

Este exemplar corresponde à redação final de tese defendida pela candidata, Srta Eneida de Paula e aprovada pela comissão julgadora.

N. C. Meirelles.

29/03/88

Eneida de Paula

Alterações Funcionais da
Hemoglobina Humana:
Interação com Drogas Vasodilatadoras.

Orientadora:
Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre (em Bioquímica).

UNICAMP
Março - 1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Agradecimentos

Foram tantos os amigos, tão longa a caminhada, que torna-se difícil retribuir a todos, de maneira que lhes seja à altura do bem que me foi prestado ...

Agradeço sinceramente à Prof. Neuza Maria Barbosa, pelo tempo e dedicação à minha formação técnica, com seu exímio conhecimento laboratorial e paciência ímpar.

À Prof. Dra. Nilce Correa Meirelles, orientadora dessa tese, pela condução desse trabalho e minha, dando-me liberdade de iniciativa, porém orientando-me quanto à interpretação dos resultados, e incentivando-me nos momentos difíceis pela sua experiência e moderação.

Agradeço também ao Prof. Dr. Renato G. G. Terzi, pela orientação e incentivo, seriedade e pronta disposição nas muitas vezes em que o solicitei, para prosseguir com o trabalho que aqui concluo.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo auxílio e participação durante esses cinco anos de convivência.

Agradeço ainda, à bióloga Rosana C. M. Ribeiro de Paiva, à Srta. Ana Cristina de Moraes e ao Sr. Gomes Sarmento Alvin pela prontidão e boa vontade, possibilitando-me o uso dos aparelhos de gasometria, CO-oximetria e tonometria, do Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental, da Fac. Ciências Médicas da UNICAMP, a quem também registro meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi Junior e Dras. Satie H. Ogo e Maria S. A. Matsuura, pela concessão de equipamentos e de seu laboratório para as dosagens fotométricas da curva de oxigenação da hemoglobina.

Ao Sr. Carlos Eduardo Câmara pelo tempo e colaboração com seus conhecimentos no campo da matemática e computação, possibilitando o estudo dos modelos matemáticos propostos para a ligação hemoglobina/oxigênio.

À Srta. Lucia Maria Paleari pelo valioso trabalho de confecção dos desenhos e slides desta tese.

A Gilson Paulo Manfio, pelo auxílio na confecção final desta.

A meus pais, Pedro e Zoraide, pela paciência e apoio para que eu chegasse à conclusão desse trabalho; aos meus irmãos e aos amigos que partilharam da minha vida durante esse período de mudanças, e que foram particularmente importantes para minha formação, enquanto pessoa, que é grata sobretudo à Deus pela possibilidade de existir e realizar.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Teorias e Modelos sobre a Ligação Hemoglobina / Oxigênio	4
1.2	Tratamento Clínico de Angina Pectoris: Mecanismo de Ação dos Vasodilatadores	10
1.2.1	Nitratos Cardíacos	10
1.2.2	Vasodilatadores Não-Específicos	11
1.2.3	Bloqueadores β -adrenérgicos	12
1.2.4	Inibidores dos Canais de Cálcio	12
1.3	Interação Hemoglobina / Drogas	12
2	Objetivos	14
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Drogas Vasodilatadoras	15
3.1.1	Cloridrato de Papaverina (Cerebid, cardoverina, Artergodan)	15
3.1.2	Dipiridamol (Persantin, Prandiol, Dipyridan)	15
3.1.3	Tetranitrato de Pentaeritritol (Peritrate, Nitropenta)	17
3.1.4	Dinitrato de Isosorbitol (Isordil, Isocord, Harrical, Isorbid)	17
3.1.5	Propatilnitrato (Sustrate, Etradil, Vasangor)	17
3.1.6	Lactato de Prenilamine (Incoran, Agazol, Sedolatan)	17
3.1.7	Nifedipine (Adalat, Oxcord, Procardia)	17
3.2	Preparação da Hemoglobina Humana "Stripped"	18
3.2.1	Determinação da Concentração da Hemoglobina em Solução	19
3.3	Métodos Experimentais para Determinação da Curva de Equilíbrio de Oxigenação da Hemoglobina	19
3.3.1	Método Fotométrico	20
3.3.1.1	Procedimento Experimental para a Dosagem de P_{50} em Amostras Purificadas de Hemoglobina	22
3.3.1.2	Determinação fotométrica de P_{50} em equilíbrios não isobésticos	27
3.3.2	Método Oximétrico	29
3.3.2.1	Tonometria	30
3.3.2.2	CO-Oximetria	32
3.3.3	Biotonometria	36
3.3.3.1	Mensuração da Velocidade de Consumo de Oxigênio pela Levedura	38
3.3.3.2	Determinação de Y% (Porcentagem de Saturação da Hb) e P_{50}	38
3.4	Equilíbrios de Diálise	40
3.5	Dosagem Sanguínea do 2,3-difosfoglicerato	43
3.5.1	Dosagem em Micro-amostra Sanguínea	44

3.5.2	Modificações do Método em Micro-amostra	44
4	Resultados	46
4.1	Equilíbrios de Oxigenação por Espectrofotometria	46
4.1.1	Determinação do "Efeito Bohr"	46
4.1.2	Verificação do Efeito de Poliânions Fosfato sobre a Afinidade Hb/Oxigênio	48
4.1.3	Determinação de P ₅₀ no Sangue de Pacientes Anginosos Tratados Clinicamente com os Vasodilatadores de Interesse.	48
4.1.4	Estudos com a Hemoglobina <i>in vitro</i> , Purificada	52
4.1.5	Efeito dos Vasodilatadores Estudados sobre Suspensões de Hemácias	52
4.1.6	Hb x Papaverina: Estudo da Concentração, pH, e Íons Fosfato sobre o Efeito da Droga na Afinidade Hb/Oxigênio	57
4.1.7	Hb x Dipiridamol: Efeito do pH e Concentração sobre o Efeito da Droga em P ₅₀	61
4.1.8	Hb x Nifedipine: Efeito da Concentração da Droga e do pH sobre o Deslocamento da C.D. Hb	62
4.2	Biotonometria	63
4.2.1	Determinação da Velocidade de Consumo de Oxigênio pela Levedura na Presença dos Vasodilatadores	63
4.2.2	Determinação de P ₅₀ por Biotonometria e Estudo da Ação dos Vasodilatadores sobre a Afinidade Hb/Oxigênio	63
4.3	Equilíbrios de Diálise	70
4.3.1	Equilíbrios de Diálise com a Papaverina	70
4.3.2	Diálise Hemoglobina x Prenilamine	73
4.3.3	Diálise Hemoglobina x Dipiridamol	73
4.4	Oximetria	73
4.4.1	Padronização do Método CO-Oximétrico	73
4.4.2	Verificação do Efeito dos Vasodilatadores sobre P ₅₀ por Ensaio CO-Oximétrico	81
4.4.3	Efeito Oxidativo dos Vasodilatadores sobre a Hemoglobina Durante os Ensaio de CO-Oximetria	87
4.4.4	Efeito da Temperatura, Tempo de Incubação e Concentração de Droga sobre a Afinidade Hb/Oxigênio	88
4.4.5	Dosagem de 2,3-DPG no Sangue de Pacientes Anginosos Tratados com Vasodilatadores	94
5	Discussão	95
6	Conclusões	102

7	Resumo	105
8	Abstract	106
9	Bibliografia	107
10	Apêndice	116

Abreviaturas

Hb	=	Hemoglobina
Mb	=	Mioglobina
2,3-DPG	=	2,3-Difosfoglicerato
ATP	=	Trifosfato de Adenosina
IHP	=	Inositol Hexafosfato
O ₂	=	Oxigênio
PAV	=	Papaverina
DIP	=	Dipiridamol
NIF	=	Nifedipine
PREN	=	Prenilamine
ISL	=	Isordil (Dinitrato de Isosorbitol)
PTT	=	Peritrate (Tetranitrato de Pentaeritritol)
STR	=	Sustrate (Propatilnitrato)
TNT	=	Nitroglicerina
LEV	=	Levedura
O.E.C.	=	“Oxygen Equilibrium Curve” ou Curva de Oxigenação da Hb
V.C.O ₂	=	Velocidade de Consumo de Oxigênio pela levedura, em ensaios Biotométricos
P ₅₀	=	Pressão de Oxigênio para 50% de saturação dos sítios ligantes da Hb
pO ₂	=	Pressão parcial de Oxigênio

1 Introdução

A hemoglobina é uma proteína conjugada, composta por quatro cadeias polipeptídicas — duas α e duas β , cada qual contendo como grupamento prostético o heme, isto é, um anel tetrapirrólico (Protoporfirínico) ligado a um átomo de ferro, responsável pela ligação com o oxigênio. O Fe^{2+} encontra-se coordenado com os quatro nitrogênios do anel protoporfirínico, na sua quinta posição com um resíduo de histidina (His proximal) e a sua sexta posição de coordenação, livre, combina-se reversivelmente com o oxigênio e outros ligantes gasosos.

A molécula de hemoglobina atua como um tetrâmero, isto é, uma associação de quatro subunidades semelhantes entre si e capazes de ligar, cada uma, uma molécula de oxigênio.

Sob o ponto de vista estrutural, a Hb assemelha-se muito a uma outra proteína, presente basicamente no tecido muscular, a Mioglobina (Mb). Esta heme proteína, é constituída de uma só cadeia polipeptídica, semelhante às cadeias β da Hb, e tem um peso molecular quatro vezes menor do que a mesma, isto é, 16.000. Assim, uma molécula de Mb somente pode ligar uma molécula de oxigênio. A Mb tem uma afinidade altíssima pelo oxigênio, o que faz com que a mesma seja capaz de captar o O_2 sanguíneo que chega ao músculo e “estocá-lo” para ser utilizado em situações onde o trabalho muscular exija um suprimento maior desse gás, para as oxidações metabólicas. Em tais condições, pela escassez de oxigênio tecidual, e a Mb libera seu O_2 . Devido à alta afinidade pelo oxigênio, isto é, $P_{50} = 2,75$ mmHg em pH 7,4 e $T = 37^\circ \text{C}$ (ROSSI-FANELLI & ANTONINI 1958) a Mb só liberará o seu O_2 para o tecido quando a tensão desse gás ali for bastante baixa.

A hemoglobina, no entanto, como proteína sanguínea não tem a mesma função de estocagem que possui a Mb; seu principal papel é o de transporte do oxigênio. Portanto, a Hb deve ser versátil o suficiente para ligar-se e desligar-se facilmente do O_2 , em respostas dependentes da tensão de oxigênio do tecido que perfundir.

As quatro cadeias polipeptídicas da Hb, independentemente possuem a mesma alta afinidade que a Mb pelo oxigênio (ANTONINI & BRUNORI, 1971). Porém a afinidade do tetrâmero de Hb é bem menor, $P_{50} = 27$ mmHg (MULHAUSEN *et al.*, 1967; EDWARDS *et al.*, 1968; WOODSON, 1970), indicando um mecanismo adaptativo molecular que lhe permite a ligação

reversível e, conseqüentemente a capacita à função de transporte do O₂.

Essa adaptação fisiológica faz com que a Hb ligue-se ao oxigênio ao nível dos pulmões onde a oferta do mesmo é enorme (PO₂ = 104 mmHg), liberando-o, porém, a nível tissular, onde a PO₂ cai para 40 mmHg (HARKEN, 1977; AFONSO, 1981). O oxigênio liberado pela Hb é utilizado diretamente na respiração celular, ou armazenado, na forma de Oxi-Mb, nos tecidos musculares.

A capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue aumenta de 0,3 ml (pela Lei de Henry = quantidade dissolvida no plasma e que depende da solubilidade e pressão parcial do gás) para 20,85 ml/100 ml de plasma, na presença de 15 g% de Hb e pressão parcial de O₂ igual a 100 mmHg (AFONSO, 1981).

Sabe-se atualmente que a versatilidade da Hb na ligação com o oxigênio é dada: a) pelas modificações estruturais permitidas pela associação das 4 subunidades da molécula, e onde um composto orgânico, o 2,3-DPG tem importante papel e b) pelo Efeito de íons hidrogênio (Efeito Bohr), sendo que o pH sanguíneo varia de 7,2, nos tecidos, para 7,45, nos pulmões (HARKEN, 1977).

O 2,3-Difosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica, encontra-se no sangue em concentrações equimolares à Hb, 2 mMoles/ml de sangue, isto é, em ordem de grandeza duas vezes maior que em qualquer outro tecido corpóreo (SUTHERLAND *et al.*, 1949; JOYCE & GRISOLIA, 1958); sua concentração é ainda quatro vezes maior do que a do ATP, o segundo polifosfato mais comum intracelularmente (DELIVORIA-PAPADOPOULOS & OSKI, 1969).

O 2,3-DPG liga-se à molécula de hemoglobina (BENESCH & BENESCH, 1967; BENESCH *et al.*, 1968; EATON & BREWER, 1968), estabilizando a forma desoxigenada da proteína, e assim, diminui a afinidade da desta pelo oxigênio (BENESCH & BENESCH, 1969; BUNN & BRIEHL, 1970; DUHM & GERLACH, 1971; RIGGS *et al.*, 1973). Esse fosfato está também associado ao Efeito Bohr, pois sua ligação na cavidade central do tetrâmero permite a formação de pontes de hidrogênio, com os dois resíduos His 143 e amino grupos N-terminais das cadeias β , (PERUTZ, 1970; DE BRUIN *et al.*, 1971; VAN BEEK & DE BRUIN, 1979).

Durante o armazenamento do sangue os níveis de 2,3-DPG decrescem (em 50% após 3 dias de estocagem, segundo MILLER & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1970), simultaneamente ao aumento da afinidade Hb/oxigênio (AKERBLUM & DE VERDIER, 1968; RIGGS *et al.*, 1973), sendo que P₅₀ atinge valores mínimos em 7 dias de estocagem sanguínea (BUNN *et al.*, 1969).

A presença de ligantes no grupo heme da hemoglobina é dominada por interações funcionais ditas heterotrópicas, com grupos que reagem como componentes solúveis, tais como: prótons, dióxido de carbono, íons orgânicos e inorgânicos. As interações heterotrópicas da hemoglobina são exemplificadas pelo "Efeito Bohr", tido como o efeito de íons hidrogênio sobre a afinidade da hemoglobina pelo ligante oxigênio e o seu significado é o do fenômeno de ligação entre os sítios ligantes heme-oxigênio e sítios ligantes de prótons (aminoácidos de cadeias polipeptídicas laterais da proteína).

O Efeito Bohr primeiramente relatado (BOHR *et al.*, 1904) quanto à variação da Curva de Oxigenação da Hemoglobina em resposta a pressão parcial de dióxido de carbono, englobou posteriormente o efeito de íons hidrogênio, que viu-se estar intimamente relacionado (tampão bicarbonato) ao transporte sanguíneo desse gás (MUIRHEAD *et al.*, 1967). A formação de compostos carbamínicos (Hb + CO₂) e a ligação de íons hidrogênio inversamente à do oxigênio na Hb confere à hemoproteína um importante papel na manutenção do equilíbrio ácido básico do sangue.

Vários trabalhos foram publicados, referindo-se aos grupamentos moleculares da Hb responsáveis por esse efeito. Sabe-se que o transporte de H⁺ pela Hb só ocorre acima de pH 6,0, e que a Deoxi-Hb é capaz de transportar 0,4 moles de CO₂ por mol de heme, enquanto que a Oxi-Hb carrega 0,15 moles/mol de heme (MUIRHEAD *et al.*, 1967; KILMARTIN & ROSSI-BERNARDI, 1973).

Segundo PERUTZ (1970), no Efeito Bohr, são importantes: os grupamentos R dos resíduos de Lisina 146 das cadeias β e 2 resíduos das cadeias α (esses relacionam-se ao transporte de H⁺) e α-amino grupos da ponta amino terminal de cada uma das 4 cadeias polipeptídicas (que formam Carbamino-Hb).

É conhecido que todas as funções ligadas a reação com o CO₂ são inibidas se os α-amino grupos são bloqueados por cianeto (KILMARTIN & ROSSI-BERNARDI, 1969); o aumento da afinidade por CO₂ dos α-amino grupos acompanha a transição de oxi para deoxi Hb e assim, provém o maior mecanismo de transporte de dióxido de carbono pela célula vermelha.

KILMARTIN *et al.*, (1980) apresentam ainda o resíduo de Histidina C-terminal, como sendo responsável por 40% do Efeito Bohr alcalino da Hb e resíduos de Valina como responsáveis por mais 20-30% do mesmo; o autor cita a mudança do pKa da Hemoglobina reduzida com e na ausência da Histidina C-terminal.

De acordo com a equação estabelecida por WYMAN (1964), o Efeito Bohr pode ser descrito por:

$$\frac{(\Delta \log P)}{\Delta pH} Y = \frac{(\Delta H^+)}{\Delta Y} \cdot pH$$

onde:

Y = Fração de saturação da Hb

P = Pressão parcial de oxigênio.

Os dois aspectos dos fenômenos relatados nessa equação são:

- a) a mudança na pressão parcial (P) de um ligante na forma gasosa em função do pH, à saturação constante;
- b) a mudança do número de prótons ligados pela proteína com relação a saturação fracional, em pH constante.

Introduzindo-se o conceito de atividade ligante média (PM), a equação acima pode ser descrita numa forma simplificada que quantifica o efeito descrito inicialmente por Bohr:

$$\frac{(\log PM)}{pH} = [H^+ (HbO_2) - H^+ (Hb)] = H^+$$

Na hemoglobina, a acidez provoca aumento da liberação de oxigênio, bem como um aumento da concentração de CO₂ — a pH constante — diminui a afinidade Hb/O₂. Esse é um mecanismo adaptativo molecular que permite à Hb liberar mais oxigênio aos tecidos com alto metabolismo (músculo em contração, por exemplo), quando então os níveis de H⁺ e CO₂ estão aumentados pela respiração celular intensa. Na verdade, a formação de CO₂ provoca um aumento da concentração de H⁺ dos tecidos, pois a hidratação do CO₂ produz H₂CO₃, um ácido fraco que se dissocia para formar H⁺ e HCO₃⁻. Nos capilares alveolares, o aumento da PO₂ sanguínea provoca a liberação do H⁺ e CO₂ e a hemoglobina novamente satura-se de oxigênio. A Hb transporta 20% de todo CO₂ e H⁺ formado nos tecidos até os pulmões e rins (HARKEN, 1977).

1.1 Teorias e Modelos sobre a Ligação Hemoglobina / Oxigênio

A Curva de Equilíbrio de Oxigenação da mioglobina é uma hipérbole podendo ser descrita, na sua fase inicial, pela equação de Michaelis-Menten para reações enzimáticas de “1a. ordem” (isto é, quando somente um ligante reage com a Mb e o crescimento exponencial é dependente unicamente da concentração desse ligante) e, numa segunda etapa por uma típica equação de “ordem zero”, onde a velocidade de reação não mais responde à concentração do ligante, mas sim a concentração da própria Mb e sua capacidade de reação com o oxigênio dada por uma constante de ligação (K).

Tal reação pode ser descrita de forma completa pela equação de VERHURST (1838) para o crescimento de populações, assim representada:

$$\frac{d \frac{Y}{1-Y}}{d pO_2} = K (pO_2) - b (pO_2)$$

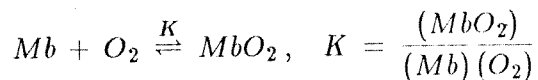
onde:

pO₂ = pressão parcial de oxigênio

Y = % Oxi-Mb

1 - Y = % de Mb não ligada ao O₂.

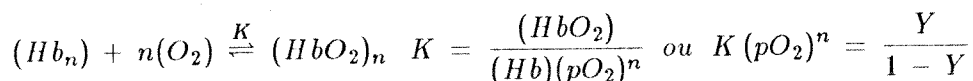
O fator de crescimento (K) é a constante de transformação de Mb em Oxi-Mb:



PO₂ é utilizado em lugar de O₂, para mensuração; e (b) é o fator limitante, dependente da concentração de Mb e de PO₂ — considerando-se Mb constante, teremos (b) dependente somente de pO₂.

Já a O.E.C. da hemoglobina humana representa-se por uma sigmóide, descrita por Michaelis-Menten para reações enzimáticas de “2a. ordem” ou mais, onde a velocidade de reação não depende somente da concentração do ligante, mas sofre ação de outras variáveis.

Na tentativa de descrever a Curva de Oxigenação da hemoglobina HILL (1910), sem um conhecimento preciso sobre o peso molecular da mesma, propôs que soluções de Hb conteriam moléculas poliméricas com mais de um sítio de ligação e grau de polimerização variável, igual a **n**:



Inicialmente bastante aceita, a equação de Hill caiu em desuso quando descobriu-se que a ligação Hb/O₂ não se comporta quimicamente como uma reação de ordem **n** correspondente aos quatro níveis de ligação do O₂ (determinou-se experimentalmente que **n** = 2,8) e também pela determinação do peso molecular da heme proteína, que mostrava que em várias condições a Hb é um tetrâmero.

A equação de Hill foi depois recuperada, pois permite uma fácil mensuração da O.E.C., pelo menos quando 0,4 < Y < 0,6, onde a mesma tem uma representação linear. O “Coeficiente de Hill”, como ficou conhecido o valor de **n** descrito pelo mesmo constitui ainda hoje um bom índice da descrição da interação heme-heme (interações internas, entre as 4 subunidades da Hb) que gera a característica sigmóide da Curva de Oxigenação da hemoglobina. A simulação dessa equação é mostrada na Figura 1.

Em 1923, ADAIR determinou o P.M. da Hb e propôs uma nova equação para a reação da mesma com o oxigênio, a qual deveria acontecer em quatro etapas sucessivas, correspondentes a ligação de cada um dos quatro hemes (ADAIR, 1925). A equação geral (simulada na Figura 2, com os dados de ROUGHTON *et al.*, 1955) seria:

$$Y = \frac{(HbO_2)}{(Hb)(O_2)^n} = \frac{0,25 K_1 (X) + 0,5 K_1 K_2 (X)^2 + 0,75 K_1 K_2 K_3 (X)^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 (X)^4}{1 + K_1 (X) + K_1 K_2 (X)^2 + K_1 K_2 K_3 (X)^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 (X)^4}$$

Onde X = oxigênio e 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 as porcentagens máximas de Hb₄X₁, Hb₄X₂, Hb₄X₃ e Hb₄X₄, respectivamente, para a saturação de 1 tetrâmero.

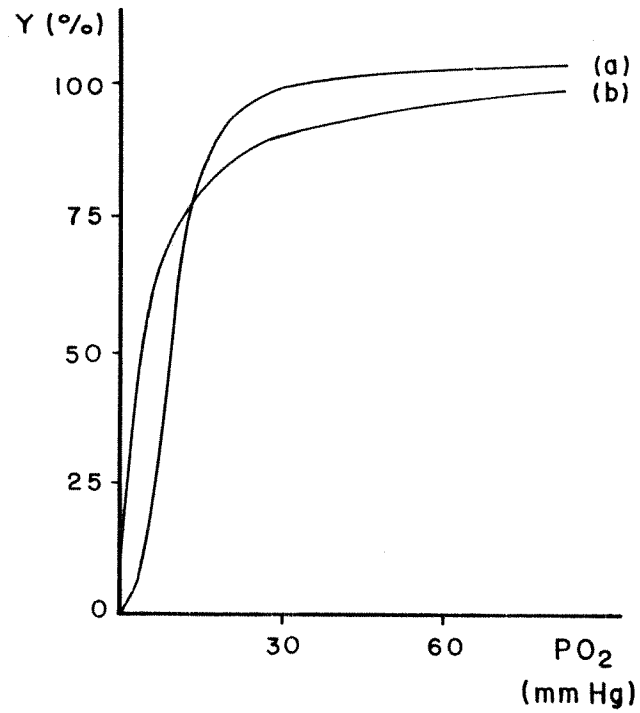
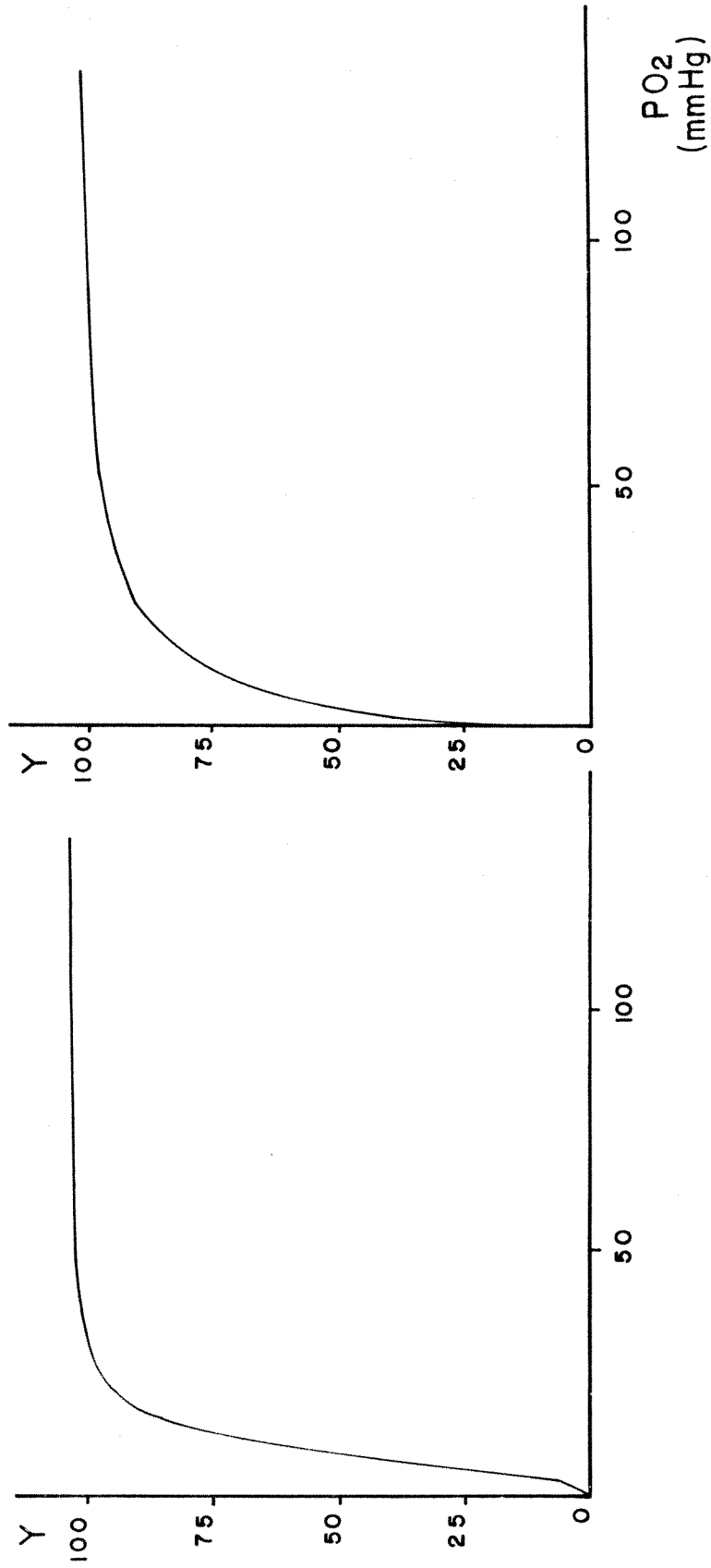


Figura 1: Simulação computadorizada da equação de HILL sobre a Curva de Oxigenação da hemoglobina e mioglobina. Notar o caráter hiperbólico em “b” (Mb) e sigmóide em “a” (Hb) com uma faixa linear entre 40 e 60% de saturação (Y%).



(a) (b)

Figura 2: Simulação da equação de ADAIR para a Curva de Oxigenação da hemoglobina humana; em (a) pH 7,1 — k1; k2; k3; k4: 0,0493; 0,0427; 0,221 e 0,320; em (b) pH 9,1 — 0,240; 4,064; 0,732 e 1,992 (segundo ROUGHTON *et al.*, 1955).

A forma sigmóide da reação da Hb (conhecida hoje), implica que uma ou mais das quatro constantes excederia seu valor estatístico, e assim, pela primeira vez foi postulada a presença de interações entre os grupamentos heme, durante o processo de oxigenação.

Em 1955, ROUGHTON *et al.* determinaram experimentalmente as quatro constantes da equação de Adair, cujos valores (divergentes em relação aos propostos pela equação) vieram comprovar a diferente afinidade dos sítios de ligação da Hb, nos seus quatro passos de oxigenação.

PAULING (1935, *apud* ANTONINI & BRUNORI, 1971) e WYMAN (1948) propuseram novas equações, já postulando interações entre os hemes (Modelo "Quadrado", Modelo "dímero") em pares, considerando a simetria dos mesmos e constantes de ligações relacionadas entre si. Os resultados de ROUGHTON *et al.*, no entanto, puseram por terra esses modelos devido aos valores relativos das constantes por ele determinadas (totalmente diferentes entre si) e porque não encontrar, em altas concentrações de O₂ (K₄), a simetria molecular proposta pelos dois primeiros autores.

A partir de 1960 a relação entre a subunidade estrutural da Hb e o caráter do equilíbrio com o oxigênio foi ensaiada experimentalmente, tendo-se estabelecido que a dissociação do tetrâmero (α_2/β_2) envolve inicialmente a formação de dímeros $\alpha\text{-}\beta$, acumulando-se fortes evidências que boa parte das interações intramoleculares tomam lugar entre os dois grupamentos heme de cada par $\alpha\text{-}\beta$ (ANTONINI & BRUNORI, 1971).

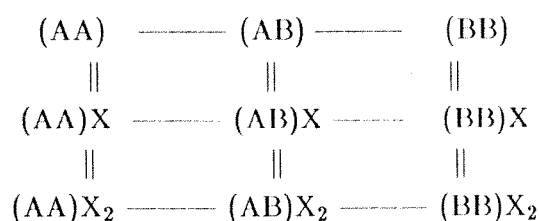
Com o trabalho de cristalografia de PERUTZ (1970) a transição conformacional da molécula de Hb associada com a ligação do oxigênio foi muito bem documentada. Esse autor mostrou também que a perda de ligações homotrópicas (aquelas que ocorrem no sítio de ligação do heme) ou heterotrópicas estava associada ao desaparecimento de tais mudanças conformacionais.

A partir de então, ficou bastante evidenciado que os efeitos interativos da Hb são mediados por mudanças conformacionais da molécula e os modelos que surgiram desde então tem versado sobre a subunidade estrutural da Hb e suas mudanças conformacionais.

WYMAN (1964) e GUIDOTTI (1967), tentaram estabelecer as subunidades estruturais da Hb que estariam ligadas às interações heme-heme; os modelos caracterizavam-se por pressupor ligações fortes entre cadeias não similares (α/β) e passos intermediários da ligação foram estudados. Outros modelos, como o de SCHEJTER *et al.* (1963) retornavam ao pressuposto de que os efeitos interativos estariam ligados a alterações na agregação (polimerização) da molécula de Hb, sendo que diferentes graus de polimerização explicariam o carácter não simétrico da curva de equilíbrio em algumas condições.

Tal como o modelo de HILL (1910), o desses autores sofreu críticas devido a não se poder comprovar experimentalmente essa variação na agregação intra-molecular.

Os primeiros modelos que tentavam explicar as interações homo e heterotrópicas, por modificações estruturais relacionadas à interações funcionais foram chamados "Modelos Alostéricos". Segundo os mesmos uma proteína composta por duas subunidades (A e B) teria seu processo de ligação assim representado:



Onde a ligação com o ligante "X" acontece no sentido vertical e as transições conformacionais no sentido horizontal. Sendo assim, dois processos concomitantes são considerados: 1) o processo químico da ligação de "X" e 2) O processo de transformação conformacional das subunidades.

O modelo de MONOD-WYMAN-CHANGEAUX (1965) é o mais conhecido dos modelos alostéricos e propõe que as proteínas existiriam em, no máximo, dois estados conformacionais, que difeririam entre si pela sua afinidade pelo ligante oxigênio (Forma "T" e "R"); segundo o mesmo as interações homo e heterotrópicas ocorreriam devido ao deslocamento do equilíbrio conformacional para um dos dois estados. Em 1967, WYMAN (*apud* ANTONINI & BRUNORI, 1971) fez novas considerações, em termos do modelo, explicando interações heterotrópicas como o pH.

Com base nas informações estruturais obtidas pelas suas análises com cristalografia, PERUTZ (1970) propôs um modelo mecanístico bastante detalhado, com interpretações a nível estrutural, sobre o comportamento da ligação Hb/oxigênio. Segundo o mesmo, a mudança conformacional, desencadeada pela quebra de pontes salinas inter-cadeias poderia ocorrer em qualquer estágio da reação, dependendo das condições de equilíbrio, estando associada à perda de 2,3-DPG (ligante alostérico). O modelo propõe somente dois tipos de conformações quaternárias e também dois tipos de reatividade, ou seja, baixa e alta reatividades.

Vários estudos posteriores tem tentado elucidar os passos da reação Hb/O₂ (SZABO & KARPLUS, 1972; BALDWIN & CHOTHIA, 1979), porém, na mesma linha de investigação do trabalho de PERUTZ, que persiste como um marco na interpretação das sequências estruturais que ocorrem durante o processo de oxigenação na molécula de hemoglobina.

Em conjunto os modelos de MONOD-WYMAN-CHANGEAUX, e o estereoquímico de PERUTZ, representam o conhecimento atual sobre a ligação Hb/O₂, segundo o qual a molécula de Hb existiria em duas conformações: "T" (tensa), mais instável e "R", relaxada; a primeira sendo o estado de baixa afinidade pelo oxigênio, forma essa estabilizada pelas condições do meio e reações alostéricas como com o 2,3-DPG, e a forma "R" aquela em que o O₂, vencendo os fatores estabilizadores da forma de menor afinidade, liga-se para formar a Oxi-Hb, com as modificações estruturais moleculares descritas por PERUTZ (BALDWIN & CHOTHIA, 1979; FLANAGAN *et al.*, 1981; LEE & KARPLUS, 1983).

1.2 Tratamento Clínico de Angina Pectoris: Mecanismo de Ação dos Vasodilatadores

As duas maiores manifestações de doenças cardíacas coronarianas são o infarto do miocárdio e a angina de peito; dos dois, a angina é a mais frequente e a mais crônica das manifestações, tendo como fatores predisponentes, além do colesterol, a hereditariedade, obesidade, estresse, vida marcadamente sedentária, etilismo e tabagismo (WHITING *et al.*, 1970; CHARLIER, 1971). Associado aos sintomas clássicos da patologia, GROSS & HARDMAN (1975) relatam um aumento de P_{50} durante os ataques anginosos

No tratamento clínico, a terapia medicamentosa é de fundamental importância, sendo acompanhada por medidas alternativas como o ajuste das atividades do paciente (diminuição da atividade física), controle de peso, diminuição da pressão arterial e correção de anemia, que visam a diminuição dos ataques de dor ao mínimo (CHARLIER, 1971).

Os primeiros medicamentos usados contra angina foram anticoagulantes (para dissolver trombozes coronarianas) gradualmente abandonados na década de 70 pela substituição por agentes vasodilatadores não específicos (papaverina, nitroglicerina) e bloqueadores β -adrenérgicos como o propranolol (STONE *et al.*, 1983). Atualmente, o tratamento convencional consiste na combinação da terapia com nitratos orgânicos como a Nitroglicerina, e, quando não contra-indicado, bloqueadores β -adrenérgicos (MULLER *et al.*, 1984). O surgimento de drogas bloqueadoras dos canais de cálcio (nifedipine, verapamil, diltiazem) trouxe novas esperanças ao tratamento, sendo via opcional a pacientes com intolerância a altas doses de nitratos (HENRY, 1980).

Na classificação geral esses vasodilatadores podem ser descritos como: cardíacos não específicos, nitratos, bloqueadores β -adrenérgicos e inibidores dos canais de cálcio das células miocárdicas.

1.2.1 Nitratos Cardíacos

Os nitratos de uso cardíaco mais conhecidos são a nitroglicerina, tetranitrato de pentaeritritol, dinitrato de isosorbitol, e o trinitrato de trietanoamina. Seus efeitos no organismo são resultantes de sua redução a nitrito e ação direta na musculatura lisa, que se mostra principalmente em vasos sanguíneos pequenos, arteríolas, capilares e vênulas, sendo especialmente marcante na seção pós-arteriolar da cama vascular (CHARLIER, 1971).

A liberação de óxido nítrico (NO) foi já relacionada com a ação dos nitritos, porém sobre o endotélio vascular (FURCHGOTT, 1984) e mais recentemente tem-se postulado o NO como o grande responsável pela ação vasodilatadora endotélio-dependente, possivelmente sendo o fator endógeno de relaxamento do endotélio relatado por IGNARRO & KADOWITZ, 1985).

A nitroglicerina (ANOROW, 1972b) tem ação direta sobre a musculatura vascular e é usada em doses sub-linguais de 0,4 mg para o tratamento do ataque anginoso, sendo a mais específica e eficaz das drogas vasodilatadoras em uso atualmente (FELDMAN & CONTI, 1981; MACHO & VATNER, 1981).

O peritrate é o mais antigo nitrito de ação prolongada que se conhece; muito mais estável que a nitroglicerina é absorvido lentamente a nível intestinal, sendo a administração oral via preferencial à sublingual. Sua ação em aumentar o fluxo arterial coronariano é mais lenta que a da TNT (GOODMAN *et al.*, 1983). Seu efeito maior parece ser em redistribuir o fluxo sanguíneo, pois aumenta a circulação nutricional enquanto reduz a resistência vascular cardíaca (PALMER, 1967). Talvez provoque relaxamento dos esfíncteres pré-capilares (CHARLIER, 1971). Mais efetivo que a nitroglicerina na prevenção de ataques anginosos, é usado em doses orais de 80 mg, duas vezes ao dia.

O isordil, como os demais nitratos é primeiramente reduzido a nitrito, para que apresente seu efeito de relaxamento sobre a musculatura lisa vascular. O isordil diminui o fluxo sanguíneo coronariano e a pressão arterial e seu efeito depressivo sobre a resistência vascular é maior que o do peritrate (BUCKY *et al.*, 1961). É administrado na prevenção do ataque cardíaco, por via sub-lingual como a nitroglicerina, porém tem ação mais prolongada (SWEATMAN *et al.*, 1972). Sua aplicabilidade clínica foi amplamente expandida na década de 70, sendo parte integrante da terapêutica convencional de angina pectoris (ARONOW, 1972a). A dose clínica diária varia de 5 a 60 mg, sendo as doses de 15 e 30 mg as preferenciais (THADANI *et al.*, 1980).

O sustrate, éster trinítrico do propanotrimetilol, é outro vasodilatador do grupo dos nitratos com efeito cardíaco e é utilizado na prevenção de ataques agudos do miocárdio; tem ação similar à TNT (ORAM, 1961 *apud* CHARLIER, 1971) e apresenta menor intolerância que esta e demais nitratos (OLIVEIRA, 1983). É administrado por via sub-lingual, em dose de 30 mg diárias.

1.2.2 Vasodilatadores Não-Específicos

A prenilamine não é um vasodilatador cardíaco específico. Inicialmente postulou-se que, como a papaverina, inibiria a 3,5-fosfodiesterase nucleotídeo cíclica, o que provocaria aumento do AMP cíclico resultando num relaxamento da musculatura arteriolar cardíaca, agindo, portanto, como um efector β -adrenérgico (ARONOW, 1973 e TUCKER *et al.*, 1974); HENRY, (1980) cita-a, como uma inibidora dos canais de cálcio, assim como a nifedipine, a prenilamine tem ainda um efeito hipotensor, por agir sobre o centro vasomotor e inibir α -receptores (CHARLIER, 1971). Por suas diversas formas de ação é classificada como de ação não específica. É administrada em doses orais de 180 mg diárias.

O dipiridamol, entre os derivados da pirimidopirimidina é o mais potente vasodilatador, e seu efeito é duas vezes maior que o da papaverina. O dipiridamol foi inicialmente usado clinicamente em 1959 e o mecanismo pelo qual altera o fluxo sanguíneo cardíaco é complexo: há uma ação vasodilatadora coronariana direta, porém indubitavelmente há certa alteração no suporte extravascular (MARCHANT *et al.*, 1984). O pré-tratamento com reserpina não altera seu efeito vasodilatador, descartando a possibilidade de ser um efector β -adrenérgico. O DIP potencializa o efeito da adenosina (reduz a captação e inativação da mesma pelo pulmão), promovendo seu acúmulo no sangue arterial (BERNARD *et al.*, 1959 *apud* CHARLIER, 1971)

É um vasodilatador de ação prolongada e a dose diária terapêutica é de 75 mg, administrado oralmente.

A papaverina é um inibidor geral da musculatura lisa e um dos mais potentes vasodilatadores cardíacos. Sua ação direta nos vasos sanguíneos coronarianos, reduzindo o tônus muscular foi citada como resposta à estimulação dos receptores β -adrenérgicos (PAP & FISHER, 1967, *apud* CHARLIER, 1971), posteriormente TRINER *et al.*, (1970) e MUKHERJEE & SIMPSON (1985) verificaram ainda uma ação inibidora da fosfodiesterase, provocada pela PAV, causando aumento da captação de cálcio em células de musculatura esquelética (CARPENEDO *et al.*, 1975); finalmente NIKOLOV *et al.*, (1978) e NICKERSON (*apud* GOODMAN *et al.*, 1983) classificaram-na como um vasodilatador de ação não específica. Seu uso cardíaco é datado de 1912 e a dose terapêutica é dada pela administração oral de 200 mg diárias (ARONOW, 1973).

1.2.3 Bloqueadores β -adrenérgicos

O propranolol (ARONOW, 1972c; PENDLETON, 1972) é um agente β -adrenérgico bloqueador, usado no tratamento convencional da angina de peito. Em doses orais de 160 mg diárias (WARREN *et al.*, 1976) é utilizado principalmente contra os ataques anginosos, e, por seus efeitos colaterais indesejáveis não é recomendado em angina instável (MULLER *et al.*, 1984).

1.2.4 Inibidores dos Canais de Cálcio

A nifedipine é um dos agentes anti-angina mais recentes, sendo parte de um grupo de “bloqueadores de canais de cálcio” de células miocárdicas, assim como o verapamil o diltiazem (HENRY, 1980). Essas drogas diminuem a permeabilidade da membrana celular (membrana lisa e miocárdica) ao cálcio (KAVERINA & CHUMBURIDZE, 1979). É usada em doses bem menores que a nitroglicerina, e portanto constitui uma alternativa à pacientes com intolerância ao tratamento convencional da angina. Sua eficácia é demonstrada por STONE *et al.*, (1983) e MULLER *et al.*, (1984) que concluem pela sua utilização em associação com β -bloqueadores para angina instável. É administrada oralmente, em doses diárias de 10 a 30 mg (DARGIE *et al.*, 1981; NILSSON *et al.*, 1984).

Drogas como o verapamil (NEUGEBAUER, 1978; OLIVEIRA, 1983), e o diltiazem (HENRY, 1980), são também empregadas no tratamento de angina, porém apresentam eficácia menor que a nifedipine e devido ao seu recente uso, a falta de estudos clínicos deixa dúvidas sobre a conveniência de sua utilização no tratamento convencional da angina.

1.3 Interação Hemoglobina / Drogas

A hipótese de interação de drogas com receptores específicos de estrutura complementar foi proposta inicialmente por LANGLEY (1878); a escolha a molécula de hemoglobina como modelo farmacológico de receptor de drogas foi postulada inicialmente por CLARK (1937), como um

modelo de valor inestimável para o estudo de ação de drogas, por ser uma proteína ativa fisiologicamente, o que permitiria respostas a modificações ocasionalmente provocadas pelas alterações desse meio.

BEDDEL *et al.*, (1976) utilizaram-se desse conceito para a síntese de novos compostos que poderiam interagir com a hemoglobina e modificá-la funcionalmente.

A escolha da hemoglobina como modelo de receptor oferece várias vantagens: 1) A obtenção da proteína em forma altamente purificada; 2) A estrutura e função dessa proteína são bastante conhecidas; 3) A função do 2,3-DPG como modulador fisiológico e a identificação do sítio de ligação deste na molécula de hemoglobina são fatos já estabelecidos.

A adrenalina pode causar um desvio para a direita na curva de oxigenação da hemoglobina humana por aumentar os níveis de 2,3-DPG (KOSTUK *et al.*, 1973), o mesmo ocorrendo após administração de hormônios da tireóide e alguns andrógenos (MILLER & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1970).

Também o propranolol, bloqueador β -adrenérgico e vasodilatador de uso clínico diminui a afinidade Hb/O₂ quando pré-incubado com hemácias, por causar um efluxo de potássio e assim provocar uma diminuição do pH intra-celular, agindo portanto por um Efeito Bohr indireto (AGOSTONI *et al.*, 1973).

BEDDEL *et al.*, (1976, 1979), sintetizaram compostos que não eram análogos ao 2,3-DPG, mas que tinham propriedades físico-químicas especiais para a interação com o sítio aniônico da molécula de hemoglobina; e os compostos sintetizados produziram o efeito biológico esperado, ou seja, a diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, ao interagirem comprovadamente com o sítio do 2,3-DPG (BROWN & GOODFORD, 1977). Mais recentemente esse autor tem descrito novas drogas, com ação sobre P₅₀ e desenvolvidas a partir dos mesmos pressupostos de interação com a hemoglobina (ALLAN *et al.*, 1986).

Em estudos anteriores, em nosso laboratório, evidenciou-se experimentalmente a modificação induzida por duas drogas vasodilatadoras sobre a afinidade Hb/oxigênio (MEIRELLES, 1980; MEIRELLES *et al.*, 1985), quando em soluções purificadas da heme proteína, o que sugeria uma interação molecular (proteína/droga) como justificativa para tal efeito. Prosseguindo a investigação dessas drogas, capazes de alterar o transporte de oxigênio pela hemoglobina, testamos o efeito de 7 drogas vasodilatadoras de uso clínico em angina de peito, procurando determinar em condições mais próximas à fisiológica, os parâmetros da reação Hb/droga.

2 Objetivos

1. Avaliação de diferentes metodologias para análise da afinidade hemoglobina/oxigênio.
2. Determinar a Curva de Oxigenação da hemoglobina humana na presença dos 7 vasodilatadores, com a hemoglobina em solução, pelo método espectrofotométrico.
3. Avaliação da constante de ligação hemoglobina/droga, por Equilíbrios de Diálise.
4. Determinação da afinidade Hb/oxigênio, no sangue de pacientes tratados cronicamente com os vasodilatadores de interesse.
5. Dosagem do nível sanguíneo de 2,3-DPG, no sangue desses pacientes.
6. Determinação da afinidade Hb/oxigênio na presença dos vasodilatadores, em sangue total, pelo método Oximétrico.
7. Correlacionar os efeitos da reação Hb/droga com: pH (pK das drogas), concentração, tempo de incubação, temperatura e ação de efetores alostéricos (ATP, 2,3-DPG).

3 Materiais e Métodos

3.1 Drogas Vasodilatadoras

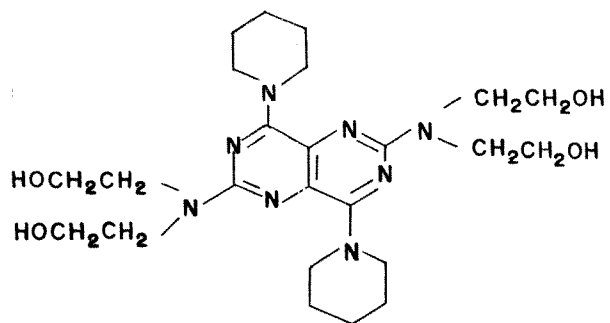
Apresentamos a seguir as 7 drogas vasodilatadoras de que trata esse trabalho, com uma pequena descrição das características físico-químicas das mesmas, e suas estruturas químicas (Esquema 1).

3.1.1 Cloridrato de Papaverina (Cerebid, cardoverina, Artegodan)

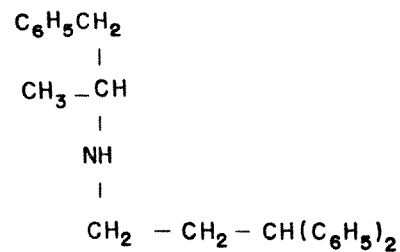
O 6,7-dimetoxiveratriloquinoleína, *Papaverina* (PAV), é um alcalóide extraído do ópio. Tem P.M. de 375,84 e coeficiente de absorção molar máximo no Ultra Violeta, em 240 nm, de 56.200 (CZOKAN, 1942). É solúvel em álcool e clorofórmio, praticamente insolúvel em éter e pouco solúvel em água (1 g / 40 ml). Utilizamos nos ensaios fotométricos e CO-oximétricos de ampolas contendo o cloridrato, não sendo necessário o uso de diluentes nas preparações com a hemoglobina.

3.1.2 Dipiridamol (Persantin, Prandiol, Dipyridan)

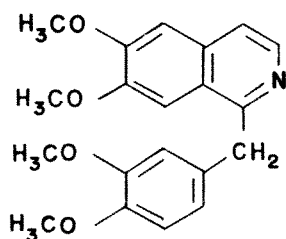
O 4,8 dipiperidinapirimida [5,4-D] pirimidina-2,6-diildinitrilo tetraetanol, *Dipiridamol* (DIP), apresenta-se como um pó branco, solúvel em metanol, etanol e clorofórmio, e de menor solubilidade em acetona, benzeno, acetato e água. Tem peso molecular de 504,62 e um pico máximo de absorção (pH 7,0) em 409 nm, cujo coeficiente de extinção molar, determinamos experimentalmente como sendo de 7.394. Para os ensaios fotométricos, a droga foi diluída em uma solução água/etanol 3:2 ou dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%; para CO-oximetria, o diluente empregado foi o polietilenoglicol P.M. 400.000 (PEG 400).



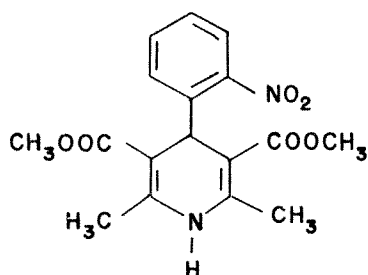
DIPIRIDAMOL



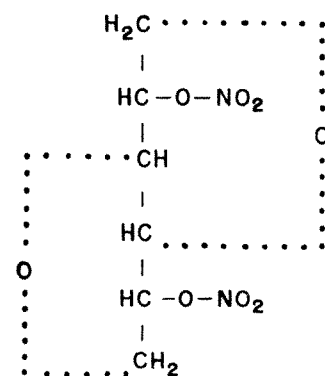
PRENILAMINE



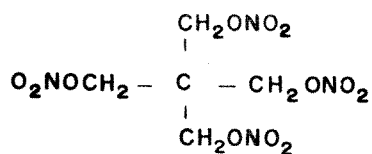
PAPAVERINA



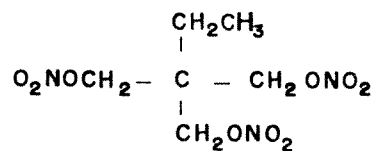
NIFEDIPINE



DINITRATO DE ISOSORBITOL



TETRANITRATO DE PENTAERITREITOL



PROPATILNITRATO

3.1.3 Tetranitrato de Pentaeritritol (Peritrate, Nitropenta)

2,2-bis[(nitrooxy)-metil]-1,3-propanediol dinitrato (éster); P.M. 316,15. O *Peritrate* (PTT) apresenta-se como um pó branco, solúvel em acetona, pouco solúvel em álcool e éter e praticamente insolúvel em água. É muito explosivo e, normalmente para fins clínicos, é diluído em lactose, para precaução contra explosões acidentais. O PTT foi usado também com os diluentes citados acima.

3.1.4 Dinitrato de Isosorbitol (Isordil, Isocord, Harrical, Isorbid)

1,4:3,6-dianidro-D-glucitol dinitrato; o *Isordil* (ISL) apresenta-se na forma de cristais brancos, pouco solúveis em água (1,089 mg/ml), solúveis em solventes orgânicos como o etanol, acetona e éter. Tem P.M. 236,14 e devido a sua baixa solubilidade foi utilizado com os diluentes água/etanol, DMSO e PEG 400.

3.1.5 Propatilnitrato (Sustrate, Etradil, Vasangor)

2-etil-2-[(nitrooxy)metil]-1,3-propanediol dinitrato(éster); P.M. 269,18. O *Sustrate* (STR) apresenta-se na forma de um pó branco, altamente solúvel em acetona, álcool e praticamente insolúvel em água, assim como outros nitratos é bastante explosivo. No seu emprego para os ensaios com a Hb utilizou-se os diluentes citados acima (DMSO, PEG 400 e etanol).

3.1.6 Lactato de Prenilamine (Incoran, Agazol, Sedolatan)

N-(1-metil-2-feniletil)-3-fenil benzeno propanamina; P.M. 425,5. A *Prenilamine* (PREN) apresenta-se como um pó branco, pouco solúvel em água (0,5%), solúvel em solventes orgânicos e tem um pico de absorção máximo em 260 nm (Coef. Extinção = 170, para sol. 1%); como com o DIP, ISL e NIF, o uso de diluentes próprios se fez necessário às determinações de P₅₀.

3.1.7 Nifedipine (Adalat, Oxcord, Procardia)

1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5- ácido piridina dicarboxílico, dimetil éster. P.M. 346,34. A *Nifedipine* (NIF) apresenta-se na forma de cristais amarelos, solúveis em acetona e clorofórmio, menos solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água; as soluções são muito sensíveis à luz, decompondo-se facilmente. A diluição para os ensaios com hemoglobina foram feitas usando-se os diluentes citados anteriormente.

3.2 Preparação da Hemoglobina Humana "Stripped"

A fim de determinar as alterações moleculares que ocorrem na hemoglobina quando da interação dessa com ligantes não hemínicos, faz-se necessária sua purificação, de partículas celulares e íons orgânicos como o 2,3-difosfoglicerato e outros.

- a) Coleta: A amostra sanguínea, geralmente 10 ml, é coletada por punção venosa, podendo-se usar como agentes anticoagulantes:

E.D.T.A. (Ac. etilenodiaminotetracético) 10%: 2 gotas/3 ml de sangue Heparina Sódica (50 UI/ml de sangue)

ou ainda, como fazemos, coletar o sangue diretamente em 1,5 vezes seu volume, em solução salina fisiológica (NaCl 0,9g%). Esse procedimento impede o processo de coagulação por diluição dos fatores envolvidos, e assim não introduz nova variável (qual seja o possível efeito do anticoagulante) para o estudo fisiológico da Hemoglobina.

Todos os procedimentos, a partir da coleta são executados em temperatura entre 0 e 4° C.

- b) Lavagem e lise das Hemácias: A amostra sanguínea diluída em solução salina é levada à centrifugação (1.000 G, 2,5 min), após o que o sobrenadante (sbn) é descartado, a pequena fração intermediária branca (ppt superficial que consiste de leucócitos) é removida com auxílio de pipeta Pasteur e o precipitado restante (hemácias) ressuspenso em volume igual ao seu da solução salina. Essa suspensão é levada à uma segunda centrifugação nas mesmas condições da inicial, repetindo-se a extração do sbn e ressuspendendo-se o ppt em salina. Após uma terceira centrifugação o ppt obtido é acrescido de 1,5 vezes seu volume de água destilada gelada e congelado por um tempo mínimo de 2 horas.

A água e o congelamento provocam a lise das membranas eritrocitárias, sem que haja necessidade de um agente hemolisante, que constituiria uma variável de erro a mais.

- c) Purificação: A suspensão de hemácias lisadas é levada 2 vezes à centrifugação (1.000 G, 2,5 min), descartando-se o ppt que consiste basicamente dos restos da membrana celular. O sobrenadante obtido é chamado "hemolisado total", é composto basicamente pela Hb, porém na presença de moléculas pequenas e íons orgânicos, podendo ser usado para os estudos fotométricos de determinação de P₅₀.

O "hemolisado Total" é submetido à uma cromatografia de coluna com resina de filtração molecular (Sephadex G-25), onde uma banda única e de rápida resolução é obtida (acompanha-se facilmente o trajeto da amostra pela coloração da Hb). Em seguida duas cromatografias de troca iônica são feitas (resinas catiônicas e aniônicas - Dowex 50x8 e 1x4 ou Biorad XG504x8) uma após a outra, obtendo-se assim a "Hb stripped", livre de íons orgânicos e poliânions como o 2,3-DPG, sabidamente capaz de alterar os parâmetros estudados: afinidade pelo oxigênio/interação heme-heme da Hb (BENESCH, 1967; PERUTZ, 1970).

As colunas utilizadas tem aproximadamente 10cm de comprimento por 2 cm de diâmetro e comportam volume de amostra igual ao seu próprio (nesse caso, 125 ml) menos o volume ocupado pela resina hidratada (aqui aproximadamente 115 ml); portanto, essas microcolunas tem capacidade média para 10 ml de solução.

Outro método de purificação da hemoglobina "stripped" usa a diálise (contra NaCl 0,1 ou 1 M, 4° C, Hb em pH 7,6) em lugar das colunas cromatográficas; as vantagens e desvantagens desses métodos são discutidas por JELKMANN & BAUER (1976), em comparação com um terceiro método, menos utilizado, de 5 passos de ultracentrifugação (em que a Hb é diluída em NaCl 0,1 ou 1 M); segundo os autores, $\log P_{50}$ está entre $0,52 \pm 0,01$ nos três métodos de purificação e n (Coef.Hill) é $2,8 \pm 0,1$ (para um número de ensaios = 12) e não há relevantes diferenças entre os métodos, ficando a critério de cada laboratório a conveniência de uso de um ou outro método.

CHANUTIN & CURNISH (1967), e BUNN & BRIEHL (1970) utilizam o método de diálise; BERMAN *et al.* (1971) preferem o método cromatográfico e citam-no como o mais utilizado. Particularmente temos preferido o método cromatográfico pela rapidez e ainda pelo fato de que, submetendo a Hb por várias horas à diálise, o nível de ferrihemoglobina (Meta-Hb) aumenta e conseqüentemente faz decair a "vida útil" do hemolisado, isso é, nossas preparações podem ser utilizadas em média por três semanas, até que o nível de Meta-Hb atinja 5%, valor máximo tolerável aos estudos fotométricos.

3.2.1 Determinação da Concentração da Hemoglobina em Solução

As concentrações das soluções de hemoglobina, quer no hemolisado, quer nas frações purificadas por cromatografia, são determinadas espectrofotometricamente, (ANTONINI & BRUNORI, 1971), sendo:

$$\epsilon_{M(\text{heme})}^{541\text{nm}} = 13.800 \quad (\text{Coeficiente de Extinção dos grupamentos heme a } 541 \text{ nm para } 1 \text{ M de Oxi-hemoglobina}).$$

Fazendo-se a leitura da absorbância em 541 nm tem-se, por regra direta a concentração molar (em heme) de Hb da solução. Como cada molécula de Hb possui 4 hemes, para expressar a concentração em termos de tetrâmetro, divide-se a concentração encontrada (em heme) pelo fator 4 e obtem-se a concentração molar do tetrâmero na solução.

3.3 Métodos Experimentais para Determinação da Curva de Equilíbrio de Oxigenação da Hemoglobina

A construção da O.E.C. da hemoglobina depende da determinação da saturação dos sítios ligantes da proteína (Y) em concentrações de oxigênio conhecidas.

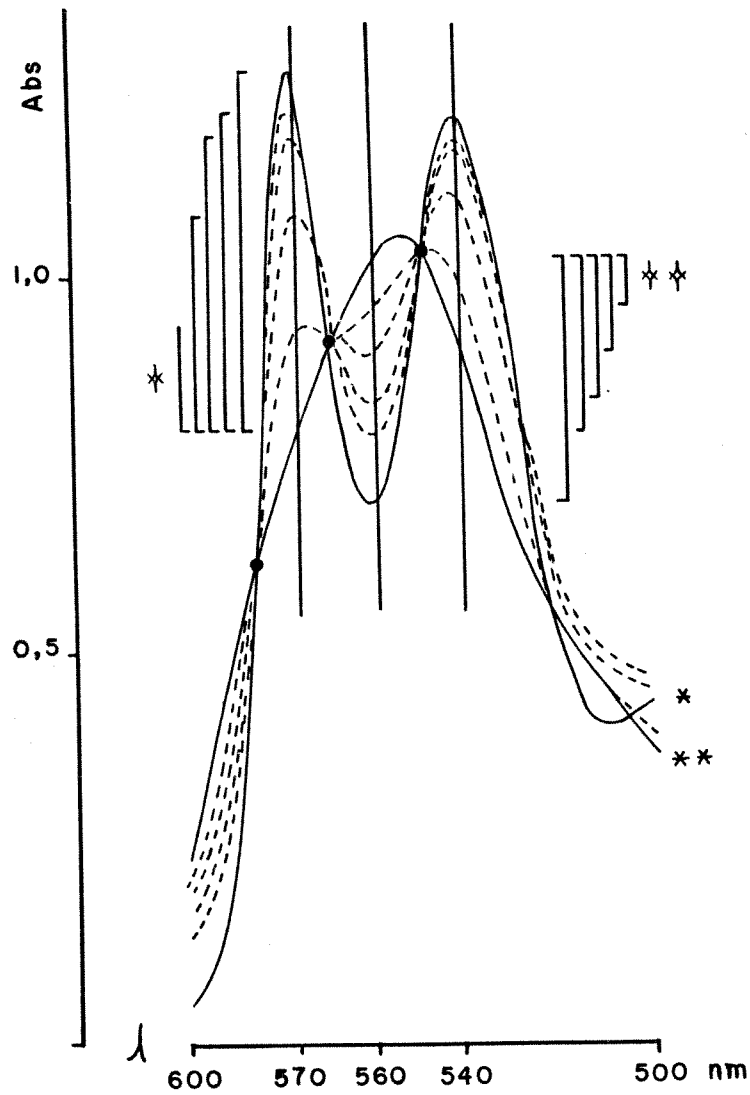
No estudo com ligantes gasosos, a pressão parcial do gás em equilíbrio com a solução é quase que invariavelmente utilizada, ao invés da concentração do mesmo. Isso se justifica pelo fato de que a atividade de um gás em solução é proporcional à sua pressão parcial na fase gasosa. A pressão parcial é expressa em mmHg a 20° C. A saturação fracional Y é determinada experimentalmente, medindo-se a quantidade do gás ligado à proteína (método gasométrico de VAN SLYKE, 1924), ou a concentração de hemes livres ou ligados, usando-se qualquer propriedade que dependa diretamente da presença do ligante no ferro do grupamento heme (qual seja a diferença na absorção de luz, pelo método fotométrico).

3.3.1 Método Fotométrico

O método espectrofotométrico baseia-se, em princípio, nas diferenças espectrais entre a hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) e desoxigenada (Deoxi-Hb), em diferentes comprimentos de onda, na faixa do visível. Sabe-se que o oxigênio liga-se somente ao grupo heme da molécula de hemoglobina e na proporção de 1:1; havendo 4 grupamentos heme por molécula de Hb, tem-se que: nas saturações intermediárias ($0 < Y < 100\%$), as propriedades espectrais do heme livre correspondem àsquelas dos derivados desoxigenados, e as do heme ligado àsquelas da hemoglobina completamente saturada, isto devido às modificações na estrutura quaternária da molécula de Hb, cujo rearranjo na oxigenação proporciona a variação das propriedades espectrais da molécula (PERUTZ, 1978). Devido a essas características, temos, para saturações intermediárias, registros espectrais também intermediários (entre os da Oxi e Deoxi-Hb), como pode-se visualizar na Figura 3.

Para o estudo das Curvas de Dissociação da hemoglobina, o método fotométrico é o de maior emprego atualmente, pelas seguintes vantagens, em relação ao método gasométrico (ANTONINI & BRUNORI, 1971):

1. Uma curva de dissociação pode ser feita com grande variação na concentração de proteína (mais de 100 a menos de 0,1 mg/ml).
2. Possibilidade de emprego de pequenas quantidades de material — aproximadamente 3 ml — portanto, sendo viável quando existe restrição na quantidade de hemoglobina disponível.
3. Simplicidade de manuseio do equipamento, quando comparado ao da técnica gasométrica e rapidez (um equilíbrio leva em média 80 min. para ser feito, enquanto anteriormente necessitava-se de horas).



* Oxi-Hb
 * Deoxi-Hb

. Pontos isobésticos
 * Distância (em mm) entre Oxi e Deoxi-Hb (576 nm)
 ** Distância (em mm) entre Oxi e Deoxi-Hb (560 nm)

Figura 3: Absorção óptica da hemoglobina: formas oxigenada, desoxigenada e intermediárias, entre 600 e 500 nm. Observar pontos isobésticos e picos de absorção (540 e 576 nm para Oxi-Hb e 560 nm para Deoxi-Hb).

3.3.1.1. Procedimento Experimental para a Dosagem de P_{50} em Soluções Purificadas de Hemoglobina.

Tonômetros adaptados à análise fotométrica da reação Hb/O₂ (construídos no Instituto de Física / UNICAMP) e um espectrofotômetro (VARIAN-Série 634) foram utilizados para a determinação experimental das curvas de dissociação da hemoglobina pelo oxigênio. Esse tonômetro, ver Figura 4, consiste de um tubo de Thunberg modificado, selado na sua parte inferior em uma cubeta fotométrica Beckman, pirex, de 1cm de caminho óptico e, na sua parte superior apresentando um sistema de válvulas de regulação para a canalização da passagem do ligante gasoso. Esse tonômetro foi desenvolvido a partir do modelo citado inicialmente por ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958), e daquele descrito por BENESCH *et al.* (1965), para estudos fotométricos.

Inicialmente procedeu-se a calibração desses aparelhos, para obtenção da constante tonométrica (Kt), isto é, a capacidade gasosa do mesmo, a qual se chega pela diferença de peso entre o tonômetro totalmente cheio de água destilada e com apenas 3 ml (volume da solução de Hb) de água destilada.

Para o ensaio fotométrico, uma alíquota de 3ml de solução de hemoglobina purificada e devidamente diluída em tampão era introduzida no tonômetro. Em seguida, determinava-se o espectro característico da mesma (Oxi-Hb) entre 600 e 500 nm, anotando-se particularmente o valor da absorvância em 540, 560 e 576 nm, comprimentos esses onde a diferença entre as formas oxigenada e desoxigenada da Hb são máximos (Figura 3). A amostra era então submetida a um fluxo constante de nitrogênio, até obter-se a solução totalmente desoxigenada, que se verifica pelo espectro característico (pico máximo de absorção em 560 nm) mostrado na Figura 3; repetia-se, então, a anotação das absorvâncias nos três comprimentos de onda descritos.

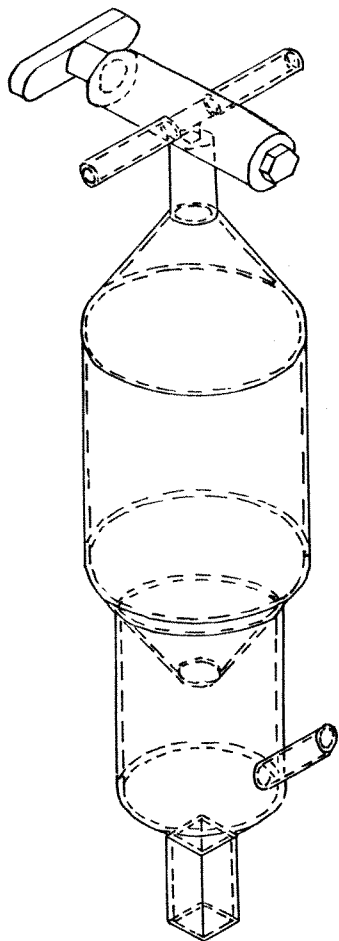


Figura 4: Tonômetro usado nos ensaios de espectrofotometria.

Adições sucessivas de volumes crescentes de ar atmosférico eram então procedidas, para obter-se 4 diferentes valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2), coordenados com diferenças de absorção que eram então convertidas em valores de $Y\%$. A cada adição a amostra era homogeneizada a $20^\circ C$, por um tempo padronizado em 10 minutos, e em seguida fazia-se o registro do espectro da mesma entre 600 e 500 nm — Figura 3 — e anotava-se as absorbâncias em 540, 560, e 576 nm.

A homogeneização da amostra sanguínea após cada nova adição de ar era feita em um banho-maria adaptado, que mantinha o tonômetro imerso em água ($20^\circ C$) e em rotação lateral contínua, provocando agitação branda que possibilita o equilíbrio das fases líquida e gasosa, sem haver desnaturação proteica.

A manutenção dos pontos isobésticos (EWING, 1960) é fundamental para a comparação e tratamento posterior das absorbâncias anotadas. Quando esses traçados diferem discretamente dos pontos isobésticos podem ser corrigidos graficamente — como mostrado nas diferenças de absorção da Figura 3 — adotando-se então as medidas milimétricas das diferenças entre os traçados nos comprimentos de onda de interesse (576, 560 e 540 nm), sempre comparando as formas parciais e totalmente oxigenada com a desoxigenada.

Os tampões usados devem manter a hemoglobina entre pH 5,0 e 9,0 — faixa em que sua atividade funcional está preservada. Os mais utilizados são: tampão Fosfato 0,2 M, TRIS-HCl 0,05 M, BIS-TRIS, e TRIS-lactato. O tampão fosfato não deve ser usado quando os níveis de fosfato orgânico estão sendo controlados (2,3-DPG, por exemplo).

A concentração de hemoglobina apropriada a mensuração da absorção entre 600 e 500 nm é a de 0,01 mM.

É necessário que a isobesticidade dos traçados seja mantida, não só para o tratamento matemático dos dados, que descreveremos a seguir, mas também porque essa propriedade assegura ser o processo de oxigenação o único responsável pelas diferenças espectrais observadas, pois certifica que uma só espécie molecular está envolvida no ensaio.

A fidelidade dos registros requer ainda a manutenção de uma mesma temperatura durante o ensaio. Os pontos comuns aos traçados (isobésticos) são mantidos quando não há variações nas condições de ensaio (temperatura, pH, desnaturação proteica, diluição ...).

A análise dos dados é feita segundo o método de ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958), exemplificada na Tabela 1, onde a partir dos valores de absorbância e volume de ar injetado, chega-se a quatro pontos coordenados de $Y\%$ em função de pO_2 (porcentagem de Hb ligada em função da pressão parcial de oxigênio), ou melhor, \log de $Y/1-Y$ contra $\log pO_2$, com os quais contruímos o Plot de HILL — Gráfico 1 - determinando P_{50} e n .

Tabela 1: Tábua de cálculo para obtenção de P_{50} pelo método de ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958), aqui referido como “Método ISO”. Ensaios com 4 adições de ar; tampão TRIS-HCl 0,05 M; pH 7,0; T = 20° C e [lib] = 0,01 mM.

	Σ Vol (ml)	A_1	A_2	A_3	Δ_1	Δ_2	Δ_3	$\Sigma \Delta$	Y%	$\frac{Y}{1-Y}$	$\log \frac{Y}{1-Y}$	$\log pO_2$
DEOXI	-	0,256	0,298	0,235	-	-	-	-	-	-	-	-
OXI	-	0,338	0,221	0,356	0,082	0,077	0,121	0,280	100,00	-	-	-
1	1,0	0,264	0,292	0,247	0,008	0,066	0,012	0,026	9,29	0,102	-0,990	-0,269
2	3,0	0,294	0,265	0,289	0,038	0,033	0,054	0,125	44,64	0,806	-0,093	0,208
3	4,5	0,311	0,246	0,316	0,055	0,052	0,081	0,188	67,14	2,043	0,310	0,384
4	6,0	0,323	0,237	0,332	0,067	0,061	0,097	0,225	80,36	4,091	0,612	0,509

- Σ Vol = Volume de ar injetado (acumulado), em mililitros.
 A_1 = Absorbância lida a 540 nm.
 A_2 = Absorbância lida a 560 nm.
 A_3 = Absorbância lida a 576 nm.
 $\Sigma \Delta$ = Somatória das diferenças das absorbâncias entre Hb deoxi e oxigenada.
Y% = Porcentagem de saturação dos sítios ligantes da hemoglobina.

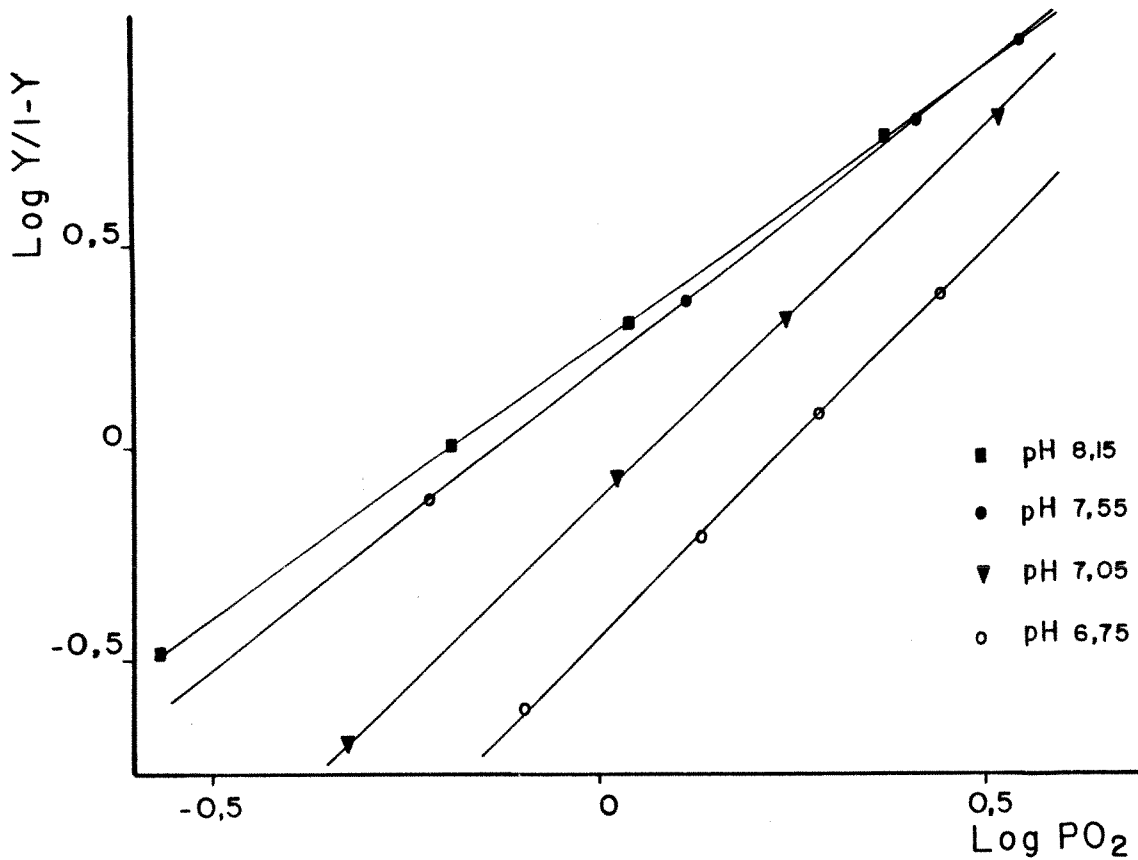


Gráfico 1: Plot de Hill — Variação de Y % (porcentagem de saturação dos sítios ligantes da Hb) em função de PO_2 . Quando $\frac{Y}{1-Y} = 1$ ($\frac{\log Y}{1-Y} = 0$) PO_2 corresponde a P_{50} . As quatro retas referem-se a diferentes valores de pH (6,75; 7,05; 7,55 e 8,15). Ensaios fotométricos com tampão TRIS-HCl 0,05 M, $T = 20^\circ C$.

Para a transformação de volume de ar injetado em pressão parcial de oxigênio, as seguintes equações são usadas:

$$P_1 \cdot V_1 = P_2 \cdot V_2$$

onde:

P_1 = Pressão de oxigênio no ar atmosférico (pressão barométrica local x pressão parcial de oxigênio na atmosfera — 20,98%). Em Campinas, $P_1 = 156$ mmHg.

V_1 = Volume de ar injetado no tonômetro.

P_2 = (?) = Pressão parcial de O_2 correspondente ao volume de ar injetado.

V_2 = Volume da fase gasosa do tonômetro (Kt).

Portanto, os valores de P_2 são dados por:

$$P_2 = \frac{P_1 \cdot V_1}{Kt}$$

A representação do Plot de Hill é a de uma reta ascendente quando os valores são logarítmicos. Para a hemoglobina purificada BENESCH (1967) descreve um valor normal de $\log P_{50} = 0,16$ e $n = 1,1$; enquanto em suspensões de hemácias os valores citados são 0,72 e 2,7 respectivamente, em pH 7,0 e temperatura de ensaio de $10^\circ C$.

3.3.1.2. Determinação fotométrica de P_{50} em equilíbrios não isobésticos.

Pelo método fotométrico verificamos o efeito direto de drogas sobre a molécula de Hb, alterando sua afinidade pelo oxigênio; desejando averiguar se tal efeito ocorreria também com a hemoglobina intracelular, isto é, se a droga conseguiria perfundir a membrana celular e atingir a proteína, iniciamos dosagens fotométricas com suspensões de hemácias lavadas, preparadas conforme ítem 2.2.

A turbidez dessas suspensões não permite a determinação de P_{50} pelo método de ROSSIFANELLI & ANTONINI (1958), já descrito e que passaremos a chamar de “Cálculo ISO”, em contraste com o “Cálculo ANISO”, que descreveremos a seguir. A variação nas leituras feitas é devida à diferença no tempo de sedimentação das hemácias em suspensão, fator de difícil controle e que impossibilita quaisquer correções nos valores de absorbância dos traçados registrados em papel milimetrado.

Propusemo-nos então a estudar mais minuciosamente os modelos e teorias sobre a ligação hemoglobina/oxigênio, em busca de novas opções para a interpretação dos dados fotométricos, que

nos possibilitassem a determinação precisa de P_{50} na suspensões de hemácias. Foi nesse período que estudamos e modelamos algumas das equações sobre a reação Hb/oxigênio, apresentadas no ítem 1.1.

Tabela 2: Tábua de cálculo para obtenção de P_{50} pelo método "ANISO"; os dados experimentais são os mesmos utilizados para o cálculo pelo método clássico (Tabela 1).

	Σ Vol (ml)	A_1	A_2	A_3	Δ_1'	Δ_2'	Y'	Y''	\bar{Y}	$\frac{Y}{1-Y}$	$\log \frac{Y}{1-Y}$	$\log pO_2$
DEOXI	-	0,256	0,298	0,235	-0,141	-0,211	0	0	-	-	-	-
OXI	- 0,338	0,221	0,356	0,529	0,611	100,0	100,0	100,0	-	-	-	-
1	1,0	0,264	0,292	0,247	-0,096	-0,154	6,2	6,4	6,3	0,067	-1,172	-0,269
2	3,0	0,294	0,265	0,289	0,109	0,091	36,2	36,4	36,3	0,570	-0,244	0,208
3	4,5	0,311	0,246	0,316	0,264	0,284	60,0	60,4	60,2	1,512	0,180	0,384
4	6,0	0,323	0,237	0,332	0,363	0,401	75,6	74,6	75,1	3,016	0,479	0,509

$$\Delta_1' = \frac{A_1 - A_2}{A_2}$$

$$\Delta_2' = \frac{A_3 - A_2}{A_2}$$

Y' = Porcentagem de saturação da Hb, obtida através de Δ_1' .

Y'' = Porcentagem de saturação da Hb, obtida através de Δ_2' .

\bar{Y} = Porcentagem de saturação média (entre Y' e Y'').

Desenvolvemos, ainda sob a equação de Hill, uma análise diferente do comportamento espectral entre Oxi e Deoxi-Hb, que aqui chamaremos de "Cálculo ANISO", dada sua propriedade de permitir o cálculo de P_{50} em equilíbrios não isobésticos, como em suspensões de hemácias.

Segundo esse cálculo, não mais analisamos a diferença entre os traçados da Oxi e Deoxi-Hb em três comprimentos de onda (ver item 3.3.1.1.) mas as diferenças espectrais de cada uma dessas formas (Oxi, Deoxi e intermediárias) separadamente, nos três comprimentos de onda citados (540, 560 e 576 nm). Assim, ao invés das colunas Δ_1 a Δ_3 da Tabela 1 (Cálculo ISO), que correspondem as diferenças entre as leituras de cada uma das formas contra a da Deoxi-Hb, respectivamente em 540, 560 e 576 nm, passamos a ter duas colunas: Δ' e Δ'' , referentes à diferença entre a absorção de cada forma em particular, contra si mesma em outro comprimento de onda; ou seja, em Δ' na linha da Deoxi-Hb, teremos o valor da absorbância da Deoxi-Hb em 576 nm menos a absorbância da mesma em 560 nm, e em Δ'' para esse mesmo estado desoxigenado o valor de Deoxi-Hb em 540 nm menos seu valor em 560 nm. Na verdade, dividimos ainda essa diferença pelo valor de absorbância no último λ , (560 nm), o que só faz normalizar as diferenças encontradas (diminui o intervalo dos valores obtidos) para Δ' e Δ'' .

Desta forma, teremos na linha da Oxi-Hb um valor máximo positivo, tanto em Δ' como em Δ'' (pois os picos de 540 e 576 nm correspondem a um máximo valor para a forma oxigenada e mínimo para a Deoxi-Hb); na linha da Deoxi-Hb um valor máximo negativo (em 560 nm a absorção da Deoxi-Hb é máxima) e entre esses, os valores das quatro adições de ar — correspondentes às formas intermediárias de oxigenação — cujos valores em Δ' e Δ'' encontram-se entre esses da Deoxi e Oxi-Hb.

A Tabela 2 apresenta esse novo tratamento de dados, utilizando os mesmos valores experimentais do ensaio da Tabela 1.

Tal como no "Cálculo ISO", consideramos linear a distribuição das formas intermediárias de oxigenação, entre os valores de Oxi e Deoxi-Hb. Portanto, assumindo para Δ' e Δ'' 0% de saturação para a Deoxi-Hb) e 100% para Oxi-Hb construímos duas colunas Y' e Y'' consistindo dos valores de % de saturação dos 4 pontos intermediários do ensaio: A média dos valores de Y' e Y'' forma a coluna $Y\%$ (% de saturação dos sítios da Hb em cada uma das adições de ar). Transformando $Y\%$ em $\log Y/1-Y$ (como no "Cálculo ISO") e graficando os valores contra $\log pO_2$, construímos o Plot de Hill e determinamos P_{50} e n .

3.3.2 Método Oximétrico

O método de Oximetria também baseia-se nas diferenças espectrais das formas diferenciais de saturação da hemoglobina, sendo portanto, um método fotométrico altamente desenvolvido.

Em cooperação com o Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental (Fac. C. Médicas - UNICAMP), tivemos acesso a um CO-oxímetro (IL 282 CO - Oximeter) e um tonômetro (IL 237 Tonometer) da "Instrumental Laboratories" com os quais foi possível realizar ensaios para a determinação de P_{50} e n em sangue total, isto é, com sangue heparinizado recém-colhido; e

avaliar o efeito dos vasodilatadores estudados sobre a Hb em condições bem mais próximas às fisiológicas.

Através dessa técnica pode-se ainda determinar, além de P_{50} , e este a uma temperatura e pH fisiológicos, valores de concentração de hemoglobina (g%), Meta-Hb (%), Carboxi-Hb (%) e conteúdo total de oxigênio da amostra sanguínea. Utilizamos juntamente com os ensaios tonométricos/CO-oximétricos um aparelho de gasometria, com o qual correlacionamos os valores acima com pH, pO_2 e pCO_2 sanguíneos determinados concomitantemente.

3.3.2.1 Tonometria

Na primeira etapa dessa metodologia, a tonometria, o sangue é equilibrado com uma mistura de gases de concentração conhecida, através do tonômetro citado.

A técnica consiste em equilibrar uma amostra de sangue com um gás de tensão (pressão parcial a uma dada temperatura) conhecida e foi inicialmente descrita por BARCROFT, em 1914. Desde então foi muitíssimo usada para análises sanguíneas (geralmente em equilíbrio com O_2 ou CO_2). Nos anos 60 apareceram os primeiros tonômetros comerciais, tais como o descrito por BENESCH *et al.* (1965), e que foi precursor daquele descrito na Figura 4, por nós utilizado nos ensaios de oxigenação por espectrofotometria.

O modelo de tonômetro utilizado para as dosagens com sangue total, em CO-oximetria, foi desenvolvido em 1972 e apresenta inúmeras vantagens e aperfeiçoamentos em relação aos demais até então existentes. A Figura 5 esquematiza esse aparelho, possuidor de um banho-maria rotatório que mantém em equilíbrio uma câmara de água e o recipiente da amostra sanguínea (ao centro desta) - ver detalhe "B", Figura 5. O banho, envolvendo a câmara, mantém a temperatura selecionada ($37^\circ C$). A câmara, contendo aproximadamente 25 ml de água destilada recebe a mistura gasosa seca, que aí sofre umidificação e permeia completamente a câmara antes de sair. Ao mesmo tempo, uma camada fina de sangue (colocada no recipiente central) sofre rotações e pausas alternadas durante um ciclo ativo. Isso permite ao sangue equilibrar-se completamente com o ar que chega, umidificado, perfundindo o recipiente — ver detalhe "A" da Figura 5 sobre o trajeto da mistura gasosa.

A amostra sanguínea entra em equilíbrio em 10 minutos de tonometria, com um fluxo de gás de 300 ml/minuto. Durante o equilíbrio, o gás aquecido e pré-umidificado flui continuamente dentro do recipiente contendo sangue, enquanto um ciclo ativo de 2 estágios (pausa/agitação) expõe intermitentemente o fino filme de sangue fresco à mistura gasosa que está entrando. A hemólise é mínima e também não há formação de espuma.

A mistura de gases pode variar conforme o objetivo do experimento. Para determinação de P_{50} utilizam-se misturas tais que promovam determinações de Y% (% de Oxi-Hb) próximas a 50%, ou seja, na fase linear da Curva de Dissociação da hemoglobina. As misturas gasosas que utilizamos têm a seguinte composição:

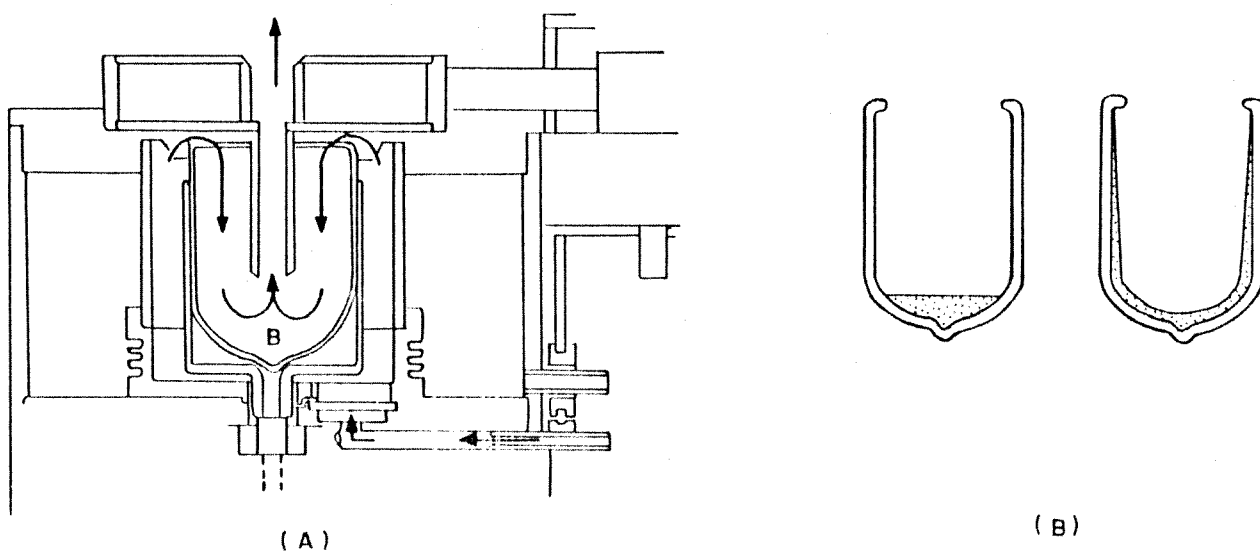
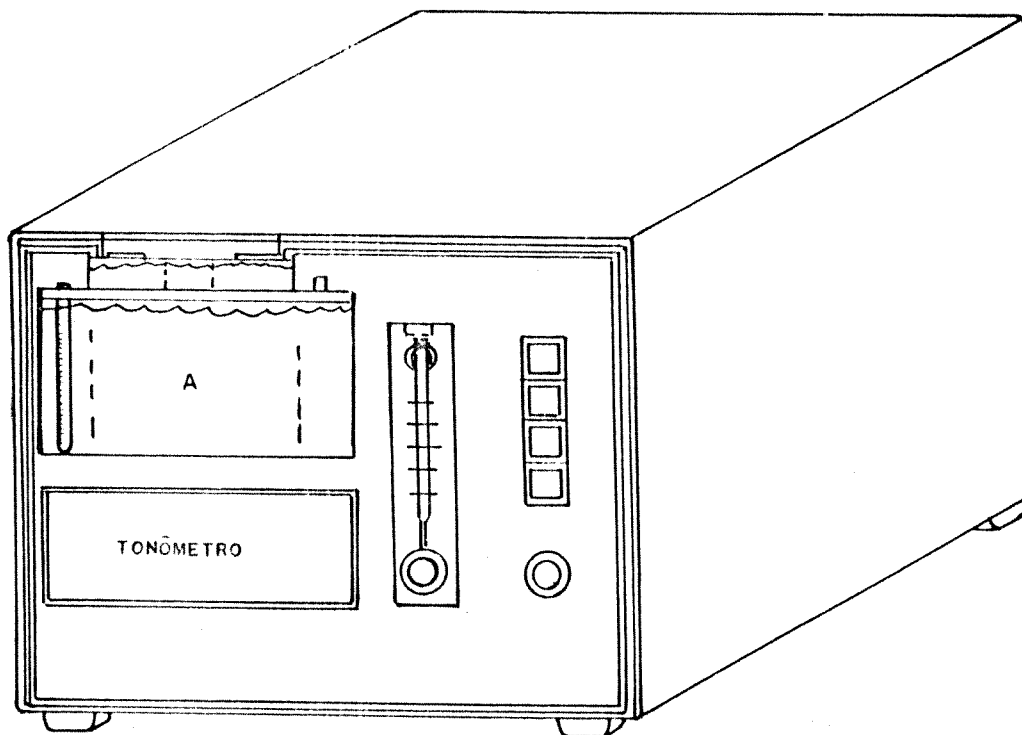


Figura 5: Esquema geral do tonômetro "IL 237", mostrando em (B) a câmara da amostra sanguínea nos dois estágios do ciclo de agitação; e em (A) o trajeto da mistura gasosa que permeia a amostra até equilíbrio.

	Gás I (%)	Gás II (%)
Oxigênio (O ₂)	2,98	4,00
Dióxido de Carbono (CO ₂)	5,60	5,60
Nitrogênio (N ₂)	p/ balanço	p/ balanço

A nível do mar a pressão parcial de CO₂ para 5,6% será de 40 mmHg e as pressões parciais de O₂ para 3 e 4% serão de 21 e 29 mmHg, respectivamente. Para diferentes pressões barométricas, as pressões parciais de O₂ e CO₂ das amostras podem ser calculadas pela fórmula:

$$P. \text{ parcial do gás (mmHg)} = P. \text{ barométrica (mmHg)} - P. \text{ vapor d'água (47 mmHg — 37° C)} \cdot \% \text{ gás}$$

Como a pressão barométrica varia em valor diariamente, as pressões parciais dos gases são calculadas para as dosagens diárias. Por exemplo, se a pressão barométrica do dia é de 713 mmHg, teremos respectivamente para pO₂ e pCO₂ da mistura I e pO₂ e pCO₂ da mistura gasosa II: 19,85 mmHg e 37,30 mmHg, 26,64 mmHg e 37,30 mmHg.

Após essa primeira etapa, a amostra sanguínea é levada direta e rapidamente à CO-oximetria, sem contato com o ar atmosférico, e para isso utilizamos seringas de vidro e agulhas especiais (“Abocatts”), devidamente vedadas.

3.3.2.2 CO-Oximetria

BENESCH *et al.* (1973), citavam a análise das diferentes formas da hemoglobina, para dosagens de P₅₀, através da leitura da absorção das mesmas em 5 comprimentos de onda diferentes: 540, 560, 570, 576 e 630 nm. De maneira semelhante, o IL 282, baseado nas diferenças espectrais entre a Oxi, Deoxi, Carboxi e Meta Hb, entre 650 e 500 nm, em 4 comprimentos de onda, dosa a quantidade dessas formas da Hb em amostras sanguíneas. O Gráfico 2 mostra o comportamento espectral da Oxi, Deoxi, Meta e CO-Hb nos pontos de leitura do CO-oxímetro.

O CO-oxímetro IL 282 é equipado para dosar a concentração de hemoglobina (em g%) fotometricamente; após hemolisar a micro-amostra sanguínea nele injetada, o aparelho faz incidir sobre a mesma um feixe de luz monocromático e, com um jogo de lentes (535, 585, 595 e 627 nm) registra as variações na absorção luminosa da amostra hemolisada. Esses registros são então processados por um microcomputador (inclusive no aparelho) que fornece os valores de porcentagem de Oxi-Hb, Meta-Hb, CO-Hb e Conteúdo total de O₂. A Figura 6 detalha o funcionamento do CO-oxímetro, esquematizando as peças que permitem a dosagem fotométrica, enquanto que a Figura 7 esquematiza o trajeto da amostra sanguínea, passando pelo hemolisador, pela cubeta e saindo, por um sistema de tubos em serpentina, para descarte.

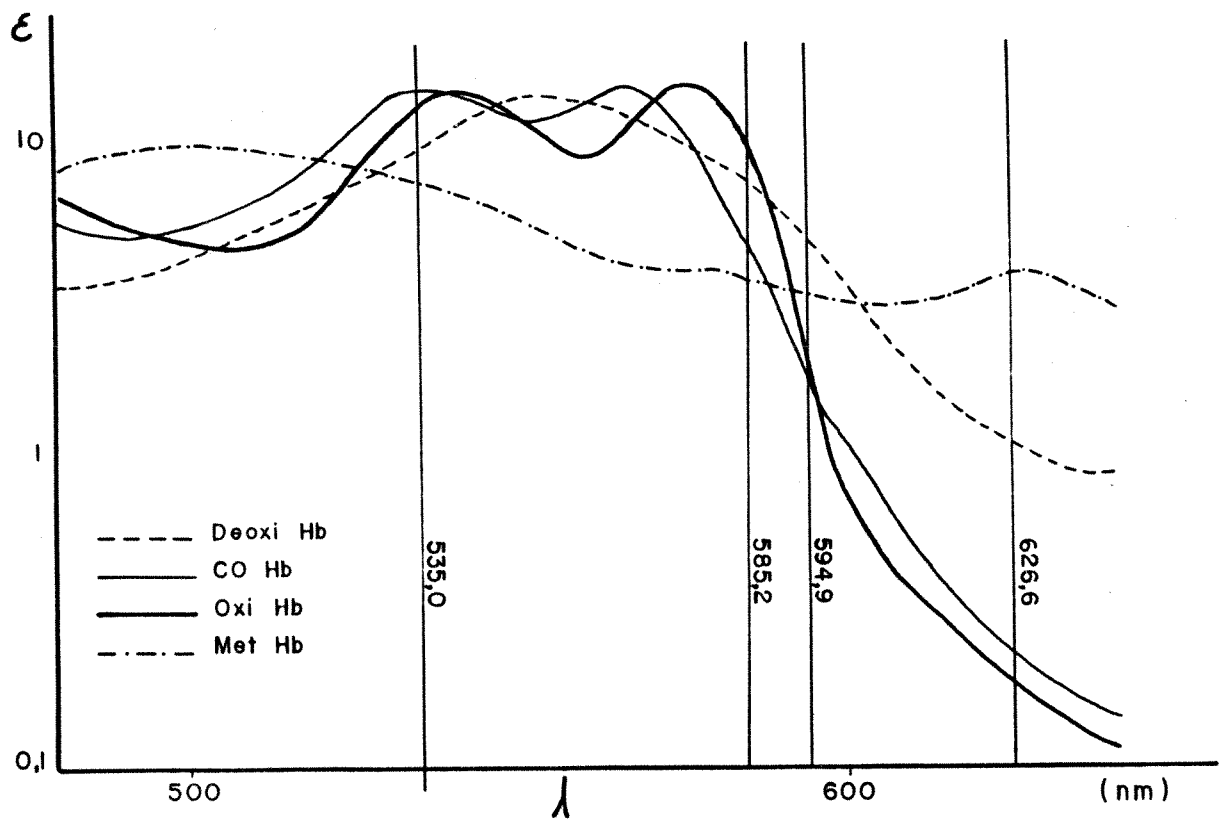
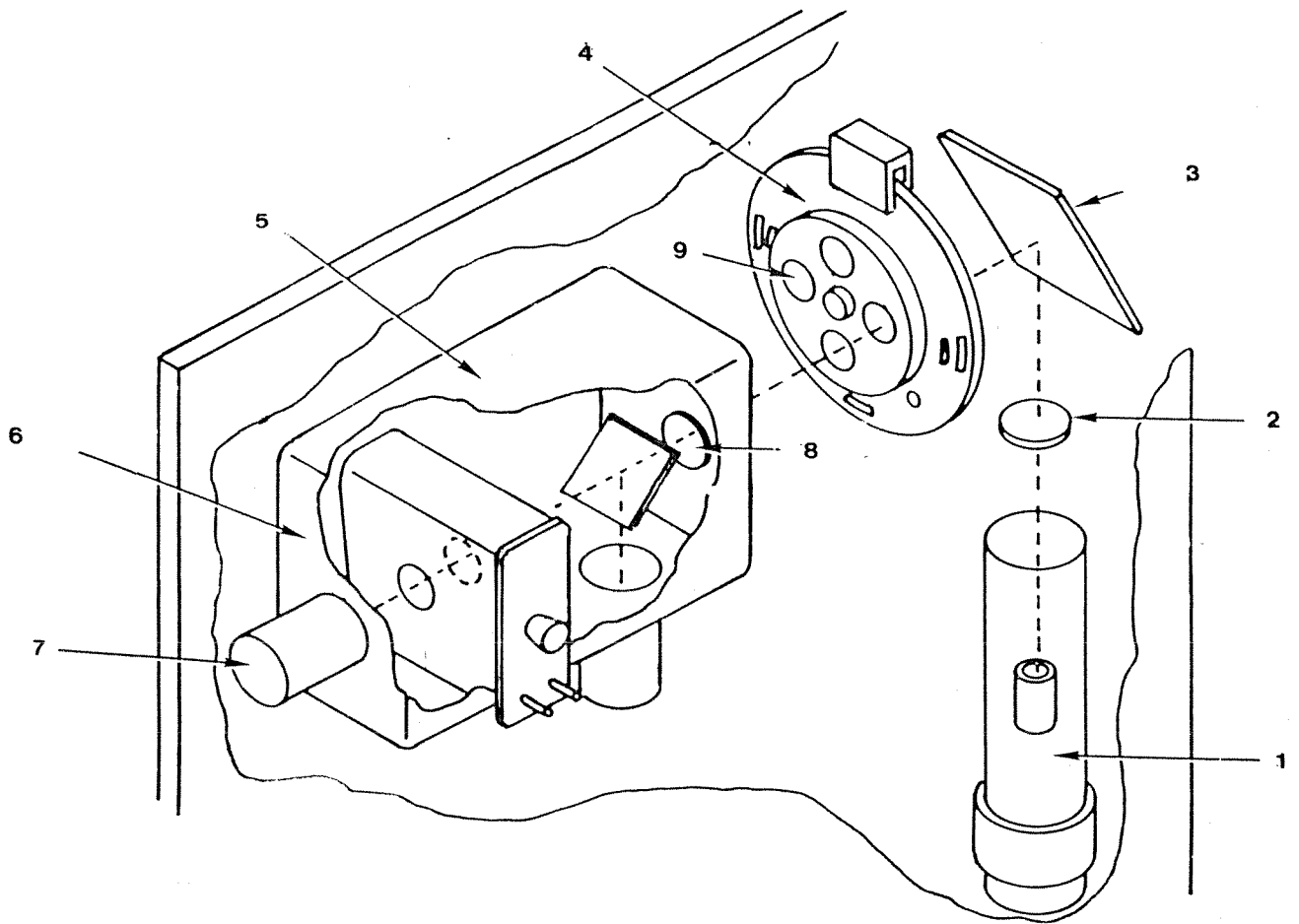


Gráfico 2: Espectro de absorção óptica da Oxi, Deoxi, Meta e Carboxi-hemoglobina entre 500 e 600 nm, mostrando os 4 comprimentos de onda em que as leituras da CO-oximetria são tomadas para cálculo da porcentagem das formas de ligação da Hb.



- 1 = fonte de luz
- 2,8 = lentes
- 3 = espelho
- 4 = coroa de filtros
- 5 = câmara de temperatura controlada
- 6 = cubeta
- 7 = fotodetector
- 9 = filtro de luz.

Figura 6: Esquema geral do funcionamento do CO-oxímetro "IL 282".

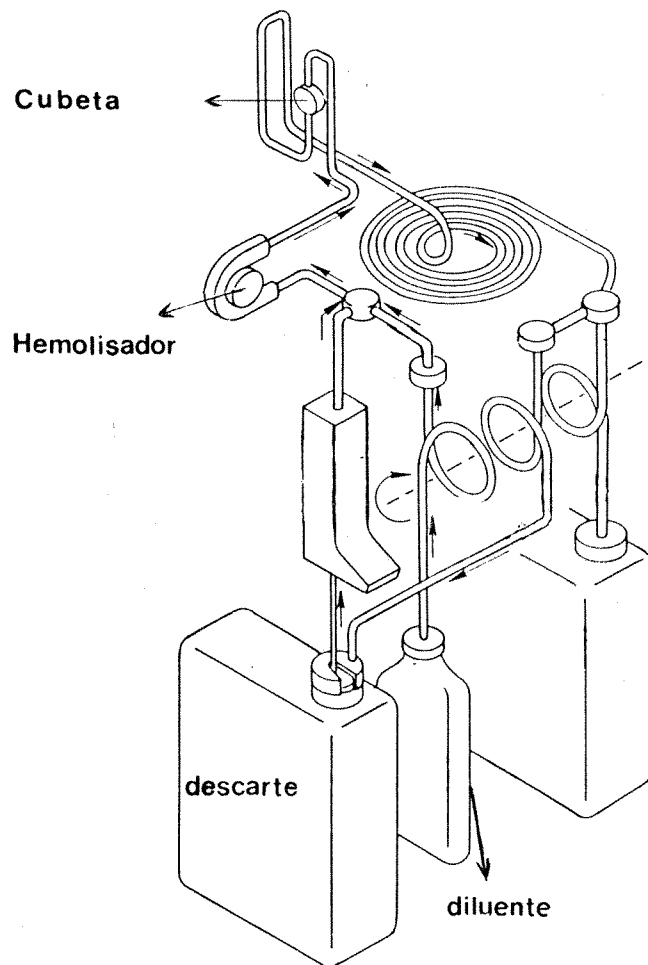


Figura 7: Trajeto da amostra sanguínea dentro do CO-oxímetro “IL 282”; notar a passagem pela câmara de hemólise anteriormente à cubeta, onde as leituras de absorvância são feitas em 4 comprimentos de onda (535, 584, 595 e 627 nm).

Para que as leituras sejam confiáveis, os valores de Carboxi-hemoglobina não devem ultrapassar 7% e os de Meta-Hb não podem ser maiores que 5%. Somente a concentração de hemoglobina pode ser ajustada no aparelho, pois não é calculada; todos os demais valores são relativos a ela e, portanto, são influenciados indiretamente pela calibração. Uma alta taxa de bilirrubina na amostra sanguínea também compromete a validade das leituras, bem como algumas drogas como a indocianina o azul de metileno (Manual do IL 282, 1977).

Para a determinação de P_{50} , tomamos uma amostra sanguínea — 1 ml — e a submetemos a tonometria e CO-oximetria, com a mistura de gases I, obtendo assim um ponto coordenado Y% (%Oxi-Hb) e pO_2 (calculado pela P.B. do dia). Repetimos o processo com a mistura II, obtendo um segundo ponto coordenado. Construímos então o “Plot de Hill”, encontrando o valor de P_{50} , em mmHg, quando %Oxi-Hb é 50%, e n (Coeficiente de Hill), como a inclinação da reta, quando os dados são logarítmicos.

Com essa metodologia foi possível avaliar o efeito dos vasodilatadores estudados sobre a hemoglobina intracelular, comparando o desvio na Curva de Dissociação da Hb no “Grupo-Tratado” com os valores dos ensaios “Controle”, sem as drogas de interesse.

3.3.3 Biotonometria

No método biotonométrico descrito por NEVILLE (1974), uma amostra sanguínea, suspensão de hemácias ou mesmo solução purificada de hemoglobina é misturada com levedura de padeiro (*Sacharomyces cerevisiae*) em alta atividade respiratória, o que causa um declínio rápido da tensão de oxigênio dissolvido em solução e em equilíbrio com a hemoglobina. Registrando-se a queda da tensão de O_2 do meio pode-se construir a Curva de Oxigenação da hemoglobina e determinar P_{50} .

O experimento é conduzido em uma câmara de volume conhecido (o que permite mensurar a tensão de O_2 inicial), com temperatura controlada (25° C) e sob agitação contínua; a medida da quantidade de oxigênio em solução é feita através de um eletrodo de prata.

150 mg da levedura em tampão (TRIS-HCl 0,15 M; pH 7,4) e na presença de quantidade não limitante de seu substrato dextrose (solução 150 mg%) consome rapidamente o oxigênio dissolvido no meio, até que a diminuição da tensão do gás seja suficiente para provocar a liberação do oxigênio ligado à hemoglobina, o qual passa então a ser consumido pela levedura, até que a tensão desse gás, na câmara, seja igual a zero.

Quando a levedura está consumindo o oxigênio provindo da hemoglobina obtém-se curva característica, sigmóide (Gráfico 3, parte II) que difere sensivelmente do traçado referente ao consumo de oxigênio pela levedura, na ausência da hemoglobina (Gráfico 3, parte I).

O estudo da Curva de Dissociação da hemoglobina, em comparação com o consumo “linear” do oxigênio em solução (só levedura) pode-nos proporcionar o conhecimento da afinidade Hb/ O_2 através das medidas de Velocidade de Consumo de Oxigênio (V.C. O_2) e P_{50} .

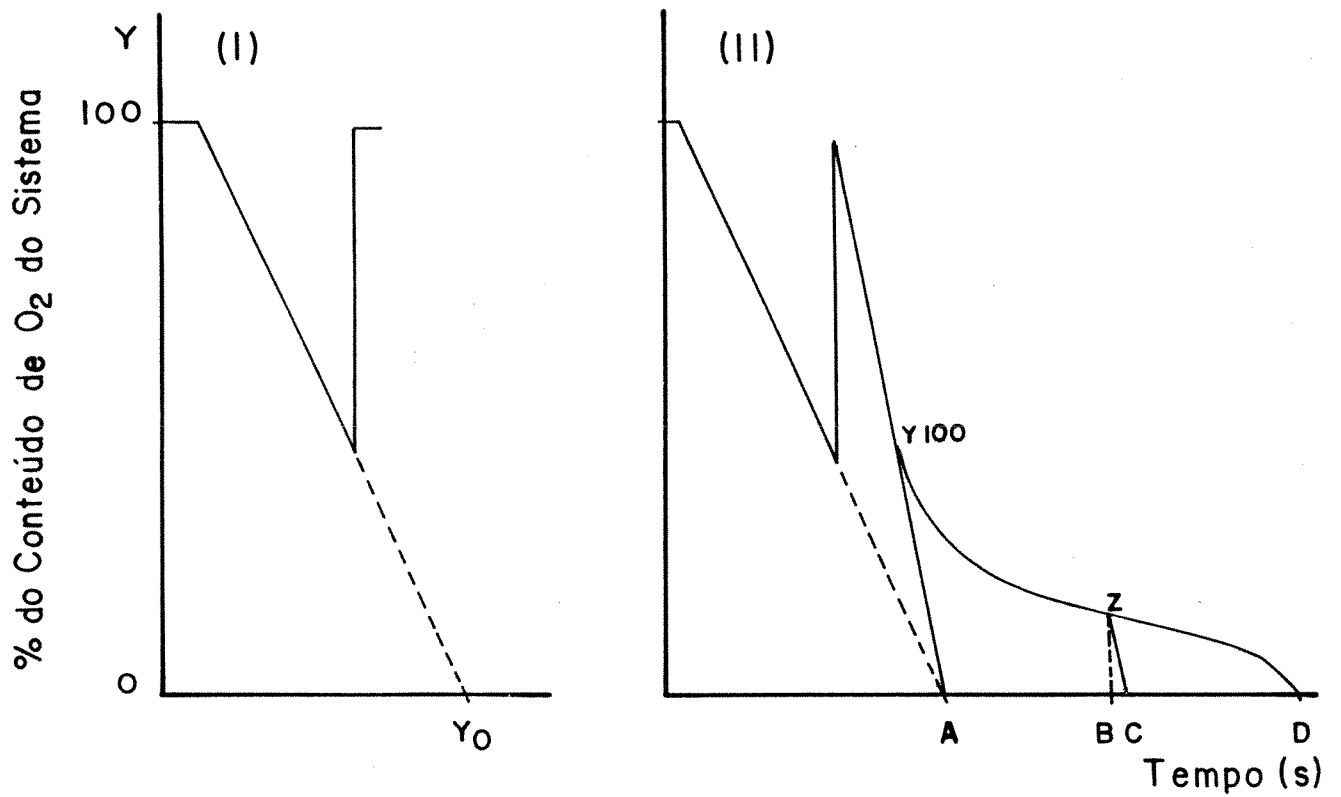


Gráfico 3: Esquema geral do traçado biotonométrico. Em (I) — declínio da da tensão de O₂ dissolvido em suspensão de levedura; em (II) — consumo de O₂ na presença de hemoglobina. Notar a inclinação dada pela Curva de Dissociação da Hb (ver texto).

3.3.3.1 Mensuração da Velocidade de Consumo de Oxigênio pela Levedura

A velocidade de consumo de oxigênio é dada diretamente pelo ângulo de declínio da tensão de oxigênio do traçado experimental.

Sabendo-se que a quantidade de oxigênio dissolvido em solução a 25° C é 480 natg/ml, e o volume da câmara de reação é de 1,7ml, chegamos ao valor de 816 natg de oxigênio na câmara, ao início do experimento.

A velocidade de corrida do papel (registrador) é de 1,9 cm/min (eixo X) e assim, a V.C. O₂ é expressa em natg/min.

A velocidade média de consumo de oxigênio varia muito entre os "pool" de levedura, e, quando na presença de hemoglobina diminui sensivelmente, sendo esta alteração na V.C.O₂, causada pela liberação ponderada do gás molecularmente ligado à hemoglobina, liberação essa proporcional à afinidade entre oxigênio e a Hb.

Essa medida serve ainda para avaliação do efeito direto das drogas em estudo sobre a levedura; aquelas drogas que interferem diretamente na respiração da levedura, isto é, que alterem V.C. O₂ não podem ser empregadas para o estudo funcional da Hb por biotometria, pois interagem com o levedo, impedindo a medida de P₅₀.

3.3.3.2 Determinação de Y% (Porcentagem de Saturação da Hb) e P₅₀

A análise do traçado da Curva de Dissociação da hemoglobina, para determinação de P₅₀ é feita tendo-se um traçado controle, somente da levedura em suspensão, emparelhado à direita do ensaio em questão (ver Gráfico 3); ou ainda, na mesma linha do traçado de ensaio, como nos nossos registros (Gráfico 4).

O ponto onde a tangente do traçado I (Gráfico 3) cruza a linha base, isto é, onde Y = zero, é chamado ponto "A"; aquele onde o traçado do experimento (parte II) atinge a linha-base (X final) é chamado ponto "D".

O ponto onde a secante do traçado linear de consumo da levedura diverge (inferiormente) da Curva de Dissociação da Hb é considerado P₁₀₀, ou seja, o início do traçado da C.D. Hb.

Traçando-se uma reta do ponto "A" até P₁₀₀, obtemos um segmento de inclinação determinada. Um ponto qualquer "Z", da Curva de Dissociação pode agora ser analisado, traçando-se uma paralela do segmento "A"/P₁₀₀ e obtendo, na linha-base, ponto "C". Finalmente, traçando a perpendicular do ponto "Z" até a linha-base, obtemos "B".

Para determinação de Y% (porcentagem de saturação dos sítios ligantes da hemoglobina) no ponto "Z", aplica-se:

$$Y\%(Z) = \frac{(B - C) - (B - D)}{(A - D)}$$

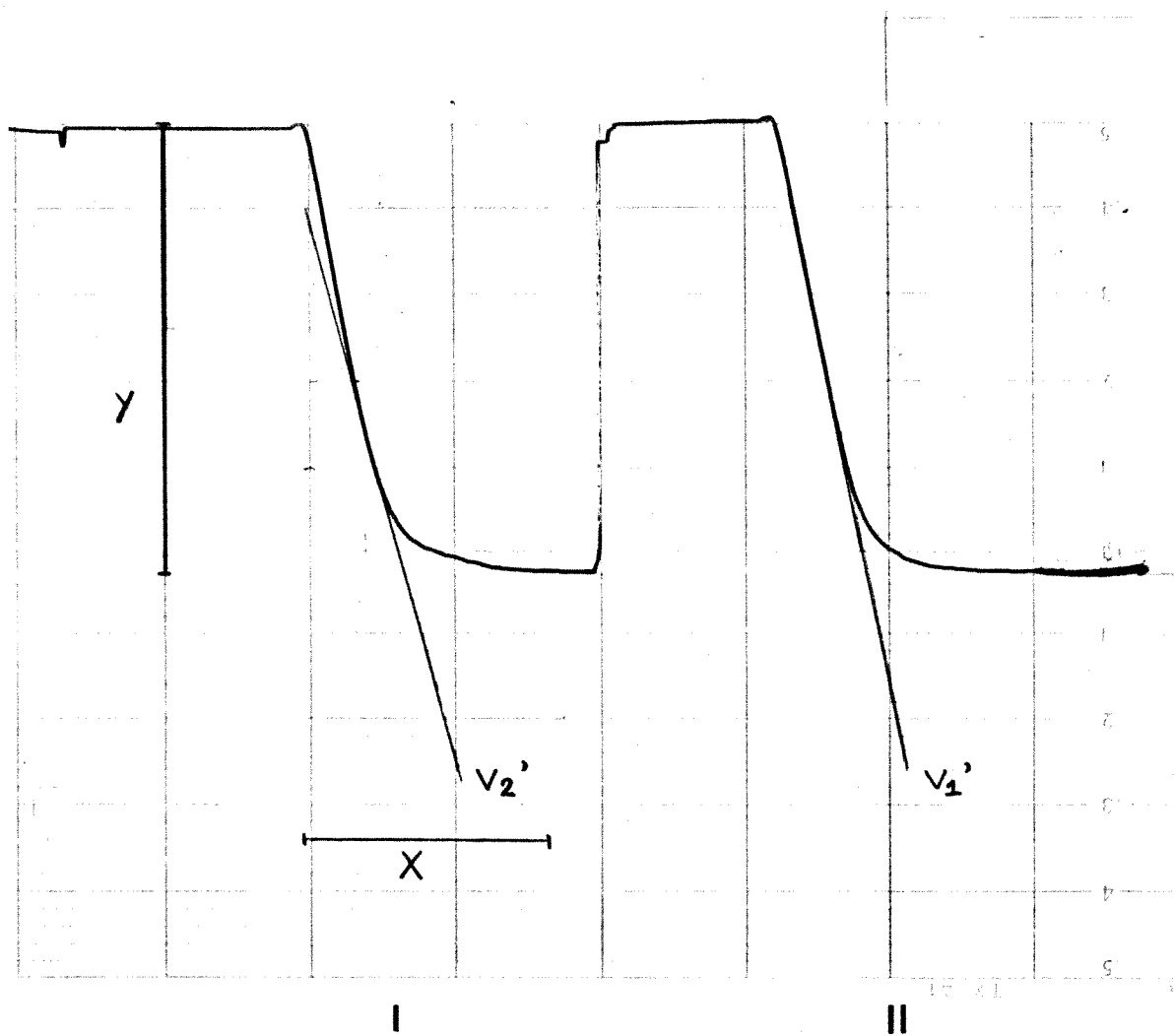


Gráfico 4: Registro do consumo de oxigênio pela levedura em ensaios biotométricos (I), e na presença de hemoglobina (II). Tampão TRIS-HCl 0,15 M com 150 mg% de dextrose, pH 7,4, $T = 25^\circ C$, $[LEV] = 150 \text{ mg}$.

Para encontrar a tensão de oxigênio (pO_2) correspondente à saturação encontrada, ALMEIDA E VAL (1982) desenvolveram a seguinte equação:

$$pO_2(Z) = \frac{P.B. \cdot 0,2098 \cdot LZ}{4 \cdot L_{100}}$$

onde:

- P.B. = Pressão barométrica
- 0,2098 = % de Oxigênio na atmosfera
- L_{100} = Altura (mm) de 0 a 100% de saturação (Y zero até P100)
- L_Z = Altura (mm) de 0% a "Z" (no eixo Y)

Quando Y% de "Z" é igual a 50%, então pO_2 corresponde a P_{50} .

3.4 Equilíbrios de Diálise

ANTONINI *et al.* (1963) descreveram a reação do corante azul de bromotimol com a hemoglobina humana e seus derivados, em equilíbrios de diálise de aproximadamente 48 horas, ao final das quais podia-se estabelecer a relação de ligante por hemoglobina, isto é, a concentração efetiva do ligante, capaz de reagir, por heme, com a molécula proteica.

Essa metodologia, portanto, permite mensurar a interação molecular hemoglobina/droga, quantitativamente revelando o número de moléculas das duas espécies envolvidas, que estão quimicamente ligadas entre si. Por ela foi-nos possível detectar a reação molecular Hb/drogas vasodilatadoras, comparando esses resultados com os efeitos fisiológicos dessas drogas e ainda com o estado de dissociação das mesmas.

O ensaio consiste em submeter à diálise, 4ml de uma solução purificada de hemoglobina de concentração próxima a 30 μ M (por heme) contra 46 ml de uma solução do ligante, entre 0,01 a 1 mM, em tampão fosfato de potássio 0,2 M; pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de 4° C. O tempo para equilíbrio é variável (entre 1 e 2 dias), ao final do qual a concentração do ligante dentro da membrana de diálise deverá ser igual à concentração do corante fora da mesma, mais a porção ligada à hemoproteína.

A hemoglobina não pode perfundir a membrana de diálise, porém o ligante o faz e assim penetra a mesma, na tentativa de estabelecer um equilíbrio de massa simples (concentração de dentro = concentração de fora), esquematizado no Gráfico 5 "A".

Na verdade, como no início do experimento o volume interno da membrana era 4 vezes menor que o externo, o equilíbrio fica deslocado, aproximando-se mais da concentração de ligante de fora da membrana (Gráfico 5 "B").

Havendo hemoglobina no interior da cela, o ligante fixa-se à esta e então um equilíbrio secundário se estabelece (Gráfico 5 "C"), onde a concentração do ligante no interior da membrana

será igual a do ligante fora da mesma acrescido da porção ligada à hemoglobina, ou seja:

$$\boxed{L_d = L_f + L_l}$$

L_d = [ligante] dentro da membrana

L_f = [ligante] fora da membrana

L_l = [ligante] ligado à Hb

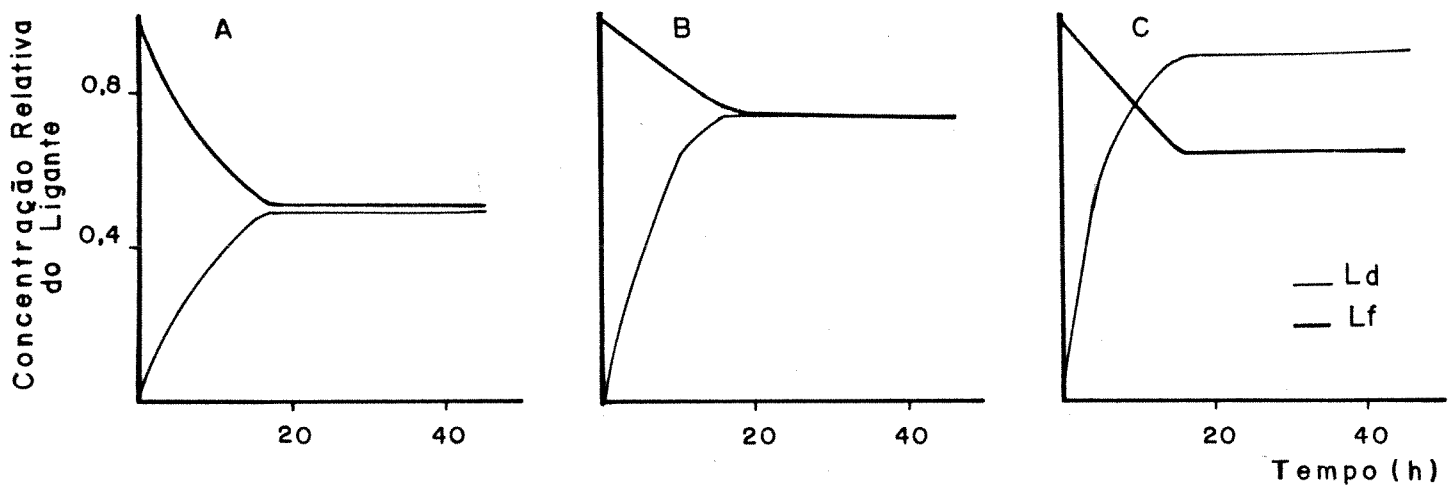


Gráfico 5: Esquema geral dos Equilíbrios de Diálise. Em (A): equilíbrio simples entre duas fases de igual volume, em (B): equilíbrio simples entre fases de diferentes volumes, em (C): equilíbrio secundário (ligante livre e ligado à proteína) entre fases de diferentes volumes.

A determinação da concentração do ligante é feita fotométricamente, utilizando-se as características ópticas de cada ligante considerado. A concentração da hemoglobina é determinada em 415 nm onde o coeficiente de extinção molar, por heme, é de 125.000.

Nem todos os vasodilatadores puderam ser estudados, mas aqueles que apresentavam propriedades espectrais adequadas (papaverina, dipiridamol, prenilamine), isto é, pico de absorção definido e coeficiente de absorção de grandeza suficiente para determinação fotométrica das pequenas concentrações molares das drogas durante o equilíbrio.

No item 3.1. descrevemos os coeficientes de absorção da papaverina, dipiridamol e da prenilamine, com os quais determinamos fotométricamente as concentrações dessas mesmas drogas durante os equilíbrios de diálise. As concentrações das drogas variaram entre 0,01 e 1 mM, conforme o método descrito para o azul de bromotimol (ANTONINI *et al.* 1963) e a concentração de hemoglobina usada foi de 0,01 mM.

No equilíbrio com a hemoglobina, estabelece-se o número de moléculas de ligante por heme proteico, segundo SCATCHARD (1949), pela fórmula.

$$Ld = Lf + Ll$$

ou ainda:

$$Ld = Lf + v \cdot [Hb]$$

onde:

v = Número de moléculas do ligante que reage (por heme) com a Hb

[Hb] = Concentração molar de hemoglobina (por heme).

3.5 Dosagem Sanguínea do 2,3-difosfoglicerato

ROSE E LIEBOWITZ (1970), descreveram um método de dosagem do 2,3-DPG, baseados no princípio de que este é hidrolisado à 3-fosfoglicerato (3-PGA) e fósforo inorgânico (Pi) por uma enzima encontrada em preparações de fosfogliceromutase (PGM), que é chamada 2,3-difosfoglicerato fosfatase; sendo o ácido fosfoglicólico um cofator necessário à reação (KIESOW & BLESS, 1973):



A dosagem do fosfato formado pode ser feita fotometricamente, segundo o método de FISKE & SUBBAROW (1925), o qual quantifica a formação do composto fosfomolibdato de amônio (azul) a partir do molibdato de amônio (incolor), sendo o ácido amino-naftol-sulfônico (ANS) o agente redutor.

Como a quantidade de fosfato liberado na reação (Pi) é diretamente proporcional à concentração de 2,3-DPG inicialmente existente, podemos assim determinar a concentração sanguínea do 2,3-DPG (ROSE & PIZER, 1968).

Inicialmente obtivemos, na forma de um Kit completo "SIGMA", todos os reagentes necessários para a dosagem do 2,3-DPG em micro-amostra sanguínea segundo os métodos citados

(SIGMA Technical Bulletin, 1974). A curva padrão de fosfato foi construída, utilizando-se solução padrão de concentração de Pi conhecida (20 mM), em uma série de diluições, adicionadas de molibdato de amônio e do reagente de FISKE-SUBBAROW (ANS); após aguardar 10 min para o desenvolvimento da reação de cor, as absorbâncias em 660 nm foram anotadas.

Posteriormente, quando das dosagens do 2,3-DPG plotamos na curva padrão o valor de absorbância encontrado e lemos diretamente (em mMoles) a concentração de Pi sanguíneo.

3.5.1 Dosagem em Micro-amostra Sanguínea

Utilizamos uma modificação do teste descrito no Boletim SIGMA nº 665 (1974), como segue:

- a) Coleta do material: 0,2 ml de sangue (fresco ou heparinizado) era pipetado em um tubo de centrífuga "Eppendorf" e adicionado de 0,6 ml de ácido tricloroacético (TCA 8% em H₂SO₄ 0,07 N) gelado, para desproteinização; após agitação forte, o tubo foi deixado em repouso por 5 min (0° C) e levado à centrifugação (250 G, 2 min), descartando-se o precipitado. Esse desproteinizado pode ser mantido, sob congelamento, por até 2 meses (Boletim SIGMA nº 665). BEUTLER (1984), cita a fervura por 10 minutos, desses desproteinizados como suficiente para conservar os níveis de 2,3-DPG estáveis por vários meses, sob congelamento.
- b) Ensaio enzimático: 0,1 ml do sobrenadante da etapa (a), em 0,5 ml de tampão tri-etanoamina 0,2 M, pH 8,0 (com 1 mM de MgCl₂ e de EDTA), foi incubado com 5 µl da enzima difosfogliceratomutase, na presença (tubo A) na ausência (tubo B) de 20 µl de ácido fosfoglicólico 0,02 M.

Os tubos eram então incubados a 37° C por 15 min, sendo a reação interrompida com 0,4 ml de TCA gelado por tubo, agitando-se por inversão. Somente ao tubo B adicionava-se, então, 20 µl de ácido fosfoglicólico, e procedia-se a reação de cor.

- c) Reação de cor: A cada tubo 0,2 ml de molibdato de amônio (2,3% em H₂SO₄ 5 N) era então adicionado, e ainda 50 µl do reagente de FISKE-SUBBAROW (ANS 0,8%); esperava-se 10 min para desenvolvimento da reação e anotava-se a absorção em cada um dos tubos de ensaio, a 660 nm contra água, completando as leituras em até no máximo 10 min. As absorbâncias, levadas à curva-padrão de fosfato davam o valor de concentração de 2,3-DPG sanguíneo.

3.5.2 Modificações do Método em Micro-amostra

Os reagentes importados e de difícil obtenção nos levaram a desenvolver novos métodos, ou melhor, a modificar as metodologias utilizadas, substituindo reagentes não disponíveis por outros preparáveis em nosso laboratório.

Assim, o ácido fosfoglicólico foi substituído por pirofosfato de sódio (0,02 M), que segundo ROSE E LIEBOWITS (1970) substitui com vantagens o primeiro (é duas vezes mais ativo) como cofator enzimático da 2,3-DPG fosfatase. O tampão trietanoamina foi temporariamente substituído pelos tampões TRIS-HCl, TRIS-glicina e imidazol-HCl, com a mesma força iônica.

Utilizamos também o sulfato ferroso (10% em H₂SO₄ 0,07 N), descrito por SUMMER (1944) em dosagens de Pi, como redutor do Molibdato de Amônio, em lugar do ANS, sendo que o sulfato apresenta sobre o redutor de FISKE-SUBBAROW a vantagem de ser estável por um período maior de tempo (até 2 meses).

Por fim, purificamos a 2,3-DPG fosfatase, inicialmente em músculo de coelho (COWGILL & PIZER, 1956) e posteriormente em músculo respiratório de frango (GRISOLIA & CARRERA, 1975) que passamos a utilizar nas dosagens sanguíneas do 2,3-DPG.

4 Resultados

4.1 Equilíbrios de Oxigenação por Espectrofotometria

4.1.1 Determinação do “Efeito Bohr”

Com uma solução de hemoglobina purificada, determinamos pelo método espectrofotométrico descrito no ítem 3.3.1.2, no Plot de Hill, (com quatro pontos cada), a C.D. Hb em quatro valores de pH diferentes, conforme mostra o Gráfico 1.

Plotando-se os valores encontrados de P_{50} em função dos de pH, observamos um decréscimo desse primeiro parâmetro, a medida que o meio vai se alcalinizando, ver Gráfico 6. Numericamente determinamos o Efeito Bohr, pela fórmula de WYMAN (1964):

$$\frac{(\log P)}{pH} \cdot Y = \frac{(H)}{Y} \cdot pH$$

onde:

Y = Fração de saturação da Hb

P = Pressão parcial de oxigênio.

Introduzindo-se o conceito de atividade ligante média (PM) a equação acima é descrita de forma simplificada, que quantifica o efeito descrito inicialmente por BOHR (1904):

$$\frac{(\log PM)}{pH} = [H^+ (HbO_2) - H^+ (Hb)] = H^+$$

Para Δ pH: 8,00 - 7,00 ou 7,00 - 6,00

$\Delta \log P_{50} = (-0,2079) - 0,0888$, $0,0888 - 0,3854$

Assim:

$$\Delta H^+ = \frac{\log PM}{pH} = \frac{(-0,2079) - 0,0888}{8,00 - 7,00} = -0,3$$

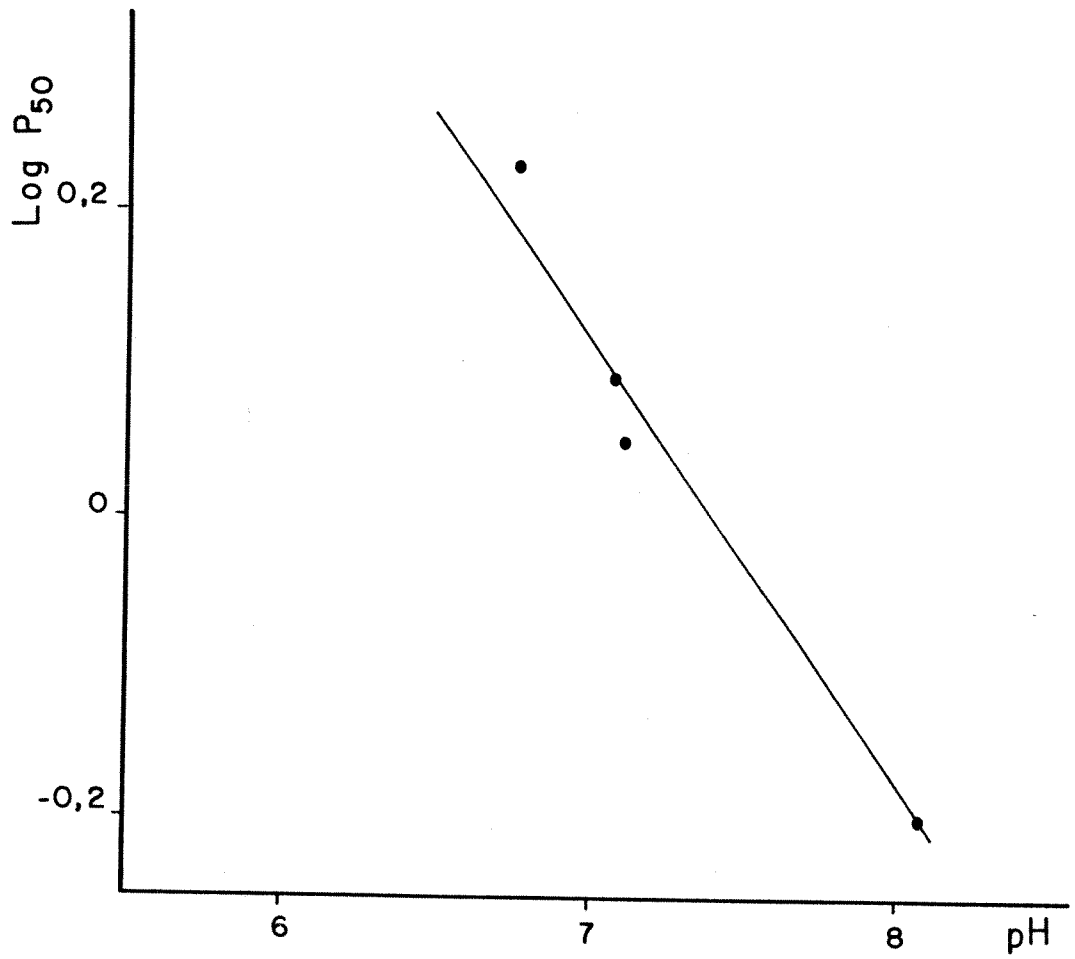


Gráfico 6: Efeito BOHR — Variação de log P₅₀ em função do pH em ensaios fotométricos com Hb humana "stripped"; tampão TRIS-HCl 0,05 M, T = 20° C, [Hb] = 10,0 μM.

A importância do Efeito Bohr nas ligações homo e heterotrópicas da Hb é fato estabelecido e o estudo da ação de vasodilatadores não poderia deixar de considerar esse efeito. A ação da papaverina em deslocar para a direita a O.E.C. é relacionado ao pH no Gráfico 8.

4.1.2 Verificação do Efeito de Poliânions Fosfato sobre a Afinidade Hb/Oxigênio

A Tabela 3 mostra o efeito do 2,3-DPG sobre P_{50} em duas concentrações diferentes, além de mostrar a ação de outro poliânion, o trifosfato de adenosina (ATP); pode-se ver também o valor da afinidade Hb/O₂ da hemoglobina parcialmente purificada (hemolisado total), descrita no item 2.2, contra P_{50} da Hb "stripped". O "hemolisado total" contém todos os fosfatos orgânicos intraeritrocitários.

4.1.3 Determinação de P_{50} no Sangue de Pacientes Anginosos Tratados Clinicamente com os Vasodilatadores de Interesse.

Através do Departamento de Clínica Médica da Faculdade Ciências Médicas da UNICAMP, tivemos acesso a pacientes cardíacos crônicos, com idade entre 40 e 83 anos, selecionados pelo diagnóstico clínico de angina pectoris e utilização de vasodilatadores cardíacos, dos quais coletamos amostras sanguíneas para dosagem da afinidade Hb/O₂ e de 2,3-DPG. A idade média desses pacientes foi de 55 anos.

Tabela 3: Ensaios fotométricos -- Variação de P_{50} da Hb "stripped" pela ação do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), trifosfato de adenosina (ATP) e em comparação com hemolisado total (tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,05; T = 21° C).

amostra	[Hb] 10 ⁻⁵ M	Conc. Fosfato 10 ⁻⁵ M	Relação Hb/fosfato	P_{50} (mmHg)	log P_{50}
Hb "Stripped"	6,7	-	-	1,412	0,15
Hb + 2,3-DPG	6,3	3,3	1 / 0,5	1,549	0,19
Hb + 2,3-DPG	6,2	33,3	1 / 5,0	1,738	0,24
Hb + ATP	10,0	20,0	1 / 2,0	1,622	0,21
"Hemol.Total"	10,0	-	-	1,786	0,25

A Tabela 4 traz os valores encontrados de $\log P_{50}$ com hemolisado total desses pacientes sob tratamento com os vasodilatadores, em comparação com seus pares controle (amostras pareadas) . A associação de drogas, comuns no tratamento clínico de angina de peito, bem como o pequeno número de casos por vasodilatador estudado (os ensaios clínicos apresentam grande dificuldade de controle de variáveis e seu número é, devido a isso, sempre reduzido), fez a amostra muito reduzida para que o efeito particular de cada droga fosse analisado contra seu par/controle, composto de indivíduos sem patologia cardíaca conhecida (protocolados) e cujas amostras sanguíneas foram colhidas e dosadas paralelamente às amostras de sangue dos pacientes.

Uma análise grupal dos valores de $\log P_{50}$ para o grupo controle e grupo tratado, mostra que *in vivo* não se observa alteração significativa de P_{50} provocada pelos vasodilatadores. Esses dados foram analisados por teste paramétrico (Teste "t" para amostras não pareadas) e não paramétrico (Teste de Mann-Withney), revelando que as alterações de $\log P_{50}$ do grupo controle ($\bar{x} = 0,2515 \pm 0,1950$) para o grupo de pacientes ($\bar{x} = 0,3015 \pm 0,1656$) não é significativa.

Pelo teste de Student, com 30 G.L., o valor de t encontrado foi de 0,2207 sendo o t crítico de 1,692. No teste de Mann-Withney, o "U" mínimo encontrado foi de 123, acima do valor de mínimo de tabela (U = 86) indicando, nos dois casos, que para $P > 95\%$, não há diferença significativa entre os dois grupos analisados.

Tabela 4: Valores de $\log P_{50}$ do sangue de pacientes anginosos tratados com vasodilatadores, contra grupo-controle (análise pareado) em ensaios fotométricos, com hemolisato total; não há diferença significativa entre os dois grupos (ver texto). Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,0; T = 20° C.

caso n ^o	grupo controle $\log P_{50}$	grupo tratado $\log P_{50}$	droga
1	0,131	0,267	propranolol + ISL
2	-0,053	0,048	STR
3	0,226	0,207	STR + ISL + PTT
4	0,114	0,104	propranolol
5	0,467	0,440	STR + ISL + PTT
6	0,253	0,130	NIF + STR
7	0,076	0,166	ISL
8	0,343	0,251	DIP
9	0,318	0,452	propranolol
10	0,219	0,334	NIF
11	0,562	0,411	DIP
12	0,290	0,334	propranolol
13	0,050	0,416	DIP
14	-0,012	0,065	STR
15	0,498	0,587	STR
16	0,541	0,605	ISL

4.1.4 Estudos com a Hemoglobina *in vitro*, Purificada

A Tabela 5 mostra o efeito dos vasodilatadores em estudo sobre a afinidade Hb/oxigênio, em pH próximo ao fisiológico para a hemoglobina purificada, sempre contra ensaios controle. O valor de $\log P_{50}$ é a média de ensaios duplos, contra a droga referida. Pode-se perceber um aumento de P_{50} provocado pela papaverina, dipiridamol e por dois nitratos, e uma diminuição, provocada pela nifedipine.

Num estudo de 34 equilíbrios de oxigenação com a hemoglobina "stripped" (Tabela 6) encontramos um valor médio de $\log P_{50}$ de $0,215 \pm 0,031$, para pH 7,0.

4.1.5 Efeito dos Vasodilatadores Estudados sobre Suspensões de Hemácias

Demonstramos a aplicabilidade do "Método ANISO", descrito no item 3.3.1.2, comparando-o com o "Método ISO", já existente através dos dados da Tabela 6. Tendo analisado independentemente 34 ensaios de oxigenação, obtivemos $\log P_{50}$ e n pelos dois métodos de cálculo e encontramos valores muito próximos para ambos, sendo os do "Cálculo Aniso", $0,288 \pm 0,054$, ligeiramente maiores que os do cálculo "ISO".

Essa variação entre os métodos é esperada e deve-se à diferente manipulação dos dados experimentais, cujos erros de medida são conduzidos diferenciadamente. Acreditamos, inclusive que a normalização (linearização e diminuição dos intervalos de medida de Δ' e Δ ". quando dividimos a diferença entre 2 comprimentos de onda por um denominador comum — absorbância em 560 nm) das medidas no cálculo "ANISO" torna-o mais preciso em relação ao Cálculo "ISO".

Através do método "ANISO" pudemos estudar a hemoglobina dentro da hemácia, verificando a repetição do efeito das drogas vasodilatadoras, anteriormente detectado em soluções purificadas dessa hemoproteína.

Encontramos para suspensões de hemácias um valor médio de $\log P_{50}$ igual a $0,5273 \pm 0,2994$ e $n = 1,5607 \pm 0,4218$. BENESCH (1967) cita valores de 0,72 e $n = 2,7$ para essas condições.

Pela Tabela 7 pode-se avaliar o efeito de cada vasodilatador sobre a atividade funcional da hemoglobina, quando a proteína encontra-se dentro das hemácias. Essa análise só foi possível através da desenvolvimento do cálculo "ANISO".

Na mesma tabela visualiza-se o efeito pronunciado da prenilamine em deslocar para a esquerda a O.E.C. da hemoglobina, e do dipiridamol em um desvio para a direita na curva; de maneira menos pronunciada os resultados sugerem ainda o efeito da papaverina, nifedipine, dinitrato de isosorbitol e do propatilnitrato (aumento de P_{50}).

Desenvolvemos um programa, em Basic, para computação dos dados dos ensaios fotométricos e determinação de P_{50} e n pelos dois métodos de cálculo; esse programa, descrito de forma completa no Apêndice 1 (para Sistema ITAUTEC I-7000) permite a determinação de P_{50} em ensaios com número variável de adições de ar (de 2 a 100) e ainda o cálculo da constante tonométrica, caso seja desejável, possibilitando assim a adaptação dos valores de pO_2 calculados,

de acordo com a pressão barométrica do dia. A opção por um dos métodos de cálculo é feita de acordo com a manutenção ou não da isosbesticidade dos traçados do ensaio.

Tabela 5: Valores médios de $\log P_{50}$ obtidos em Equilíbrios de Oxigenação da hemoglobina pelo método fotométrico com sete vasodilatadores. Hb “stripped”, pH 7,0 em tampão TRIS-HCl 0,05 M; T = 20° C, [Hb] = 0,01 mM.

droga	C/T	relação Hb/droga	pH	$\log P_{50}$
papaverina	C	-	7,2	0,078
	T	1 / 10		0,283
dipiridamol	C	-	7,4	0,290
	T	1 / 10		0,395
prenilamine	C	-	7,2	0,138
	T	1 / 15		0,148
dinitrato de isosorbitol	C	-	7,3	0,342
	T	1 / 48		0,350
nifedipine	C	-	7,4	0,024
	T	1 / 20		-0,061
tetranitrato de pentaeritreitol	C	-	7,4	0,208
	T	1 / 300		0,240
propatilnitrato	C	-	7,3	0,324
	T	1 / 50		0,363

Tabela 6: Valores de $\log P_{50}$ e n (Coeficiente de Hill) obtidos em ensaios fotométricos com a hemoglobina “stripped” por dois métodos de cálculo: “ISO” = método clássico de ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958) e “ANISO” = novo método proposto; tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,0, T = 20° C.

Equilíbrio nº	Cálculo “ISO”		Cálculo “ANISO”	
	$\log P_{50}$	n	$\log P_{50}$	n
01	0,164	2,312	0,237	2,039
02	0,248	1,287	0,349	1,366
03	0,226	1,828	0,298	1,703
04	0,216	2,220	0,258	2,044
05	0,215	2,223	0,258	2,046
06	0,244	2,350	0,310	2,188
07	0,205	2,161	0,334	2,050
08	0,160	1,451	0,262	1,421
09	0,185	2,373	0,083	2,198
10	0,263	1,622	0,247	1,870
11	0,226	2,376	0,260	2,409
12	0,165	2,046	0,253	1,874
13	0,228	2,036	0,294	2,048
14	0,217	1,673	0,345	1,615
15	0,218	1,780	0,318	1,667
16	0,238	2,163	0,303	2,092
17	0,262	1,973	0,343	1,897
18	0,241	2,468	0,320	2,293
19	0,227	2,114	0,320	2,073
20	0,176	1,983	0,270	1,914
21	0,251	1,994	0,336	1,947
22	0,206	2,161	0,334	2,050
23	0,185	1,807	0,293	1,703
24	0,163	2,007	0,278	1,982
25	0,232	1,816	0,306	1,780
26	0,212	1,819	0,220	2,063
27	0,188	1,514	0,246	1,449
28	0,265	2,209	0,365	2,081
29	0,170	1,603	0,190	1,565
30	0,184	2,076	0,287	1,961
31	0,248	1,287	0,349	1,366
32	0,210	1,751	0,311	1,744
32	0,245	2,091	0,321	2,086
33	0,225	2,097	0,312	1,893
\bar{X}	0,215	1,961	0,288	1,896
D.P.	0,031	0,304	0,054	0,258

Tabela 7: Equilíbrios de oxigenação da hemoglobina (Método fotométrico, cálculo “ANISO”), com hemácias: alteração dos valores de $\log P_{50}$ pela ação de vasodilatadores cardíacos. (Tampão TRIS-HCl 0,1 M, T = 20° C; [Hb] = 0,01 mM)

droga	C/T	relação Hb/droga	pH	$\log P_{50}$
papaverina	C	-	7,6	0,350
	T	1 / 50		0,433
dipiridamol	C	-	7,6	0,392
	T	1 / 5		0,602
prenilamine	C	-	7,3	0,765
	T	1 / 5		0,260
dinitrato de isosorbitol	C	-	7,3	0,810
	T	1 / 100		1,057
nifedipine	C	-	7,6	0,200
	T	1 / 10		0,310
proprilnitrato	C	-	7,3	1,170
	T	1 / 41		1,035

4.1.6 Hb x Papaverina: Estudo da Concentração, pH, e Íons Fosfato sobre o Efeito da Droga na Afinidade Hb/Oxigênio

A papaverina diminui a afinidade de soluções de hemoglobina pelo oxigênio (Tabelas 5 e 7), e essa diminuição é concentração dependente sendo que o efeito é detectável em relações Hb/PAV 10:1 (Tabela 8).

Ensaíamos ainda o efeito do ATP sobre a Hb (já descrito na Tabela 3) contrastando-o com o da papaverina, variando a concentração da droga e do polifosfato: Tabelas 9 e 10 respectivamente. O ATP, que também provoca um aumento de P_{50} , assim como outros fosfatos orgânicos (ARNONE & PERUTZ 1974; SZABO & KARPLUS, 1976) mostrou efeito somatório ao da PAV sobre a hemoglobina, sendo que o efeito de ambos continua concentração dependente.

Testamos, complementarmente o efeito da papaverina sobre a afinidade Hb/oxigênio, em hemoglobina fetal (Hb F) colhida do cordão umbelical de recém-nascidos.

Tabela 8: Variação de $\log P_{50}$ em resposta à concentração de papaverina em ensaios fotométricos com Hb "stripped". (Tampão TRIS-Lactato 0,05 M, pH 7,00; T = 20° C).

conc. Hb 10 ⁻⁵ M	conc. PAV 10 ⁻⁶ M	relação Hb/PAV	log P ₅₀
1,04	-	-	-0,0321
1,05	0,143	75 / 1	-0,0562
1,07	0,357	3 / 1	0,1265
1,00	73,000	1 / 7	0,2922
1,19	190,000	1 / 15	0,3415

Tabela 9: Equilíbrios de oxigenação por fotometria: Hb “stripped” x papaverina (em diferentes concentrações, na presença de ATP 0,02 mM (Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,0; T = 20° C).

conc. Hb 10 ⁻⁵ M	con. PAV 10 ⁻⁵ M	relação Hb/PAV	log P ₅₀	Hb/ATP
1,23	-	-	0,1518	-
1,22	-	-	0,2499	1 / 1,5
1,21	1,65	1 / 1,3	0,4921	1 / 1,5
1,26	16,50	1 / 13,0	0,5598	1 / 1,5

Tabela 10: Equilíbrios de oxigenação Hb x papaverina por fotometria, em concentrações crescentes de ATP. Hb “stripped” (Tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,0; T = 20° C).

conc. Hb 10 ⁻⁵ M	conc. ATP 10 ⁻⁴ M	relação Hb/ATP	log P ₅₀	Hb/PAV
7,9	-	-	0,3420	-
7,2	-	-	0,4228	1 / 20
7,6	1,7	1 / 2	0,4780	1 / 20
7,2	3,3	1 / 5	0,6102	1 / 20
6,8	1,7	1 / 25	0,6791	1 / 20

O Gráfico 7 mostra o efeito da PAV sobre a Hb F; vê-se que o deslocamento da O.E.C. para a direita se mantém, independentemente do efeito do 2,3-difosfoglicerato.

A influência do pH na ação da papaverina sobre a hemoglobina foi analisada numa faixa de pH (5,0 a 9,0) onde a atividade funcional da proteína estivesse mantida. Tal análise faz-se importante quando tentamos encontrar qual a forma molecular (referente ao grau de ionização da droga e, portanto, ao seu pK) responsável pelo efeito verificado sobre a hemoglobina. O Gráfico 8 mostra o efeito da PAV sobre P_{50} em diferentes pH, mostrando uma ação maior da droga em pHs mais ácidos.

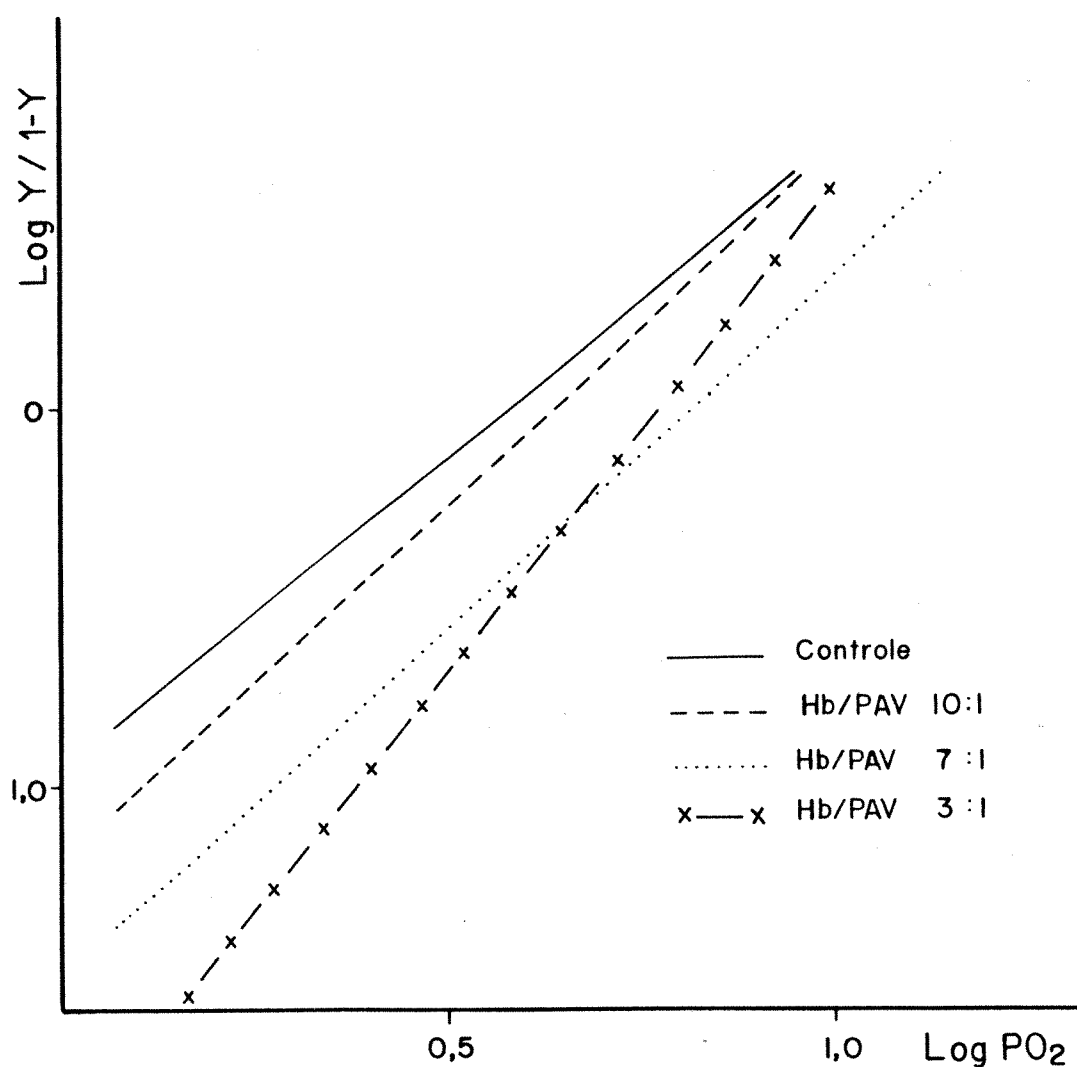


Gráfico 7: Efeito da papaverina (diferentes concentrações) sobre a afinidade Hb/oxigênio em hemoglobina fetal; ensaio fotométrico com tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,9, T = 20° C.

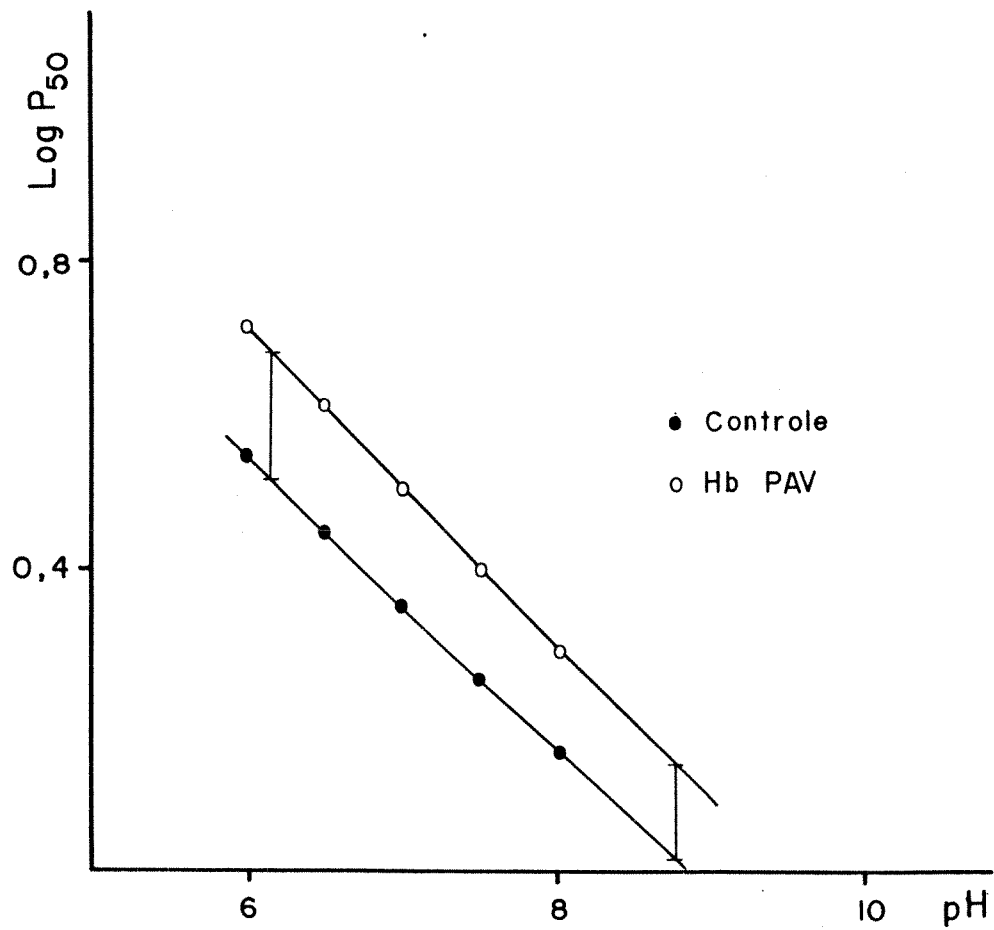


Gráfico 8: Variação do efeito da papaverina sobre P_{50} em função do pH em ensaios fotométricos com Hb "stripped" (regressão linear dos pontos obtidos entre pH 6,0 e 9,0). $[\text{Hb}] = 10 \mu\text{M}$, relação Hb/droga 1:10.

4.1.7 Hb x Dipiridamol: Efeito do pH e Concentração sobre o Efeito da Droga em P_{50}

A ação do dipiridamol sobre a afinidade Hb/oxigênio é dependente da concentração e é mais fortemente detectável que aquela da papaverina, sendo perceptível até em relações Hb/DIP de 20:1. A Tabela 11 mostra o efeito da concentração deste sobre P_{50} da hemoglobina em suspensão de hemácias.

Tabela 11: Variação de $\log P_{50}$ em resposta a concentrações crescentes de dipiridamol, em ensaios fotométricos, com hemácias lavadas (tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,6; T = 18° C).

C/T	[Hb] 10^{-5} M	[DIP] 10^{-5} M	relação Hb/DIP	$\log P_{50}$
C	5,50	-	-	0,392
T	8,30	21,0	1 / 2,5	0,505
T	4,70	10,0	1 / 4,0	0,602

4.1.8 Hb x Nifedipine: Efeito da Concentração da Droga e do pH sobre o Deslocamento da C.D. Hb

A Tabela 12 mostra o efeito concentração dependente da nifedipine em aumentar a afinidade Hb/O₂. Esses ensaios foram feitos contra controles (“branco”, contendo Hb e diluente). Vê-se, assim como observado para a papaverina, um maior efeito em pHs ácidos que em pHs mais alcalinos.

Tabela 12: Ensaios fotométricos Hb / nifedipine em diferentes pHs e concentrações da droga. (Tampão TRIS-HCl 0,05 M, T = 20° C [Hb] = 0,0135 mM).

B = Branco (Hb “stripped + diluente PEG 400).

T = Tratado (Hb “stripped + nifedipine em PEG 400).

Amostra	pH	relação Hb/NIF	log P ₅₀	P ₅₀ (mmHg)
B	6,80	-	0,315	2,06
T	6,80	1 / 23,0	0,010	1,02
B	7,45	-	-0,040	0,91
T	7,45	1 / 25,0	-0,030	0,93
B	7,45	-	0,060	1,15
T	7,45	1 / 10,5	0,045	1,11
B	8,00	-	-0,205	0,62
T	8,00	1 / 10,0	-0,170	0,68
T	8,00	1 / 23,0	-0,160	0,69

4.2 Biotonometria

4.2.1 Determinação da Velocidade de Consumo de Oxigênio pela Levedura na Presença dos Vasodilatadores

Conforme detalhado no ítem 3.3.3.1, a velocidade de consumo de oxigênio pela levedura nos ensaios biotonométricos é uma medida que sofre alterações na presença de hemoglobina. A hemoglobina altera a V.C. O₂ da levedura porque, no ensaio, é ela quem controla a liberação de oxigênio na suspensão, oxigênio esse que será consumido pela levedura. A diminuição da velocidade de consumo dá o aspecto sigmóide da curva de dissociação da hemoglobina, mostrado no Gráfico 3, parte II.

A velocidade média de um "pool" de leveduras, determinada em 24 ensaios pareados, caiu de 103,2 para 51,8 natg/min, quando na presença de hemoglobina.

Na Tabela 13 visualiza-se o efeito dos 7 vasodilatadores estudados sobre a Velocidade de Consumo de O₂ pela levedura. Pela mesma vê-se que o lactato de prenilamine diminui sensivelmente a V.C. O₂, quando em concentração igual ou superior a 0,01 mM, ou seja, numa faixa de concentração aquém da necessária à verificação de sua atividade sobre a hemoglobina. O efeito da prenilamine sobre a LEV é bastante pronunciado, dificultando a obtenção de traçados precisos para a determinação de P₅₀.

O Gráfico 9 demonstra a variação da V.C. O₂ da levedura, quando exposta a diferentes concentrações de prenilamine.

4.2.2 Determinação de P₅₀ por Biotonometria e Estudo da Ação dos Vasodilatadores sobre a Afinidade Hb/Oxigênio

Na padronização dessa metodologia, que nos permitiria o estudo do efeito droga/Hb com a proteína intra-eritrocitária (e, portanto, em condições mais próximas à fisiológica, pois até então só podíamos realizar dosagens da afinidade Hb/O₂ de soluções purificadas de hemoglobina) nos defrontamos com alguns problemas técnicos, como o da determinação precisa do ponto "D" nos traçados. Como o traçado do consumo de oxigênio na presença da hemoglobina aproxima-se lentamente de zero, traçando-se uma paralela do eixo X (ver traçado experimental do Gráfico 4) é difícil determinar, com precisão, onde o traçado toca o eixo das abcissas.

Inicialmente propusemo-nos a ajustar a curva do traçado biotonométrico (com Hb), pela equação de VERHURST (1838) para o crescimento de bactérias, mas concluímos que este modelo não é ajustável, pois não admite um valor finito para a população e, aplicado aos nossos traçados jamais encontraríamos o valor de $Y = 0$, que de fato existe, pois no caso da biotonometria há um momento final onde não existe mais oxigênio na câmara de ensaio.

Tabela 13: Diminuição da Velocidade de Consumo de Oxigênio (V') pela levedura, por ação dos vasodilatadores, em ensaios biotomométricos; $T = 25^\circ \text{ C}$, Tampão TRIS-HCl 0,15 M + dextrose 150 mg%, pH = 7,4; [LEV] = 150 mg.

Droga	Concentração (mM)	V' LEV (natg/min)	V' LEV + droga (natg/min)
PAV	0,0343	109,078	109,078
	0,1710	103,237	88,065
	0,7140	107,118	81,823
DIP	0,1150	113,772	113,772
ISL	0,4370	95,045	109,053
NIF	0,2080	104,839	106,873
PREN	0,0006	92,158	84,632
	0,0012	100,066	97,436
	0,1500	97,697	8,890
STR	0,0315	129,694	124,286
PTT	0,2500	108,033	115,798
PEG	10 μl	98,563	98,563
	100 μl	110,697	102,264

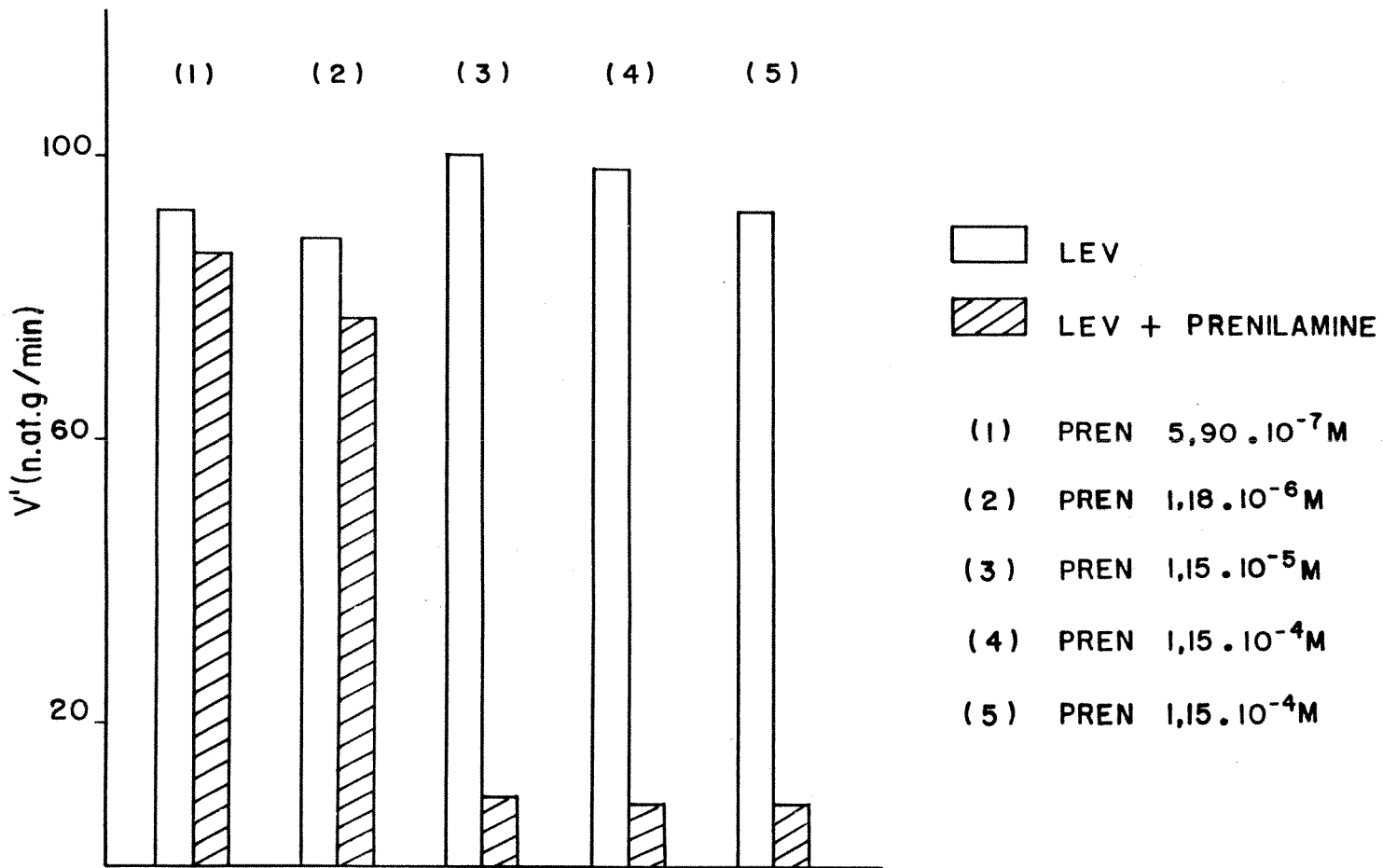


Gráfico 9: Variação da Velocidade de Consumo de Oxigênio pela levedura, causada por concentrações crescentes de prenilamine. Há inibição da respiração em concentrações de droga maiores que $10 \mu M$. Tampão TRIS-HCl $0,15 M$ + dextrose $150 mg\%$, pH $7,4$; $T = 25^\circ C$; $[LEV] = 150 mg$.

Procuramos ainda correlacionar o traçado da levedura com aquele da levedura mais hemoglobina e, na ausência de um ajuste de curvas, tentamos correlacioná-las em escala logarítmica, linearizando-as para obter, mais facilmente, a equação das retas. Essa análise mostrou haver uma certa correlação entre as duas curvas (levedura, levedura + hemoglobina), porém não levou à solução do problema experimental.

FORD-WALFORD (*apud* VAZZOLER, 1976) descreveram um tratamento matemático para determinação do valor máximo de crescimento de populações (curva de crescimento bacteriano) partindo de pontos coordenados na fase de crescimento positivo. Como em nossos experimentos, era difícil determinar com precisão o tempo final, isto é, quando a população atingia seu valor máximo. Pelo método proposto não é necessário conhecer a equação da curva de crescimento.

O traçado da Curva de Dissociação da Hb, por análise biotométrica, pode ser comparado com a curva de crescimento de população e veremos que se assemelham, tendo porém a primeira um caráter decrescente (crescimento negativo) e a segunda, positivo. Aplicamos o método de FORD-WALFORD na tentativa de determinação do ponto "D".

Na fase não linear do traçado (o da C.D. Hb) determinamos pontos coordenados (X/Y) e, em seguida, pontos Y/W (Y contra "defasado" de Y), tomando o cuidado de inverter a reta, subtraindo de 10 os valores de Y e W, obtendo assim Y' e W' (Tabela 14).

Graficando W' contra Y', por regressão linear encontramos a melhor reta entre os pontos. O valor máximo de Y é encontrado quando a reta da regressão linear cruza a reta de 45° (Gráfico 10); voltando ao traçado experimental, por Y máximo chegamos a X final (ponto "D"). No caso dos valores da Tabela 14, Y = 0,08 cm e X ("D") = 8,0 cm.

Tabela 14: Biotometria - Método de FORD-WALFORD (defasado) para determinação do ponto "D" (onde PO₂ é zero). Ver também Gráfico 10 e texto.

X	Y	W	Y'	W'
4,50	1,50	1,45	8,50	8,55
4,65	1,45	1,15	8,55	8,85
4,80	1,15	0,80	8,85	9,20
5,10	0,80	0,40	9,20	9,60
5,55	0,40	0,30	9,60	9,70
6,10	0,30	0,20	9,70	9,80
6,65	0,20	0,12	9,80	9,88
7,30	0,12	0,05	9,88	9,95
7,90	0,05	-	9,95	-

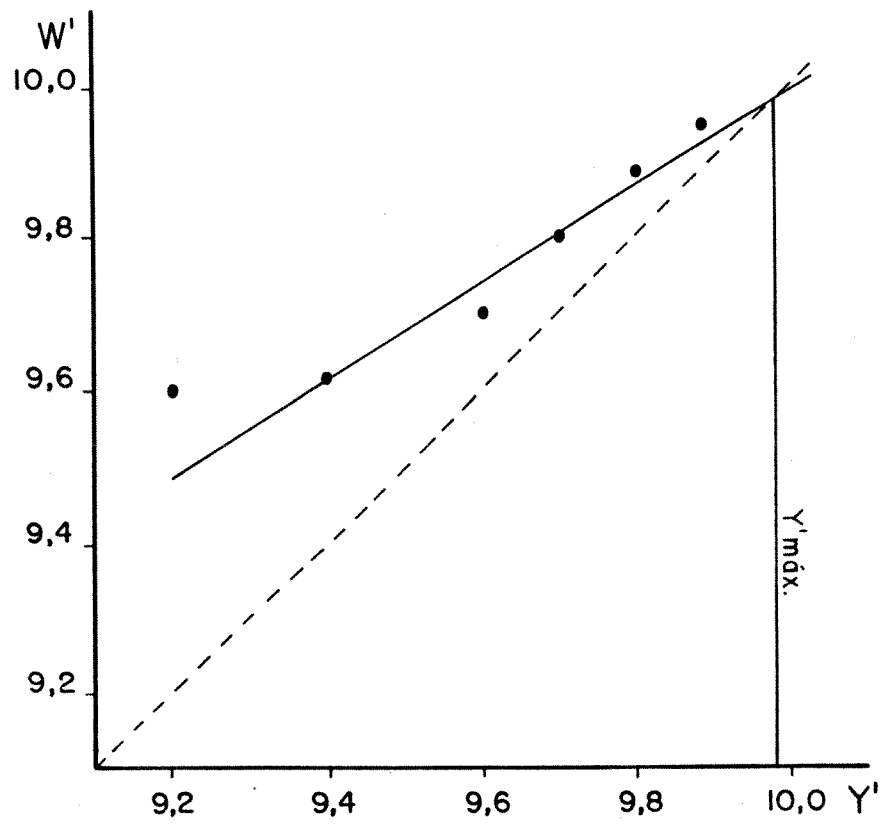


Gráfico 10: Método de FORD-WALFORD — W' em função de Y' — na fase final do traçado de Velocidade de Consumo de Oxigênio pela levedura na presença de Hb (pontos 5 a 9 da Tabela 14).

A Tabela 15 mostra o efeito dos 7 vasodilatadores sobre P_{50} da Hb humana, em determinações biotonométricas, segundo o método descrito por NEVILLE (1974). Estes ensaios parecem mostrar o efeito do dipiridamol em aumentar P_{50} e da nifedipine e prenilamine em diminuir esse valor, as demais drogas não mostraram efeito aparente.

Tabela 15: Valores de $\log P_{50}$ obtidos por ensaios biotonométricos com os sete vasodilatadores em estudo e seus diluentes: PEG 400 (polietilenoglicol P.M. 400.000) e A/A (água / álcool 3:2). Ver também V' (Velocidade de Consumo de O_2 pela levedura). [Hb] da suspensão de hemácias = 0,02 mM, [LEV] = 150 mg; tampão TRIS-HCl 0,15 M com dextrose 150 mg%, pH 7,4, T = 25° C.

droga	C/T	relação molar Hb / droga	$\log P_{50}$	V' (natg/min)
papaverina	C	-	- 0,242	54,857
	T	1 / 1,4	- 0,244	47,407
dipiridamol	C	-	- 0,242	54,857
	T	1 / 0,5	- 0,165	53,833
dinitrato de isosorbitol	C	-	0,208	39,184
	T	1 / 2,0	0,208	54,084
prenilamine	C	-	0,611	49,920
	T	1 / 0,1	0,493	49,030
nifedipine	C	-	0,271	40,778
	T	1 / 1,0	0,008	43,301
propatilnitrato	C	-	- 0,127	43,802
	T	1 / 0,1	- 0,130	49,656
tetranitrato de pentaeritritol	C	-	- 0,107	53,333
	T	1 / 4,4	- 0,109	60,952
-	C	-	- 0,107	53,333
PEG 400	T	-	- 0,066	56,471
A/A 3:2	T	-	- 0,066	60,313

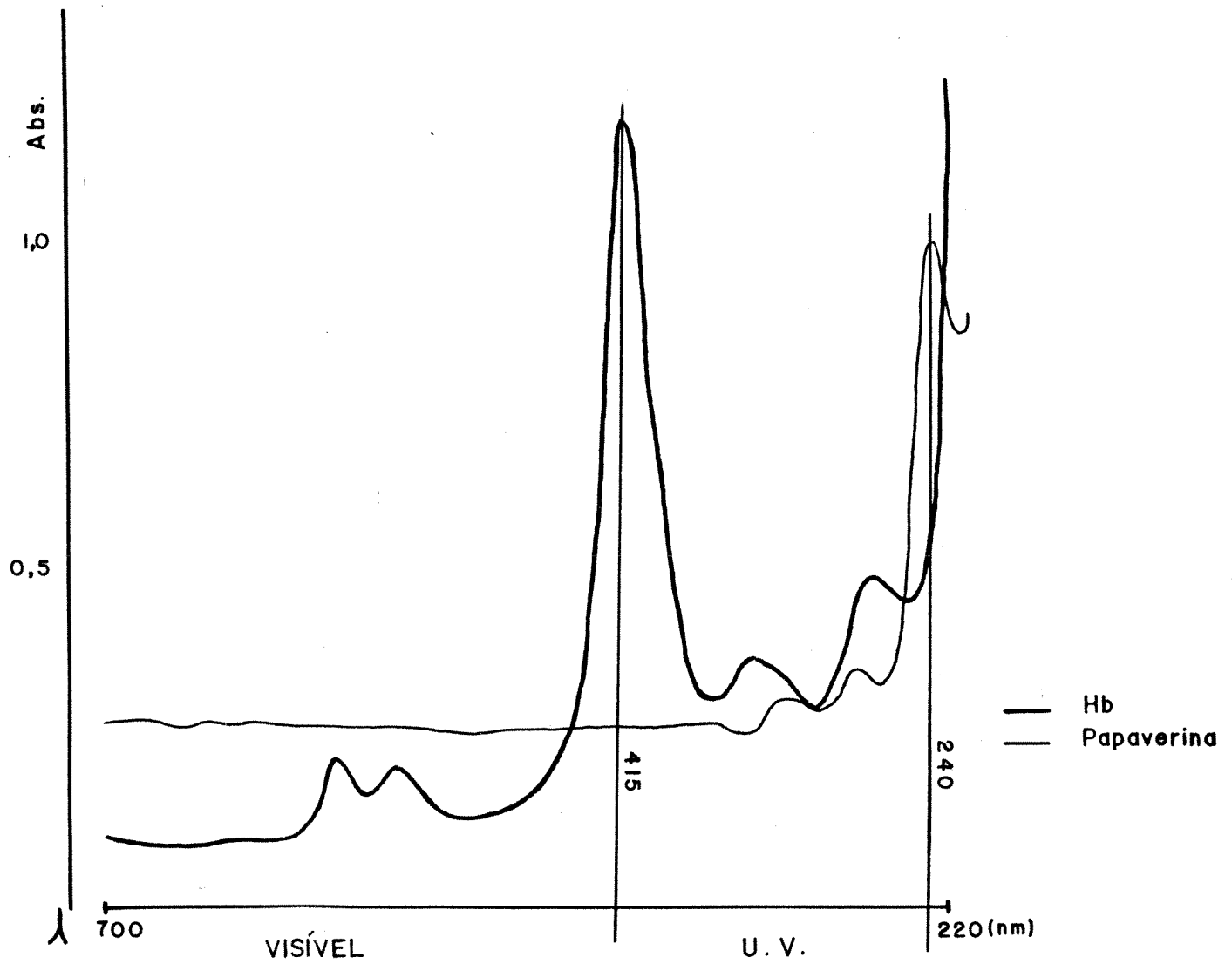


Gráfico 11: Espectro de varredura da papaverina e da hemoglobina na faixa do visível e ultra-violeta. Notar picos de absorção máximos em 240 nm (PAV) e 415 nm (Hb). Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M, pH 7,2.

4.3 Equilíbrios de Diálise

Nem todos os 7 vasodilatadores puderam ser estudados pela técnica de Equilíbrios de diálise por não apresentarem as características ópticas necessárias; mesmo assim, pudemos ensaiar o equilíbrio da papaverina, dipiridamol e da prenilamine.

4.3.1 Equilíbrios de Diálise com a Papaverina

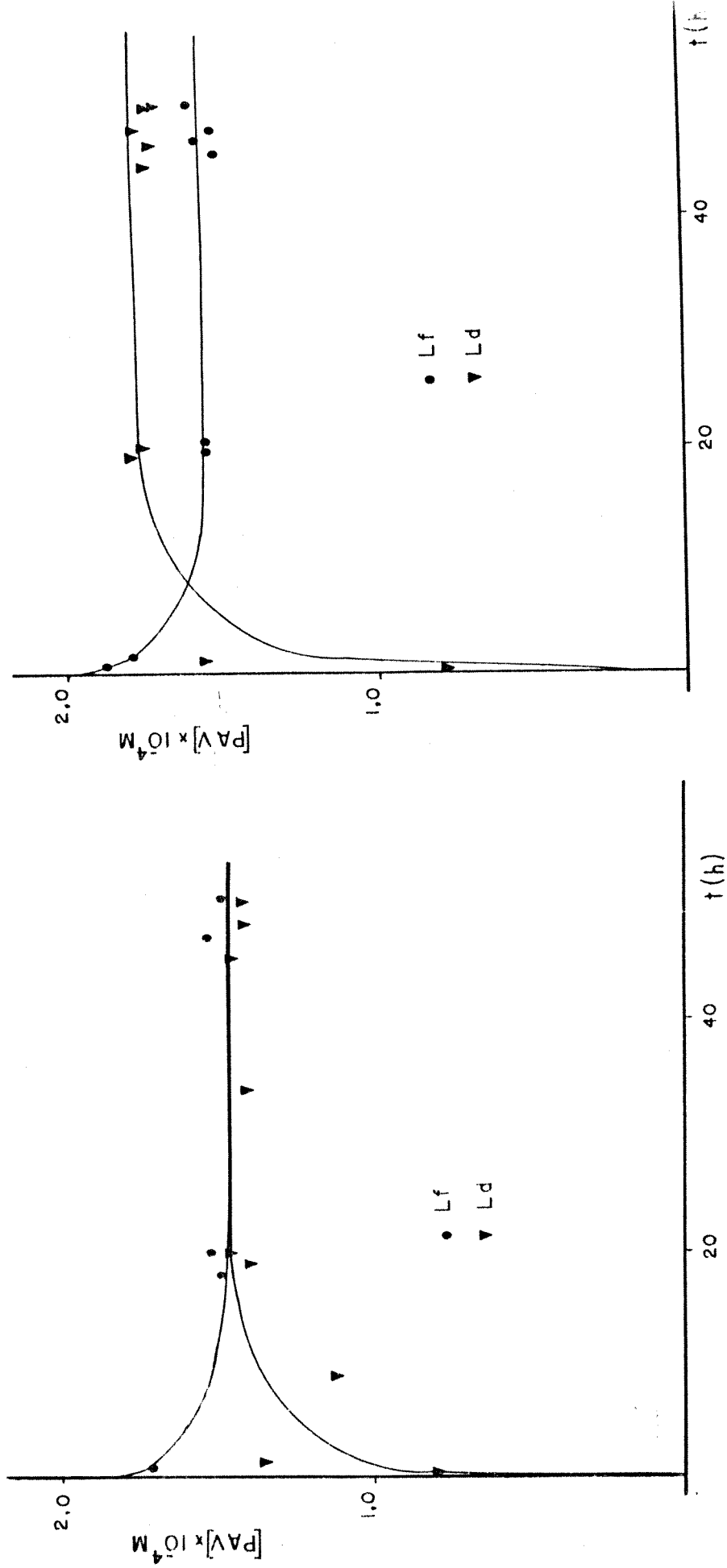
A papaverina tem características espectrais condizentes aos ensaios de diálise, pois apresenta um pico nítido de absorção em 240 nm que é bastante distinto do da hemoglobina, conforme mostra o Gráfico 11: espectro de varredura da PAV e Hb de 700 a 200 nm.

Dialisada simplesmente contra tampão a PAV (Gráfico 12, I) apresenta um equilíbrio simples em aproximadamente 20 horas. O mesmo tempo é necessário para o equilíbrio com a hemoglobina, mostrado no Gráfico 12, parte II.

Na Tabela 16 mostramos a variação de v (razão molar ligante/Hb) em função do pH, onde encontramos maior ligação para pHs mais ácidos e próximos do pK da papaverina (6,4).

Tabela 16: Equilíbrio de diálise da hemoglobina com a papaverina em diferentes valores de pH. Notar que há maior número de moléculas de PAV ligadas por heme de Hb (v) em valores de pH mais baixos; tampão fosfato de sódio 0,2 M, T= 4° C.

pH	6,5	7,0	7,5
conc. hemoglobina	0,0034 mM	0,0023 mM	0,0015 mM
conc. papaverina	0,0480 mM	0,0340 mM	0,0240 mM
relação Hb / PAV	1 / 15	1 / 15	1 / 15
tempo de equilíbrio	30 hs	30 hs	30 hs
v	2,46	1,89	1,67



(I) (II)
Gráfico 12: Equilíbrios de Diálise da papaverina contra tampão (I) e na presença de hemoglobina (II). Notar em (II) que no equilíbrio a concentração de PAV dentro da membrana de diálise é maior que a externa, indicando interação da droga com a hemoglobina. Tampão Fosfato de Sódio 0.2 M, pH 7.2; $T = 4^\circ C$, tempo para equilíbrio ≈ 20 hs.

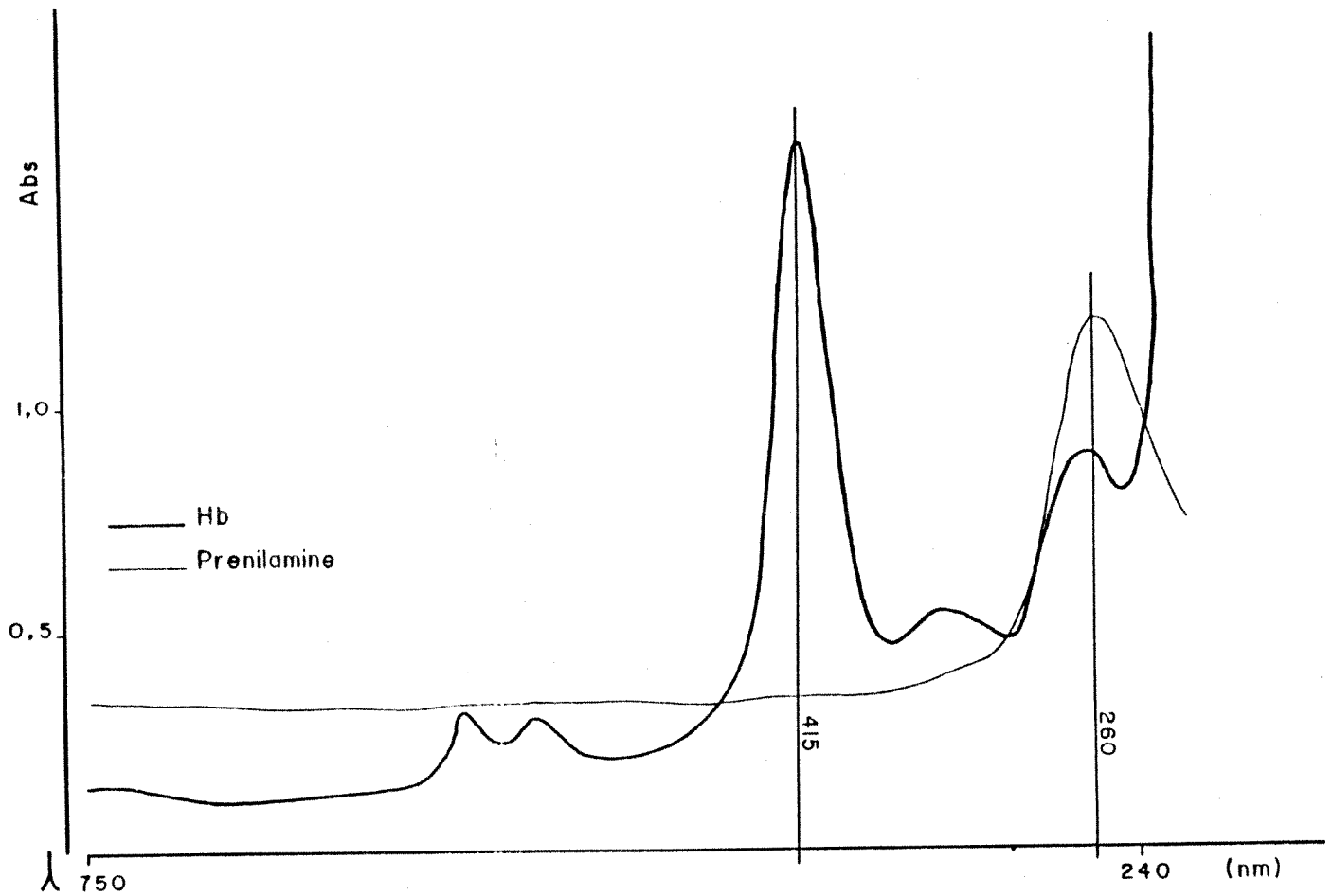


Gráfico 13: Espectro de varredura da prenilamine e hemoglobina na faixa do visível e ultravioleta. Notar os picos de absorção (260 e 415 nm, respectivamente) distintos que permitem a mensuração da concentração da droga nos Equilíbrios de Diálise. Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M, pH 7,2.

4.3.2 Diálise Hemoglobina x Prenilamine

Também o lactato de prenilamine apresenta um pico de absorção nítido em 260 nm (Gráfico 13), bem distinto dos da hemoglobina, que lhe permite ser usado nos ensaios de diálise, onde concentrações mínimas da droga são detectadas fotométricamente.

No ensaio contra tampão, um equilíbrio simples de massa acontece em cerca de 30 horas; e na presença da hemoglobina um equilíbrio idêntico parece ocorrer (Gráfico 14, I e II), mostrando que a hemoglobina em nada interfere no equilíbrio de massas da PREN dentro e fora da membrana de diálise. Isso significa que não há qualquer tipo de interação molecular detectável entre a hemoglobina e a prenilamine.

4.3.3 Diálise Hemoglobina x Dipiridamol

Ao contrário da papaverina e da prenilamine, o dipiridamol não apresenta um pico de absorção bastante distinto do da hemoglobina (Gráfico 15) em pH próximo a 7,0, embora mesmo assim tenha uma característica espectral que lhe permita ter sua concentração mensurada por fotometria.

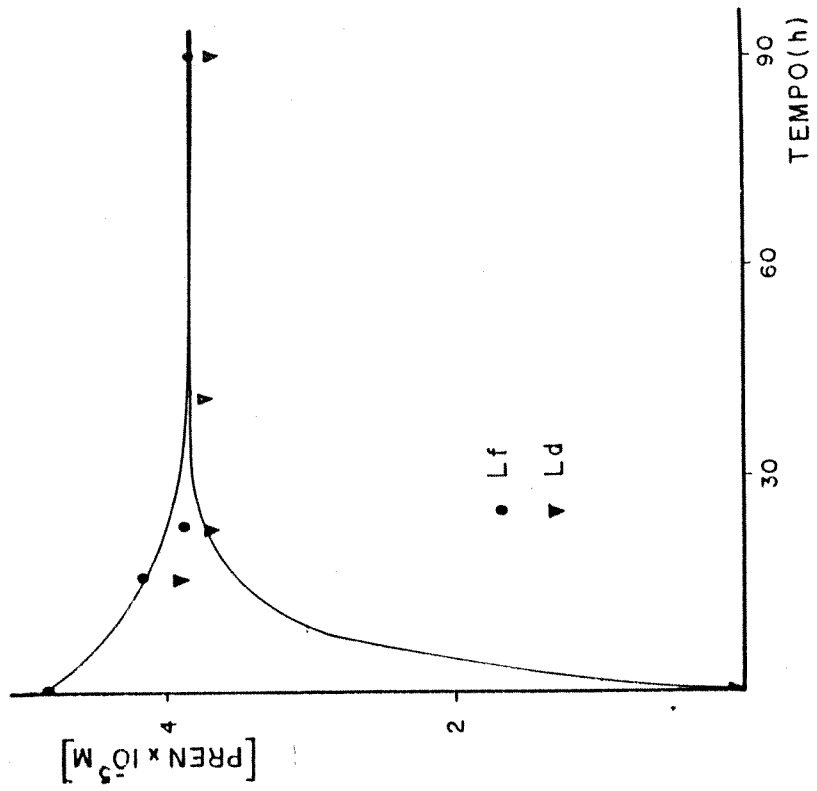
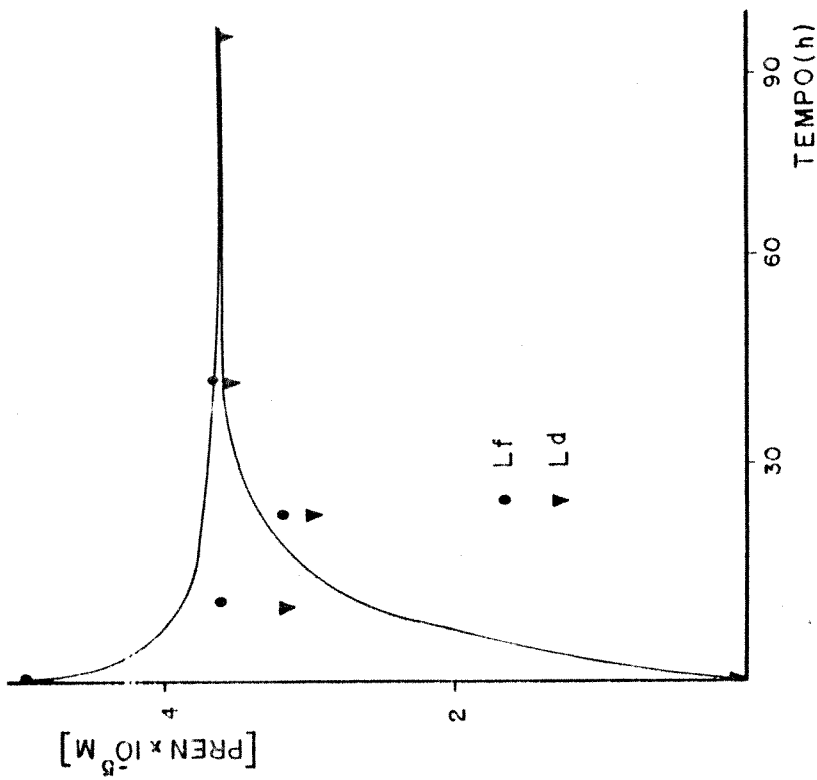
Devido ao risco de os picos de absorção da Hb e do dipiridamol estarem sendo coincidentes, para a determinação da concentração de DIP, as alíquotas do ensaio de diálise eram levadas a aquecimento (10 min a 97° C), para desnaturação da Hb, que, precipitando, era totalmente separada com um rápida centrifugação (1.000 G; 2,5 min), deixando no sobrenadante o dipiridamol livre cuja concentração podia, então, ser dosado fotométricamente, sem interferência da heme proteína.

Realizamos ensaios entre valores de pH de 5,0 a 9,0. O valor médio de v , para pH 7,2, concentração de Hb = 0,009 mM e relação Hb/DIP = 1/10 foi de 6,15, mostrando haver ligação entre Hb e DIP nas condições observadas. Quanto ao comportamento dessa ligação em função do pH, os valores de v parecem aumentar (2,1 em pH 5,0 para 8,6 em pH 9,0) com mais altos valores de pH; no entanto, a dispersão dos dados calculados é ainda bastante grande e compromete a análise do efeito da droga sobre a hemoglobina, em função da concentração hidrogeniônica.

4.4 Oximetria

4.4.1 Padronização do Método CO-Oximétrico

Testamos aqui nossos resultados quanto a alguns dos parâmetros dosados pelo CO-oxímetro "IL 182" --- Meta-Hb, CO-Hb --- e mostramos os valores encontrados para indivíduos adultos em um número de ensaios estatisticamente significativo. O Gráfico 16 esboça a distribuição dessa amostra de população (entre 21 e 56 anos de idade, fumantes e não fumantes, homens e mulheres), com idade média de 36 anos.



(I) (II)
Gráfico 14: Equilíbrio de Diálise hemoglobina x prenilamine. Em (I) — PREN x Tampão;
 em (II) — Hb x PREN. Não há ligação detectável entre proteína e droga. Tampão Fosfato de
 Sódio 0,2 M, pH 7,2, T = 4° C, tempo para equilíbrio = 30 hs.

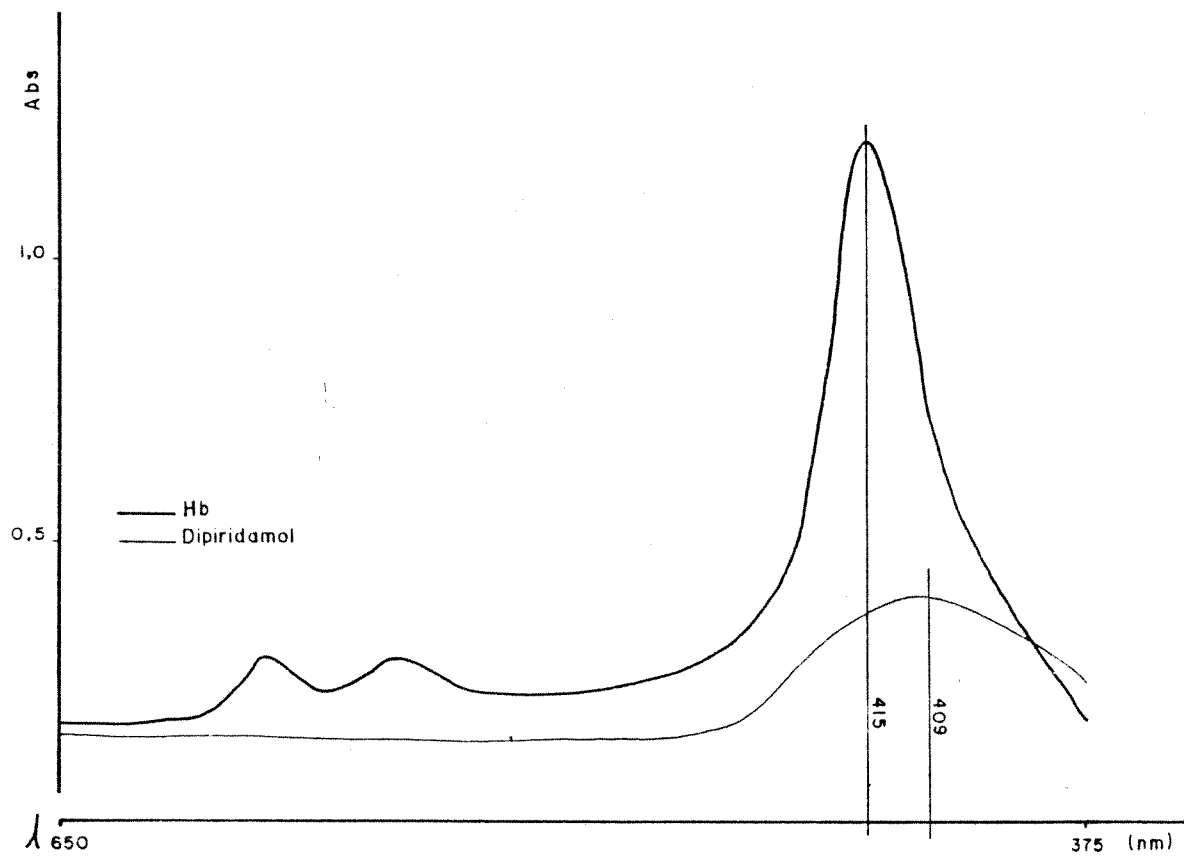


Gráfico 15: Espectro de varredura do dipiridamol e da hemoglobina na faixa do visível. Os picos muito próximos (409 e 415 nm, respectivamente) dificultam a determinação fotométrica da concentração de ambos os compostos nos ensaios de Equilíbrios de Diálise. Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M, pH 7,2.

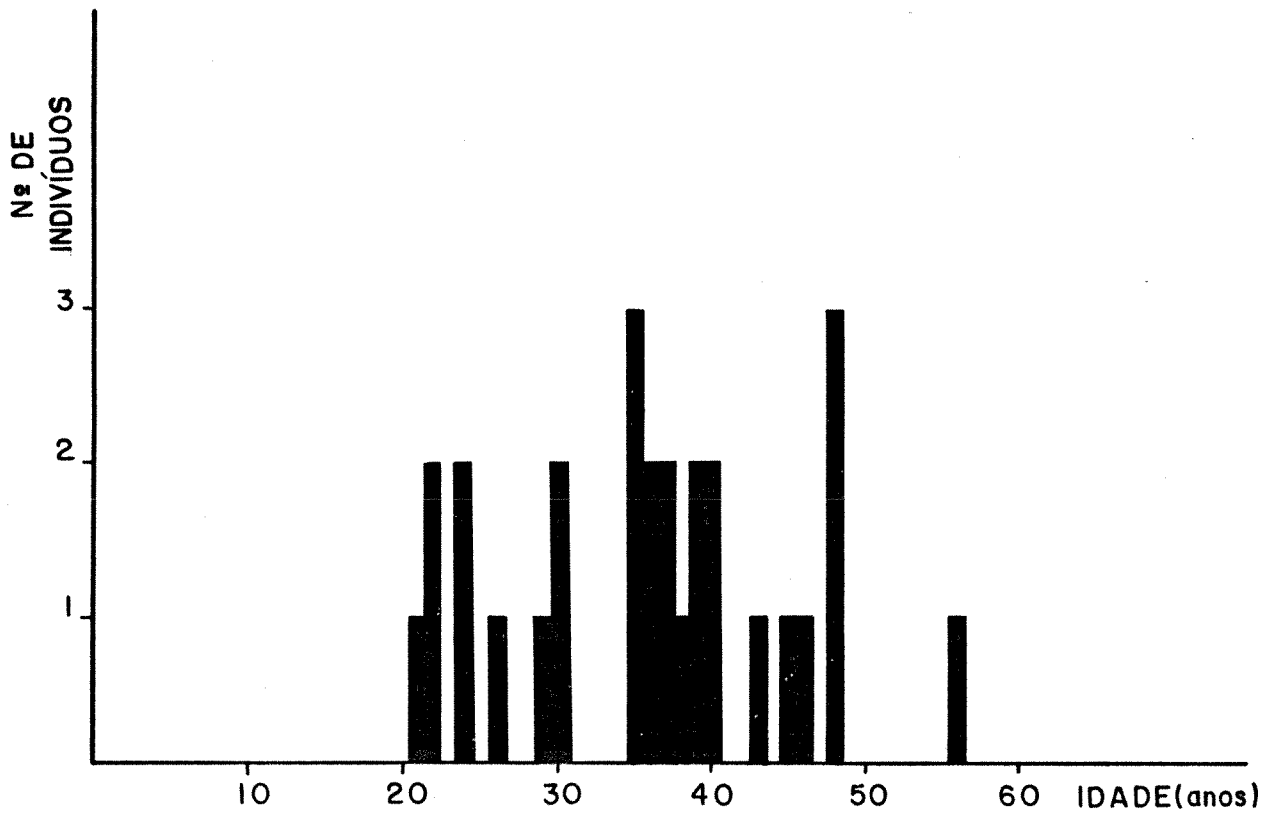


Gráfico 16: Distribuição etária dos indivíduos cuja amostra sanguínea foi analisada nos ensaios de CO-oximetria.

Uma das primeiras dosagens que fizemos foi a da porcentagem de Carboxi-hemoglobina, forma fisiologicamente inativa da Hb, e que é decorrente da aspiração de monóxido de carbono devido ao tabagismo e/ou a resíduos da combustão incompleta de veículos automotivos. Os valores médios de Carboxi-Hb encontrados por esse método foram de 0,4% em não fumantes e 4,2% em indivíduos fumantes, como mostra a Tabela 17.

Tabela 17:

Valores médios de Carboxi-hemoglobina em indivíduos fumantes e não-fumantes. Ensaio CO-oximétricos com 36 indivíduos e 374 dosagens. $T = 37^{\circ} C$, $[Hb] = 14 \text{ mg}\%$.

Caso n ^o	não-fumantes		Caso n ^o	fumantes	
	n ^o de dosagens por caso	% CO-Hb (média)		n ^o de dosagens por caso	% CO-Hb (média)
1	11	0,2	24	04	4,8
2	06	0,0	25	24	3,4
3	04	0,4	26	12	3,8
4	09	0,3	27	08	2,4
5	19	0,5	28	08	4,3
6	08	0,5	29	09	6,0
7	08	0,4	30	16	3,3
8	24	0,7	31	20	3,0
9	11	0,2	32	19	5,0
10	08	0,5	33	04	5,4
11	16	0,2	34	08	4,1
12	04	0,6	35	19	4,5
13	09	0,4	36	10	4,5
14	12	0,0			
15	15	0,6			
16	08	0,4			
17	04	0,4			
18	05	0,4			
19	02	0,7			
20	08	0,7			
21	08	0,3			
22	08	0,5			
23	06	0,6			
n ^o de dosagens	213			161	
\bar{X}		0,4			4,2
D.P.		0,2			1,0

Já os valores de Meta-Hb sofrem influência dos vasodilatadores utilizados, ficando sua observação relacionada aos ensaios com as drogas; assim, a Tabela 18 traz os valores de ferri-Hb em sangue exposto aos vasodilatadores de estudo. Em nenhum caso a porcentagem de meta-Hb excede 7,0%, acima do que há comprometimento dos valores calculados fotometricamente pelo aparelho.

Não há diferença significativa entre a %Meta-Hb entre fumantes e não fumantes (Tabela 18).

Os parâmetros %HbO₂ e Volume de oxigênio% obviamente não podem ser avaliados, devido a sua dependência da pressão de O₂ da amostra sanguínea, temperatura, etc... fatores esses propositalmente modificados na tonometria prévia das amostras para a dosagem de P50. Análises dos valores de P50 encontrados são, contudo, bastante conclusivas sobre a sensibilidade do CO-oxímetro à porcentagem de Oxi-Hb.

Tabela 18: Porcentagem de Meta-Hb em ensaios oximétricos, 5 min. de incubação; (Hb) = 1,875 mM, em fumantes e não fumantes. Tonometria prévia a 37° C, 10 min, sob fluxo de gás a 5 psi e 300 ml/min, com agitação intermitente.

Droga	Concentração (mM)	Nao Fumantes		Fumantes	
		N	% Meta-Hb	N	% Meta-Hb
—	—	22	0,2 ± 0,2	23	0,3 ± 0,2
prenilamine	2,73	16	0,8 ± 0,3	6	0,7 ± 0,3
isordil	2,73	14	0,4 ± 0,3	4	0,4 ± 0,2
peritrate	2,73	17	0,3 ± 0,3	6	0,7 ± 0,1
nifedipine	2,73	26	0,6 ± 0,2	5	0,4 ± 0,1
sustrate	2,86	14	0,5 ± 0,5	13	0,5 ± 0,5
papaverina	0,72	12	3,0 ± 1,9	15	2,6 ± 1,5
dipiridamol	1,43	13	1,1 ± 0,5	8	1,8 ± 0,8
PEG 400	0,1 ml	30	0,2 ± 0,1	30	0,2 ± 0,2

A Tabela 19 mostra os valores de P_{50} e n do sangue de 20 adultos não fumantes; o valor médio encontrado, isto é, $26,1871 + 1,0517$ mmHg.

Tabela 19: Valores de P_{50} e n em 20 ensaios CO-oximétricos com sangue de indivíduos adultos, não-fumantes, entre 20 e 50 anos, $[Hb] = 2\text{mM}$, $T = 37^\circ \text{C}$.

Caso n ^o	Coef. Hill (n)	log P_{50}	P_{50} (mmHg)
01	2,750	1,422	26,424
02	3,370	1,440	27,542
03	3,170	1,431	26,977
04	2,495	1,405	25,410
05	3,518	1,424	26,546
06	2,940	1,449	28,119
07	2,831	1,438	27,416
08	4,057	1,410	25,704
09	2,641	1,417	26,122
10	2,667	1,438	27,416
11	2,352	1,380	23,988
12	3,518	1,424	26,546
13	2,712	1,413	25,882
14	2,509	1,419	26,242
15	2,795	1,426	26,669
16	2,534	1,404	25,351
17	2,497	1,383	24,155
18	2,803	1,414	25,942
19	2,147	1,410	25,704
20	2,630	1,408	25,586
\bar{X}	2,847	1,418	26,187
D.P.	0,453	0,017	1,025

Na Tabela 20 vemos os valores de P_{50} e n em 20 indivíduos fumantes, ligeiramente menores que os valores de P_{50} de não fumantes: (P_{50} médio de fumantes = $25,7855 \pm 1,6069$ mmHg).

Pela qualidade dos resultados obtidos, concluímos pela aplicabilidade e eficácia do método CO-Oximétrico.

Tabela 20: Valores de P_{50} e n em 20 ensaios CO-oximétricos com sangue de indivíduos adultos, fumantes. $T = 37^\circ \text{C}$, $[\text{Hb}] = 2\text{mM}$.

Caso n°	Coef. Hill (n)	$\log P_{50}$	P_{50} (mmHg)
01	3,060	1,414	25,942
02	3,360	1,387	24,378
03	2,780	1,422	26,424
04	3,010	1,419	26,242
05	2,286	1,388	24,434
06	2,502	1,391	24,604
07	2,443	1,401	25,177
08	1,901	1,440	27,542
09	2,200	1,425	26,607
10	2,329	1,437	27,353
11	2,810	1,414	25,942
12	2,661	1,419	26,242
13	2,686	1,389	24,491
14	2,250	1,444	27,797
15	2,495	1,405	25,410
16	2,803	1,414	25,942
17	2,228	1,338	21,777
18	1,980	1,436	27,290
19	2,335	1,373	23,605
20	2,440	1,455	28,510
\bar{X}	2,528	1,410	25,786
D.P.	0,360	0,027	1,607

4.4.2 Verificação do Efeito dos Vasodilatadores sobre P_{50} por Ensaio CO-Oximétricos

A Tabela 21 mostra os valores de Y(% saturação da Hb) contra pO_2 , obtidos de 20 ensaios (10 controle/10 Tratados) pareados, verificando o efeito do polietilenoglicol - o diluente de 6 das 7 drogas estudadas — sobre a afinidade Hb/oxigênio.

Para cada ensaio há dois pontos coordenados Y/ pO_2 , correspondentes às duas misturas gasosas que utilizamos (ver ítem 3.3.2.1), e cuja % O_2 possibilita valores de Y% entre 40-60% em indivíduos normais. Pelos dois pontos coordenados, chegamos, no "Plot de Hill", ao valor de P_{50} e n das 10 análises pareadas (Controle/Tratado), exemplificada na Tabela 22.

A análise estatística dos valores de P_{50} assim obtidos (Teste de Student para dados pareados, 9 G.L., "t" de tabela = 1,812) revela o efeito ou não da droga empregada sobre a afinidade Hb/ O_2 . Nesse caso, tratando os dados da Tabela 22, chegamos a um valor de "t" menor que o crítico, ou seja, 1,2404 e assim, concluímos não haver efeito significativo ($P > 95\%$) do diluente polietilenoglicol sobre a afinidade Hb/ O_2 .

Comumente aceitamos a faixa de 5% ($P > 95\%$) de significância para os ensaios biológicos.

As Tabelas 23 a 29 exibem os valores de P_{50} e n obtidos por CO-oximetria com os 7 vasodilatadores em estudo.

Tabela 21: CO-oximetria — pontos coordenados de Y (porcentagem de saturação dos sítios ligantes da Hb para o oxigênio) e PO₂, obtidos com a hemoglobina na presença de polietilenoglicol, PM 400.000 (PEG 400). T = 37° C, [Hb] = 2 mM, t. incubação = 5 min.

Mistura Gasosa I: 3 % de oxigênio

Mistura Gasosa II: 4 % de oxigênio

ensaio n ^o	controle /tratado	mistura gasosa	Y (%)	pO ₂ (mmHg)	log $\frac{Y}{1-Y}$	log pO ₂
1	C	I	35,4	21,50	- 0,261	1,332
		II	51,2	26,70	0,021	1,427
2	C	I	38,7	19,97	- 0,200	1,300
		II	54,9	26,62	0,085	1,425
3	C	I	44,0	25,00	- 0,105	1,398
		II	61,7	34,40	0,207	1,537
4	C	I	26,8	19,97	- 0,436	1,300
		II	46,0	26,62	- 0,070	1,425
5	C	I	30,2	20,03	- 0,364	1,302
		II	48,2	26,70	- 0,031	1,427
6	C	I	26,7	20,03	- 0,439	1,302
		II	53,9	26,71	0,068	1,427
7	C	I	33,2	20,03	- 0,304	1,302
		II	51,5	26,71	0,026	1,427
8	C	I	36,4	20,03	- 0,242	1,302
		II	53,6	26,71	0,063	1,427
9	C	I	35,2	19,97	- 0,265	1,300
		II	48,4	26,63	- 0,028	1,425
10	C	I	36,6	19,97	- 0,239	1,300
		II	55,6	26,63	0,098	1,425
11	T	I	35,4	20,00	- 0,261	1,301
		II	48,2	26,70	- 0,031	1,427
12	T	I	40,7	19,97	- 0,163	1,300
		II	55,3	26,62	0,092	1,425
13	T	I	37,6	23,20	- 0,220	1,365
		II	63,8	36,00	0,246	1,556
14	T	I	43,0	24,00	- 0,122	1,380
		II	54,1	27,60	0,071	1,441
15	T	I	39,4	20,03	- 0,187	1,302
		II	51,7	26,70	0,030	1,427
16	T	I	35,2	20,03	- 0,265	1,302
		II	52,8	26,71	0,049	1,427
17	T	I	36,6	20,03	- 0,239	1,302
		II	58,3	26,71	0,146	1,427
18	T	I	38,3	20,03	- 0,207	1,302
		II	53,4	26,71	0,059	1,427
19	T	I	35,4	19,97	- 0,261	1,300
		II	49,5	26,63	- 0,009	1,425
20	T	I	37,4	19,97	- 0,224	1,300
		II	53,9	26,63	0,068	1,425

Tabela 22: CO-oximetria — valores de P_{50} e n (Coeficiente de Hill) calculados a partir dos pontos coordenados $Y\% / PO_2$ da Tabela 21 (hemoglobina x PEG 400 = 100 μ l). $T = 37^\circ C$, 5 minutos de incubação; tonometria prévia com fluxo de gás = 300 ml/min (a 5psi, 10 min.), $[Hb] = 2,0$ mM.

Caso n ^o	n	Grupo Controle		n	Grupo Tratado	
		log P_{50}	P_{50} (mm Hg)		log P_{50}	P_{50} (mm Hg)
1	3,007	1,419	26,242	1,836	1,443	27,733
2	2,281	1,388	24,434	2,047	1,380	23,988
3	2,250	1,444	27,797	2,440	1,455	28,510
4	2,933	1,449	28,119	3,187	1,418	26,182
5	2,667	1,438	27,416	1,737	1,409	25,645
6	4,057	1,410	25,704	2,513	1,407	25,527
7	2,641	1,417	26,122	3,077	1,379	23,933
8	2,443	1,401	25,177	2,133	1,399	25,061
9	1,901	1,440	27,542	2,023	1,429	26,853
10	2,686	1,389	24,491	2,329	1,396	24,888
\bar{X}	2,687	1,420	26,323	2,332	1,412	25,832
D.P.	0,585	0,023	1,294	0,488	0,025	1,434

Tabela 23: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados (controle/tratado) da Hb com papaverina; $T = 37^\circ C$, 5 minutos de incubação, tonometria com fluxo de gás de 300 ml/min (a 5 psi/10 min); $[Hb] = 1,99$ mM, $[PAV] = 1,82$ mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	26,424	2,750	28,840	2,480
2	27,542	3,370	28,973	2,780
3	25,942	3,060	27,542	2,310
4	26,977	3,170	34,914	5,090
5	26,977	3,170	29,242	2,410
6	33,806	4,230	34,674	5,330
7	39,355	4,450	35,727	2,190
8	24,378	3,360	26,669	3,330
9	26,424	2,780	28,840	2,620
10	26,242	3,010	28,642	4,010
\bar{X}	27,407	3,335	30,406	3,255
D.P.	2,444	0,571	3,169	1,165

Tabela 24: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x dipiridamol; $[Hb] = 1,91$ mM, $[DIP] = 2,73$ mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	24,099	2,435	24,831	2,757
2	25,645	2,360	27,990	5,188
3	28,642	2,706	29,648	2,412
4	26,363	3,275	26,977	3,059
5	25,645	3,130	25,823	2,610
6	30,061	2,055	30,690	2,122
7	23,388	2,350	25,645	2,535
8	25,468	2,503	26,915	1,996
9	27,040	2,374	25,351	2,544
10	27,733	1,836	27,733	2,229
\bar{X}	26,408	2,502	28,160	2,745
D.P.	1,923	0,439	2,939	0,913

Tabela 25: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x nifedipine; $[Hb] = 2,07$ mM, $[NIF] = 2,73$ mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	23,878	2,193	22,439	2,725
2	22,909	2,794	22,751	2,362
3	24,378	2,357	23,823	2,624
4	24,434	2,329	23,823	2,106
5	24,378	1,977	23,388	2,227
6	23,768	2,258	23,714	2,530
7	24,434	2,309	23,878	2,289
8	24,604	2,067	23,823	2,146
9	24,774	2,682	24,322	2,540
10	24,888	2,331	23,988	2,506
\bar{X}	24,244	2,330	23,595	2,406
D.P.	0,555	0,249	0,550	0,210

Tabela 26: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x propatilnitrato; $[Hb] = 2,00$ mM, $[STR] = 2,86$ mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	25,351	1,899	25,645	1,859
2	29,174	4,183	28,774	2,798
3	29,309	1,760	25,293	3,695
4	25,645	2,848	25,645	2,911
5	28,774	1,512	26,853	2,299
6	25,003	2,319	27,040	1,631
7	25,942	3,054	26,853	2,214
8	24,378	2,916	25,293	2,215
9	25,468	1,134	24,831	2,752
10	25,704	2,147	24,888	2,396
11	25,527	2,382	26,122	2,462
\bar{X}	26,389	2,378	26,112	2,476
D.P.	1,701	0,085	1,127	0,559

Tabela 27: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x isordil; [Hb] = 2,02 mM, [ISL] = 2,73 mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	34,198	0,663	31,477	1,798
2	26,915	2,474	27,606	2,417
3	26,607	2,770	23,388	3,165
4	24,378	2,905	24,660	2,202
5	25,645	2,072	27,416	1,288
6	25,468	2,372	25,177	1,683
7	25,586	1,490	26,062	1,061
8	24,604	2,824	26,669	1,892
9	27,733	2,091	25,003	2,568
10	26,668	1,892	28,379	2,080
\bar{X}	26,780	2,155	26,584	2,015
D.P.	2,663	0,690	2,181	0,618

Tabela 28: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x peritrate; [Hb] = 1,93 mM, [PTT] = 2,73 mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	25,293	3,749	25,293	4,005
2	26,363	2,023	24,946	2,015
3	25,293	2,385	25,235	2,986
4	25,003	2,613	25,351	2,910
5	27,353	2,175	28,907	1,984
6	27,102	2,084	27,164	2,288
7	25,061	1,828	29,376	1,531
8	29,648	3,909	31,915	3,376
9	24,831	2,481	25,704	2,013
10	25,177	3,046	24,888	2,823
\bar{X}	26,112	2,629	26,878	2,593
D.P.	1,459	0,720	2,290	0,758

Tabela 29: CO-oximetria — valores de P_{50} e n em ensaios pareados, Hb x prenilamine; [Hb] = 1,84 mM, [PREN] = 2,73 mM.

Caso n ^o	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	P_{50} (mmHg)	n	P_{50} (mmHg)	n
1	27,290	2,094	28,510	2,269
2	26,424	2,875	28,774	2,381
3	28,576	2,685	31,477	2,754
4	24,378	2,545	26,546	2,518
5	25,704	2,308	26,122	2,687
6	25,823	1,996	25,645	2,493
7	23,988	2,051	25,061	1,990
8	24,831	2,833	25,293	2,237
9	30,974	2,956	31,117	2,880
10	29,854	0,703	26,424	1,717
\bar{X}	26,784	2,305	27,497	2,393
D.P.	2,238	0,667	2,231	0,357

A análise estatística individual, para cada uma das drogas e PEG 400 é dada na Tabela 30; pela mesma encontramos que: 1) a papaverina e o dipiridamol são capazes de deslocar a Curva de Dissociação da hemoglobina para a direita, diminuindo assim a afinidade Hb/O₂, em sangue total; 2) A nifedipine desloca de maneira inversa a C.D.O₂, aumentando a afinidade Hb/O₂ nessas condições e 3) As demais drogas não apresentam efeito significativo sobre P₅₀, em comparação com seus respectivos controles.

Tabela 30: Análise estatística dos valores de log P₅₀ de ensaios CO-oximétricos — Hb x vasodilatadores: Teste “t” para amostras pareadas (para cada grupo: N = 10, G.L. = 9, “t” crítico = 1,812).

droga	C/T	log P ₅₀	Média	Teste t para dados pareados		
				Desvio Padrão	Erro Padrão	t
papaverina	C	1,4490 ± 0,0631	2,8010	2,0264	0,6408	4,3710***
	T	1,4807 ± 0,0463				
dipiridamol	C	1,4206 ± 0,0331	2,1220	1,1514	0,3641	5,8282***
	T	1,4333 ± 0,0299				
propatilnitrato	C	1,4200 ± 0,0289	-0,2773	1,6272	0,4906	-0,5652
	T	1,4165 ± 0,0193				
dinitrato de isosorbitol	C	1,4259 ± 0,0418	-0,1950	2,0025	0,6332	-0,3079
	T	1,4232 ± 0,0367				
tetranitrato de pentaeritritol	C	1,4162 ± 0,0247	0,7660	1,6088	0,5088	1,5056
	T	1,4279 ± 0,0375				
prenilamine	C	1,4264 ± 0,0376	0,7130	1,7764	0,5617	1,2693
	T	1,4379 ± 0,0363				
nifedipine	C	1,3845 ± 0,0106	-0,6497	0,4049	0,1280	-5,0746***
	T	1,3727 ± 0,0108				
polietilenoglicol 400 (diluyente)	C	1,4195 ± 0,0226	-0,4730	1,2059	0,3813	-1,2404
	T	1,4115 ± 0,0252				

*** = P > 99,9 %.

O sinal negativo antes do valor de “t” indica que a média do grupo “tratado” é menor que a do grupo “controle”.

4.4.3 Efeito Oxidativo dos Vasodilatadores sobre a Hemoglobina Durante os Ensaio de CO-Oximetria

A Tabela 18 mostrou o valor médio de %Meta-Hb nos ensaios CO-oximétricos com as 7 drogas estudadas, revelando o efeito oxidativo da papaverina, do peritrate, sustrate e do dipiridamol, nas concentrações de ensaio. Pela Tabela 31, mostrada a seguir, pode-se ver ainda a variação da formação da Meta-Hb em função da concentração de droga para o dipiridamol, papaverina e sustrate.

Tabela 31: Formação de Meta-Hb com o aumento da concentração de drogas em ensaios de CO-oximetria com papaverina, dipiridamol e sustrate; tempo de incubação = 5 min; T = 37° C; [Hb] = 1,875 mM.

Droga	Concentração (mM)	% Meta-Hb
sustrate	-	0,3
	2,86	0,7
	5,45	1,2
	7,83	2,0
papaverina	-	0,4
	0,72	2,0
	1,45	4,2
dipiridamol	-	0,3
	1,43	0,9
	2,73	1,7

A Tabela 32 mostra o efeito do tempo de incubação sobre a formação de Meta-Hb nas duas drogas de maior efeito oxidativo sobre a Hb (dipiridamol e papaverina). Verifica-se que a taxa de ferri-hemoglobina eleva-se proporcionalmente ao tempo de incubação. Essa mesma tabela demonstra o aumento de P_{50} , concomitante ao maior tempo de permanência (droga/Hb) e à formação de Meta-Hb.

4.4.4 Efeito da Temperatura, Tempo de Incubação e Concentração de Droga sobre a Afinidade Hb/Oxigênio

O Gráfico 17 (I, II e III) mostra o efeito da papaverina sobre a afinidade Hb/oxigênio em um intervalo de tempo de incubação de 0 a 60 minutos, e em três valores de temperatura diferentes: 34, 37 e 39° C; podendo-se visualizar: 1) um deslocamento da O.E.C. para a direita e maior efeito da PAV em temperaturas mais elevadas, 2) maior descolamento da O.E.C., para a direita, com o aumento do tempo de incubação Hb/PAV.

Na temperatura de 34° C não é tão evidente a variação em $\log P_{50}$ entre os traçados de diferentes tempos de incubação, como em 37° e 39° C (principalmente), indicando que o aumento da temperatura exacerba o efeito da papaverina, talvez pela introdução de uma nova variável, isto é, a formação de meta-Hb (ver ítem V).

Finalmente, podemos afirmar que o efeito deslocador da Curva de Dissociação da hemoglobina, tanto pela papaverina quanto pelo dipiridamol são concentração dependentes, como mostram respectivamente o Gráfico 18 e 19. Esse efeito da concentração da droga, estudado inicialmente para detecção da concentração apropriada aos ensaios CO-oximétricos, foi avaliado para outras drogas, porém, como mostra o Gráfico 20 (Hb + substrate), não há alteração de P_{50} em resposta a maior concentração desse outro fármaco.

Tabela 32: Efeito do tempo de incubação sobre a oxidação da hemoglobina e P_{50} em ensaios CO-oximétricos com papaverina e dipiridamol; $[Hb] = 2 \text{ mM}$, $T = 37^\circ \text{ C}$.

Droga	Concentração (mM)	Tempo de Incubação (min)	% Meta-Hb	log P_{50}
	-	-	0,4	1,322
	2,25	0	1,7	1,356
	"	15	1,9	1,389
dipiridamol	"	30	2,2	1,383
	"	45	2,5	1,395
	"	60	2,9	1,411
	-	-	0,2	1,380
	1,14	0	4,4	1,475
	"	15	7,0	1,472
papaverina	"	30	6,8	1,492
	"	45	5,8	1,478
	"	60	5,8	1,501

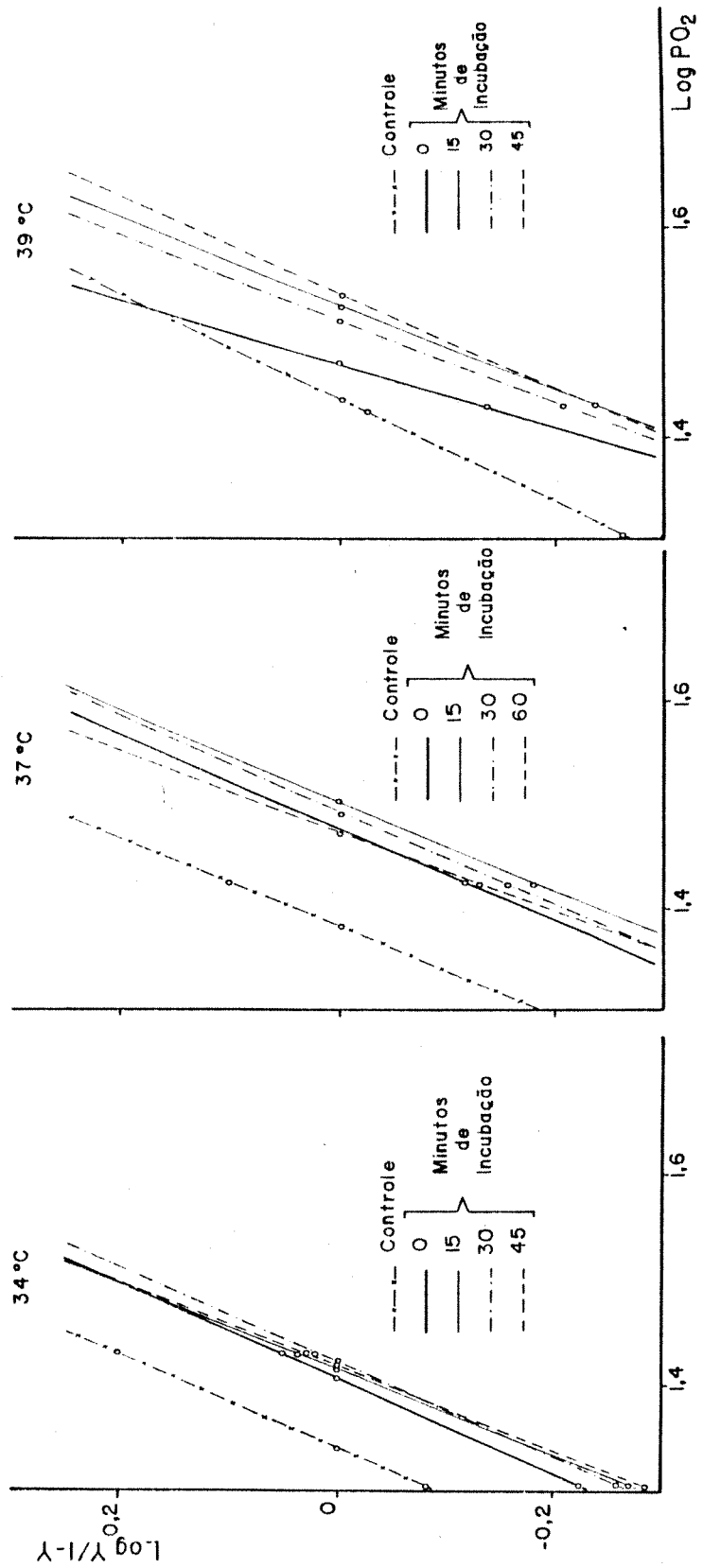


Gráfico 17: Influência da temperatura e tempo de incubação no efeito da papaverina sobre a afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio; ensaios oximétricos com sangue total, [PAV] = 0,75 mM, [Hb] = 1,5 mM.

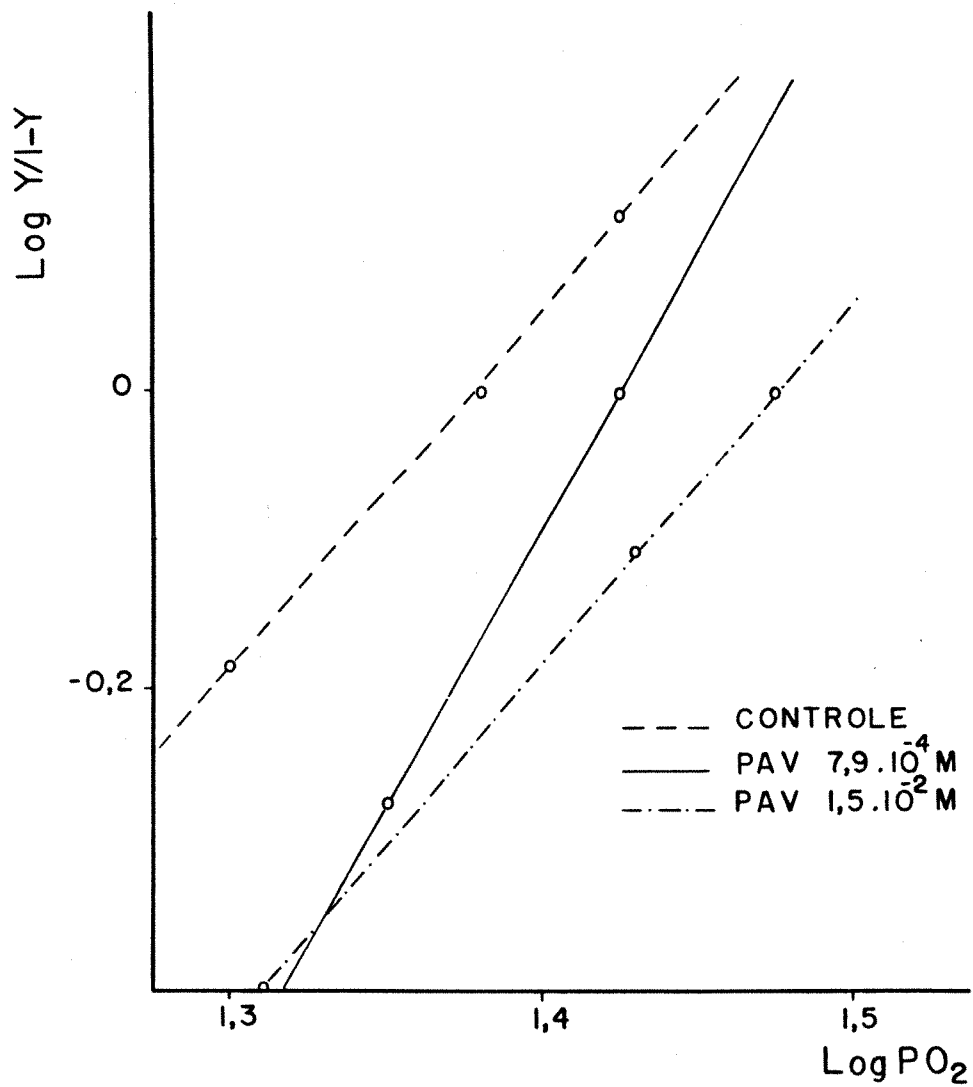


Gráfico 18: Efeito da concentração de papaverina sobre a alteração induzida pela mesma na afinidade Hb/O₂, em ensaios CO-oximétricos com sangue total; T = 37 ° C, [Hb] = 1,875 mM.

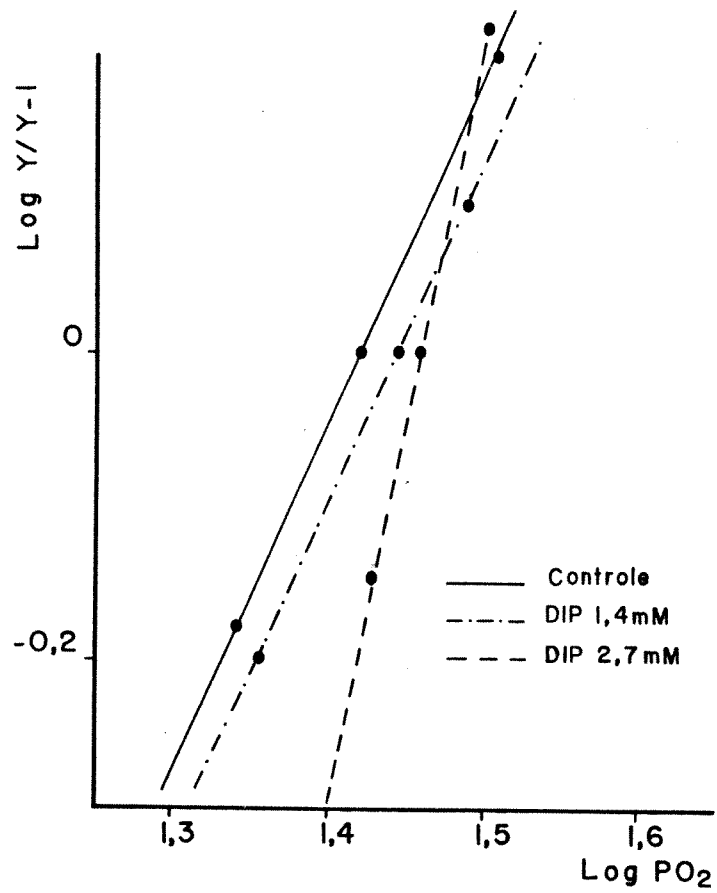


Gráfico 19: Efeito da concentração da droga sobre a alteração da afinidade induzida pelo dipiridamol, em ensaios de CO-oximetria com sangue total; $T = 37^\circ \text{C}$, $[\text{Hb}] = 2,03 \text{ mM}$.

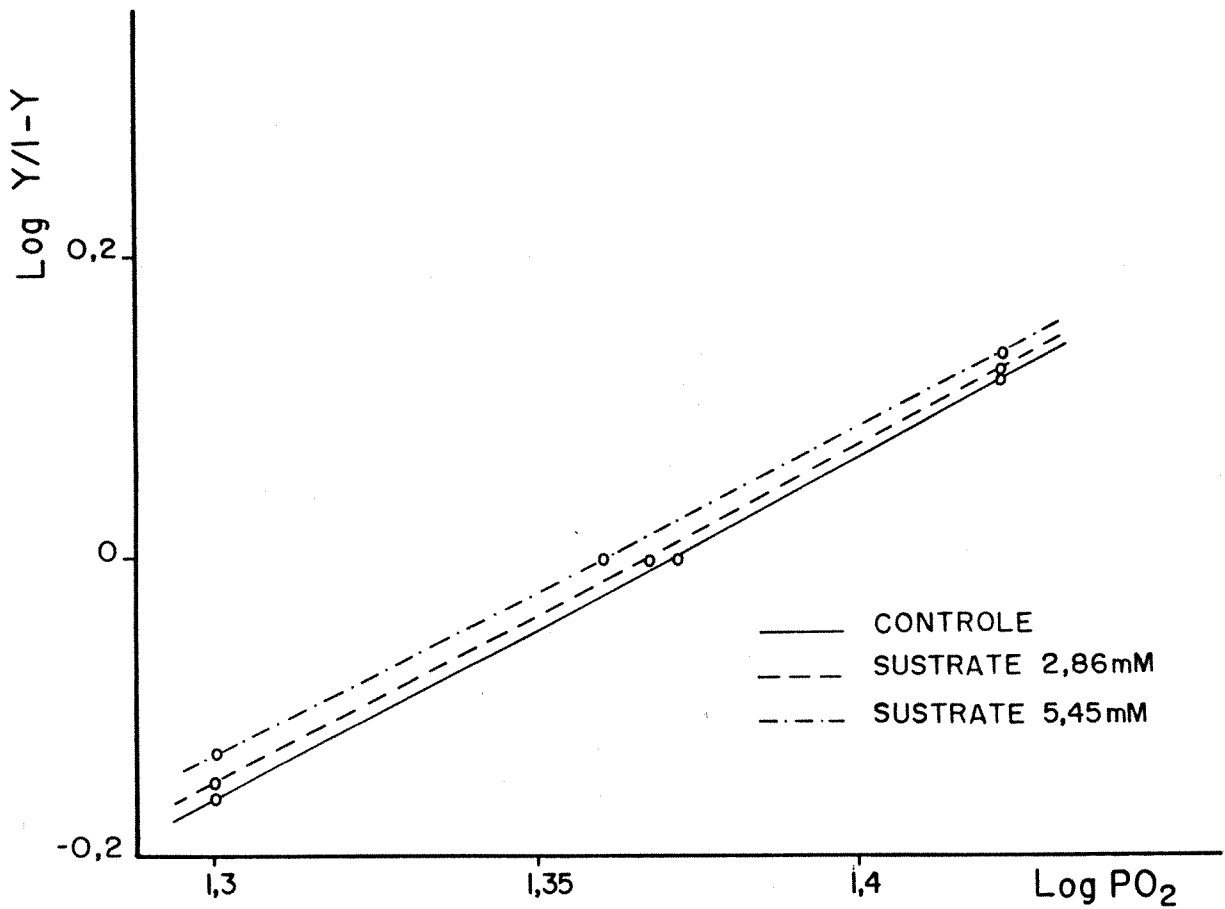


Gráfico 20: Efeito da concentração de substrate sobre a afinidade Hb/O₂ em ensaios CO-oximétricos. Não há correlação evidente entre concentração da droga e alteração de P₅₀; T = 37° C, [Hb] = 2,53 mM e sangue total.

4.4.5 Dosagem de 2,3-DPG no Sangue de Pacientes Anginosos Tratados com Vasodilatadores

A Tabela 33 mostra os valores de 2,3-DPG de amostras sanguíneas de pacientes anginosos em terapêutica de uso de vasodilatadores; os valores médios, $1,81 \pm 0,53$, não diferem significativamente dos do grupo controle (teste "t" para dados não pareados, 19 G.L., e "t" crítico 1,73. "t" encontrado = 0,0657, P = 52%).

Devido a importância fisiológica do 2,3-DPG e aos vários fatores que modificam sua concentração intraeritrocitária, tornou-se importante mensurar nas amostras sanguíneas os níveis desse fosfato, para verificação, como mostrou a Tabela 33, de que os efeitos de alteração de P_{50} na Hb exposta aos vasodilatadores não era devido a alterações desse efector alostérico da proteína, mas sim à ação direta das drogas sobre a Hb.

Tabela 33: Valores de 2,3-DPG sanguíneo em pacientes anginosos tratados com vasodilatadores, contra grupo-controle. Dosagens em desproteinizados sanguíneos de até 2 hs após a coleta do material. Não há diferença significativa entre grupo-controle e grupo-tratado (ver texto).

amostra n ^o	grupo de pacientes		grupo controle	
	droga	[2,3-DPG] mMoles/l sg	amostra n ^o	[2,3-DPG] mMoles/l sg
01	ISL + propanolol	1,67	03	1,55
02	propanolol	1,36	04	2,17
05	PTT + ISL	1,94	09	1,17
07	propanolol	1,10	10	2,23
11	ISL + STR	1,27	14	1,01
12	NIF + STR	0,27	15	1,83
16	DIP	1,25	18	3,43
17	propanolol	2,67	19	1,35
20	NIF + STR	1,84	24	2,95
21	propanolol	1,91		
22	DIP	2,77		

5 Discussão

O efeito de vasodilatadores sobre as propriedades funcionais da hemoglobina humana foi primeiramente demonstrado por AGOSTONI et al (1973) para o propranolol, porém, esse efeito era devido a ação da droga sobre o pH intraeritrocitário, portanto agindo como um “efeito Bohr indireto”; SUGIMOTO & ISHIKAWA (1972), trabalhando com hemoglobina humana purificada, não encontraram para a nitroglicerina qualquer alteração da afinidade Hb/oxigênio, nos ensaios em diferentes valores de pH, resultado confirmado posteriormente, em sangue canino, por GROSS & HARDMAN. Os primeiros resultados experimentais *in vitro*, sobre a ação de drogas vasodilatadoras nas propriedades funcionais da Hb humana, verificados em nosso laboratório foram bastantes estimuladores, no sentido de que sugeriam um segundo efeito farmacológico para a papaverina e o dipiridamol, além da sua conhecida função vasodilatadora, quer seja, uma diminuição da afinidade da hemoglobina pelo Oxigênio (MEIRELLES, 1980; MEIRELLES *et al.*, 1985).

Esse vasodilatadores, utilizados no tratamento de cardiopatias, atuam sobre o tecido cardíaco em isquemia, provocando uma maior perfusão sanguínea e, conseqüentemente melhor nutrição e adequada oxigenação do tecido miocárdico (CHARLIER, 1971). Considerando a interação dessas drogas com a hemoglobina e o resultante deslocamento da Curva de Dissociação para a direita, fisiologicamente teríamos uma segunda via terapêutica contribuindo para a oxigenação tecidual.

Ampliamos nossas observações para novos vasodilatadores e então nos detivemos naqueles utilizados clinicamente em 1985, para o tratamento de angina de peito, em pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O número total de drogas estudadas foi de 7, sendo a ação das mesmas variada: vasodilatadores inespecíficos (papaverina, dipiridamol, prenilamine), nitratos orgânicos (isordil, peritrate e sustrate) e inibidores de canais de cálcio (nifedipine).

Com um número maior de experimentos, analisamos estatisticamente o efeito dessas drogas sobre P_{50} da hemoglobina humana adulta e confirmamos os dados iniciais de que tanto a PAV quanto o DIP provocam um deslocamento para a direita na Curva de Oxigenação da Hb;

observamos também que a nifedipine, a droga de mais recente uso clínico, é capaz de deslocar a O.E.C., mas para a esquerda, isto é, aumentando a afinidade da proteína pelo ligante oxigênio. As demais drogas, mesmo em relações com a Hb maiores que 10:1, não modificam significativamente os valores de P_{50} , quando comparados com pares controle (Tabela 30).

Protocolamos inicialmente um grupo de 18 indivíduos com diagnóstico clínico de angina de peito, paralelamente a um grupo "controle", e mensuramos P_{50} na hemoglobina purificada desses pacientes, todos tratados por um tempo médio de 6 meses, com os vasodilatadores de interesse (Tabela 4). Desses pacientes dosamos os níveis sanguíneos de 2,3 -difosfoglicerato (Tabela 33), não encontrando variação entre os dois grupos, dessa forma descartando a possível interferência do 2,3-DPG no efeito das drogas sobre a hemoglobina.

Quanto aos níveis de 2,3-DPG, dosados em até 2 horas após a coleta, ou seja, $1,81 \pm 0,53$ mMoles/l de sangue, DUHN & GERLACH (1971) citam valores médios de 1,8 mMoles/l (3 horas após a coleta sanguínea); GRISÓLIA & CARRERA (1975) citam 1,6 a 2,6 mMoles/l e DELIVORIA-PAPADOPOULOS & OSKI (1969) falam em 4,1 mMoles/l, em amostras recém-colhidas. Em situações de hipóxia o 2,3-DPG intracelular está aumentado (LENFANT *et al.*, 1969; DUHM & GERLACH, 1971), por um mecanismo que SHAPPEL & LENFANT (1972) acreditam ser resultado da alcalose celular. Também em algumas patologias cardíacas (METCALFE *et al.*, 1969; WOODSON & TORRANCE, 1970) e na cianose congênita (RAVIN *et al.*, 1973), observou-se aumento desse polifosfato. MULHAUSEN *et al.* (1967) citam um aumento de 2,3-DPG em pacientes com cirrose hepática e HJELM (1969 *apud* HARKEN, 1977) notou uma relação inversa entre concentração de hemoglobina e níveis de 2,3-DPG em indivíduos anêmicos, indicando que também nesse estado patológico o 2,3-DPG está envolvido. Obviamente algumas hemoglobinopatias são acompanhadas de variação dos níveis de 2,3-DPG, assim como alguns fatores hereditários congênitos como deficiências enzimáticas (DELIVORIA-PAPADOPOULOS & OSKI, 1969).

Devido ao pequeno número de pacientes observados, não avaliamos o efeito individual dos vasodilatadores, mas comparamos estatisticamente os valores de P_{50} entre o grupo de pacientes e o grupo-controle (item 4.1.3); os resultados não mostraram variação significativa de P_{50} no sangue de indivíduos expostos prolongadamente aos vasodilatadores. Esses resultados mostraram não haver *in vivo*, o efeito inicialmente suposto e detectado *in vitro* das drogas sobre preparações purificadas de hemoglobina.

Procurando descobrir os mecanismos responsáveis pela aparente discrepância desses achados, propusemo-nos verificar em suspensões de hemácias, isto é, com a hemoglobina dentro da célula íntegra, a afinidade Hb/oxigênio na presença dos vasodilatadores; dessa maneira, saberíamos se o efeito, que não se manteve no sangue de pacientes, sofreria a ação da barreira da membrana plasmática, isto é, as drogas sendo incapazes de penetrar a membrana eritrocitária e atingir seu "receptor", a hemoglobina.

Pela técnica de Bionometria, com suspensões de hemácias previamente lavadas em solução salina, comprovou-se o efeito do dipiridamol em deslocar a O.E.C. para a direita e ainda o efeito

da nifedipine e da prenilamine em mover para a esquerda a Curva de dissociação da Hb (Tabela 15).

Como a prenilamine altera a taxa de respiração da levedura, inibindo-a em concentrações maiores que 0,1 mM (Gráfico 9), acreditamos que o efeito detectado, em biotometria, sobre a Hb possa ser decorrente da potente ação da PREN na levedura, comprometendo assim, seu estudo por essa técnica.

Posteriormente, introduzindo uma nova interpretação matemática para os diferentes comportamentos espectrais das formas de ligação da hemoglobina (Cálculo ANISO), pudemos realizar dosagens fotométricas com a mesma, em suspensões de hemácias, à exemplo das dosagens anteriores com "Hb stripped".

O valor de $\log P_{50}$, encontrado pelo cálculo "ANISO", em 60 ensaios de oxigenação em pH 7, foi de $0,288 \pm 0,054$, é comparado com o do cálculo "ISO" ($\log P_{50} = 0,215 \pm 0,031$), uma análise detalhada desses métodos mostra que (Tabela 6): 1) o valor de n não se altera significativamente entre os dois métodos; 2) o valor médio de $\log P_{50}$ encontrado pelo método "ANISO", embora maior que o encontrado pelo método "ISO" está dentro do desvio-padrão deste último; 3) O desvio-padrão dos valores de $\log P_{50}$ de ambos os métodos é muito próximo (0,10), comprovando a similaridade das medidas e 4) o valor médio de $\log P_{50}$ encontrado pelo método "ANISO" está bem próximo ao de literatura: 0,160 (BENESCH, 1967) e 0,172 (BUNN & BRIEHL, 1970).

Nesses resultados com hemácias lavadas e equilíbrios fotométricos tratados pelo cálculo "ANISO" (Tabela 7), mais uma vez observamos a capacidade de PAV e do DIP em diminuir a afinidade Hb/oxigênio, enquanto o efeito contrário da NIF não foi tão evidente.

Nos estudos com a hemácia íntegra, algumas outras drogas insinuavam-se capazes de aumentar P_{50} (PREN, pela Biotometria, ISL pelo método fotométrico), ou diminuí-lo (PREN, pelo mét.fotométrico), mas esses resultados não se mostraram significativamente diferente de seus pares controle.

Assim, os ensaios intraeritrocitários mostraram que o efeito daquelas drogas capazes de alterar P_{50} (PAV, DIP e NIF) se mantinha mesmo com a membrana celular íntegra, isto é, as drogas penetram as hemácias e atingem a hemoglobina, interagindo com a mesma e modificando sua capacidade de transporte de oxigênio.

Segundo DUHM *et al.* (1968) e ZACHARA (1972) o dipiridamol retarda a decomposição do ATP e do 2,3-DPG em sangue estocado, promovendo assim um aumento de P_{50} . O efeito observado aqui, no entanto, é devido à interação com a hemoglobina e conseqüente alteração — direta — da afinidade dessa hemoproteína pelo ligante oxigênio.

O efeito dessas drogas se mostrou diretamente proporcional à concentração empregada (Tabela 8, 11 e 12) e ainda estudamos o efeito de poliânions fosfato (Tabela 7), sobre o mesmo. Variando as concentrações da PAV e do trifosfato de adenosina, encontramos um efeito somatório e concentração dependente de ambas as substâncias (Tabelas 9 e 10), deslocando para a direita a O.E.C. da Hb; significando que o efeito da PAV é independente da presença de fosfatos, e, provavelmente a mesma se liga à hemoglobina em sítio diferente daquele do fosfato.

Esses dados foram comprovados pelo ensaio da ação da PAV contra a Hb fetal (Gráfico 7), cuja afinidade por íons fosfato é bem menor que a da Hb A, e por isso, praticamente não sofre alteração funcional por ânions como o 2,3-DPG e o ATP. A Hb fetal tem duas cadeias γ , em substituição às duas cadeias β da hemoglobina adulta (Hb "A"), apresenta maior afinidade pelo oxigênio e quase nenhuma alteração dessa afinidade, quando na presença do 2,3-DPG (BUNN & BRIEHL, 1970); as cadeias β têm importante papel na ligação do 2,3-DPG à Hb, pois esse fosfato aloja-se num *locus* estruturalmente adequado à sua conformação tridimensional, formado no interior das cadeias polipeptídicas da Hb (PERUTZ, 1978). No sangue umbelical de recém nascidos, de onde as amostras de Hb fetal foram colhidas, encontramos, na verdade, cerca de 15% de Hb F do tipo 1 (que não sofre qualquer alteração pelo 2,3-DPG) e 85% de HbF do tipo 2, que apresenta 1/3 da alteração que faz 2,3-DPG sobre a Hb A (BUNN & BRIEHL, 1970).

Também o variação de pH sobre tal deslocamento da O.E.C. foi verificado para a papaverina e nifedipine (Gráfico 8 e Tabela 12 respectivamente), sendo os resultados discutidos, no caso da PAV, em relação ao pK da mesma e aos resultados de equilíbrios de diálise (Tabela 16).

O método oximétrico possibilitou análises da afinidade Hb/oxigênio em condições ainda mais próximas à fisiológica, isto é em "sangue total", recém-colhido e incubado com as drogas em estudo. Um número grande de ensaios foram realizados e a análise estatística mais uma vez veio comprovar resultados anteriores sobre a diminuição da afinidade Hb/O₂ causada pela PAV e DIP, e aumento da afinidade, provocada pela nifedipine. As demais drogas não mostraram variação significativa em relação aos seus controles (Tabelas 30).

O valor médio encontrado de P₅₀ em adultos, não fumantes, (pH 7,4, T = 37° C) foi de 26,187 ± 1,0517 mmHg, bastante próximo ao de literatura: 25,0 (ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958); 26,9 ± 1,0 (MULHAUSEN et al, 1967); 27,3 ± 0,9 (EDWARDS *et al.*, 1968); 26,8 ± 0,6 (LENFANT et al, 1969); 26,0 (SHAPPEL & LENFANT, 1972); 26,5 (FINCH & LENFANT, 1972) e 28,8 mmHg (SAMAJA & WINSLOW, 1979).

Os valores de P₅₀ em fumantes são ligeiramente inferiores aos de não fumantes, porém não diferem significativamente destes. O valor médio de P₅₀ encontrado foi de 25,7855 ± 1,6069 mmHg; MULHAUSEN et al (1967) citam 25,8 mmHg e WOODSON & TORRANCE (1970) citam 27,0 ± 1,3 mmHg quando seu grupo de não fumantes tinha P₅₀ médio de 27,3 ± 0,9 mmHg.

O aumento da afinidade Hb/O₂ está relacionado à formação de Carboxi-Hb, segundo AFONSO (1981), posto que a Hb tem uma altíssima afinidade pelo monóxido de carbono e este se liga à proteína de maneira praticamente irreversível, competindo pelo sítio de ligação do oxigênio. Assim, a formação de Carboxi-Hb pode reduzir em até 10% (em "heavy smokers") a porcentagem total de Hb capaz de transportar oxigênio (SULLIVAN, 1972).

Por essa metodologia controlamos ainda outros fatores como pH sanguíneo, porcentagem de Carboxi (Tabela 17) e Meta-hemoglobina (Tabela 18), temperatura e tempo de incubação, avaliando mais nitidamente, o efeito da droga sobre a Oxi e Desoxihemoglobina.

Os valores de Carboxi-Hb (0,4% em não fumantes e 4,2% em fumantes) encontrados con-

cordam com os valores citados em literatura, de valores inferiores a 1% para não fumantes e média de 4,0% em fumantes (MULHAUSEN *et al.*, 1967), cifra que pode atingir 7,0%, em "heavy-smokers" (MAAS *et al.*, 1972).

A porcentagem de Meta-Hb não ultrapassa 7%, valor acima do qual os resultados de dosagens fotométricas ficam comprometidos (MAAS *et al.*, 1972); o valor médio foi de 0,2% de Meta-Hb e não houve diferença significativa entre fumantes e não fumantes.

Com todos esses dados, sabíamos que a membrana celular não consistia barreira para a interação droga/hemoglobina, primeira suposição para a não observação do efeito *in vivo*, no sangue de pacientes tratados. Então, o efeito que comprovadamente exercem a papaverina e o dipiridamol sobre P_{50} não deve ocorrer no sangue de pacientes provavelmente pela dose terapêutica usada, isto é, tal efeito foi observado "in vitro" em relações droga/Hb próximas à unidade ou maiores. Como a concentração média da Hb no eritrócito é de 15 mg% (isto é, 2,5 mMoles/l) a concentração do vasodilatador administrada ao paciente deveria ser tal, que após absorção e distribuição circulatória (considerando não haver fixação preferencial em algum órgão) atingisse molaridade intra-eritrocitária igual ou maior a essa da hemoglobina. Obviamente a dose terapêutica excederia em muito a dose letal desses vasodilatadores.

Analisando com maior detalhe a interação Hb/papaverina pelo método oximétrico (Gráfico 18) mais uma vez demonstramos o efeito concentração dependente (como também para o DIP — Gráfico 19) e observamos o efeito da temperatura sobre a reação (Gráfico 17). Variando o tempo de incubação Hb/droga verificamos uma exacerbação do efeito da PAV e do DIP, porém esse efeito era acompanhado pelo surgimento de concentrações cada vez maiores de hemoglobina oxidada (Tabela 32).

Na verdade, o efeito oxidativo de algumas drogas como a PAV, o DIP e o STR sobre a Hb já havia sido observado (Tabela 31) e a avaliação dos ensaios variando tempo de incubação permitiu verificar que o efeito adicional de aumento de P_{50} com um tempo maior de incubação está, na verdade, relacionado com o surgimento de Meta-Hb, que altera a capacidade de transporte de oxigênio do sangue. Tais considerações ficam mais evidentes variando além do tempo de incubação Hb/droga, a temperatura do ensaio.

O efeito isolado da temperatura sobre P_{50} é descrito por SHAPPEL & LENFANT (1972) e HARKEN (1977), segundo os quais a O.E.C. responde ao aumento da temperatura, com diminuição da afinidade Hb/O₂. Em relação à oxidação, verificamos que em temperaturas menores que a fisiológica (34° C) há uma menor taxa de oxidação da Hb e, conseqüentemente, quase não se observam variações de P_{50} dos traçados (em resposta ao tratamento com PAV) entre 0 e 45 min de incubação (Gráfico 17).

Obviamente, um aumento do tempo de incubação reflete em maior atividade da droga sobre a Hb e isso é esperado, pois há maior tendência de reação, mas uma exposição prolongada a essas concentrações de droga provocam também o aparecimento de ferri-Hb, que acentua ainda mais o deslocamento para a direita na Curva de Oxigenação da Hb.

Já havíamos estudado os níveis de 2,3-DPG e sabíamos que as drogas com efeito sobre P_{50}

não o alteravam por influência sobre os níveis desse ânion fosfato, mas não sabíamos ainda se tal efeito ocorria devido à interação direta droga/Hb, ou por vias indiretas como influência sobre a via glicolítica, (PANTELY *et al.*, 1981) interações com moléculas intraeritrocitárias, modificação do pH intracelular (Efeito Bohr indireto), etc ... que indiretamente modificassem a capacidade de transporte de oxigênio por essa hemeproteína.

Com a técnica de equilíbrios de diálise, focalizamos aquelas drogas que apresentavam efeito sobre a afinidade Hb/O₂ e encontramos para a papaverina e para o dipiridamol haver reação molecular entre proteína e droga (Gráfico 12), com razões molares dependentes do pH (Tabela 16). Portanto, a ação das drogas sobre a capacidade funcional da Hb é direta, por interação molecular. Concordantemente a prenilamine, que não apresentava efeito sobre P₅₀ (Tabela 30), não interagiu molecularmente com a Hb (Gráfico 14).

O estudo do pK da papaverina e do dipiridamol trouxe maior esclarecimento sobre a forma de ação dos mesmos. A PAV apresenta maior efeito funcional sobre a Hb em pHs mais ácidos (Gráfico 8) que em alcalinos, pelos equilíbrios de diálise verificamos que acontece mais reação (maior razão molar de droga ligada/heme de hemoglobina) em pHs mais baixos — Tabela 16. Como a PAV é um ácido fraco, de pK 6,4 (SAKAMOTO, 1983), acreditamos que a forma não dissociada dessa molécula é a responsável pela ligação e efeito sobre a afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio.

Valores normais de P₅₀ para a Hb “stripped”, suspensões de hemácias e sangue total são comparados com os valores de literatura, sendo bastante condizentes com os mesmos.

Os valores de *n* (coeficiente de Hill) também são bastante precisos pelo método oximétrico (2,847 ± 0,453), e concordantes com os valores de literatura: 2,8 (ROSSI-FANELLI & ANTONINI, 1958); 2,64 (EDWARDS *et al.*, 1968); 2,6-3,0 (SHAPPELL & LENFANT, 1972); 2,72 (WILSON & LAVER, 1972); 2,75 (POYART, 1978) e 2,48 (SAMAJA & WINSLOW, 1979).

Não verificamos alteração de *n* pela ação das drogas vasodilatadoras pelo método CO-oximétrico (Tabelas 23 a 29).

Contrastando esses valores com aqueles do método espectrofotométrico, vemos para esse último que *n* está mais próximo à unidade, o que pode ser atribuído ao aumento da força iônica (HARKEN, 1977) uma vez que nos ensaios fotométricos usa-se tampões (0,05 M para soluções purificadas de Hb, onde o valor médio de *n* é 2,00 e 0,1 M para suspensões de hemácias, quando então *n* médio é 1,5). BENESCH (1967) atribui essa diminuição de *n* em soluções purificadas de Hb à ausência do 2,3-DPG, que altera a interação intramolecular da Hb. Devido a essas considerações, não consideramos as pequenas variações de *n* (Gráfico 7, por exemplo) nos ensaios espectrofotométricos como alterações nas interações heme/heme provocadas pelos vasodilatadores.

O método CO-oximétrico mostrou-se o mais fidedigno dentre os métodos fotométricos, sendo mais preciso também que o método de biotometria pela repetitividade de resultados e pequena variação entre experimentos. O método fotométrico aproxima-se à precisão do método gasométrico de VAN SLIKE (1924, 1932), precursor seu e ainda um dos mais refinados métodos

de dosagem de P_{50} (ROUGHTON *et al.*, 1955), embora ultrapassado pelo seu difícil manuseio e excesso de tempo consumido na dosagem das curvas de oxigenação.

6 Conclusões

1. Nos ensaios com "Hb Stripped", a papaverina e o dipiridamol alteram P_{50} da hemoglobina, aumentando-o.
2. Com a Hb purificada, o efeito da PAV e do DIP sobre P_{50} é diretamente proporcional à concentração de droga, na faixa estudada.
3. Esse efeito sobre P_{50} é independente da concentração de fosfato orgânico (ATP), sugerindo um sítio de ação diferente na molécula proteica.
4. Ensaio com Hb fetal (com baixa afinidade por fosfatos orgânicos) confirmam os resultados da papaverina com ATP, isto é, que o efeito sobre P_{50} independe do de ânions fosfato.
5. A PAV tem maior efeito sobre a afinidade Hb/O₂ em pHs mais ácidos.
6. A nifedipine diminui P_{50} , quando em soluções purificadas de Hb.
7. Por estudos fotométricos não se detectou alteração de P_{50} no sangue de pacientes tratados cronicamente com as drogas vasodilatadoras.
8. O nível de 2,3-DPG desses pacientes anginosos foi dosado em 1,8 mMoles/l de sangue, não diferindo do valor médio do grupo controle.
9. Suspensões de hemácias puderam ser estudadas por fotometria, com um novo cálculo para interpretação das variações espectrais entre 500 e 600 nm.
10. O valor médio de $\log P_{50}$ de suspensões de hemácias, encontrado por essa metodologia (0,5273 mmHg), é coerente com a literatura.
11. Nos experimentos com drogas em suspensões de hemácias, papaverina, dipiridamol e isordil, mostraram um aumento de P_{50} , enquanto a prenilamine, uma diminuição.

12. Pelo método biotonométrico, estudamos também a hemoglobina em suspensões de hemácias íntegras, onde viu-se novamente o efeito do dipiridamol em aumentar P_{50} , e o da nifedipine e prenilamine em diminuí-lo.
13. A prenilamine inibe a respiração da levedura nos ensaios biotonométricos em concentrações maiores que 0,1 mM.
14. O efeito da prenilamine sobre P_{50} , detectado por biotometria, deve ser um artefato da técnica, decorrente da ação da PREN sobre a velocidade de consumo de oxigênio pela levedura.
15. Por equilíbrios de diálise demonstrou-se a ligação molecular da hemoglobina com a papaverina e o dipiridamol.
16. A PAV se liga mais fortemente à hemoglobina (razão droga/Hb maior) em pHs mais ácidos.
17. A PREN, em equilíbrios de diálise, não apresenta ligação com a hemoglobina.
18. Análises por CO-Oximetry, permitiram mensurar P_{50} em sangue total; o valor médio encontrado foi 26,1871 mmHg, coerente com valores literários.
19. Em indivíduos fumantes, P_{50} nessas condições, decaiu para 25,7855 mmHg, queda essa relacionada a taxa aumentada de Carboxi-hemoglobina em tabagistas.
20. Valores de % Carboxi-hemoglobina foram dosados encontrando-se a média de 0,4% para indivíduos não fumantes e 4,2% para fumantes.
21. A %Meta-Hb encontrada foi em média 0,2%, não diferindo entre fumantes e não-fumantes, mas sofrendo ação dos vasodilatadores.
22. No ensaio com drogas conferimos o efeito da papaverina e do dipiridamol em deslocar para a direita a Curva de Oxigenação da hemoglobina, e o da nifedipine, deslocando-a para a esquerda.
23. O efeito da papaverina e do dipiridamol sobre P_{50} mostrou-se concentração dependente, nos ensaios Co-oximétricos.
24. O Efeito da PAV sobre P_{50} é mantido em diferentes temperaturas.
25. Um aumento no tempo de incubação da droga (PAV) com a Hb exacerba o efeito desta sobre P_{50} e também a formação de meta-hemoglobina.
26. O aumento de P_{50} com o tempo de incubação não é tão evidente a 34° C, quando a Hb sofre menor oxidação em comparação com os ensaios de 37° C e 39° C.

27. O sustrate, dipiridamol e papaverina tem efeito oxidativo sobre a hemoglobina, mais evidente que as demais drogas em estudo.
28. O Efeito maior da papaverina (pK 6,4) em pHs mais baixos leva a crer que é sua forma não dissociada a que se liga preferencialmente à hemoglobina, alterando-lhe a capacidade de transporte de oxigênio.
29. O método oximétrico mostrou-se o mais preciso, com maior repetitividade de resultados e facilidade de manuseio, sendo o método de escolha para a conclusão dos estudos sobre os efeitos de vasodilatadores sobre a afinidade hemoglobina/oxigênio.

7 Resumo

Antigos modelos e teorias sobre a reação hemoglobina/oxigênio são revistos e ainda os métodos para determinação de P_{50} (pressão parcial de O_2 para saturação de 50% dos sítios ligantes da hemoglobina), baseados nessas teorias, propondo-se nova metodologia para o cálculo de parâmetros fisiológicos, baseada no método fotométrico clássico de ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958).

A utilização de diferentes metodologias permitiu o estudo *in vitro* de sete vasodilatadores cardíacos, de uso no tratamento de angina de peito, sobre as propriedades funcionais da hemoglobina humana.

Desse "screening", uma análise estatística final demonstra o efeito direto da papaverina e do dipiridamol ligados com a hemoglobina, provocando um deslocamento da Curva de Oxigenação da mesma proteína, para a direita. Também a nifedipine altera a afinidade Hb/oxigênio, porém em sentido oposto, aumentando-a.

Tal efeito é demonstrado em condições diversas: com Hb fetal, na presença de fosfatos orgânicos de concentração definida, em diferentes pHs, temperaturas e tempos de incubação, além de concentrações variáveis da droga. Por equilíbrios de diálise a reação molecular entre proteína e droga é demonstrada.

O efeito da papaverina é relacionado à sua constante de dissociação e conclui-se que a mesma reage melhor com a Hb em sua forma não dissociada, responsável pelo efeito funcional sobre a proteína.

A análise de P_{50} *in vivo*, no sangue de pacientes anginosos tratados cronicamente com os vasodilatadores, não mostra diferença detectável entre esses e seu grupo controle, fato que é interpretado como decorrente da alta relação droga/hemoglobina, necessária à detecção dos efeitos observados *in vitro* e terapêuticamente impraticáveis.

Através de ensaios com a hemoglobina intra e extra-eritrocitária, e dos equilíbrios de diálise comprovou-se que o efeito das drogas sobre a afinidade hemoglobina/oxigênio, ocorre pela ação direta dos vasodilatadores sobre a molécula de hemoglobina, e não por alterações no microambiente intraeritrocitário.

8 Abstract

Older models and theories about the Hemoglobin/Oxygen binding are revised as well as the methods for measuring P_{50} (the partial O_2 pressure for the half saturation of the Hb binding sites), which are based on the models. A new methodology for obtain P_{50} , based on the classic spectrophotometric method of ROSSI-FANELLI & ANTONINI is proposed.

The different methods utilized allowed the "in vitro" study of seven cardiac vasodilator drugs, often used in the angina pectoris treatment, over the functional properties of the Human Hemoglobin.

A final statistical analysis of this screening showed a direct effect of papaverine and dipiridamole when bound to hemoglobin, promoting a shift to the right in the Oxygen Equilibrium Curve of the protein while nifedipine — another vasodilator - alters the Hb/Oxygen affinity in an opposite way, increasing it.

This effect is noticed in several conditions: with Fetal Hb, in the presence of known quantities of organic phosphates, on different pH values, temperatures, incubation periods, and drugs concentrations. The molecular reaction between protein and drug is demonstrated by dialysis equilibria.

The papaverine effect is related to its dissociation constant (pK), and we concluded the drug reacts better with Hb in its non dissociated form, which is the responsible for the effect over the Hb physiological properties.

The *in vivo* analysis of P_{50} , in the blood of patients treated for a long time with the vasodilators drugs, hadn't showed a real difference between these patients blood samples and their *control* group; and these data are understood as the result of the high drug/protein ratio needed for the effects observed *in vitro*, so it's not possible to use the drugs clinically in that way.

By the assays with intra and extraerythrocytic hemoglobin and by the dialysis equilibria, it was proved that the effect of the drugs over hemoglobin/oxygen affinity occurs due to a direct action of the vasodilator drugs on the hemoglobin molecule, instead of being related to alterations on the intraerythrocytic environment.

10 Bibliografia

- ADAIR, G. S. The hemoglobin system. VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. biol. Chem.*, 63: 529-45, 1925.
- AFONSO, F. E. Fisiologia pulmonar: Transporte de Oxigênio. *J. Pneumol.*, 7(4): 231-8, 1981.
- AGOSTONI, A.; BERFASCONI C. & GERLI G. Oxygen affinity and electrolite distribution of human blood: changes induced by Propanolol. *Science*, 182: 300-1, 1973.
- AKERBLOM, O. & DE VERDIER C. H. Restoration of defective oxygen transport function of stored red blood cells by addition of inosine. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 21: 245-8, 1968.
- ALLAN, G.; CHAPPLE, D. J. & HUGHES, B. Effects of an increase in Hemoglobin-oxygen affinity by BW12C on myocardial function in the erythrocyte-perfused rabbit heart *in vitro* and myocardial infact size in the dog. *Br. J. Pharmac.*, 89: 183-90, 1986.
- ALMEIDA E VAL, V. M. F. Aspectos estruturais e funcionais da hemoglobina de 7 espécies de peixes pertencentes à família anostomidae (cypriniformes: characoidei). São Carlos, 1982. Tese (mestrado) Universidade Federal de São Carlos — SP.
- ANTONINI E. & BRUNORI, M. *Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands*. Amsterdam, North Holland, 1971, 436 p.
- ANTONINI, E.; WYMAN J.; MORETTI, R. & ROSSI-FANELLI, A. The interaction of Bromothymol Blue with hemoglobin and it's effect on the oxygen equilibrium. *Biochem. biophys. Acta*, 71: 124-138, 1963.
- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. & ROSSI-FANELLI, A. Studies on the relation between molecular and functional properties of Hemoglobin. *J. biol. Chem.*, 240(3): 1096-103, 1965.
- ARNONE, A. & PERUTZ, H. F. Structure of Inositol Hexaphosphate- human deoxyhemoglobin complex. *Nature, Lond.*, 249: 34-6, 1974.
- ARONOW, W. S. The Medical treatment of angina pectoris. III. Pharmacology of sublingual nitrites as antianginal drugs. *Am. Heart J.*, 84(2): 273-5, 1972a.

- ARONOW, W. S. The Medical treatment of angina pectoris. IV. Nitroglycerin as an antianginal drug. *Am. Heart J.*, 84(3): 415-8, 1972b.
- ARONOW, W. S. The Medical treatment of angina pectoris. VI. Propranolol as an antianginal drug. *Am. Heart J.*, 84(5): 706-9, 1972c.
- ARONOW, W. S. The medical treatment of angina pectoris. VIII Miscellaneous antianginal drugs. *Am. Heart J.*, 85(1): 132-7, 1973.
- BALDWIN, J. & CHOTHIA, J. 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*. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1914, Pt. 1-2.
- BEDDEL, C. R.; GOODFORD, P. J.; NORRINGTON, F. E. & WILKINSON, S. Compounds designed to fit a site of known structure in Human Hemoglobin. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 57: 201-9, 1976.
- BEDDEL, C. R.; GOODFORD, P. J.; STAMMERS, D. K. & WOOTTON, R. Species differences in the binding of compounds designed to fit a site of known structure in adult Human Hemoglobin. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 65: 535-43, 1979.
- BENESCH, R.; MACDUFF, G. & BENESCH, R. E. Determination of Oxygen Equilibrium with a versatile new tonometer. *Analyt. Biochem.*, 11: 81-7, 1965.
- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 26(2): 162-7, 1967.
- BENESCH, R.; BENESCH, R. E. & ENOKI, I. The interaction of Hb and its subunits with 2,3-Diphosphoglycerate. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 61: 1102-8, 1968.
- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. Intracellular organic phosphates as regulator of oxygen release by haemoglobin. *Nature, Lond.*, 221: 618-22, 1969.
- BENESCH, R. E.; BENESCH, R. & YU, C. I. The Oxygenation of Hemoglobin in the Presence of 2,3-Diphosphoglycerate. Effect of Temperature, pH, Ionic Strength, and Hemoglobin Concentration. *Biochemistry*, 8(6): 2567-71, 1969.
- BENESCH, R.; BENESCH, R. E. & YUNG, S. Equations for the spectrophotometric analysis of Hemoglobin mixtures. *Analyt. Biochem.*, 55: 245-8, 1973.
- BERMAN, M.; BENESCH, R. & BENESCH, R. E. The removal of organic phosphates from Hemoglobin. *Archs Biochem. Biophys.*, 145: 236-9, 1971.
- BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism*. 3.ed. Orlando, Greene & Stratton, 1984, p. 127-131.
- BOHR, C.; HASSELBACH, K. & KROGH, A. A biological important influence of carbon dioxide pressure of the blood on the binding of oxygen. *Translation of the Skand. Arch. Physiol.*, 16: 402-12, 1904.
- BROWN, F. M. & GOODFORD, P. J. The interaction of some bis- arylhydroxy-sulfonic acid with a site of known structure in Human Hemoglobin. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 60: 337-41, 1977.

- BUCKY, J. P.; ACETO, M. D. G. & KINNARD, W. J. The effects of isosorbide dinitrate on coronary vascular resistance. *Angiology*, 12(6): 1259-66, 1961.
- BUHN, H. F. & BRIEHL, R. W. The interaction of 2,3-Diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. clin. Invest.* 49: 1088-95, 1970.
- CANIZARRO, P. C.; HENESSY, J. & NELSON, J. Alterations in Oxygen transport. In: ———: ——— & ———. Textbook of Shock, 1973, p. 96-115.
- CARPENEDO, F.; GAION, R. M. & FASSINA, G. Calcium and Papaverine interaction with soluble cardiac phosphodiesterase. *Biochem. Pharmacol.*, 24: 2069-73, 1985.
- CHANUTIN, A. & CURNISH, R. R. Effect of organic and inorganic phosphates on the Oxygen Equilibrium Curve. *Archs Biochem. Biophys.*, 121: 96-102, 1967.
- CHARLIER, R. *Antianginal drugs*. Handbook of Experimental Pharmacology, Berlin, Springer-Verlag, 1971, v.31, 430p.
- CLARCK, A. J. *Handbuch der experimentellen pharmakologie. 4 General Pharmacol.* Berlin, Springer, 1937.
- COWGILL, R. W. & PIZER, L. I. Purification and some properties of phosphoglyceric acid mutase from rabbit skeletal muscle. *J. biol. Chem.*, 223: 885-95, 1956.
- CZOKAN, P. Spectroscopy of opium alkaloids. *J. analyt. Chem.*, 124: 344, 1942.
- DARGIE H. J.; LYNCH P. G.; KRIKLER, D. M.; HARRIS, L. & KRIKLER, S. Nifedipine and Propanolol: A Beneficial Drug Interaction. *Am. J. Med.*, 71: 676-82, 1981.
- DE BRUIN, S. H.; JANSSEN, L. H. M. & VAN OS, J. Effect of 2,3-Diphosphoglycerate on the Bohr effect of Human Adult hemoglobin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 45: 544-50, 1971.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. A. & OSKI, F. Oxygen-Hemoglobin Dissociation Curves: Effect of Inherited Enzyme Defects of the Red Cell. *Science*, 165: 601-2, 1969.
- DUHM, J.; DEUTICKE, B. & GERLACH, E. Metabolism of 2,3-Diphosphoglycerate and glycolysis in Human red blood cells under the influence of dypiridamole and inorganic sulfur compounds. *Biochem. biophys. Acta*, 170: 452-4, 1968.
- DUHM, J. & GERLACH, E. On the mechanisms of Hypoxia Induced Increase of 2,3- Diphosphoglycerate in erythrocytes. *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, 326: 254-69, 1971.
- EATON, J. W. & BREWER, G. J. The relationship between red cell 2,3-diphosphoglycerate and Hemoglobin in Human. *Biochemistry*, 6(1): 756-60, 1968.
- EDWARDS, M. J.; NOVY, M. J. & WALTERS, C. Improved Oxygen release and adaptation of mature red cell to hypoxia. *J. clin. Invest.*, 47: 1851-57, 1968.
- EWING, G. W. The absorption of radiation UV and Visible. In: ———, Instrumental Methods of Chemical Analysis 2.ed., Tokyo, Mc Graw-Hill 1960, cap.3, p.22.
- FELDMAN, R. L. & CONTI, C. R. Relief of Myocardial Ischemie with nitroglycerin: What's the mechanism?. *Circulation*, 64(6): 1098, 1981.
- FINCH, C. A. & LENFANT, C. Oxygen transport in man. *New Engl. J. Med.*, 286(8): 407-15, 1972.

FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y.

The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem.*, 66: 375, 1925.

FLANAGAN, M. A.; ACKERS, G. K.; MATHEW, J. B.; HANANEA, G. I. H. & GURD, F. R. N. Electrostatic Contributions to the Energetic of Dimer-Tetramer Assembly in Human Hemoglobin: pH Dependence and Effect of Specifically Bound Chloride Ions. *Biochemistry*, 20: 7439-49, 1981.

FURCHGOTT, R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *A. Rev. Pharmac. Toxic.*, 24: 175-90, 1984.

GOODMAN GILMAN, A.; GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1983. 773 p.

GRISOLIA, S. & CARRERA, J. Phosphoglycerate mutase from yeast, chicken breast muscle and kidney (2,3 PGA dependent). *Meth. Enzym.*, 42: 435-45, 1975.

GROSS, G. J. & HARDMAN, H. F. Alteration in Oxyhemoglobin Equilibrium (P_{50}) and myocardial oxygen consumption (MVO_2) by nitroglycerin (GTN). *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 193: 346-55, 1975.

GUIDOTTI, G. Studies on the chemistry of Hemoglobin. *J. biol. Chem.*, 242(16): 3694-703, 1967.

HARKEN, A. H. The surgical significance of the Oxyhemoglobin dissociation curve. *Surgery Gynec. Obstet.*, 144: 935-55, 1977.

HENRY, P. D. Comparative Pharmacology of Calcium Antagonists: Nifedipine, Verapamil and Diltiazem. *Am. J. Cardiol.*, 46: 1047-58, 1980.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules on its oxygen dissociation curve. *J. Physiol, Lond.* 40: 4, 1910.

IGNARRO, L. J. & KADOWITZ, P. H. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *A. Rev. Pharmac. Toxicol.*, 25: 171-91, 1985.

JELKMANN, W. & BAUER, C. What's the best method to remove 2,3-Diphosphoglycerate from Hemoglobin?. *Analyt. Biochem.*, 75(2): 382-9, 1976.

JOYCE, B. K. & GRISOLIA, S. Studies on glycerato 2,3-diphosphatase. *J. biol. Chem.*, 23(3): 351-9, 1958.

KAVERINA, N. V. & CHUMBURIDZE, V. B. Antianginal drugs. *Pharmac. Therapeutics*, 4: 109-53, 1979.

KIESOW, L. A. & BLESS, J. W. The enzymic determination of 2,3-Diphosphoglycerate in a crude cell extract (UV method). *Analyt. Biochem.*, 51: 91-6, 1973.

KILMARTIN, J. V. & ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO_2 combination and reduction of the Bohr Effect in Haemoglobin chemically modified at its α -amino groups. *Nature, Lond.*, 222: 1243-6, 1969.

KILMARTIN J. V. & ROSSI-BERNARDI, L. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide and organic phosphates. *Physiol. Rev.*, 53(4): 836-90, 1973.

- KILMARTIN J. V.; FOGG, J. H. & PERUTZ, M. F. Role of C-Terminal Histidine in the Alkaline Bohr effect of Human Hemoglobin. *Biochemistry*, 19: 3189-93, 1980.
- KOSTUK, W. S.; SUWA, K.; BERNSTEIN, E. F. & SOBEL, B. E. Altered Hemoglobin Oxygen affinity in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 31: 295-9, 1973.
- LANGLEY, J. N. On the Physiology of the salivary secretion. *J. Physiol.*, Lond., 1: 339-69, 1878.
- LEE, A. W.-M. & KARPLUS, M. Structure-specific model of hemoglobin cooperativity. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 7055-9, 1983.
- LENFANT, C.; WAYS, P.; AUCUTT, C. & CRUZ, J. Effect of chronic hypoxic hypoxia on the Oxygen-Hemoglobin dissociation Curve and respiratory gas transport in man. *Respir. Physiol.*, 7: 7, 1969.
- MAAS, A. H. J.; HAMELINK, M. L. & DE LEEUW, J. M. An evaluation of the spectrophotometric determination of HbO₂, HbCO and Hb in blood with the CO-Oximeter IL 182. *Clin. chem. Acta*, 29: 303-9, 1970.
- MACHO, P. & VATNER, S. F. Effects of Nitroglycerin and Nitroprusside on Large and Small coronary Vessels in conscious Dogs. *Circulation*, 64(6): 1101-6, 1981.
- Manual do Operador do Tonômetro "IL 237". Instrumental Laboratories, Massachusetts / U.S.A., 1972.
- Manual do Operador do CO-Oxímetro "IL 282". Instrumental Laboratories, Massachusetts / U.S.A., 1977.
- MARCHANT, E.; PICHARD, A. D.; CASANEGRA, P. & LINASAY, J. Effect of intravenous Dipyridamol on regional coronary blood flow with 1-vessel coronary artery disease. Evidence against coronary steal. *Am. J. Cardiol.*, 53: 718-21, 1984.
- MEIRELLES N. C. Effect of two benzylisoquinoline alkaloids on the equilibrium dissociation of hemoglobin with oxygen. Abstracts of the World Conference of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1, London, 1980, Abstracts, ref. 114.
- MEIRELLES, N. C.; NASCIMENTO, O. R. & TABAK, M. 6,7-Dimethoxy-1 veratrylisoquinoline alters the Oxygen Dissociation properties of Human hemoglobin: an ESR study. *Hemoglobin*, 9(4): 399-403, 1985.
- METCALFE, J.; DHINDSA, D. S.; EDWARDS, M. J. & MOURDJINIS, A. Decreased affinity of blood for Oxygen in patients with Low-Output Heart Failure. *Circulation Res.*, 25: 47-51, 1969.
- MILLER, W. W.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Oxygen releasing factor in hyperthyroidism. *J. Am. med. Ass.*, 211: 1824, 1970.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEAUX, J. P. On the nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J. molec. Biol.*, 12: 88-118, 1965.
- MUIRHEAD, H.; COX, J. M.; MAZZARELLA, L. & PERUTZ, M. F. Structure and function of Hemoglobin. III. A three dimensional Fourier synthesis of Human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *J. molec. Biol.*, 28: 117-56, 1967.

- MUKHERJEE, K. & SIMPSON, R. W. Inhibitory effect of papaverine on RNA and protein synthesis of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.*, 3: 57-67, 1985.
- MULHAUSEN R.; ASTRUP, P. & KIELDSEN, K. Oxygen affinity of Hemoglobin in patients with cardiovascular diseases, anemia, and cirrhosis of the liver. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 19: 291-7, 1967.
- MULLER, J. E.; ZOLTAN, G. T.; PERALE, D. L.; SHNEIDER; J. F.; SERFAS, D. H.; MORRISON, J.; STONE, P. H.; RUDE, R. E.; ROSNER, B.; SOBEL, B. E.; TATE, C.; SHEINER, E.; ROBERTS, R.; HINNEKENS, C. H. & BRAUNWALD, E. Nifedipine and conventional therapy for unstable angina pectoris: a randomized, double-blind comparison. *Circulation*, 69(4): 728-39, 1984.
- NEUGEBAUER, G. Comparative cardiovascular actions of verapamil and its major metabolites in the anaesthetised dog. *Cardiovasc. Res.*, 12: 247-54, 1978.
- NEVILLE, J. R. Hemoglobin Oxygen affinity measurements using bionometry. *J. appl. Physiol.*, 37(6): 967-71, 1974.
- NIKOLOV, R.; LENIGER-FOLLERT, E. The effect of papaverine on local tissue PO₂ and microflow in cat brain cortex. *Naunyn Schmedeberg Archs Pharmac.*, 305: 149-54 1978.
- NILSSON, H.; JONASSON, T. & RINGQVIST, I. Treatment of digital vasospastic disease with the calcium entry blocker Nifedipine. *Acta Med. Scand.*, 215: 135-9, 1984.
- OLIVEIRA, S. F. Tratamento clínico da insuficiência coronariana. *Rev. Bras. Clin. Terap.*, 12(5): 20-8, 1983.
- PALMER, D. W. Pentaerythritol tetranitrate. *New Engl. J. Med.*, 276(17): 989, 1967.
- PANTELY, G. A.; OYAMA, A. A.; METCALFE, J.; LAWSON, M. S. & WELCH, J. E. Improvement in the relationship between Flow to ischemic myocardium and the Extent of necrosis with glycolytic intermediates that decrease Blood Oxygen Affinity in dogs. *Circulation Res.*, 49(2): 395-404, 1981.
- PAP J. G.; FISCHER, E. *Eur. J. Pharmac.*, 2: 1, 1967. *Apud*: CHARLIER, R. *Antianginal drugs*. Handbook of Experimental Pharmacology, Berlin, Springer-Verlag, 1971, v.31, 430p.
- PAULING, L. *Proc. natn. acad. Sci. U.S.A.*, 21: 186, 1935. *Apud*: ANTONINI, E. & BRUNORI, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands*. Amsterdam, North Holland, 1971, 436 p.
- PENDLETON, R. G.; NEWMAN, D. J.; & SHERMAN, S. S. Effect of propranolol upon the Oxygen dissociation Curve. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 180: 647-56, 1972.
- PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature, Lond.*, 228: 726-37, 1970.
- PERUTZ, M. F. Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Scient. American*, 239(6): 68-87, 1978.
- POYART, C. F.; BURSAUX, E. & BOHN, B. An estimation of the First binding Constant to Human Hemoglobin A. *Eur. J. Biochem.*, 87: 75-83, 1978.

- RAVIN, M. B.; DRURY, W. L.; KEITT, A. S. & DAICOFF, G. Red-cell 2,3-Diphosphoglycerate in Surgical Correction of Cyanotic Congenital Heart Disease. *Anesthes. Analgesy*, 52(4): 599-603, 1973.
- REICHLIN, M.; UDEM, L. & RANNEY, H. M. The effect of specific antibody on the Oxygen Equilibrium of Human hemoglobin. *Biochem. biophys. Acta* 175: 49-54, 1969.
- RIGGS, T. E.; SHAFER, A. W. & GUENTER, C. A. Acute changes in oxyhemoglobin affinity. *J. clin. Invest.*, 52: 2660-3, 1973.
- ROSE, Z. B. & PIZER, L. I. The Hydrolysis of Phosphate Esters of α -Hydroxy Acids Catalyzed by Molybdate. *J. biol. Chem.*, 243(18): 4806-9, 1968.
- ROSE, Z. B. & LIEBOWITZ, J. Direct determination of 2,3- Diphosphoglycerate. *Analyt. Biochem.*, 35: 177-80, 1970.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the Oxygen and carbon monoxide equilibria of human Myoglobin. *Archs. Biochem. Biophys.*, 77: 478-91, 1958.
- ROUGHTON, F. J. W.; OTIS, A. B. & LYSTER, R. L. J. The determination of the individual equilibrium constants of the four intermediate reactions between oxygen and sheep hemoglobin. *Proc. R. Soc. B*, 144: 29-54, 1955.
- SAKAMOTO, M. M. Efeitos farmacológicos de alcalóides benzil isoquinolínicos sobre a musculatura traqueal de cobaias. Campinas, 1983 *Tese (mestrado)* UNICAMP, Instituto de Biologia.
- SAMAJA, M. & WINSLOW, R. M. The separate effects of hydrogen and 2,3-Diphosphoglycerate on the oxygen equilibrium Curve of human Blood. *Br. J. Haemat.*, 41: 373-81, 1979.
- SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51: 660-72, 1949.
- SCHEJTER, A.; ADLER, A. D. & GLAUSER, C. S. Stoichiometry of hemoglobin reactions. *Science*, 141: 784-8, 1963.
- SHAPPEL, S.; LENFANT, C. J. M. Adaptative, Genetic and Iatrogenic Alterations of the Oxyhemoglobin Dissociation Curve. *Anesthesiology*, 37(2): 127-39, 1972.
- SIGMA Technical Bulletin, Nb. 665. *The Colorimetric enzymatic determination of 2,3-DPG in blood*. 1974.
- SPIEGEL, M. R. *Estatística: resumo da teoria*. São Paulo, Mac Graw Hill do Brasil, 1974, 580 P.
- STONE, P. H.; MULLER, J. E.; TURI, Z. G.; GELTMAN, E. JAFFE, A. S. & BRAUNWALT, E. Efficacy of Nifedipine therapy in patients with refractory angina pectoris: Significance of the presence of coronary vasospasm. *Am. Heart J.*, 106(4): 644-52, 1983.
- SUGIMOTO, T. & ISHIKAWA, T. Effects of antianginal medication on Hemoglobin affinity for oxygen. *Am. Heart J.*, 84(4): 570, 1972.
- SULLIVAN, S. F. Oxygen Transport. *Anesthesiology*, 37(2): 140-7, 1972.
- SUMMER, J. B. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*, 100(2601): 413-4, 1944.

- SUTHERLAND, E. W.; POSTERNACK, T. & CORI, C. F. Mechanism of the action of phosphoglucosmutase and phosphoglyceric acid mutase. *J. biol. Chem.*, 179: 501-9, 1949.
- SWEATMAN, T.; STRAUSS, G.; SELZER, A. & COHN, K. E. The long-acting hemodynamic effects of Isosorbide Dinitrate. *Am. J. Cardiol.*, 29: 475-80, 1972.
- SZABO, A. & KARPLUS, M. A Mathematical Model for Structure Function Relations in Hemoglobin. *J. mol. Biol.*, 72: 163-97, 1972.
- SZABO, A. & KARPLUS, M. Analysis of the interaction of Organic Phosphates with Hemoglobin. *Biochemistry*, 15(13): 2869-77, 1976.
- THADANI, U.; FUNG, H.-L.; DARKE, A. C. & PARKER, J. O. Oral Isosorbide dinitrate in the treatment of angina pectoris. *Circulation*, 62(3): 491-502, 1980.
- TRINER, L.; VULLEIMAS, Y.; SHWARTZ, J. & NAHAS, G. G. Cyclic phosphodiesterase Activity and the action of Papaverine. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 40(1): 64-9, 1970.
- TUCKER, H.; CARSON, P.; BASS, N. & J. MASSEY Prenylamine in treatment of angina. *Br. Heart J.*, 36: 1001-4, 1974.
- VAN BEEK, G. G. M. & DE BRUIN, S. H. The pH dependence of the binding of D-glycerate 2,3-biphosphate to deoxy hemoglobin and oxy hemoglobin. *Eur. J. Biochem.*, 100: 497-502, 1979.
- VAN SLYKE, D. D. & NEILL, J. M. The determination of gases in blood and other solutions by vacuum extraction and manometric measurement. *J. biol. Chem.*, 61: 523-73, 1924.
- VAN SLYKE, D. D. & SENDROY, J. Jr. Manometric Analysis of gas mixtures, I - V. *J. biol. Chem.*, 95: 509-530, 531-546, 547-568, 569-586, 587-599, 1932.
- VAZZOLER, A. E. A. M. *Manual de Métodos para estudos biológicos de população de peixes: Reprodução e crescimento*. Brasília, CNPq, 1976, cap. 18, p.99-106.
- VERHULST, P. F. Notice sur la population sit dans son accroissement. *Corresp. Math. et phys.*, 10: 113-121, 1838.
- WARREN, S. G.; BREWER, D. L. & ORGAIN, E. S. Long-term Propanolol therapy for angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, 37: 420-6, 1976.
- WHITING, R. B.; KLEIN, M. D. & LOWN, B. Variant angina pectoris. *New Engl. J. Med.*, 282: 709, 1970.
- WILSON, R. S. & LAVER, M. B. Oxygen Analysis. *Anesthesiology*, 37(2): 112-127, 1972.
- WOODSON, R. D. & TORRANCE, J. D. The effect of cardiac disease on Hemoglobin Oxygen binding. *J. clin. Invest.*, 49: 1349-56, 1970.
- WYMAN, J. Jr. Heme Proteins. *Adv. Protein Chem.*, 4: 407-531, 1948.
- WYMAN, J. Jr. Linked functions and reciprocal effects in Hemoglobins: a second look. *Adv. Protein Chem.*, 19: 283-6, 1964.
- WYMAN, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* 89: 2202, 1967. *Apud*: ANTONINI, E. & BRUNORI, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands*. Amsterdam, North Holland, 1971, 436 p.

ZACHARA, B. The effect of persantin on the phosphate compounds in erythrocytes during blood conservation. *Acta Haemat.*, 48: 164, 1972.

11 Apêndice

```
10 DIM Z(10,3), Y(10,3), YM(10), CY(10), LY(10), LP(10), W(10,3), PO(10), O1(10), D1(10),  
    K1(10,3), O4(10), K2(10), K3(10), K4(10), K5(10), K6(10), V1(10)  
11 DIM R(10),M(10),R1(10),M1(10)  
90 CADF = "4x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3"  
100 PRINT "ENTRE COM O NÚMERO DE ADIÇÕES DE AR"  
110 INPUT N  
120 FOR J = 1 TO N  
122 PRINT "ENTRE COM O VOLUME DE AR INJETADO"; J;  
125 INPUT V1(J)  
127 NEXT J  
128 FOR I = 1 TO 3  
130 PRINT "ENTRE COM O VALOR DE OXI-Hb";I;  
140 INPUT O1(I)  
150 PRINT "ENTRE COM O VALOR DE DEOXI-Hb" ;I;  
160 INPUT D1(I): NEXT I  
170 FOR J = 1 TO N  
172 PRINT "ENTRE COM AS ABSORBÂNCIAS EM 540nm"; J;  
174 INPUT W(J,1)  
176 NEXT J  
178 FOR J = 1 TO N  
180 PRINT "ENTRE COM AS ABSORBÂNCIAS EM 560nm"; J;  
182 INPUT W(J,2)  
184 NEXT J  
186 FOR J = 1 TO N  
188 PRINT "ENTRE COM AS ABSORBÂNCIAS EM 576nm" ;I;  
190 INPUT W(J,3)  
192 NEXT J  
220 PRINT "DESEJA CALCULAR A CTE TONOMÉTRICA KT? S/N?"  
230 INPUT X1  
240 IF X1$ = <> "S" THEN GOTO 360  
250 PRINT "ENTRE COM A PORCENTAGEM DE O2 NA ATMOSFERA"  
260 INPUT V2  
270 PRINT "ENTRE COM A PRESSÃO DO VAPOR D'ÁGUA"  
280 INPUT WP  
290 PRINT "ENTRE COM O VOLUME DO TONÔMETRO"  
300 INPUT V  
310 PRINT "ENTRE COM O VOLUME DA FASE LÍQUIDA NO TONÔMETRO"  
320 INPUT VL  
330 PRINT "ENTRE COM A PRESSÃO BAROMÉTRICA"  
340 INPUT BP  
345 FOR J = 1 TO N  
350 PO(J) = ((BP-WP)*V2 / (V-VL))* V1(J)
```

```

355 NEXT J
357 IF X1$ = "S" THEN GOTO 390
360 PRINT "ENTRE COM A CTE TONOMÉTRICA,KT"
370 INPUT KT
375 FOR J = 1 TO N
378 PO(J) = 0
380 PO(J) = KT * V1(J)
385 NEXT J
390 PRINT "DESEJA CALCULAR PELO MÉT.P/EQUIL.ANISOBÉSTICOS? S/N?"
400 INPUT N2$
410 IF N2$ = "S" THEN GOTO 566
420 X1 = (O1(1) - O1(2)) / O1(2)
430 X2 = (O1(3) - O1(2)) / O1(2)
440 H1 = (D1(1) - D1(2)) / D1(2)
450 H2 = (D1(3) - D1(2)) / D1(2)
460 X3 = X1 - H1
470 X4 = X2 - H2
480 FOR J = 1 TO N
490 Z(J,1) = (W(J,1) - W(J,2)) / W(J,2)
500 Z(J,2) = (W(J,3) - W(J,2)) / W(J,2)
510 Y(J,1) = (Z(J,1) - H1) / X3
520 Y(J,2) = (Z(J,2) - H2) / X4
530 YM(J) = (Y(J,1) + Y(J,2)) / 2
540 CY(J) = YM(J) / (1 - YM(J))
550 LY(J) = LOG(CY(J)) : R(J)=CSNG(LY(J))
560 LP(J) = LOG(PO(J)) : M(J)=CSNG(LP(J))
561 NEXT J
562 FOR I = 1 TO N
563 PRINT ("4x,f5.1,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3") V1(I), W(I,1),W(I,2), W(I,3),R(I),M(I)
564 NEXT I
566 PRINT "DESEJA CALCULAR PELO MÉTODO P/ EQUIL. ISOBÉSTICOS? S/N?"
567 INPUT B$
572 IF B$ = "S" THEN GOTO 774
580 FOR J = 1 TO 3
590 O4(J) = ABS(O1(J) - D1(J))
600 FOR I = 1 TO N
610 K1(I,J) = ABS(W(I,J) - D1(J))
620 NEXT I
630 NEXT J
638 O5 = 0
640 FOR J = 1 TO 3
650 O5 = O5 + O4(J)
660 NEXT J
665 FOR J = 1 TO N

```

```

668 K2(J) = 0
670 FOR I = 1 TO 3
675 K2(J) = K2(J) + K1(J,I)
680 NEXT I
690 NEXT J
700 FOR I = 1 TO N
705 K3(I) = 0
710 K3(I) = K2(I) / O5
715 K4(I) = 0
720 K4(I) = K3(I) / (1 - K3(I))
725 K5(I) = 0
730 K5(I) = LOG(K4(I)) : R1(I) = CSNG(K5(I))
740 K6(I) = LOG(PO(I)) : M1(I) = CSNG(K6(I))
750 NEXT I
770 FOR I = 1 TO N
772 PRINT ("4x,f5.1,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3") V1(I), W(I,1), W(I,2), W(I,3), R1(I), M1(I)
773 NEXT I
774 GOTO 1000
780 PRINT "DESEJA IMPRIMIR? S/N?"
782 INPUT A$
784 IF A$ = "S" THEN GOTO 1300
786 LPRINT " DEOXI"; LPRINT (CADF$) D1(1), D1(2), D1(3)
788 LPRINT " OXI "; LPRINT (CADF$) O1(1), O1(2), O1(3)
790 IF N2$ = "S" THEN GOTO 816
800 FOR I = 1 TO N
810 LPRINT ("4x,f5.1,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3") V1(I), W(I,1), W(I,2),
W(I,3), R1(I), M1(I)
812 NEXT I
813 LPRINT " N(ANISO)= "; BE
814 LPRINT " LOG P50(ANISO)= "; X8
816 IF B$ = "S" THEN GOTO 1000
820 FOR I = 1 TO N
825 LPRINT ("4x,f5.1,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3,5x,f6.3") V1(I), W(I,1), W(I,2),
W(I,3), R1(I), M1(I)
826 NEXT I
827 LPRINT " N(ISO) = "; BA
828 LPRINT " LOG P50(ISO) = "; X9
830 GOTO 1300
1000 IF N2$ = "S" THEN GOTO 1150
1008 L7 = 0: L8 = 0: L9 = 0: L6 = 0
1010 FOR I = 1 TO N
1020 L7 = L7 + LP(I) * LY(I)
1030 L8 = L8 + LP(I)
1040 L9 = L9 + LY(I)

```

```

1050 L6 = L6 + LP(I) * LP(I)
1060 NEXT I
1070 BD = (L9 * L6 - L8 * L7) / (N * L6 - L8 * L8)
1080 BE = (N * L7 - L8 * L9) / (N * L6 - L8 * L8)
1090 X8 = -BD / BE
1100 PRINT " N(ANISO) = "; BE
1110 PRINT "LOG P50(ANISO) = "; X8
1150 IF B$ = "S" THEN GOTO 1300
1158 K7 = 0: K8 = 0: K9 = 0: KA = 0
1160 FOR I = 1 TO N
1170 K7 = K7 + K6(I) * K5(I)
1180 K8 = K8 + K6(I)
1190 K9 = K9 + K5(I)
1200 KA = KA + K6(I) * K6(I)
1210 NEXT I
1220 BO = (K9 * KA - K8 * K7) / (N * KA - K8 * K8)
1230 BA = (N * K7 - K8 * K9) / (N * KA - K8 * K8)
1240 PRINT " N(ISO)= "; BA
1250 X9 = -BO/BA
1260 PRINT " LOG P50(ISO)= "; X9
1265 GOTO 780
1300 PRINT "DESEJA INICIAR NOVOS CÁLCULOS? S/N?"
1310 INPUT X5$
1320 IF X5$ = "S" THEN GOTO 100
1325 PRINT "Eneida/Dinho 1987"
1330 PRINT "FIM DE TRABALHO"
1340 END

```