

SATIE HATSUSHIKA OGO

ESTRUTURA E FUNÇÃO EM HEMOGLOBINAS DE SERPENTES

H. modestus e *L. miliaris*

Tese apresentada ao De-
partamento de Bioquímica,
Instituto de Biologia -
Universidade Estadual de
Campinas para o Concurso de
Livre-Docência na Área de
Química Biológica

CAMPINAS - S.P.

-1987-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A memória de
meus pais.

Ao meu esposo
e filhos.,

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Renato Costa Souza, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas; ao Prof. Dr. Antonio Celso Novaes Magalhães, DD. Diretor do Instituto de Biologia; ao Dr. Benedito de Oliveira, Chefe do Departamento de Bioquímica, pelo apoio às pesquisas realizadas neste Departamento.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Jr. Prof. Titular do Departamento de Bioquímica - UNICAMP, meu profundo reconhecimento e gratidão pelo apoio e incentivo desde o início de minha carreira científica.

A Profa Dra Maria S. A. Matsuura, pela valiosa colaboração científica.

A Profa Dra Nilce Correa Meirelles, Diretora Associada do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo espírito de colaboração e sugestões valiosas.

A Sra Anna Gagliardi, Bibliotecária-Chefe do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo esmero e dedicação na revisão da referência bibliográfica.

A Dra Carmen Lúcia dos Santos Cordeiro, Seção de Herpetologia - Instituto Butantã-SP, pela doação e classificação das serpentes utilizadas neste trabalho.

Aos Professores Dr. Joseph Bonaventura e Dra Célia Bonaventura, co-Diretores da Duke University Marine Biomedical Center, North Carolina, U.S.A., pelo apoio e colaboração científica que possibilitaram a obtenção de resultados complementares dos estudos apresentados na presente tese.

A Sra Ester da Rocha e Sra Clair Bellobraydic pelos auxílios técnicos.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UNICAMP,, que contribuíram para a realização do presente trabalho.

A Sra Stella Maria Coelho Favier pelo trabalhos de digitação do texto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq), que sempre nos tem distinguido com seus apoios.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	MATERIAL E METODOS	17
2.1.	Reagentes e Equipamentos	17
2.2.	Material Biológico	18
2.3.	Separação Eletroforética dos Componentes de Hemoglobina em Gel de Amido	20
2.4.	Separação de Componentes de Hemoglobina por Eletroforese em Disco de Policrilamida	21
2.5.	Separação dos Componentes por Cromatografia de Troca Iônica.....	23
2.6.	Separação de Determinação do Ponto Isoelétrico de Hemoglobina por Focalização Isoelétrico em Gradiente de Sacarose.....	24
2.7.	Determinação de Ácido Lático e NTP no Sangue Total das Serpentes <i>H.nodestus</i> e <i>L.niliaris</i>	25
2.8.	Determinação da Concentração de Hemoglobina no Sangue de <i>H.nodestus</i> e <i>L.niliaris</i>	27
2.9.	Método Tonométrico para a Estimativa dos Parâmetros Log P50 e Coeficiente de Hill	28
2.10.	Titulação da Hemoglobina com NADPH	29

2.11.	Determinação do Peso Molecular da Hemoglobina de <i>L.miliaris</i> por Filtração em Gel	30
2.12.	Estudo da Curva de Ligação do Oxigênio em Altas Concentrações de Hemoglobina pelo Método de Canada Delgada HEM-O-SCAN.....	31
2.13.	Medida Detalhada da Curva de Equilíbrio de Oxigenação pelo Método de Imai	32
3.	RESULTADOS.....	35
3.1.	Eletroforese dos Hemolisados de <i>H.modestus</i> e <i>L.miliaris</i>	35
3.2.	Cromatografia dos Hemolisados de <i>H.modestus</i> e <i>L.miliaris</i>	39
3.3.	Separação e Determinação do Ponto Isoelétrico dos Componentes por Focalização Isoelétrica em Gradiente de Sacarose	41
3.4.	Determinação do Ácido Lático no Sangue de <i>H.modestus</i> e <i>L.miliaris</i>	44
3.5.	Determinação da Concentração de Hemoglobina e Nucleotídeo Trifosfato no Sangue.....	46
3.6.	Equilíbrio da Hemoglobina com Oxigênio.....	48
3.7.	Análise Fluorimétrica da Interação do NADPH com a Hb de <i>L.miliaris</i>	52
3.8.	Medida das Constantes de Afinidade entre a DesoxiHb e OxiHb com o ATP e NADPH	57

3.9.	Influência dos Moduladores Alostéricos na Manutenção da Estrutura Quaternária da Mb de <i>L.miliaris</i> : Determinação do Peso Molecular.....	59
3.10.	Método Espectrofotométrico de Camada Delgada para Determinação da Curva de Ligação do Oxigênio à Solução de Hemoglobina de <i>L.miliaris</i> (HEM-G-SCAN).....	63
3.11.	Medida de Equilíbrio de Oxigenação pelo Método de Imai.....	63
4.	DISCUSSÃO.....	66
5.	RESUMO.....	85
6.	SUMMARY.....	88
7.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	91

ABREVIATURAS

ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
β NAD	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
β NADH	- β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
CM-celulose	- Carboximetil-celulose
DEAE-Sephadex	- Dietilamino-etil-Sephadex
2,3-DPG	- 2,3-Difosfoglicerato
EDTA	- Etileno-diamino-tetracético ácido
G-6-PDH	- Glicose-6-fosfato desidrogenase
Hb	- Hemoglobina
IHP	- Inositol hexafosfato
IPP	- Inositol pentafofosfato
LDH	- Lactato desidrogenase
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NTP	- Nucleotídeo trifosfato
TEMED	- N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
Tris	- Tris (hidroximetil)-amino-metano

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento da correlação estrutura-função nas moléculas de proteínas é problema antigo e continua sendo objetivo fundamental de muitos pesquisadores em bioquímica. A hemoglobina, graças aos intensivos estudos e, portanto, aos amplos conhecimentos adquiridos de suas propriedades, constitui um excelente modelo molecular para o estabelecimento dessa correlação. Evidentemente, ocorrendo em grandes concentrações nos animais superiores e podendo ser facilmente purificada a hemoglobina foi alvo de pesquisadores de diferentes áreas como químicos, físicos, matemáticos, etc mais interessados em suas peculiaridades moleculares que propriamente em sua função. As idéias modernas sobre alosterismo enzimático, por exemplo, foram desenvolvidas através dos estudos da correlação estrutura-função de hemoglobina, possibilitando um grande avanço no conhecimento de proteínas em geral (Briehl, 1963).

A hemoglobina humana é, sem dúvida, a mais estudada tanto do ponto de vista funcional, como estrutural e ontogênica. Os conhecimentos atuais sobre a estrutura tridimensional de hemoglobina bem como os mecanismos envolvidos em sua função resultam praticamente dos estudos

em hemoproteínas de mamíferos, e, somente mais recentemente, é que estudos em vertebrados inferiores tem despertado interesse.

O conhecimento das propriedades da hemoglobina de répteis particularmente de serpentes embora ainda escassos parecem ser relevantes uma vez que podem representar instrumento valioso no auxílio da análise dos mecanismos moleculares que parecem operar nas hemoglobinas de animais superiores como procuramos demonstrar nesta tese. Além disso, pode fornecer informações sobre os mecanismos adaptativos desenvolvidos por diferentes organismos para atender as necessidades respiratórias peculiares de cada espécie.

O papel fisiológico fundamental das proteínas respiratórias é a manutenção adequada do suprimento de oxigênio aos tecidos animais para que o gás seja utilizado nos sistemas de oxidações biológicas. Quando as proteínas respiratórias ocorrem no sangue, elas servem para transportar oxigênio do meio externo aos tecidos periféricos; neste caso, tem também papel proeminente no transporte de CO₂, produto final do metabolismo. Em geral a concentração das proteínas respiratórias depende de fatores tais como idade do animal ou das condições ambientais (especialmente aquelas envolvendo pO₂ externo) (Antonini and Brunori, 1974).

As funções das proteínas respiratórias que ocorrem no

sangue são estritamente correlacionadas com os sistemas envolvidos na circulação e com os aparelhos onde a troca gasosa tem lugar tais como pulmões e brânquias. Suas propriedades químicas variam em diferentes espécies para preencher as necessidades fisiológicas dos organismos. Neste aspecto, a hemoglobina, talvez, ofereça o melhor exemplo de adaptação biológica no nível molecular (Antonini and Brunori, 1974).

Em geral a arquitetura molecular das hemoglobinas presentes nas células vermelhas de vertebrados parece ser constante, embora algumas propriedades estruturais mais detalhadas possam variar nas diferentes classes de animais. Assim, são moléculas tetraméricas formadas por 2 pares de cadeias polipeptídicas, α e β (Braunitzer et al, 1961, Konigsberg et al, 1961, Schroeder, 1963), organizadas como um tetraedro irregular. As cadeias α e β das hemoglobinas de diferentes espécies tem sequência de aminoácidos similares especialmente nas partes das cadeias polipeptídicas que são consideradas críticas para a função, como a sequência C-terminal Arg-Tyr nas cadeias α e His-Tyr nas cadeias β invariáveis em todas as hemoglobinas de mamíferos estudadas (Antonini e Brunori, 1974). Variações podem ser encontradas em outras espécies não mamíferas, onde a histidina C-terminal, por ex., pode ser substituída por outros resíduos e isso seguramente causa importantes mudanças nas propriedades funcionais da proteína.

A estrutura da hemoglobina muda com a ligação de certas substâncias orgânicas e inorgânicas de baixo peso molecular chamadas ligantes; é usualmente aceito que essas mudanças conformacionais representam a base física para o fenômeno que dominam as reações da hemoglobina. O fenômeno, em geral, não é restrito à hemoglobina e a transição conformacional parece estar envolvida no mecanismo regulatório ao nível molecular (Monod et al, 1965). Na hemoglobina, a mudança conformacional dependente de ligante envolve a estrutura terciária e quaternária da proteína. Isto foi elucidado em detalhes através de estudos cristalográficos em desoxihemoglobina e derivados ligados com ligantes e pelas medidas de propriedades das soluções (Muirhead et al, 1967, Perutz, 1970, Antonini and Brunori, 1971).

O equilíbrio da hemoglobina com vários ligantes mostra a mesma característica básica, independente do tipo de ligante. Os vários ligantes diferem, somente no valor absoluto da constante de afinidade; as curvas de ligação de O_2 e CO , por ex., podem ser superpostas com o uso de uma escala apropriada que representa o coeficiente de partição (Wyman, 1964).

A forma da curva de oxigenação das hemoglobinas de mamíferos é sigmoidal com um valor do coeficiente de Hill, nH , cerca de 2,5-3,0 (Antonini and Brunori, 1971). A forma da curva, pelo menos na hemoglobina humana, não muda

significativamente com pH (de 5 a 9, a uma concentração de proteína de poucos mg/ml), temperatura e concentração de sais, condições que afetam fortemente a afinidade (Roughton, 1955, Rossi-Fanelli et al, 1961).

Baseado em estudos químicos e cristalográficos de hemoglobina humana normal e modificada, tentativas tem sido feitas no sentido de identificar, em detalhes, os eventos físicos que comandam a cooperatividade ou ligação de ligantes (Antonini and Brunori, 1974). De acordo com o mecanismo estereoquímico proposto por Perutz, 1970, a ligação do ligante à hemoglobina desoxigenada induz mudanças na estrutura terciária das cadeias e causa ruptura de pontes salinas. A ruptura dessas pontes resultam, num certo estágio, numa transição da estrutura quaternária da hemoglobina desoxigenada T (tensa) ou estado de baixa afinidade para a estrutura quaternária correspondente à hemoglobina oxigenada R (relaxada) ou estado de alta afinidade (Monod et al, 1965, Koshland et al, 1966, Perutz, 1970).

Geralmente a afinidade de hemoglobinas de diferentes mamíferos por oxigênio é similar sob as mesmas condições e é igualmente afetada pelas mudanças na composição do meio. Alterações na afinidade devidas aos componentes dos solventes implicam nas relações termodinâmicas recíprocas entre a ligação do ligante ao ferro heme e a ligação de outros componentes a outros sítios. Estes efeitos

heterotrópicos assim como os homotrópicos (do oxigênio) encontram explicação física nos efeitos conformacionais (Wyman, 1964).

O efeito Bohr, originalmente descrito como o efeito do CO₂ sobre a afinidade da Hb-O₂, é atualmente considerado como efeito ao pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Nas hemoglobinas de mamíferos a afinidade é mínima num pH próximo a 6,0; o aumento dessa afinidade em pHs mais alcalinos é chamado efeito Bohr "alcalino", e em pHs mais ácidos, efeito Bohr "ácido". Qualquer que seja o mecanismo, o efeito Bohr implica na mudança do pK de grupos ionizáveis com a ligação de ligantes. Diversas linhas de evidência indicam que, pelo menos no limite alcalino, o efeito Bohr origina da mudança conformacional intra cadeia (Antonini et al, 1965, Brunori et al, 1970). A importância do resíduo de histidina no efeito Bohr, foi apontada há muitos anos, por Wyman, 1948 baseado nos estudos químicos e confirmada, posteriormente, pelas evidências de cristalografia em Raio-X por Perutz, 1970. Os resíduos de aminoácidos responsáveis pelo efeito Bohr foram identificados por Perutz et al, 1969, Kilmartin and Rossi-Bernardi, 1969 como sendo: histidina C-terminal 146 das cadeias β , valina 1 e histidina 122 das cadeias α . A mudança de pK dos grupos relevantes ocorrem devido a mudança na interação eletrostática causada pela mudança conformacional.

A curva de dissociação da hemoglobina é modificada também pela presença de outros ions na solução. De grande importância fisiológica é o efeito de polifosfatos orgânicos (Benesch and Benesch, 1967; Chanutin and Curnish, 1967) que são componentes normais dos eritrócitos na maioria das espécies. No homem, são representados principalmente pelo 2,3-DPG e ATP. Em outros animais pelo ATP, IHP (IPP) ou GTP (Rapoport and Guest, 1941, Johnson and Tate, 1969). A concentração de 2,3-DGP nos eritrócitos de mamíferos é aproximadamente equimolar a da hemoglobina, cerca de 5 mM (Arnone, 1972) e acredita-se que desempenha papel relevante na regulação das propriedades respiratórias do sangue (Benesch and Benesch, 1969). Apesar do ATP estar também presente em alta concentração (cerca de 1,3 mM) acredita-se que sua contribuição na regulação da hemoglobina pelo oxigênio é pequena devido a sua alta afinidade por ions Mg^{++} intracelulares reduzindo consideravelmente o papel do nucleotídeo como modulador alostérico (Bunn, 1971).

O difosfoglicerato regula o transporte de oxigênio mediante sua ligação preferencial com a desoxihemoglobina numa razão de 1 mol DGP/mol Hb tetramérica, sem diminuir a natureza cooperativa da ligação do ligante (Arnone, 1972). Portanto, o deslocamento da curva de dissociação no sentido de menor afinidade reflete a energia requerida para a dissociação do 2,3-DGP da desoxihemoglobina (Benesch and

Benesch, 1970).

Recentemente foi descrito que outros ânions polifosfatos, os nucleotídeos de nicotinamida oxidados ou reduzidos, NADH, NADP⁺, NADPH tem efeito alostérico sobre a hemoglobina humana e existe a possibilidade que estas interações tenham importância fisiológica (este efeito foi descrito em nosso laboratório e publicado em 1986 em colaboração: Cashon et al, 1986). Por suas características de fluorescência, o NADPH, torna-se um efector alostérico muito conveniente não somente para se estudar sua estequiometria e afinidade de ligação, mas também para acompanhar a mudança conformacional que ocorre com a ligação do ligante à molécula de hemoglobina (Ogo et al, 1987a).

Diversos estudos bioquímicos sobre a localização do sítio de ligação do DPG em particular os trabalhos de Bunn and Briehl sobre uma variedade de hemoglobinas humanas anormais apontaram a relevância dos resíduos de aminoácidos His H21(143) β e aminogrupos N-terminal da cadeia β . (Bunn and Briehl, 1970). Quando Perutz examinou esta região no modelo atômico da desoxiHb de cavalo, encontrou que a molécula de DPG pode-se acomodar na abertura da cavidade central formada com a valina NA(1), lisina EF6(82) e histidina NA(2) e H21(143) de ambas as cadeias β .

A estereoquímica do DPG complementa os resíduos básicos da cavidade central para formar pontes salinas com

a valina 1, histidina 2 e 143 de ambas as cadeias β e com a lisina 82 de uma das cadeias β (Perutz, 1970). Com a oxigenação da hemoglobina, os resíduos N-terminais das cadeias β se movem e a cavidade se fecha de forma que a estereoquímica complementar é perdida. A oxihemoglobina também se liga ao 2,3-DPG, mas muito mais fracamente (Arnone and Perutz, 1974) e o sítio de ligação é ainda desconhecido. As medidas de ressonância nuclear magnética sugerem que o sítio está também localizado ao longo da interface entre as cadeias β (Gupta et al, 1979) e se liga, como na desoxihemoglobina, com uma estequiometria igual a 1 (Van Beek and De Bruin, 1979).

Em 1986, Benesch et al, demonstraram que a oxihemoglobina em sua forma dimérica também se liga ao ATP e ao DPG com alta afinidade, i.é, com uma afinidade relativa de aproximadamente 1/4 do valor da desoxiHb tetramérica.

Outras informações sobre a ligação do DPG vieram dos estudos de interação do cofator com as cadeias α e β isoladas da hemoglobina A (Benesch et al, 1968). O DPG não se liga às cadeias α ; as sub-unidades β , por outro lado, liga 1 mol de DPG/ β_4 tetramero, exatamente igual à desoxiHb A, embora com afinidade ligeiramente menor. Em contraste à Hb A, o complexo β_4 -DPG é formado igualmente bem em presença ou ausência de oxigênio e por isso, a oxigenação das cadeias β não é afetada pelo DPG. As moléculas β_4 retêm a

sua conformação T mesmo sob a forma oxigenada. Inúmeros fatores ambientais influenciam a reação do DPG com a desoxiHb A. As pequenas moléculas que tem alta afinidade com as formas oxi e/ou desoxi da Hb influenciam a afinidade de maneira recíproca. O efeito Bohr é o exemplo mais familiar, onde a grande afinidade de prótons pela desoxiHb (exatamente como DPG) resulta no decréscimo de sua afinidade pelo oxigênio. A interrelação entre a ligação de ions H^+ e DPG pela Hb é, portanto, particularmente relevante. A interação do ânion polivalente com grupos catiônicos da proteína torna-se mais forte com o decréscimo de pH. Os valores do efeito Bohr em presença do 2,3-DPG em excesso são idênticos aos encontrados na Hb "stripped" (Benesch and Benesch, 1970).

De especial interesse para nós é a interação entre as cadeias de hemoglobinas uma vez que, como veremos, ela se tornou "leit motiv" do presente trabalho. Assim passamos a descrevê-lo.

No tetramero, as cadeias α e β se mantêm juntas através das interações não covalentes. O contacto entre cadeias similares, α - α e β - β são muito menos numerosas do que entre cadeias diferentes. Dois tipos de contacto podem se distinguir entre as cadeias α e β , $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_1\beta_2$ (Perutz, 1965). Estudos de cristalografia em raio X de hemoglobina tetramérica mostraram que a maior parte das mudanças mais drásticas que ocorre na conversão da estrutura da desoxi a

oxiHb, ocorre ao longo da interface $\alpha_1\beta_2$ (Perutz, 1970; Fermi, 1975; Ladner et al, 1977; Baldwin and Chothia, 1979). Os estudos comparativos com mutantes de hemoglobina humana com substituição de aminoácido no contacto $\alpha_1\beta_2$ indicaram que rompimento de pontes de hidrogênio localizadas ao longo dessa interface pode ser a chave da transição $T \rightleftharpoons R$ e da cooperatividade entre as sub-unidades na ligação do oxigênio MacDonald et al, 1985. Portanto, a conservação estrutural na região de contacto de ambas as sub-unidades é essencial para a afinidade e cooperatividade de ligação de ligantes na hemoglobina. Em solução, a hemoglobina tetramérica está em equilíbrio dinâmico com dímeros e monômeros. O balanço do equilíbrio depende de diversos fatores, incluindo a natureza do ligante no átomo de ferro, concentração da hemoglobina, concentração de eletrólitos neutros e de íons hidrogênio (Rossi-Fanelli et al, 1964, Wyman, 1964). A dissociação que ocorre parece ser do tipo assimétrico, onde $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$. A dissociação simétrica não foi observada (Rosemeyer and Huens, 1967; Antonini and Brunori, 1971). A dissociação em monômeros pode ser detectada por métodos sensíveis até mesmo sob condições fisiológicas de pH e concentração de eletrólitos (Guidotti et al, 1963) mas concentração apreciável de monômeros aparece somente em pH abaixo de 4,9 e acima de 11 em hemoglobina humana A.

No interior dos eritrócitos a hemoglobina está num

meio fisiológico e portanto, as propriedades do sangue total são diferentes das soluções de proteína "stripped" e derivam das propriedades intrínsecas das hemoglobinas e das modificações que estas sofrem quando se ligam aos íons e moléculas efetoras como H^+ , CO_2 , 2,3-DPG, ATP, IHP, Cl^- , NADPH, etc.,

Os mecanismos que controlam a reação de oxigenação de hemoglobinas de répteis e em particular, de serpentes, possivelmente não diferem fundamentalmente dos de mamíferos e estão rigorosamente adaptados às necessidades respiratórias de cada espécie de sorte que animais completamente aquáticos teriam adaptações funcionais e estruturais mais profundas do que as espécies semi-aquáticas, em resposta às demandas respiratórias num meio pobre de oxigênio. (Smith et al, 1966). Assim, répteis, anfíbios e peixes tem, geralmente, grande multiplicidade de componentes de hemoglobina quando comparados com mamíferos (Riggs, 1970); isto poderia refletir alguns fatores fisiológicos importantes relacionados com a vantagem que tal multiplicidade pode conferir ao animal em resposta às alterações ambientais (Brunori et al, 1973). Da mesma forma, os animais poiquilotermos estão constantemente sujeitos à grande variabilidade de temperatura e pressão de oxigênio ambiental e assim, é possível que as hemoglobinas sejam sintetizadas de forma que tenham diferentes propriedades ou

talvez, em decorrência da considerável oscilação metabólica, os animais necessitem de hemoglobinas múltiplas com propriedades funcionais também múltiplas (Riggs, 1970).

Sendo o assunto da presente tese hemoglobinas de répteis, julgamos conveniente tecer algumas considerações sobre estes animais. A grande diversidade de animais encontrada entre os répteis torna esse grupo extremamente interessante para estudar as adaptações fisiológicas de suas hemoglobinas. Em nenhum outro grupo de vertebrados ocorrem tal variedade de "habitat", atividade e metabolismo. Flutuações na pressão osmótica, pH e composição de eletrólitos do sangue que seriam letais para outros vertebrados, são perfeitamente normais para muitos répteis (Wood and Lenfant, 1976).

Os répteis mergulhadores e os que vivem nas tocas, frequentemente estão expostos à falta de oxigênio por períodos prolongados (Andersen, 1966). Assim, os crocodilos, lagartos e ofídios estão usualmente aptos a sobreviver cerca de 45 minutos em completa ausência de oxigênio. A tolerância é maior ainda entre as tartarugas. Do exposto pode-se notar grande preocupação entre os pesquisadores por um estabelecimento mais definitivo possível de como a hemoglobina funciona em condição em que os suprimentos de oxigênio são escassos ou muito abundantes e quais são as diferenças responsáveis por estas adaptações fisiológicas.

Inúmeros pesquisadores chamam a atenção na correlação entre metabolismo fisiológico e o modo de vida dos répteis (Bennet, 1973, Bennet and Dawson, 1976), porém as características adaptativas do sangue assim como as propriedades funcionais de suas hemoglobinas receberam atenção esporádica. Dentre esse grupo de animais, as serpentes tem despertado nosso particular interesse para os estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas visto que, dos vertebrados terrestres, os ofídios, possivelmente, sofreram a mais intensa irradiação adaptativa, em contraste à extinção ou estagnação evolucionária de outros répteis e podem ainda estar em processo adaptativo (Romer, 1966).

Diversos trabalhos recentes focalizaram atenção na correlação entre o metabolismo e as propriedades funcionais das hemoglobinas de serpentes semi-aquáticas, uma vez que a vida aquática dos animais, somente tornou-se possível, mediante adaptação das hemoglobinas que torna viável o transporte de oxigênio em ambiente deficiente desse gás (ABE, 1977; Ogo et al, 1979, Ogo and Focesi, 1979).

O estudo das propriedades funcionais de duas espécies de serpentes de "habitat" aquático, pertencentes à família Colubridae, *Helicops modestus* e *Liophis miliaris* revelou que ambas possuem alta afinidade pelo oxigênio, pequena cooperatividade com valor de nH próximo a 1,0, grande afinidade por fosfatos orgânicos como ATP, IHP, 2,3-DPG. Os valores de efeito Bohr, na ausência de efetores

alostéricos calculados em pH entre 6,5 e 8,0 foram pequenos (da ordem de -0,07 na *H.modestus* e -0,30 na *L.miliaris*) porém na presença de ATP houve um grande incremento nestes valores, passando a aproximadamente -0,55 na *H.modestus* e a -0,90 na *L.miliaris*. Ao mesmo tempo, verificou-se alteração na interação heme-heme na presença de ânions polifosfatos, i.e., em pH menores que 7,5, o valor de nH aumentou gradativamente até atingir o valor nH=2,0 (pH 6,5) em Hb de ambas as espécies (Ogo et al, 1979).

Além do "habitat" outro fator que parece determinar mudanças funcionais nas hemoglobinas é a taxa metabólica. Serpentes altamente ativas que fogem em alta velocidade quando ameaçadas, utilizam energia que provém da via aeróbica e anaeróbica (Ruben, 1976; Ogo and Focesi, 1979). Tanto a *H.modestus* quanto a *L.miliaris* (Ogo and Focesi, 1979) apresentaram pequenos níveis basais de ácido láctico e responderam a estimulação elevando o seu conteúdo e, portanto, recorrendo ao metabolismo anaeróbico durante atividade forçada.

Nas serpentes aquáticas, durante o mergulho voluntário, a concentração de lactato permanece baixa, indicando que a maior parte do metabolismo nestes organismos é de origem aeróbica e não ocorre acúmulo de CO₂ devido à capacidade que possuem os animais em eliminá-lo por via cutânea (Graham, 1974, Heatwole and Seymour, 1975).

A elevada concentração de hemoglobina em mamíferos e

aves mergulhadoras tem função de reserva de oxigênio (Andersen, 1966) mas isto é difícil generalizar para répteis devido a sua alta variabilidade (Dessauer, 1970). Além disso, significativa concentração de metahemoglobina ocasionalmente observada em serpentes, reduz a capacidade de reserva de oxigênio pela hemoglobina. Prado, 1946 reportou 17% de metehemoglobina em *Bothrops jararaca* e Pough, 1969, de 14 a 21% em outras espécies de serpentes.

Neste contexto, o estudo comparativo sobre a correlação estrutura-função das hemoglobinas das duas espécies de serpentes *H.modestus* e *L.miliaris* adquire significância que vai além de seu interesse fisiológico mas tende para a compreensão dos mecanismos de controle geral que operam nestas proteínas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes como NADPH, IHP, ATP, 2,3-DPG, utilizados nos experimentos foram obtidos da Sigma.

Os espectros de absorção foram obtidos com um Cary 14 UV-VIS Spectrophotometer ou com um modelo 8451 A Diode Cary Spectrophotometer (Hewlett Pakard) ou ainda com um espectrofotometro Varian, série 634. Para as medidas espectrofluorimétricas foi utilizado fluorômetro "Fluorog 2 séries Spectrofluorometer". Os experimentos de equilíbrio com oxigênio, e de fluorescência que exigiam cuidadoso controle de pressão parcial de oxigênio sobre a amostra foram realizados num tonômetro contendo acoplada uma cubeta de vidro ou quartzo. Foi também utilizado o aparelho "HEM-O-SCAN Oxigen Dissociation Analyser" Travenol Laboratories, Instrument Div., Savage Maryland, para estudo de ligação de oxigênio pelo método da camada delgada. A célula de Imai foi usada acoplada ao espectrofotometro Cary 219 e ao microcomputador Apple Plus II. Para analisar os dados obtidos na célula de Imai, utilizamos o Compuro

System 8116.

Foram também empregados outros equipamentos básicos como "pH Meter HM-7A" Toa Electronics Ltd, coletor de fração Buchler, bomba de vácuo, Precision Scientific CO, model 25, Centrífuga Eppendorff 3.200, balança analítica Sartorius, tipo 2443, balança semi preparativa Mettler, fonte elétrica Thomas modelo 21, lâmpada ultra violeta mineralight UVSL-25, High Voltage Power Supply, Savant Instrument, Inc., Recirculating cooler, Savant Instrument, Inc.

Os cálculos foram feitos com o auxílio de microcomputador Apple Plus II, Itautec ou IBM.

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Serpentes adultas de ambos os sexos, das espécies *Helicops modestus* (Gunter, 1861) e *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758) pertencentes à família Colubridae foram utilizadas. Os animais da espécie mais aquática *Helicops modestus* pesavam aproximadamente 50g e mediam cerca de 60cm. A espécie mais anfíbia *Liophis miliaris* apresentava cerca de 150g e 100cm de comprimento. Os exemplares foram gentilmente doados pelo Instituto Butantã-São Paulo, através da Dr^a Carmen Lúcia dos Santos Cordeiro, Seção de Herpetologia.

O sangue das serpentes foram coletados via arco sistêmico esquerdo ou por punção cardíaca usando a heparina como anticoagulante (50µl de heparina 500 UI/ml). Após a separação das células por centrifugação, as hemácias foram lavadas por 3 vezes com 10 volumes de solução 1,8% de NaCl contendo 1 mM EDTA pH 7,0. A hemólise foi feita com 2 volumes de 1 mM EDTA pH 7,0.

Para a obtenção de hemolisado isento de impurezas de baixo peso molecular contidas nos eritrócitos, a solução de hemoglobina foi submetida à diálise através de coluna de Sephadex G-25 (2,5 x 20cm) e em seguida à cromatografia de troca iônica (2,5 x 50cm) do tipo "mixed bed resin", Amberlite MB-3 que é uma mistura de Amberlite IR-120 (resina trocadora de cátion H^+) e IR-410 (resina trocadora de anion OH^-) (Ogo et al, 1979). Após esses tratamentos foi adicionado aos hemolisados, uma solução de 1mM EDTA pH 7,0 a fim de se evitar a oxidação das hemoglobinas (Sannes & Hultquist, 1979).

A concentração de hemoglobina foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se o coeficiente de extinção milimolar para a oxihemoglobina de 13,8 a 541nm (Antonini and Brunori, 1971).

Os níveis de metahemoglobina foram determinados pelo método espectrofotométrico (Tomita et al, 1968) e as preparações que continham mais de 12% não foram utilizadas nos experimentos.

2.3 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA EM GEL DE AMIDO

Os componentes das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* foram separados por eletroforese horizontal em gel de amido 13%, pH 8,5 (Smithies, 1959). O gel foi preparado com amido hidrolisado (Poulik et al, 1957; Smithies, 1959) e tampão tris-borato que continha ácido bórico 44 mM, KCN 0,01%, pH 8,55. O tampão dos eletrodos foi o tris borato, pH 9,0. As amostras foram convertidas em cianohemoglobinas imediatamente antes de suas aplicações, mediante a adição de 0,01 ml de KCN 2,0%/ml de proteína.

Uma corrente de 6,4 volts/cm foi aplicada por 6 horas, à temperatura de aproximadamente 4°C para evitar o aquecimento do gel por efeito joule. Após 6 horas o gel foi cortado longitudinalmente em 2 parcelas e coradas por 20 minutos com uma solução contendo 1 g de benzidina, 75 ml de metanol, 0,5 ml de ácido acético glacial, 0,1 ml de peróxido de hidrogênio (130 volumes) e cerca de 10 mg de nitroprussiato de sódio. Após esse tratamento, o gel foi lavado com uma solução de 50 ml de éter, 25 ml de metanol e 5 ml de peróxido de hidrogênio, por 2 horas.

2.4. SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR ELETROFORESE EM DISCO DE POLIACRILAMIDA

Os componentes das hemoglobinas de *H. modestus* e *L. miliaris* foram separados por eletroforese em disco de poliacrilamida segundo o método de Ornstein, 1964; Davis, 1964. O gel de poliacrilamida era constituído de duas camadas: a primeira, formada pelo gel de resolução, continha uma mistura de 3 soluções estoques: A, B e C nas proporções de 1:2:2, respectivamente. O gel de concentração que formava a camada superior era constituída pelas seguintes soluções estoques: D, E e C nas proporções de 2:1:1, respectivamente. Cada 100 ml da solução estoque continha: solução A: 30 g acrilamida, 0,8 g bis acrilamida; Solução B: 24 ml 1N HCl, 18,15 g tris, 0,4 ml TEMED, Solução C: 0,1% persulfato de amônio; Solução D: 5,0 g acrilamida, 1,15 g bis-acrilamida; Solução E: 12,8 ml 1N H₃PO₄, 2,85 g tris, 0,1 ml TEMED.

Volumes da ordem de 1 ml foram distribuídos em tubos de vidro (0,3 cm x 10 cm) e guardados ao abrigo da luz, cerca de 1 hora. Sobre a camada polimerizada foram depositadas 0,2 ml do gel de concentração. Após a polimerização, os tubos foram inseridos numa câmara para

eletroforese e sobre o gel, colocados 100 μ l de amostra da solução de hemoglobina preparada da seguinte maneira: 20 μ l de solução de oxihemoglobina stripped, (absorbância a 580 nm=1,0), 40 μ l de tampão do eletrodo superior, 20 μ l de glicerol, 20 μ l de tampão do eletrodo superior onde continha 0,1M β - mercaptoetanol e alguns cristais de ditionito de sódio. A esta solução, fazia-se borbulhar o gás CO.

O tampão do eletrodo superior era constituído de 6,32 g tris, 3,94 g glicina, completando-se o volume a 1000 ml com água destilada. O pH da solução final era 8,9. O tampão de eletrodo inferior continha 12,1 g tris, 50 ml 1N HCl e água destilada para completar 1 litro. O pH desta solução era 8,1. Ao tampão de eletrodo superior foram adicionadas algumas gotas de azul de bromofenol que serviram como marcador. Os eletrodos foram conectados a uma fonte elétrica de corrente contínua de maneira que o polo negativo fosse ligado ao eletrodo superior e o polo positivo, ao inferior.

A eletroforese foi desenvolvida a 2mA/tubo por 1 ou 2 horas. Os géis foram mergulhados numa solução de ácido tricloracético 12% durante 2 horas e então corados. A solução corante foi preparada com benzidina, 1 g, metanol, 75 ml e ácido acético 0,5 ml e III gotas de água oxigenada 130 volumes e alguns cristais de nitroprussiato de sódio. Deixou-se o gel na solução recém preparada durante 10 a 20 minutos, lavando-se em seguida com a solução descorante que

continha metanol 25 ml, éter sulfúrico 50 ml e água oxigenada 1 ml (Meirelles, 1975).

2.5. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A separação cromatográfica dos componentes de hemoglobina de *H. modestus* foi feita utilizando-se DEAE Sephadex A50 (20 x 1 cm) previamente equilibrada com 0,05M Tris-HCl pH 8,6 contendo 1 mM EDTA. O hemolisado foi dialisado contra o mesmo tampão por 2 horas e cerca de 20 mg de proteína foram aplicadas na coluna. A eluição foi feita por gradiente de pH entre 8,6 e 8,0, 0,05M tampão Tris-HCl. Aliquotas de aproximadamente 2 ml foram coletadas em cada tubo onde a absorbância no comprimento de onda de 415 nm foi determinada.

Os componentes de hemoglobina da serpente *L. miliaris* foram fracionados utilizando-se a resina CM-celulose previamente equilibrada com 0,01M tampão fosfato (20 x 1 cm) pH 6,4, 1 mM EDTA. O hemolisado total foi dialisado por 2 horas contra o mesmo tampão e cerca de 20 mg de proteína, aplicados na coluna. Os componentes foram eluídos aplicando-se gradiente de pH entre 6,0 e 8,0.

Os componentes de *L. miliaris* foram também separados em

coluna de CM-celulose utilizando-se o sistema gradiente de pH 0,02M tris-HCl 1 mM EDTA entre pH 6,0 e 8,0. O hemolisado total desionizado foi aplicado na coluna após ter sido dialisado 2 horas contra Tris HCl 0,02M pH 6,0.

2.6. SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GRADIENTE DE SACAROSE

A separação e determinação dos pIs isoeletricos dos componentes de hemoglobina foram feitas utilizando-se a coluna e anfólito (pH entre 7,0 e 9,0) de procedência LKB tipo 8100-2 e 1809, respectivamente. O método utilizado foi o gradiente de sacarose, segundo o manual LKB. 10 a 15 ml de uma solução de oxihb desionizada na concentração da ordem de 1,5 mg/ml a 3,5 mg/ml foi aplicado na coluna em gradiente de sacarose. Uma corrente de 30 mA, correspondendo a 1600 volts fornecido pelo "High Voltage Power Supply" Savant Instrument, Inc, foi aplicada no inicio do processo. Após 60 horas, a corrente era estável a 7 mA e os componentes de hemoglobina estavam separados em bandas que foram coletados em aliquotas de 2 ml, onde foram determinadas as absorbâncias a 415 nm e os pIs

correspondentes. Durante a focalização isoeétrica a temperatura foi mantida a 4°C utilizando-se "Recirculating Cooler", Savant Instrument, Inc.

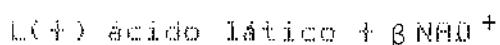
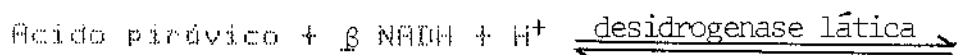
As frações individuais de hemoglobina foram reunidas e dialisadas contra tampão 0,05M Tris-HCl pH 7,0 a fim de se remover os anfólitos e a sacarose.

2.7 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E NTP NO SANGUE TOTAL DAS SERPENTES *H.modestus* E *L.miliaris*

O conteúdo de ácido láctico foi determinado no sangue das serpentes em estado de repouso e após a estimulação até o esgotamento do animal, isto é, um período de atividade forçada de 7 minutos e seguido de um repouso de 8 minutos. Quando em repouso, o animal foi sangrado através da cauda e após a estimulação, por punção cardíaca e o sangue coletado, foi imediatamente desproteinizado com ácido periódico 6% na proporção 1:1 (vol/vol) e centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos a 4°C, separando-se o sobrenadante I. O resíduo foi lavado por mais 3 vezes com 1 ml de ácido perclórico 6% e os sobrenadantes reunidos ao 1º. Estes foram neutralizados com uma solução de carbonato de potássio 5M e essa solução foi utilizada para a determinação do ácido láctico e do NTP.

A dosagem de ácido láctico foi feita pelo método

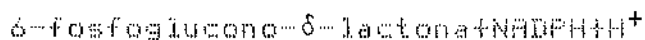
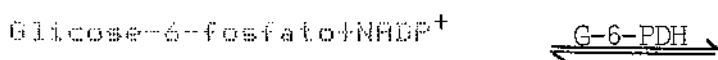
descrito por Marbach et al, 1967; baseado na formação do NADH que foi acompanhado espectrofotometricamente a 340 nm, e a formação concomitante do ácido pirúvico, em presença da desidrogenase láctica (Schwert et al, 1962).



1 ml de mistura de incubação continha: glicina-semicarbazida pH 9,5, 175 mM, extrato sanguíneo, desidrogenase láctica e NAD, 0,3 mM. A reação foi iniciada pela adição de NAD, lendo-se A340 após 15 minutos à temperatura ambiente.

A concentração do ácido láctico do extrato foi medida utilizando-se a curva padrão construída com concentração conhecida de lactato.

Para a determinação de NTP (Lamprecht et al, 1965) utilizou-se a seguinte reação enzimática:



A concentração do NTP no extrato foi determinada por comparação com uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de ATP.

A mistura de reação consistia de: tampão trietanolamina, 40 mM pH 7,0; NADP^+ 0,364 mM; cloreto de magnésio, 7,0mM; extrato sanguíneo; G-6-PDH (Glicose 6 fosfato desidrogenase) em excesso; glicose 40 mM e hexaquinase em excesso, para um volume final de 1 ml.

A reação foi iniciada pela adição de hexaquinase. A absorbância a 340 nm foi registrada durante 15 minutos, à temperatura ambiente (formação de NADPH).

2.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NO SANGUE DE *H.modestus* E *L.miliaris*

A concentração de hemoglobina no sangue foi determinada espectrofotometricamente (Antonini et al, 1971), utilizando o coeficiente de extinção milimolar do heme da oxihemoglobina humana no comprimento de onda 415 nm=125.

0,1 ml do sangue coletado via arco sistêmico esquerdo foi convenientemente diluído e hemolisado em água destilada e carbonato de sódio 0,1 M e a absorbância, determinada a 415 nm. A concentração foi expressa em mM/heme ou

mM/tetrâmero.

2.9. MÉTODO TONOMÉTRICO PARA A ESTIMATIVA DOS PARAMETROS LOG P50 E COEFICIENTE DE HILL

O método tonométrico (espectrofotométrico) foi usado para as estimativas rotineiras do P50 e do coeficiente de Hill na saturação média (nH) (Riggs and Wolbach, 1956).

Uma solução de oxihemoglobina foi colocada no tonômetro e desoxigenada pela aplicação alternada de vácuo e nitrogênio gasoso. A pressão parcial de oxigênio na fase gasosa do vaso foi então aumentada pela injeção de quantidade conhecida e sucessiva de ar com uma seringa, através da abertura fechada com uma tampa de borracha. A pressão parcial de oxigênio pode ser calculada pela simples aplicação da lei dos gases, sendo o volume do tonômetro, conhecido. O grande volume da fase gasosa do vaso evitou mudanças significantes no pO₂ quando a fase líquida foi equilibrada com oxigênio. No equilíbrio, a atividade do oxigênio na fase líquida é diretamente proporcional ao pO₂ da fase gasosa. Saturação fracional com oxigênio foi determinada espectrofotometricamente após o equilíbrio com cada injeção de ar. O equilíbrio da fase líquida com

oxigênio contido na fase gasosa requer aproximadamente 10 minutos.

Os experimentos foram feitos a 25°C, em tampão 0,05M Tris HCl, contendo 0,1 mM EDTA.

2.10. TITULAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM NADPH

Na titulação da hemoglobina com NADPH uma alíquota de 4 ml de solução de hemoglobina em concentração cerca de 40 μ M (em heme) foi colocada no tonômetro acoplado com uma cela de quartzo para medidas fluorimétricas. A amostra foi degaseada sob atmosfera de nitrogênio e vácuo repetidas vezes, em banho de gelo, até que o espectro de absorção fosse consistente com a da hemoglobina completamente desoxigenada. A pequena fluorescência da amostra antes da adição do NADPH reflete a fluorescência da hemoglobina em si. Aliquotas de solução desoxigenada de NADPH (concentração de cerca de 1 mM) foram adicionadas ao tonômetro com uma seringa Hamilton. Mudanças na intensidade de fluorescência foram então registradas. As medidas rotineiras da intensidade de fluorescência foram realizadas no comprimento de onda de excitação de 340 nm e de emissão de 470 nm (Ogo et al, 1987). A fluorescência de emissão da hemoglobina foi considerada desprezível (Weiss

et al, 1978). Técnica similar foi utilizada para a medida do efeito do IHP sobre a fluorescência de emissão. Aliquotas de uma solução estoque 50 mM de IHP desoxigenada foram adicionadas ao tonômetro. Concentração relativamente altas de hemoglobina (cerca de 40 μ M em heme) foram utilizadas. Nessa concentração, a hemoglobina humana normal não apresenta complicações potenciais de dimerização que são pronunciadas a baixas concentrações, em soluções livres de cloretos.

2.11. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA HEMOGLOBINA DE *L.miliaris* POR FILTRAÇÃO EM GEL

A cromatografia de filtração em gel foi feita em coluna de Sephadex G-100 (2,0 x 92cm) a 16°C, previamente equilibrada com tampão 0,05M Tris-HCl pH 7,0 contendo 1 mM EDTA. O fluxo foi mantido constante a cerca de 50 ml/hora. Amostras de 3,0 ml de solução contendo 8 mg/ml de hemoglobina foram aplicadas no topo de uma coluna e o eluato foi coletado com um coletor de frações Buchler. As absorbâncias das frações eluídas foram lidas num espectrofotômetro a 540 nm. O volume morto (V_0) da coluna de Sephadex foi determinado com solução de azul de Dextran e as seguintes proteínas foram usadas para calibrar a

coluna: mioglobina (Sperm Whale), $\alpha\beta$ dímero de hemoglobina humana A e hemoglobina A tetramérica. Os parâmetros V_0 , V_t (volume total) e V_e (volume de eluição) do leito do gel foram usados para calcular $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$. O peso molecular das hemoglobinas poder ser estimado pelos valores de K_{av} (Laurent and Killander, 1964).

2.12. ESTUDO DA CURVA DE LIGAÇÃO DO OXIGENIO EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA PELO MÉTODO DE CAMADA DELGADA HEM-O-SCAN

Neste método utilizado para a determinação da curva de oxigenação da hemoglobina, a amostra foi espalhada em uma camada delgada, sendo então desoxigenada por uma corrente de nitrogênio ou argônio. A amostra foi exposta, em seguida, a variada pressão parcial de oxigênio enquanto que a saturação pelo gás foi monitorada espectrofotometricamente. Assim pudemos obter curvas de ligação contínuas que foram analisadas pelo "plot de Hill" como no método tonométrico. O aparelho utilizado para o experimento foi o HEM-O-SCAN Oxygen Dissociation Analyzer. Uma amostra (20 μ l) de uma solução de hemoglobina foi colocada entre duas membranas permeáveis e o conjunto foi introduzido numa câmara termostalizada e umidificada. Os

raios de luz que atravessam a amostra e então chegam a um sistema fotodetector registram a diferença de absorbância em dois comprimentos de onda. Esta diferença de absorbância que varia com a saturação da proteína pelo oxigênio foi registrada no eixo Y de um registrador X-Y. Um eletrodo de oxigênio acompanhou a pressão do gás, pO_2 , na amostra e foi registrada no eixo X do registrador. O gráfico direto da porcentagem da hemoglobina oxigenada versus pO_2 foi obtido aumentando-se a pressão de oxigênio de zero até a sua completa saturação. (Lapennas et al, 1981)

2.13. MEDIDA DETALHADA DA CURVA DE EQUILIBRIO DE OXIGENAÇÃO PELO MÉTODO DE IMAI

O método mais elaborado empregado para a medida da curva de equilíbrio de oxigenação foi descrito por Imai, 1970, no qual a pressão parcial de oxigênio, pO_2 , muda de forma contínua e lentamente, para manter o equilíbrio a qualquer momento; o pO_2 e a fração de saturação da hemoglobina com oxigênio (Y) são determinados e registrados continuamente dando uma curva contínua, automaticamente. O aparelho de oxigenação automática de Imai permite medir as curvas de equilíbrio com grande precisão. O método de

oxigenação automática é uma combinação da determinação polarográfica de pO_2 com a determinação espectrofotométrica de porcentagem de oxigenação Y . Uma solução de oxihemoglobina foi colocada numa célula que é equipada com um eletrodo de oxigênio YSI 5331 (Yellow Springs Tust) envolvido por uma membrana de alta sensibilidade YSI (12 de Teflon) e janelas ópticas para permitir a detecção de raio de luz que atravessa a célula. A fase gasosa da célula é preenchida e constantemente renovada com nitrogênio puro; a solução foi agitada continuamente por um agitador magnético; então o oxigênio dissolvido na solução difundiu-se para a fase gasosa e estabeleceu-se um gradiente de pressão de oxigênio através da interface líquido-gás. O oxigênio ligado à hemoglobina foi liberado gradualmente com a diminuição do pO_2 que foi detectado por um eletrodo de oxigênio e o sinal ampliado foi aplicado no eixo do X de um registrador X-Y. A mudança do Y foi acompanhada pela mudança de absorbância. A curva de desoxigenação completa foi registrada automaticamente. Fechando-se a entrada para o nitrogênio e abrindo-a para o ar, a curva de reoxigenação completa pode ser registrada.

A célula de Imai foi usada acoplada num espectrofotometro CARY 219, e este, num microcomputador Apple Plus II para a coleta dos dados. O computador foi programado para ler e armazenar tanto a absorbância quanto o pO_2 da célula de Imai. Três fontes de gases foram usadas

no experimento: nitrogênio (cilindro de gás comprimido) a 0,2 ppm de O₂, oxigênio ultra puro (99,99%), ar (bomba aquarium). Todos os gases foram hidratados pelo borbulhamento num vaso de hidratação mantido em banho termostatisado. Todos os gases foram levados, através de uma válvula "Solenoid" de 3 saídas até a célula; a abertura e fechamento das válvulas foram comandados pelo microcomputador Apple Plus II.

Os dados do aparelho de Imai coletados foram transmitidos do microcomputador Apple Plus II para um computador Compucro System 816, onde os dados foram analisados com o programa PRIMA (Johnson et al, 1981; Johnson, 1984).

3. RESULTADOS

3.1. ELETROFORESE DOS HEMOLISADOS DE *H.modestus* E

L.miliaris

Os estudos eletroforéticos das hemoglobinas não fracionadas de *H.modestus* e *L.miliaris* revelaram 3 componentes e foram designados HbI, HbII e HbIII de acordo com a mobilidade anódica decrescente. O número de componentes de hemoglobina no sangue das cobras eram persistentes de acordo com a análise eletroforética em gel de amido, nas espécies individuais, porém a separação não era clara sendo que as bandas se apresentavam difusas.

Na tentativa de se obter melhor resolução, estudos eletroforéticos em gel de poliacrilamida (disco) dos hemolisados totais das duas espécies de serpentes bem como dos componentes separados por cromatografia, foram realizados. Corroborando os resultados obtidos na eletroforese em gel de amido, os hemolisados totais de cada espécie apresentaram 3 bandas igualmente difusas. A análise eletroforética dos componentes mostraram padrões similares aos dos hemolisados totais.

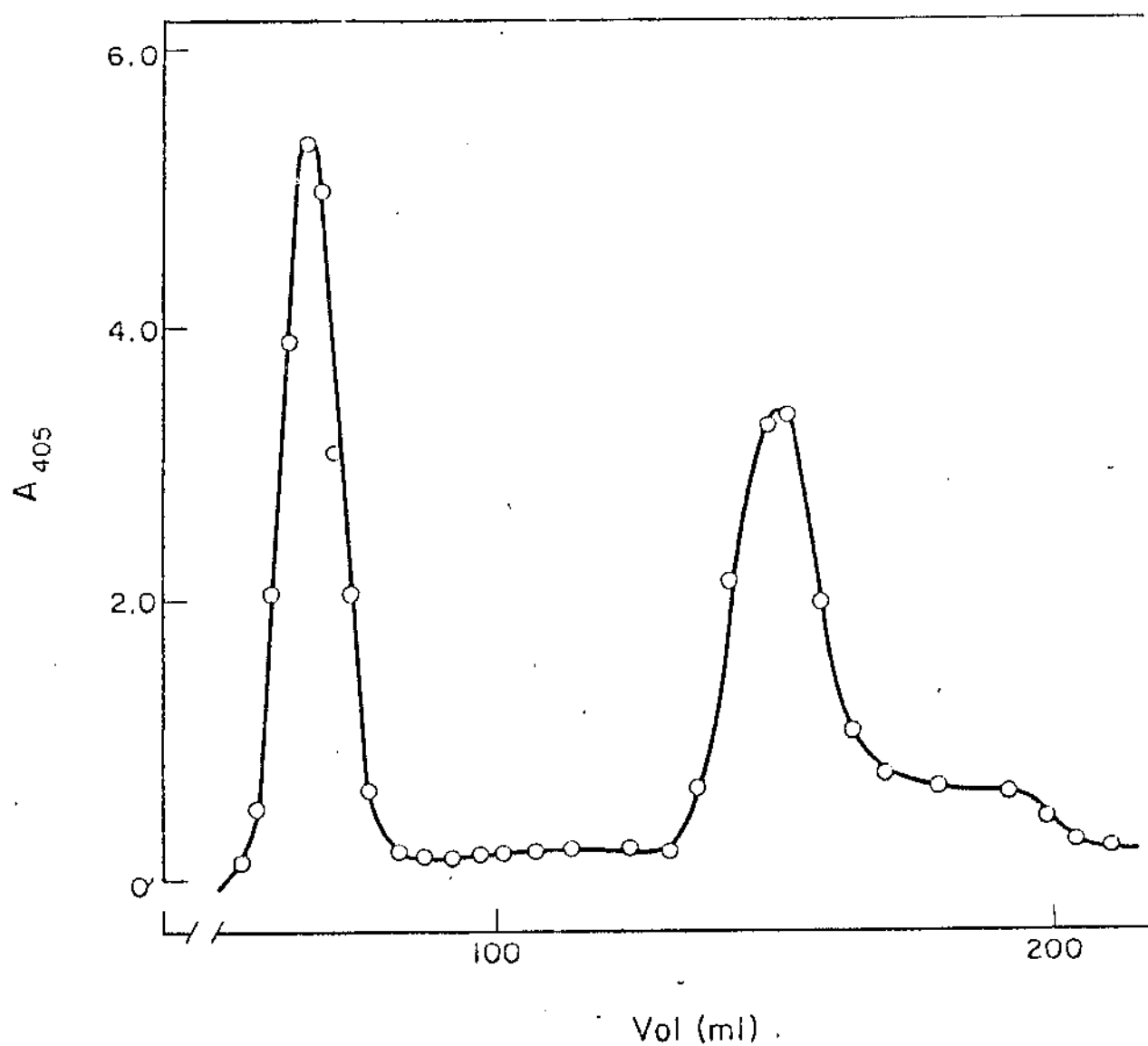


Fig. 1. Perfil de eluição do hemolisado de *H. modestus* em DEAE-Sephadex A₅₀ utilizando tampão 0,05M tris-HCl-EDTA 1mM, num sistema gradiente de pH de 8,6 a 8,0. As absorbâncias foram determinadas no comprimento de onda de 405nm.

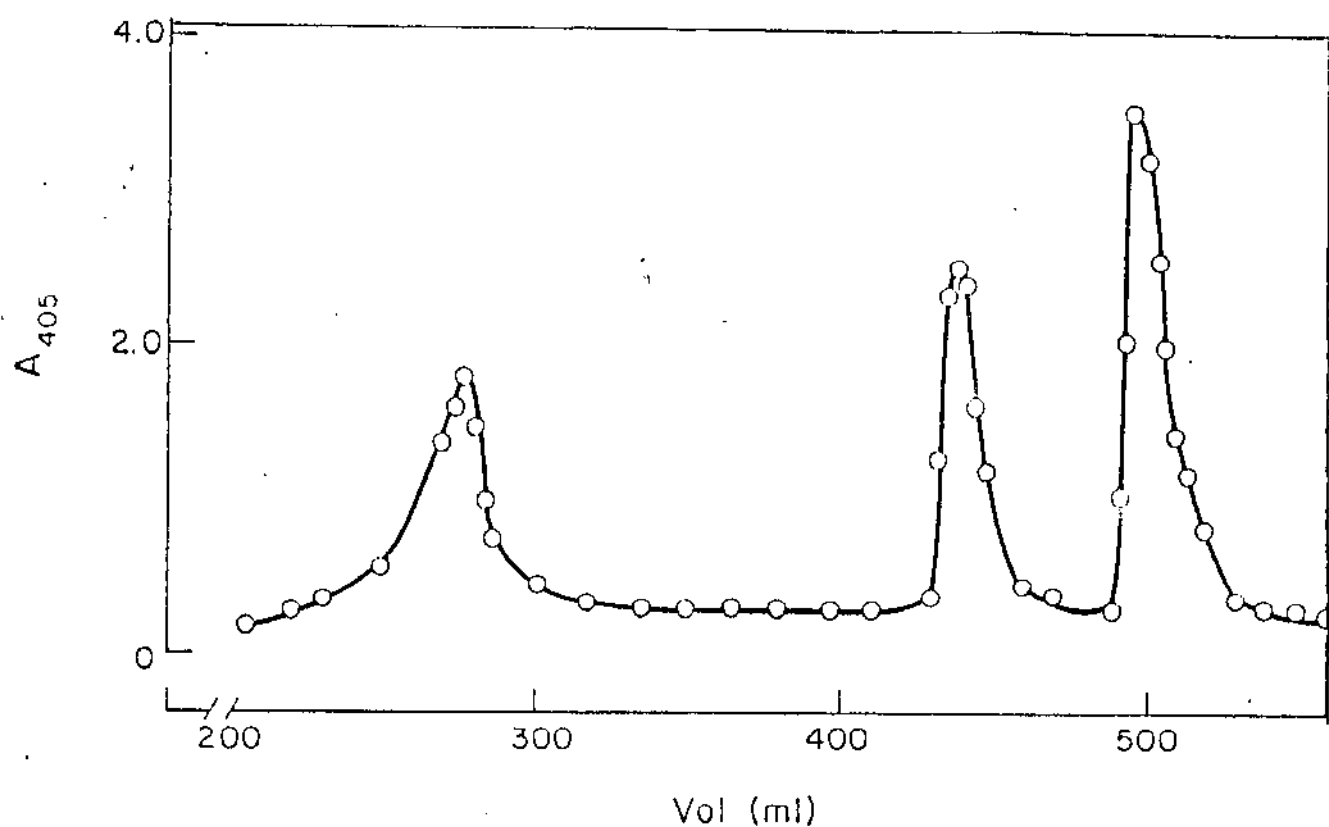


Fig. 2. Perfil de eluição do hemolisado de *L. miliaris* em CM-celulose utilizando 0,01M tampão fosfato - EDTA 1mM, num sistema gradiente de pH de 6,4 a 8,0. As absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de 405nm.

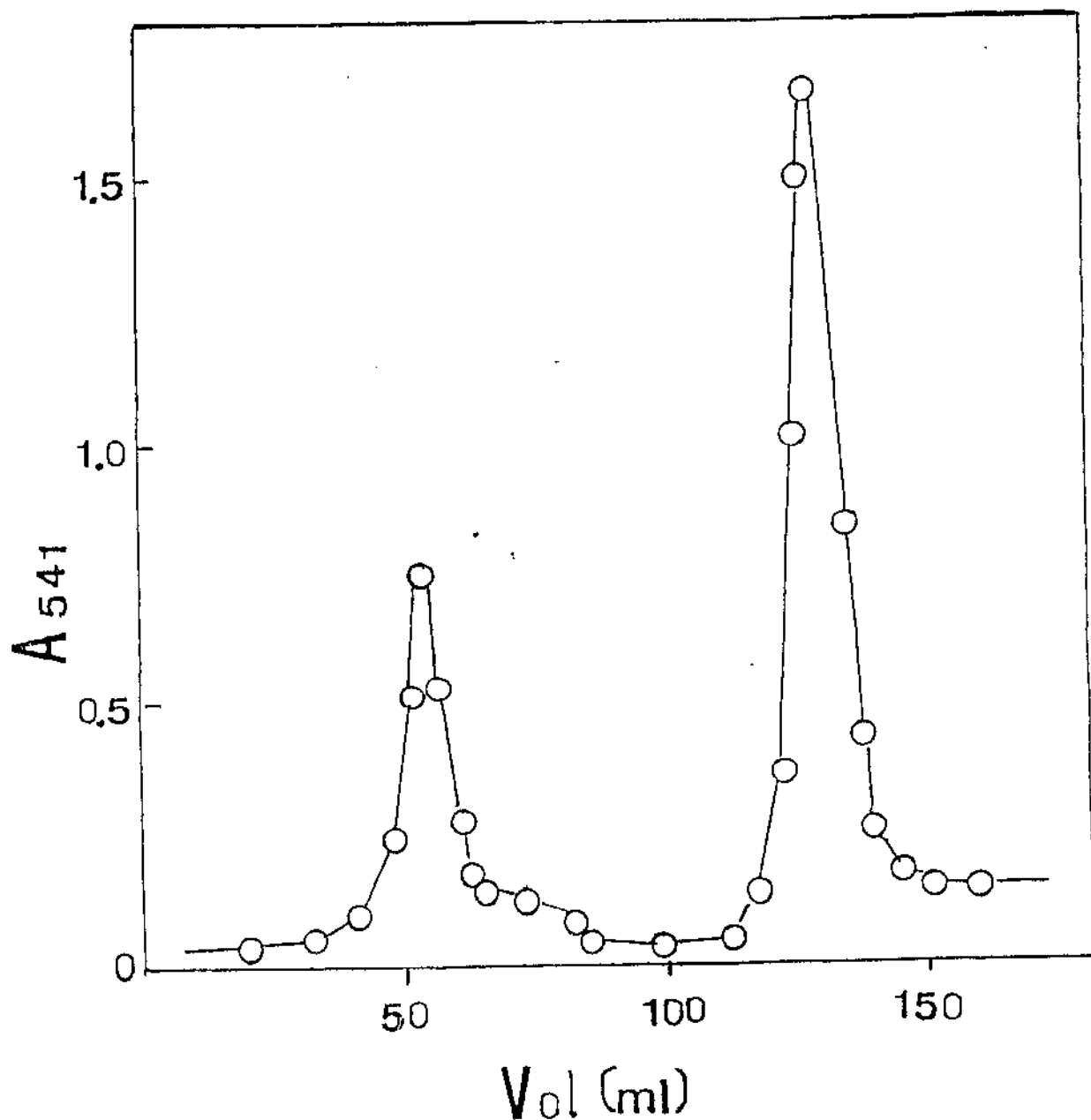


Fig. 3. Perfil de eluição do hemolisado de *L. miliaris* em CM-celulose utilizando sistema gradiente de pH entre 6 a 8, tampão tris-HCl 0,02M - EDTA 1mM. As absorbâncias foram determinadas no comprimento de onda de 541nm.

3.2. CROMATOGRAFIA DOS HEMOLISADOS DE *H.modestus* E *L.miliaris*

Pela determinação cromatográfica do hemolisado de *H.modestus*, três picos foram obtidos, sendo que o primeiro representava cerca de 60%, o segundo, cerca de 35% do hemolisado total. Fig. 1.

A *L.miliaris* mostrou no hemolisado, proporções de cerca de 35%, 25% e 40% respectivamente para os três picos eluidos da coluna. Fig. 2 (Ogo et al, 1979).

Os componentes dos hemolisados de *H.modestus* e *L.miliaris* obtidos das colunas cromatográficas, mostraram padrões eletroforéticos similares aos dos hemolisados não fracionados, sugerindo que os componentes eram formas diferentes da mesma proteína.

O hemolisado "stripped" de *L.miliaris* foi também submetido à cromatografia em CM-celulose usando sistema de gradiente de pH entre 6 a 8, tampão 0,02M Tris HCl 1 mM EDTA (Fig. 3). Dois componentes principais foram eluidos: HbI e HbII, porém estes componentes apresentaram também os mesmos padrões eletroforéticos do hemolisado total. Durante a corrida cromatográfica, em gradiente de pH entre 6,0 e 8,0, dependendo das condições tais como volume da coluna, temperatura, etc, o pico mais lento moveu-se

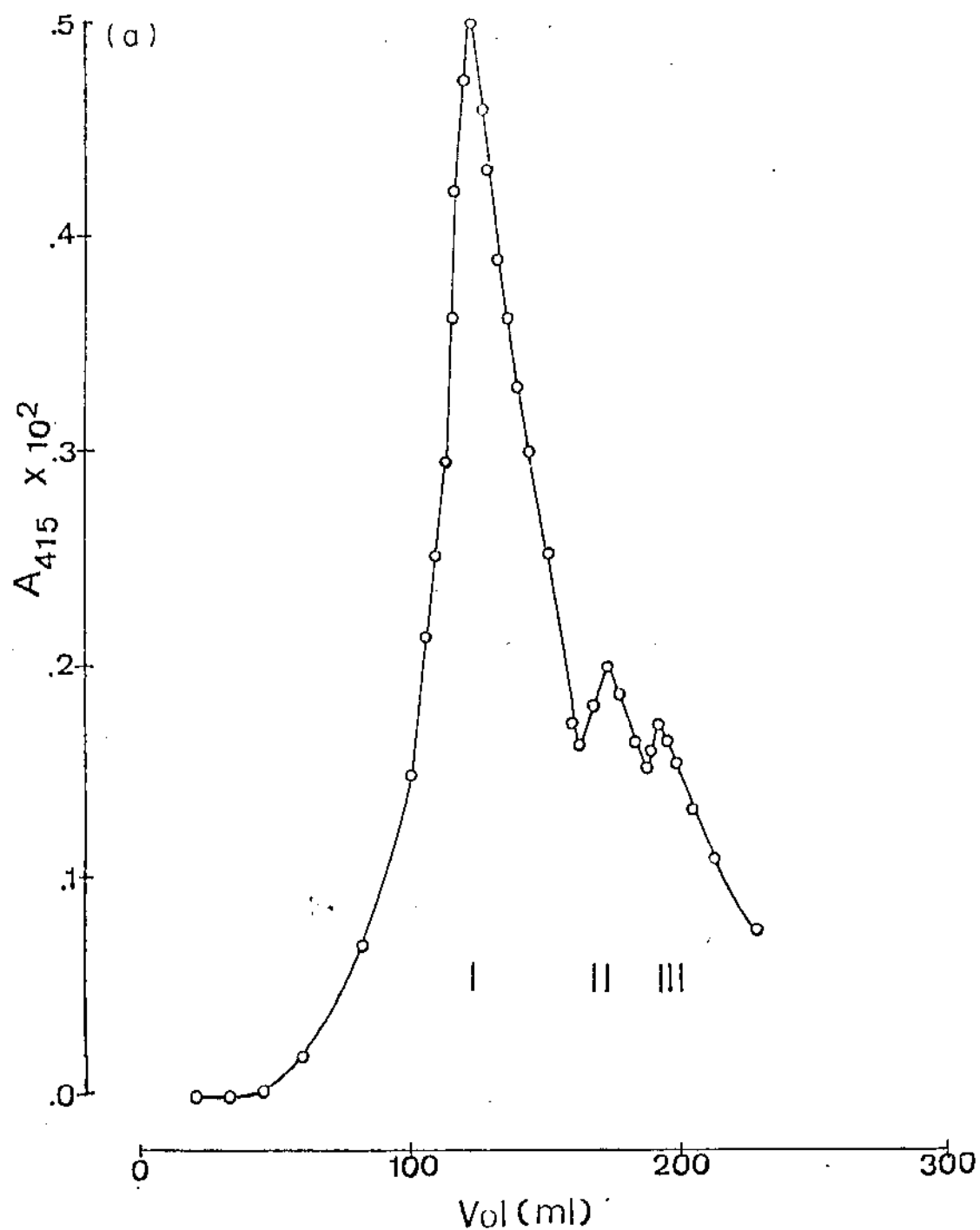


Fig. 4. Padrão de isoeletrofocalização do hemolisado de *H. modestus*. As absorvâncias do eluato foram determinadas no comprimento de onda de 415nm.

progressivamente mais rapidamente e foi eliminado junto com o mais rápido.

3.3. SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DOS COMPONENTES POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GRADIENTE DE SACAROSE

A focalização isoelétrica dos hemolisados não fracionados de *H.modestus* e *L.miliaris* em gradiente de sacarose, utilizando-se anfólito no intervalo de pH entre 7,0 e 9,0, forneceu perfis de eluição completamente diferentes daqueles obtidos por cromatografia de troca iônica (Figuras 4 e 5). O pH de cada pico de absorção em 415 nm correspondia o seu ponto isoelétrico aparente. Assim, conforme mostra a tabela I, no hemolisado total de *H.modestus*, 3 componentes foram obtidos e designados de acordo com os pIs aparentes decrescentes em componentes I, II e III.

No hemolisado de *L.miliaris* foram identificados 5 componentes cujos pIs aparentes e a suas proporções relativas encontram-se na tabela II.

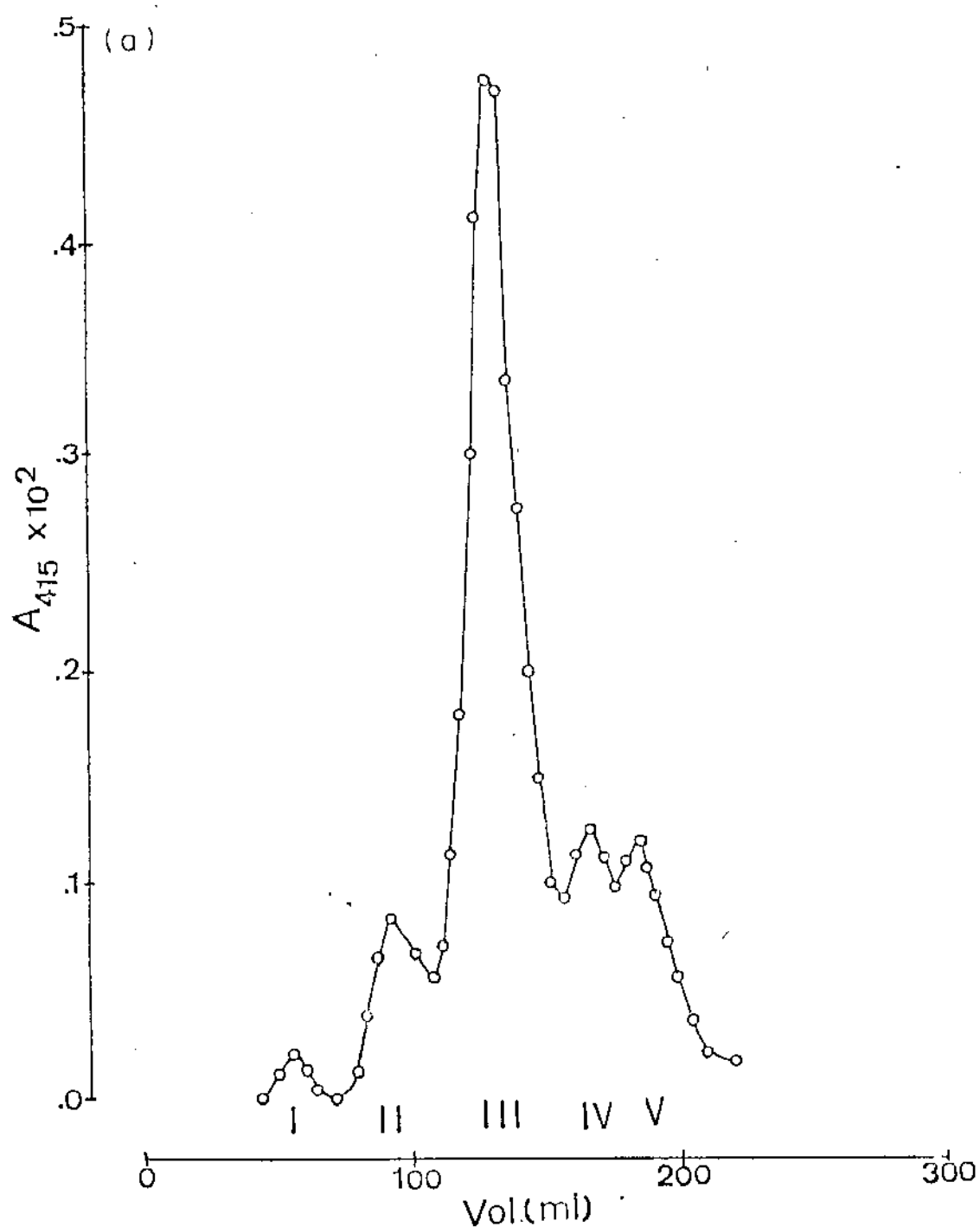


Fig. 5. Padrão de isoeletrofocalização do hemolisado de *L. miliaris*. As absorbâncias do eluato foram determinadas no comprimento de onda de 415 nm.

TABELA I

Componentes de hemoglobina de *H. modestus* obtidos por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose e anfólito de pH entre 7,0 e 9,0.

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

TABELA II

Componentes de hemoglobina de *L. miliaris* obtidos por focalização isoelétrica em gradiente de sacarose e anfólito de pH entre 7,0 e 9,0.

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

3.4. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO NO SANGUE DE *H.modestus* E *L.miliaris*

A determinação da concentração do ácido láctico no sangue das serpentes foi realizada sob duas condições: na primeira, o animal encontrava em repouso e na segunda, o animal tinha sido estimulado até o esgotamento, i.e., submetido a um período de atividade forçada por 7 minutos, seguido por 8 minutos de repouso, quando o sangue foi coletado.

O sangue da *H.modestus*, a espécie mais aquática apresentou níveis de ácido láctico de cerca de 10 mg% em condições de repouso, e 150mg% após estimulação. A espécie *L.miliaris*, por outro lado, apresentou um nível basal de ácido láctico de cerca de 40 mg% que aumentou após estimulação, a 230 mg%.

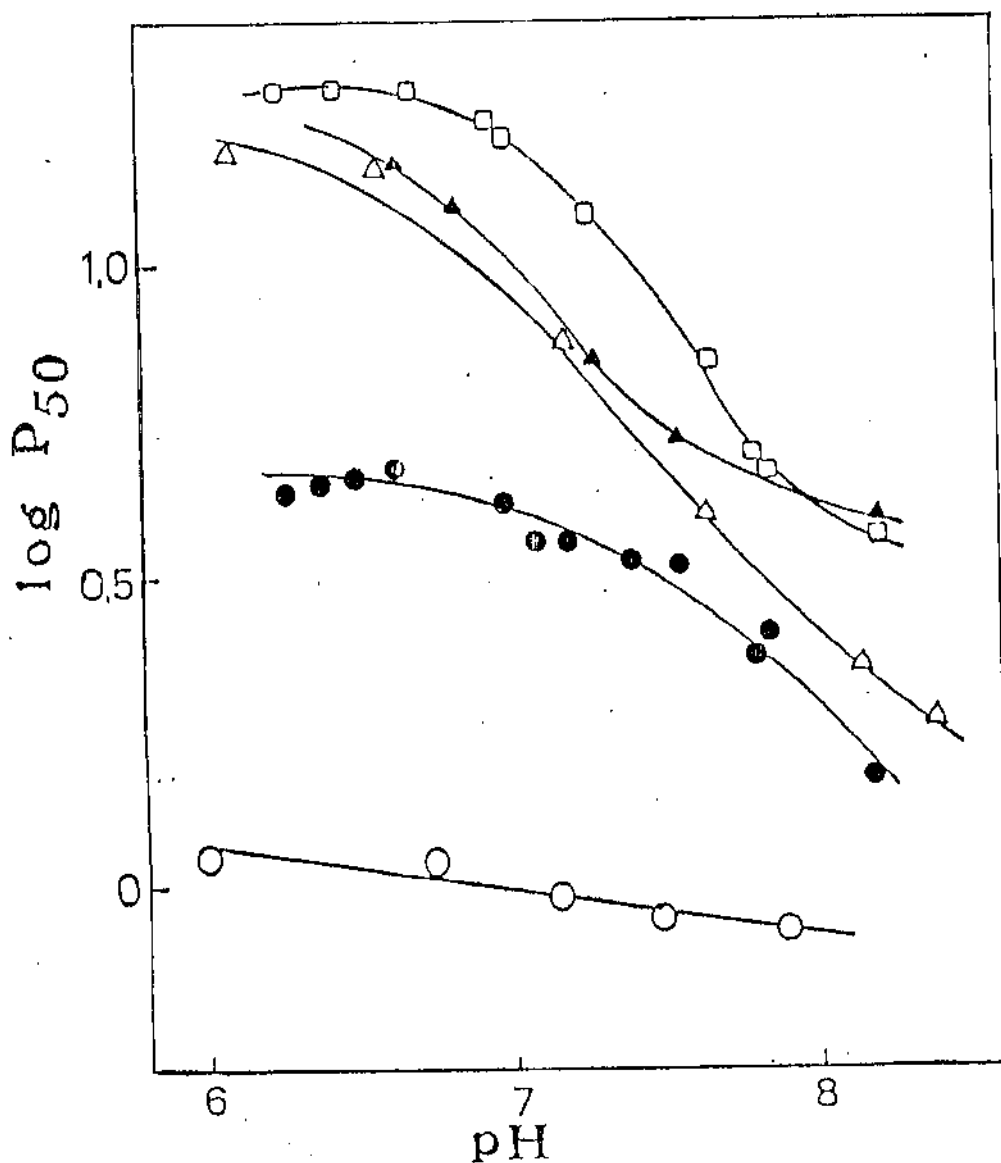


Fig. 6. Efeito de ânions polifosfatos sobre a afinidade da hemoglobina de *H. modestus* pelo oxigênio em vários pHs. (○) hemoglobina desionizada; (●) hemoglobina + 2,3 DPG 1mM; (△) hemoglobina + ATP 1mM; (▲) hemoglobina + GTP 1mM; (□) hemoglobina + IHP 1mM. Concentração de hemoglobina: cerca de 60 μ M (heme); Tampão: 0,05M tris-HCl + EDTA 0,1mM; Temperatura: 25°C.

3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA E NUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO NO SANGUE

A concentração de hemoglobina determinada no sangue de *H.modestus* e *L.miliaris* revelou valores compatíveis com os níveis de hemoglobina de répteis em geral, de 6 a 9% (Antonini and Brunori, 1974). Na espécie *H.modestus*, a concentração de hemoglobina sanguínea encontrada foi de 9,83 g/ml de sangue, sendo o hematócrito, 40 ml de hemácias/100 ml de sangue.

Na *L.miliaris* a concentração de hemoglobina encontrada foi 6,74 g/ml de sangue, portanto cerca de 70% do valor encontrado na *H.modestus*, e um valor de hematócrito também inferior, i.e., 24 ml de hemácias por 100 ml de sangue.

Os ânions polifosfatos (ATP, GTP, etc) que atuam como poderosos moduladores alostéricos da função da hemoglobina foram determinados como nucleotídeos trifosfatos totais, NTP. A dosagem do NTP no sangue por método enzimático, mostrou que tanto no estado de repouso como após estimulação do animal não houve alteração considerável em seu nível mantendo-se nos limites de 2,65 mM em *L.miliaris* e 2,84 mM em *H.modestus*, os quais correspondem uma razão de 2,51/tetrâmero e 1,85/tetrâmero, respectivamente.

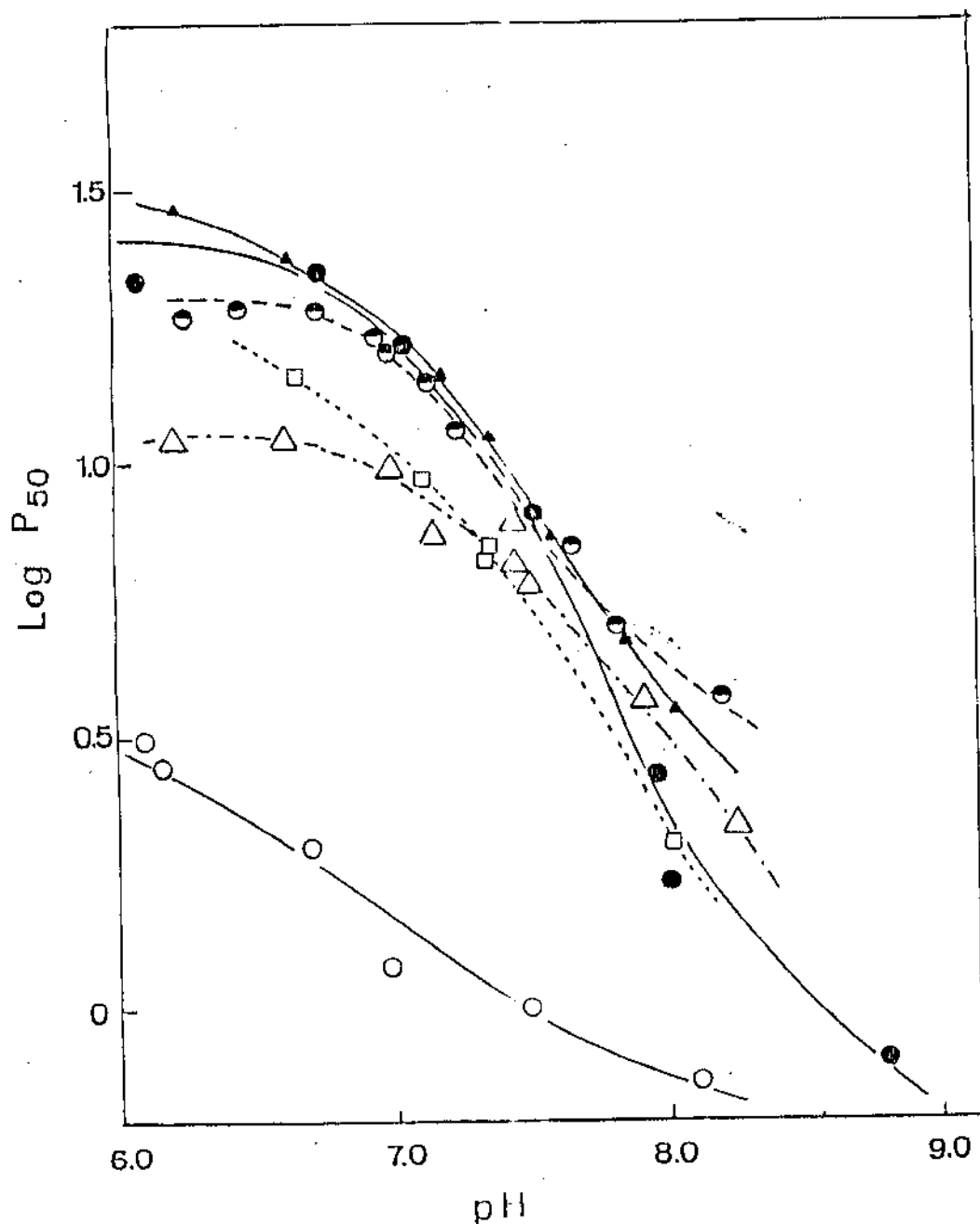


Fig. 7. Efeito de anions polifosfatos sobre a afinidade da hemoglobina de *L. miliaris* pelo oxigênio, em vários pHs.

(○) hemoglobina desionizada, (●) em presença de ATP 1mM, (▲) em presença de GTP 1mM; (○) em presença de IHP 1mM; (△) em presença de 2,3 DPG 1mM; (□) em presença de NADPH 1mM. Concentração de hemoglobina: cerca de 60μM. Tampão: 0,05M tris-HCl + EDTA 0,1mM Temperatura: 25°C.

3.6. EQUILIBRIO DA HEMOGLOBINA COM OXIGENIO

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi estudada com o hemolisado total e com o maior componente obtido na focalização isoeletrica, em ambas as espécies de serpentes. Os experimentos foram realizados a 25 °C 0,5, em 0,05 Tris-HCl 0,1 mM EDTA, no intervalo de pH entre 6,0 e 8,0 tanto com hemoglobina "stripped" quanto em presença de 1 mM ânions polifosfatos tais como ATP, 2,3-DPG, GTP e IHP. Os resultados obtidos com maior componente da focalização isoeletrica bem como com o hemolisado total, foram muito semelhantes.

A figura 6 mostra a afinidade da hemoglobina de *H.modestus* pelo oxigênio, bem como o efeito Bohr na ausência e na presença de moduladores alostéricos, ATP, GTP, 2,3-DPG e IHP. Do mesmo modo, a fig. 7 mostra a afinidade da hemoglobina de *L.miliaris* "stripped" e na presença de ATP, GTP, 2,3-DPG, IHP e NADPH, e o efeito Bohr correspondente a cada condição. Conforme podemos observar, a hemoglobina de *H.modestus* desionizada tem alta afinidade pelo oxigênio e valores do coeficiente de Hill próximo a 1,0 independentemente do pH do meio. Quando a afinidade pelo oxigênio foi analisada em presença de 1 mM de ânions polifosfatos, a curva de equilíbrio com oxigênio foi

TABELA III

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

Tampão utilizado: 0,05M tris HCl + EDTA 0,1mM

Temperatura: 25°C $\pm$ 0,5

Concentração de hemoglobina: cerca de 60 μ M (heme)

Modulador alostérico (1mM)	$\Delta \log P_{50}/\Delta pH$	
	<i>H. modestus</i>	<i>L. miliaris</i>
Ausente	- 0,07	- 0,30
2,3 DPG	- 0,34	- 0,45
GTP	- 0,38	- 0,60
ATP	- 0,55	- 0,90
IHP	- 0,58	- 0,66
NADPH	-	- 0,72

deslocada para a direita, a medida que se acidificava o meio. Portanto, houve um aumento do efeito Bohr alcalino, sendo o valor máximo encontrado na presença de IHP (-0,58), seguido por ATP, GTP e 2,3-DPG (-0,55, -0,38 e -0,34 respectivamente) (Tabela III). Na presença dos moduladores alostéricos, os valores de coeficiente de Hill mostraram-se também ser pH dependentes de maneira que os valores de nH tendiam para 2,0 a medida que o pH se aproximava de 6,0 e para 1,0 a medida que o pH se aproximava de 8,5.

A hemoglobina de *L.miliaris* apresentou padrões similares aos de *H.modestus*, com pequenas variações. Por exemplo, a hemoglobina "stripped" de *L.miliaris* mostrou ter pequeno efeito Bohr, da ordem de -0,30, porém os valores nH eram sempre próximos a 1,0 nos limites de pH estudados. Em presença de ânions polifosfatos, a afinidade pelo oxigênio foi bruscamente diminuída principalmente em pHs ácidos. Em pHs maiores que 8,0, todavia, o valor do $\log P50$ eram similares aos da hemoglobina "stripped". A magnitude do efeito Bohr encontrados foram -0,90, -0,66, -0,60 e -0,45, respectivamente em presença de 1 mM ATP, IHP, GTP e 2,3-DPG (Tabela III).

Os valores de nH , similarmente aos encontrados com a hemoglobina de *H.modestus*, eram dependentes do pH, tendendo para 1,0 a medida que se aproximava do pH 8,5. As propriedades de ligação do oxigênio da Hb de *L.miliaris* foram também profundamente modificadas por uma outra classe

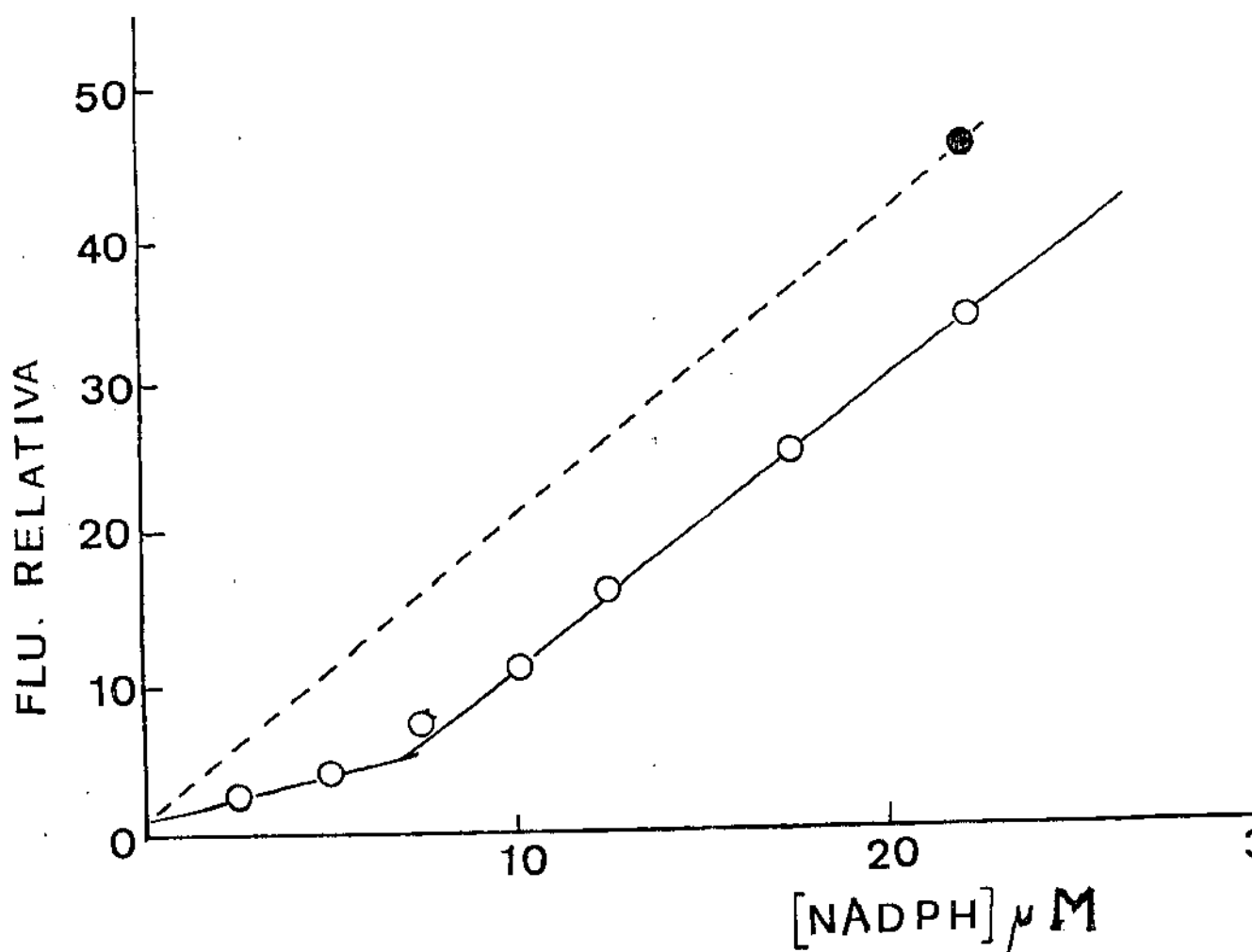


Fig. 8. Titulação fluorimétrica da desoxiHb de *L. miliaris* com NADPH na ausência (○) e na presença de IHP (●). O comprimento de onda de excitação foi 340nm e a fluorescência foi observada a 470nm.

Concentração de hemoglobina: 39 μM (heme).

Tampão: 0,05M Tris-HCl pH 7,0 + EDTA 0,1mM.

de composto metabolicamente importante encontrado nas células vermelhas, NADPH (Cashon et al, 1986). Da mesma forma que os outros ânions polifosfatos, o NADPH diminuiu drasticamente a afinidade em pHs ácidos, porém teve pouco efeito em pHs próximos a 8,0.

O efeito Bohr alcalino em presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido foi da ordem de -0,72 entre os pHs 7,0 e 8,0. Entretanto os valores de nH não variaram com o pH, conservando-se próximos a 2,5 nos limites de pH estudados.

3.7. ANÁLISE FLUORIMÉTRICA DA INTERAÇÃO DO NADPH COM A Hb DE *L.miliaris*

Como ocorre com a hemoglobina humana normal, o NADPH atua como um efêtor alostérico da função da hemoglobina de *L.miliaris*, diminuindo sua afinidade pelo oxigênio. A uma concentração constante de hemoglobina, a ligação do NADPH à proteína foi estudada em função da concentração do NADPH, monitorando-se a fluorescência produzida na presença e ausência de IHP. A fig. 8 mostra o aumento progressivo da fluorescência de emissão que resulta do aumento da concentração do NADPH a uma solução desoxiHb em presença e em ausência de IHP. Na ausência de IHP (linha inferior) a

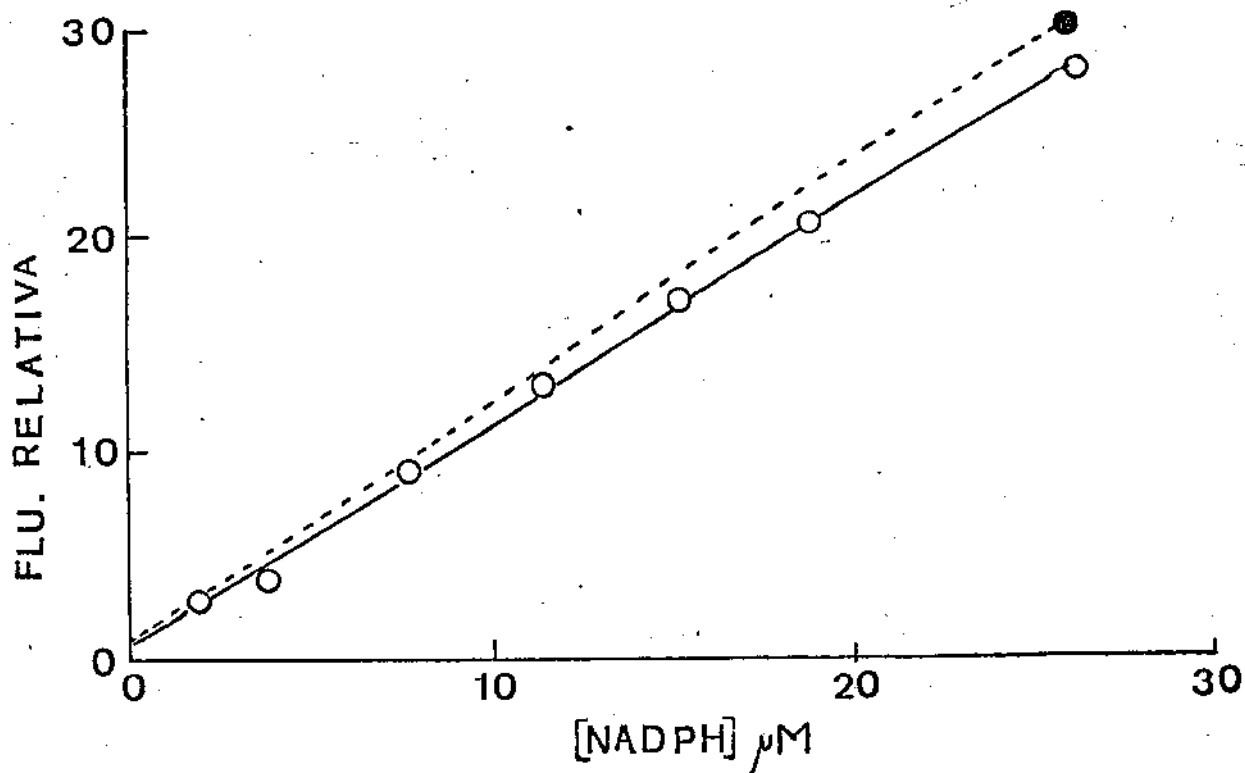


Fig. 9. Titulação fluorimétrica da oxihb de L.miliaris com NADPH na ausência (O) se na presença de IHP (●). O comprimento de onda de excitação foi 340 nm e a fluorescência foi observada a 470 nm. Concentração de hemoglobina: 46,12 μM (heme).
Tampão: 0,05M Tris-HCl pH 7,0 + EDTA 0,1 mM.

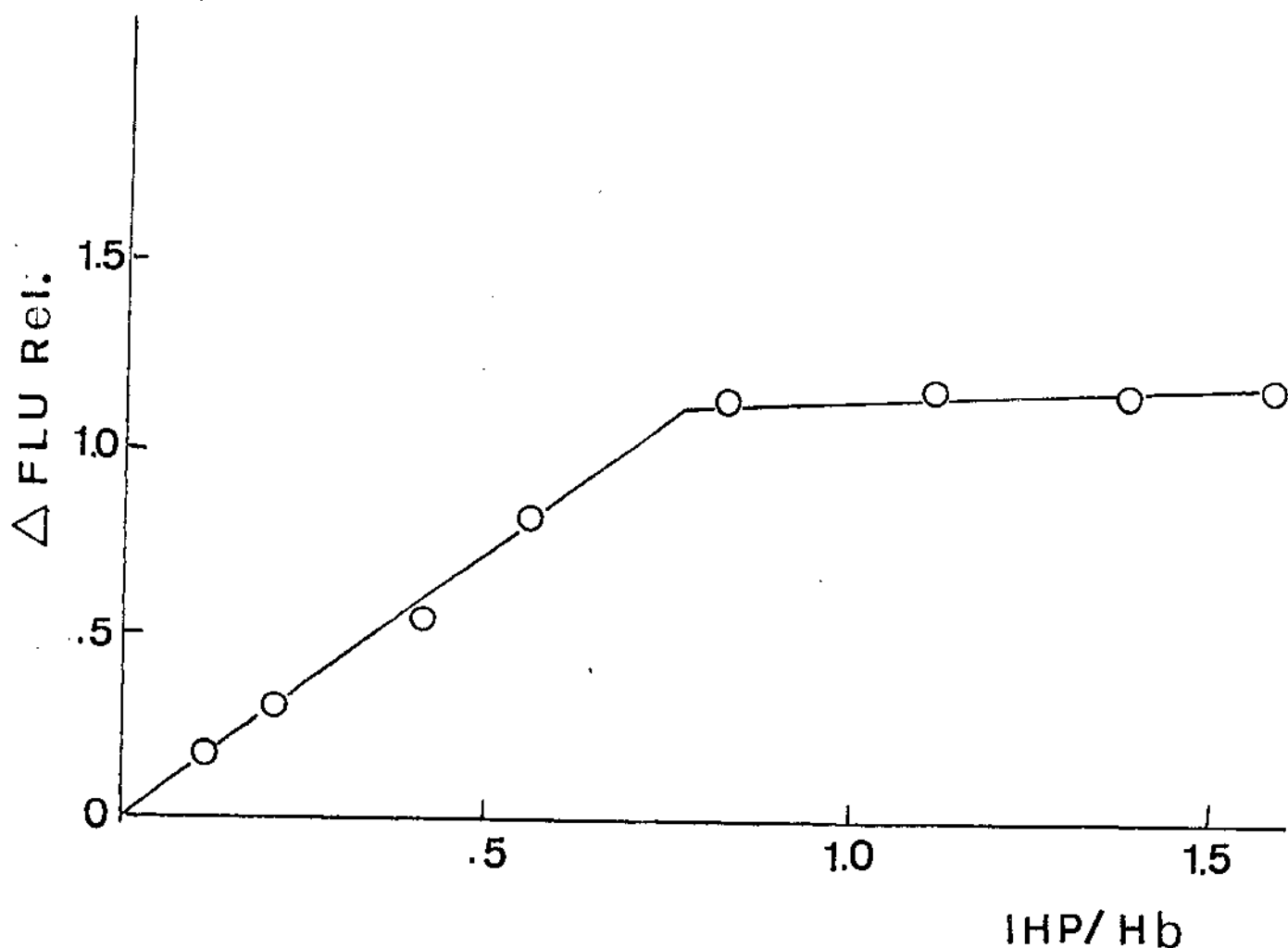


Fig. 10. Mudança da fluorescência relativa com adições sucessivas de IHP a uma solução de desoxiHb de L.miliaris contendo NADPH. Tampão utilizados 0,05M tris-HCl pH 7,0 + EDTA 0,1 mM. O ponto extrapolado corresponde a razão mol de IHP/mol de Hb tetramérica.

curva de titulação exibe uma quebra distinta indicando estequiometria de ligação do NADPH e desoxiHb tetramérica de cerca de 0,75. A linha superior ilustra que a fluorescência da solução de hemoglobina desoxigenada contendo NADPH aumenta pela adição de IHP em excesso (cerca de 10 vezes). O NADPH quando se encontra ligado à hemoglobina, tem pequena ou nenhuma fluorescência de emissão relativa, entretanto, exibe forte fluorescência em estado livre como ocorre quando se adiciona IHP à solução.

A estequiometria de ligação do NADPH à desoxiHb foi investigada também, medindo-se a intensidade de fluorescência de uma solução onde as concentrações de NADPH e desoxiHb são mantidas constantes e IHP é progressivamente adicionado (Fig. 10). A quebra na curva de titulação ocorre com uma estequiometria efetor: Hb tetramérica de 0,75.

Para se medir a ligação do NADPH à oxiHb, foi utilizado o mesmo processo descrito para a desoxiHb. Na fig. 9, a linha inferior mostra o aumento da fluorescência com adições sucessivas de NADPH à solução de oxiHb na ausência de IHP e a linha superior, na presença de IHP.

Conforme podemos observar, o NADPH ligou-se à oxiHb com baixa afinidade.

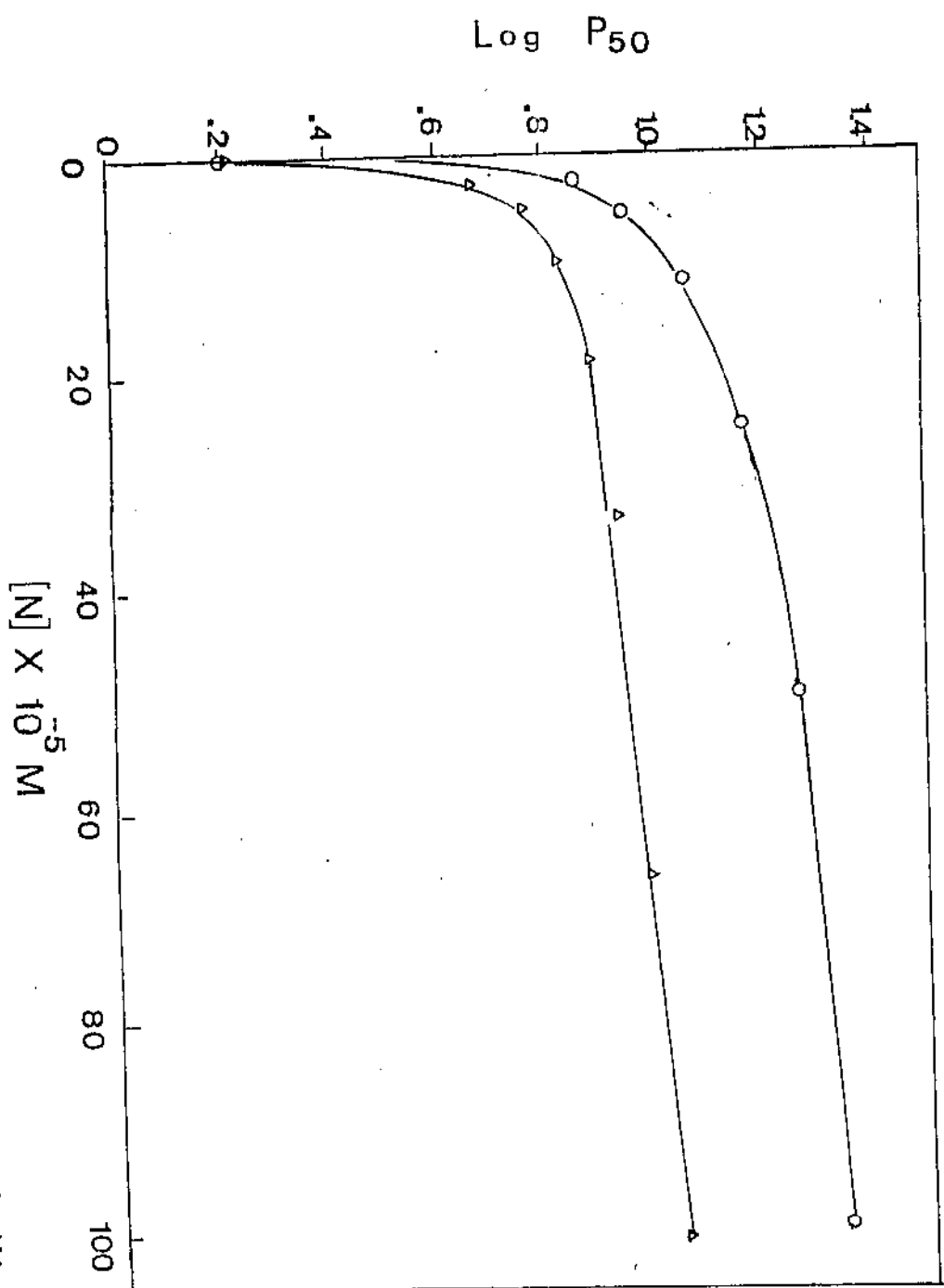


Fig. 11. Efeito da concentração de ATP (O) e NADPH (Δ) sobre a afinidade da hemoglobina de L. milliaris pelo oxigênio. Tampão: 0,05M tris HCl pH 7,0 + EDTA 0,1mM. Concentração de hemoglobina: cerca de 60 μM (heme). Temperatura: 25°C.

3.8. MEDIDA DAS CONSTANTES DE AFINIDADE ENTRE A DESOXIHb E OXIHb COM O ATP E NADPH

Para os experimentos de afinidade de ligação do cofator à hemoglobina, concentrações conhecidas de ATP ou NADPH e desoxihemoglobina foram misturadas em presença de tampão 0,05M Tris-HCl contendo 0,1 mM EDTA. O pH foi ajustado a 7,0 e a afinidade pelo oxigênio foi medida pelo método de Riggs and Wolbach, 1956. A magnitude do efeito do ATP e NADPH sobre o equilíbrio de oxigenação foi estudada em várias concentrações dos moduladores. A fig. 11 mostra a relação entre os valores de log P50 e concentração de ATP e NADPH. A modulação da afinidade da proteína pelos poliânions pode ser descrita pela equação de Szabo and Karplus (1972).

$$\log(P1/2)_{EFETOR} = \log(P1/2) + 1/4 \log_{10} \frac{1 + {}^1KD(EFETOR) + {}^2KD(EFETOR)^2}{1 + {}^1KO(EFETOR) + {}^2KO(EFETOR)^2}$$

onde KD e KO representam as constantes de associação do efetor (NADPH ou ATP) à proteína completamente desoxigenada ou oxigenada respectivamente. Os números 1 e 2 superescritos referem-se à ligação da primeira e segunda molécula do efetor.

As constantes de afinidade que se encontram na tabela

TABELA IV

Estimativas das constantes de associação do ATP e NADPH calculadas a partir dos dados apresentados na figura 11.

As medidas das constantes de associação para a ligação do ATP e NADPH à desoxiHb de *L. miliaris* foram feitas com 50mM tampão Tris HCl pH 7,0 + EDTA 0,1mM a 25°C $\pm$ 0,5. A concentração da hemoglobina foi cerca de 60 μ M heme.

Cofator	DesoxiHb (M^{-1})	OxiHb (M^{-1})
ATP	$1,6302 \cdot 10^7$	$1,8339 \times 10^3$
	$1,0702 \cdot 10^{11}$	$4,7338 \times 10^5$
NADPH	$7,4024 \cdot 10^6$	$7,8887 \times 10^2$

IV revelam que a ligação do ATP ao sítio de alta afinidade da desoxiHb de *L.miliaris* é muito mais forte do que a da Hb humana. A afinidade do ATP no segundo sítio de ligação é mais fraca do que o primeiro, porém é tão forte quanto a do 2,3-DPG e desoxiHb humana normal. Em pH 7,0, 25°C, o ATP ligou-se também à oxiHb através de 2 sítios; ainda que as constantes de afinidade sejam menores do que das desoxiHb, continuam sendo bastante significativas principalmente ao sítio de maior afinidade. Por outro lado, o NADPH ligou-se tanto à desoxiHb quanto à oxiHb através de um único sítio, sendo este de alta afinidade na desoxiHb e de baixa na oxiHb (tabela IV).

3.9. INFLUENCIA DOS MODULADORES ALOSTÉRICOS NA MANUTENÇÃO DA ESTRUTURA QUATERNARIA DA Hb DE *L.miliaris*: DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

Uma coluna de Sephadex G-100 foi calibrada plotando-se $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ contra o logaritmo do peso molecular para diversas proteínas, padrões tais como Mb, dímeros $\alpha\beta$ de hemoglobina humana e Hb humana tetramérica, que corresponderam respectivamente K_{av} de 0,7, 0,35 e 0,065 (Fig. 12). A Hb de *L.miliaris* cuidadosamente desionizada, numa solução 0,05M de tampão Tris HCl pH 7,0, emergiu da

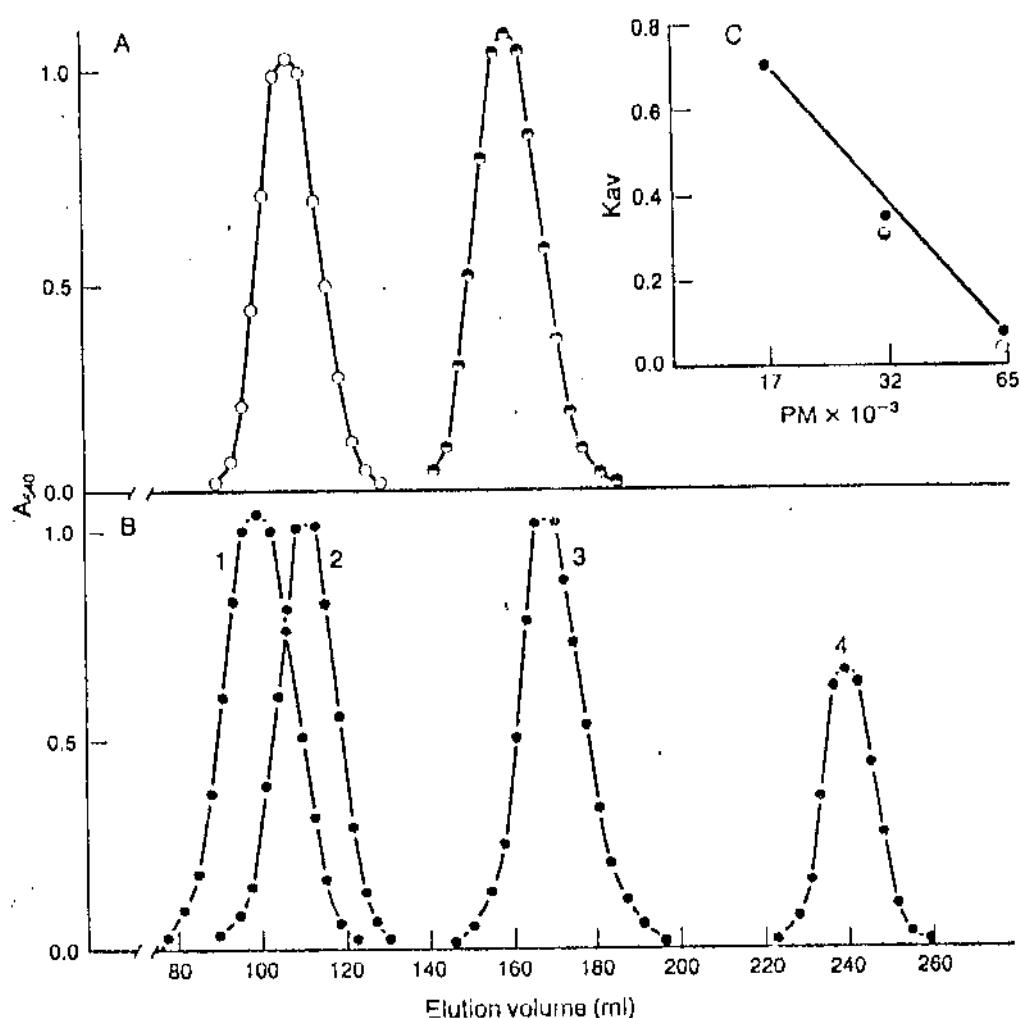


Fig. 12. Padrão de filtração em gel em Sephadex G- 100 de A: hemoglobina "stripped" de *L. miliaris* (0), após adição de ATP 1mM em sua forma de-soxigenada (0). B: Padrão de Azul dextran (1); hemoglobina humana (2); $\alpha\beta$ dímero de hemoglobina humana (3) e mioglobina (Sperm Whale) (4). As amostras foram eluídas a 16°C com 0,05 tampão Tris-HCl pH 7,0 contendo 1mM EDTA. Figura 12C mostra o coeficiente de partição (K_{av}) entre as fases líquida e sólida da proteína (de acordo com Laurent and Killander, 1964), em função do peso molecular.

coluna como um simples volume de eluição (V_e) de aproximadamente 160 ml. Este valor corresponde a um K_{av} equivalente ao peso molecular de cerca de 32.500 d similar à forma dimérica da Hb humana (Fig. 12). A Hb dimérica da serpente obtida na coluna foi submetida aos testes de equilíbrio com oxigênio e comportou-se como hemoglobina "Stripped" do hemolisado, com relação ao P50 e valor de nH em diferentes pHs. Na presença de IHP, a proteína tornou-se cooperativa com valor de nH próximo a 2,0 e P50 elevado, principalmente em pHs menores que 7,5. Esses parâmetros sugerem a formação de tetrômeros após a ligação do nucleotídeo. O experimento de filtração em gel em Sephadex G-100 numa solução em presença de 1mM IHP foi feito com a hemoglobina de *L.miliaris* na sua forma desoxigenada. Para isso, uma solução de desoxiHb em concentração " 8mg/ml em 0,05M tampão Tris HCl contendo 1mM EDTA, 1mM IHP foi colocada cuidadosamente no topo de uma coluna equilibrada com o mesmo tampão contendo IHP. Nessas condições a proteína permaneceu na forma deoxi durante a cromatografia e emergiu da coluna com um tetrômero (fig. 12).

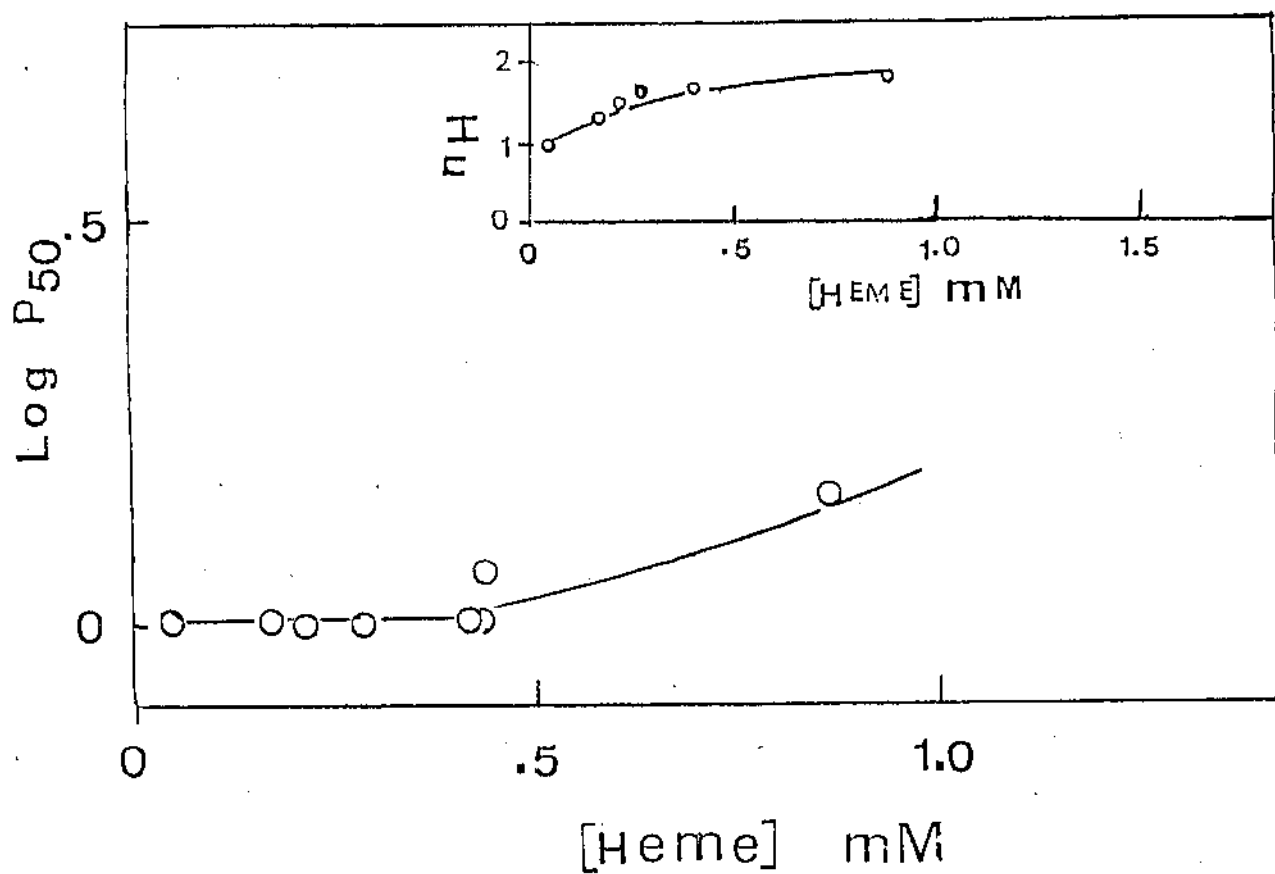


Fig. 13. Influência da concentração da hemoglobina sobre a afinidade pelo oxigênio, em *L. miliaris*.

Tampão: 0,05M tris HCl pH 7,0 EDTA 0,1mM; temperatura: 25°C.

3.10. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE CAMADA DELGADA PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA DE LIGAÇÃO DO OXIGÊNIO A SOLUÇÃO DE HEMOGLOBINA DE *L.miliaris* (HEM-O-SCAN)

O método da camada delgada foi por nós utilizado para se investigar o efeito da concentração de proteína sobre a afinidade do oxigênio.

A figura 13 mostra que em tampão 0,05M Tris-HCl pH 7,0, não houve variação nos valores de log P50 com a variação da concentração de proteína nos limites de 0,05mM a 0,5mM em heme. Em concentrações maiores que 0,5mM, ocorreu uma ligeira diminuição da afinidade tendo os valores de log P50 aumentado de 0,1 a 0,15. Os valores de nH aumentaram de 1,0 para 2,0 com o acréscimo da concentração de proteína de 50 μ M a 900 μ M em heme.

3.11. MEDIDA DE EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO PELO MÉTODO DE IMAI

As curvas de equilíbrio de oxigenação contínuas e detalhadas fornecidas por esse método permitiram avaliar com maior precisão a combinação do ligante à hemoglobina.

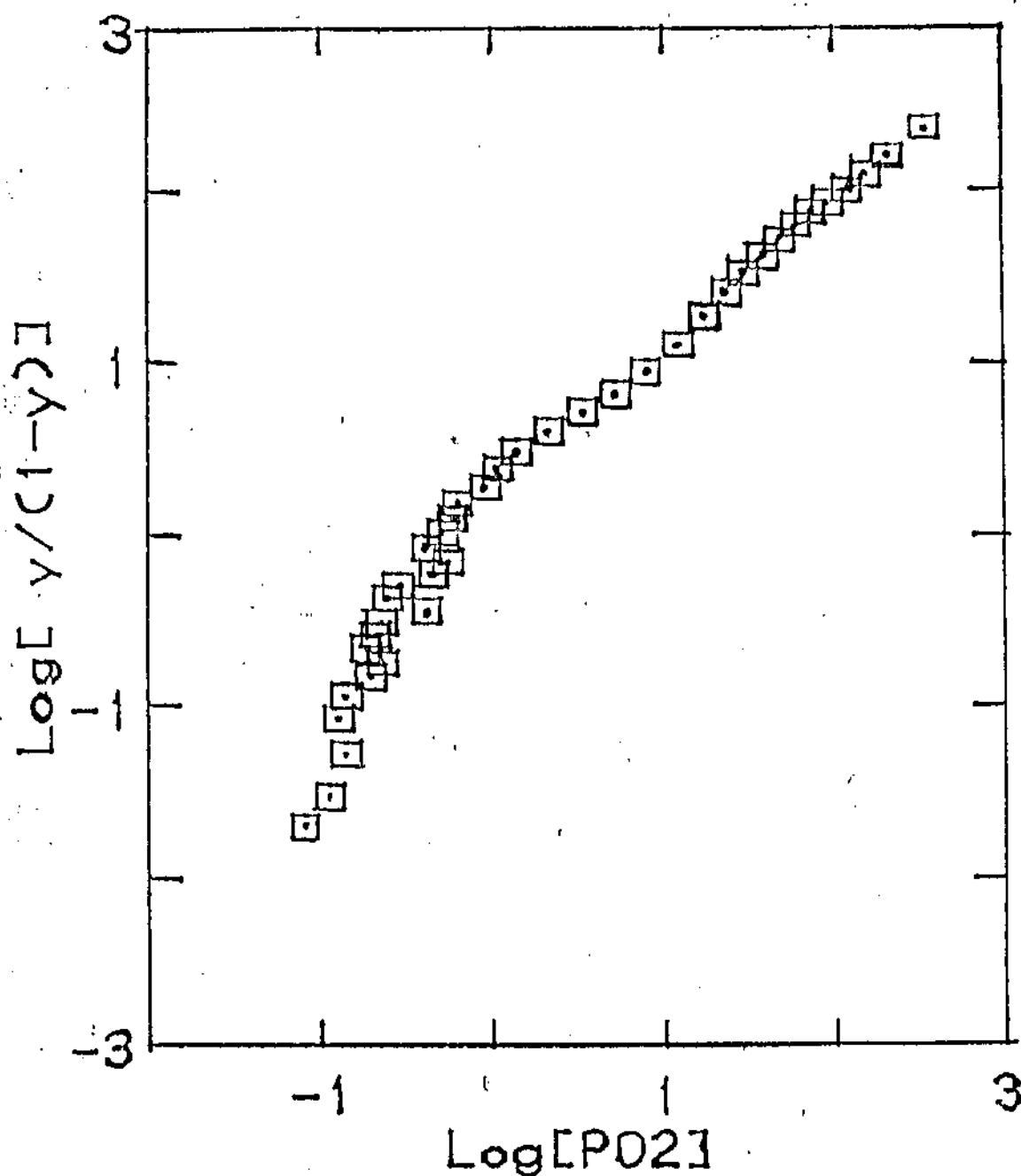


Fig.14. Plot de Hill da curva de equilíbrio da hemoglobina de L.miliaris com oxigênio, utilizando-se a célula de Imai. A curva foi registrada automaticamente; temperatura: 25°C, tampão: 0,05M tris-HCl contendo EDTA - 0,1 mM, pH 6,5; concentração da hemoglobina: cerca de 60 μM (heme).

A afinidade Hb-O₂ de *L.miliaris* foi estudada em presença de 0,05M Tris-HCl contendo 0,1M EDTA, pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,3 e os valores de log P50 obtidos corroboram os achados pelo método tonométrico.

Entretanto, pelo método de Imai foi possível observar que as curvas de equilíbrio com oxigênio tinham formas completamente não usuais (fig. 14). Em pH 6,5 p. exemplo, o coeficiente de Hill foi aproximadamente 1,0 na saturação de 50% com oxigênio, mas foi cerca de 2,0 quando a saturação com oxigênio era pequena. Esta forma anômala da curva pode ser interpretada como a ocorrência de sítios com diferentes afinidades com o ligante, dependendo do grau de saturação da proteína com oxigênio. Isto parece ocorrer na Hb de *L.miliaris* que na forma desoxigenada teria predominância da molécula com conformação T (molécula tetramérica) que se converteria na conformação R (molécula dimérica) a medida que ocorre a sua saturação com oxigênio.

4. DISCUSSÃO

Os primeiros estudos sobre as propriedades funcionais das hemoglobinas de duas espécies de serpentes *H.modestas* e *L.miliaris* pertencentes à família *Colubridae*, com diferentes graus de adaptação ao ambiente aquático, foram realizados por Ogo, 1977, Ogo et al, 1979. De acordo com esses trabalhos, a hemoglobina de *H.modestas* na forma "stripped" apresentou alta afinidade pelo oxigênio, com P50 de 1,0 mm de Hg independentemente do pH; a hemoglobina de *L.miliaris* teve também alta afinidade pelo gás, porém ligeiramente dependente do pH do meio, isto é, em pH 7,0 o valor de P50 foi 1,41 mm Hg e em pH 8,0, 1,0 mm Hg portanto mostrando um efeito Bohr alcalino, de cerca de -0,30. (Figuras 6 e 7).

Em presença de 1mM ânions polifosfatos tais como ATP, 2,3-DPG ou IHP, os valores de P50 das hemoglobinas de ambas as espécies foram drasticamente diminuídos em pHs abaixo de 7,5; em pHs maiores que 8,0, entretanto, a afinidade pelo oxigênio foi aproximadamente igual à obtida com as hemoglobinas "stripped", mostrando que os polifosfatos ligavam-se mais fracamente à desoxihemoglobina, a medida que se alcalinizava o meio. Os valores de nH que refletem a cooperatividade entre as sub-unidades, indicaram que em

forma "stripped", a interação heme-heme era significativamente menor do que a encontrada nas hemoglobinas de outros vertebrados (aproximadamente 2,7 no homem), variando em torno de 1,0 em todos os pHs estudados. Em presença de ânions polifosfatos os valores de nH foram ligeiramente maiores em pHs ácidos variando em torno de 2,0; em pHs maiores que 7,5, entretanto, não ocorreu aumento significativo em relação à proteína desionizada. Os resultados nos indicaram claramente que as hemoglobinas das serpentes não possuem cooperatividade entre as suas sub-unidades em pHs alcalinos tanto em forma "stripped" como em presença de efetores alostéricos.

A ausência de cooperatividade sugere a presença de sub-unidades nos hemolisados, i.é, de dímeros ou monômeros provenientes da dissociação da proteína tetramérica como ocorre com algumas hemoglobinas humanas anormais em que o resíduo Glu 63 (101β) encontra-se substituído. Este é um dos resíduos que faz contacto entre as sub-unidades $\alpha_1\beta_2$ e desempenha papel vital nas propriedades de ligação do oxigênio à molécula de proteína e é substituído por Gln na Hb Rush, por Lys na Hb British Columbia, por Asp na Hb Potomac e por Gly na Hb Alberta. A substituição do Glu por resíduos básicos ou neutros torna o equilíbrio de dissociação $\text{tetramero} \xrightleftharpoons{K} \text{dímero}$ mais favorecido para a direita, e a Hb tem alta afinidade por oxigênio e alta afinidade por fosfatos orgânicos (Shih et al, 1985).

Fenômenos semelhantes são observados nas hemoglobinas das cobras. Os estudos estruturais recentes (Matsuura, M.S.A., 1987*) demonstraram que o mesmo resíduo 101 β da hemoglobina de *L.miliaris* encontra-se substituindo por Val. A 2ª substituição que ocorre nas cadeias β de *L.miliaris*, na interface $\alpha_1\beta_2$ está localizada na posição 43 em que Glu $\rightarrow$ Thr. Assim, a ausência da ponte salina entre Glu(101) β e Arg FG4(92) α (presente na hemoglobina humana) e a perda de 2 cargas negativas na interface $\alpha_1\beta_2$ na hemoglobina de *L.miliaris* levaria ao decréscimo da interação eletrostática ocasionando o deslocamento do equilíbrio da estrutura T $\rightleftharpoons$ R para a direita.

Duas substituições adicionais ocorrem nas cadeias α , na região de contato $\alpha_1\beta_2$ na hemoglobina de *L.miliaris*: Pro(38) α $\rightarrow$ Gln e Pro(44) α $\rightarrow$ Ser e parecem contribuir com a desestabilização do tetrâmero.

Portanto, os resultados obtidos por Matsuura, 1987*, podem explicar os nossos achados dos estudos funcionais. A alta afinidade observada parece inteiramente ou quase inteiramente resultar da grande dissociação e portanto da maior contribuição dos dímeros para o processo de oxigenação. Embora a determinação da sequência de aminoácidos não tenha sido estabelecida na hemoglobina de *H.modestus*, o seu comportamento funcional permite-nos inferir que substituições semelhantes aos da Hb de *L.miliaris* podem estar presentes, i.é, nas interfaces $\alpha_1\beta_2$.

* Matsuura, M.S.A., 1987. Comunicação pessoal.

As curvas de equilíbrio com oxigênio em função do pH, fig. 7 mostram que ATP e outros ânions polifosfatos tem efeito heterotrópico muito acentuado na Hb de *L. miliaris* em pH mais ácidos que 7,5; o valor de P50 de cerca de 20mm de Hg em pH 7,0, diminui bruscamente a medida que alcalizamos o meio ao mesmo tempo que o coeficiente de Hill nH cai de 2,0 para 1,0. O mesmo fenômeno ocorre também com *H. modestus* (fig. 6).

A nossa interpretação inicial de elevado efeito Bohr alcalino na presença de fosfatos orgânicos, baseada atualmente em maiores conhecimentos estruturais e funcionais da molécula de hemoglobina destes animais pode ser explicado sob outro ângulo: a proteína em pH alcalino, devido as substituições nos resíduos responsáveis pela manutenção de sua estrutura quaternária, tende a dissociar-se em unidades diméricas expulsando o ânion polifosfato que se encontrava fortemente ligado ao seu sítio em pHs ácidos. O efeito de pH seria, portanto, uma associação de dois fenômenos: i) enfraquecimento da ligação entre o ânion polifosfato com grupos catiônicos da proteína; ii) destruição do sítio de fosfato devido à dissociação da hemoglobina tetramérica. Em outras palavras, a baixos valores de pH, o ânion polifosfato ligaria-se muito mais fortemente, através de interações eletrostáticas, à hemoglobina que é positivamente carregada, contribuindo na manutenção da forma tetramérica. Por outro

lado, em pHs alcalinos, devido a neutralização das cargas positivas do sítio de fosfato, ocorreria o enfraquecimento da ligação eletrostática entre o fosfato e a proteína cessando, portanto, a força que mantém as duas cadeias β próximas e ocorreria a dissociação da molécula. O elevado efeito Bohr, em presença de ATP seria, portanto, consequência do efeito da concentração de H^+ e efeito da dissociação da proteína em pHs alcalinos.

Analisando-se os valores de nH , há indicação que as hemoglobinas desionizadas estão mais sujeitas à dissociação, inclusive em pHs ácidos, do que na presença de efetores aniônicos. Na condição "stripped" estaria ausente a molécula que manteria unidas as duas sub-unidades β .

O pequeno efeito Bohr que observamos na Hb desionizada de *L.miliaris* Fig.7 poderia ser consequência da contaminação por nucleotídeo na solução devido sua alta afinidade com a proteína, o que favoreceria a formação de tetrâmero, levando a uma falsa interpretação como efeito alostérico de prótons.

As experiências realizadas com Hb de *L.miliaris* na célula de Imai podem demonstrar que existe mudança no estado de agregação das sub-unidades no decorrer do experimento de ligação do oxigênio à desoxiHb. A vantagem desta técnica em relação ao método tonométrico é que esta pode fornecer dados muito mais detalhados e permite, inclusive, avaliar as 4 constantes de equilíbrio com

oxigênio (constantes de Adair) ou parâmetros do modelo alostérico (Imai, 1973, Tyuma et al, 1973, Imai and Yonetami, 1977). A curva de ligação do oxigênio obtida pela célula de Imai (fig. 14) na Hb "stripped", em 0,05M tris-HCl pH 6,52, 0,1mM EDTA, nos mostrou claramente que o plot de Hill é completamente anômalo e o valor de coeficiente de Hill (nH) na saturação média é de aproximadamente 1,0 bem como nas saturações acima de 50%, mas é cerca de 2,0 na metade inferior da curva. O coeficiente de Hill de maior valor pode ser interpretado em termos de maior agregação de sub-unidades (Tam and Riggs, 1984). Desde que a agregação das sub-unidades é uma função da desoxigenação, a medida que se oxigena a molécula esta terá maior concentração de dímeros; quando se alcança a saturação de 50% da Hb com oxigênio, a cooperatividade é muito pequena e o valor de nH se aproxima de 1,0. Os experimentos com a célula de Imai realizados em outros pHs tiveram o plot de Hill igualmente anômalos, com valores de nH na saturação média de aproximadamente 1 e os valores de P50 similares aos encontrados pelo método tonométrico.

O peso molecular da Hb de *L.miliaris* determinado em coluna de Sephadex G-100 corrobora a nossa teoria. A proteína cuidadosamente desionizada mostra que em pH 7,0, em sua forma oxigenada, tem grande tendência a dissociar-se em sub-unidades, apresentando o volume de eluição compatível com dímeros de Hb humana, com peso molecular

equivalente a 32000d. A mesma hemoglobina, quando desoxigenada e em presença de IHP, apresentou o volume de eluição equivalente ao da Hb humana tetramérica, i.e., 64000d. O peso molecular também estimado através do coeficiente de sedimentação em comparação com a hemoglobina humana, usando ultra centrifuga analítica (Beckman model E) (Ogo, 1987*) corrobora os dados acima.

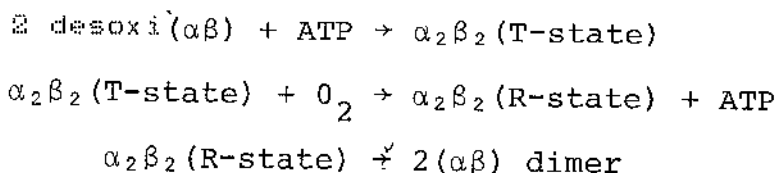
O fenômeno da dissociação não está totalmente esclarecido embora conhecido a longo tempo. De acordo com Antonini and Brunori, 1971, a dissociação envolve um equilíbrio entre tetrâmero e sub-unidades e para concentração de proteína maior que 0,1%, o equilíbrio predominante pode ser representado: $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2(\alpha\beta)$.

No caso da hemoglobina da cobra, o peso molecular foi medido a concentração maior que 1%, onde a Hb humana não se dissocia apreciavelmente. Portanto, podemos sugerir que o equilíbrio acima, na ausência do efetor alostérico ATP, é largamente deslocado para a direita, no sentido da formação de dímero. Com a finalidade de se obter tetrâmeros, várias tentativas foram feitas com a oxihemoglobina desionizada alterando a força iônica e pH, mas todas foram infrutíferas. Entretanto, os dímeros, quando desoxigenados e em presença de ATP converteram-se em tetrâmeros, analisados pelo peso molecular em Sephadex G-100.

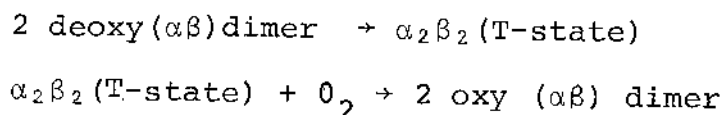
Os resultados mostraram, assim, uma transição entre 2 formas na Hb de *L. miliaris* e baseado no modelo de 2 estados

*OGO, S.H., 1987. Dados não publicados.

de Monod et al (1965) e é possível sugerir as seguintes equações para aplicar os resultados:



O dímero com alta afinidade pelo oxigênio, na forma desoxi, em presença de ATP converteria-se no tetrâmero, estado T que em presença de oxigênio tenderia para o estado R com a subsequente liberação do ATP. Alternativamente as seguintes equações podem ser propostas:



Neste caso é sugerida uma mudança para a forma dimérica durante a oxigenação do tetrâmero estado T, sem a passagem pelo tetrâmero estado R. Estes mecanismos foram publicados por nossa equipe em 1987, (Matsuura et al, 1987).

Estudos sobre a estequiometria de ligação entre NADPH e desoxiHb sugerem a presença de formas diméricas, mesmo na desoxihemoglobina.

As estequiometrias de ligação do ATP com a desoxiHb e oxiHb não foram determinadas, devido as dificuldades técnicas pelo fato de o ATP não possuir nenhuma característica que permita acompanhar diretamente a sua ligação e liberação da proteína. O cofator NADPH que

possui as propriedades alostéricas no transporte de oxigênio muito semelhante às do ATP ou do 2,3-DGP tem a conveniente propriedade de fluorescência e pode ser utilizado para a determinação direta de sua estequiometria de ligação com a desoxiHb de *L.miliaris*. Os dados obtidos com NADPH não podem ser extrapolados sem restrições ao ATP, pois, conforme veremos, cada um desses efetores alostéricos tem características que lhes são peculiares.

Baseado nos estudos da afinidade pelo oxigênio observamos (fig. 7) que da mesma forma que o ATP, o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido tem a propriedade de diminuir drasticamente a afinidade da proteína pelo oxigênio. O efeito do pH sobre a afinidade varia do mesmo modo que em presença de ATP, mas o valor do coeficiente de Hill permanece próximo a 2,5 em todos os pHs analisados (6,0 a 8,0) (fig. 7). Através do estudo do efeito da concentração dos cofatores sobre os valores de log P50 e da análise dos dados através da equação de Szabo and Karplus, 1972, foi possível se estimar as afinidades relativas do ATP e NADPH com a Hb desoxigenada ou ligada com oxigênio.

Conforme a tabela IV, o ATP apresentou 2 sítios de ligação na desoxiHb com K de afinidade estimado $1,07 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $1,63 \times 10^{-7} \text{ M}$ e dois sítios na oxihemoglobina cujo K de afinidade estimado foi $4,73 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $1,63 \times 10^{-3} \text{ M}$. Por esses resultados observamos que o ATP se liga

fortemente a desoxiHb em ambos os sítios.

Alguns autores encontraram em Hb bovina (Kuwajima and Asai, 1975), de cavalo (Medlund et al, 1972) e humana (Horiuchi and Asai, 1983; Zuirderweg et al, 1981) mais de um sítio para fosfato orgânico, disponíveis. Entretanto, esta é, ao lado da Hb de camelo (*Camelus Dromedarius*) (Amiconi et al, 1985) as únicas descritas que possuem um segundo sítio de fosfato com alta afinidade. A localização de ambos os sítios na desoxiHb de *L.miliaris* não está determinada. A sequência de amino-ácidos (Matsuura, 1987*) não difere da hemoglobina humana nas regiões onde se ligam os ânions polifosfatos, sugerindo que um dos sítios de alta afinidade no derivado desoxigenado da hemoglobina seja similar ao da Hb humana estando localizado entre as cadeias β .

O alto valor da constante de afinidade no derivado oxigenado mostra a potencial relevância da forma oxigenada da hemoglobina para modulação da quantidade de oxigênio liberado aos tecidos como ocorre com a hemoglobina de camelo (Amiconi et al, 1985). Os resíduos de amino-ácidos na proteína que interagem com o ATP na forma desoxi não podem ser responsáveis pela sua ligação à forma oxi, uma vez que o sítio torna-se indisponível na transição para a conformação R (Perutz, 1970). Não se conhece ainda os resíduos responsáveis pela ligação do ATP na oxiHb.

Estudos recentes (Benesch et al, 1986) encontraram que 2,3-DGP e ATP tem afinidade relativamente alta por Hb humana oxigenada em sua forma dimérica $\alpha\beta$. A razão de afinidade encontrada para DPG na desoxiHb humana tetramérica e Hb O₂ dimérica foi somente 4:1 ($K_{\frac{Hb}{DPG}} : K_{\frac{HbO_2}{DPG}} = 4:1$). Como discutido anteriormente, se a oxiHb de *L.miliaris* tem o equilíbrio tetrâmero $\rightleftharpoons$ dimeros desviado para a direita, pode-se esperar que haja grande proporção das moléculas em forma de $\alpha\beta$ dimeros, que continuaria ligado ao ATP.

O estudo de ligação do NADPH à desoxiHb por fluorescência revelou a presença de um único sítio de ligação; a estequiometria encontrada foi consistentemente cerca de 0,75 mol. de NADPH por mol. de desoxiHb tetramérica (figuras 8 e 10).

A baixa estequiometria de 0,75 significa que aproximadamente 25% das hemoglobinas totais não se ligaram ao cofator. Como é difícil, senão impossível executar o experimento em sua íntegra, na total ausência de metaHb e sabendo-se que a mesma tem baixa afinidade por NADPH (Ogo et al, 1987a), aproximadamente 10% das proteínas que não participam na ligação com a nicotinamida reduzida deve-se provavelmente à hemoglobina oxidada. Portanto, os 15% restantes que não se ligaram ao cofator na ausência de oxigênio, pode ser devido à presença de hemoglobina dissociada, i.e., de dímeros presente na solução tendo em

vista que não foi detectado no hemolisado nenhum outro componente que poderia ter baixa afinidade do NADPH (Focesi et al, 1987). A hemoglobina humana dissociada ou a mioglobina tem também afinidade muito reduzida pelo NADPH (Ogo et al, 1987a).

Assim sendo, diferentemente ao ATP, o NADPH não se ligaria a proteína dissociada, nem em sua forma oxigenada e nem na desoxigenada. Pelos estudos da variação dos valores de $\log P_{50}$ em função da concentração do NADPH e a análise subsequente pela equação de Szabo e Karplus, 1972, encontramos também apenas 1 sítio de ligação por tetramero na Hb de *L.miliaris*, tanto na forma oxigenada quanto na desoxigenada, corroborando os dados da análise fluorimétrica. A constante de afinidade do nucleotídeo com a desoxiHb encontrada foi $7,4 \times 10^6 M^{-1}$ e com a oxiHb $7,89 \times 10^2 M^{-1}$; estes valores, comparados com aqueles obtidos com a hemoglobina humana normal, (Cashon et al, 1986) resulta que a afinidade da Hb de *L.miliaris* é cerca de 20 e 10 vezes maior na forma desoxigenada e oxigenada, respectivamente, tendo portanto, efeitos heterotrópicos similares aos encontrados na hemoglobina humana. Como ocorre com a hemoglobina humana, (Ogo et al, 1987), o NADPH parece se ligar no mesmo sítio de ligação do IHP, na desoxiHb de *L.miliaris* e é deslocado prontamente em presença de excesso de inositol hexafosfato (cerca de 10 vezes) Fig. 10, com uma estequiometria de cerca de 0,75 moles IHP/Hb

tetramérica. O sítio de ligação do NADPH na oxiHb continua desconhecido como ocorre com a Hb humana.

Outra diferença marcante do NADPH como modulador alostérico, em relação aos demais é que na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, o valor de n_H na saturação média sempre se manteve em torno de 2,5 independentemente do pH, ao contrário dos demais efetores estudados que perdiam a cooperatividade em pHs maiores que 7,5. Assim sendo, parece que o NADPH tem a capacidade de manter pelo menos, grande parte das moléculas de hemoglobina em sua estrutura quaternária na forma tetramérica.

Embora não se conheça o nível de nucleotídeo de nicotinamida fosfato no sangue das serpentes, este certamente deve exercer papel importante no transporte de oxigênio. Os níveis de ATP, GTP, etc determinados como NTP foram 0,63/heme na *L.miliaris* e 0,46/heme na *H.modestus*, níveis estes suficientes para determinar diminuição substancial nos valores de P50, pelo menos em pHs abaixo de 7,5 (Fig. 11).

Os estudos eletroforéticos e cromatográficos das hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris* (Ogo, 1977, Ogo et al, 1979) mostraram a existência de 2 ou 3 bandas cada, e a separação por isoeletrofocalização, 3 e 5 componentes, respectivamente.

Embora exista uma tendência em se considerar cada banda obtida por eletroforese ou cromatografia como uma hemoglobina distinta (Riggs, 1970) nem sempre, as frações correspondem às proteínas diferentes. A rigorosa análise dos componentes pode demonstrar diferenças não significativas entre si. Uma similaridade funcional das múltiplas hemoglobinas deve-se, possivelmente, as formas diferentes da mesma proteína como ocorre com as diversas bandas separadas por cromatografia em hemoglobinas de *H.modestus* e *L.miliaris*.

Os componentes do hemolisado dessas serpentes isolados por cromatografia ou isoeletrofocalização, quando analisados por eletroforese mostraram os mesmos padrões daqueles obtidos com o hemolisado não fracionado corroborando a nossa proposição sobre a existência de apenas uma hemoglobina sob diferentes estados de agregação, i.é, de tetrâmeros, dímeros ou monômeros em solução. Seria este o caso típico em que a tendência de dissociação em sub-unidades leva a uma complicação no comportamento cromatográfico e eletroforético da proteína dando origem a componentes adicionais (Riggs, 1965).

Dependendo das condições em que a cromatografia era realizada, o hemolisado de *L.miliaris* resolveu em apenas 1 ou 2 picos. Por exemplo, o hemolisado "stripped" submetido à cromatografia em coluna de CM-celulose utilizando sistema gradiente de pH entre 6,0 e 8,0, tampão 0,02 tris-HCl, 1mM

EDTA, dependendo de fatores tais como temperatura, volume da coluna, volume dos tampões, presença ou não de moduladores no hemolisado, o pico mais lento caminhava progressivamente mais rápido na coluna e era eluído junto com o mais rápido. A interpretação pode ser a seguinte: em pH 6, a forma tetramérica migraria mais rapidamente separando-se da forma dimérica em 2 bandas. Com o aumento do pH, causado pelo gradiente, o pico mais lento iniciaria sua migração enquanto que a banda mais rápida se transformaria em dímeros considerando-se que em pHs mais alcalinos ocorre o deslocamento do equilíbrio $\text{dímero} \rightleftharpoons \text{tetramero}$ para a esquerda. Assim o componente mais lento seria eluído juntamente com o mais rápido como moléculas diméricas. Portanto, as frações obtidas da cromatografia e isoeletrofocalização (contendo pI muito próximos) seriam resultantes da presença de tetrameros, dímeros e monômeros em solução de hemoglobina devido a facilidade com que as proteínas tetraméricas, na sua forma oxigenada, se dissociam. Evidentemente, a dissociação seria também dependente de pH e da concentração de hemoglobina.

Foi demonstrado com a hemoglobina humana que a concentração tem também importância fundamental sobre a afinidade visto que soluções diluídas (cerca de 10-20 μM) tem o equilíbrio $\text{tetramero} \rightleftharpoons \text{dímero}$ deslocado mais para a direita em relação às mais concentradas (Chiancone et al,

1968).

Devido à alta afinidade pelo oxigênio e baixo valor de nH encontrados na hemoglobina de *L.miliaris* pelo método tonométrico ou com o aparelho de Imai, utilizando concentração de proteína, cerca de $60\mu M$ (em heme), foi nosso interesse conhecer se concentrações mais elevadas de proteínas, levariam a alteração destes parâmetros, nas mesmas condições: tampão $0,05M$ tris HCl pH 7,0 contendo $0,1mM$ EDTA, a $25^{\circ}C$. Assim, utilizando-se o método de camada delgada HEM-O-SCAN, analisamos a curva de dissociação da Hb de *L.miliaris* numa concentração entre $50\mu M$ e $1000\mu M$ (em heme). A fig. 13 pode ser interpretada de acordo com a variação nos valores de $\log P50$ e nH da seguinte forma: embora não se observe alteração marcante nos valores de $\log P50$, há uma tendência de maior interação entre as sub-unidades à medida que se aumenta a concentração da proteína.

Muito se tem escrito sobre a vantagem do aspecto sigmoidal da curva de equilíbrio com oxigênio (Grig, 1974). As hemoglobinas das serpentes por nós estudadas não mostram aspecto sigmoidal na curva de dissociação do oxigênio como ocorre na maioria dos mamíferos. Por outro lado, a curva não é hiperbólica como na mioglobina ou na hemoglobina dimérica ou monomérica encontrada em certos peixes cyclostomos (Manwell, 1963) e *P.marinus* (Wald and Riggs, 1951) com $nH=1,0$. Devido o equilíbrio dinâmico ou a

conversão gradativa de tetramero a dímero com a transição da estrutura T de baixa afinidade para estrutura R de alta afinidade a curva de oxigenação de Hb de *L.miliaris* mostrou também ser "mista", que refletiu sobre a cooperatividade diferente no início da oxigenação e na saturação superior que 50%. A curva "mista" foi observada também em presença de ATP, no pH fisiológico (~7,6) (Ogo and Matsuura, 1985*) o que confere à hemoglobina grande vantagem na combinação com oxigênio num ambiente pobre em gás e a sua liberação nos tecidos em metabolismo, através de sua baixa afinidade.

Como o transporte de oxigênio é fortemente modulado pelos componentes intraeritrocíticos, além de ânions polifosfatos e íons H^+ , outros moduladores devem ser considerados, como por exemplo, cloretos, fosfatos, etc que também interferem no equilíbrio de dissociação de sub-unidades favorecendo ou dificultando o mesmo.

Do exposto podemos concluir que as hemoglobinas das serpentes refletem adaptações sofridas não somente com relação à velocidade metabólica, mas também às pressões de oxigênio predominante no meio em que vivem.

As serpentes, quando estimuladas, aumentaram metabolismo anaeróbico de acordo com a análise de ácido láctico do sangue que passaram dos níveis basais de 10 mg% e 40 mg% para 150 mg% e 230 mg% nas espécies *H.modestus* e *L.miliaris* respectivamente causando, portanto, diminuição do pH sanguíneo e todas as consequências provenientes dessa

* Ogo, S.H. and Matsuura, M.S.A., 1985. Dados não publicados.

acidificação, i.e., maior estabilização da Hb tetramérica, maior afinidade da proteína por ânions polifosfatos e menor afinidade da Hb pelo oxigênio e assim, facilitando a oxigenação tecidual.

Com relação ao habitat, tanto a espécie mais aquática, *H. modestus* com algumas adaptações morfológicas do aparelho respiratório para viver na água (Abe, 1977) quanto a espécie *L. miliaris* sem qualquer adaptação, teriam suas compensações através da modificação ao nível molecular de suas hemoglobinas que seriam adaptadas para responder pela oxigenação adequada dos tecidos, mesmo passando, os animais, muito tempo mergulhados ou respirando num ambiente pobre em oxigênio.

Finalmente, as hemoglobinas destas serpentes que se dimerizam para aparentemente "conseguir" mais oxigênio e se reassociam ao nível tecidual facilitando a oxigenação do mesmo parece ser um exemplo único na natureza e vem reafirmar pelo menos em parte o modelo proposto pelo genial Barcroft (1910) que desconhecendo qualquer efector alostérico propunha a associação e dissociação da hemoglobina como o único meio lógico de uma molécula conseguir ligar oxigênio e desligá-lo quando necessário.

Estudos com hemoglobinas de outras espécies de serpentes terrestres e aquáticas estão em progresso para verificar se os fenômenos do equilíbrio de dissociação tetramero $\rightleftharpoons$ dímero que ocorrem durante a ligação e

liberação do oxigênio, e os demais fenômenos estudados na presente tese, são restritos a essas duas espécies de serpentes ou se são gerais para os ofídios ou se estão associados ao habitat e modo de vida dos animais, é de nosso interesse verificar também se o mesmo fenômeno de equilíbrio de dissociação das sub-unidades está presente em hemoglobinas de peixes e quais suas implicações fisiológicas.

A ausência de interação heme-heme é descrita em muitas espécies de peixes bem como a presença de bandas múltiplas em eletroforese e cromatografia que poderiam ser resultante da dissociação de sub-unidades e reassociação em moléculas híbridas com mobilidades distintas.

Por outro lado, utilizando-se a técnica de fluorescência, nos propomos a averiguar o desligamento do modulador NADPH com a ligação do ligante no heme na hemoglobina não só das serpentes, mas também de outros mamíferos e não mamíferos, cujo estudo parece ser de importância fundamental na investigação da conformação da proteína parcialmente saturada com oxigênio.

RESUMO

As serpentes aquáticas *Helicops modestus* e *Liophis miliaris* apresentaram nos hemolisados totais 3 e 5 componentes respectivamente que parecem ser formas diferentes da mesma hemoglobina. As curvas de equilíbrio com oxigênio da hemoglobina "stripped" de ambas as serpentes mostraram alta afinidade pelo oxigênio, de cerca de 1,0mm Hg em pH 7,0, pequeno efeito Bohr alcalino, cerca de -0,07 em *H.modestus* e -0,30 em *L.miliaris* bem como baixa cooperatividade (nH cerca de 1,0) e pronunciado efeito de fosfatos orgânicos sobre ambos, afinidade pelo oxigênio e efeito Bohr. Assim, os valores de P_{50} encontrados em presença de efetor alostérico como ATP foram 17,8mm Hg e 8,93mm Hg, os valores do efeito Bohr alcalino foram cerca de -0,90 e -0,55 em Hb de *L.miliaris* e *H.modestus*, respectivamente. Os valores do coeficiente de Hill em pHs menores que 7,5 foram cerca de 2,0 enquanto que em pHs maiores foram cerca de 1,0 mostrando ausência de cooperatividade entre as sub-unidades nestas condições. Estudos de ligação de oxigênio mais detalhados foram feitos com a célula de Imai e os "plot de Hill" obtidos foram não usuais em sua forma sugerindo a presença de diferentes formas espectrais na solução. De fato, a determinação de peso molecular indicou a presença de 2 formas de

hemoglobina: uma dimerica com p.m. 32000d e uma tetramérica de aproximadamente 64000d. A desoxihemoglobina era tetramérica e foi convertida em dimerica pela ligação de ligantes como oxigênio.

A presença de polifosfatos orgânicos estabilizou a conformação T tetramérica corroborando os dados obtidos nos experimentos de equilíbrio. Os polifosfatos orgânicos como ATP ligaram-se tanto na forma desoxi quanto na oxi da hemoglobina de *L.miliaris* através de 2 sítios de ligação. As constante de afinidade (Kb) estimadas foram $1,07 \times 10^{11} M^{-1}$, $1,63 \times 10^7 M^{-1}$ e $4,73 \times 10^5 M^{-1}$, $1,83 \times 10^3 M^{-1}$, respectivamente. Outro fosfato orgânico, NADPH, que apresenta fluorescência intrínseca, recentemente descrito como efector alostérico da hemoglobina humana, foi também estudado. Como os demais polifosfatos orgânicos analisados, este efector interagiu com a desoxiHb (Kb cerca de $7,4 \times 10^6 M^{-1}$) e diminuiu a afinidade pelo oxigênio (P50 foi cerca de 10,0mm Hg em pH 7,0). A Kb para oxiHb foi estimada em $7,89 \times 10^2 M^{-1}$. A estequiometria de 0,75 mol NADPH/desoxiHb (tetramero) foi encontrada através dos experimentos de fluorescência.

Devido ao grande efeito de fosfatos orgânicos sobre a afinidade e sobre o efeito Bohr, foi de interesse conhecer as possíveis implicações fisiológicas destas propriedades da hemoglobina. Então os níveis de nucleotídeo trifosfatos no sangue total das serpentes foram determinados e os

valores encontrados foram 2,64 mM em *H.modestus* e 2,6 mM em *L.miliaris* enquanto que as concentrações de hemoglobina encontradas foram de 6,14 mM e 4,21 mM (em heme). Estes valores correspondem a uma razão de ATP/ Hb (heme) igual a 0,63 em *L.miliaris* e 0,46 em *H.modestus*.

Por outro lado, alto efeito de prótons parece ser devido ao fato das serpentes *H.modestus* e *L.miliaris* apresentarem diferentes adaptações respiratórias aos seus habitat aquático e o metabolismo anaeróbico certamente desempenha um importante papel na vida das serpentes e pode ser demonstrado através da análise dos níveis de ácido láctico. O nível basal de ácido láctico encontrado no sangue total de *H.modestus*, a serpente menos ativa foi cerca de 10 mg% enquanto que na *L.miliaris* foi cerca de 40 mg%. Após a estimulação, os níveis de lactato aumentaram acima de 150 mg% e 230 mg% respectivamente.

Finalmente o mecanismo molecular envolvendo transição dímero-tetrâmero foi proposto para descrever o transporte de oxigênio nestes animais.

SUMMARY

The water snakes *Helicops modestus* and *Liophis miliaris* presented 3 and 5 components, respectively in whole hemolysates and these appear to be different forms of the same hemoglobin. The oxygen equilibrium curves of the stripped form from both snake hemoglobins showed high oxygen affinities of about 1,0 mmHg at pH 7,0; small alkaline Bohr effect values of about -0,07 for *H.modestus* and -0,03 for *L.miliaris*, as well as low cooperativity (nH about 1,0) and a pronounced organic phosphate effect on both oxygen affinity and Bohr effect. Thus the P50 values found in the presence of an allosteric effector such as ATP were 17,8 mmHg and 8.93 mmHg and the alkaline Bohr effect was about -0,90 and -0,55 for *L.miliaris* and *H.modestus* hemoglobin respectively. The Hill coefficient values at pHs below 7,5 were about 2 while at higher pHs these were about 1, showing the absence of cooperativity between subunits under these conditions. A more accurate oxygen binding study was performed through Imai cell experiments and the Hill Plot obtained was unusual in shape, suggesting the presence of different spectral species in the solution. In fact, the molecular weight determination indicated the presence of 2 forms of hemoglobin, a dimeric form of about

MW,32000d and a tetrameric form of about 64000d. The deoxy-hemoglobin was tetrameric and it was converted to the dimer by binding of a ligand such as oxygen. The presence of organic polyphosphates stabilized the tetrameric T conformation corroborating the data of oxygen equilibrium experiments. The organic polyphosphate effector in the form of ATP was bound to both deoxy and oxy form of hemoglobin of *L.miliaris* through at least 2 binding sites. The estimated Kb were $1.07 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, $1.63 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $4.73 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.83 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ respectively.

Another organic polyphosphate, NADPH, recently described as an allosteric effector of human hemoglobin that presents intrinsic fluorescence, was also studied. As with other organic polyphosphates this effector interacted with deoxyHb. (Kb of about $7.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) and decreased the oxygen affinity (P50 of about 10 mmHg at pH 7.0). The Kb for oxyHb was estimated to be $7.89 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. A stoichiometry of .75 mol NADPH/ deoxyHb (tetramer) was revealed through fluorescence studies.

Due to the large effect of organic polyphosphates on the oxygen affinity and on the Bohr effect, it was of interest to determine the possible physiological implications of these hemoglobin properties. The level of nucleotide triphosphates in the whole blood of the snakes were determined and the values found were 2.84 mM for *H.modestus* and 2.6 mM for *L.miliaris* whereas the hemoglobin

concentrations were 6.14 mM and 4.21 mM (as heme) respectively. These values correspond to a ratio of ATP/hemoglobin (tetramer) of 2.5 for *L.miliaris* and 1.84 for *H.modestus*.

On the other hand, the high proton effect seems to be due to the fact that *H.modestus* and *L.miliaris* present different respiratory adaptations to their aquatic habitat and the anaerobic metabolism must play an important physiological role as demonstrated by lactic acid levels. The basal level of lactate found in the whole blood of *H.modestus*, the less active snake, was about 10 mg%, whereas for *L.miliaris* it was about 40 mg%. After stimulation, the lactate level increased up to 150 mg% and 230 mg% respectively.

Finally, a molecular mechanism involving dimer-tetramer transition was proposed to describe the oxygen transport in these animals.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABE, A. S. Adaptações respiratórias e tolerância a variações de alguns fatores extrínsecos em *Helicops modestus* Gunter, 1861 e *Liohpis miliaris* (Linnaes, 1758), serpentes de hábitos aquáticos (serpentes: Colubridae). São Paulo, 1977 161p. (Tese - Doutorado) Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.
- AMICONI, G., BERTOLLINI, A., BELLELLI, A., COLETA, M., CONDO, S.G. AND BRUNORI, M. Evidence for two oxygen-linked sites for polyanions in dromedary hemoglobin. Eur. J. Biochem. 150: 387-93, 1985.
- ANDERSEN, H. T. Physiological adaptations in diving vertebrates Physiol. Rev., 46:212-43, 1966.
- ANTONINI, E., SHUSTER, T. M., BRUNORI, M. and WYMAN, J. The kinetics of the Bohr effect in the reaction of human hemoglobin with carbon monoxide. J. biol. Chem., 240: PC2262-PC2264, 1965.
- ANTONINI, E. and BRUNORI, M. In: Neuberger, A. and Tatum, E.L. ed. Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands. Amsterdam, North Holland, 1971.

- ANTONINI, E. and BRUNORI, M. Transport of oxygen: respiratory proteins. In: Hayashi, O., ed. Molecular oxygen in biology: topics in molecular oxygen research. Amsterdam North Holland, 1974, p.219-274.
- ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature, 237:146-9, 1972.
- ARNONE, A. and PERUTZ, M. F. Structure of inositol hexaphosphate human deoxyhaemoglobin complex. Nature, 249:34-6, 1974.
- BALDWIN, J. and CHOTHIA, C. Haemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. J. molec. Biol., 129:175-220, 1979.
- BARCROFT, J. The respiratory function of the blood. Part. I Hemoglobin. Cambridge Univ. Pr., 1910.
- BENESCH, R. and BENESCH, R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. biophys. Res. Commun., 26:162-7, 1967.
- BENESCH, R., BENESCH, R. E. and YU, C. I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 59:526-32, 1968.

BENESCH, R. and BENESCH, R. E. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. Nature, 221:618-622, 1969.

BENESCH, R. E. and BENESCH, R. The reaction between diphosphoglycerate and hemoglobin. Fed. Proc., 29:1601-4, 1970.

BENESCH, R. E., BENESCH, R. and KWONG, S. Binding of diphosphoglycerate and ATP to oxyhemoglobin dimers. J. molec. Biol., 190:481-5, 1986.

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

BENNETT, A. F. and DAWSON, W. R. Metabolism. In: Gans, C. and DAWSON, W. R., ed. Biology of the reptilia. London, Academic 1976. p.127-223.

BRAUNITZER, G. R., GEHRING-MULLER, N., ILSHANN, K., HILSEN, G., HOBOM, U., RUDLOFF, N. and WITHMANN-LIEBOLD, B. Die konstitution des normalen adulten humanhemoglobins. Z-Physiol. Chem., 333:283, 1961.

- BRIEHL, R. The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. J. biol. Chem., 238:2361-6, 1963.
- BRUNORI, M., AMICONI, G., ANTONINI, E., WYMAN, J. and WINTERHALTER, K. H. Artificial intermediates in the reaction of hemoglobin. Function and conformational properties of the cyanamet intermediates. J. molec. Biol., 49:461-71, 1970.
- BRUNORI, M., GIARDINA, B., BONAVENTURA, J., BARRA, D. and ANTONINI, E. Properties of fish hemoglobins: the hemoglobin system of trout (*Salmo irideus*) In: Bolis, K. et al, ed. Comparation physiology. Amsterdam, North-Holland, 1973.
- BUNN, H. F. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. Science, 172:1049-50, 1971.
- BUNN, H. F. and BRIEHL, W. The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. J. Clin. Invest., 49:1088-95, 1970.
- CASHON, R., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. and FOCESI, A. The nicotinamide adenine dinucleotides as allosteric effectors of human hemoglobin. J. biol. Chem., 261(27):12700-5, 1986

- CHANUTIN, A., and CURNISH, R. Effect of organic and inorganic phosphate on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Archs Biochem. Biophys., 121:96-102, 1967.
- CHIANCONE, E., ALFSEN, A., IOFFOLO, C., VECCHINI, F., AGRO, A. F., WYMAN, J., and ANTONINI, E. Studies on the reaction of haptoglobin with haemoglobin an haemoglobin chains. I. Stoichiometry and affinity. J. molec. Biol., 34:347-56, 1968.
- DAVIS, B. J. Disc Electrophoresis. I- Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.
- DESSAUER, H. C. Blood chemistry of reptiles:physiological and evolutionary aspects. In: GANS, C., and DAWSON, T. S. ed. Biology of the reptilia. New York, Academic, 1970, v.3 p.1-72.
- FERMI, G. Three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 2.5 Å resolution; refinement of the atomic model. J. molec. Biol., 97:237-56, 1975.
- FOCESI JR., A., OGO, S.H., MATSUURA, M. S. A. and SAY, J. C. Further evidence of dimer-tetramer transition in hemoglobin from *Liohpis miliaris*. Braz. J. Med. Res. 20, 1987. (In Press)

- GRAHAM, J. B. Aquatic respiration in the sea snakes *Pelamis platurus*. Respir. Physiol., 21:1-7, 1974.
- GRIG, G. G. Respiratory function of blood in fishes. In: FLORKIN, M. and SCHEEN, B. ed. Chemical Zoology. New York, Academic, 1974, v.8, p.331-367.
- GUIDOTTI, G., KONIGSBERG, W. and GRAIG, L. G. On the dissociation of normal adult human hemoglobin. Proc. natn. Acad. Sci., 50(40):774-82, 1963.
- GUPTA, R. K., BENOVIC, J. L. and ROSE, Z. B. Location of the allosteric site for 2,3-diphosphoglycerate on human oxy and deoxyhemoglobin as observed by magnetic resonance spectroscopy. J. biol. Chem., 254:8250-5, 1979.
- HEATWOLE, H. and SEYMOUR, R. S. Diving physiology. In: DUNSON, W.A. ed. Biology of sea snakes. Maryland, University Park Pr., 1975, p.289-327.
- HEDLUND, B., DANIELSON, C. and LOVRIEN, R. Equilibria of organic phosphates with horse oxyhemoglobin. Biochemistry, 11:4660-8, 1972.

- HORIUCHI, K. and ASAI, H. Binding of β -naphthyl triphosphate to human adult hemoglobin accompanying deoxygenation. Eur. J. Biochem., 131:613-8, 1983.
- IMAI, K., NORIMOTO, H., KOTANI, M., WATARI, H., HIRATA, W. and KURODA, M. Studies on the function of abnormal hemoglobins. I. An improved method for automatic measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. Biochim. Biophys. Acta, 200:189-96, 1970.
- IMAI, K. Analysis of oxygen equilibria of native and chemically modified human adult hemoglobin on the basis of Adair's stepwise oxygenation theory and allosteric model of Monod, Wyman and Changeau. Biochemistry, 12(5):796-808, 1973.
- IMAI, K. and YONETANI, T. The hemoglobin-oxygen equilibrium associated with subunit dissociation I. An approach with the Hill scheme. Biochim. Biophys. Acta, 490:164-70, 1977.
- JOHNSON, B., 1984. Duke University, Ph. D. Dissertation.
- JOHNSON, L. F. and TATE, M. E. Structure and "phytic acids". Can. J. Chem., 47:63-73, 1969.

JOHNSON, M. L., CORREIA, J., YPHANTIS, D. A. and HALVORSON, H. R.
Analysis of data from the analytical ultracentrifuge by
non linear least-square techniques. Biophys. J., 36:575-88,
1981.

KILMARTINN, J. V. and ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO2
combination and reduction of the Bohr effect in haemoglobin
chemically modified at its α amino groups. Nature, 222:1243-6,
1969.

KONIGSBERG, W., GUIDOTTI, G. and HILL, R. J. The amino acid
sequence of the β chain of human hemoglobin. J. biol. Chem.,
236(9):PC55-PC56, 1961.

KOSHLAND, D. E. Jr., NEMETHY, G. and FILMER, D. Comparison of
experimental binding data and theoretical models in protein
containing subunits. Biochemistry, 5(1):365-385, 1966.

KUNAJIMA, T. and ASAI, H. Synthesis of fluorescent organic
phosphates and their equilibrium binding to bovine
oxyhemoglobin. Biochemistry, 14(3):492-7, 1975.

LADNER, R. C., HEIDNER, E. J. and PERUTZ, M. F. The structure of
horse methaemoglobin at 20 $\text{\AA}$ resolution. J. molec. Biol.,
114:385-414, 1977.

- LAMPRECHT, W. and TRAUSCHOLD, I. Adenosine-5'-triphosphate determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis, New York, Academic, 1965. p.543-551.
- LAPENAS, G. N., COLACINO, J. M., BONAVENTURA, J. Thin-Layer methods for determination of oxygen binding curves of hemoglobin solutions and blood. Meth. Enzymol., 76:449-90, 1981
- LAURENT, T. C. and KILLANDER, J. A theory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromat., 14:317-30, 1964.
- MacDONALD, M. J., TURCI, S. M. and BEICKMAN, M. Functional and sub-unit assembly properties of hemoglobin Alberta ($\alpha_2\beta_2$ 101 Glu $\rightarrow$ Gly).
- MANWELL, C. The blood proteins of cyclostomes. A study in phylogenetic and ontogenic biochemistry. In Brodal, A. and Frange, R. ed. Biology of Myxine, Oslo, Oslo Univ. Pr., 1963. p.372.
- MARBACH, E. P. and WEIL, M. H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Clin. Chem., 13:314, 1967.

- MATSUURA, M. S. A., OGO, S. H. and FOCESI, Jr., A. Dimer-tetramer transition in hemoglobins from *Liohpis miliaris* - I. Effect of organic polyphosphates. Comp. Biochem. Physiol., 86B(4): 683-7, 1987.
- MEIRELLES, N. C. Estudos sobre hemoglobinas de *Pipa carvalhoi*. Campinas, 1975. 75p. (Tese-Doutoramento). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEAUX, J. P. On the nature of allosteric transitions: a possible model. J. molec. Biol., 12:88-118, 1965.
- MUIRHEAD, H., COX, J. M., MAZZARELLA, L. and FERUTZ, M. Structure and function of haemoglobin. III. A three dimensional Fourier synthesis of human desoxyhemoglobin at 5,5 Å resolution. J. molec. Biol., 28:117-150, 1967.
- OGO, S. H. Propriedades funcionais de hemoglobinas de serpentes com diferentes graus de adaptação morfológicas ao ambiente aquático. Campinas, 1977. 79p. (Tese-Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- OGO, S. H. and FOCESI, Jr., A. Bohr effect and lactic acid content of the blood of 2 water-snakes with different degrees of aquatic adaptations. Experientia, 35:862-3, 1979.

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

OGO, S. H., CASHON, R., BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. Spectrofluorimetric analysis of the allosteric modulation of hemoglobin function by NADPH, 1987a, In Press.

OGO, S. H., FOCESI Jr., A., CASHON, R., BONAVENTURA, C. and BONAVENTURA, J. Fluorescence studies on the binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to human hemoglobin A and its variant Hemoglobin Providence. Braz. J. Med. Biol. Res., 20, 1987. (In Press).

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. background and theory Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:321-49, 1964.

PERUTZ, M. F. Structure and function haemoglobin. I. A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. J. molec. Biol., 13: 646-68, 1965.

PERUTZ, M. F., MUIRHEAD, H., MAZZARELLA, L., CROWTHER, R. A.,
GREER, J., KILMARTIN, J. V. Identification of residues
responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin
Nature, 222:1240-3, 1969.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in
haemoglobin. Haem-haem interaction and the problem of
allostery. The Bohr effect and combination with organic
phosphates. Nature (London), 228:726-39, 1970.

POUGH, F. H. Environmental adaptation in the blood of lizards.
Comp. Biochem. Physiol., 31:885-901, 1969.

POULIK, M. D. Starch gel electrophoresis in a discontinuous
system of buffers. Nature, 180:1477-9, 1957.

PRADO, J. L. Inactive (non oxygen combining) hemoglobin in
ophidia and dogs. Science, 102:406, 1946.

RAPOPORT, S. and GUEST, G. M. Distribution of the acid-soluble
phosphates in the blood cells of various vertebrates.
J. biol. Chem., 138:269-82, 1941.

RIGGS, A. and WOLBACH, R. A. Sulphydryl groups and the
structure of hemoglobin. J. Gen. Physiol., 39(4):585-605,
1956.

RIGGS, A. Functional properties of hemoglobin. Physiol. Rev.,
45:619-73, 1965.

RIGGS, A. Properties of fish hemoglobin. In Hoar, W.S. and
Randall, D.J. ed. Fish Physiology. New York, Academic,
1970, v.4, p.209-51.

ROMER, A. S. Vertebrate paleontology. 3 ed. London, Chicago
Univ., 1966. 468p.

ROSEMEYER, M. A. and HUEHNS, E. R. On the mechanism of the
dissociation of hemoglobin. J. molec. Biol., 25:253-73, 1967.

ROSSI-FANELLI, A., ANTONINI, E. and CAPUTO, A. Studies on the
relations between molecular and functional properties of
salts on the molecular weight of human hemoglobin. II The
effects of salts on the oxygen equilibrium of human
hemoglobin. J. biol. Chem., 236:391-7, 1961.

ROSSI-FANELLI, A., ANTONINI, E. and CAPUTO, A. Hemoglobin and
myoglobin. Adv. Prot. Chem., 19:73, 1964.

- SMITHIES, O., An improved procedure for starch-gel electrophoresis
further variation in the serum protein of normal individuals,
Biochem. J., 71:585-7, 1959.
- SZABO, A. and KARPLUS, M., A Mathematical model for structure-
-function relation in hemoglobin. J. molec. Biol., 72:163-7,
1972.
- TAM, L. T. and RIGGS, A. F., Oxygen binding and aggregation of
bilfrog hemoglobin. J. biol. Chem., 259(4):2610-16, 1984.
- TOMITA, S., ENOKI, Y., SANTA, M., YOSHIDA, H. and YASUMITSU, Y.
A simple spectrophotometric method for determination of
met-hemoglobin in dilute solution. J. Nara Med. Assoc.,
19:1-6, 1968.
- TYUMA, I., IMAI, K. and SHIMIZU, K., Analysis of oxygen
equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic
phosphates. Biochemistry, 12(8):1491-8, 1973.
- VAN BEEK, G. M. and DE BRUIN, H., The pH dependence of the
binding of D-glycerate 2,3-bisphosphate to deoxyhemoglobin
and oxyhemoglobin. Eur. J. Biochem., 100:497-502, 1979.

- WALD, G. and RIGGS, A. Hemoglobin of the sea lamprey,
Petromyzon marinus. J. Gen. Physiol., 35:45, 1951.
- WEISS, L., WOLFF, J., KNOWLES, F.C., DeFILIPPI, L. J., GIBSON,
Q.H. Synthesis and characterization of N-(2,4-diphosphobenzil)-
1-amino-5-naphthalenesulfonic acid, a new fluorescent
analogue of diphosphoglyceric acid. J. biol. Chem., 253(7):
2380-5, 1978.
- WOOD, S. C. and LENFANT, C. J. M. Respiration:mechanics control
and gas exchange. In: GANS, C. and DAWSON, W.R., ed.,
Biology of the Reptilia. London, Academic, 1976, v.5,
p.225-74.
- WYMAN, J. Heme proteins. Adv. Protein Chem., 4:407-531, 1948.
- WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin
a second look. Advan. Protein. Chem., 19:223-86, 1964.
- ZUIDERWEG, E. R., HAMERS, L. F., ROLLEMA, H. S., de BRUIN, S. H.
and HILBERS, C.W. ³¹P NMR Study of the kinetics of binding of
myo-inositol hexakisphosphate to human hemoglobin. Observation
of fast-exchange kinetics in high-affinity systems. Eur. J.
Biochem., 118:95-104, 1981.