROKUTAN, K. JOHNSTON, R. B. JR. & THOMAS, J. A. Protein S-thiolation hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 310:264-272 (1994a)
- CHAI, Y. C.; HENDRICH, S. & THOMAS, J. A. S-thiolation of individual human neutrophil protein inducing actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulphide. *Arch. Biochem. Biophys.* 310:273-281 (1994b)
- CHIU, D. T Y.; VAN DER BERG, J.; KUYPERS, F. A.; HUNG, I. J.; WEI, J. S. & LIU, T. Z. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. *Free Rad. Biol. Med.* 21(1):89-95 (1996).
- CHIU, D.; LUBIN, B. H. & SHOHET, S. B. Peroxidative reactions in red cell biology. In *Free radicals in biology* Vol. V pp 115-160 (1982) (Pryor, W. A. ed.) Academic Press, New York.
- CHIU, D.; LUBIN, B. & SHOHET, S. Erythrocyte membrane lipid reorganization during the sickling process. *Br. J. Haematol.* 41:223-234 (1979)

- CHIU, D. & LUBIN, B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxide levels in sickle cell anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 94: 542-548 (1979)
- CLARK, M. R. & SHOHET S. B.. Red cell senescence. *Clin. Haemat.*, 14: 223-257 (1985).
- CLEMENS, M. R.; EINSELE, H.; REMMER, H. & WALLER, H. D. An essential requirement for ferrous-hemoglobin in the hydrogen peroxide stimulated oxidation of red blood cell membrane lipids. *Biochem. Pharmacol.* 34:1339-1341 (1985)
- CLEMENS, M. R. & WALLER, H. D.. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.*, 45: 251-268 (1987).
- CUTLER, R. G.. Antioxidants, aging and longevity. In *Free radicals in biology* (edited by Pryor W. A.), pp. 371-428. Academic Press, Orlando, FL, (1984a).
- CUTLER, R. G. Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity of mammalian species. *Arch. Gerontol. Geriat.*, 3:321-348 (1984b).
- CUTLER, R. G. Antioxidant and longevity of mammalian species. In *Molecular Biology of Aging* (edited by Woodhead A. D., Blacket A. D. and Hollander A.), pp. 15-73, Plenum Press, New York, (1985).
- DAFRE, A. L. & REISCHL, E. High hemoglobin mixed disulphide content in hemolysates from stressed shark. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B:215-219 (1990).
- DAVIES, K. J. A.; SEVANIAN, A.; MUAKASSAH-KELLY, S. P. & HOCHSTEIN, P. A. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem. J.* 235:747-754 (1986)
- DELUCIA, A. J. MUSTAFA, M. G.; HUSSAIN, M. Z. & CROSS, C. E. Ozone interaction with rodent lung. *J. Clin. Invest.* 55:794-802 (1975).

- DI SIMPLICIO, P. & ROSSI, R. The time-course of mixed disulfide formation between GSH and proteins in rat blood after oxidative stress with *tert*-butyl hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1199:245-252 (1994)
- DI SIMPLICIO, P.; CACACE, M. G.; LUSINI, L.; GIANNERINI, F.; GIUSTARINI, D. & ROSSI, R. Role of protein-SH groups in redox homeostasis- The erythrocyte as a model system. *Arch. Biochem. Biophys.* 335(2): 145-152 (1998)
- DODGE, J. T.; COHEN, G.; KAYDEN, H. J. & PHILLIPS, G. B. Peroxidative hemolysis of red blood cells from patients with abetalipoproteinemia *J. Clin. Invest.* 46: 357-368 (1967).
- EVERSE, J. & HSIA, N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Rad. Biol. Med.* 22:1075-1099 (1997)
- FAZI, A.; ACCORSI, A.; PIATTI, E. & MAGANI, M. Cell age dependent decay of human erythrocytes glutathione-S-transferase. *Mech. Ageing Dev.* 58:255-266 (1991).
- FEE, J. A. & TEITELBAUN, H. D. Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49:150-158 (1972)
- FITCH, C. D.; CHEVLI, R.; KANJANANGGULPAN, P.; DUTTA, P.; CHEVLI, K. & CHOU, A. C. Intracellular ferridoproteoporphyrin IX is a lytic agent. *Blood* 62: 1165-1168 (1983)
- FLOHE, L.. Superoxide dismutase for therapeutic use: Clinical experience, dead ends and hopes. *Mol. Cell. Biochem.*, 84: 123-131 (1988).
- FLOHE L.; GÜNZLER, W. A. & SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters*, 32: 132-134 (1973)

- FREEDMAN, R. B. How many distinct enzymes are responsible for the several cellular process involving thiol: protein-disulphide interchange. *FEBS Lett.* 97, 201-210 (1979)
- FREEMAN, B. A. & GRAPO, J. D. Biology of disease. Free Radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47:412-426 (1982)
- FYHN, U. E. H. & SULLIVAN, B. Elasmobranchs haemoglobins dimerisation and polymerisation in various species. *Comp. Biochem. Physiol.* 50:119-129 (1975)
- GAREL, M. C.; BEUZARD, Y.; THILLET, J.; DOMENGET, C.; MARTIN, J.; GALACTEROS, F. & ROSA, J. Binding of 21 thiol reagents to human hemoglobin in solution and intact cells. *Eur. J. Biochem.* 123: 513-519 (1982)
- GIULIVI, C. & DAVIES, K. J. A. A novel antioxidant role for hemoglobin. The Comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 265: 19453-19460 (1990).
- GIULIVI, C. & CADENAS, E. Heme proteins radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Rad.. Biol. Med.* 24(2): 269-279 (1998)
- GORDON-SMITH, F & WHITE, B. Oxidative haemolysis and Heinz body haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.*, 26: 513-517 (1974)
- GUTTERIDGE, J. M. C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from hemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* 201: 291-295 (1986)
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C.. IN: "Free radicals in biology and Medicine". (B. Halliwell and J. M. C.Gutteridge eds), pp 188. Clarendon Press, Oxfor, 1989.
- HUISMAN, T. H. J. & DOZY, A. M.. *J. Lab. Clin. Med.* 60:302-319 (1962)
- IMANISHI, H.; NAKAI, T.; ABE, T. & TAKINO, T. Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging. *Clin. Chim. Acta* 159:73-76 (1986).

- JOCELYN, P. C. In Biochemistry of the SH group (Jocelyn, P. C., ed.) Academic Press, London (1972)
- KEELING, P. L.; SMITH, L. L. & ALDRIDGE, W. N. The formation of mixed disulphide in rat lung following paraquat administration. *Biochim. Biophys. Acta.* 716:249-257 (1982)
- KELLET, G. L. & SCHACHMAN, H. K. Dissociation of hemoglobin into subunits: monomer formation and the influence of ligands. *J. Mol. Biol.* 59: 387-399 (1971)
- KIRSCHNER-ZILBER, I., RABIZADEH, E; SHAKAI, N. The interaction of hemin and bilirubin with the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 690: 20-30 (1982)
- KLEINSCHMIDT, T. & SGOUROS, J. G. Hemoglobins sequences. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368: 579-615 (1987).
- KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M. KOPPEL, R. L. Sensitivity of hemoglobin thiol groups within red blood cells of rat during oxidation of glutathione. *Eur. J. Biochem.* 77:529-534 (1977)
- KURATA, M.; SUZUKI, M & AGAR, N. S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B: 477-487 (1993).
- LI, C. K. & HUNG, C.N. Protein thiol modifications of human red blood cells treated with t-butyl hydroperoxide. *Biochim Biophys. Acta* 1336:147-156 (1997)
- LIU, S. C.; ZHAI, S. LAWER, J. & PALEK, J. Hemin-mediated dissociation of erythrocyte membrane skeletal proteins. *J. Biol. Chem.* 260:12234-12239 (1985)
- LOMBECK, I.; KASPEREK, K.; BACHMANN, D. FEINENDEGEN, L. E. & BREMER, H. J. Selenium requirements in patients with inborn error of amino acid metabolism and selenium deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 134: 65-68 (1980)

- LOOS, H.; ROOS, D.; WEENING R. & HOUWERZIL, J. Familial deficiency of glutathione reductase in human blood cells. *Blood* 48: 53-62 (1976)
- LUX, S. E.; JOHN, K. M. & KARNOVSKY, J. Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversible sickled cells. *Clin. Invest.* 58: 955-963 (1976)
- MACCORD, J. M. & DAY, E. D. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* 86: 139-142 (1978)
- MARCUS, C. J.; HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Glutathione transferase from human erythrocytes. Non identify with the enzymes from liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 188: 287-293 (1978)
- MARTINEZ-CAYUELA, M. Oxidative free radicals and human disease. *Biochimie* 77: 147-161 (1995).
- MCCORD, J. M.. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New England. J. Med.*: 312:159-163 (1985).
- MEISTER, A. & ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760 (1983).
- MENGEL, C. E.; KANN, H. E. & MERIWETHER, W. D. Studies of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes: increased lysis and lipid peroxide formation by hydrogen peroxide. *J. Clin. Invest.* 46: 1715-1723 (1967)
- MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I.. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 247: 6960-6962, 1972.
- PAGLIA, D. E. & VALENTINE, W. N. Evidence for molecular alternation of piruvate kinase as consequence of erythrocyte aging. *J. Lab. Clin. Med.* 76:202-212 (1970).
- PUPPO, A. & HALLIWELL, B.. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* 249: 185-190 (1988).

- RAVICHANDRAN, V. ; SERE, R. MORIGUCHI, T. THOMAS, J. A. & JOHNSTON, R. B. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. J. Biol. Chem. 269:25010-25015 (1994).
- REISCHL, E.. Sulphidryl rich hemoglobins in reptiles: a defense against reactive oxigens species? in Non-mammalian animal models for biomedical research, (edited by Woodhead A. D.) Ch. 18:309-318. C R C Press, Boca Raton, EUA, (1989).
- REISCHL, E.. High sulphidryl content in turtle erythrocytes: is there a relation with resistance to hypoxia?. Comp. Biochem. Physiol., 85B: 723-726 (1986).
- REISCHL, E. & DAFRE, A. L.. Glutathione mixed disulphides and heterogeneity of chicken hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol. 102B:849-853 (1992).
- RICE-EVANS, C. & BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. Biochem. J. 244: 191-196 (1987)
- ROSSI, R.; CARDAIOLI, E.; SCALONI, A.; AMICONI, G. & DI SIMPLICIO, P. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. Biochim. Biophys. Acta 1243:230-238 (1995)
- RUCKNAGEL, K. P.; REISCHL, E. AND BRAUNITZER, G. Expression von α^D -gene bei schildkroten, chrysemys picta bellii und Phrynops hilarii (Testudines). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365:1163-1171 (1984).
- SADRAZADEH, S. M. H.; GRAF, E.; PANTER, S. S.; HALLAWAY, P. E. & EATON, J. W. Hemoglobin a biologic Fenton reagent J. Biol. Chem., 259: 14354-14356 (1984).
- SEVANIAN, A.; DAVIES, K. J. A. & HOCHSTEIN, P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. J. Free Rad. Biol. Med. 1:117-124 (1985).
- SIES, H.. Oxidative stress: Introductory remarks. In Oxidative Stress (edited by Sies H.), pp 1-8. Academic Press, London (1985).

- SOLAR, I. & SHAKLAI, N. Association of hemin with proteins 4.1 as compared to spectrin and actin. *Biochim. Biophys. Acta* 983:199-204 (1989)
- SPILBERG, S. P.; GARRICK, M. D.; CORASH, L. M.; BEUTLER, J. D.; TIETZE, F.; ROGERS, L. & SCHULMAN, J. D. Biochemical heterogeneity in glutathione synthetase deficiency. *J. Clin. Inves.* 61: 1417-142 (1978)
- SPODARYK, K. The red blood cell glutathione reductase activity in anaemic rat. *Mech. Ageing Dev.* 52:255-261 (1990).
- SRIVASTAVA, S. K.; AWASTHI, Y. C. & BEUTLER, E. Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes. *Biochem. J.* 139: 289-295 (1974)
- SRIVASTAVA, S. K. & BEUTLER, E. The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes *J. Biol. Chem.* 244: 6-16 (1969)
- SULLIVAN, B. Reptilian hemoglobins. In *Chemical Zoology* (Edited by Florkin M. and Scherer, B. T.) Vol. 9 Chap 14, Academic Press, New York (1974a).
- SULLIVAN, B. Amphibian hemoglobins. In *Chemical Zoology* (Edited by Florkin M. and Scherer, B. T.) Vol. 9 Chap 5, Academic Press, New York (1974b).
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.. Haemoglobin: Reversal of oxidation and polymerization in turtle red cells. *Nature*, 204:1098-1099, 1964.
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A. Structure and function and evolution of haemoglobins-II. Electrophoretic studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 23:449-458 (1967)
- SUZUKI, T. AGAR, N. S. & SUZUKI, M. The effect of experimental anaemia on red cell glutathione reductase. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A:473-478 (1984a).
- SUZUKI, T.; AGAR, N. S. & SUZUKI, M. Red cell metabolism: a comparative study of some mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 515-520 (1984b)

- SUZUKI, T.; AGAR, N. S. & SUZUKI, M. Red cell metabolism in experimental animals: pentose-phosphate pathway, antioxidant enzymes and glutathione. *Exp. Anim.* 34: 353-366 (1985)
- SUZUKI, T.; COGGAN, M.; SHAW, D. C. & BOARD, P. G. Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isoenzymes. *Ann. Hum. Genet.* 51: 95-106 (1987).
- SVEDBERG, T. & HEDENIUS, A. The sedimentation constants of the respiratory proteins. *Biol. Bull.* 66: 191-223 (1934).
- THOMAS, J. A. POLAND, B. & HONZATKO, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319:1-9 (1995)
- THOMAS, M. J.; MEHL, K. S. & PRYOR, W. A. The role of the superoxide anion in the xanthine oxidase-induced autoxidation of linoleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 927-932 (1978)
- THORNALLEY, P. J.; TROTTA, R. J. & STERN, A. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 759:16-22 (1983).
- TORSONI, M. A. & OGO, S. H. Oxygenation properties of hemoglobin from the turtle *Geochelone carbonaria*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:1129-1131 (1994)
- TORSONI, M. A.; VIANA, R.I.; BARROS, B.F; STOPPA, G.; CESQUINI, M. & OGO, S.H. Effect of thiol reagents on functional properties and heme oxidation of hemoglobin from *Geochelone carbonaria*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40(2), 355-364 (1996).
- TORSONI, M. A., VIANA, R. I., STOPPA, G. R., CESQUINI, M., BARROS, B. F. & OGO, S. H. Oxygen binding properties of total hemoglobin and isolated components

- of the terrestrial tortoise *Geochelone carbonaria*. Comp. Biochem. Physiol. 118 (A): 679-684 (1997).
- TORSONI, M.A. SOUZA-TORSONI, A. & OGO, S.H. - Involvement of Hb-mixed disulfides and polymerization on the heterogeneity of hemoglobin from the terrestrial turtle *G. carbonaria*. Biochem. Mol. Biol. Int. 44(4): 851-860 (1998a)
- TORSONI, M. A.; VIANA, R. I. & OGO, S. H. Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells. Biochem. Mol. Biol. Int. 46(1): 147-156, 1998b.
- TORSONI, M. A.; STOPPA, G. R. & OGO, S. H. Structure and function of hemoglobin from the tortoise *Geochelone carbonaria*. Brazilian. J. Med. Biol. Res. (1998c) (submetido)
- TORSONI, M. A. & OGO, S. H. High reactive thiols of *Geochelone carbonaria* Hb can reduce oxidative damage in erythrocyte membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998d) (submetido)
- TROTТА, R. J.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Biochim. Biophys. Acta. 679: 230-237 (1981)
- VAN DER BERG, J. J. M.; OP DEN KAMP, J. A. F.; LUBIN, B. H.; ROELOFSEN, B. & KUYPERS, F. A.. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. Free Rad. Biol. & Med., 12: 487-498 (1992).
- VAN DER ZEE, J.; VAN STEVENINCK, J.; KOSTER, J. F. & DUBBELMAN, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidation damage of red blood cells produced by t-butyl hydroperoxide derived radicals. Biochim. Biophys. Acta 980: 175-180 (1989)
- WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. Free Rad. Biol. Med. 17:249-258 (1994)

- ESTERMAN, M. P.; PIERCE, L. E. & JENSEN, W. N. Erythrocytes lipids: a comparasion of **nomal** young and normal old population. J. Lab. Clin. Med. 62:394-400 (1963).
- INTERBOURN, C. C.. Oxidative reactions of hemoglobins. Meth. Enzymol., 186: 265-272 (1990).
- INTERBOURN, C. C.; MCGRATH, B. M. & CARRELL, R. W. Reactions involving superoxide radical **and** normal and unstable haemoglobin. Biochem. J. 155: 493-502, (1976)
- AWATA, Y. & TANAKA, K. Regulatory mechanism of glutathione reductase activity in human red cells. **B**lood 43: 99-109 (1974)
- IEGLER, M. D. **Role** of reversible oxidation and reduction of enzymes thiols-disulphides in **metabolic** regulation. Ann. Rev. Biochem. 54: 305-329 (1985)
-