

NILCE CORREA MEIRELLES

ESTUDOS SOBRE ALTERAÇÕES EM HEMÁCIAS E PROPRIEDADES
FUNCIONAIS DE HEMOGLOBINA HUMANA, INDUZIDAS POR
PAPAVERINA E DIPIRIDAMOL.

Tese de Livre Docência
apresentada ao Instituto
de Biologia da Uni-
versidade Estadual de
Campinas.

Campinas

1983

A meus pais

Urbano,

Urbano, Alexandre, Christian

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr.José Aristodemo Pinotti, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas; ao Prof.Dr. Clodowaldo Pavan, DD.Diretor do Instituto de Biologia; ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Professor Titular do Departamento de Histologia e ao Prof.Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, Chefe do Departamento de Bioquímica, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento.

Ao Prof.Dr. Aldo Focesi Júnior, com quem nos iniciamos na carreira científica e quem nos introduziu na fascinante área de hemoproteínas.

A nossos colegas do Departamento de Bioquímica em especial aos Doutores Anibal Eugênio Vercesi e Lucia Pereira da Silva Airolodi pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Prof.Dr. Sérgio Mascarenhas, pela permissão na utilização do Espectrômetro de Ressonância Magnética e ao Prof. Dr.Otacíro R.Nascimento e amigos do grupo de biofísica do Instituto de Física e Química de São Carlos, pela colaboração e entrosamento.

Ao Prof.Dr. Marcel Tabak, em especial, pela amizade, empenho, colaboração e espírito científico na elaboração deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Genética Médica Dr. Sérgio Ramalho e Luis Alberto Magna pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e em especial a Srta Regina Célia Rossetto, pela doação voluntária do material biológico e Srta Maria Luiza de Souza, pelo esmero e dedicação no trabalho de datilografia.

ÍNDICE

	pag.
I. INTRODUÇÃO	1
Hemoglobina - Estrutura	1
Propriedades funcionais da hemoglobina	4
Hemoglobina - proteína alostérica.....	8
Fatores que afetam a transição T → R	14
Interação de hemoglobinas com fosfatos orgânicos	15
Afinidade da hemoglobina pelo oxigênio	19
Interação de drogas com hemoglobina	22
Metabolismo da hemácia	30
Membrana da hemácia	31
Objetivos	40
II. MATERIAL E MÉTODOS	41
Abreviaturas	41
Preparação do hemolisado	42
Preparo de amostras isentas de cofatores ...	42
Curva de equilíbrio da oxigenação	42
Preparação de globina	44
Titulação de globina com hemácia	45
Titulação de metahemoglobina com hidróxido de sódio	45
Oxidação de oxihemoglobina	46
Determinação da atividade do sistema de metaredutase	47
Ensaio de NADH diaphorase I em eritrócitos .	47
Captação de papaverina por eritrócito	48
Captação de ANS por eritrócito	49
Avaliação da turgescência de hemácias	50
Alterações morfológicas nos eritrócitos	50
Curvas de hemólise	51
Preparação de membranas de eritrócitos	51
Dosagem de ATP no sangue	52

Dosagem de 2,3-DPG no sangue	52
Método do marcador de spin	53
Radicais Nitróxido	53
Espectro de ressonância paramagnética eletrônica de nitróxidos	54
Equipamentos e reagentes	56
III. RESULTADOS	59
Propriedades espectrais	59
Equilíbrio de hemoglobina com o ligante oxigênio	59
Titulação de globina purificada com hemina .	67
Titulação alcalina de metahemoglobina	70
Formação de metahemoglobina	70
Sistema de metaredutase	73
Captação de 1-anilino 8 naftaleno sulfonato.	77
Atividade hemolítica	81
Resistência osmótica	81
Alterações morfológicas	88
Concentração de fosfatos intraeritrocitária.	88
Utilização de radicais nitróxido para detecção de alterações em membranas	88
IV. DISCUSSÃO	98
Capacidade de transporte de oxigênio- curvas de equilíbrio hemoglobina/oxigênio	98
Hemácias	104
Modificações da hemácia íntegra	106
Mudanças conformacionais da membrana	110
ABSTRACT	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

INTRODUÇÃO

I - 1 HEMOGLOBINA: ESTRUTURA

O termo hemoglobina foi usado pela primeira vez por Hoppe Seyler (1864) que descreveu o pigmento vermelho nos eritrócitos e observou as características de absorção óptica desta hemeproteína na sua forma oxigenada. Stokes (1864) notou que a desoxigenação produzia mudanças espectrais em relação a forma oxigenada observada por Seyler.

A ligação reversível com o oxigênio pela hemoglobina foi analisada quantitativamente no final do século por um grupo de fisiologistas que inclui: Bohr, Krogh, Barcroft e Haldane. Em 1852 o cromóforo da hemoglobina foi isolado na forma de cloreto de hemina (Teichman, 1852). Durante o ano de 1920 o grupo prostético contendo ferro foi exaustivamente investigado e a síntese do grupo heme foi realizada por Fisher (1929). Logo se tornou aparente que esta porfirina era o grupo prostético não só da hemoglobina como também de outras proteínas respiratórias como a mioglobina e alguns citocromos (Haurowitz, 1928). Quando a natureza do grupo prostético foi completamente elucidada foi possível um melhor entendimento de sua relação com a proteína globina. O fato do grupo hemínico conter ferro confere à proteína a propriedade de se combinar reversivelmente com o oxigênio, o que consiste a base de sua função fisiológica de transportadora deste gás (Keilin, 1951). A capacidade de ligação reversível com o oxigênio depende de interações específicas do grupo heme com a proteína, que envolvem o átomo de ferro e parte da porfirina formando complexos octaédricos de coordenação com diferentes ligantes na quinta e sexta posições. A quinta posição de coordenação do ferro é ligada covalentemente ao resíduo da histina proximal

(F₈) e a sexta pode estar ocupada pelos ligantes oxigênio, monóxido de carbono, água ou radical hidroxila, etc. Fisiologicamente o ferro se mantém no estado reduzido (Fe⁺⁺) e pode estar ou não ligado ao oxigênio. No estado ferroso, o Fe⁺⁺ pode se ligar a outros ligantes como NO, isocianato, compostos aromáticos nitrosos dando derivados correspondentes. Como resultado da autooxidação ou exposição a agentes oxidantes o ferro é oxidado a Fe⁺⁺⁺ ou forma férrica. Neste caso ele poderá estar ligado a radicais hidroxila, azida, fluoreto, cianeto, imidazol, etc, mas não é mais capaz de ligar O₂.

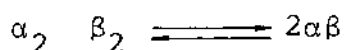
Na hemoglobina desoxigenada o ferro é penta coordenado e a sexta posição de coordenação permanece vazia: o composto é paramagnético. Nesta situação de alto spin o átomo de ferro se mantém fora do plano do heme de 0,3 a 0,7 Å (Love et alii, 1971). Na hemoglobina oxigenada, a sexta posição de coordenação está ocupada pelo oxigênio e o composto é diamagnético. Nesta situação de baixo spin, o ferro se mantém no plano do anel porfirínico.

A formação de um complexo reversível hemoglobina/oxigênio é a propriedade funcional primária das heme proteínas respiratórias. Outras heme proteínas, como por exemplo as peroxidases, quando expostas em seu estado ferroso ao oxigênio, são rapidamente oxidadas. A base extrutural para a estabilidade do complexo hemoglobina/oxigênio é a presença do meio altamente hidrofóbico ao redor do heme. Estudos de cristalografia mostraram que as regiões das cadeias polipeptídicas que envolvem o grupo heme são ricas em resíduos de amino ácidos não polares e são frequentemente invariáveis. A presença do imidazol como ligante do ferro na posição proximal parece ser também necessária para esta estabilidade. A ligação com a histidina proximal é constante em

todas as heme proteínas respiratórias e quando há substituição deste resíduo, a propriedade de ligação com o oxigênio é perdida (Antonini, 1974). O resíduo de histidina distal é ainda contribuinte para esta estabilização, pois quando ocorre substituição a taxa de autooxidação da heme proteína aumenta consideravelmente (Caughey, 1967). Tridimensionalmente esta proteína globular toma a forma de um tetraedro irregular sendo que o grupo heme posiciona-se na superfície de cada cadeia polipeptídica, quase nas arestas do tetraedro (Perutz, 1965). As sequências de aminoácidos nas posições críticas das cadeias α e β , se mantêm quase invariáveis em diferentes espécies assim os resíduos carboxila terminais são Arg. Tyr. para a cadeia α e His - Tyr para as cadeias β .

As hemoglobinas de mamíferos contêm geralmente dois tipos de resíduos sulfidríla: grupos reativos que ocupam a posição Cys β 93 (Riggs, 1951) e grupos SH não reativos nas posições β 112 e α 104. Quanto à estrutura secundária, a hemoglobina em seu estado nativo se encontra 75% na configuração de α hélice. Este alto conteúdo de α hélice em comparação com outras proteínas globulares simplifica a determinação da estrutura tridimensional da hemoglobina. Após a remoção do grupo heme, o conteúdo de α hélice decresce para 50% (Beychok et alii., 1967). Em alguns segmentos das cadeias polipeptídicas a interrupção da estrutura em α hélice é devido à presença de resíduos de prolina. A estrutura quaternária é atribuída a forma tetramérica onde as cadeias α e β são mantidas unidas através de ligações não covalentes. Os contatos entre as cadeias similares α - α ; β - β são menos numerosos que aqueles entre as cadeias não similares. Dois tipos de contatos são distintos entre as cadeias α e β : $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_1 \beta_2$. Pelas considerações de simetria e interface $\alpha_1 \beta_1$ é estruturalmente idênti-

ca a $\alpha_2 \beta_2$ e a interface $\alpha_1 \beta_2$ é idêntica a $\alpha_2 \beta_1$. As sub-unidades da hemoglobina interagem uma com a outra por intermédio de ligações relativamente fracas, não covalentes, como forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Em condições fisiológicas a oxihemoglobina se dissocia sucessivamente em dímeros.



A dissociação simétrica ocorre na interface $\alpha_1 \beta_2$ dando dois dímeros idênticos $\alpha_1 \beta_2$ e $\alpha_2 \beta_1$ (Rosenmeyer & Huenms, 1967).

I - 2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DA HEMOGLOBINA

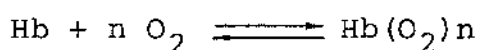
Durante longo tempo a natureza da interação da hemoglobina com oxigênio foi tema de vários debates.

Em 1908 Wolfgang Ostwald admitia a hipótese que moléculas de oxigênio se tornavam aderentes à extensa superfície da molécula da hemoglobina por algum tipo de atração elétrica. Em 1912 Peters iniciou um estudo de quantificação do conteúdo de ferro e oxigênio em eritrócitos. Neste procedimento o ferro hemínico era oxidado por adição de ferricianeto e o oxigênio liberado era medido manometricamente. O conteúdo em oxigênio estimado por Peters era 0,975 moles de oxigênio por mol de ferro. Esta relação estequiométrica indicava que o oxigênio reagia com a hemoglobina em sítios específicos.

A demonstração da habilidade da hemoglobina em captar ou liberar oxigênio a pressões fisiológicas deste ligante é expressa pela curva de dissociação da hemoproteína com o oxigênio. O aspecto sigmóide desta curva foi obtido em 1930 por Bohr e seu significado fisiológico posteriormente aceito. Nas pressões de oxigênio encontradas nos pulmões a hemoglobina (nas hemácias)

se torna 97% saturada com o oxigênio. Assim sendo, o sangue de indivíduos normais com uma concentração de hemoglobina 15g/100 ml poderia transportar 20 volumes de oxigênio por 100 ml. Na pressão de 40 mmHg a hemoglobina se encontra 75% saturada (pressão no leito capilar artério-venoso) e é portanto capaz de liberar para os tecidos 4,5 volumes de oxigênio por 100 ml. A forma característica da curva de dissociação da oxihemoglobina de mamíferos reflete a presença de um fenômeno de interação entre os diferentes sítios ligantes na molécula. O pré-requisito essencial para a cooperatividade na molécula é a presença de mais que um sítio ligante (Adair, 1925; Pauling, 1935; Wyman, 1948; Weber, 1965 & Antonini, 1971). A oxigenação de cada heme (sítio ligante) no tetrâmero aumenta a afinidade dos hemes remanescentes para o oxigênio implicando em cooperatividade nas subunidades da hemoproteína.

Em 1890 Hűfner, assumindo que a reação oxigênio/hemoglobina fosse de natureza unimolecular, obteve para a curva de dissociação um aspecto hiperbólico, como o que se dá com a mioglobina (que possui só um sítio ligante). Todavia, antes que se tivesse estabelecido a estrutura tetramérica da hemoglobina A.V. Hill (1910) propôs uma expressão empírica para o equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio:



sendo a constante de dissociação Kd.

$$K_d = \frac{\text{Hb} \quad \text{PO}_2}{\text{Hb} + \text{Hb}(\text{O}_2)}$$

e a fração de saturação: Y

$$Y = \frac{\text{Hb}(\text{O}_2)_n}{\text{Hb} + \text{Hb}(\text{O}_2)_n}$$

assim:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{PO_2}{Kd}$$

a valores de:

$$Y = 0,5$$

$$PO_2 = P_{50}$$

$$Kd = (P_{50})^n$$

portanto

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log \frac{PO_2}{P_{50}} \quad : \text{equação de Hill.}$$

Se as medidas de equilíbrio são graficadas de acordo com a equação de Hill tendo-se $\log Y/1-Y$ em ordenadas e $\log PO_2$ em abcissas, um gráfico linear é obtido. O intercepto em X desta reta no valor de $Y = 0,5$ fornece o valor de P_{50} (quando 50% das moléculas se encontram oxigenadas e 50% dos sítios ligantes não se acham ligados ao oxigênio. A inclinação desta reta n é uma medida da cooperatividade das subunidades. Algumas vezes a proteína mesmo na forma tetramérica não apresenta cooperatividade (por exemplo: hemoglobina H (β_4) (Benesche et alii., 1961), variantes de Hb com alta afinidade pelo oxigênio como as hemoglobinas anormais Bethesda e Kempsey ou ainda hemoglobinas quimicamente modificadas como as tratadas por bis maleimida metil eter (Simon & Konigsberg, 1966); ou por 1-fluor-2,4-dinitrobenzeno (Neer & Konigsberg, 1968).

Uma estimativa da energia livre de interação pode ser obtida através do gráfico de Hill como demonstrou Wyman (1964). Se n é a inclinação da reta, em qualquer ponto a energia livre aparente de interação neste ponto é equivalente a:

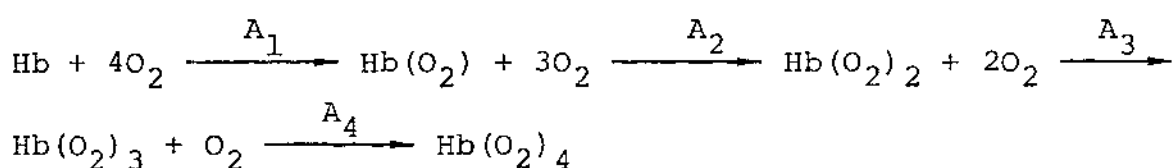
$$\Delta F_i = \frac{RT}{\bar{Y} (1-\bar{Y})} \left(1 - \frac{1}{n} \right)$$

Esta equação mostra que para que ΔF_i não se torne infinita, n tende à unidade em valores extremamente baixos ou altos da saturação. Isto realmente ocorre para o equilíbrio das hemoglobinas de mamíferos com o oxigênio.

Um valor mínimo estimado da energia de interação destas hemoglobinas que se pode obter pelo gráfico de Hill é de cerca de 3 Kcal/mol de O_2 (Wyman, 1964).

I - 3 CINÉTICA DO SISTEMA COOPERATIVO

A reação da hemoglobina com o oxigênio ou outros ligantes tem sido analisada em termos da equação proposta por Adair (1925) quando a combinação reversível com o oxigênio nos quatro sítios ligantes pode ser representada pelo esquema:



as constantes de Adair são dadas por:

$$\begin{aligned} A_1 &= \frac{\text{Hb}(\text{O}_2)}{\text{Hb} \cdot p} \quad ; \quad A_2 = \frac{\text{Hb}(\text{O}_2)_2}{\text{Hb}(\text{O}_2) \cdot p} \quad ; \quad A_3 = \frac{\text{Hb}(\text{O}_2)_3}{\text{Hb}(\text{O}_2)_2 \cdot p} \\ A_4 &= \frac{\text{Hb}(\text{O}_2)_4}{\text{Hb}(\text{O}_2)_3 \cdot p} \end{aligned}$$

A curva de equilíbrio é o gráfico da fração de saturação dos sítios ligantes com o oxigênio, $\bar{y}$, em função da pressão parcial de oxigênio, PO_2 . Expressando-se a concentração relativa das moléculas de hemoglobina ligadas com zero a quatro moléculas de oxigênio em termos de equação de Adair, a fração de saturação dos sítios ligantes $\bar{y}$ pode ser expressa:

$$\bar{y} = \frac{(A_{1p} + 2 A_1 A_{2p}^2 + 3 A_1 A_2 A_{3p}^3 + 4 A_1 A_2 A_3 A_{4p}^4)}{4 (1 + A_{1p} + A_1 A_{2p}^2 + A_1 A_2 A_{3p}^3 + A_1 A_2 A_3 A_{4p}^4)}$$

Se y é o número médio de moléculas de oxigênio ligadas por molécula de hemoglobina

$$y = 4\bar{y}$$

Se as constantes de associação intrínseca são desiguais e se a constante de associação para a última etapa de ligação com o oxigênio é maior que a da primeira etapa, a curva de equilíbrio é sigmóide, mostrando que a última molécula de oxigênio se combina mais facilmente com o oxigênio do que a primeira. A reatividade dos sítios ligantes para o oxigênio são influenciadas pela presença dos sítios ligantes já ocupados pelo oxigênio mostrando interação cooperativa entre os sítios ligantes.

I - 4 HEMOGLOBINA: PROTEÍNA ALOSTÉRICA

A hemoglobina pode ser considerada o exemplo típico de uma proteína alostérica. Neste caso, a ligação de um determinado ligante a um sítio altera a afinidade para o mesmo ligante em outro sítio da molécula.

Normalmente, nas proteínas alostéricas, existe uma modificação conformacional nas etapas sucessivas de ligação com ligantes específicos e interação entre as subunidades, implicando num mecanismo de cooperatividade. Estas interações são ditas homotrópicas. Quando estas interações ocorrem com ligantes que não se ligam no sítio específico, são ditas heterotrópicas.

Vários modelos foram propostos para explicar a base molecular do controle alostérico. Monod, Wyman, Changeux (1965)

sugeriram para o caso da hemoglobina que esta poderia existir em equilíbrio entre dois estados conformacionais: forma T (tensa) ou R (relaxada). Na ausência de um ligante específico, por exemplo o oxigênio, as moléculas da hemoproteína poderiam existir em qualquer das duas conformações e com suas afinidades pelos ligantes próprias. A interação do ligante a uma subunidade resultaria em uma transição conformacional sendo que a afinidade das subunidades ainda não ligadas mudaria abruptamente. Assim, o equilíbrio entre as duas conformações é marcadamente alterado pela interação de qualquer subunidade com um ligante.

No modelo proposto por Koshland, Nemethy & Filmer (KNF) 1966 a ligação de um ligante a cada subunidade da molécula resultaria em uma modificação na estrutura terciária daquela subunidade. A alteração conformacional afetaria a afinidade das subunidades seguintes para o mesmo ligante. Este modelo de ajuste induzido resulta em várias espécies de conformação intermediária, dependendo do número de sítios ligantes na molécula. Dos estudos com hemoglobina várias evidências experimentais apoiam um ou outro dos modelos propostos.

No modelo M.W.C. as constantes de equilíbrio para as formas R e T na presença de oxigênio K_t e K_r e a constante alostérica L (que expressa a razão entre o número de moléculas na forma T e na R) são as três variantes independentes que descrevem este postulado de simetria. A mudança conformacional envolve a proteína como um todo e esta transição de uma forma para outra é essencialmente um processo de tudo ou nada que tem por finalidade manter a simetria na interação entre as subunidades. Esta teoria simplifica a interpretação dos efeitos cooperativos que advêm da interação homotrópica. O aumento progressivo da afinida

de pelo oxigênio ocorreria em função da mudança transicional da estrutura T, com baixa afinidade pelo ligante, para a estrutura R, de alta afinidade.

As bases estruturais para o modelo MWC foram obtidas pelos trabalhos de Perutz et alii. (1970) quando, utilizando-se de métodos de cristalografia em Raios-X, encontraram duas estruturas diferentes para oxi-hemoglobina e a sua forma desoxigenada, correspondentes aos estados R e T respectivamente.

A combinação da desoxi-hemoglobina com o oxigênio produzia um desvio na região helicoidal de 2 a 3 nm e uma mudança na inclinação do plano do heme em relação à globina. Estas modificações eram acompanhadas por diminuição do distanciamento entre as cadeias β de cerca de 6,5 nm e um aumento na distância entre as cadeias α de cerca de 1 nm (Muirhead et alii., 1967). Esta mudança envolve também o contacto entre as cadeias, principalmente α_1 e β_1 . A cavidade central aparece maior na forma desoxi ou T, do que na forma ligada ou R (Perutz, 1970). A região é compactada de forma que a região CD α de uma cadeia ajusta-se dentro da região FG de outra. Durante a transição T $\rightarrow$ R o atarrachamento entre CD α e FC β muda de modo que as pontes de hidrogênio ligando Asp G₁(94) α ao resíduo Asn C₄(102) β são deslocadas por outra ligação entre os resíduos Tyr C₇(42) α e Asp C₁(99) β (Fig.1). Finalmente, grandes diferenças são observadas na região dos resíduos C terminal. Na desoxi-hemoglobina as tirosinas (HG₂) ocupam cavidade entre as hélices F e H, e seus grupos fenólicos são ligados por pontes de hidrogênio às valinas FG₅. Os resíduos C terminal são limitados pela participação nas pontes salinas. Na oxi-hemoglobina os grupos fenólicos da Tyr HC₂ são ejetados de suas cavidades e as pontes salinas são rompidas (Fig.2).

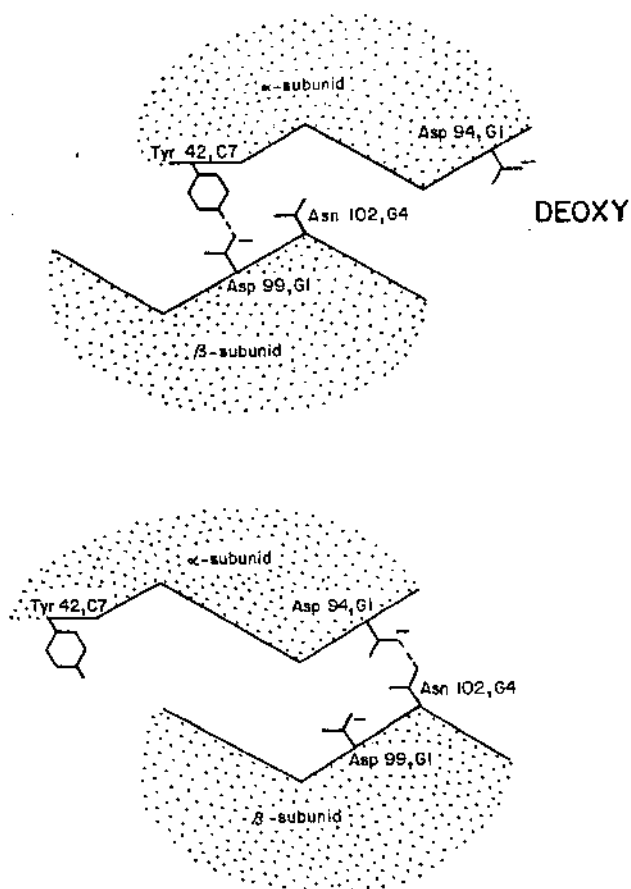


FIG.1 - Modificações nos contactos α_1 e β_2 na oxigenação. O contacto move-se de uma área a outra envolvendo deslocamento de uma ligação por ponte de hidrogênio para uma segunda ligação deste tipo. As outras ligações são de natureza não polar (Morimoto, 1971).

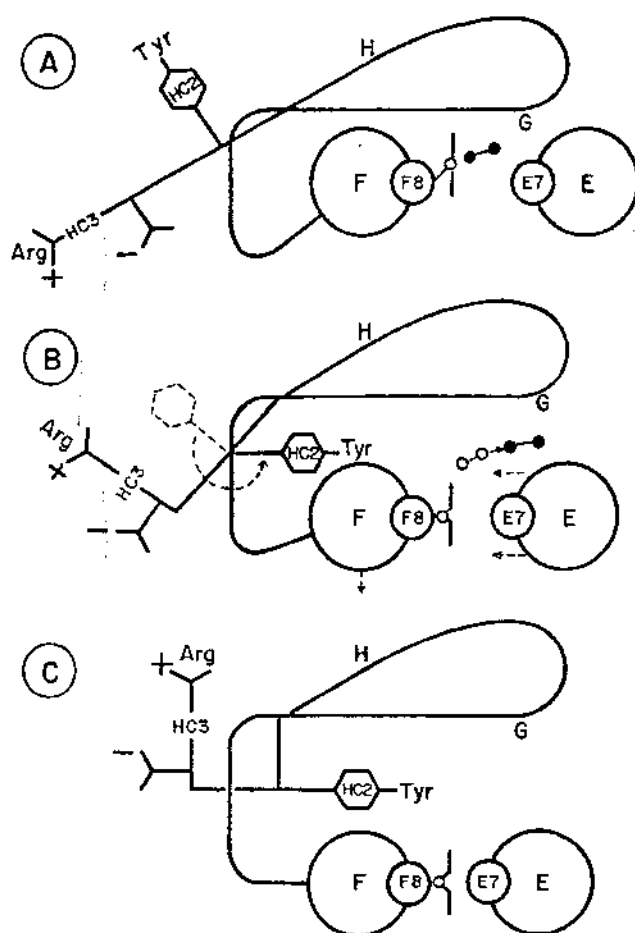


FIG.2 - Modificações na estrutura terciária produzidas pela transição da forma oxigenada para desoxigenada. Na oxihemoglobina (A) o átomo de ferro está no plano do heme, tracionando o resíduo His F₈ para cima, enquanto Arg HC₃ gira livremente. Quando o oxigênio sai (B) a hélice E é tracionada para dentro e a hélice F move-se para baixo, formando uma cavidade entre ela e a hélice H. O grupo fenólico da Tyr HC₂ pode ocupar esta cavidade (C) e assim sua entrada puxa o resíduo Arg HC₃ para dentro, de modo a formar as pontes salinas (Charache, S. 1974).

A sequência destes eventos seria iniciada pela combinação do átomo do Fe^{++} com o oxigênio. Quando isto ocorre, o raio atômico do Fe^{++} decresce, e o coloca em situação de baixo spin onde não há elétrons não emparelhados, e o Fe^{++} nivela-se no plano do anel porfirínico. Este movimento é suficiente para mudar a distância entre o heme ligado à histidina proximal e o próprio plano do anel porfirínico, iniciando-se as modificações que levam à transição T $\rightarrow$ R.

Na deoxihemoglobina a histidina distal βE_7 e a valina βE_{11} bloqueiam o acesso rápido do oxigênio para o ferro hemínico. Comparativamente a cavidade do heme na cadeia α desoxigenada é mais aberta, induzindo espaço adequado para a ligação com o oxigênio. Alguns dados funcionais apoiam esta evidência (Lindstron et alii., 1972; Henry & Cassoly, 1973).

A transição na estrutura quaternária T $\rightarrow$ R provavelmente ocorre de forma abrupta pela ruptura sucessiva das pontes salinas que estabilizam a forma T e secundariamente devido à compressão imposta na interface entre as subunidades α_1 β_2 . Há alguma evidência experimental que o "click" na estrutura quaternária ocorre após o terceiro oxigênio ter sido ligado (Gibson & Parkmust, 1968; Caldwell et alii., 1971 e Salhany et alii., 1972).

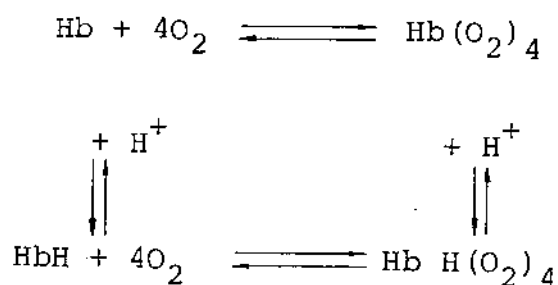
Perutz et alii. (1972, 1974) mostraram por métodos de ressonância magnética e ópticos que a ligação da hemoglobina resulta em uma diminuição no estado de spin dos grupos hemes não ligados. A mudança T $\rightarrow$ R abre as cavidades dos hemes não ligados aumentando sua afinidade. Todavia, Hensley et alii., 1975 não encontraram esta correlação entre conformação da hemoglobina e o estado do spin do ferro hemínico.

I - 5 FATORES QUE AFETAM A TRANSIÇÃO T → R

Efeito Bohr

Em 1904 Christian Bohr relatou que a posição da curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio era sensível a mudanças na pressão parcial de dióxido de carbono. Posteriormente evidenciou-se que o CO_2 tinha um duplo efeito. De um lado, o CO_2 pode ligar-se diretamente à hemoglobina formando compostos carbamino. Em condições fisiológicas, somente 10% de CO_2 produzido nos tecidos é transportado como compostos carbamino com a hemoglobina (Bauer & Schroeder, 1972). Um outro aspecto do efeito do CO_2 sobre a curva de equilíbrio é um efeito indireto ou seja um efeito de pH. Assim, em pH fisiológico existe uma variação inversa PO_2 e pH (Efeito Bohr alcalino).

O efeito Bohr pode ser considerado um exemplo de função "ligante". Assim:



O equilíbrio demonstrado horizontalmente representa a oxigenação da hemoglobina e pode ser demonstrado experimentalmente medindo-se a curva de dissociação em diferentes valores de pH. As reações mostradas verticalmente representam a protonação da oxi e desoxihemoglobina. Este equilíbrio pode ser medido diretamente por titulação. Wyman (1964) expressou quantitativamente estas interações em termos da seguinte equação:

$$\frac{\delta H^+}{\delta y} \quad pH = \frac{\log p)}{\delta H} \cdot \bar{y}$$

onde: $\bar{y}$ = fração de
 p = pressão p
 Em condições fisiológicas de pH

fração
 al de oxigênio ;
 a 7,6) o valor:

$$\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta pH} \quad ,6$$

Portanto, para a
 hemoglobina, 4 x 0,6 ou 2,4 pró

ão de 4 moles de O₂ à deoxi-
 poderiam ser liberados.

O modelo de Perut
 química para o efeito Bohr alca.
 da hemoglobina poderiam ser mai:
 desoxigenada.

70) prevê uma base estereo-
 onde quatro grupos acídicos
 ilmente protonados na forma

Cerca de 50% do es
 na entre o grupo imidazol protor
 duo carregado negativamente do 1
 tin & Rossi Bernardi, 1969). Out
 tes salinas entre o grupo N-term
 o resíduo C-terminal de outra ca
 evidenciou estas ligações por di

Bohr é devido à ponte sali-
 la histidina β 146 e o resí-
 94 na mesma cadeia (Kilmar-
 25% seriam atribuídos a pon-
 protonado de uma cadeia α e
 Todavia, Fermi 1975 não
 io de Raios-X.

I - 6 INTERAÇÃO DE HEMOGLOBINAS

FOSFATOS ORGÂNICOS

Os experimentos de
 a afinidade da hemoglobina pelo
 ça iônica da solução. Em 1961 Ro
 ram em detalhe o efeito de vário
 nais da hemoglobina.

roff (1928) demonstraram que
 nio depende em parte da for
 anelli & Antonini investiga
 s nas propriedades funcio-

O eritrócito humano contém um polifosfato intermediário na cerato (2,3-DPG). Sua concentração é da ordem de 5 mM, equivalente à concentração de hemoglobina. Benesch e Benesch demonstraram a função da hemoglobina.

O 2,3-DPG se liga a desoxihemoglobina numa relação estequiométrica de 1:1. A constante de equilíbrio de dissociação para o 2,3-DPG é de $2,5 \times 10^{-5} M$. A pH e força iônica, o 2,3-DPG liga-se inespecificamente à oxi ou desoxihemoglobina com relação à carga. A identificação do sítio de ligação foi estabelecida por Arnone, 1967, quem mostrou que os grupos imidazólicos da His 143 β interagem com as cargas positivas do polifosfato e os grupos negativos do polifosfato. O 2,3-DPG se ajusta na cavidade da molécula de hemoglobina e é coordenado com os resíduos da Lys E F₆ (82) β . Na transição de estado T para R a valina se move para fora justamente com a

Esta interação conhecida como prova da estrutura terciária. Dados experimentais utilizando "spin labels" estão de acordo com (Ogata & McConnell, 1971, 1972).

contêm altas concentrações de 2,3-difosfoglicolítica o 2,3-difosfoglicolítica é da ordem de 5 mM, equivalente a 1967, Chanutin e Curnish; efeito deste polifosfato na função

desoxihemoglobina numa relação de equilíbrio de dissociação condições de baixos valores de pH e força iônica, os polianions se ligam a desoxihemoglobina. Portanto, o 2,3-DPG modifica a função de oxigênio. A 2,3-DPG com a hemoglobina assim, os resíduos que controlam a interação eletrostática com a molécula de hemoglobina são o grupo amino da Val 143 β . Na desoxihemoglobina a valina se move para fora justamente com a

fosfato orgânico pode ser reatada de dois estados. Os dados de 2,3-DPG marcados com ³²P estão de acordo com o modelo (Ogata & McConnell, 1971, 1972).

Efeito do ATP

Este polifosfato é segundo mais abundante nos eritrócitos. Normalmente sua concentração é cerca de 1/4 a do 2,3-DPG, e também é um forte modificador da afinidade da hemoglobina pelo O_2 (Benesch & Benesch, 1967; Bunn et alii., 1971). Todavia, a concentração deste polifosfato se acha na hemácia ligada a Mg^{2+} (Rose, 1968; Bunn et alii., 1971; Berger et alii., 1971). O complexo ATP-Mg não apresenta efeito significativo na oxigenação da hemoglobina. Outro ânion que diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é o Cl^- (Antonini et alii., 1971). Os sítios de ligação para o Cl^- diferem parcialmente daqueles para o 2,3-DPG (Bonaventura et alii., 1976). Policarboxilatos como o ácido cítrico, propeno, 1,2,3-tricarboxilato, benzeno, 1,2,3,4,5-pentacarboxilato são também capazes de induzir modificações no equilíbrio T $\rightarrow$ R e diminuir a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Desbois et alii., 1974).

Recentemente estudou-se o efeito de nicotinamida adenina dinucleosídeo fosfatos (NAD $^+$ e NADP) e demonstrou-se a influência destes compostos na curva de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina (Focesi, 1981). Em concentrações menores que o 2,3-DPG na hemoglobina, estes compostos exercem o mesmo regulatório, por interagirem com sítios também não totalmente idênticos ao de fosfatos.

Ainda polisulfatos e sulfatos moleculares (como o sulfato de dextran e heparina) modificam as propriedades funcionais da hemoglobina decrescendo sua afinidade pelo oxigênio (Amiconi et alii., 1977).

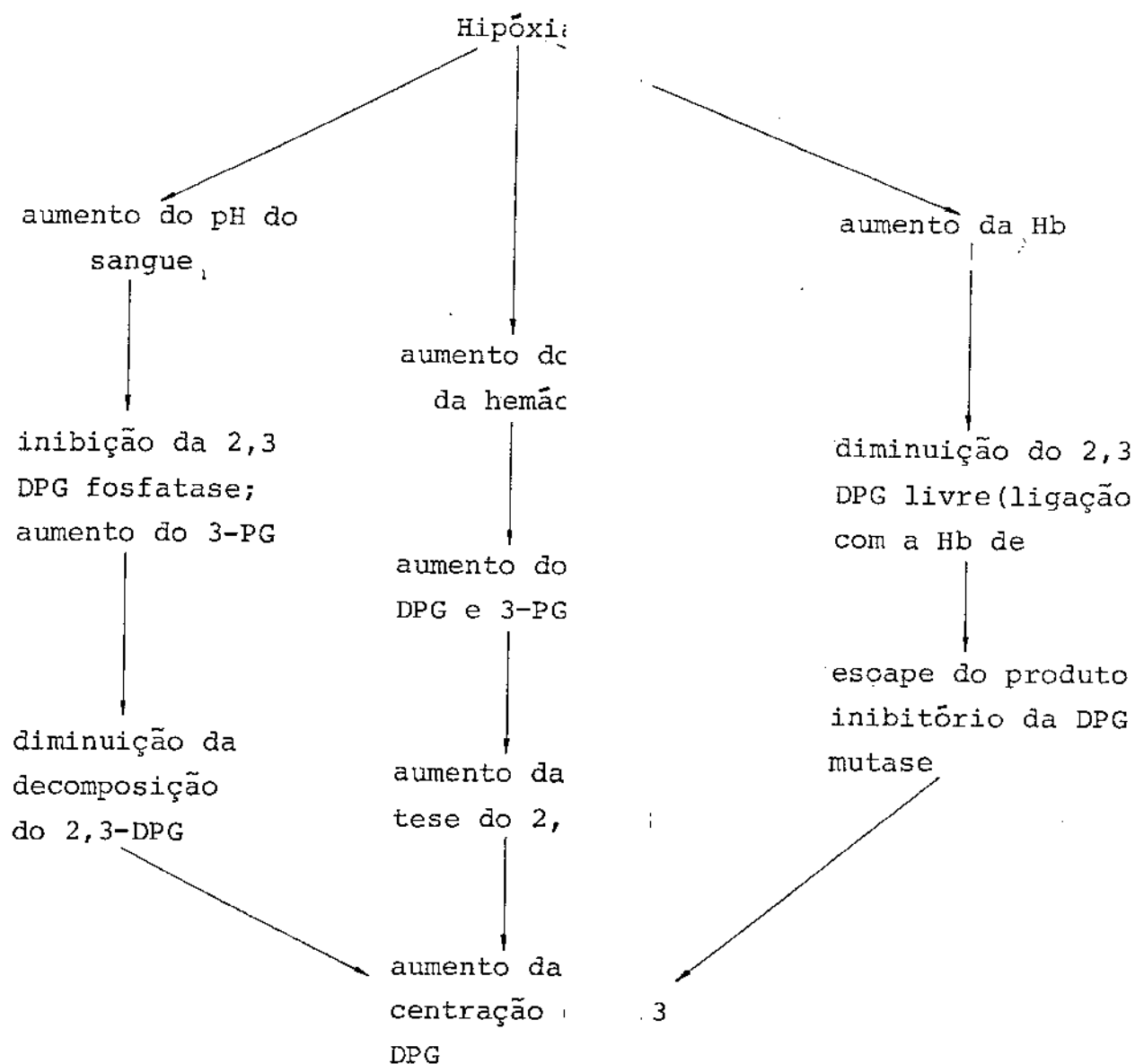


FIG.3 - Esquema de mecanismos propostos para aumento dos níveis de 2,3-DPG-induzidos pela hipóxia (J.Dühm).

I - 7 A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA COM O OXIGÊNIO: (CONTROLE E SIGNIFICADO "in vivo").

O requerimento de oxigênio pelos tecidos é adequadamente suprido pelos eritrócitos e não se constituem simples transportadores passivos (Hill et alii., 1970). A posição da curva de dissociação da hemoglobina de indivíduos adultos é controlada em primeira instância pela interação da hemoglobina com fosfatos orgânicos, principalmente pelo 2,3-DPG. Em várias condições clínicas em que há um aumento da demanda periférica de oxigênio, um incremento da concentração de 2,3-DPG acompanha este desvio para a direita da curva de dissociação facilitando a liberação tecidual deste gás. Um aspecto que descreve a situação acima é a condição de hipóxia. Dois mecanismos tem sido propostos para esta adaptação ou seja, aumento da concentração de 2,3-DPG (Fig.3). A hipóxia é normalmente acompanhada de uma alcalose respiratória, que estimula a glicólise. Tem sido demonstrado que no homem (Lenfant et al., 1971) e em animais (Duhm & Gerlach, 1971) condições de hipóxia aguda não induzem aumento na taxa de 2,3-DPG se a alcalose for proveniente. Ainda com aumento de desoxihemoglobina nos estados de hipóxia decrescem os níveis de 2,3-DPG livre nas hemácias, o que ocasiona a liberação do fator inibitório que o 2,3-DPG exerce sobre sua própria síntese. Assim, o aumento da síntese de 2,3-DPG induzido pela desoxigenação facilitaria a liberação do oxigênio necessário.

Ainda com relação aos níveis de 2,3-DPG, animais expostos cronicamente a monóxido de carbono apresentam níveis elevados deste poliânion (Dinman et alii., 1970). Pacientes com deficiência congênita de diaphorase reduzem a síntese de metahemoglobina e a redução da metahemoglobina redutase

NAD dependente), apresentam um aumento de 70% nos níveis de 2,3-DPG (Versmold et alii., 1973). Outras doenças pulmonares crônicas (Oski et al., 1969); doenças cardíacas e deficiência da enzima piruvato quinase (Delevoria et al., 1969) levam a modificações dos níveis do 2,3-DPG e tornam a hemoglobina mais apta à liberação de oxigênio. Esta relação entre o desvio na pressão parcial de oxigênio e a dissociação da hemoglobina é de tal modo precisa que 1 mmHg de desvio na pressão parcial de oxigênio corresponde a uma mudança de 4,20 g de eritrócitos. Todavia, em algumas situações, esta resposta não ocorre como por exemplo nas transfusões de sangue estocado e na síndrome respiratória (Muller et alii., 1970). Nestas condições os níveis de 2,3-DPG são baixos e podem ocorrer inclusive um desvio para a esquerda na curva de dissociação.

Outro aspecto interessante na curva de afinidade é dada pela concentração média corpuscular da hemoglobina pelo oxigênio decresce com o aumento do MCHC (Benesch et alii., 1969). Embora uma correlação tenha sido proposta, (Bellinghan, 1971) o significado funcional é ainda incerto.

I - 8 MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS

A liberação de oxigênio para os tecidos é governada por três variáveis independentes e podem ser expressas pela equação de Fick:

de 70% nos níveis de 2,3-DPG. Alterações clínicas como doenças cardíacas e deficiência da enzima piruvato quinase (Delevoria et al., 1969) levam a modificações da hemoglobina mais apta à liberação de oxigênio. Esta relação entre o desvio na pressão parcial de oxigênio e a dissociação da hemoglobina é de tal modo precisa que 1 mmHg de desvio na pressão parcial de oxigênio corresponde a uma mudança de 4,20 g de eritrócitos. Todavia, em algumas situações, esta resposta não ocorre como por exemplo nas transfusões de sangue estocado e na síndrome respiratória (Muller et alii., 1970). Nestas condições os níveis de 2,3-DPG são baixos e podem ocorrer inclusive um desvio para a esquerda na curva de dissociação.

Outro aspecto interessante na curva de afinidade é dada pela concentração média corpuscular da hemoglobina pelo oxigênio decresce com o aumento do MCHC (Benesch et alii., 1969). Embora uma correlação tenha sido proposta, (Bellinghan, 1971) o significado funcional é ainda incerto.

A liberação de oxigênio para os tecidos é governada por três variáveis independentes e podem ser expressas pela equação de Fick:

$$VO_2 = 1,39 \cdot Q \cdot Hb (S_a - S_v - O_2)$$

onde VO_2 é a quantidade de oxigênio liberada (l/min); 1,39 é a quantidade em ml de O_2 ligado por grama de hemoglobina totalmente saturada; Q é o fluxo sanguíneo e $S_a - S_v - O_2$ são as porcentagens de saturação de oxigênio arterial e artério-venosa.

A concentração de hemoglobina no sangue é resultante do balanço entre a eritropoiese e a destruição da hemácia. O aumento da massa das células sanguíneas representa um fator importante na adaptação de situações de baixo conteúdo de oxigênio. O fluxo sanguíneo para um determinado órgão é controlado por uma complexa relação de fatores neurais e hormonais. Alterações no fluxo sanguíneo para um determinado órgão ou tecido suprem as demandas metabólicas de forma apropriada, por exemplo, no exercício muscular vigoroso, o aumento do débito cardíaco acompanha a facilitação do fluxo para o músculo em trabalho.

O 3º termo da equação de Fick ($S_a - S_v - O_2$) expressa quantitativamente a liberação fracional de oxigênio da hemoglobina durante o fluxo sanguíneo da artéria para a parte venosa. Este parâmetro depende da curva de dissociação da hemoglobina que determina a quantidade de oxigênio do sangue que pode ser liberada por uma determinada pressão parcial de oxigênio. Em condições fisiológicas a curva de dissociação é de tal natureza que o sangue se apresenta quase totalmente saturado com o oxigênio em sua circulação pelos pulmões; portanto o fluxo através dos capilares sistêmicos o aspecto da curva de dissociação prediz que uma grande quantidade de oxigênio será liberada com pequenas diferenças na pressão parcial dos gases. Isto permite que o oxigênio seja liberado no plasma e em concentrações suficientemente

altas para prover um gradiente de oxigênio dentro das células. Lawson & Forster, 1967, estimaram que a tensão de oxigênio nas hemácias é de cerca de 1 mmHg maior que aquela do plasma. O gradiente de PO_2 entre o plasma e o interior das células deve ser variável dependendo de diferentes fatores tais sejam: fluxo sanguíneo capilar, permeabilidade capilar, barreira de difusão e atividade metabólica das células. Em muitos tecidos o transporte de oxigênio dentro das células é um processo de difusão limitado.

Músculos esqueléticos e cardíacos têm alta concentração de mioglobina dentro do citoplasma das células; devido à sua alta afinidade pelo oxigênio a hemeproteína capta e estoca oxigênio. A pressão de oxigênio dentro da célula muscular cardíaca tem sido estimada como sendo de 5 mmHg (Coburn et alii., 1973). Sabe-se que cerca de 0,5 mmHg é necessário para a respiração de mitocôndrias isoladas (Chance et alii., 1962). Quando a tensão de oxigênio cai a valores de 0,1 mmHg a respiração celular cessa. Assim o oxigênio se encontra sempre em excesso ao nível mitocondrial. Os mecanismos homeostáticos para o aumento do débito cardíaco; uma diminuição na diferença da pressão artério-venosa ou ainda modificação na forma e posição da curva de dissociação.

I - 9 INTERAÇÃO DE DROGAS COM HEMOGLOBINA

A escolha da molécula de hemoglobina como modelo farmacológico de receptor de drogas foi postulada inicialmente por Clark (1937). Neste termo Clark rediz que a hemoglobina pro-

ve um modelo de valor inestimável por ser uma proteína ativa fisiologicamente e que as modificações ocasionadas quando existentes poderiam ser medidas diretamente.

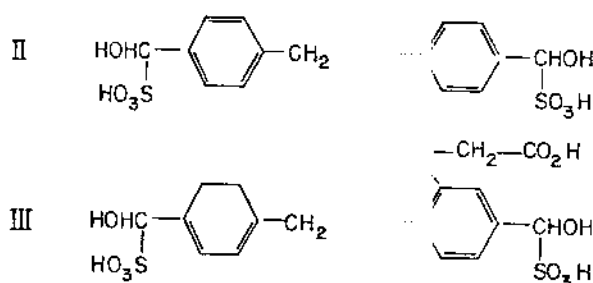
A hipótese de interação específica de estrutura complementar de drogas como receptor esboçada foi proposta já em 1828 por Langley.

Beddel et alii., utilizaram-se deste conceito para síntese de novos compostos que poderiam interagir com a hemoglobina e modificá-la funcionalmente.

No caso específico do termo receptor se restringia a hemoglobina para interação com o 2,3-DPG. Neste contexto a hipótese de Beddel não foi prontamente aceita pois críticas foram feitas no sentido de que a molécula de hemoglobina não está sujeita às mesmas interações com moléculas vizinhas, como um receptor farmacológico ligado à membrana. Mas em outros aspectos a obtenção da hemoproteína em forma altamente purificada; a estrutura e função desta proteína são bastante conhecidas; a função do 2,3-DPG como modulador fisiológico e a identificação do sítio desta na molécula de hemoglobina são fatos já estabelecidos.

A inovação do grupo Wellcome R.F. (Beddel, Brown, Stammers, Goodfort) foi na estrutura da síntese dos novos compostos, que não eram análogos do 2,3-DPG mas que tinham propriedades físico-químicas especiais de interação com o sítio aniônico da molécula de hemoglobina.

Os novos compostos sintetizados (bis-aryl-hidroxi sulfonic acids II e III).



selecionados a partir da estrutura do sítio de ligação ou receptor produzem o efeito biológico esperado ou seja a diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio interagindo comprovadamente por estudos de NMR (Brown et al., 1977) no sítio do 2,3-DPG (Fig.4).

Outro aspecto relevante de interação hemoglobina e drogas tem sido o de modificação da molécula com finalidade de esclarecer estruturalmente os aspectos essenciais na função desta proteína (Antonini et alii, 1971). Sobre este ponto de vista a hemoglobina poderia sofrer modificações "in vivo" que seriam importantes. Um dos grupos de experimentação neste sentido que se desenvolveu é o da patologia: anemia falciforme.

A falcização das hemácias foi observada pela primeira vez em 1910 por Herrick que observou a forma não usual de hemácias em um esfregaço de sangue de um paciente. A dependência da falcização ou não sobre a oxigenação e desoxigenação foi notada por Hahn & Gillespie em 1927.

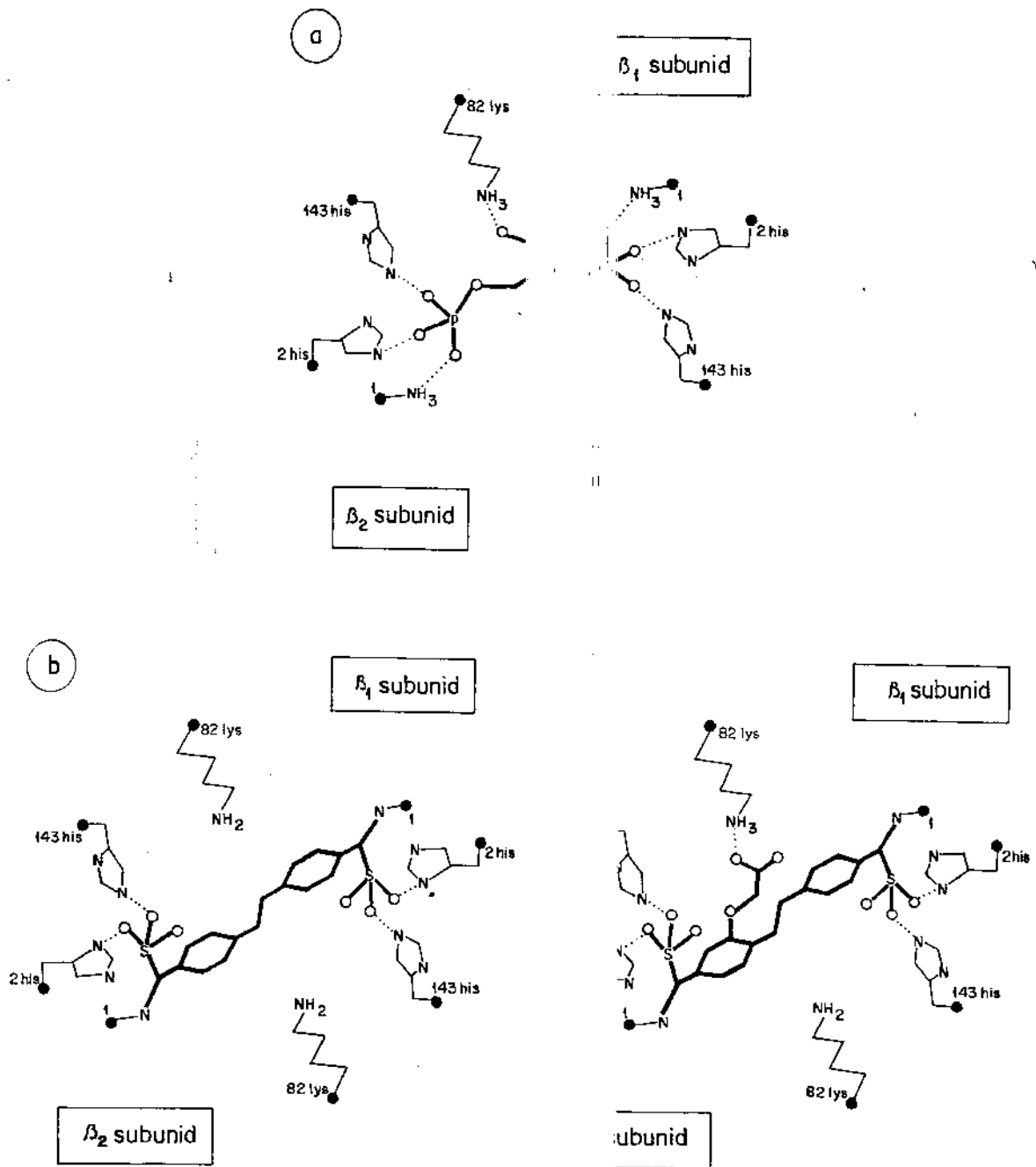


FIG.4 - Representação esquemática

- (a) com o 2,3-DPG ligado
 (b) ligação postulada por
 (c) ligação postulada por

sítio receptor do 2,3-DPG.
 observado por Arnone(1972).
 composto I.
 composto II.

A siclemia ocorre em hemácias de indivíduos portadores de hemoglobina S quando um resíduo de valina é substituído por ácido glutâmico na sexta posição da cadeia β . Vários fatores têm sido correlacionados com o fenômeno da falcização: pH, força iônica, 2,3-DPG, PCO_2 e mesmo a temperatura (Paniker et alii., 1972; Nagel & Bookchin, 1974; Masys et al., 1974). Portanto a modificação química da hemoglobina S; para evitar a falcização tem sido estudada como forma terapêutica. O uso de cianato de sódio como agente anti-falcêmico. Nijkan et alii. (1974) mostraram que a carbamilação na posição N-terminal da hemoglobina S apresenta características para gelificação; enquanto os grupos N-terminal das cadeias não carbamiladas mostram menor tendência à polimerização. Entretanto Bensch et alii. (1974) encontraram resultados conflitantes com os de Nijkan quando do bloqueio dos grupos N-terminal com piridoxal fosfato.

A polimerização da hemoglobina S na forma desoxigenada (T) se constitui no processo patogênico primário na anemia falciforme (May, 1976; Finch et al., 1973; Dean, 1978). A substituição da valina por ácido glutâmico na posição β_6 ocorre na superfície da molécula acarretando perda de estrutura helicoidal desta região (Yang, 1975). A forma T com rompimentos de ligações hidrofóbicas foi o mecanismo proposto para a uréia na prevenção da polimerização (Murayama et alii., 1973).

Ainda dentre outras modificações químicas da hemoglobina tem-se as que são obtidas com reagentes específicos para grupos sulfidríla. Assim a reação com o grupo SH (β 93) com L-cystine) induz modificações químicas da hemoglobina.

ções na hemoglobina que apresenta propriedades funcionais diferentes daquelas da hemoglobina A (Antonini, 1977).

Esta modificação induzida pela cistamina levou (Benzearã et alii., 1978) a utilizá-la como inibidor do processo de falcização. A ligação cistamina-hemoglobina é desfeita na presença de glicose e NADP^+ e envolve os sistemas enzimáticos glutatona-redutase e metahemoglobina-redutase.

Outro reagente tiol que inibe o falcização é a N-maleimidometil ester (Zack, 1975) porém embora esta substância aumente a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio existe uma diminuição na cooperatividade das hemácias tratadas. O mecanismo proposto para a ação destes reagentes tióis é a formação de pontes mistas e uma modificação conformacional que resultaria na estabilização da estrutura quaternária (forma R) Hassan (1976).

Outro agente modificador da estrutura e função da hemoglobina é o diclorometano (DCM); este solvente industrial liga-se à hemoglobina A e S, reduzindo o transporte de oxigênio para estas hemoproteínas modificadas, a baixas pressões deste ligante. A interação desta droga se faz em sítios estabelecidos (Schoenborn et alii., 1976) (Fig.5).

Modificações nos grupos N-terminal da hemoglobina foram encontrados por Currell et alii., 1979, que estudaram a ação do 2-metoxi 5-nitro-pone. Este reagente liga-se especificamente a grupos NH_2 livres produzindo resíduos N-nitroponyl que ocasionam um dramático aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Por outro lado, observou-se que pacientes portadores de diabetes apresentavam um componente de HbA denominado Hb A1c em concentrações elevadas. Este componente consiste em uma hemoglobina modificada por reação de grupo N-terminal da cadeia β

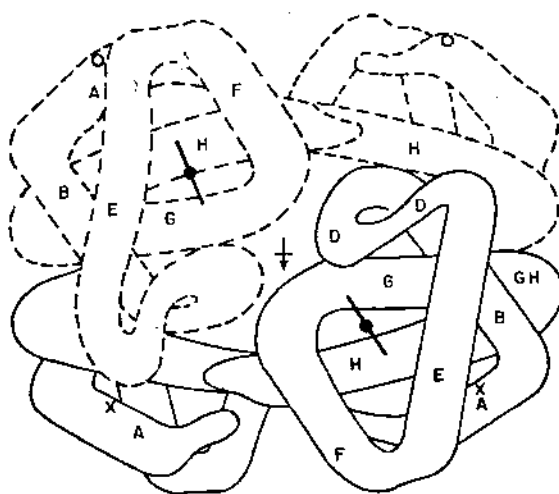


FIG.5 - Representação esquemática da estrutura da desoxihemoglobina após Fermi (1975) - Cadeia α_1 : contorno sólido forte; α_2 : contorno sólido leve; β_1 : contorno achureado forte; β_2 : contorno achureado fraco. A ligação do diclorometano nos sítios D_1 (próximo ao resíduo Trp 14 α) é indicada como cruzes. As hêlices são indicadas por letras maiúsculas. As regiões entre hêlices são indicadas por letras maiúsculas duplas (Schoenborn B, 1978).

com um composto de baixo peso molecular que dava origem a uma base de Schiff (White, 1972). Esta hemoglobina glicosilada apresenta uma afinidade menor pelo oxigênio e uma menor sensibilidade à ação do 2,3-DPG (Flickiger, 1976). A presença de glicose no resíduo N-terminal da cadeia interfere com o acesso do 2,3-DPG ao sítio aniônico deste polifosfato na conformação T da proteína.

Outro açúcar, a glicose 6-P também pode se ligar à hemoglobina e formar uma ligação estabilizadora adicional entre seu grupo fosfato e a proteína (Haney, 1976). A partir do conhecimento do efeito da glicose estudou-se a modificação ocasionada pelo gliceraldeído (Manning, 1978) nas propriedades funcionais da hemoglobina. Estudos com gliceraldeído ^{14}C mostraram que 3 a 4 moles deste reagente era incorporado por mol de hemoglobina. Após redução com $^3\text{HNaBH}_4$ e hidrólise ácida cerca de 2 moles de N-glicerolisina por mol de Hb foram encontrados.

Em 1973, Oelshegel et alii. estudando deficiência de zinco em casos de anemia falciforme, observaram o efeito do zinco sobre a afinidade da hemoglobina humana. Gilman et alii., 1977 confirmaram este efeito e sugeriram que o sítio para ligação com o Zn^{++} envolve grupos vizinhos a cisteína 893.

Outros efeitos de modificação da funcionalidade da hemoproteína ocasionados por drogas são tidos como indiretos ou seja, não há interação hemoglobina/droga. Pode-se citar o emprego de altas concentrações de corantes iodados usados como contrastes de radiologia (Rosenthal et alii., 1973). Estes agentes são ânions relativamente impermeáveis que diminuem o gradiente de pH entre o interior e exterior da hemácia e aumentam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

O agente β bloqueador propranolol diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, quando pré-incubado com as hemácias por causar um efluxo de K^+ e assim causar uma diminuição de pH dentro da célula devido à alteração no equilíbrio de Donnan (Agostini et alii., 1973).

A adrenalina pode causar um desvio para a direita na curva de oxigenação por aumentar o nível de 2,3-DPG em hemácias de ratos. O mesmo pode ocorrer seguido à administração de hormônio de tireoide (Duhm et alii., 1969).

Andrôgenos poderiam também ocasionar modificações funcionais da hemoglobina por alterar os níveis deste polifosfato (Gorshein, 1974; Smolin, 1975).

Ainda a afinidade de hemoglobina pelo oxigênio pode ser alterada quando as hemácias são submetidas a ambientes hiperbáricos (5 Atm) Kiesow et alii., 1973. Todavia este mecanismo não é ainda conhecido.

I - 10 METABOLISMO DA HEMÁCIA

A hemácia é a razão fundamental na eficiência do transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e do CO_2 na direção inversa.

O eritrócito adulto tem uma organização relativamente simples: uma membrana metabolicamente ativa, circundando um citoplasma homogêneo que contém 34% de hemoglobina e cerca de 2% de proteínas não heme como a anidrase carbônica e enzimas glicolíticas. As obrigações metabólicas da célula vermelha são bastante limitadas, quais sejam: a) manutenção da bomba sódio-potássio com a finalidade de prevenir a lise colóide osmótica; b) manuten

ção da hemoglobina em seu estado reduzido (ferroso) desde que a forma oxidada é incapaz de se ligar ao oxigênio; c) reparo da membrana por acilação de fosfolipídeos (Shohet et alii., 1968) e proteção da membrana e interior contra stress oxidante. Estas funções são acompanhadas por pouco gasto energético de ATP e equivalentes de redução provenientes de NADH e NADPH.

Durante a maturação na medula óssea, as células vermelhas perdem suas organelas e assim a capacidade de respiração mitocondrial e de síntese de ácidos graxos e proteínas. Somente duas vias metabólicas são ativas nos eritrócitos: a de Embden-Meyerhof e o desvio das pentoses. Sobre condições fisiológicas a glicose é o único substrato importante para o metabolismo. A glicose é metabolizada na hemácia a lactato principalmente, metabólito que se difunde livremente para fora da célula. Do ponto de vista metabólico o 2,3-DPG é o intermediário mais importante sintetizado na hemácia a alta concentração. O nível deste polifosfato é determinado por três fatores: a) a velocidade de formação de seu substrato 1,3-DPG; b) a quantidade relativa de 1,3-DPG que se destina ao "shunt" de Rapoport-Lueberring e aquela com destino à via glicolítica; c) a velocidade com que este metabólito é hidrolizado.

As implicações deste polifosfato e sua importância fisiológica foram já comentados.

I - 11 MEMBRANA DA HEMÁCIA

Os principais componentes da membrana do eritrócito humano: lipídios, proteínas e carboidratos constituem aproximadamente 41% ($5,3 \times 10^{-13}$ g/célula); 52% ($\sim 6,6 \times 10^{-13}$ g/célula)

e 7% ($\sim 0,8 \times 10^{-13}$ g/célula) do total da massa da membrana (Juliano, 1973).

Os lipídios constituintes da membrana pertencem a três classes (Nelson, 1972; van Deenen et alii., 1974):

1. Lipídios neutros: Esta fração quase que exclusivamente de colesterol não esterificado contribui com 25 a 29% do total de lipídios.

2. Fosfolipídios: Contribuem com 50 a 55% do total e pertencem principalmente às seguintes classes de acordo com a caracterização de seu grupo polar. a) Glicerofosfolipídeos; fosfatidilcolina (PC); fosfatidiletanolamina (PE); fosfatidilserina (PS); fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA). b) Esfingolipídios (esfingosina); esfingomiéline (Sph). Quantitativamente PC, Sph, PE e PS são predominantes. A diversidade dos fosfolipídios não só se prende à cabeça dos grupos polares mas também à região apolar. Os ácidos graxos na membrana de eritrócitos podem variar nas cadeias de 16 a 24 átomos de C e de zero a 6 duplas ligações (usualmente Cis) por cadeia (Nelson, 1972). As cadeias alquílicas dos PC e em particular esfingomielinas são mais saturadas que aquelas dos PE e PS. Esfingomielinas são caracterizadas por grande conteúdo de cadeias longas de ácidos graxos (20 átomos C).

3. Glicolipídios: Constituem-se em 5 a 10% do total de lipídios da membranas, e consistem de uma mistura apolar (esfingosina + 1 ácido graxo usualmente de cadeia longa e altamente saturado) (Ando & Yamakawa, 1973), ligadas a um oligossacarídeo variando no número de unidades monossacarídeos.

Constituintes protéicos da membrana - A solubilização de membranas isoladas por sódio dodecil sulfato (SDS) e subsequente eletroforese em gel de poliacrilamida tem demonstrado a presença de

15 a 20 frações de polipeptídeos (Lenard, 1970; Fairbanks et alii, 1971; Knuferrmann et alii., 1975; Anselstetter et alii., 1975) . Algumas das frações de polipeptídeos contêm de 20 a 60% de carboidratos (Fujita et alii., 1975) que podem ser corados em ácido periódico e reagentes de Schiff.

Estado físico e arranjo dos constituintes das membranas - Uma topografia funcional da membrana do eritrócito requer informação sobre o arranjo, comportamento dinâmico e interrelação de seus elementos. Inicialmente a idéia da disposição dos lipídeos em bicamadas vem das experiências de Gorter & Grendell (1925). Micrografias eletrônicas de membranas biológicas indicavam uma região de baixa densidade eletrônica de cerca de 5 a 10 nm compreendida entre duas regiões de mais alta densidade eletrônica; observações que levaram Danielli & Davson (1935) a propor um modelo em que a região de baixa densidade eletrônica se constituiria em uma bicamada lipídica coberta por proteínas. Todavia, o conceito de mosaico fluido lipídeo-proteína para membranas (Fig.6) já previsto por Mond 1927, elaborado em detalhe por Wallarch et alii., 1966, e notavelmente por Singer & Nicolson (1972) tem sido presentemente o mais aceito. Neste, as características mais importantes são as seguintes: a) os lipídeos anfipáticos da membrana plasmática são arranjados em bicamadas, com as regiões hidrofóbicas voltadas para o interior. O conceito de arranjo em bicamadas para as membranas de eritrócitos se tornou comprovado por dados espectroscópicos demonstrando a grande semelhança entre camadas artificiais duplas de fosfolipídeos e a membrana eritrocitária. A análise de Raios-X indica a presença de uma bicamada lipídica com uma cavidade central hidrofóbica e uma espessura de 45 a 55A (Wilkins, 1971; Stannoff, 1975). Evidências de um arranjo or

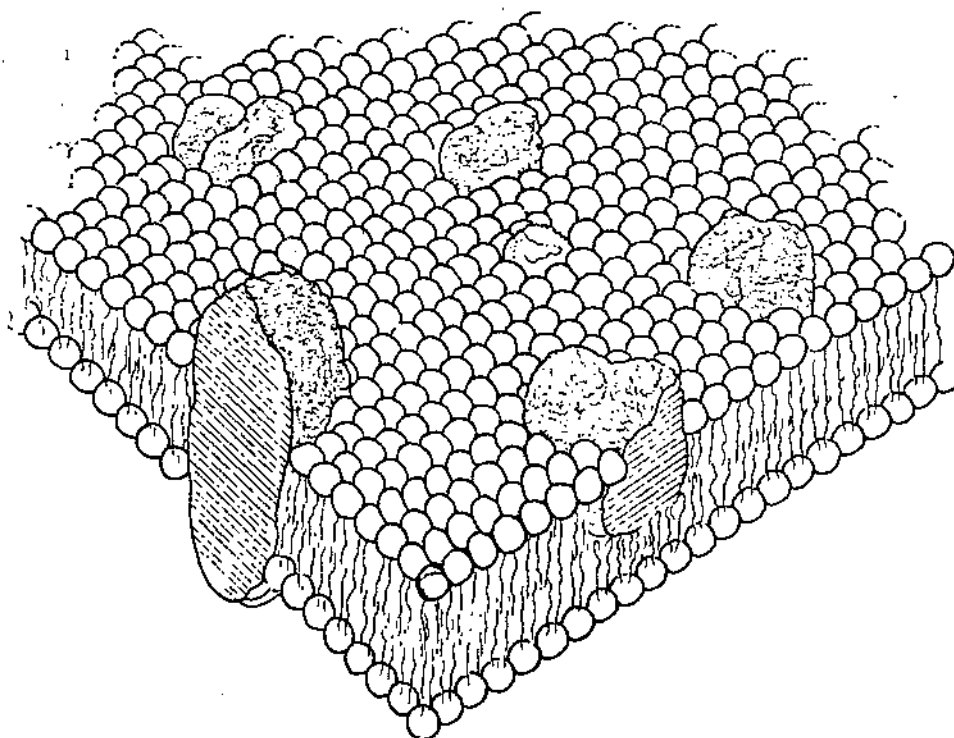


FIG.6 - Modelo de mosaico fluido de membrana (Singer et alii, 1972).

denado de cadeias paralelas de hidrocarboneto perpendiculares à superfície de membranas adveio das experiências com ácidos graxos e esteróis marcados com nitróxido por estudos de ressonância eletrônica paramagnética (REP) (Hubel et alii., 1969; Landsbeyer et alii., 1971); b) as proteínas estão dispostas em relação a bicamada lipídica de dois modos:

1) Proteínas intrínsecas significando que são parcialmente embebidas no interior das membranas hidrofóbica e permanecem nesta posição principalmente pelas interações hidrofóbicas com os lipídeos enquanto que outros segmentos são expostos na superfície da membrana e na fase aquosa (Singer & Nicolson, 1972; Capaldi & Green, 1972). Um caso especial deste tipo são as proteínas membrana "spanning".

2) Proteínas extrínsecas ou periféricas que estão fixadas na região superficial das proteínas intrínsecas da membrana ou nas cabeças dos lipídeos por todos os tipos de interação também características para a ligação de proteínas solúveis isto é, polar, estereoespecífica, forças apolares (Singer & Nicolson, 1972; Singer, 1974).

Este aspecto dualístico que não exclui alguma sobreposição no arranjo dos dois tipos de proteína é refletido na grande variedade de procedimento requerido para solubilização dos diferentes tipos de proteínas da membrana de eritrócitos. Devido à presença das proteínas intrínsecas e extrínsecas a espessura total da membrana pode exceder consideravelmente a espessura da bicamada lipídica como tem sido indicado por estudos de Raios-X (Fineau et alii., 1975).

Região lipídica (Arranjo transversal)- Os amino fosfolipídeos carregados (PS, PE) da membrana de eritrócitos estão localizados pre

ferencialmente no citoplasma, enquanto que os neutros (PC, Sph) na fase oposta. Estas observações vieram de resultados experimentais pelo uso de marcadores amino-reagentes como o formilmetionil sulfone metilfosfato (Bretscher et alii., 1972) que reage com PE em "ghosts" mas não com células íntegras. As técnicas de marcadores avaliáveis só detectam estes dois amino fosfolipídeos PE e PS. A aplicação de fosfolipases oferece possibilidades mais amplas. A aplicação sequencial de fosfolipase A₂ e esfingomielinase (Verkley et alii., 1973) provê a mais conveniente evidência da assimetria de fosfolipídeos na membrana de eritrócitos humanos,

Um máximo de 48% de fosfolipídeos totais que poderiam constituir um dos lados da bicamada, são degradados compreendendo 76% de PC, 82% de esfingomielina e 20% de PE. Experimentos com quebra de lipídios externos em "ghosts" "inside out" re-selados (Zwall et alii., 1975) quantitativamente dão suporte a este conceito de assimetria. Por outro aspecto, fosfolipídeos voltados para o lado externo da membrana são resistentes à ação de certas fosfolipases na célula íntegra embora prontamente atacados em "ghosts".

A estabilização desta assimetria dos lipídios é feita por interação lipídio/proteína presumivelmente no lado interno da membrana. Glicolipídeos são também dispostos de forma altamente assimétrica. Desde que os glicolipídeos são especialmente esfingolipídeos, presupõe-se que a disposição assimétrica da esfingomielina confine os esfingolipídeos na camada externa da membrana.

A disposição transversa do colesterol é ainda um problema em discussão; análises recentes por fratura por resfriamento de uma camada de eritrócitos (Fisher, 1976) fornece alguma

evidência de que o colesterol poderia se localizar preferencialmente do lado externo.

Região lipídica (Arranjo lateral) - Nas bicamadas fluídas tais como nas membranas de eritrócitos os constituintes tem uma mobilidade lateral bastante alta.

Região lipídica (Estado físico) - Os fosfolipídeos em presença de excesso de água formam estruturas ordenadas por exemplo: bicamadas (Luzzati, 1968; Tardieu et alii., 1973) com propriedades dependentes da temperatura e da natureza anfipática e flexibilidade inerente à estrutura da cadeia hidrocarbonada.

Na variação das temperaturas biologicamente relevantes estas estruturas organizadas podem estar presentes, ou em um estado de "gel" no qual as moléculas tem um alto grau de liberdade, maior que em um cristal sólido, ou em um estado cristalino líquido, que combina um alto grau de flexibilidade, liberdade rotacional e mobilidade lateral de uma única molécula com a preservação de uma estrutura ordenada na camada interna do lipídeo (Trauble, 1971; Chapman, 1975). A transição entre as duas fases ocorre a temperaturas características dependendo da natureza da região polar e apolar dos fosfolipídeos.

Região proteica (Arranjo transversal) - A disposição das proteínas das membranas relativas à bicamada lipídica tem sido investigada pelo uso de marcadores ou de enzimas proteolíticas. Com esta metodologia se prova um arranjo transversal de pelo menos cinco frações proteicas, denominadas PAS -1 a 4 e a banda 3 (Fairbanks et alii., 1971). Polipeptídeos adicionais parecem ser acessíveis de ambos os lados da membrana principalmente as bandas 2.1 e 2.6 (Staros & Richards, 1974).

O arranjo de glicophorina (PAS 1) relativa ao domínio lipídico foi estabelecido por Segrest et alii (1973) utilizando-se de lactoperoxidase, para degradação proteolítica parcial. O segmento N-terminal da cadeia peptídica que carrega o resíduo de carboidrato parece estar dirigido para o lado exterior da membrana enquanto que o resíduo C-terminal se projeta para o espaço citoplasmático. O segmento que ancora a molécula na cavidade hidrofóbica contém uma alta proporção de amino ácidos hidrofóbicos e imita a bicamada lipídica por uma série de regiões polar-apolar-polar.

Região proteica (Arranjo lateral) - A disposição lateral das proteínas "spanning" no plano da membrana e sua interação com proteínas extrínsecas tem sido estudadas por microscopia eletrônica de resfriamento e uso de reagente "cross-linked".

Região proteica (Assimetria) - O aspecto de distribuição heterogênea no plano de membrana tem sido objeto de vários estudos principalmente quanto à separação lateral de fases de lipídeos (Philips et alii., 1970) ou lipídeos e proteínas promovidos por ação de temperatura, presença de íons ou pH, quando o método de marcadores de spin vem sendo utilizado (Kleeman et alii., 1976) .

Interação: lipídeos-proteína - Proteínas intrínsecas da membrana em virtude de sua localização na região lipídica interagem com os lipídeos circunvizinhos. Como consequência, os lipídeos da membrana podem modificar as propriedades das proteínas da membrana e vice-versa. A partir de numerosos estudos torna-se evidente que as funções de transporte e enzimáticas das proteínas dependem da presença de fosfolipídeos com requisitos variáveis concernentes à cabeça polar e à região apolar de molécula (Coleman 1973; Fox & Tsukagoshi, 1973).

A interação com proteínas torna os lipídeos ligados incapazes de participar em transições termotrópicas. Este efeito tem sido utilizado para estimar quantitativamente a quantidade de lipídeos afetados por interação hidrofóbica com a proteína integral. Estes valores são representados como 12% de lipídeos imobilizados em membranas de eritrócitos (Mc Jamghlin et alii, 1975). A influência de proteínas na disposição dos lipídeos de membrana é ainda indicada por modificações marcantes na acessibilidade de marcadores e fosfolipases aos fosfolipídeos após perturbação da proteína da membrana por alcôois ou reagentes SH (Haest & Deuticke, 1975).

Movimentos dos componentes das membranas - O estudo da mobilidade dos componentes das membranas, tanto lateral (Frye et alii., 1970) como transversal (flip-flop) (Lenard et alii., 1976) tem-se desenvolvido consideravelmente. Experimentos de ressonância magnética eletrônica (Scandella et alii., 1972) e microscopia de fluorescência (Frye et alii., 1970) tem indicado que os diferentes componentes das membranas se deslocam no plano da membrana com diferentes coeficientes de difusão que dependem do peso molecular, do comprimento e do tipo de membrana.

OBJETIVOS

As drogas dipiridamol e papaverina possuem efeito farmacológico comum qual seja o de vasodilatação. O mecanismo proposto para este efeito é o da mediação por adenosina (ambas inibem a captação deste nucleosídeo por células cardíacas e ghosts (Schrader et alii.,1972). Por outro lado, existe um incremento de PO_2 no sangue do "sinus coronariano" na administração destas drogas em pacientes humanos anestesiados (Heistradur et alii.,1964).

Foi nosso interesse no presente estudo verificarmos, "in vitro", as alterações no estado biofísico da membrana da hemácia, bem como analisarmos as propriedades funcionais da hemoglobina, na presença destes vasodilatadores.

ABREVIATURAS

ATP	=	adenosina trifosfato
2,3-DPG	=	2,3 difosfoglicerato
Dip	=	dipiridamol (2,2',2'',2''',4-8 dipiperideno pyrimido 5,4 pirimidina 2,6 diyldimetrola tetraethanal) (Fig.3).
PAV	=	papaverina (6,7 dimetoxi 1-veratrylisoquinoline) (Fig.2)
NEM*	=	4-maleimido 2,2,6,6 tetrametil piperidinoxil
IAA	=	iodoacetamida
NAD	=	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
DCCP	=	2,6 diclorofenol indofenol
tris	=	tris hidroximetilaminometano
8 ANS	=	1 anilino naftaleno 8 sulfonato
PGK	=	fosfogliceromutase
GAPD	=	gliceraldeido fosfato desidrogenase
3 PgA	=	3 fosfogliceraldeido
I _{5,10}	=	5-doxyl esteriaci

MATERIAL E MÉTODOS

1 - PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO

O sangue era colhido da veia inferior do braço de indivíduos normais (portadores de hemoglobina A) na presença de anticoagulante: heparina ou solução de ácido cítrico-dextrose. Procedia-se à centrifugação a 2000 rpm (Sorvall SS34) por 5 minutos a 4°C a fim de separar o soro e células brancas. A seguir suspendiam-se as hemácias em solução salina fisiológica e lavava-se por centrifugação a 5000 rpm por 3 vezes. A hemólise era então obtida adicionando-se água destilada às células vermelhas (3 V/V). O hemolisado era separado por centrifugação a 10000 rpm quando o sedimento era constituído por detritos celulares e membranas.

2 - PREPARO DE AMOSTRAS ISENTAS DE COFADORES

Amostras de hemoglobinas isentas de cofadores eram obtidas pela passagem da amostra por uma coluna de Sephadex G25 de 15x15 cm, montada em água bidestilada, e pela passagem sucessiva em colunas trocadoras de íons. Estas colunas de troca iônica eram Dowex 1-Xg (H_3COO^-), Dowex 50W (NH_4^+) e mistura de Amberlite TRC-50 (H^+) e IR-4B (OH^-).

3 - CURVA DE EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO

O estudo de equilíbrio da hemoglobina com o ligante oxigênio foi feito pelo método espectrofotométrico onde eram calculados os valores de $\underline{n}$ (coeficiente de Hill) e P_{50} (pressão

de oxigênio onde metade das moléculas estão na forma de oxihemoglobina) através da diferença entre as absorbâncias das formas oxi e desoxihemoglobina a 550, 577 e 540 nm, e em função do volume de ar adicionado. Em um tonômetro de vidro, previamente aferido eram colocados 3 ml de solução de hemoglobina isenta de cofatores, diluída em tampão bis-tris lactato 0,05 M pH variando de 6,5 a 8,0, de modo que a solução ficasse com a hemoglobina em concentração final da ordem de 5×10^{-5} M. Pela passagem de nitrogênio no tonômetro se conseguia a amostra na forma desoxi que era lida por varredura de 500 a 600 nm registrando-se as absorbâncias com auxílio de um registrador acoplado a um espectrofotômetro. Após o registro da desoxihemoglobina, adicionava-se no tonômetro um volume conhecido de ar, deixando-se o tonômetro em banho maria a 37°C por 10 minutos, com agitação. Após o equilíbrio térmico, novamente se registrava as absorbâncias nas mesmas condições anteriores. Esta operação (com novas adições de ar) era repetida por 4 a 5 vezes. Finalmente o tonômetro era aberto e se fazia passar um corrente de ar por 1 a 2 minutos a fim de se obter a forma oxihemoglobina que também era lida e registrada de 500 a 600 nm.

Os cálculos foram feitos utilizando-se a somatória das diferenças das absorbâncias (nos três comprimentos de onda) de cada adição de ar com a da desoxihemoglobina sendo este valor na forma oxi correspondente a saturação total, calculou-se as porcentagens de saturação ($\bar{y}$) de cada adição em função do valor ao qual se atribuiu 100%. Os valores $\log \bar{y} / 1 - \bar{y}$ foram calculados e registrados em gráfico em função de $\log \text{PO}_2$ (logaritmo da pressão de oxigênio) onde se pode obter $\log P_{50}$ e n , ou simplesmente calculando estes parâmetros, por regressão linear utilizan

do-se os dados $\log \bar{y} / 1 - \bar{y}$ e $\log PO_2$.

O $\log P_{50}$ corresponde ao intercepto do eixo X onde se obtém a pressão suficiente para 50% de saturação e n corresponde à tangente da reta obtida. Pela regressão linear $\log P_{50} = -a/b$ e $n = 1/b$ onde: a = coeficiente linear
 b = coeficiente angular

4 - PREPARAÇÃO DE GLOBINA

Apo-hemoglobina foi preparada a partir de amostras de hemolisados provenientes de sangue de indivíduos normais (hemoglobina A), estocadas a 4°C por período de no máximo 1 semana.

O procedimento para obtenção da globina foi baseado no método de Rossi Fanelli (1958) e consistia no seguinte: um volume x de proteína em água (concentração aproximadamente 3%) foi adicionada lentamente com agitação vigorosa a cerca de 30 volumes de acetona ácida gelada (-20°C contendo 2 a 3 ml de HCl 2 N por litro de acetona). A apo-hemoglobina precipitada foi coletada por centrifugação 5000 rpm (SS34) 10 minutos a 4°C, tratando-se o precipitado com acetona ácida tantas vezes quanto necessário até obtenção de um precipitado branco ligeiramente amarelado. O precipitado foi dissolvido em um mínimo volume de água destilada e dialisado contra solução de bicarbonato de sódio (100 mg/l) por cerca de 2 horas, e subsequentemente dialisado contra tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 por 12 horas. Durante a última dialise contra fosfato uma parte da proteína precipita (globina desnaturada) e é removida por centrifugação a 10000 rpm (SS34) a 4°C por 10 minutos.

A solução de globina (1 a 3%) amarelo-clara foi

estocada em refrigerador por períodos até uma semana. Esta solução origina produto de reconstituição indistinguível da hemoglobina original nas suas propriedades físico-químicas quando recombinada.

5 - TITULAÇÃO DE GLOBINA COM HEMINA

A preparação de solução de hemina foi feita dissolvendo 6,52 mg de clorohemina em 2 ml de NaOH 1 N e completando para 10 ml com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

A reconstituição da hemeproteína a partir de apohemoglobina foi feita pela titulação com hemina. A capacidade da apohemoglobina de recombina-se com hemina foi testada acompanhando-se a absorbância a 405 nm em função da quantidade de hemina adicionada a uma quantidade fixa de apoproteína (Rossi Fanelli, 1958). O ponto de equivalência em termos de hemina adicionada coincide com a concentração de sítios ligantes calculados com base no coeficiente de extinção $12400/\text{cm}^2/\text{m mole}$ a 280 nm.

Todas as medidas espectrofotométricas feitas a temperatura ambiente foram feitas em poucos minutos devido à instabilidade de apohemoglobina a temperaturas abaixo de 10°C .

6 - TITULAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA A COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO

Hemoglobina A "stripped" foi equilibrada com tampão bis-tris 0,05 M pH 7,4. Posteriormente a hemoglobina foi oxidada à forma férrica (Fe^{+++}) pela passagem em uma coluna de Sephadex G25 equilibrada com $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Metahemoglobina ($8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ em heme) foi titulada opticamente em um espectrofotômetro Zeiss

DMR21 a temperatura ambiente. O aumento do pH pela adição de NaOH 0,1 M foi determinado com um pHmetro digital. O aparecimento de ponto isosbético indica a ausência de formação de novas espécies de metahemoglobina.

7 - OXIDAÇÃO DE OXIHEMOGLOBINA

A autooxidação da hemoglobina foi seguida espectrofotometricamente na região do visível, incubando-se a proteína ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, a temperatura ambiente a diferentes intervalos de tempo dependendo do tratamento a que foi submetida a hemoglobina.

A obtenção de hemoglobina na sua forma férrica final foi feita pela adição de ferricianeto de K em excesso.

A taxa de formação de metahemoglobina foi calculada a partir do tempo zero onde a absorbância em 576 mμ correspondia a 100% da forma oxi, antes da adição de qualquer droga a ser estudada. Após determinado intervalo de tempo foi adicionado ferricianeto de K, e feito espectro da amostra (hemoglobina de forma férrica que corresponderia a 0% de forma oxi). Para cada intervalo de tempo o decréscimo da absorbância a 576 nm correspondia a uma porcentagem de oxidação.

O cálculo da constante cinética de oxidação da hemoglobina foi feito na calculadora Sharp modelo Compet 364P onde se calculava a função $\ln 100/100-x$ onde x é igual a porcentagem de oxidação no tempo t' e o coeficiente angular da reta determinada por estes valores em cada intervalo de tempo. A constante cinética da reação (K') correspondia ao coeficiente angular da reta.

8 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA DE METAREDUCTASE

Cinco ml de sangue eram coletados em 30 ml de NaCl 0,9% com vigorosa agitação a fim de se evitar coagulação. A suspensão de células vermelhas era lavada por 4 vezes com solução salina por centrifugação a 2000 rpm (Sorvall SS-34).

A hemoglobina contida no sangue de indivíduos normais era transformada em hemoglobina férrica por tratamento com NaNO_2 (0,1%), e após 5 minutos as hemácias eram lavadas por 5 vezes por centrifugação a fim de retirar o excesso de nitrito. Os eritrócitos tratados com nitrito eram suspensos em 10 volumes (V/V) de salina, em tampão tris 0,01 M pH 7,4 e incubados a 37°C em um banho maria com agitação, na presença de ar. Em cada experimento 2 ml de suspensão de células eram incubados com glicose (0,01 M) ou lactato (0,02 M) na presença de azul de metileno ($2 \times 10^{-5}\text{M}$).

A mudança no conteúdo de hemoglobina férrica era acompanhada espectrofotometricamente a 540 nm em um espectrofotômetro Zeiss DMR-21, em alíquotas de 0,2 ml de suspensão de hemácias que eram coletadas a diferentes intervalos de tempo e hemolisadas com água destilada. As porcentagens de hemoglobina férrica remanescente eram calculadas segundo Rossi Fanelli et alii. (1957).

9 - ENSAIO DE NADH DIAPHORASE I EM ERITRÓCITOS

A determinação da atividade da diaphorase I foi feita segundo método de Scott, E.M. (1960), onde 5 ml de sangue eram colhidos em solução ácido cítrico-dextrose (ACD). Procedia

-se à lavagem das células vermelhas por centrifugação, após retirada do soro, utilizando-se 10 volumes de solução de tampão salina-fosfato (PBS). Era adicionado à suspensão de hemácias um igual volume de solução de PBS contendo nitrito de sódio 1%, incubando-se por 20 minutos. Após este tempo as hemácias eram lavadas por 5 vezes com PBS 10 volumes, até remoção completa do nitrito. A 0,1 ml de hemácias contendo hemoglobina Fe^{+++} era adicionado 1,5 ml de água destilada a fim de se proceder a hemólise centrifugando-se a suspensão por 1 minuto a 5000 rpm (Sorvall SS 34) a fim de remover detritos celulares.

O conteúdo de metahemoglobina no hemolisado foi determinado medindo-se a absorvância a 600 mμ.

A cada uma das duas cubetas foi adicionado 50 ml de tampão tris 1 M, 100 ml de EDTA 0,05 M, e 50 ml de DCCP $1,2 \times 10^{-3}$ M. Na cubeta de ensaio era adicionado um volume de hemolisado correspondente a 3,25 mg de metahemoglobina, e água destilada para um volume de 2,98 ml. Na cubeta correspondente ao branco omitia-se o hemolisado. A ambas as cubetas eram adicionados 20 μl de NADH $8,8 \times 10^{-3}$ M. A absorvância a 600 mμ era determinada em um espectrofotômetro Zeiss DMP-21, a intervalos de 3 minutos. O nível de diaforase no hemolisado era expresso com a mudança na absorvância por minuto.

10 - CAPTAÇÃO DE PAPAVERINA POR ERITRÓCITOS

A suspensão de hemácias em tampão tris HCl 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,5 era feita para um hematócrito previamente estabelecido.

A papaverina apresenta a intervalos de pH 6.0 a 7,0

um pico de absorção máxima a 250 nm. O logaritmo do coeficiente de extinção molar corresponde a 4,75.

Inicialmente foi feita uma curva padrão de solução de PAV em tampão para estabelecer o intervalo de linearidade. À suspensão de hemácias era adicionada solução de PAV de concentração conhecida determinada espectrofotometricamente; e incubava-se por tempos diferentes a temperatura ambiente. A diferentes tempos alíquotas eram retiradas, centrifugadas a 16000 rpm (Eppendorf) por 3 minutos. O sobrenadante era diluído convenientemente e lido em um espectrofotômetro Zeiss PMQ2 a 250 nm.

A porcentagem de captação era estabelecida em função do AA 250 nm em relação ao tempo zero. Um controle, suspensão de hemácias na ausência de droga era feita concomitantemente a partir de estabelecido um tempo de máxima captação; procedia-se ao mesmo ensaio para diferentes concentrações de droga, mantendo-se a suspensão com um mesmo valor de hematócrito.

11 - CAPTAÇÃO DE ANS POR ERITRÓCITO

A porcentagem de captação de ANS (1 anilino naftaleno 8-sulfonato) foi feita de acordo com o procedimento de Fortes, G (1974).

Sangue fresco colhido em heparina era lavado por centrifugação em solução de NaCl 0,9%, e as hemácias obtidas res suspensas em tampão tris HCl 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,4.

Um ml de suspensão de hemácias; 4 ml do meio de incubação (tampão tris HCl 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,4); 25 µl ANS. Incubava-se a diferentes tempos 0 a 60 minutos a 37°C em banho maria com agitação contínua. Retirava-se alíquotas de 0,4 ml nos

diferentes tempos. Centrifugava-se em Eppendorf (16000 rpm) por 3 minutos. Retirava-se 20 μ l do sobrenadante e adiciona-se a 2ml de N-butanol. A captação de ANS era acompanhada por leituras de fluorescência em um espectrofluorímetro Aminco Bowman, a 360 nm comprimento de excitação e 500 nm comprimento de emissão.

12 - AVALIAÇÃO DA TURGEÊNCIA DE HEMÁCIAS (TRATADAS COM DROGAS) EM DIFERENTES CONDIÇÕES.

O aumento de volume de hemácias pode ser acompanhado espectrofotometricamente a 656 nm. A diminuição da turbidez da suspensão reflete em um decréscimo da absorbância neste comprimento de onda, sendo este índice utilizado para avaliação da integridade da membrana.

13 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NOS ERITRÓCITOS

Com a finalidade de acompanhar alterações morfológicas induzidas por droga (PAV) em eritrócitos foi utilizada a técnica de microscopia de fase.

Eritrócitos humanos normais (hematócrito 10%) foram incubados em condições isotônicas a temperatura ambiente com diferentes concentrações de PAV, em diferentes tempos. Em cada tempo uma alíquota da suspensão de hemácias foi observada sob microscopia de fase, e fotografada em campos tomados ao acaso, para posterior mensuração do diâmetro eritrocitário médio. O aumento final utilizado foi de 17360 X.

14 - CURVAS DE HEMÓLISE

Após obtenção de hemácias, ressuspensava-se em solução salina 0,15 M (1/2) V/V.

Alíquotas de 0,1 ml desta suspensão eram misturadas com 5 ml de solução de NaCl: 0,1%, 0,35%, 0,4%, 0,5%, 0,6% e 0,85% e deixadas a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras eram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O conteúdo de hemoglobina no sobrenadante era determinado espectrofotometricamente a 576 nm. A porcentagem de hemólise era calculada assumindo como 100% o valor encontrado para a suspensão de hemácia a 0,1% de NaCl.

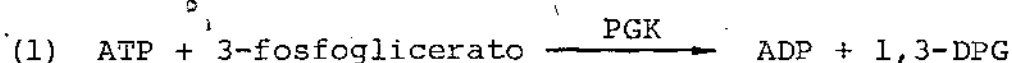
15 - PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS

O método utilizado foi de P.Kommer (1980).

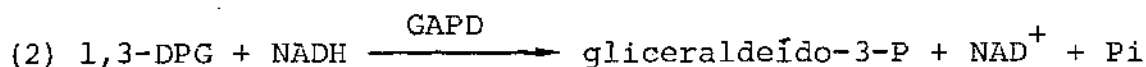
Sangue de doador normal (hemoglobina A) era retirado em tampão citrato dextrose (ACD). As células eram lavadas por duas vezes em 5 volumes de KCl 130 mM, tris 20 mM pH 7,4 a 4°C a 5000 rpm (Sorvall SS34). As células brancas foram removidas. As hemácias empacotadas e lavadas foram lisadas com água bidestilada por 5 minutos a 4°C. As membranas foram sedimentadas dentro de 10 minutos a 12000 rpm (Sorvall SS34). Adicionava-se cerca de 200 ml de solução KCl 520 mM, tris HCl 80 mM pH 7,4 a fim de restaurar a isotonicidade. O procedimento lítico foi repetido cerca de dez vezes até as membranas aparecerem esbranquiçadas. O sedimento final foi coletado em KCl 130 mM, tris HCl 200 mM pH 7,4 e levado a um volume final de 100 ml.

16 - DOSAGEM DE ATP NO SANGUE E EM SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS

A enzima fosfoglicerato quinase (PGK) cataliza a seguinte reação:



A enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase também presente na mistura de reação, cataliza a reação seguinte:

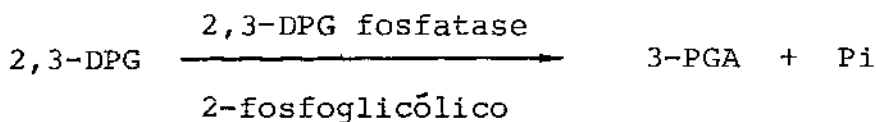


Pela determinação do decréscimo de absorbância a 340 nm, que é resultante de oxidação do NADH, se obtém o conteúdo de ATP presente.

A dosagem do conteúdo de ATP em suspensão de eritrócitos, e sangue foi feita segundo o método de Adams (1963).

17 - DOSAGEM DE 2,3-DPG NO SANGUE E EM SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS

O 2,3-DPG é enzimaticamente hidrolizado a ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) e fosfato inorgânico (Pi). A enzima que cataliza a reação está presente em preparações de fosfogliceromutase e é a 2,3-DPG fosfatase. O ácido 2-fosfoglicólico é necessário como catalizador da reação.



O conteúdo de 2,3-DPG pode ser determinado através da dosagem colorimétrica do Pi.

A dosagem de 2,3-DPG no sangue foi feita de acordo com o método de Kevt, A.S. (1966) e o conteúdo de Pi foi determinado pelo método de Fiske & Subbarow (1925).

18 - MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN

O método de marcador de spin, consiste no emprego de uma molécula sonda, através de cujo espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) se procura obter informações de carácter estrutural ou conformacional do sistema ao qual a molécula sonda se encontra ligada. Esta possibilidade de obtenção de informação a respeito de transições conformacionais se deve ao fato da ressonância paramagnética eletrônica ser uma técnica que opera na região de micro ondas (9, 24, 35 GHz) do espectro eletromagnético (Carrington et alii., 1967), o que corresponde a frequência de movimentos translacionais, rotacionais e segmentais das estruturas em estudo.

19 - RADICAIS NITRÓXIDO

O desenvolvimento da química do radical NO serviu de fundamento ao método de marcação de spin originalmente proposto por (McConnell, 1965) e que hoje é bastante empregado em físico-química e biologia molecular (Berliner, 1976). Este método consiste em colocar o radical com um grupo NO estável no sistema em estudo seja por meio de uma reação que leva à ligação covalente a uma molécula do sistema, seja simplesmente introduzindo o radical no sistema estudado no qual ele é dissolvido sem uma ligação permanente às suas moléculas (sonda de spin). Como a maioria dos sistemas estudados são diamagnéticos o sinal de RPE do fragmento NO é o único sinal presente.

A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica espectroscópica que depende da presença de radicais livres

e se baseia na aplicação de um campo magnético H , sob ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin (MS) se tornam divergentes (Fig.1) (Wertg et alii., 1972), se agora for aplicada a energia adequada ($h\nu$) é possível induzir a transição entre os dois níveis. Esta absorção de energia vai gerar um espectro que normalmente é registrado na forma da derivada da primeira absorção. A análise da posição das linhas e da forma das linhas em sistemas isotrópicos pode dar informações sobre velocidades do momento do marcador, sobre a estrutura, ordem, velocidade e polaridade do sistema estudado.

20 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE NITRÓXIDOS.

A energética das transições envolvendo momento magnético de spin pode ser representado através da hamiltoniana de spin que é expressa:

$$(1) \mathcal{H} = \beta_e \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \hat{S} + \hat{S} \cdot \vec{T} \cdot \hat{I} - \beta_N \vec{H} \cdot \vec{g}_N \cdot \hat{I} + \mathcal{H}_{\text{troca}} + \mathcal{H}_{\text{dipolo}}$$

onde o 1º termo representa a interação eletrônica do tipo Zeeman, o 2º a interação hiperfina (spin eletrônico-spin nuclear), o 3º a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (que é desprezível nas condições normais do experimento de RPE) e $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ representam as energias envolvidas em interações entre elétrons livres, que só ocorrem em bi ou poli radicais em concentrações elevadas de monoradicaís.

$\mathcal{H}_{\text{troca}}$ depende da interpenetração dos orbitais dos radicais e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ depende da geometria do sistema uma vez que envolve uma dependência angular. Na equação (1) $\vec{H}$ é o vetor de campo magnético, β_e e β_N são os magnetons eletrônico e

nuclear respectivamente, $\bar{g}_N$ é o fator de desdobramento nuclear de Zeeman, $\bar{g}$ é o tensor g do elétron, $\hat{S}$ é o operador de momento angular de spin nuclear e $\bar{T}$ (ou $\bar{A}$) é o tensor do desdobramento hiperfino.

Em radicais nitróxido, a maior parte da densidade eletrônica está localizada no átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante do ^{14}N possui spin nuclear = 1 ($I=1$) podendo na presença de um campo magnético apresentar tais valores para o momento magnético de spin nuclear ($M_I = -1, 0 + 1$). A interação entre o spin nuclear e o spin eletrônico dá origem ao desdobramento hiperfino (2º termo da equação 1). O spin nuclear = 1 ($I=1$) causa o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três (Fig. 1b). Portanto, na ausência de interação do spin eletrônico, ($\mathcal{H}$ troca e $\mathcal{H}$ dipolo = 0) podem-se observar três transições, uma vez que somente transições com $\Delta M_I = 0$ são permitidas. A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino (Schever & Shirley, 1979).

Para os radicais nitróxido livres utilizados no tratamento de membranas de eritrócitos os termos da hamiltoniana de spin são:

$$\mathcal{H} = \beta S g H + S A I$$

onde S e I são operadores de spin eletrônico e spin nuclear, H é o vetor do campo magnético e g e A são os dois tensores que descrevem a interação do elétron não emparelhado com o campo magnético e com momento magnético nuclear do nitrogênio. Devido a anisotropia de g e A os espectros observados são dependentes da liberdade de movimentação do marcador de spin. É usual a medida deste parâmetro em termos de tempo de correlação (Sanderberg et alii., 1969).

EQUIPAMENTOS, REAGENTES

Reagentes

os marcadores de spin: $I_{5,10}$ e NEM* provieram de Syva Corp. Palo Alto, California. Os demais reagentes utilizados provieram de Sigma, Merk, Pharmacia Fine Chemicals.

Equipamentos

Tonômetro: célula de Pyrex da Beckmann, parte volumétrica e montagem executada no Instituto de Química - UNICAMP.

Espectrofotômetros:

Varian serie 634

Zeiss - PMQII ou DMR 21

Espectrofluorímetro Aminco Bowman

Centrífuga

Sorvall modelo RC-2B

Eppendorf 3.200

Balança analítica

Metler, SS

Sartorius 2443

Espectrometro de EPR da Varian de Banda X - Instituto de Química e Física, Universidade de São Paulo.

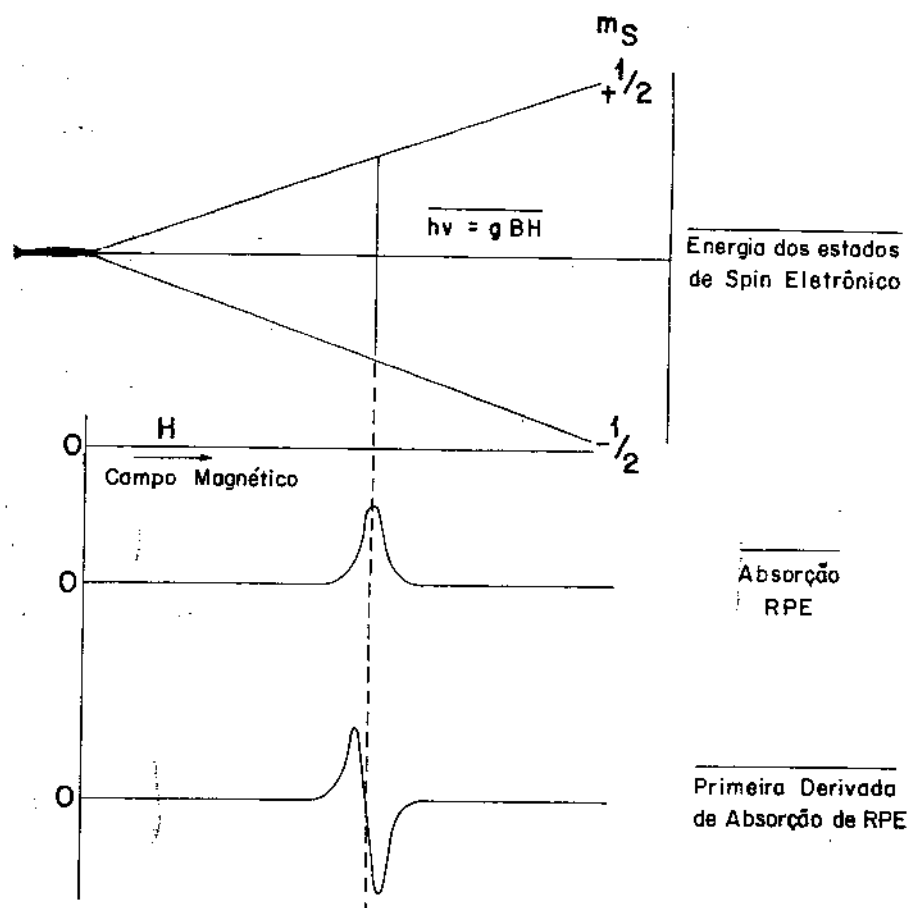


FIG.1a - Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético. Os espectros de RPE registram, em geral, a derivada primeira da absorção.

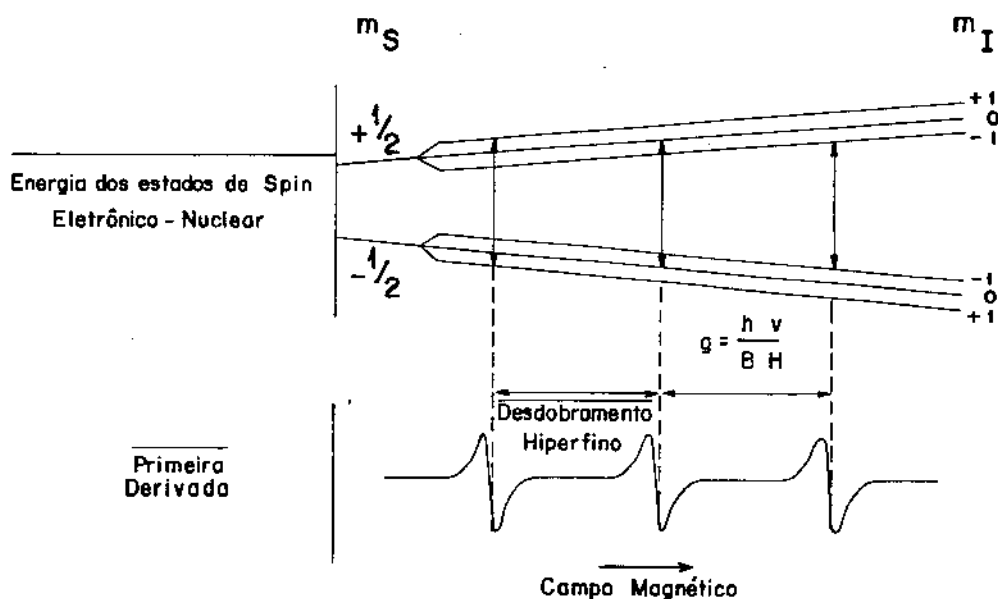


FIG.1b - Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico para um átomo com spin nuclear ($I=1$). A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino.

FIG.3 - Formula estrutural do dipiridamol .

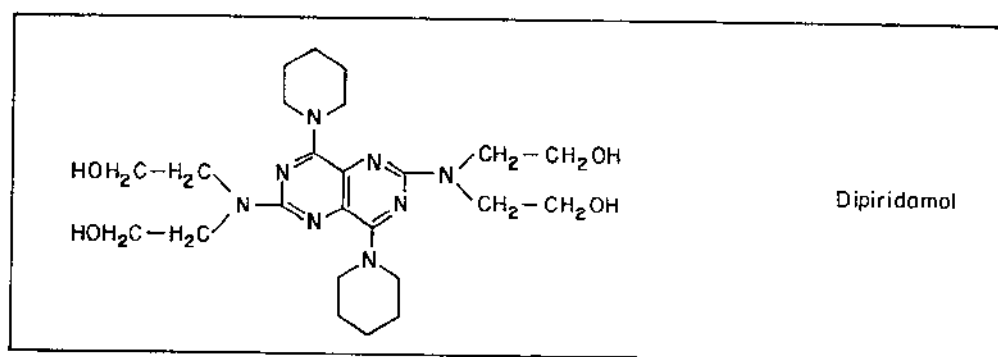
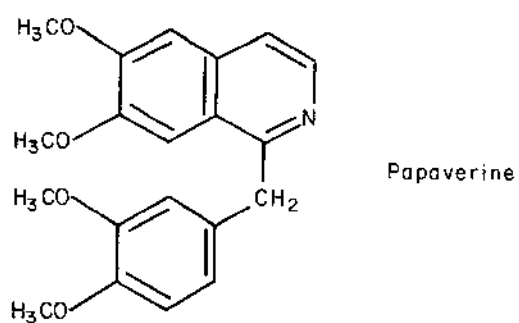


FIG.2 - Fórmula estrutural da papaverina.

RESULTADOS

1 - PROPRIEDADES ESPECTRAIS

Os espectros de absorção de solução de hemoglobina tratadas pelas drogas, foi determinado com a finalidade de se verificar se havia deslocamento dos picos de absorção máxima 577 e 541 nm na forma de oxihemoglobina. Modificações ou deslocamentos destes picos podem ser visualizados quando a hemoglobina é tratada, por exemplo, com derivados nitrosos aromáticos (Selreler, 1950), ou ainda com alkyl-isocianato (Antonini et alii., 1971). Outras drogas que possam afetar a curva de equilíbrio de oxigênio como os compostos sintéticos: bis-aril hidroxí, sulfonic-ácidos, (Beddel et alii., 1979) ou ainda reagentes específicos para grupos SH (Garil et alii., 1981) não promovem deslocamentos nos picos da região visível. A Fig.1 mostra os espectros de absorção de soluções de hemoglobina em tampão tris-HCl 5×10^{-2} M pH 7,0, isentos ou tratadas pelas drogas. Como se pode visualizar não existem modificações espectrais (600 a 500 nm) causadas pela presença das drogas nas concentrações máximas em que foram utilizadas para experiências de equilíbrio.

2 - EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM O LIGANTE OXIGÊNIO

Um dos parâmetros utilizados para determinação da afinidade da hemoglobina com o ligante oxigênio é a pressão deste ligante para saturação de 50% dos sítios ligantes da hemoglobina (P_{50}). Outra estimativa que se pode obter das curvas de equilíbrio é a interação heme-heme dada pelo valor de n (coeficiente

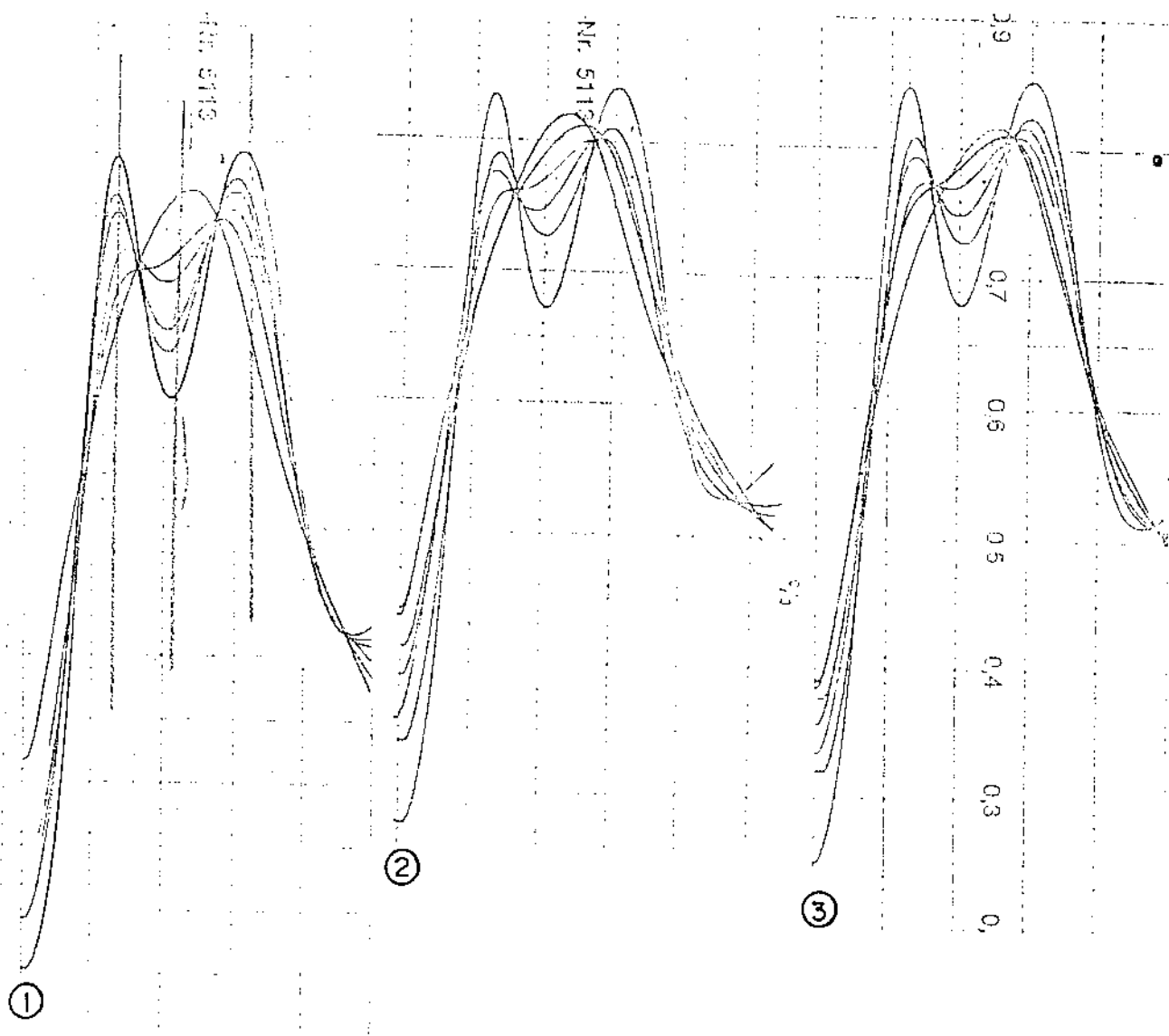


FIG.1 - Espectros de absorção de solução de hemoglobina de 600 a 500 nm, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0

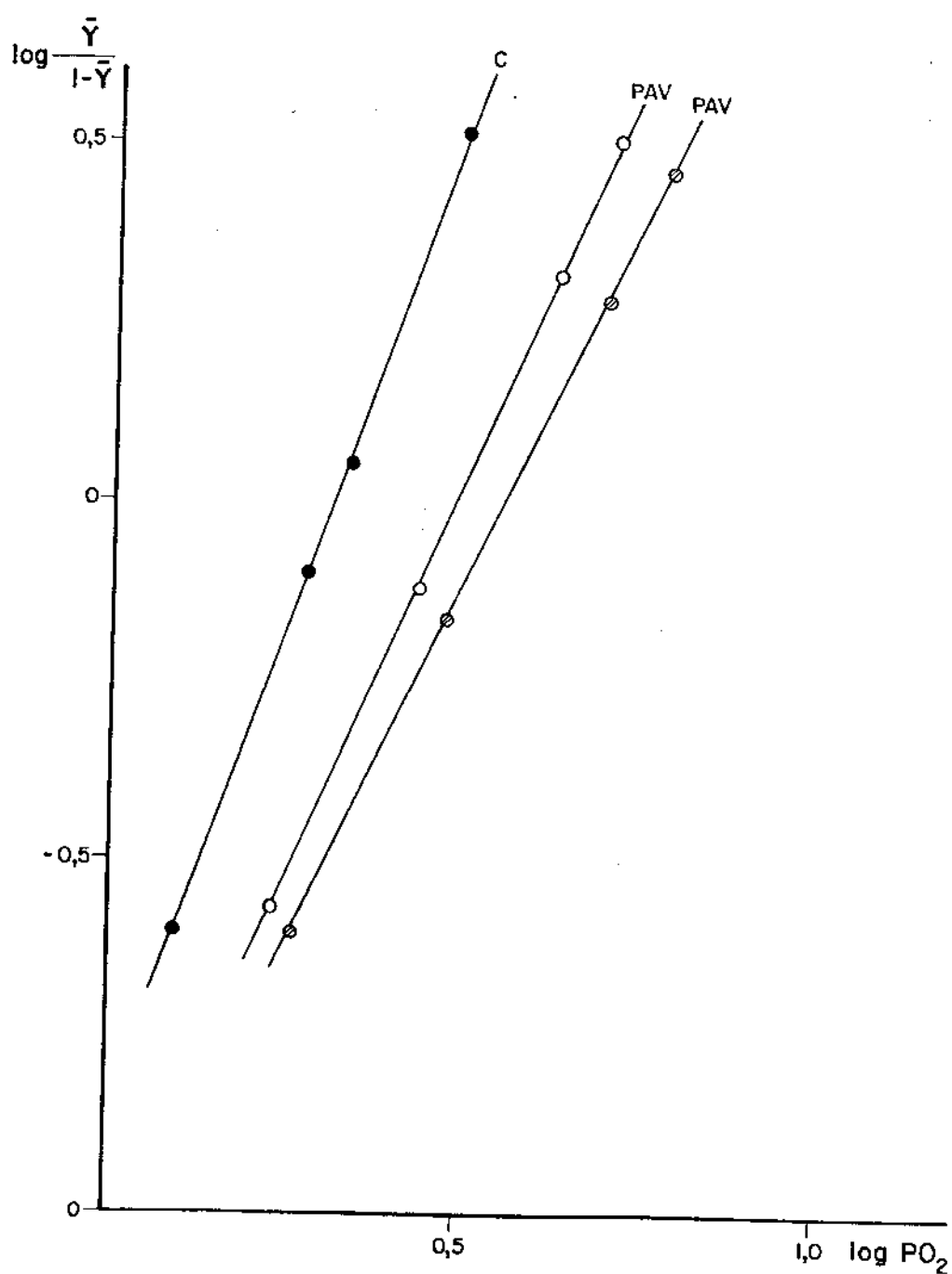
1. hemoglobina controle
2. hemoglobina tratada com PAV ($2 \times 10^{-4} \text{M}$)
3. hemoglobina tratada com Dip ($2,5 \times 10^{-4} \text{M}$)

de Hill). Para observarmos o efeito que as drogas dipiridamol, e ou papaverina pudessem ter em relação a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio procedemos às experiências de equilíbrio de oxigenação (descrito em Métodos). Estas experiências foram efetuadas em condições diferentes com relação à incubação com as drogas ou seja: 1) as hemácias foram pré tratadas e posteriormente obtinha-se hemolisado para as experiências de equilíbrio. 2) a solução de hemoglobina "stripped" era diretamente incubada com as drogas. As figuras 2 e 7 mostram curvas de equilíbrio de oxigenação. A obtenção de hemolisado a partir de doador sadio (portador de hemoglobina A) era feita por lavagem sucessiva de hemácias, hemólise "stripped" em coluna de Sephadex G25. O hemolisado "stripped" assim obtido era incubado por 15 minutos a temperatura ambiente com diferentes concentrações de papaverina, posteriormente o pH era ajustado e procedia-se ao equilíbrio de oxigenação. Como se pode notar na figura 2 há um deslocamento para a direita na curva de dissociação quando os valores encontrados para P_{50} foram 1,69 mm de Hg (controle), 3,3 mm de Hg (hemolisado tratado com PAV $4,4 \times 10^{-5}M$) e 3,6 mm de Hg (hemolisado tratado com PAV $8,7 \times 10^{-5}M$). Os valores de n se mantiveram em torno de 1,55 (controle) e 1,93 (tratados).

Na figura 3: curva de equilíbrio de oxigenação de hemolisados obtidos de hemácias previamente tratadas com papaverina por 60 minutos e $25^{\circ}C$; uma suspensão de hemácias em salina era tratada por diferentes concentrações de papaverina; $3,1 \times 10^{-4}M$ e $7,3 \times 10^{-4}M$, as hemácias eram lavadas para retirar excesso de droga e obtinha-se o hemolisado por lise em água destilada. Este hemolisado em tampão tris HCl ou bis tris lactato tinha o pH ajustado para o valor adequado e procedia-se a determinação do

FIG.2 - Plot de Hill:

- hemoglobina controle stripped
(Sephadex G₂₅)
 - hemoglobina tratada com PAV
($4,4 \times 10^{-5} \text{M}$)
 - ⊗ hemoglobina tratada com PAV
($8,7 \times 10^{-5} \text{M}$)
- em tampão tris HCl $5 \times 10^{-2} \text{M}$ pH 7,2



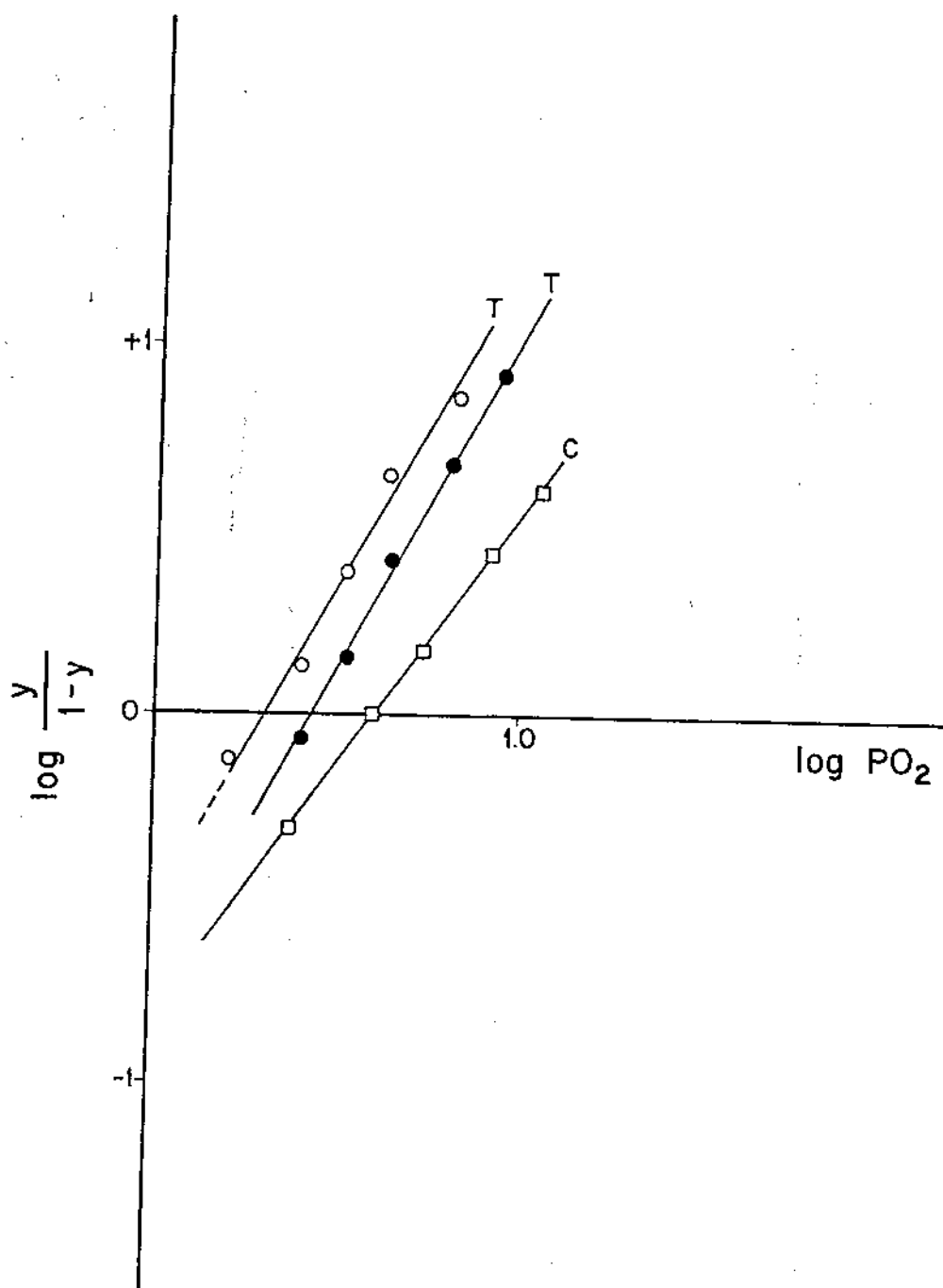


FIG.3 - Curva de equilíbrio de oxigenação de hemolisados obtidos de hemácias previamente incubadas com a droga por 60 minutos a 25°C

- hemoglobina controle
 - hemoglobina obtida a partir de suspensão de hemácias tratadas com $3,1 \times 10^{-4}$ M PAV
 - hemoglobina a partir de suspensão de hemácias tratada com $7,3 \times 10^{-4}$ M PAV
- em tampão bis tris lactato 5×10^{-2} M pH 7,3

equilíbrio. Nesta figura, podemos notar que a curva de dissociação tem um deslocamento para a esquerda quando os valores de P_{50} foram os seguintes 3,9 mm de Hg (controle), 2,5 mm de Hg (tratado com $3,1 \times 10^{-4} M$) e 1,9 mm de Hg (tratado com $7,3 \times 10^{-4} M$). Os valores de n 1,45 (controle) e 1,65 (tratados).

Com a finalidade de avaliarmos o efeito de papaveína em hemolisados obtidos a partir de portadores homozigotos de hemoglobina S; estudamos o efeito de diferentes concentrações de PAV e de 2,3-DPG (1 mM) em hemolisados "stripped" em Sephadex G25. A figura 4 indica um gráfico de Hill para hemolisados SS "stripped" em Sephadex G25 incubados com PAV $8,8 \times 10^{-4} M$, $1,6 \times 10^{-3} M$ e $2,2 \times 10^{-3} M$ por 15 minutos e 2,3-DPG (1 mM); em tampão bis tris lactato $5 \times 10^{-2} M$, pH 7,0. Os valores encontrados foram os seguintes: para P_{50} 2,23 mm de Hg (hemolisado controle) 5,62 (T_1); 6,16 (T_2); 7,2 (T_3) e 11,4 mm de Hg (para o hemolisado incubado com a 2,3 DPG). Os valores de n , todavia foram de ordem de 0,97 a 0,92.

Para nos certificarmos se havia ou não um efeito do dipiridamol sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, efetuamos experiências de equilíbrio de oxigênio com hemolisados provenientes de hemácias pré tratadas com Dip, em hemolisados incubados diretamente com a droga por tempo determinado, a diferentes concentrações da mesma.

As figuras 5 a 7 expressam os resultados obtidos. Na fig.5: Uma suspensão de hemácias (em salina) foi incubada com diferentes concentrações de Dip : $9 \times 10^{-5} M$, $1,8 \times 10^{-4} M$, $3,6 \times 10^{-4} M$ por 30 minutos a $25^{\circ}C$. Para a mesma suspensão havia um controle. Após lavar as hemácias com NaCl 0,15 M para retirar excesso de droga, obtínhamos a solução de hemoglobina por hemólise em água

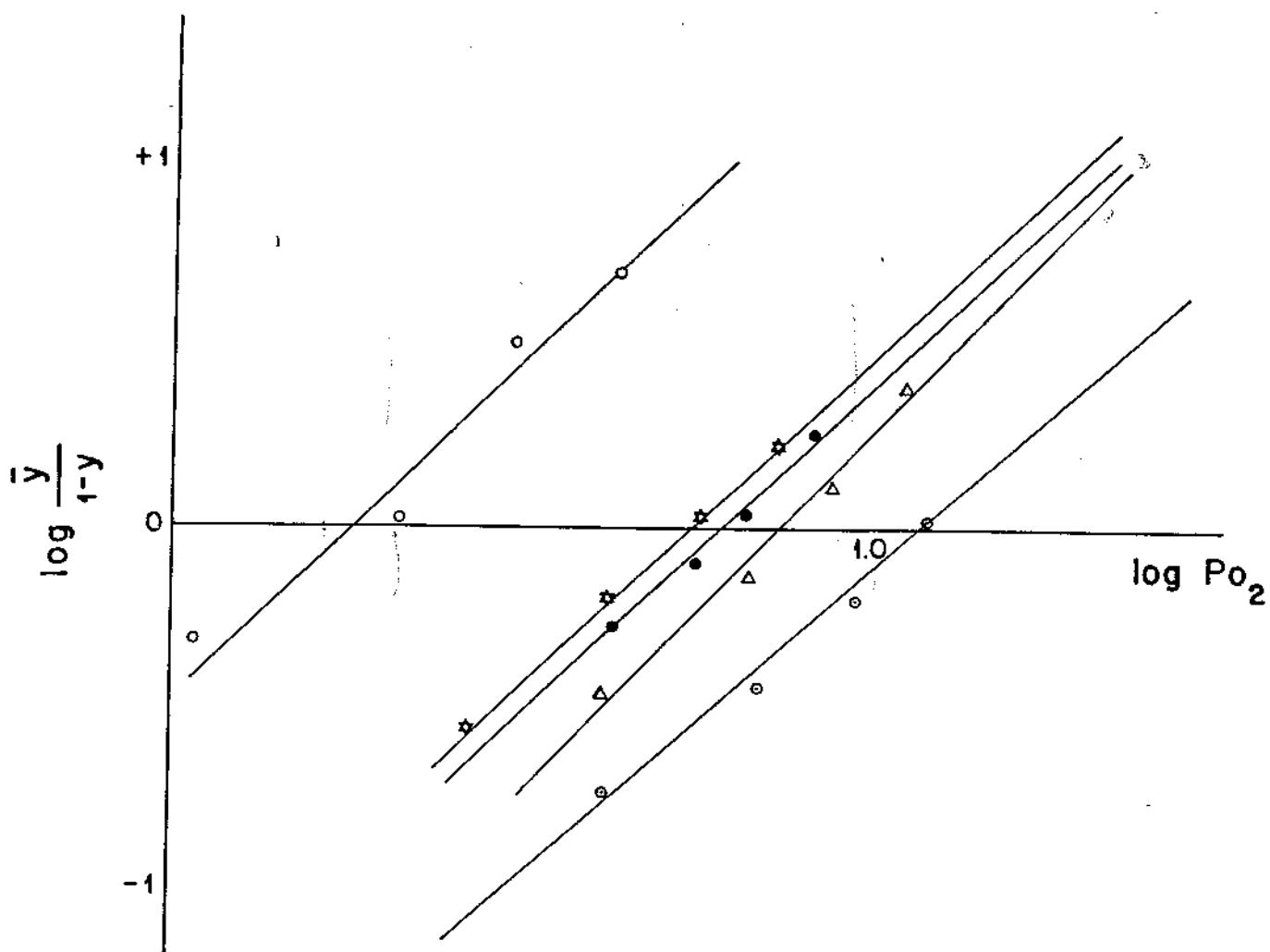


FIG.4 - Curvas de dissociação de hemoglobina S com o ligante oxigênio

- controle stripped
- ☆ ● △ tratada com diferentes concentrações de PAV
- tratada por 2,3-DPG (1 mM)
- em tampão bis-tris $5 \times 10^{-2} M$ pH 7,2

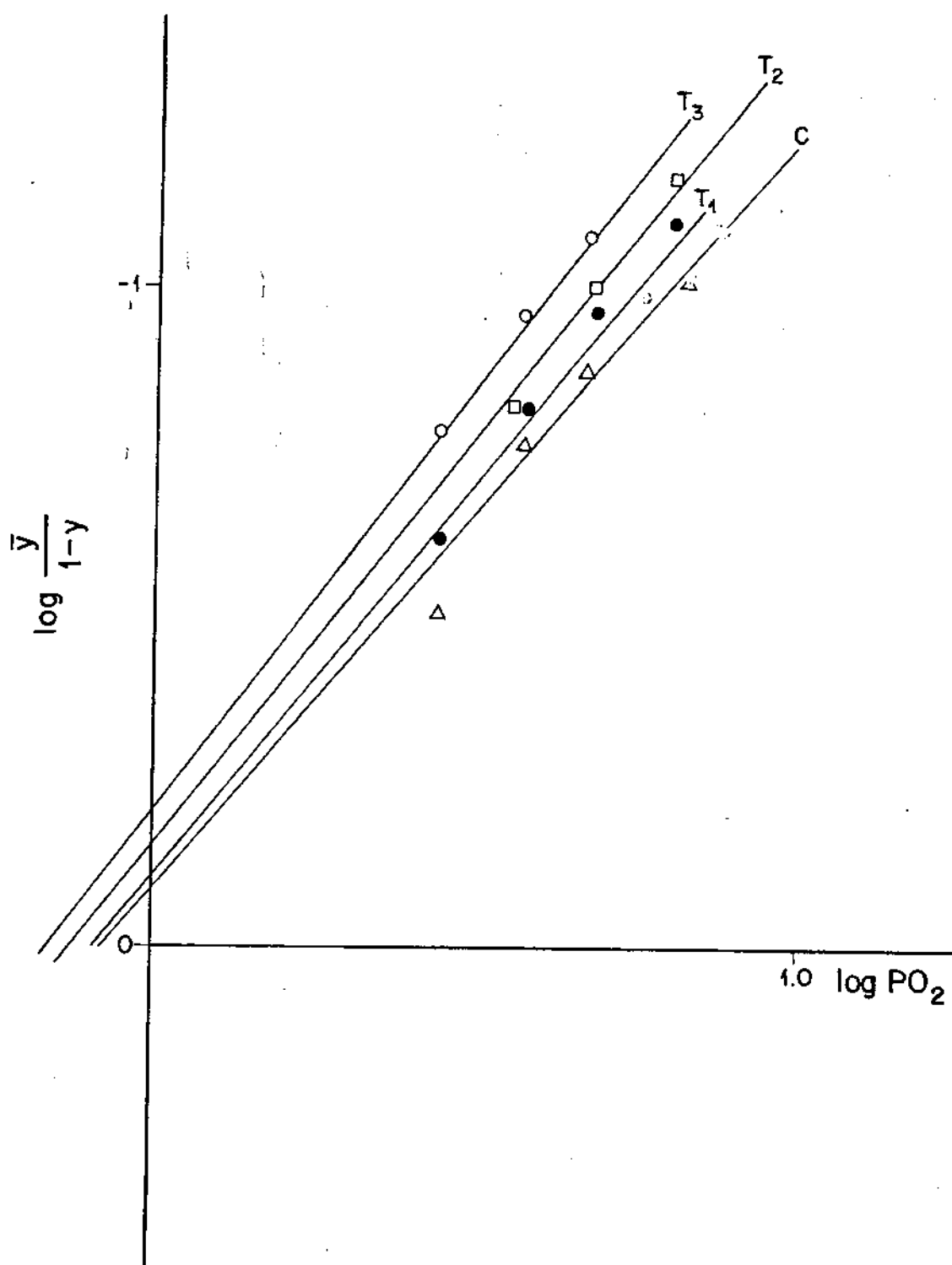


FIG.5 - Gráfico de Hill, para hemoglobina humana obtida a partir de suspensão de hemácias tratadas com diferentes concentrações de Dip a 37°C por 30 minutos.

Concentração de hemoglobina: $3 \times 10^{-5} M$

Δ C = controle

● T₁ = hemoglobina tratada com Dip $9 \times 10^{-5} M$

□ T₂ = hemoglobina tratada com Dip $1,8 \times 10^{-4} M$

○ T₃ = hemoglobina tratada com Dip $3,6 \times 10^{-4} M$

em tampão Bis Tris lactato $5 \times 10^{-2} M$ pH 7,2

destilada. O pH do hemolisado era ajustado e a curva de dissociação era obtida. Os valores encontrados para P_{50} foram: 0,77 mm Hg (controle); 0,75 mm de Hg (T_1); 0,70 mm de Hg (T_2) e 0,67 mm Hg (T_3). Os valores de $\bar{n}$ foram de 1,7 a 1,2 (para os hemolisados tratados).

Na figura 6 observamos que quando o hemolisado era tratado com diferentes concentrações de Dip ($4,4 \times 10^{-5} M$ e $1,5 \times 10^{-4} M$) havia um deslocamento para a direita da curva de afinidade sendo o log de P_{50} : 0,45 (controle), 0,56 (T_1) e 0,62 (T_2) os valores de $\bar{n}$ encontrados foram de 2,2.

Para a hemoglobina "stripped" em Sephadex G25, e tratada com Dip $2 \times 10^{-5} M$ e $4 \times 10^{-5} M$, podemos verificar pela figura 7 um desvio também para a direita, com diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio que é expressa pelos valores de P_{50} de 1,9 mm de Hg a 6,3 mm de Hg. Os valores de $\bar{n}$ encontrados foram menores que 1, tanto para o controle como para os tratados.

3 - TITULAÇÃO DE GLOBINA PURIFICADA, COM HEMINA

A reconstituição da hemoglobina na forma férrica pode ser obtida pela titulação estequiométrica de globina com hemina (Antonini et alii., 1963). O ponto final de equivalência corresponde a 4 hemes por 64000 g de proteína, independentemente de ser meso, deutério, cloro ou hematohemoglobina.

As figuras 8 e 9 mostram curvas de titulação de globina purificada tratada por Dip ou PAV com hemina.

Quando a globina ($8 \times 10^{-3} M$) foi incubada com papa-verina ($6 \times 10^{-4} M$) por 15 minutos a temperatura de $4^\circ C$ e poste-

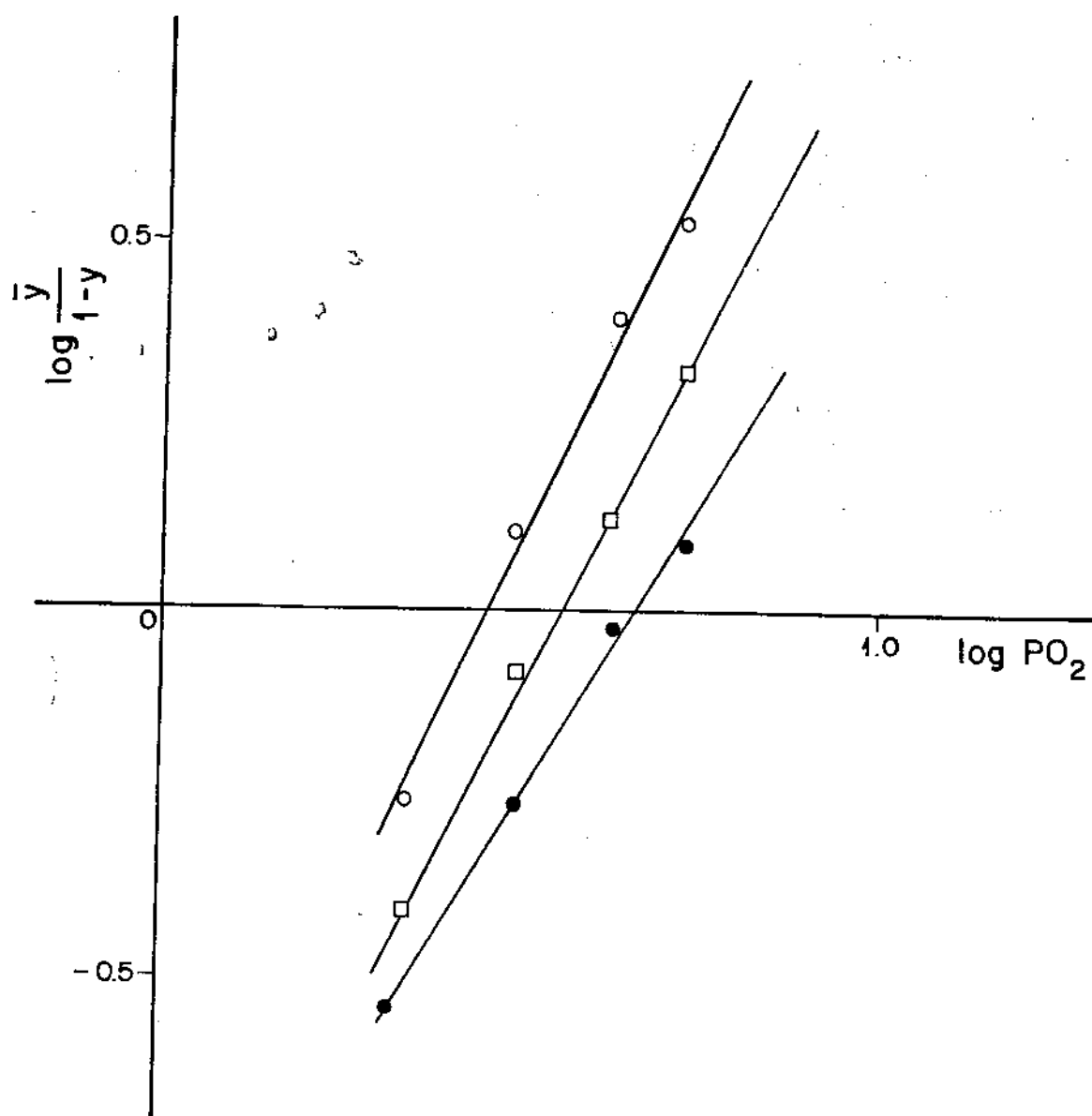


FIG.6 - Curva de saturação de hemoglobina em função do ligante oxigênio

- Hemolizado total
 - Hemolizado tratado com Dip ($4,4 \times 10^{-5} M$)
 - Hemolizado tratado com Dip ($1,5 \times 10^{-4} M$)
- Tampão bis tris HCl $5 \times 10^{-2} M$ pH 7,0

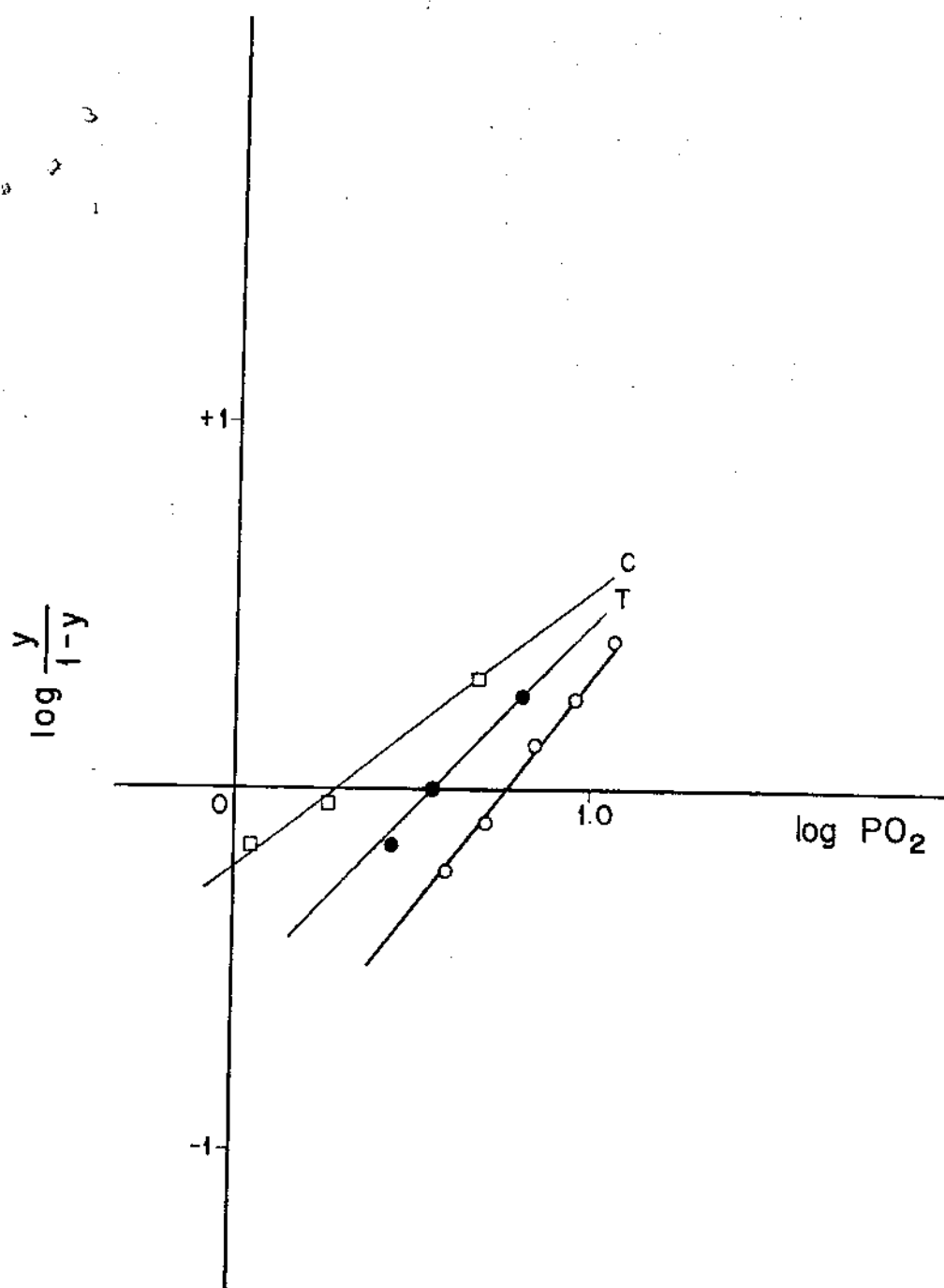


FIG.7 - Gráfico do equilíbrio de dissociação da hemoglobina com o oxigênio.

- Hemoglobina stripped (Sephadex G25)
 - Hemoglobina tratada com Dip ($2 \times 10^{-5} M$)
 - Hemoglobina tratada com Dip ($4 \times 10^{-5} M$)
- em tampão tris HCl $5 \times 10^{-2} M$ pH 7,0

riormente foi titulada com hemina, houve um deslocamento do ponto final de titulação, quando o número de equivalentes de hemina foi reduzido de 4 para 2. Entretanto, o tratamento de globina ($2,5 \times 10^{-5}M$) com dipiridamol ($1 \times 10^{-4}M$) mostrou o mesmo ponto final de equivalência do que o da globina sem tratamento com a droga.

4 - TITULAÇÃO ALCALINA DE METAHEMOGLOBINA

A observação de que a hemoglobina anormal Kansas em condições especiais em sua forma férrica apresentava uma mistura de espécies desta forma uma de baixo spin e outra de alto spin mesmo na ausência de inositol hexafosfato (Peisach, 1975) detectável por titulação alcalina possibilita a utilização desta metodologia para identificação de diferentes espécies moleculares da forma férrica.

Na figura 10 temos dois espectros de titulação alcalina de hemoglobina férrica (uma controle) e outra tratada com papaverina ($6 \times 10^{-4}M$). Em ambos os casos detecta-se a isosbesticidade no decorrer da titulação não havendo portanto formação de novas espécies moleculares de forma férrica mesmo em presença de droga.

A tabela 1 analisa as variações de absorbância a 550 nm em função da variação de pH.

5 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA

A observação de que hemolisados tratados por Dip (nas concentrações utilizadas nas experiências de equilíbrio)

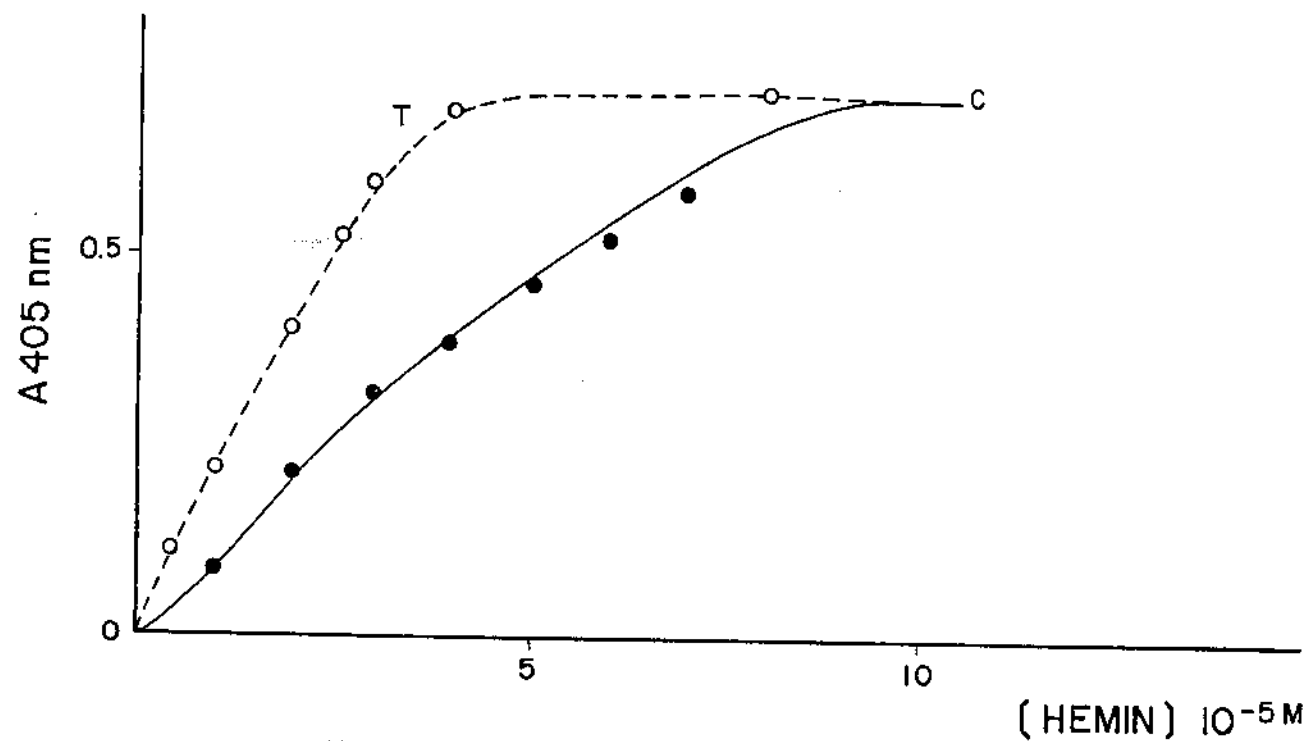


FIG.8 - Titulação de globina purificada em meio ácido, com cloro-hemina, em tampão
fósfato 0,1 M pH 7,0

- Globina controle ($8 \times 10^{-5} M$)
- Globina previamente tratada com PAV ($6 \times 10^{-4} M$)

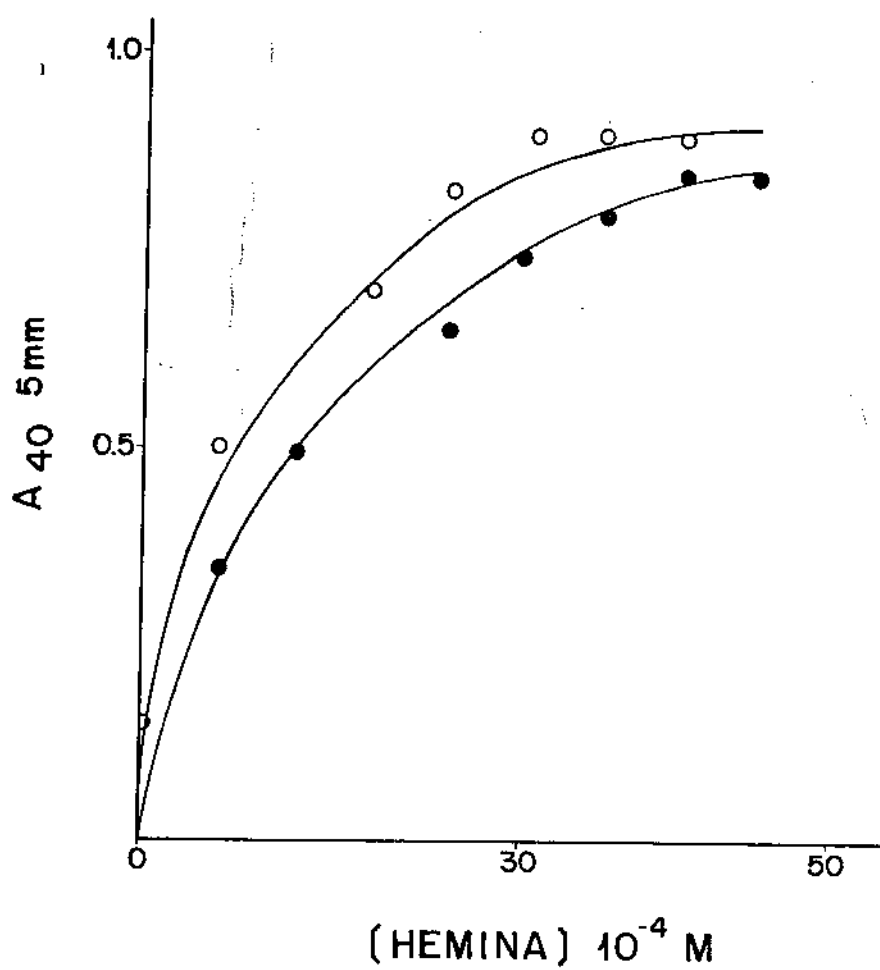


FIG.9 ~ Titulação de globina com hemina

● globina ($2,5 \times 10^{-5}$ M)

O globina tratada com Dip (1×10^{-4} M)

em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0

após tempos superiores a 5 horas apresentavam características espectrais de metahemoglobina, nos levou a determinação desta cinética, utilizando concentrações de dipiridamol maiores que as utilizadas para as experiências de equilíbrio.

Assim, na figura 11, temos espectros de absorção de hemolisado tratado por dipiridamol ($0,9 \times 10^{-3}M$) em diferentes tempos. As constantes cinéticas para a formação de metahemoglobina foram $\log K = 0,0013$ (para o hemolisado tratado) e $\log K = 0,0007$ (para o controle).

6 - SISTEMA DE METAREDUCTASE

Modificações químicas de cadeias laterais da hemoglobina, por reagentes específicos como o 2 metoxi-nitropone, ou ainda modificações de grupos sulfidrilas por formação de dissulfetos mistos na posição $\beta 93$ podem ocasionar modificações funcionais quanto à afinidade da hemoglobina modificada e alteração de algumas propriedades inerentes à hemácia como a do sistema de metaredutase. Torna-se de importância testar portanto a eficiência deste sistema com hemácias submetidas a tratamento com drogas. Na figura 12 podemos observar que hemácias tendo como substrato glicose ou lactato (produtores de equivalentes de redução: NADPH ou NADH onde foi adicionado o receptor artificial de elétrons azul de metileno são capazes de reverter ou reduzir a metahemoglobina formada pelo tratamento com nitrito de sódio.

A velocidade de redução e mesmo a taxa de metahemoglobina reduzida a oxihemoglobina se encontra alterada em hemácias tratadas por papaverina em ambos os casos (lactato ou glicose). A taxa de redução para hemácias tratadas tendo como subs-

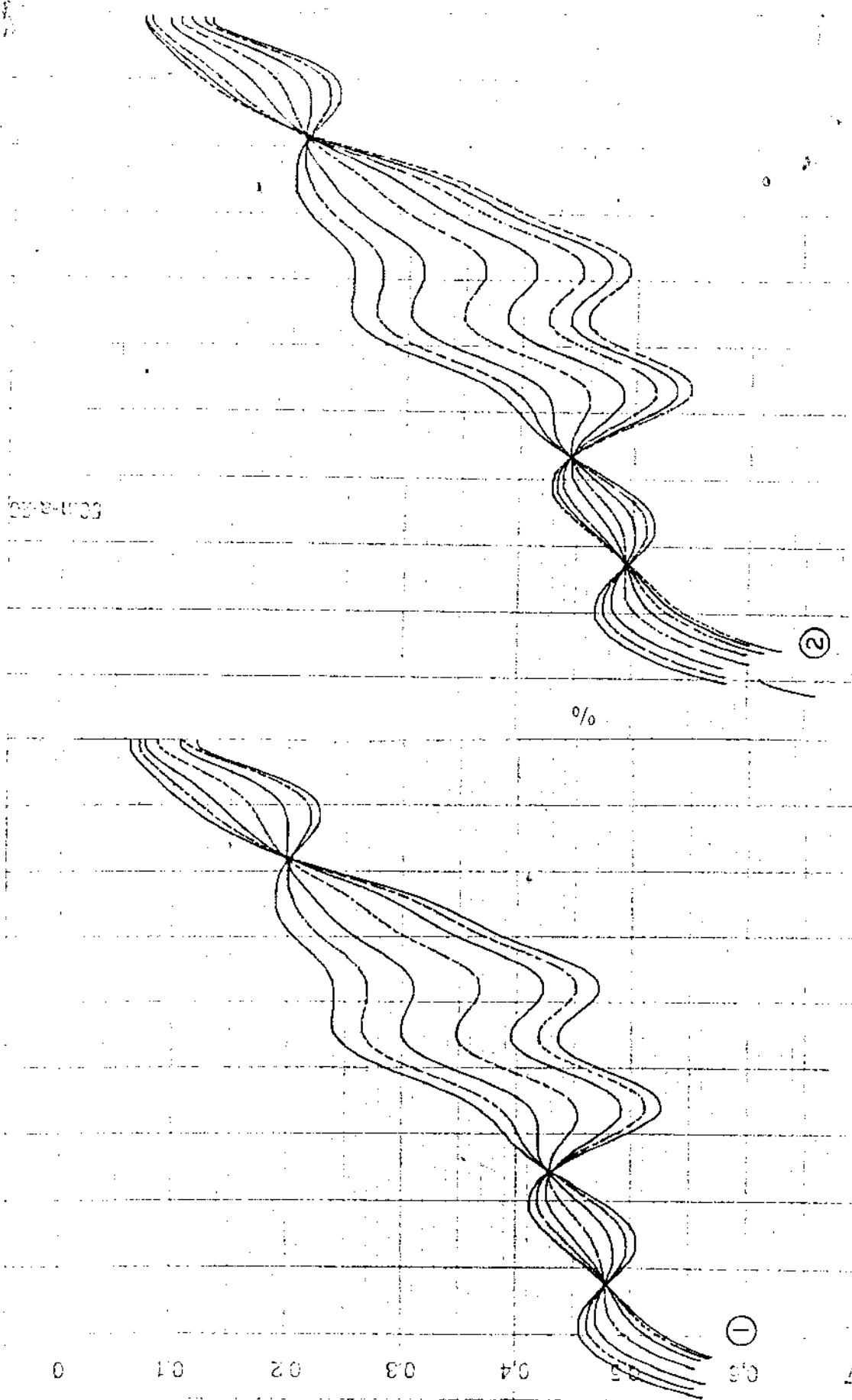


FIG.10 - Titulação alcalina de metahemoglobina

1) na ausência de droga

2) na presença de PAV ($6 \times 10^{-4}M$)

TABELA 1

Análise da titulação de hemoglobina férrica em 550 nm		
Volume (µl) (NaOH 0,1M)	A _{550 nm}	pH
0	0,37	7,0
5	0,39	7,3
10	0,42	7,7
15	0,47	8,0
20	0,52	8,3
25	0,54	8,6
30	0,56	8,9

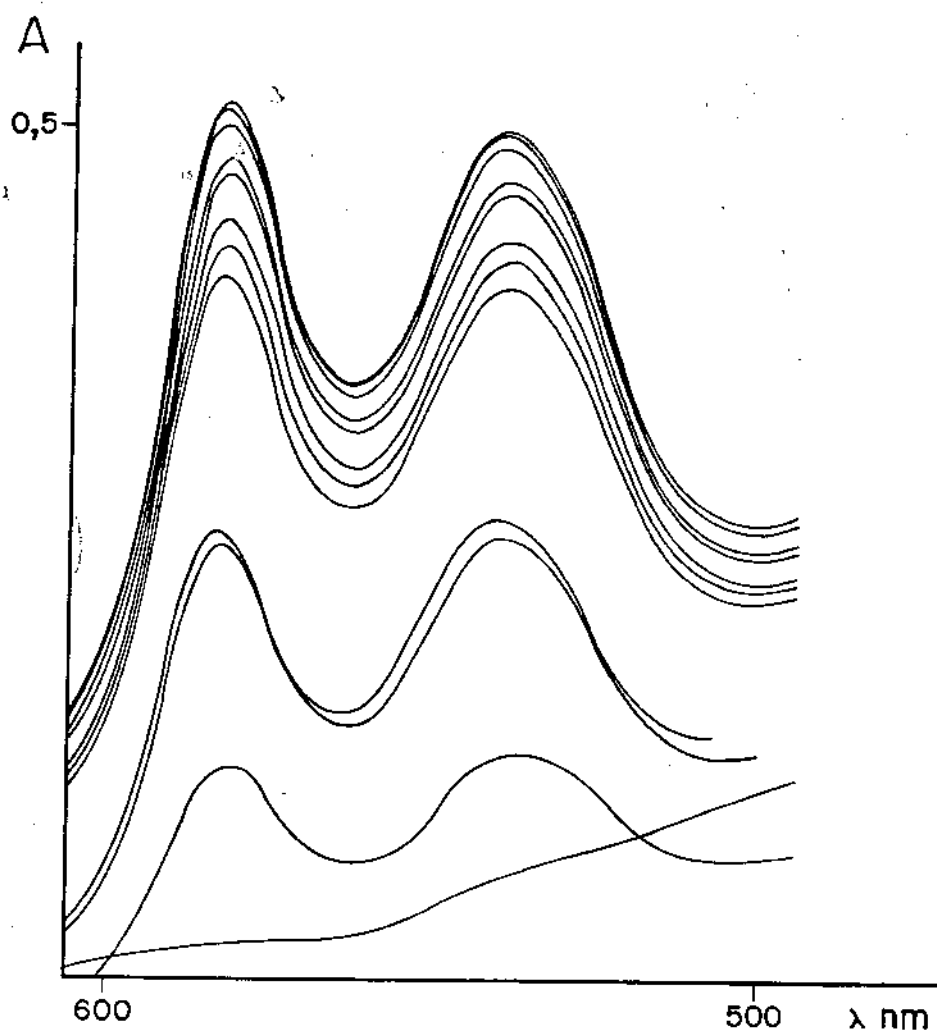


FIG.11 - Espectros de absorção de hemoglobina tratada com dipi-
ridamol $5 \times 10^{-4} M$ em função do tempo.
zero, 5, 15, 30, 45, 60, 80, 120 minutos
17 e 24 horas

A curva inferior se refere ao hemolisado tratado por
ferricianeto de potássio.

trato glicose foi $0,003 \text{ min}^{-1}$ ($p < 0,001$) enquanto que para o controle $0,009 \text{ min}^{-1}$ e quando o substrato foi lactato este valor foi $0,001 \text{ min}^{-1}$ para o tratado, e $0,002 \text{ min}^{-1}$ para o controle.

Para avaliarmos se esta inibição do sistema de redutase se processava em função da inibição da enzima NADH diaphorase ou pela insuficiência na produção de equivalentes reduzidos, por exemplo, pela inibição da entrada de substrato glicose ou lactato na hemácia procedemos ao mesmo experimento de eficiência do sistema nos utilizando de fluoridizina (1 mM) inibidor específico para a entrada de glicose.

Pela figura 13 podemos notar que tanto fluoridizina quanto papaverina se comportam de forma semelhante, quando se varia a concentração de glicose, a taxa de inibição em presença de fluoridizina foi de 67%. Entretanto quando se testa o hemolisado a atividade de NADH diaphorase I, pela adição de equivalentes reduzidos, os valores encontrados para a taxa de redução foram os mesmos para o controle e tratado ou seja, $r = 0,015 \text{ min}^{-1}$.

Em outro aspecto relativo a hemácia foi feita uma estimativa da permeabilidade da papaverina, utilizando-se a propriedade espectral da droga.

A figura 14 registra a porcentagem de captação em função da concentração da droga ensaiada.

7 - CAPTAÇÃO DE 1 ANILINO 8 NAPTALENO-SULFONATO

A utilização de corantes aniônicos, por exemplo, o 1 anilino 8 naptaleno-sulfonato como sondas de fluorescência permite o estudo de alterações a nível de membranas das hemácias em suas regiões hidrofóbicas (Rubacalva et alii., 1969).

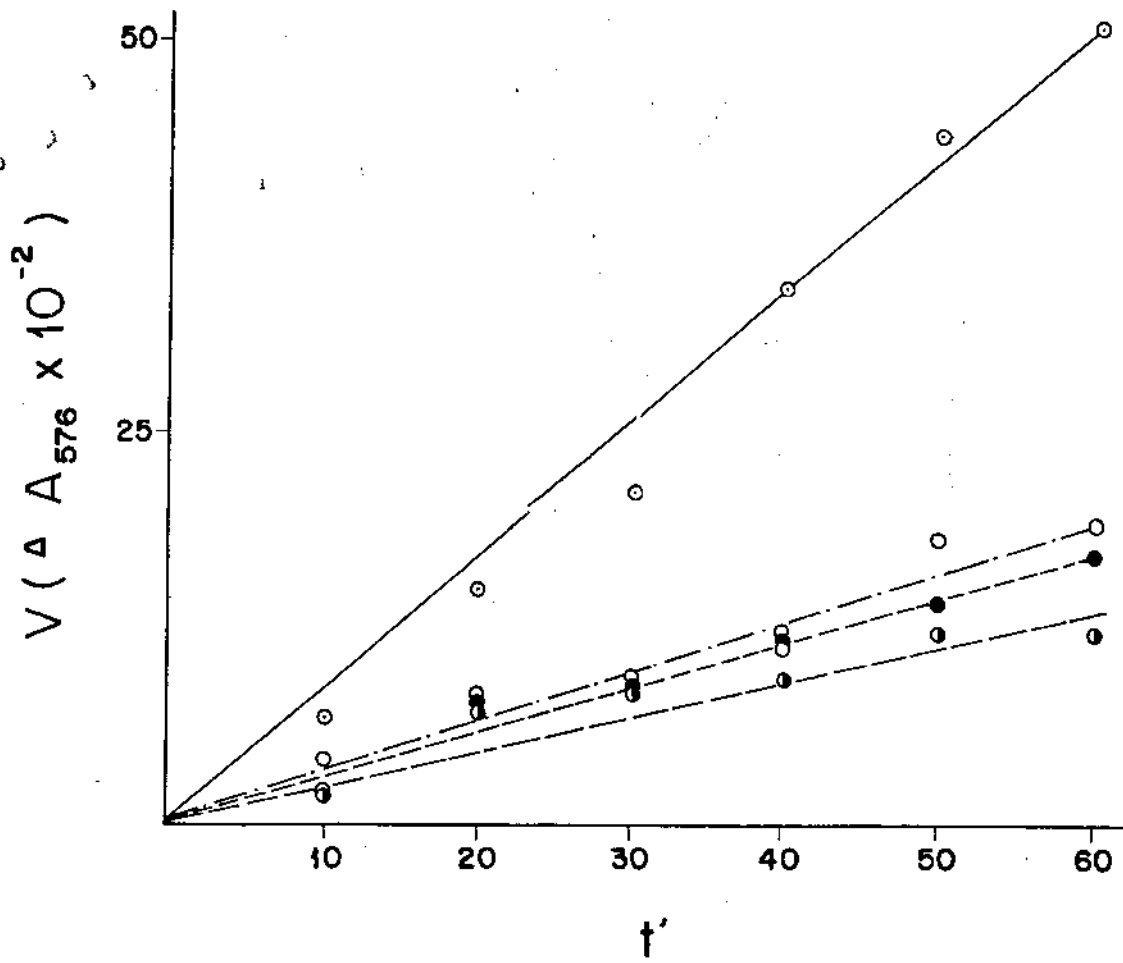


FIG.12 - Redução de metahemoglobina em função do tempo.

- Controle (substrato glicose)
- Hemácias tratadas com PAV (glicose)
- Controle (substrato lactato)
- Hemácias tratadas com PAV (lactato)

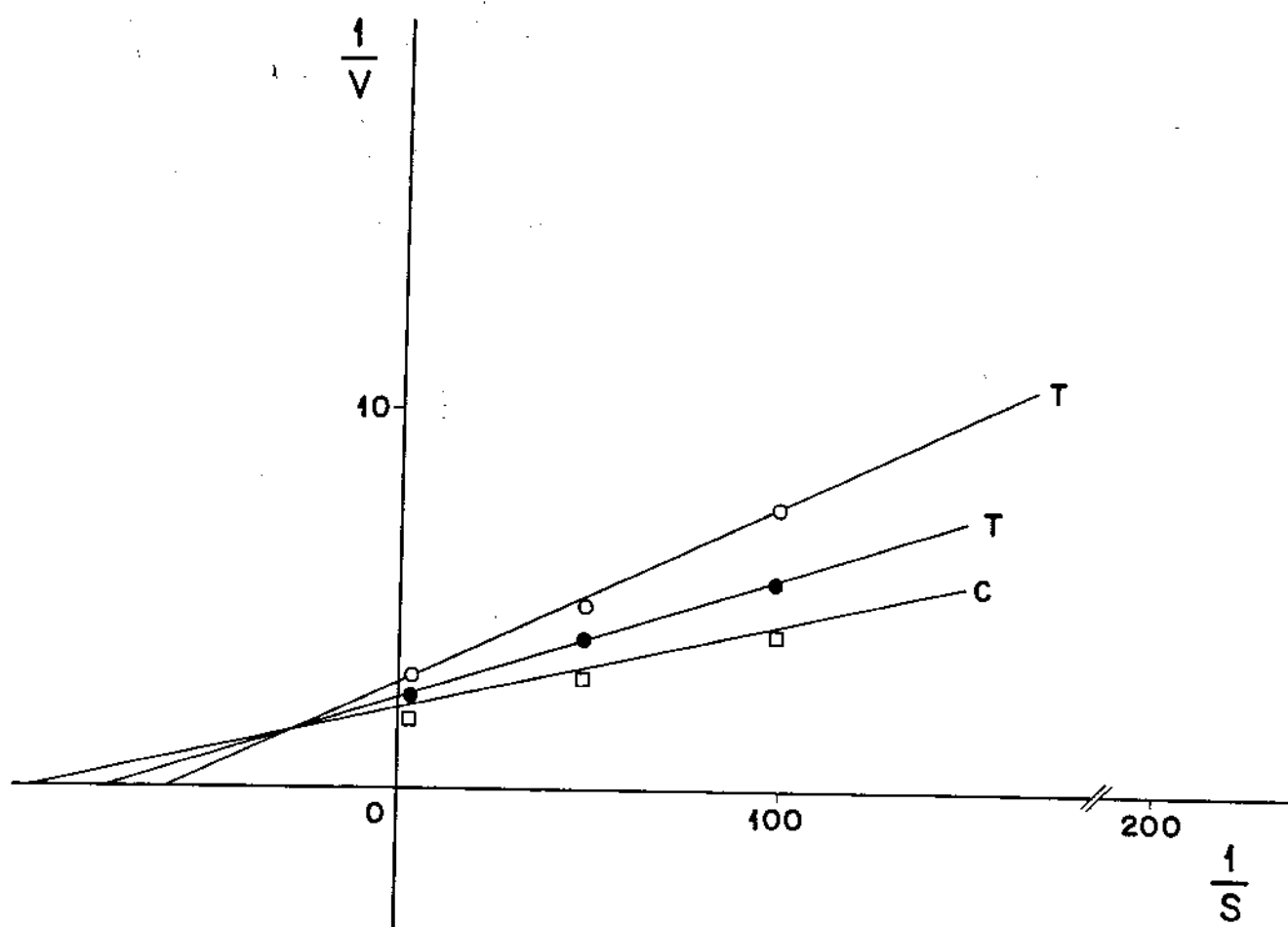


FIG.13 - Velocidade de redução de metahemoglobina em função da variação de substrato (glicose).

□ Controle

● Hemácias tratadas com PAV

○ Hemácias tratadas com fluoridizina

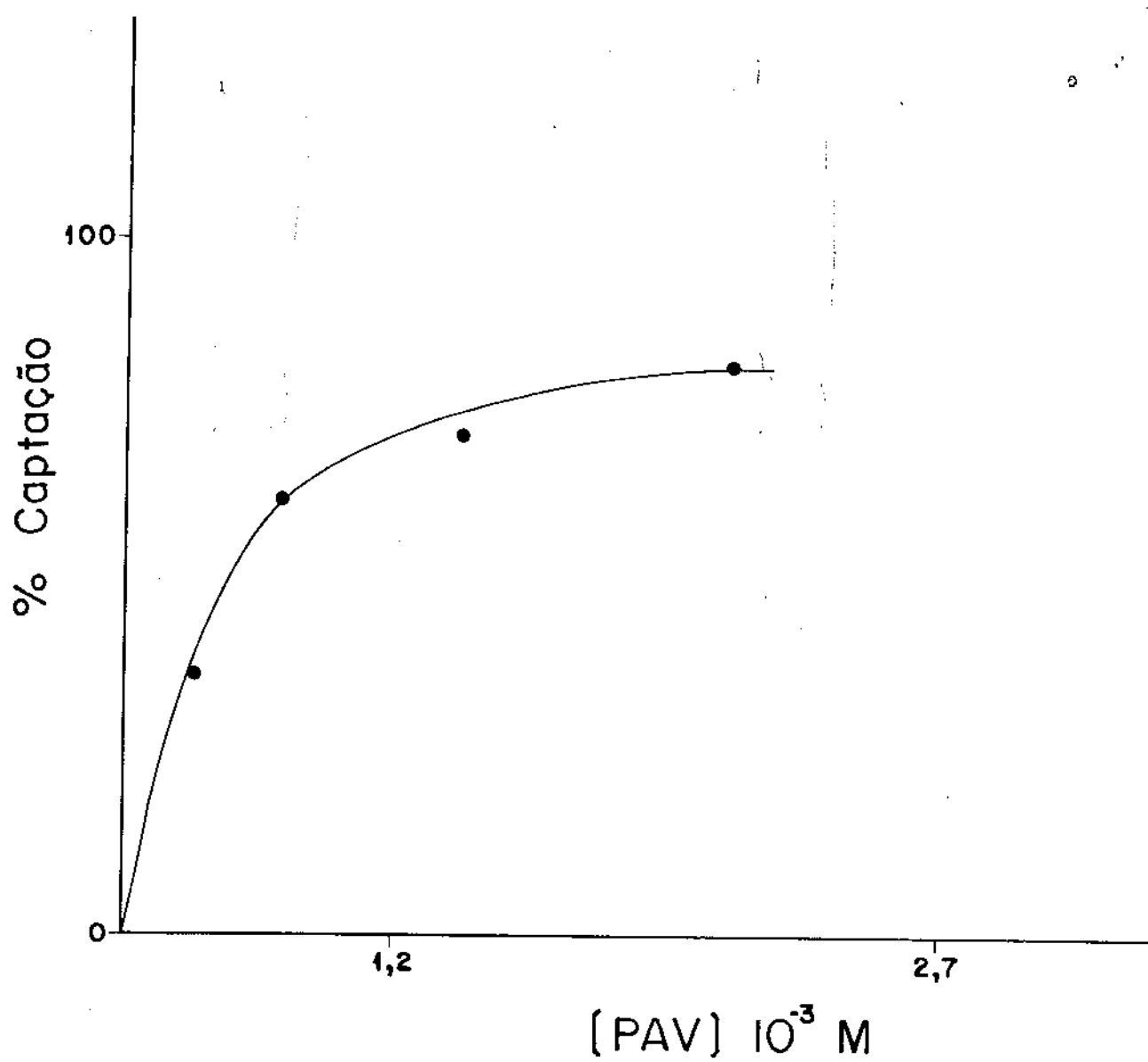


FIG.14 - Curva de captação de papaverina por suspensão de hemácias.

A figura 15 mostra os resultados obtidos para captação de ANS por hemácias controle, e tratadas com papaverina. Existe um acréscimo na captação com referência às duas fases : inicial e final. O aumento da permeabilidade ao ANS, foi analisado posteriormente em função da concentração de droga utilizada.

8 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Tem sido evidenciado que vários agentes como anestésicos, tranquilizantes e anti-inflamatórios não esteróides induzem modificações nos eritrócitos na dependência de suas concentrações (Seeman, 1972). Sabe-se ainda que modificações de intensidade de fluorescência de marcadores como o ANS, guardam uma relação com a atividade hemolítica destas drogas.

A atividade hemolítica do dipiridamol e da papaverina é demonstrada na figura 16, quando se verifica a diferença em relação ao máximo de efeito para diferentes concentrações destes agentes.

Um outro sistema de avaliação de modificações não drásticas como a hemólise pode ser observado nas figuras 17 e 18 quando através de medidas do índice de turbidez podemos avaliar o grau de turgescência, ou aumento de volume das hemácias tratadas.

9 - RESISTÊNCIA OSMÓTICA

Os resultados da figura 19 demonstram que hemácias pré tratadas com concentrações de papaverina 2,5 mM induzem a hemólise não só em condições isotônicas como aumentam a fragilidade osmótica a partir de soluções de NaCl 0,6%.

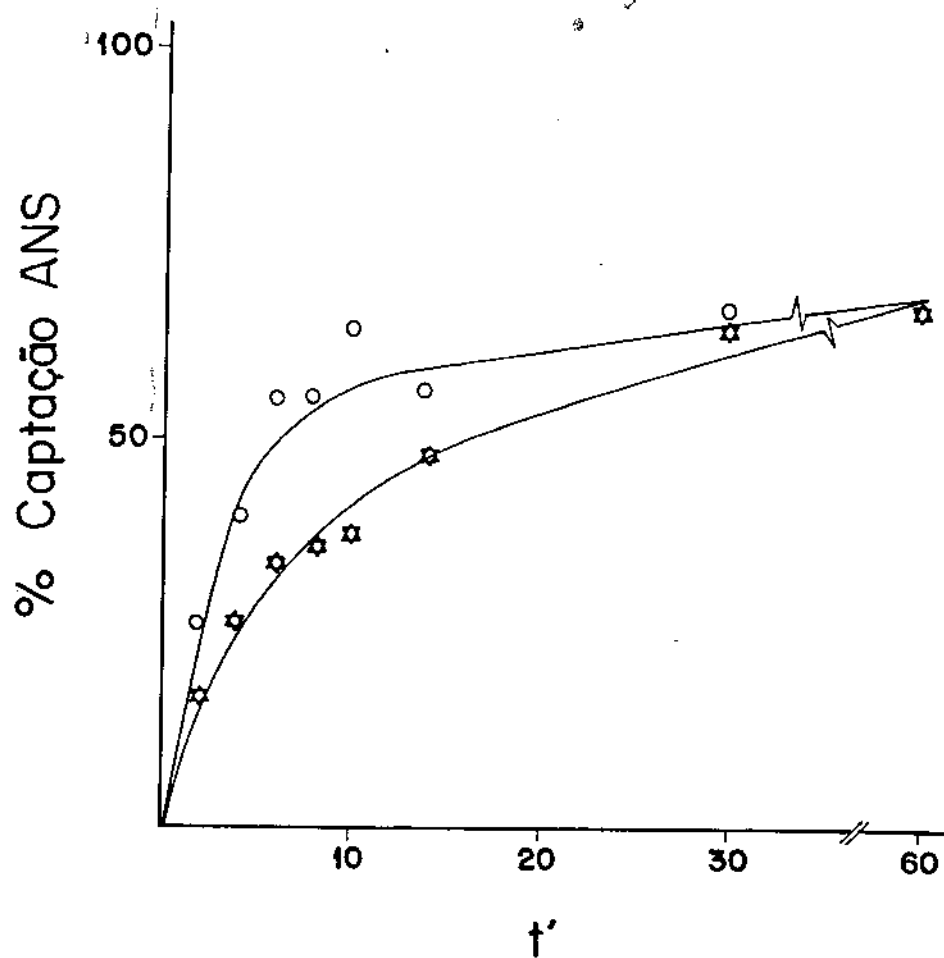


FIG.15 - Curva de captação de 1,8 ANS por hemácias.

☆ Controle

○ Tratadas com PAV, em função do tempo

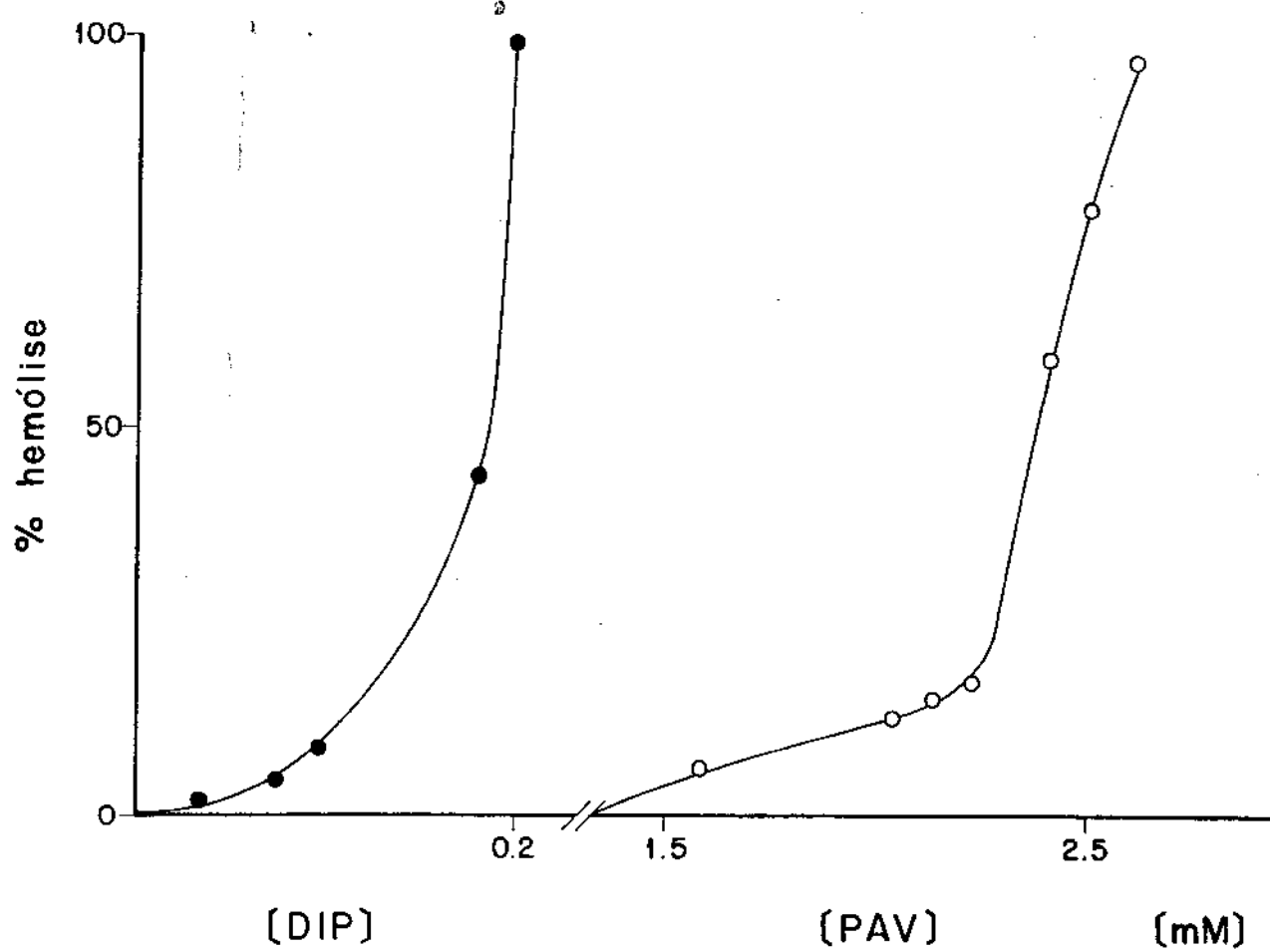


FIG.16 - Curvas de hemólise em função da variação de dose de PAV e de Dip.

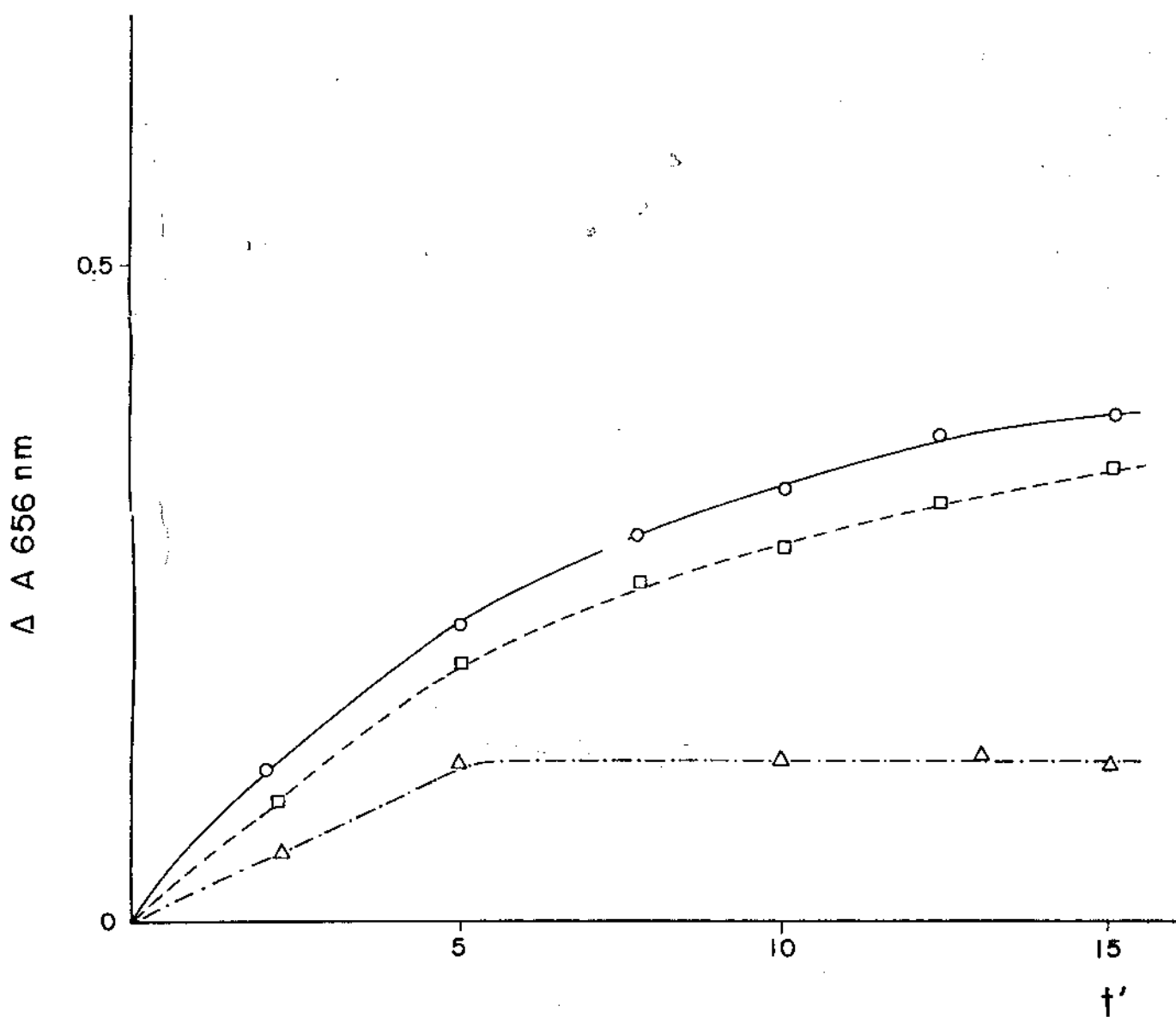


FIG.17 - Avaliação de turgescência de hemácias suspensas em salina.

Δ Controle
 $\square$ $\circ$ Tratadas com diferentes concentrações de papaverina

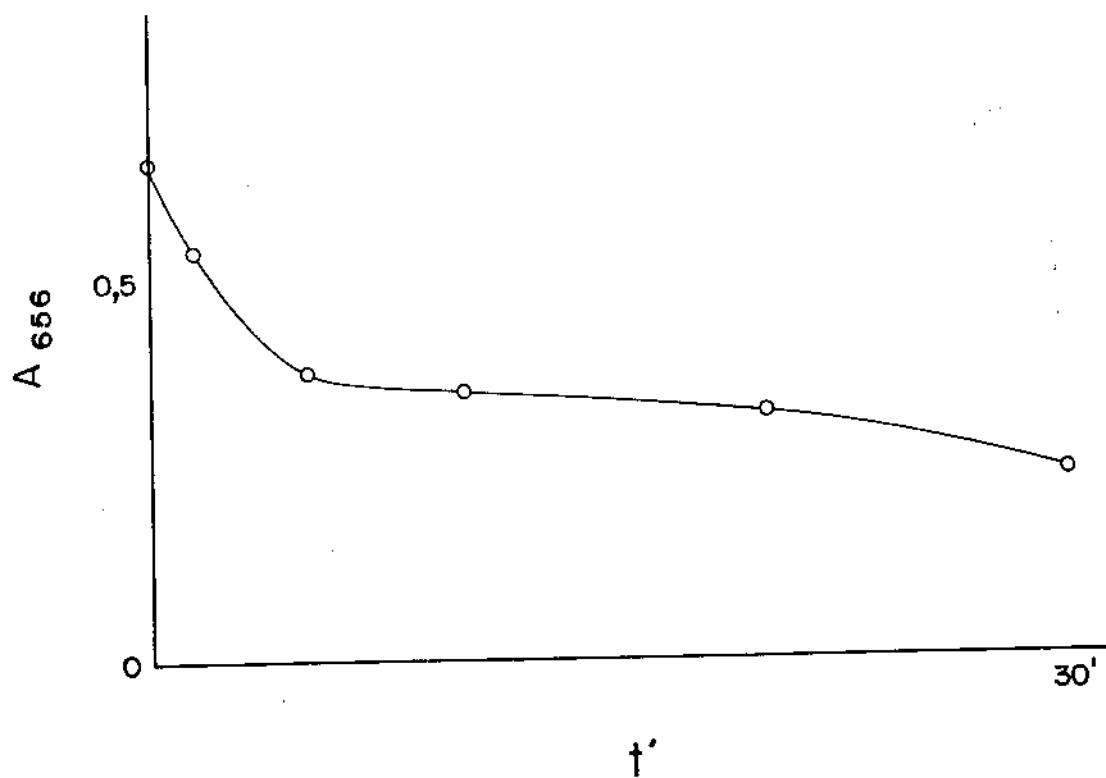


FIG. 18 - Avaliação da turgescência das hemácias tratadas por dipiridamol.

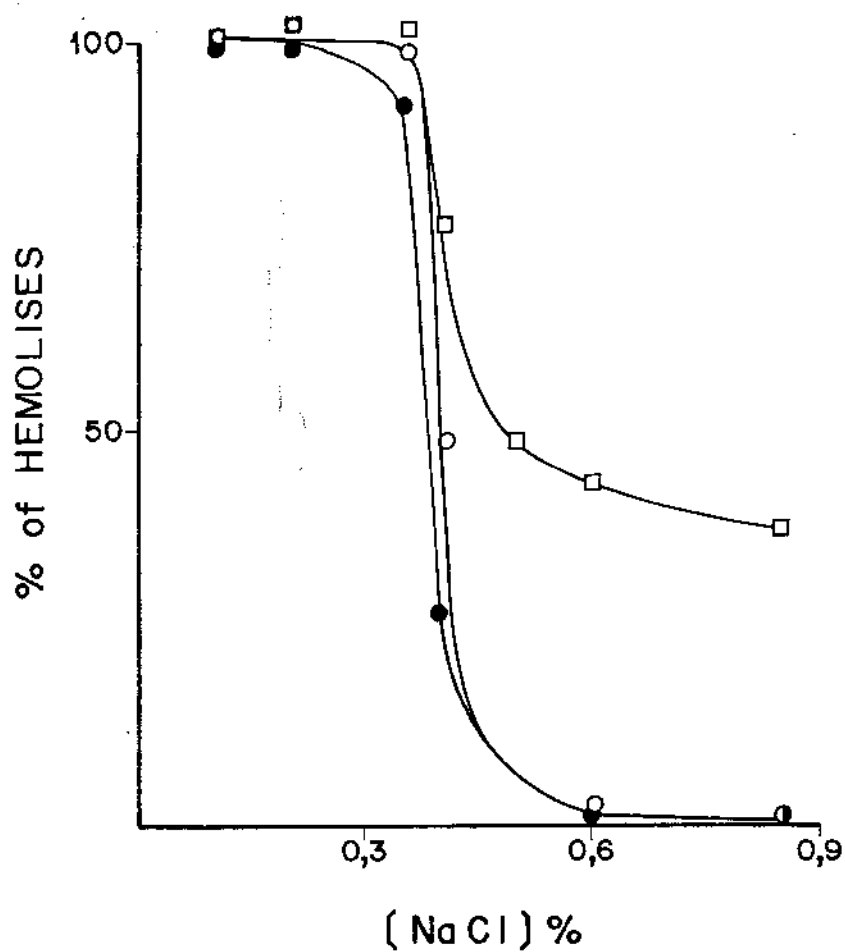


FIG.19 - Curva de fragilidade osmótica

● Hemácias controle

○ Hemácias tratadas com PAV $2 \times 10^{-3} M$

□ Hemácias tratadas com PAV $0,8 \times 10^{-3} M$

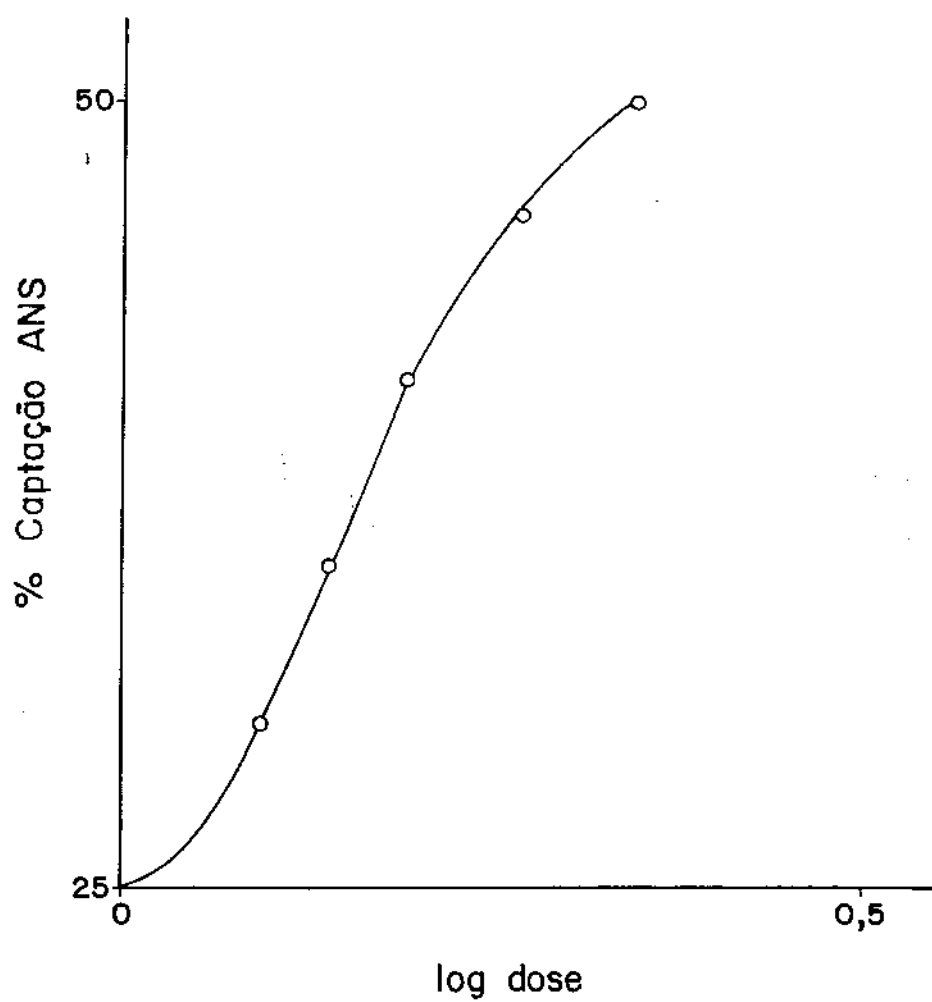


FIG.20 - Curva de captação de 1,8 ANS por hemácias em função da concentração de PAV.

Para concentrações de papaverina de 1 mM o comportamento é semelhante ao controle. Dentro desta característica de modificação de permeabilidade ou aumento da fragilidade os resultados da figura 20 demonstram a correlação entre a atividade hemolítica e permeabilidade ao composto 1 anilino 8 naftaleno sulfonato.

10 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

A figura 21 mostra as alterações da forma das hemácias, quando incubadas com papaverina 2,8 mM a diferentes tempos. As modificações ocorrentes foram visualizadas em microscopia de fase e a alteração de volume ocasionada pode ser vista conforme a tabela 2.

11 - CONCENTRAÇÃO DE FOSFATOS INTRA-ERITROCITÁRIA

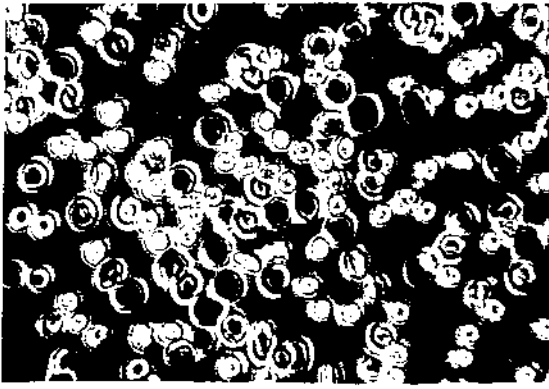
A determinação de conteúdo de 2,3-DPG e de ATP em suspensão de hemácias tratadas pelas drogas, foi feita por método enzimático. As concentrações encontradas em ambos os casos estão na tabela 3.

12 - UTILIZAÇÃO DE RADICAIS NITRÓXIDO PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES EM MEMBRANAS DE HEMÁCIAS

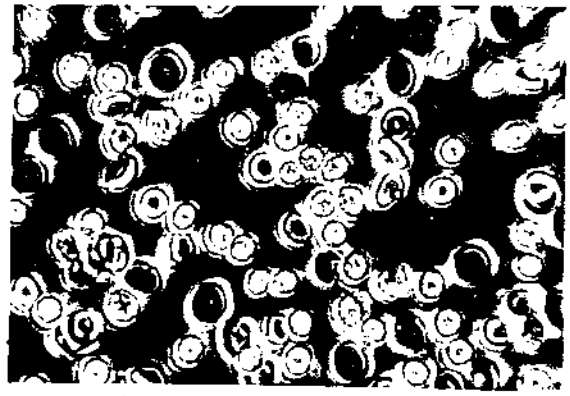
O método de marcadores de spin tem sido aplicado para detecção de alterações de membranas e mesmo para mostrar mudanças de conformação de proteínas constituintes da mesma.

A estrutura do marcador lipídico utilizado $I_{5,10}$ é mostrado na figura 22.

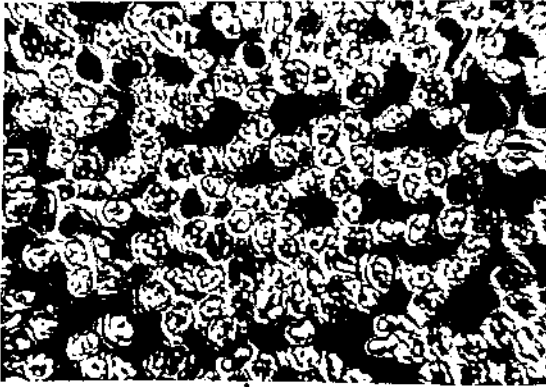
A



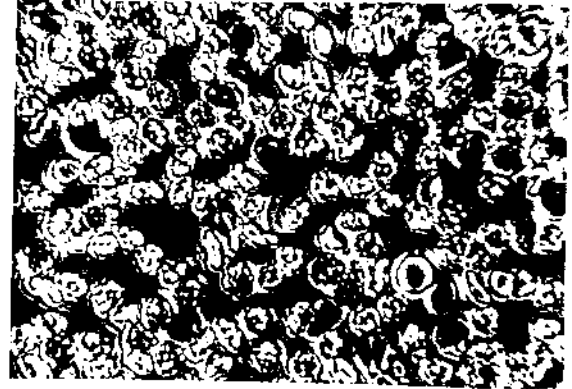
B



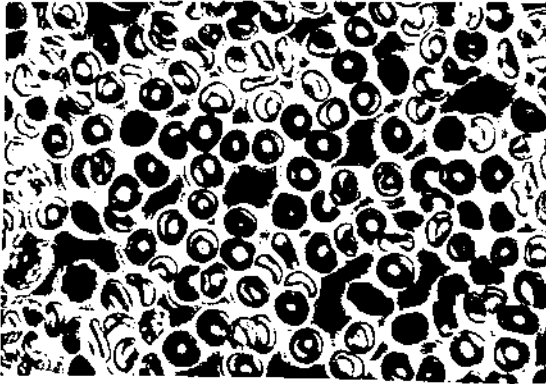
C



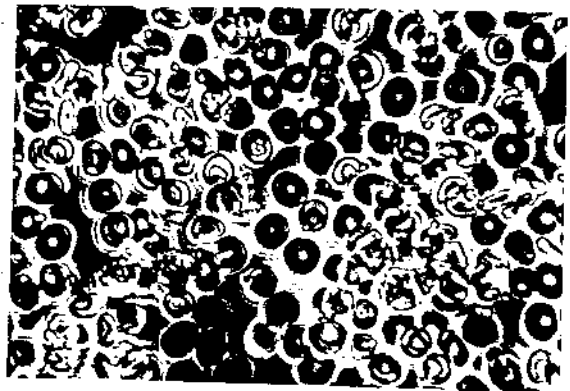
D



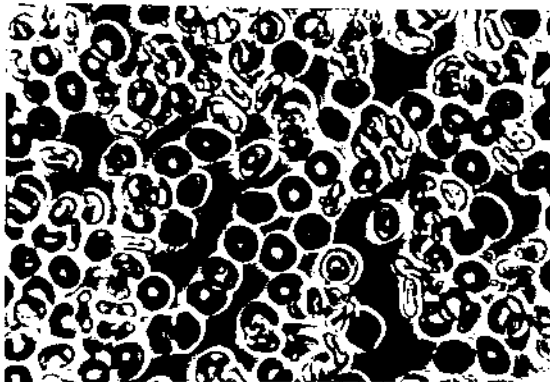
E



F



G



H

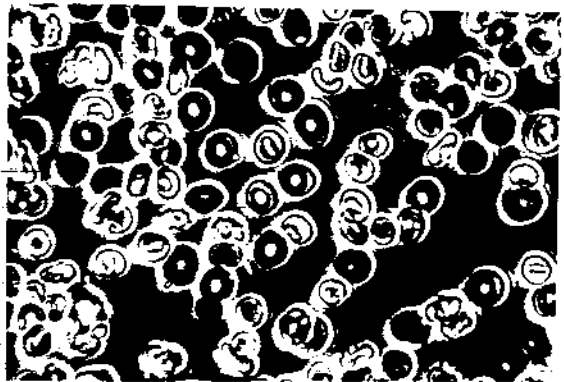


FIG.21 - Alterações morfológicas de hemácias. A,B, (Controle)
C,D,E,F,G,H, (Tratadas com papaverina).

TABELA 2

Estimativa do diâmetro médio de hemácias incubadas com diferentes concentrações de PAV em diferentes tempos.

TEMPO	CONTROLE	PAV (1,7mM)	PAV (2,8 mM)
0	7,8 ± 1.0	7,8 ± 0,92	10,13 ± 0,38 **
5	-	-	10,37 ± 1,38 **
10	-	-	10,30 ± 0,84 **
15	-	7,53 ± 1,11	10,30 ± 0,77 **
20	-	-	9,83 ± 1,23 **
30	7,3 ± 0,53	-	-

TABELA 3

Concentração eritrocitária de fosfatos orgânicos: ATP e 2,3-DPG				
	VALORES DE ATP (μ moles/100 ml)		VALORES DE 2,3-DPG (μ moles/ml)	
	Sangue total	Suspensão	Sangue total	Suspensão
Controle	48,16	19,69	1,25	1,0
PAV	36,27	7,9	1,25	0,2
Dip	42,31	15,99	1,25	0,4

Os espectros foram obtidos no espectrômetro E-9 da Varian de banda X (Biofísica USP, São Carlos). As amostras foram colocadas em célula plana de quartzo, e as medidas feitas a temperatura ambiente. As experiências foram feitas com nível de sinal $5 \cdot 10^3$, modulação de 1G ou 1,6G, potência de microondas 10 mW em banda X, isto é, frequência 9,1G HZ e campo magnético 3.300 Gauss.

O marcador $I_{5,10}$ foi dissolvido em metanol, e diluído em salina 0.9%. Na figura 22 temos um espectro de ressonância eletromagnética, de hemácia íntegra marcadas com $I_{5,10}$.

As hemácias lavadas em NaCl 0,9% foram suspensas em salina (V/V) e a 1 ml desta suspensão adicionou-se 20 μ l de marcador diluído em salina. Incuba-se por 1 hora a 37°C, lava-se as hemácias por duas vezes, e tira-se o espectro.

Na figura 23 temos um espectro de ressonância de hemácias íntegras marcadas com NEM*. Nesta figura o sinal de NEM* é praticamente livre; $\tau_c = 2 \cdot 10^{-10}$ seg., enquanto que na figura 24 quando pré tratamos as hemácias com NEM, ou IAA há o aparecimento do sinal imobilizado I_1 .

Nas figuras 25 e 26 temos a comparação dos parâmetros utilizados (I_1 e I_2) para o pré tratamento de hemácias com as drogas PAV e Dip, quando nos utilizamos do marcador lipídico $I_{5,10}$, ou quando nos utilizamos do marcador proteico NEM*.

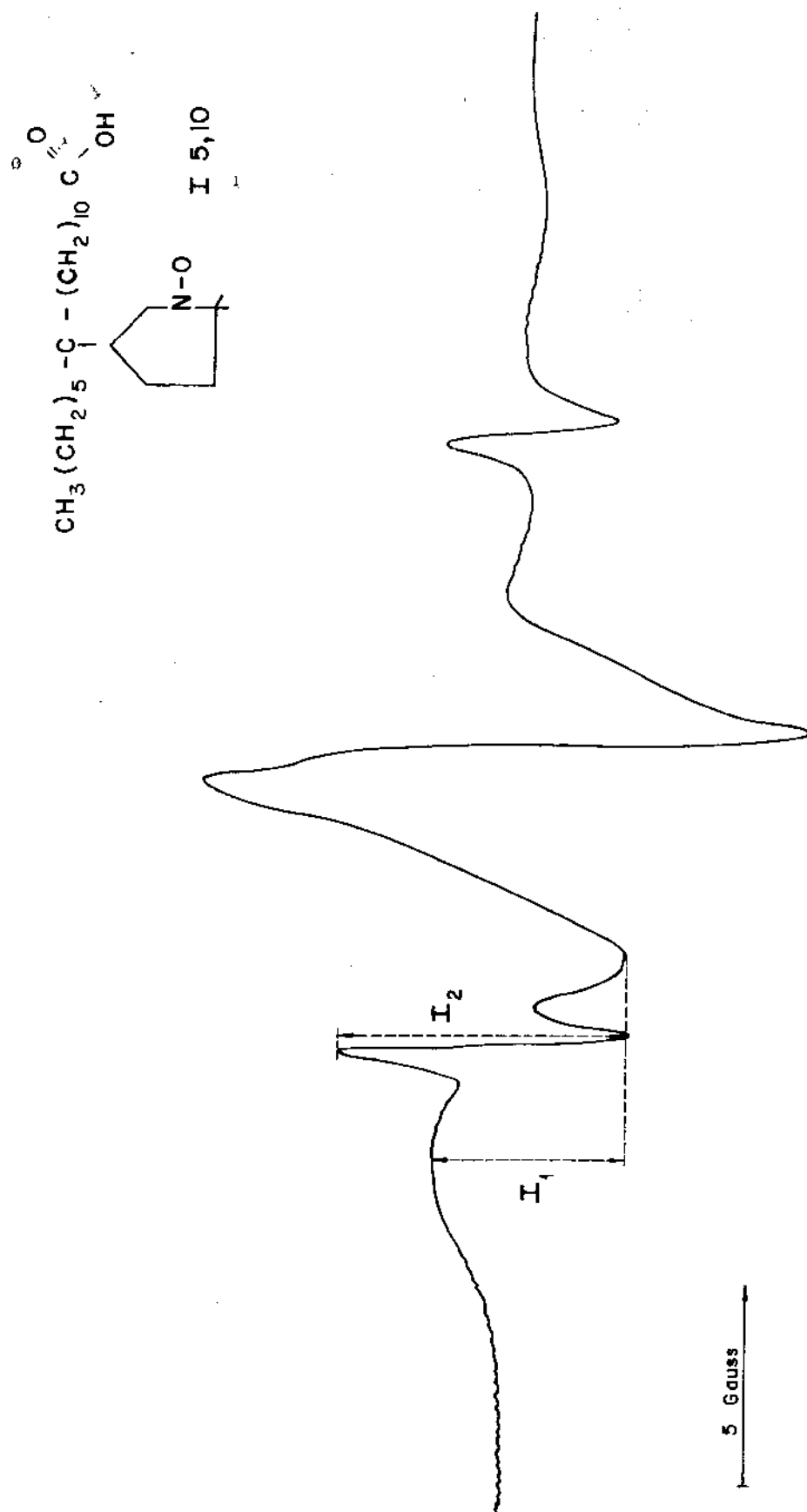


FIG.22 - Espectro de RPE de hemácias intactas marcadas com I_{5,10}

I₁ = corresponde ao marcador com $\bar{O}$ c maior (mais lento)

I₂ = corresponde ao marcador mais rápido

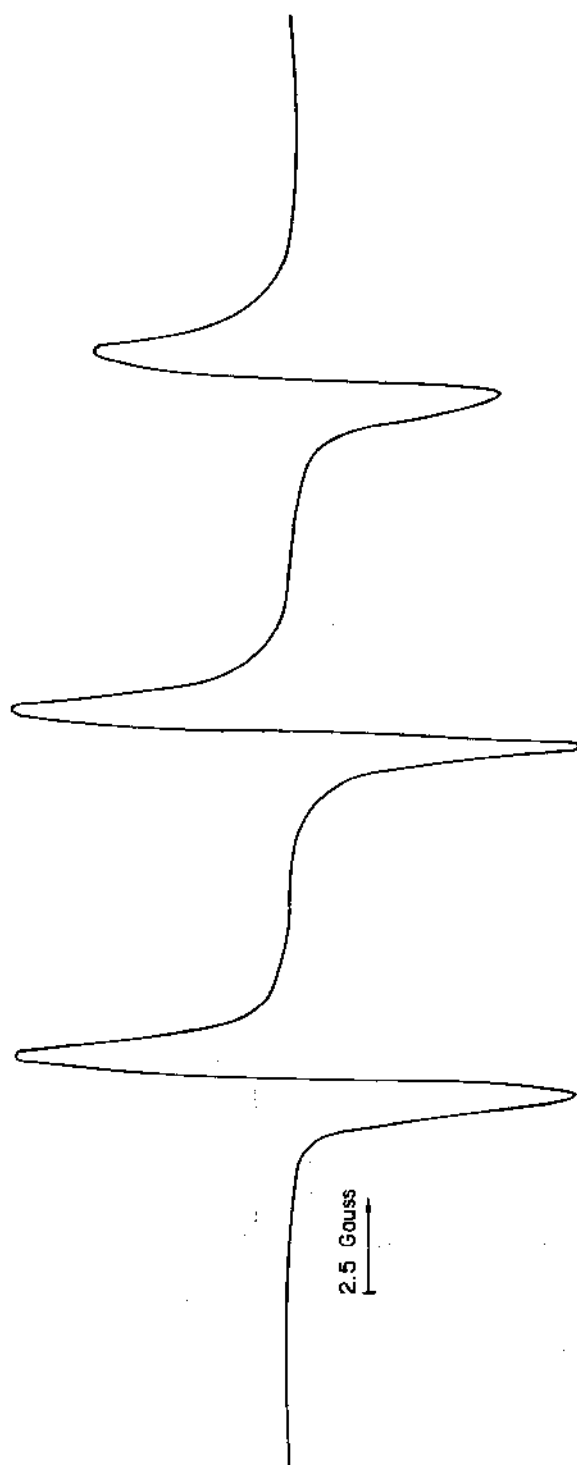


FIG.23 - Espectro de RPE de hemácias marcadas com NEM^{*}

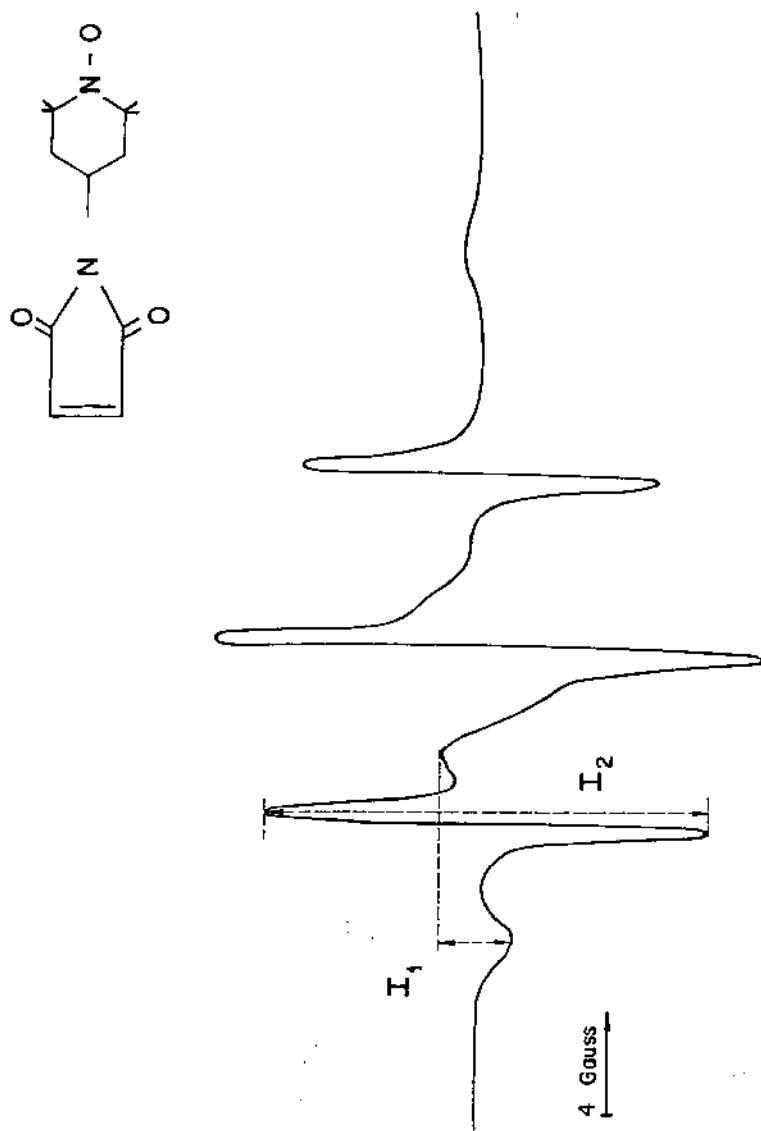


FIG.24 - Espectro de RPE de hemácias tratadas com NEM ou IAA e marcadas com NEM^{*}

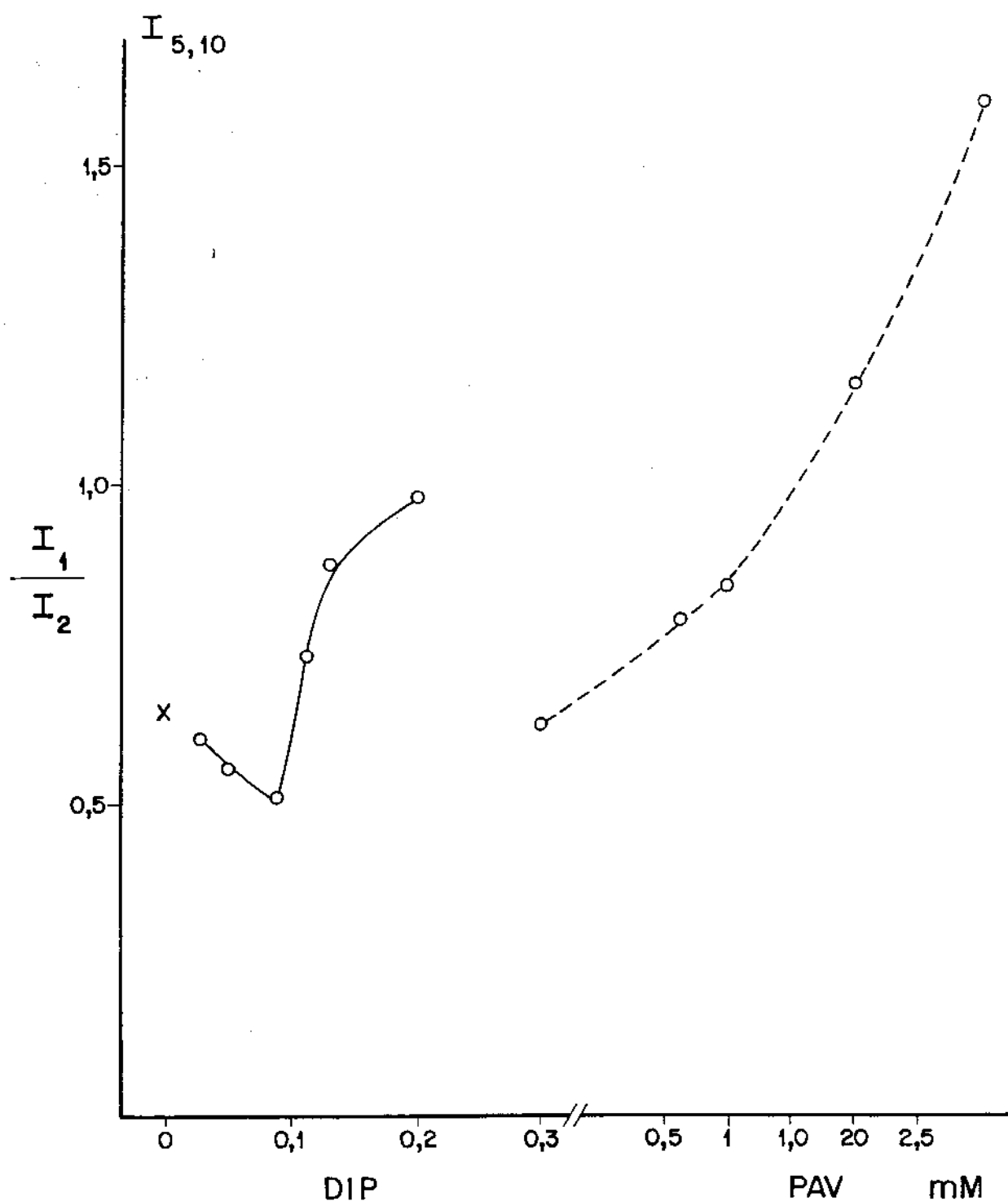


FIG.25 - Correlação do parâmetro I_1/I_2 em função de concentração de drogas PAV e Dip. Hemácias íntegras tratadas com as drogas por 1 hora a 37°C , lavadas, incubadas com IAA - por 1 hora a 37°C , lavadas e incubadas por 1 hora com NEM* lavadas em salina.

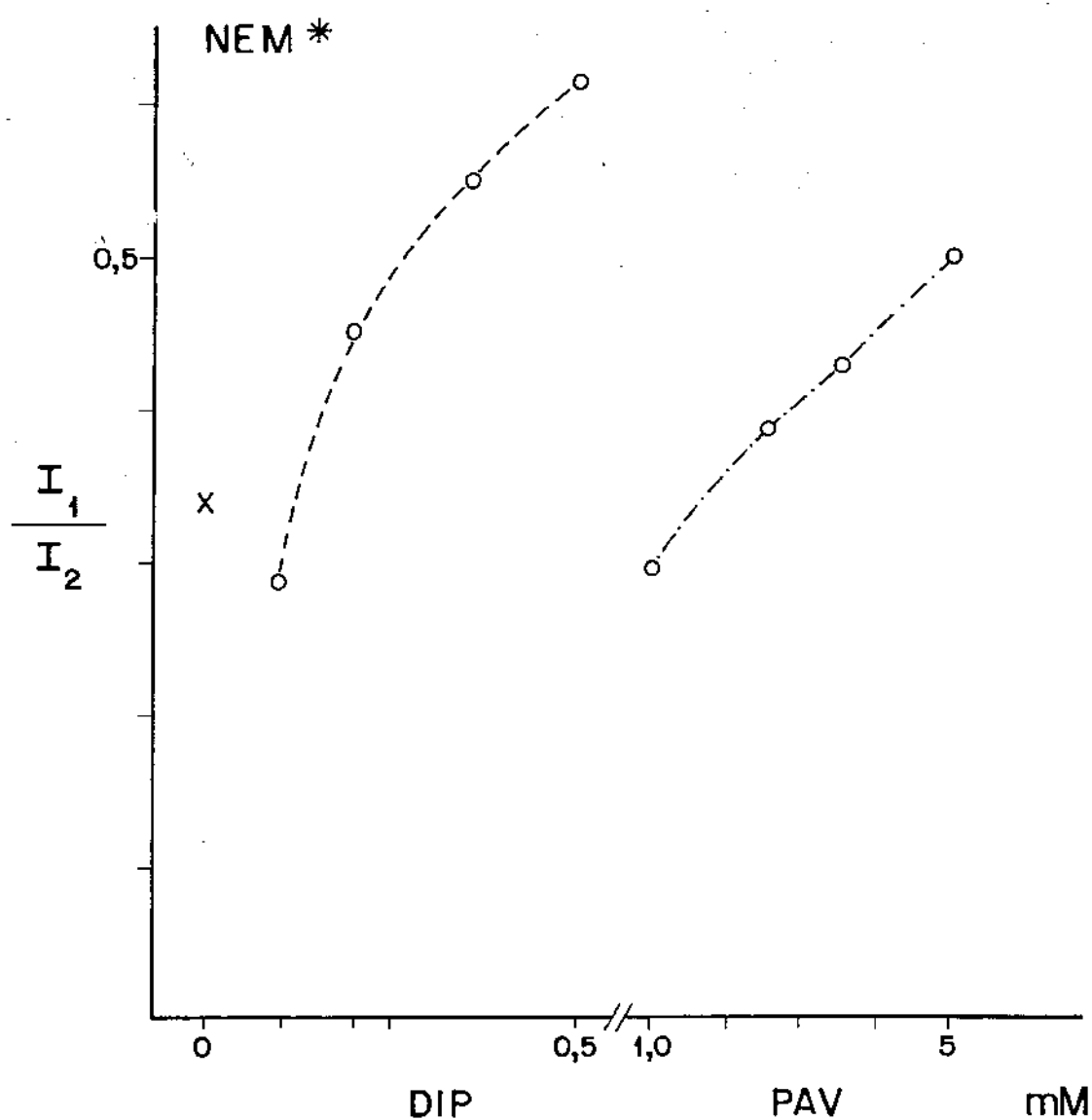


FIG.26 - Correlação do parâmetro I_1/I_2 em função de concentração de drogas (PAV e Dip). Hemácias íntegras tratadas com as drogas por 1 hora, incubadas com $I_{5,10}$, por 1 hora a 37°C , lavadas.

DISCUSSÃO

1 - CAPACIDADE DE TRANSPORTE DE OXIGÊNIO: CURVAS DE EQUILÍBRIO HEMOGLOBINA/OXIGÊNIO.

Dentre os parâmetros da capacidade de transporte de oxigênio se leva em consideração prioritariamente a concentração de hemoglobina ou valor do hematócrito. Todavia o igualmente importante fator de capacidade de liberação de oxigênio ou seja o valor de P_{50} e a quantidade de hemoglobina em sua forma de alta afinidade (R) e baixa afinidade (T) não tem sido avaliadas rotineiramente devido à dificuldade de modificação artificial destes parâmetros. Em trabalhos mais atuais, neste sentido, há duas propostas fundamentais: a) a tentativa de suprir a demanda de oxigênio em condições em que as respostas homeostáticas (2,3-DPG, pH e CO_2) são ineficazes, neste caso a sugestão tem sido a de fusão de vesículas lipídicas unilamelares com hemácias para incorporação do inositol hexafosfato (IHP) (Gersonde & Nicolau, 1979); b) por outro lado há a proposição do grupo de pesquisadores da Wellcome R. (1977) em modificar a molécula de hemoglobina através de interação com drogas que ocupariam o sítio aniônico de polifosfatos. As drogas sintetizadas (derivados de bis-aril - hidroxissulfonic ácidos) satisfazem as condições de desvio da curva de dissociação da hemoglobina para a direita a exemplo do efeito do 2,3-DPG. Contudo os aspectos da utilização destas drogas com a finalidade de aumentar a liberação de oxigênio tecidual ainda se acham em debate.

Situações de ineficácia da resposta reguladora do 2,3-DPG são detectadas em deficiências hereditárias da enzima he

oxiquinase (Delivoria & Papadoupolos, 1970), doenças cardíacas cianóticas e doença pulmonares crônicas (Osaki et alii., 1969), anemia (Eaton et alii., 1968), tirotóxicoses (Muller et alii., 1970) choque séptico, transfusão de sangue estocado em prematuros (Muller et alii., 1970) e nos casos de hipofosfatemia (Marshall et alii., 1971) etc. Ainda o aumento da concentração de cátions nos eritrócitos pode ocasionar uma diminuição da afinidade pelo oxigênio (Sommerkaing et alii., 1961). Esta correlação foi também descrita por Waldeck et alii (1967).

Ainda com relação a propriedades funcionais ou desvios da curva de dissociação para a direita pode-se citar as hemoglobinas anormais estáveis. Hemoglobina Titusville (294 Asp — Asn) (Scheineder et alii., 1975); hemoglobina Providence (82 Leu — Asn) (Charache et alii., 1975); hemoglobina Agenogi (890 Glu — Lys) (Imai et alii., 1970); hemoglobina Kansas (102 Asn — Thr) (Reissman et alii., 1961); hemoglobina Beth Israel (102 Asn — Ser) (Nagel et alii., 1976); hemoglobina Yoshizuka (108 Asn — Asp) (Isamura et alii., 1969). Em qualquer destes aspectos de mudanças estruturais em diferentes resíduos, se acha alterada a estrutura T que se encontra em maior estabilidade que a conformação R.

Em contrapartida as alterações estruturais em hemoglobina de alta afinidade pelo oxigênio, como as hemoglobinas Hmpesy (Bunn et alii., 1974) ou Bethesda (Olson et alii., 1972) promovem uma menor estabilidade da forma T e conseqüentemente um desvio para a esquerda na curva de dissociação. Alterações artificiais da curva de dissociação refletidas na mudança de P_{50} podem ser observadas em pacientes submetidos a injeção de contrastes radiológicos do tipo Renovist (Rosenthal et alii., 1975) quan-

do há um aumento de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, gerando portanto uma menor liberação de oxigênio tecidual.

Ainda, as modificações químicas de hemoglobina nos dois grupos tióis reativos $\beta 93$, podem promover alterações funcionais da hemoglobina, quanto à afinidade e cooperatividade.

Riggs (1954) mostrou que um grande número de reagentes tióis que se ligam a Cys $\beta 93$ aumentam a afinidade e diminuem o efeito Bohr, enquanto que a cooperatividade da molécula se achava diminuída, por exemplo, quando o reagente era glutationa oxidada (Huisman, 1962).

A reatividade da cisteína $\beta 93$ depende todavia da conformação da hemoglobina tetramérica. Na hemoglobina deoxigenada os grupos tióis tem uma menor reatividade do que na conformação R (Bush, 1962).

Derivados de cisteína e cistamina foram estudados pelo grupo de Antonini (1979); (Garil et alii., 1981) compararam as propriedades de 21 reagentes tióis quanto à alteração de propriedades funcionais da hemoglobina em função das diferenças de diferentes reatividades dos grupos SH $\beta 93$, analisando a velocidade de ligação da hemoglobina em solução ou na hemácia íntegra e efeitos sobre a oxidação ou formação de metahemoglobina.

A reatividade dos grupos amino livres das cadeias laterais podem, por exemplo, quando na formação de derivados do 2-metoxi-nitropone, levar a um aumento dramático da afinidade pelo oxigênio sem alteração de outras características funcionais (Currel et alii., 1978).

Alterações da afinidade por mecanismos indiretos podem ser vistos em desequilíbrios iônicos, como por exemplo na liberação acentuada de K^+ das hemácias por drogas do tipo propranolol (Agostini et alii., 1973).

55 151 BC

A infusão de nitroglicerina por via intra-coronariana promove um aumento significativo no P_{50} coronariano venoso (Garret et alii., 1975) sem que haja um aumento de PO_2 coronariano arterial, tendo isto como significado que existe um acréscimo de 18% na avariabilidade de oxigênio. Todavia, a administração de nitroglicerina via sublingual (Manchester et alii., 1972) não leva a um acréscimo no P_{50} quando as determinações foram feitas em sangue venoso periférico. Assim sendo para a nitroglicerina haveria a liberação de uma substância ou metabólito do miocárdio que seria rapidamente degradado, responsável pelo aumento de PO_2 coronariano.

Este mesmo tipo de efeito tem-se observado em pacientes com enfarte agudo do miocárdio, ou ainda em casos de angina, quando há um deslocamento da curva de afinidade para a direita sem correlação com os níveis de fosfatos orgânicos, ou modificação de pH (Shappell et alii., 1970).

Em termos ainda de modificações indiretas poderíamos citar aquelas que promovem estímulo da via glicolítica e concomitante aumento de 2,3-DPG. Um exemplo deste mecanismo seria o da ação de andrógenos (progesterona) quando se observa um aumento na produção de lactato, e 2,3-DPG, com resultante diminuição da afinidade da hemoglobina (Molinari et alii., 1973). Por outro lado, inibidores da via glicolítica, por exemplo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, como o iodoacetato promovem o efeito oposto (Engel et alii., 1968).

Os nossos resultados demonstraram modificações nas curvas de dissociação que a princípio parecem contrastantes ou seja quando a hemoglobina se encontra em solução e em presença das drogas haveria uma diminuição da afinidade da hemoproteína

pelo oxigênio e uma relativa diminuição do valor de n.

Dada as estruturas químicas das drogas empregadas, talvez pudéssemos aventar uma possibilidade de interação do dipiridamol (que funcionaria como polianion em função de seus radicais hidroxila) com os sítios de polifosfatos. Para tanto, deveríamos contar com metodologia adequada com o que tem sido feito com as drogas sintéticas ensaiadas por Goodfort et alii. (1978).

Por outro lado, para a papaverina, de início, este mecanismo de interação estaria totalmente afastado pois esta se comporta mais exatamente como cátion.

A eventualidade de ocorrer uma ligação inespecífica do tipo hidrofóbica entre as drogas e a hemoproteína nos parece o mais correto. Sugerimos investigar esta possibilidade, nos utilizando do recurso, de a partir de nitrosil hemoglobina verificarmos se realmente ocorreria uma maior estabilidade da conformação quaternária T.

Por outro lado, a incubação de hemácias com as drogas, pelos nossos resultados e outros da literatura demonstram grandes modificações com relação à permeabilidade das membranas. Quando tentamos verificar da correlação entre estas alterações e a função da hemoglobina obtivemos dados de desvio da curva de dissociação para a esquerda, sem grandes alterações na cooperatividade.

Nos pareceu mais adequado verificarmos os níveis de fosfatos orgânicos destas hemácias submetidas a tal tratamento, para explicarmos o efeito do aumento de afinidade, uma vez que as mudanças de permeabilidade poderiam levar a efeitos indiretos sobre os níveis de fosfatos. A diminuição destes níveis por nós encontrada, seria suficiente para promover este desvio visto

que para um decréscimo de 420 mμ moles por ml de células sanguíneas de 2,3-DPG (pL 0,001) existe um desvio na curva de saturação equivalente a 1 mm de Hg (Miller et alii.,1970). De qualquer forma não se pode afastar a possibilidade de inibição de enzimas da via glicolítica com repercussão na concentração de fosfato intracitocitária. Mas para esta possibilidade teríamos que proceder à incubação com as drogas por tempos maiores (4 a 6 horas) tal como ocorre com o efeito observado para fluoreto de sódio ou iodoacetato. Neste mesmo aspecto, tempos maiores de incubação poderiam possibilitar eventualmente ao invés de decréscimo dos níveis de fosfatos um incremento na concentração dos mesmos, se nos reportarmos ao aspecto seguinte: concentrações menores de 2,3-DPG liberam a inibição da enzima fosfoglicero mutase e aceleram a síntese de novo deste polifosfato.

Portanto, preferimos constatar este resultado sem discutirmos o mecanismo pelo qual ele se manifesta, e simplesmente sugerimos a possibilidade de alteração de permeabilidade da membrana da hemácia como fator de importância na regulação da afinidade da hemoglobina.

Inicialmente em Resultados, nos referimos a possíveis interações diretas ou indiretas sobre a hemoglobina na forma R, através das análises das propriedades funcionais.

Em sequência achamos interessante analisarmos a interação se houvesse, com a hemoglobina na forma férrica (Fe^{+++}). Os resultados de titulação alcalina de hemoglobina férrica por métodos espectrofotométricos, nos puderam indicar que a princípio não há alteração aparente ou formação de novas espécies moleculares de metahemoglobina, mantendo-se em ambos os casos (tratadas por Dip ou por PAV) a mesma isosbesticidade da hemoglobina

sem tratamento. Uma forma mais elegante de obtenção destes resultados seria a de acompanhar o sinal do Fe^{+++} por ressonância eletromagnética como tem sido feito para as hemoglobinas anormais que apresentam dois valores distintos, de pK na titulação alcalina; com duas espécies moleculares de alto spin. Os experimentos relativos a taxas de oxidação, para o dipiridamol se basearam em uma observação casual de que amostras de hemoglobina tratadas pela droga, quando guardadas por período de 6 a 8 horas apresentavam visualmente características de metahemoglobina. A tentativa de se comprovar esta oxidação que é um processo lento ($K = 0,0013 \text{ min}^{-1}$) foge aos objetivos do presente trabalho.

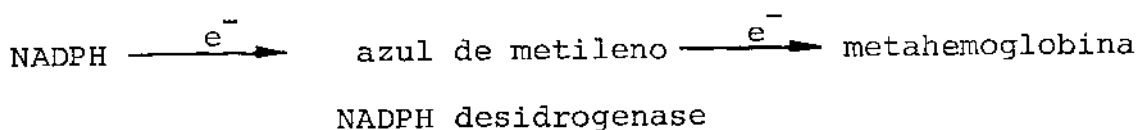
A fim de verificarmos a ocorrência de mudanças dramáticas na apoproteína, procedemos a sua reconstituição na forma férrica. Estes resultados quais sejam a não interferência do Dip neste processo, e o deslocamento do ponto estequiométrico quando a globina era tratada por papaverina, nos indicam que existem diferenças quanto a possíveis modificações entre as duas drogas analisadas. É nosso interesse no futuro evidenciarmos a possível interação hidrofóbica da papaverina com a apohemoglobina através da observação do efeito Cotton por dicroísmo circular, onde com certeza poderíamos concluir com base no conteúdo de α hélices nas globinas modificadas, a interação sugerida.

2 - HEMÁCIAS

Uma das funções metabólicas das hemácias de importância é a manutenção de hemoglobina em seu estado reduzido (Fe^{++}) desde que sua forma oxidada (Fe^{+++}) é incapaz de se ligar ao oxigênio. Fisiologicamente só 1% do total de hemoglobina presente

em eritrócitos normais se encontra na forma oxidada ou metahemoglobina, devido à capacidade dos eritrócitos em reduzir a autooxidação espontânea (Scott, 1968). Dos possíveis caminhos metabólicos para a redução de metahemoglobina "in vivo", o mais importante é o que envolve uma desidrogenase NADH. Muitas proposições tem sido aventadas de que a via glicolítica em especial a reação envolvendo a gliceraldeído-3-P-desidrogenase é a principal fonte de NADH utilizado para a redução enzimática da glicose. Um dos aspectos que reforça esta proposição é a de que nas hemácias tratadas com nitrito de sódio quando incubadas com glicose, há acúmulo de piruvato em quantidade equivalente à de metahemoglobina reduzida. A redução de metahemoglobina em eritrócitos tratados por nitrito incubados com glicose é bloqueada por iodoacetato mas não por fluoreto de sódio (Gilson, 1948).

Um outro possível caminho para redução da metahemoglobina é o postulado por Kiese (1944):



A estimulação da redução da metahemoglobina seria dependente da formação de NADPH gerado na via das pentoses. Toda via, esta segunda opção parece não ser de importância fisiológica visto que deficientes em glicose-6-P-desidrogenase apresentam níveis normais de metahemoglobina (Koster, 1972) e mesmo deficientes na redutase NADPH, apresentaram capacidade de redução da metahemoglobina quando seus eritrócitos foram tratados por nitrito e incubados com glicose (Sass et alii., 1967).

Todavia, se o sistema de metaredutase se encontrar bloqueado, há uma repercussão funcional surpreendente, qual seja

a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta (Bunn et alii., 1977).

Os reagentes sulfrídila do tipo cistamina afetam o sistema de metaredutase de uma forma discreta (Antonini et alii., 1977) e alteram a propriedade funcional de hemoglobina modificando o mesmo ocorrendo com o reagente amino específico metoxi nitropone (Currel et alii., 1978). Quando analisamos a eficiência do sistema de metaredutase em eritrócitos tratados com nitrito, anteriormente pré tratados (por papaverina) verificamos uma inibição de cerca de 50% quando o substrato como fonte de poder redutor era glicose. Com relação ao lactato como substrato, observamos também uma inibição (10%). As taxas de redução de metahemoglobina apresentam velocidades da ordem; $0,003 \text{ min}^{-1}$ para glicose e $0,02 \text{ min}^{-1}$ para lactato.

A observação de que encontramos inibição com ambos os substratos nos leva a supor uma dificuldade de transporte dos próprios substratos e não efetivamente inibição de uma das desidrogenases envolvidas. Isto se pode evidenciar de duas formas: 1) quando a atividade enzimática foi ensaiada nos hemolisados fornecendo-se NADH, encontramos os mesmos valores de r (taxa de redução) para os tratados ou não por papaverina; 2) de outra forma poderíamos testar a eficiência do sistema nos utilizando de uma droga que inibisse a entrada do substrato, no caso, glicose, como obtivemos com a fluoridizina.

3 - MODIFICAÇÕES DA HEMÁCIA ÍNTEGRA

O problema de como os eritrócitos de mamíferos mantêm sua forma discóide tem sido objeto de muitas especulações

desde que se descobriu que esta habilidade é uma propriedade intrínseca da membrana (Deuticke, 1968).

Durante os últimos anos se tem acumulado evidências de que os níveis de ATP (Gardos et alii., 1966) e provavelmente o íon Ca^{++} (Weed et alii., 1968) estão envolvidos na manutenção da forma normal da hemácia. Por outro lado a composição lipídica da membrana parece exercer um papel fundamental (Murphy, 1965). A forma dos eritrócitos é mantida através de um equilíbrio entre forças divergentes que poderiam originar formas ditas crenadas, formas em cálice, ou ainda formas turgidas (Fugil et alii., 1978).

Compostos de natureza anfipática levam a modificação da forma normal da hemácia. Entre muitos, o dipiridamol e a papaverina induzem esta modificação de forma desestabilizando o equilíbrio e levando a formas crenadas (agentes com grupos polares aniônicos como o dipiridamol) ou a formas ditas internalizadas que podem se reverter em formas túrgidas (como os que possuem um grupo catiônico exemplo: papaverina). Os nossos resultados inerentes a esta modificação, foram os de encontrar uma relação dose x efeito, e tempo de incubação com a droga. Observamos que o efeito se manifesta imediatamente depois da droga ter sido adicionada à suspensão de hemácias e que é concentração dependente.

Uma das teorias que explicam as modificações de forma induzidas por agentes anfipáticos é a de Shietz et alii. , 1974. De acordo com eles, as drogas catiônicas permeáveis se intercalam principalmente no interior da membrana, na bicamada lipídica devido à sua interação com o grupo ácido da fosfatidil serina, causando expansão deste segmento de membrana; para as drogas aniônicas ocorreria o contrário devido à repulsão com os gru

pos acídicos, ocorrendo uma modificação diversa na forma da hemácia. A interação com grupos acídicos da fosfatidil serina ou com sítios diferentes deste podem levar a modificações na permeabilidade a ânions pelas células vermelhas. Com os dois agentes estudados é conhecido o fator inibitório que exercem sobre o transporte de fosfato; e mesmo sobre ácidos carboxílicos como o lactato (Deutcke, 1970). A inibição é predominantemente não competitiva para a maioria dos agentes e uma das propostas para este mecanismo é a hipótese de Gerhardt et alii., 1973 que implica num decréscimo na densidade de carga fixa. Todavia, em termos mais estruturais, alguns inibidores poderiam afetar a permeabilidade a ânions por perturbar a região de interação lipídeo proteína devido a sua incorporação nas regiões hidrofóbicas da membrana.

Outra hipótese na mudança de permeabilidade seria a de modificação no potencial da membrana (Singer, 1973).

Por outro lado, muitas das características estruturais e propriedades funcionais das membranas biológicas dependem da presença de regiões apolares dentro da mesma. A permeabilidade a diferentes moléculas tem sido portanto correlacionada com a sua solubilidade em solventes apolares. Portanto, a formação de regiões hidrofóbicas é devida à presença de altas concentrações de fosfolipídeos de natureza anfipática, que em solução aquosa são orientados de forma a que as cadeias de ácidos graxos são distanciadas da água através de contatos de Van de Waals e os grupos polares são dirigidos de forma a ter um máximo contato com a água (Lenard et alii., 1966).

O acesso a estas propriedades das regiões apolares das membranas tem sido feito pelo uso de sondas de fluorescência tipo 1,8 ANS (Rulbacalva et alii., 1969) por exemplo, a papaveri-

na, em hemácias, modifica as características de captação desta sonda em hemácias íntegras. A maior captação observada para o ANS em presença de papaverina é semelhante à observada para outras drogas catiônicas como por exemplo: cloropromazina, prometazina, (Horie et alii., 1981).

O aumento da intensidade de fluorescência causada pelas drogas catiônicas poderia ser devido ou ao aumento do rendimento quântico do ANS ligado à membrana que teria sofrido uma mudança conformacional, ou a um aumento do número de moléculas de ANS ligadas à membrana.

No caso da papaverina, não podemos discutir quais dos dois mecanismos ocorre pois experimentalmente nossos dados relativos ao aumento de captação de ANS em função de diferentes concentrações de droga foram obtidos com suspensão de hemácias e nas membranas utilizamos uma única concentração de PAV. Se, o comportamento da PAV, for o mesmo que para os fenotiazínicos o que poderia ocorrer seria o aumento do número de moléculas de ANS ligadas à membrana (Horie et alii., 1978).

Uma das modificações mais drásticas na membrana de hemácia é a ocorrência de hemólise. Considera-se que a hemólise por drogas poderia ocorrer através das seguintes etapas: ligação da droga na membrana, perturbação da membrana e lise. A membrana pode tolerar deformação unidirecional considerável, mas uma expansão da área por mínima que seja, leva à hemólise. Estes achados podem ser explicados por um modelo estrutural no qual a espectrina encobrindo a fase interna da membrana forma um retículo conectado com as moléculas de glicoforina penetrando a parte mais estreita da membrana. Estas proteínas formam um arcabouço para os lipídeos e conferem força mecânica para a membrana enquanto

que a fluidez da camada lipídica permite os movimentos dinâmicos da interação dos componentes da membrana (Chien, 1976).

As duas drogas por nós estudadas possuem efeitos hemolíticos, dependentes de concentração. As curvas de dose efeito para hemólise mostram uma maior eficácia do dipiridamol quando se compara com a papaverina. Este processo é dependente de pH e de temperatura (dados não mostrados). Com relação a ação hemolítica da papaverina ocorre uma correlação entre a indução à hemólise e aumento de captação de ANS. De qualquer forma, para a captação de ANS, dois tipos de sítios ligantes estariam envolvidos: um do lado externo da membrana de grande especificidade, e outro menos específico, na parte lipídica da membrana.

Pressupomos que a papaverina interage nestes sítios e promove expansão da membrana até o seu rompimento quando as concentrações eram 2 a 2,5 mM. Todavia, na fase pré-lítica pudemos observar o aumento da turgescência da hemácia e o aumento da captação de ANS, que já indicam mudanças na membrana.

4 - MUDANÇAS CONFORMACIONAIS DA MEMBRANA

As técnicas de marcação de spin utilizadas de forma pioneira por McConnel e McFarland (1970) e Jost et alii, (1971) tem sido utilizadas extensivamente no estudo de biomembranas.

O conhecimento da estrutura e conformação de membranas biológicas tem sido considerável pelo uso dos radicais nítróxido. Vários compostos de importância biológica e farmacológica interagem a nível de membrana. Assim estudos empregando esta técnica foram feitos para observação das ações de esteróis (Lappin et alii., 1972); íons (Ito et alii., 1974); pH (Wisniewski et alii.,

1974); desacopladores de fosforilação oxidativa (Verma et alii., 1973); proteínas e peptídeos (Rousselet et alii., 1978); bloqueadores de grupos SH (Sandberg, 1969), etc.

Uma série de investigações, em que foram analisados 1) influência da composição de membrana na partição de marcadores de spin que se distribuem entre a membrana e a fase aquosa; 2) a dependência da permeabilidade da membrana e composição lipídicas das mesmas; 3) o efeito de colesterol sobre o grau de organização e mobilidade de componentes da membrana; 4) biossíntese de fosfolipídeos contendo marcador de spin; 5) reatividade da membrana biológica foram feitas (Schreir, 1979).

A utilização de um marcador de spin do tipo $I_{5,10}$ em hemácias íntegras possibilita a visualização de modificação na fase lipídica da membrana, e a análise do parâmetro I_1/I_2 ; reflete o coeficiente de partição do marcador.

Pelos nossos resultados observamos que para o dipiridamol, quando em concentrações menores, na fase pré lítica há uma certa proteção e uma maior organização de membrana, que se torna mais fluida à medida em que se aumenta a concentração da droga. Com relação à papaverina, o comportamento do marcador é o mesmo, independentemente das concentrações de papaverina utilizadas. Isto significa uma inespecificidade da droga, e uma desorganização da membrana em todo o intervalo de concentração utilizada.

Em experiências com ghosts obtivemos resultados semelhantes aos com hemácias íntegras quando o marcador era o $I_{5,10}$ embora na preparação de ghosts em presença de K^+ houvesse uma melhor solubilização do marcador. Isto se deve ao fato de que o K^+ permite um reselamento melhor após a hemólise, e a manutenção da membrana na estrutura nativa.

Experimentos preliminares com ghosts de hemácias de indivíduos portadores de deficiência em glicose-6-P-desidrogenase, mesmo quando preparados em presença de K^+ , mostraram uma diferença sensível na solubilidade do marcador, dando a idéia de uma maior rigidez da membrana neste caso (resultados não mostrados).

A escolha do marcador $I_{5,10}$ se deve ao fato de que este seria sensível à modificação nos contactos proteína-lipídio. Embora não seja possível o cálculo de ζ c sem que se faça simulação de espectros, foi possível determinar um parâmetro empírico do tipo I_1/I_2 . Talvez fosse interessante utilizarmos o marcador $I_{12,3}$ nas mesmas condições pois embora não seja também neste caso possível determinar ζ c, pode-se calcular A_{II} , que dá uma idéia de liberdade de movimento do marcador. Quanto maior A_{II} , menor a liberdade de movimento e mais imobilizado se encontra o marcador e maior o ζ c.

Ainda, uma quantidade considerável de informações sobre sistemas biológicos tem sido obtidas pela marcação de grupos sulfidrilas e amino com marcadores de spin análogos a N-etil maleimida e iodoacetamida. Sanberberg et alii., 1969, verificaram que maleimida-nitróxido reage prontamente com membranas isoladas das células vermelhas originando um espectro de dois componentes, um fracamente imobilizado e outro fortemente. Este último liga-se no interior da membrana de forma que seu movimento é rigorosamente restrito.

Suspensões de hemácias tratadas com papaverina em diferentes concentrações quando expostas a reagentes sulfidrilas iodoacetamida ou N-etilmaleimida, e posteriormente incubadas com análogos de maleimida com incorporação de radical nitróxido, apre

sentaram modificações na razão I_1/I_2 parâmetro empírico que indica a maior ou menor liberdade de movimentação do radical nítr $\bar{o}$ xido.

Quando as suspensões de hemácias eram incubadas com N-etilmaleimida com radical nítr $\bar{o}$ xido sem prévio tratamento com reagentes sulfidril, notamos exclusivamente o aparecimento de sinal de ERP do marcador livre; procedendo-se à hemólise e posterior diálise, o sinal do marcador aparecia no dializado, presumindo-se que ou o marcador se achava totalmente livre ou ligado à moléculas de baixo peso molecular como a glutathiona.

Todavia, no pré tratamento com os reagentes sulfidril, o sinal de ERP era o mesmo que para membranas de hemácias marcadas com nítr $\bar{o}$ xido observadas por Sandeberg et alii., 1969, isto é, era constituído de dois componentes, um de marcador praticamente livre ou fracamente imobilizado e outro por marcador fortemente imobilizado.

No tratamento com as drogas dipiridamol e ou papaverina pudemos observar um aumento de sinal de marcador imobilizado em dependência da dose utilizada das duas drogas.

Isto implica em que há modificações conformacionais da membrana da hemácia, nas regiões lipídeo-proteína próximas aos grupos sulfidrilas.

ABSTRACT

A review is presented about:

- 1) Hemoglobin structure and function.
- 2) Erythrocyte membrane composition. a) The effects of vasodilators drugs dipyridamole and papaverine on the equilibrium dissociation curves of human hemoglobins treated by the drugs have been studied. b) The changes in the apoprotein in the presence of the drugs were investigated. c) The possibility that the drugs promote hemoglobin oxidation or an interaction with the metahaemoglobin were examined. d) Some functional and morphological properties of the human erythrocytes exposed to different concentrations of the drugs were studied. e) Attempts were made to verify the biophysical state of the ghosts from erythrocytes treated by papaverine and dipyridamole, by using spin labels methods.

BIBLIOGRAFIA

ADAIR, G. S.

Proc. Roy. Soc. London, 109A: 292, 1925.

ADAMS, H.

in: Methods of Enzymatic Analysis by H. Bergmeyer.

Academic Press, N.York, 539-543, 1963.

AGOSTINI, A.; BERFASCONI, C. & GERLI, G.

Science, 82: 300-301, 1973.

ANDO, S. & YAMAKAWA, T.

J. Biochem., 73: 387-396, 1973.

ANSELSTETTER, V. & HORSTMANN, H. J.

Europ. J. Biochem., 56: 259-269, 1975.

ANTONINI, E. & BRUNORI, M.

in: Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with Ligands.

North Holland Publishing Co. Amsterdam, London, 1971.

ANTONINI, E.; IOPPOLO, C.; GIARDINA, B. & BRUNORI, M.

Bioch. Biophys. Res. Commun., 74: 4-1647, 1977.

AMICONI, G.; ZOLLA, L.; VECCHINI, P.; BRUNORI, M. & ANTONINI, E.

Eur. J. Biochem., 76: 339-343, 1977.

ARNONE, A.

Nature, 237: 146, 1972.

BARCROFT, J.

in: The Respiratory Function of the Blood. part II: Haemoglobin.

London Cambridge University Press, 1928.

BAUER, C. & SCHROEDER, E.

J. Physiol. (London), 227: 457, 1972.

BEDDELL, C.R.; GOODFORD, P.J.; NORRINGTON, F.E. & WILKINSON, S.

Br. J. Pharmac., 57: 201-209, 1976.

BELLINGHAM, A. J.; DETTER, J. C. & LENFANT, C.

J. Clin. Invest., 50: 700, 1971.

BENESCH, R. E.; RANNEY, H. M. & BENESCH, R.

J. Biol. Chem., 236: 2926, 1961.

BENESCH, R & BENESCH, R. E.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 26: 162, 1967.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R. & JU, C. I.

Bioch., 8: 2567, 1969.

BENESCH, R.; BENESCH, R. E. & YUNG, S.

Proc.Natl.Acad.Sci., USA 71: 1504, 1974.

BERGER, H.; JAMIG, C. R. & GERBER, G.

Europ. J. Biochem., 38: 553, 1973

BEYCHOCK, S.; TYUMA, I.; BENESCH, R. E. & BENESCH, R.

J. Biol. Chem., 242: 2460, 1967

BOHR, C.; HASSELBACK, K. & KROGH, A.

Skand Arch. Physiol., 16: 402, 1904.

BOHR, C.

in: Handbook of Physiology. Sect.3, vol.1.

Wallace O. Fenn Hermann Rahn, 1930.

BONAVENTURA, J. & RIGGS, A.

J. Biol. Chem., 243: 980, 1968

BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B.; FERRUZZI, G.;
& MCCURDY

J. Biol. Chem., 237: 7563-7571, 1976.

BRETSCHER, M. S.

J. Mol. Biol., 71: 523-528, 1972.

BROWN, F. F. & GOODFORD, P. J.

Br.J. Pharmac., 60: 337-341, 1977.

BENZARD, Y.; MACHADO, P.; HASSAU, W.; MAX-AUDIT, I.; GARD, M. C.
& ROSA, J.

in: Inhibition of Sickling by Cystamine. Biochem and Clinical
Aspects of Hemoglobin abnormalities.

Acad. Press, pg.237, 1978.

BUNN, H. F. & BRIEHL, R. W.

J.Clin.Invest., 49: 1088-1045, 1970.

BUNN, H. F.; RANSIL, B. J. & CHAO, A.

J. Biol. Chem., 246: 5273, 1971

BUNN, H. F.; WOHL, R. C. & BRADDLY, T. B.

J. Biol. Chem., 249: 7402, 1974.

CALDWELL, P.R.B.; NAGEL, R. L. & JAFFÉ, E. R.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 44: 1504, 1971.

CAPALDI, R. A. & GREEN, D. E.

Febs Lett., 25: 205-209, 1972.

CARRINGTON, A. & McLAGHLAN

in: Introduction to magnetic ressonance.

Harper, New York, 1976

CAUGHEY, W. S.

Ann. Rev. Biochem., 36: 621, 1967.

CERAMI, A. & MANNING, J. M.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68: 1180-1183, 1971.

CHANCE, B.; COHN, P. & JOLISIS, F.

Science, 137: 499, 1962.

CHANUTIN, A. & CUNISH, R. R.

Arch. Biochem. Biophys., 121: 96, 1967.

CHAPMAN, D.

Quart. Rev. Biophys., 8: 185-235, 1975.

CHARACHE, S.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 241: 449, 1974.

CHARACHE, S.; McCURDY, P. & FOX, L.

Blood, 46: 1030, 1975.

CLARCK, A. J.

in: Handbuch der experimentellen pharmakologie,

4. General Pharmacology Berlin Springer, 1937.

COBURN, R. F.; PLOEGMAKERS, F.; GONDRIE, P. & ABBOUD, R.

Ann. J. Physiol., 224: 870, 1973.

COLEMAN, R.

Biochim. Biophys. Acta (Anist) 300: 1-30, 1973

CURREL, D.; BENITEZ, E.; IOPOLLO, C.; GIARDINA, B.; CONDÓ, S. &

MARTINI, F.

Eur. J. Biochem., 91: 285-289, 1978.

DANIELLI, J. F. & DAVSON, H.

J. Cell. Comp. Physiol., 5: 495, 1935.

DEAN, J. & SCHECHTER, A. N.

N. Engl. J. Med., 299: 752-763, 1978.

DELIVORIA, PAPADOPOULOS, OSKIM, GOTTLIEB, A. J.

Science, 165: 601, 1969.

DELIVORIA PAPADOPOULOS, M. D.; MONOW, G. & OSKI, F. A.

J. Pediatr., 79: 898, 1971.

DESBOIS, A. & BANERJEE, R.

J. Mol. Biol., 92: 479-493, 1974.

DEUTICKE, B.

Biochim. Biophys. Acta, 163: 494, 1968.

DINMAN, B. D.; EATON, J. W. & BREWER, G. J.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 174: 246, 1970.

DUHM, J.; GERLACH, E. & DEUTICKE, B.

Naturwissenschaften, 56: 329, 1969.

DUHN, J. & GERLACH, E.

Pflugers. Arch., 326: 254-269, 1971.

EATON, J. W. & BREWER, G. J.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61: 756, 1969.

ENGEL, K. & DUE, J.

Nature, 219: 936-939, 1968.

FAIRBANKS, G.; STECK, T. L. & WALLACH, D. F. H.

Biochemistry, 10: 2606-2626, 1971.

FERMI, G.

J. Mol. Biol., 97: 237, 1975.

FINEAU, J. B.; FREEMAN, R. & COLEMAN, R.

Nature (London) 257: 718-719, 1975.

FISCHER, H. & ZEILE, K.

in: Synthese des Hämatoporphyrins Protoporphyrins und Hämins
Justins Liebrig's Annalen der Chemie, 468: 98, 1929.

FISHER, K. A.

Proc.Nat. Acad.Sci. (Wash) 73: 173-177, 1975.

FISKE SUBBAROW, Y.

J. Biol. Chem., 66: 375, 1925.

FINCH, J.J.; PERUTZ, M.F.; BERTLES, J.F. & DÖBLER, J.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 70: 718-722, 1973.

FLÜCKIGER, R. & WINTERHALTER, K. H.

Febs Lett., 71: 356-360, 1976.

FOCESI, Jr. A.

Tese de livre docência: Ação de efetores alostéricos sobre he
moglobinas de animais de diferentes espécies (1980).

Apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas.

FORTES, P. A. J. & HOFFMANN, J. H.

J. Membrane Biol., 16: 79-100, 1974.

FOX, C. F. & TSUKAGOSHI, N.

in: The Influence of Lipid Phase Transitions on Membrane
Function and Assembly. Membrane Research Fox CF (Ed) pp.145-153
New York and London Academic Press, 1972.

FRYE, L. D. & EDILUI, M.

J. Cell. Sci., 7: 319, 1970.

FUGIL, F.; SATO, T.; TAMURA, A.; WAKATSUKI, M. & KANAHO, Y.

Biochem. Pharm., 28: 613-620, 1978.

FUJITA, S. & CHEVE, H.

Biochim. Biophys. Acta, 382: 172-180, 1975.

GARDOS, G.; SZAZ, I. & ARKY, I.

Acta Biochim. Biophys. Acad.Sc. (Hureg) 1: 253, 1966.

GAREL, M. C.; BENZARD, Y.; THILLET, J.; DOMERIGE, C.; MARTIN, J.;

GALACTEROS, F. & ROSA, J.

Europ. J. Biochem., 123: 513-519, 1982.

GARRET, J.; GROSS, J. & HARDMAN, H.

J. of Pharm. and Exp. Ther., 193: 346-355, 1975.

GERHARD, S.; SCHÖPPE, FREDENBURG, A. & SCHENELL, K. F.

in: Erythrocytes, Trombocytes, Leucocytes.

Gerlach, E.; Moser, K., Deutsch, E. & Willmanns. W. pp-87-92.

Stuttgard, 1973.

GERSONCHE, K. & NICOLAU, C.

Blut, 39: 1-7, 1979.

GILMAN, J. G. & BREWER, G. J.

Biochem.J., 169: 625-632, 1978.

GIBSON, Q. H.

Biochem. J., 42: 13, 1948.

GILSON, Q. H. & PARKHURST, L. J.

J. Biol. Chem., 243: 5521, 1968.

GORSHEIN, D.; OSKI, F. & DELIVORIA PAPADOPOULOS, M.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 147: 616, 1974.

GOODFORD, P. J.

Tips, 307-312, 1980.

GORTER, E. & GRENDAL, F.

J.Exp.Med., 41: 439-443, 1925.

HAEST, C. W. M. & DEUTICKE, N.

Biochim.Biophys. Acta, 401: 468-480, 1975.

HAHN, E. N. & GILLESPIE, E. B.

Arch. Intern. Med., 39: 233-254, 1927.

HASSAU, W.; BENZARD, Y. & ROSA, J.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73: 3288-3292, 1976.

HAUROWITZ, F.

Physiol.Chem., 173: 118, 1928.

HENRY Y. & CASSOLY, R.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 51: 659, 1973.

HERRICK, J. B.

Arch.Intern.Med., 6: 517-521, 1910.

HILL, A. V.

J. Physiol., 40:4, 1910.

HOPPE-SEYLER, F.

Arch. Pathol.Anat., 29: 233, 1864.

HORI, T.; SUGIYAMA, Y.; AWAZU, S. & HANANO, M.

J. Pharm.Dyn., 4: 116-122, 1981.

HUBBELL, W. C. & McCONNELL, H. M.

Proc.Nat.Acad.Sci. (Washi) 64: 20-27, 1969.

HUFNER, G. V.

Arch.Anat.Physiol., 1: 1-27, 1890.

HUISMANN, T. H. J. & DOZY, A. M.

J.Lab.Clin.Med., 60: 302, 1962.

IMAI, K. & MORIMOTO, H & KOTAN, M.

Biochim.Biophys.Acta, 200: 197, 1970.

IMAMURA, T.; FUJITA, S. & OHTA, Y.

J. Clin. Invest., 48: 2341, 1969.

IOPOLLO, C.; AMICONI, J. & CURRELL, D. L.

Vox Sanguinis, 27: 403-410, 1974.

ITO, T. & OHNISHI, S.

Biochim. Biophys, Acta, 352: 29, 1974.

JOST, P.; WAGGONER, A. S. & GRIFFITH, O. H.

in: Structure and Function of Biological Membranes.

(Rothfield L.I. ed.) Academic Press, N.York, 84-144, 1971

JULIANO, R. L.

Biochim. Biophys. Acta (Amst) 300: 341-378, 1973.

KEILIN, J. & SCHMID, K.

Nature, 168: 266, 1948.

KIESOW, L. A.; BLESS, J. W. & SCHELTON, J. B.

Science, 179: 1236, 1973.

KENT, A. S.

Am. J. Med., 41: 762, 1966.

KIESE, M.

Biochem. Z., 316: 264, 1944.

KIILMARTIN, J. V. & ROSSI BERNADI, L.

Nature, 222: 1243, 1969.

KMÜFERMANN, H.; BHAKDI, S. & HOELZE-WALLACH, D. F.

Biochim. Biophys. Acta, 389: 464-476, 1975.

KOMMER, P.

in: Futher Characterization and partial Purification of the Calcium Magnesium, Stimulated Adenosine Triphosphate of Human Erythrocyte Membranes.

Diss ETH submetido ao Instituto Federal de Tecnologia Serviço de Zurique para obtenção de grau de Doutor em Ciências (1978).

KOSHLAND, D. E.Jr.; NEMETHY, G. & FILMER, D.

Biochemistry, 5: 365, 1966.

KOSTER, A. S.

J. Chem. Phys., 56: 3161, 1972.

LANGLEY, J. N.

J. Physiol. Lond. 1: 339-369, 1878.

LANDSBERGER, F. R.; PAXTON, J. & LENARD, J.

Biochim.Biophys. Acta, 266: 1-6, 1971.

LAPPER, R. D.; PATERSON, S. J. & SMITH, I. C. P.

Can.J.Biochem., 50: 969, 1972.

LAWSON, W. H.Jr. & FORSTER, R. E.

J. Appl. Physiol., 22: 970, 1967.

LENFANT, C.; TORRANCE, J. D. & REYNAFARGE, C.

Journ.of Appl.Phys., 50: 5-625-631, 1971.

LENARD, J. & SINGER, S. J.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 56: 1828, 1966.

LENARD, J.

Biochemistry, 9: 1129-1132, 1970.

LENARD, J. & ROTHMAN, J. E.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73: 391, 1976.

LINDSTRON, T. R. & HO, C.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 69: 1707, 1972.

LOVE, W.E.; KLOCK, P.H.; LATTMAN, E.E.; PADEAN, E.A. & WARD, Jr.

K. B.

in: Symposia on Quantitative Biology. vol.VI, pg.349, 1971.

LUZZATI, V.

X Ray Diffraction studies of Lipid-Water System.

in: Biological Membranes. Chapman, D. (ed), pp-71-121.

London and N.York Academic Press, 1968.

MANCHESTER, J.H.; SHELBRUNE, J.H.; OSKI, F.; MULLER, L.D. &

DELIVORIA-PAPADOPOULOS.

Circulation, 45: 11, 109, 1972.

MANNING, J. M. & ALAN M. NIGE

in: Inhibition of Erythrocyte Sickling in vitro by Glyceraldehyde.

in: Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities

p.665, 1978.

MARSHALL LICHTMAN.; MILLER, D. R.; COHEN, J. & WATERHOUSE, C.

Annals of Internal Medicine, 74: 4, 1971.

MAY, A. & HUEHNS, E. R.

Br.J.Haematol., 30: 21-29, 1975.

MAY, A. & HUEHNS, E. R.

Br.Med.Bull, 32: 223-233, 1976.

MASYS, D. R.; BROMBERG, P. A. & BALCERZAK, S. P.

Blood, 44: 885, 1974.

McCONNEL, H. M. & McFARLAND, B. G.

Quart.Rev.Biophys., 3: 91, 1970.

MILLER, L. D.; OSKI, F. A. & DIACO, J. F.

Surgery, 68: 187, 1970.

MOLINARI, P. F.; CHENG, S. K. & SNYDER, L. M.

J.Lab.Clin.Med., 443-446, 1973.

MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEAUX, J. P.

J.Mol.Biol., 12: 88, 1965.

MORIMOTO, H.; LEHMANN, H. & PERUTZ, M. F.

Nature (Lond.) 232:408, 1971.

MOUND, R.

Pluggers Arch.Ges.Physiol., 217: 618-630, 1927.

MÜLLER, W.W.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; MÜLLER, L. D. &

OSKI, F. A.

J.A.M.A., 211:1824, 1970.

MURAYAMA, M.

in: Molecular Hypothesis for the Mechanism of Sickling in

Murayama M and Nabalndian R.M. Sickle Cell Hemoglobin

Molecule to Man.

Little Brown and Company, Boston pg.47, 1973.

MUIRHEAD, H.

J.Mol.Biol., 28: 117, 1967.

MURPHY, J. R.

J.Lab.Clin.Med., 65: 756-774, 1965.

NAGEL, R. L. & BOOKCHIM, R. M.

Clin. Res., 22: 339A, 1974.

NAGEL, R. L.; LYNFIELD, J. & JOHNSON, J.

N.Engl.J.Med., 295: 125, 1976.

NEER, E. J. & KOMIGSBUEG, W.

J.Biol.Chem., 243: 1966, 1968.

NELSON. G. L.

in: Lipid Composition and Metabolism of Erythrocytes. In Blood
Lipids and Lipoproteins: Quantitation Composition and Metabolism.

Nelson, G. J. (ed) pp. 317-386.

New York, London, Wiley Interscience, 1972.

NYKAN, N.; JOHNS, W. M. & NIGEN, A. M.

J.Biol.Chem., 248: 8052-56, 1973.

OELSHLEGEL, F. J.Jr.; BREWER, G. J.; KMETSEN, C., PRASAD, A. S.
& SCHOOMAKER, E. B.

Arch.Biochem.Biophys.Res.Comm., 53: 560-566, 1973.

OGATA, R. & McCONNELL, H. M.

The binding of a spin labeled triphosphate to hemoglobin:
Cold spring Harbor Symp.Quant.Biol., 36: 325, 1971.

Ogata R. & McConnell, H. M.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 69: 334, 1972.

OLSON, J. S. & GILSON, R. H.

J.Biol.Chem., 247: 3662, 1972.

OSKI, F.A.; GOTTLIEB, A.J.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. &
MILLER, W.W.

N.Engl.J.Med. 280: 1165, 1969.

PANIKER, N. V.; BEN-BASSAT, I. & BEUTLER, E.

J.Lab.Clin.Med. 80: 282, 1972.

PAULING, L.

Proc.Natl.Acad.Sci., 21: 186, 1935

PEISACH, J. & BLUMBERG, W. E.

in: Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin

- Abnormalities

Academic Press, pp-619, 1978.

PERUTZ, M.F.

J.Mol.Biol., 13: 646, 1965.

PERUTZ, M. F.

Nature, 228: 734, 1970.

ROUSSELET, A. & DEVAUX, P. F.

Febs Lett., 93: 161, 1978.

RUBACALVA, B. & MARTINEZ de MUÑOZ & GITLER, C.

Biochemistry, 8: 2743, 1969.

SALHAMY, J. M.; MATHERS, D. H. & ELIOTE, R. S.

J.Biol.Chem., 247: 6985, 1972.

SIMON, S. R. & KAMIGSBERG, W. H.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 56: 749, 1956.

SCHOENBORN, B. P. & BARRY E. NORTH

in: Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities

Edited by Winslow S. Caughey.

Academic Press p.591, 1978.

SMOLIN, M. F.; ZANJANI, E. D.; HOFFMAN, R. & WASSERMAN, L. R.

Clin.Res., 23: 583A, 1975.

SHOLET, S. B.; NATHAN, D. G. & KARNOVSKY, M. L.

J.Clin.Invest., 47: 1096, 1968.

SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L.

Science, 175: 720-731, 1972.

STAROS, J. V. & RICHARDS, F. M.

Biochemistry, 13: 2720-2726, 1974.

SCANDELLA, G. J. & DEVAUX, P. & McCONNELL, H. M.

Proc.Nat.Acad.Sci., USA 69: 2056, 1972.

SCHREIER Shirley

in: Estudos Estruturais e Dinâmicos de Membranas pelo Método de Marcador de Spin.

Tese de Livre Docência, Instituto de Química, USP, 1979.

PERUTZ, M. F.

Nature (New Biol.) 237: 495, 1972.

PERUTZ, M. F.; LADNER, J. E.; SIMON, S. R. & HO, C.

Biochemistry, 13: 2163, 1974.

PETERS, R. A.

J. Physiol. (London) 44: 131, 1912.

PHILLIPS, D. R. & MORRISON, M.

Biochemistry, 10: 1766-1771, 1971.

RIGGS, A.

J. Biol. Chem., 236: 1948, 1954.

RIGGS, A.

J. Biol. Chem., 236: 1948-1954, 1961.

ROSE, Z. B.

J. Biol. Chem., 243: 4810, 1968.

ROSENMEYER, M. A. & HUCHNS, E. R.

J. Mol. Biol., 25: 253, 1967.

ROSENTHAL, A.; LITWIN, S. B. & LEWER, M. D.

Invest. Radiol., 8: 191, 1973.

ROSSI FANELLI, A.; ANTONINI, E. & MANDОВI, B.

Clin. Chim. Acta, 2: 476-480, 1957.

ROSSI FANELLI, A.; ANTONINI, E. & CAPUTO, A.

Biochim. Biophys. Acta, 39: 608, 1958.

ROSSI FANELLI, A.; ANTONINI, E. & CAPUTO, A.

J. Biol. Chem., 236: 391, 1961.

SANDERBERG, H. E.; BRYANT, R. G. & PIETTE, L. H.

Arch. of Biochem. and Biophys., 133: 144-152, 1969.

SHU CHIEN

in: Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements.

capt.19.

University Park Press, Baltimore, 1976.

SINGER, S. J.

Ann.Rev.Biochem., 43: 805-833, 1974.

SCOTT, E. M.

Journal of Clin.Invest., 39: 1176-1179, 1960.

SECHELER, W.

Acta Biol.Med.Germ., 5: 382, 1960.

SHAPPEL, S.; MURRAY, J. K.; NASSER, M.; WILLS, R.; TORRANCE, J.

& LENFANT, C.

The New Engl.J.of Med., 282: 1219-1222, 1970.

SASS, M. D.; CARUSO, C. J. & FARHANGI, M.

J.Lab.Clin.Med., 70: 760, 1967.

SANDBERG, H.; BRYANT, R. & PIETTE, L.

Arch.of Biochem. and Biophys., 133: 144-152, 1969.

SINGER, M. A.

Can.J.Physiol.Pharmacol., 51: 523-530, 1973.

SCHLETZ, M. P. & SINGER, S. J.

Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash) 71: 4457-4461, 1974.

SCHEINER, R. G.; ATKINS, R. J. & HOSTY, T. S.

Biochim.Biophys.Acta, 400: 365, 1975.

SCHRADER, J.; BERNE, R. & RUBIO, R.

Ann.J.of Phys., 223: 159, 1972.

SCOTT, E. M.

in: Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism.

Edited by Bentler, Grune, Straton. N.York, 1968.

TARDIEU, A.; LUZZATI, V. & REMAN, F. C.

J.Mol.Biol., 75: 711-733, 1973.

TEISCHMAN, N. L.

Z.Ration.Med. (NS) 3: 374, 1853.

TRAUBLE, H.

Naturwissenschaften, 58: 277-284, 1971.

Van DEENEN, L.L.M. & DEFIER, J.

in: Lipids of the Red Cell.

Dim (ed) pp.147-211

New York and London. Academic Press (1974)

VERSMOLD, H.; HORN, K.; WINDTHORST, H. & RIEGEL, K. P.

Resp.Physiol., 18: 26, 1973.

VERKLIIG, A. J.; ZWAAL, R. F. A.; ROELOJSEN, B. ; COMPIRINS, P.;

Kasting, D. & Van DEENEN, L. L. M.

Biochem.Biophys.Acta, 323: 1781-1791, 1973.

VERMA, S. P.; BERLINER, L. J. & SMITH, I. C. P.

Bioch.Biophys.Res.Comm., 53: 704-709, 1973.

WALDECK, F.

Pfluegers.Arch., 295: 1, 1967.

WALLARCH, D. F. H. & ZAHLER, H. P.

Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash) 56: 1552-1559, 1966.

WEBER, G.

in: Molecular Biophysics Academic Press New York, p.369
1965.

WEED, R. I.; IACELLE, P. L. & MERRILE, E. W.

J.Clin.Invest. 48: 795, 1969.

WERTZ, J. & BALTON, J. R.

in: Eletron Spin Ressonance.

Mc Grw Hile, N.York, 1972.

WHITE, J. M.

Biochimie, 54: 657, 1972.

WISNIESKI, B.J.; PARKES, J.C.; HNAUG, Y.O. & FOX, C.F.

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 71: 438, 1974.

WILKINS, M. H. E.; BLAUROCK, A. E. & ENGLEMAN, D. M.

Nature (Lond) New Biol., 230: 72-76, 1971.

WYMAN, J.

Advan. Protein Clin., 4: 407, 1948.

WYMAN, J.

Adv.Protein Chem., 19: 223, 1964.

WOLFGANG OSTWALD

in: Handbook of Phyiology. Sect 3. Respiration. vol.

(Ed. Wallace, O., Fenn Herman Rahn) 1964.

ZAK, S.J.; GELLER, G.R.; FINKEL, B.; TUKEY, D.P.; Mc CORMACK, M.K.
& KRIVET, W.

Proc.Natl.Acad.Sci..USA 72: 4152-56, 1975.

ZWAAL, R. F. A.

Biochem.Soc.Trans., 2: 821-825, 1974.

YANG, J. T.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 63: 232-238, 1975.