

**BC/18212**

**IB/81135**



**UNICAMP**

**"ESTRUTURA-FUNÇÃO E EVOLUÇÃO  
EM HEMOGLOBINAS DE OFÍDIOS"**

GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

Orientador: Aldo Focesi Junior

Setembro/1992

347



GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

"ESTRUTURA-FUNÇÃO E EVOLUÇÃO EM HEMOGLOBINAS DE OFÍDIOS"

Professor Orientador:

Dr. ALDO FOCESI Jr.

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Genética.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)

*Gustavo Orlando Bonilla  
Rodriguez*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Aldo Focesi Jr.* 30/09/92

CAMPINAS, S.P., 1992.

UNIDADE	10/76
N.º CHAMADA	8642e
V. TO	18.212
PROD.	215/92
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 100.000,00
DATA	07/11/92
N.º CPD	

CM-00036273-3

À Heide, cuja ajuda e estímulo tem  
me acompanhado em todos os momen-  
tos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Aldo Focesi Jr. pela orientação e amizade.

Aos colegas de trabalho Professoras Dras. Maria S. Arita Matsuura e Satie H. Ogo, Cristina L. Nagatomo, Sérgio Oyama Jr., Maria I. Galdames Portus, Mickie Takagi e Ester Rocha, pela colaboração e incentivo.

Ao Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, pela concessão de uma bolsa de Doutorado.

À CAPES pelas bolsas de Doutorado e "sandwich", e à FAEP (UNICAMP) e Strohtech (Detroit, Michigan, E.U.A.) pelo apoio financeiro suplementar.

Ao Professor Giuseppe Puerto do Instituto Butantan (São Paulo) pelo fornecimento de serpentes e de valioso material informativo.

A Paulo Roberto Manzani do Departamento de Zoologia da UNICAMP, pelo fornecimento de serpentes e de informações, bem como pela ajuda na manipulação dos animais.

Aos Dres. Joseph e Celia Bonaventura, Diretores do Marine Biomedical Center, vinculado à Duke University (Beaufort, Carolina do Norte, E.U.A.) por terem possibilitado a conclusão da fase experimental em seus laboratórios.

Aos pesquisadores e técnicos do centro citado acima, em particular a Gerald Godette, Dr. Robert Cashon, Shirley Tesh, Giulia Ferruzzi, Dr. Marius Brouwer e Bill Hunnings.

À minha mãe pelo incentivo e apoio, e ao meu pai, que na lembrança tem sido sempre uma referência.

Aos amigos, em especial a Odilon, Neyde e Laerte.

## RESUMO

Foram realizados estudos funcionais das hemoglobinas de cinco espécies de serpentes com o objetivo de verificar a existência ou não do fenômeno de transição molecular oxidímero-desoxitetramero descrito na hemoglobina de Liophis miliaris<sup>1</sup>. As espécies de ofídios selecionadas para este trabalho representam diferentes habitats e comportamentos, sendo quatro delas achadas na nossa fauna (Crotalus durissus terrificus, Bothrops alternatus, Oxyrhopus trigeminus quibei e Mastigodryas bifossatus) e uma no sudeste asiático (Acrochordus javanicus). Os hemolisados analisados por isoeletrofocalização mostraram a existência de pelo menos dois componentes principais em todas as espécies, o que foi corroborado pela determinação do número de globinas. O ponto isoelétrico das hemoglobinas é elevado ( $pI > 8$ ).

As propriedades funcionais dos hemolisados das espécies brasileiras coincidem em linhas gerais com o padrão descrito para a hemoglobina de L. miliaris, o que pode ser resumido como segue: i) o efeito Bohr alcalino na ausência de ATP é menor do que o medido em hemoglobina humana A; ii) a ligação de O<sub>2</sub> nas mesmas condições mostrou baixa cooperatividade dependente do pH, tornando-se não cooperativa ( $n_{50} = 1$ ) em pH elevado; iii) na presença de ATP as propriedades funcionais mudaram significativamente, diminuindo consideravelmente a afinidade por O<sub>2</sub> e aumentando tanto o efeito Bohr quanto a cooperatividade; iv) a afinidade por O<sub>2</sub> permaneceu sensivelmente maior ainda em pH elevado. O hemolisado da serpente aquática A. javanicus, por outro lado, na ausência de ATP, mostrou maior afinidade pelo O<sub>2</sub>, maior cooperatividade (que também mostra dependência do pH) e um efeito Bohr de -0,46. Na presença do efetor a afinidade por O<sub>2</sub> é maior do que nas espécies brasileiras, e em pH abaixo de 7,5 a cooperatividade é menor do que na ausência de ATP.

A elevação da temperatura dos equilíbrios com O<sub>2</sub> de 20 para 30°C mostrou, do ponto de vista da variação da entalpia, uma menor sensibilidade do hemolisado na presença de ATP, particularmente nas espécies brasileiras (euritérmicas).

Experiências de cinética rápida (dissociação de O<sub>2</sub>, combinação com CO e recombinação com CO após fotólise) mostraram a presença de significativa proporção de espécies moleculares compatíveis com dímeros em todos os hemolisados. A existência de formas tetraméricas e diméricas em transição molecular tem também como apoio evidências obtidas em ultracentrifuga analítica, por filtração em gel e por estimativas de parâmetros do modelo MWC.

Entre as hemoglobinas de vertebrados a transição dímero-tetramero achada em ofídios parece, assim, constituir um elo na evolução desde as formas primitivas monoméricas até as superiores tetraméricas. Tal fenômeno parece estar presente tanto em ofídios considerados primitivos como B. constrictor (FOCESI et al., 1992) e A. javanicus, quanto nas espécies mais evoluídas, representando possivelmente uma vantagem fisiológica para esses animais.

---

<sup>1</sup> MATSUURA et al., Comp. Biochem. Physiol. 86A, 683-687, 1987.

## ABSTRACT

The present work represents functional studies performed on the hemoglobins from five snake species with the purpose of verifying the presence or not of the molecular transition phenomenon between oxydimers and deoxytetramers described in Liophis miliaris<sup>2</sup>. The snake species selected represent different habitats and behaviors. Four of them are commonly found in Brazil (Crotalus durissus terrificus, Bothrops alternatus, Oxyrhopus trigeminus quibei and Mastigodryas bifossatus) and the other one is from the southeast of Asia (Acrochordus javanicus). The analysis of the hemolysates by isoelectric focusing showed the existence of at least two major components for all the species, what was verified by the determination of the number of globin chains. The isoelectric point of these hemoglobins is high (pI>8).

The functional properties of the hemolysates of the Brazilian species are similar to those described for L. miliaris Hb, and could be summarized as follows: i) the alkaline Bohr effect in the absence of ATP is lower than in human hemoglobin A; ii) O<sub>2</sub> binding in the same conditions showed low cooperativity that is pH dependent, becoming non-cooperative (n<sub>H</sub>=1) on higher pH values; iii) in the presence of ATP large changes are observed in the functional properties, decreasing significantly the O<sub>2</sub>-affinity and increasing both the Bohr Effect and the cooperativity; iv) the O<sub>2</sub>-affinity in the presence of ATP remained considerably higher even at high pH. On the other side, A. javanicus' hemolysate in the absence of ATP presented higher O<sub>2</sub>-affinity (also pH dependent) and a Bohr effect of -0.46. In the presence of the effector the O<sub>2</sub>-affinity is still higher than for the Brazilian species, and at pH less than 7.5 the cooperativity was lower than in the absence of ATP.

An increase of the temperature of O<sub>2</sub>-equilibria from 20 to 30°C showed, from the standpoint of enthalpy change, a lower sensitivity of the hemolysates in the presence of ATP, especially for the Brazilian species (eurythermals).

Rapid kinetics experiments (O<sub>2</sub>-dissociation, CO-combination and CO-recombination after flash photolysis) showed for all the hemolysates the presence of significant proportion of molecular species compatible with dimers. The existence of tetrameric and dimeric forms in molecular transition has also support obtained with analytical ultracentrifuge, gel filtration and by estimatives of the parameters of the MWC model.

Snake hemoglobins seem to constitute, among vertebrates, an intermediate stage on the evolution between the primitive monomeric forms and the evolved tetrameric proteins. This phenomenon appears to be present in ophidia considered as primitive like B. constrictor (FOCESI et al., 1992) and A. javanicus, as well as in the evolved species, maybe representing a physiological advantage for those animals.

---

<sup>2</sup> MATSUURA et al., Comp. Biochem. Physiol. 86A, 683-687, 1987.

## Abreviações utilizadas

<b>ΔH</b>	Variação da entalpia
<b>ΔH<sup>+</sup></b>	efeito Bohr
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>bis-Tris</b>	bis-Tris(hidroximetil)aminometano
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>Hb</b>	hemoglobina
<b>Hb<sup>+</sup></b>	metemoglobina
<b>HbA<sub>0</sub></b>	hemoglobina humana A <sub>0</sub>
<b>HEPES</b>	ácido (N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etano) sulfônico
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de elevado rendimento
<b>IHP</b>	inositol hexafosfato
<b>K<sub>4,2</sub></b>	constante de associação dímero-tetrâmero. Os índices "T" e "R" referem-se aos estados "tenso" e "relaxado" do modelo de Monod-Wyamn-Changeux (K <sub>4,2</sub> <sup>T</sup> e K <sub>4,2</sub> <sup>R</sup> respectivamente).
<b>log</b>	logaritmo decimal
<b>pI</b>	ponto isoelétrico
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano



# Í N D I C E

I	INTRODUÇÃO.....	1
i	Hemoglobina: estrutura fundamental.....	1
ii	Propriedades funcionais.....	6
iii	Modelos teóricos.....	13
iv	Hemoglobina sob o ponto de vista genético e evolutivo.....	14
v	Hemoglobinas de ofídios.....	17
vi	Objetivos deste trabalho.....	19
II	MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
i	Obtenção e manutenção dos animais.....	22
ii	Coleta de sangue e preparação do hemolisado.....	22
iii	Preparação do hemolisado isento de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular.....	23
iv	Análise e separação de componentes.....	23
v	Análise espectrofotométrica de curvas de dissociação de oxigênio.....	24
vi	Estudos de cinética rápida de dissociação de oxigênio e recombinação de monóxido de carbono.....	27
vii	Efeito da temperatura sobre a afinidade das hemoglobinas por oxigênio.....	31
viii	Estudos de sedimentação em ultracentrífuga analítica.....	32
ix	Filtração em gel.....	32
x	Estimativa dos parâmetros dos modelos de Adair e MWC.....	33
III	RESULTADOS.....	34
i	Estudos eletroforéticos, de isoeletrofocalização e de separação de componentes.....	34
ii	Estudos funcionais.....	37
iii	Cinética rápida.....	46
iv	Estudos de sedimentação em ultracentrífuga analítica.....	48
v	Filtração em gel.....	50
vi	Estimativa de parâmetros dos modelos de Adair e MWC.....	51
VI	DISCUSSÃO.....	59
V	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**i) Hemoglobina: estrutura fundamental**

A hemoglobina é o pigmento respiratório mais importante e de maior distribuição na natureza. Sua função primordial é o transporte de oxigênio (O<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) entre os meios ambiente e interno tanto em vertebrados quanto em invertebrados (moluscos, artrópodes, anelídeos). A hemoglobina pode, ainda, ser encontrada em vegetais (leguminosas, alfafa), e em microorganismos como fungos (leveduras), protozoários (Paramecium, Tetrahymena) e bactérias, tendo sido propostas várias hipóteses para a sua função nesses organismos (SCHMIDT-NIELSEN, 1975; RIGGS, 1991a). Segundo LANDSMANN et al. (1986) os genes de globina podem estar amplamente distribuídos em plantas mais evoluídas, e possivelmente tenham sido derivados de um ancestral comum entre animais e vegetais. As hemoglobinas, independentemente de sua origem, possuem subunidades de estrutura semelhante à mioglobina, o reservatório de oxigênio dos músculos. Em invertebrados há tanto hemoglobinas que possuem elevado peso molecular de vários milhões de dalttons (com até 100 subunidades de globina) quanto hemoglobinas de baixo peso molecular, em quatro padrões básicos propostos por VINOGRADOV (1985). As hemoglobinas de vertebrados em geral são tetraméricas, com duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas beta ( $\beta$ ) com peso molecular em torno

de 64.000 dáltons.

De acordo com HOCHACHKA et al. (1973), não há melhor exemplo de adaptaao bioquímica ao ambiente do que a hemoglobina de vertebrados, a qual tem servido de modelo para o estudo de proteínas alostéricas em geral e tem sido denominada "enzima honorária". Esta denominaao baseia-se, segundo RIGGS (1991b), na ausência de atividade catalítica por um lado e por a molécula possuir todas as propriedades esperadas para uma proteína regulatória por outro (cabe aqui observar que a hemoglobina apresenta algumas atividades catalíticas, pelo menos *in vitro*).

Didaticamente a molécula de hemoglobina possui além da parte protéica (globina) um grupo prostético constituido de protoporfirina IX ligada a  $Fe^{2+}$ . Para melhor focar o problema discutiremos resumidamente estes aspectos.

A porão protéica é a responsável pelas diferenças observadas nas propriedades funcionais das diversas hemoglobinas, em funao da composiao de aminoácidos. Segundo PERUTZ (1979) em hemoglobina de *Ascaris* tem se encontrado a maior afinidade por oxigênio, enquanto que em algumas hemoglobinas de peixes em pH baixo teriam sido registradas as menores afinidades pelo gás, com uma variaao entre elas de 250 mil vezes.

De forma geral, a proteína presente em vertebrados é constituida de quatro cadeias de globina: duas  $\alpha$  e duas  $\beta$  idênticas entre si (fig. 1). As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  diferem na

seqüência primária e no número de resíduos; em geral as alfa possuem 141 enquanto as beta 146 aminoácidos. EATON (1980) divide os resíduos de hemoglobina do ponto de vista funcional em cinco categorias: a) resíduos que formam uma fenda hidrofóbica para o heme, a qual evita a oxidação do átomo de ferro de  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$  (estes resíduos também transmitem mudanças estruturais causadas pela oxigenação ou desoxige-

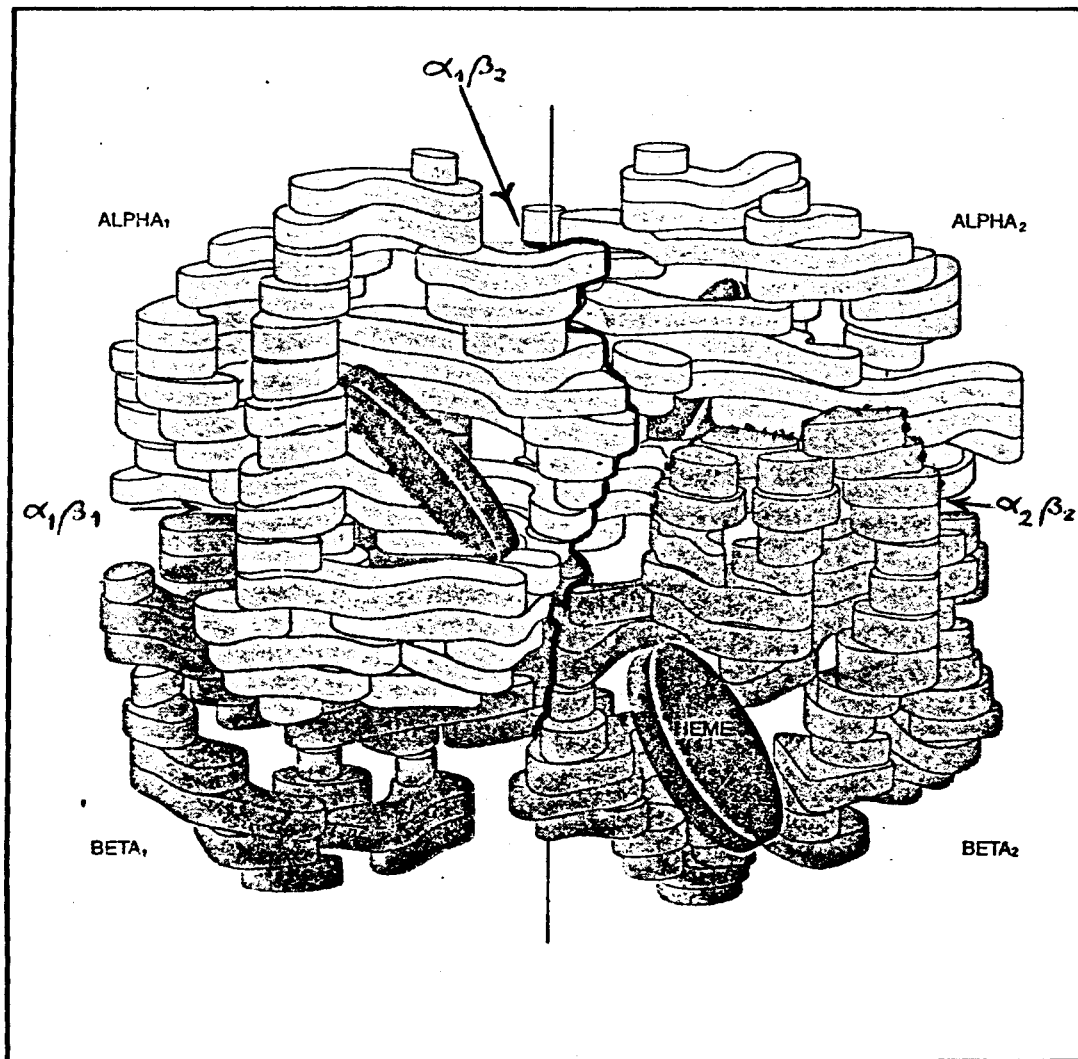


Figura 1 Molécula de hemoglobina mostrando as quatro globinas (2  $\alpha$  e 2  $\beta$ ), e os contatos interdiméricos  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_1\beta_2$  (PERUTZ, 1978).

nação do heme para o contato  $\alpha_1\beta_2$ , b) resíduos da interface  $\alpha_1\beta_2$ , c) aminoácidos no contato  $\alpha_1\beta_1$ , d) resíduos da cadeia beta envolvidos na ligação de fosfato, e e) aminoácidos que participam do efeito Bohr (efeito do pH sobre a afinidade por oxigênio, a ser discutido no ítem seguinte).

As globinas  $\alpha$  e  $\beta$  são constituídas de sete e oito segmentos helicoidais respectivamente, denominados com as letras A até H, e os resíduos recebem um número de acordo com a sua posição em relação ao grupo N terminal. Existem também segmentos não helicoidais que são denominados NA (correspondentes aos resíduos N terminal), AB, CD, até GH e HC (para a carboxila terminal) (PERUTZ, 1979).

Quanto ao seu grupo prostético podemos esclarecer que as porfirinas têm a capacidade de se combinar com íons metálicos. No caso da hemoglobina o átomo é ferro como vimos, o qual liga-se simultaneamente a quatro nitrogênios pirrólicos que o mantém no plano do heme (Fig. 2). As duas valências restantes estão situadas uma de cada lado do plano do heme. A quinta posição de coordenação do heme conecta-se com a globina através da histidina proximal (F8). A sexta valência liga uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) que por sua vez interage com um outro resíduo de histidina chamado distal (E7).

O átomo de ferro do núcleo do heme se mantém no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) durante os processos de oxigenação e desoxigenação, devendo permanecer nessa condição para apresentar suas propriedades funcionais. A oxidação do ferro ( $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ )

produz a chamada metemoglobina ( $Hb^+$  ou Met-Hb), incapaz de realizar a oxigenação de forma reversível. Na hemácia, um sistema enzimático reduz a pequena quantidade de Met-Hb que é formada *in vivo* para a forma ferrosa.

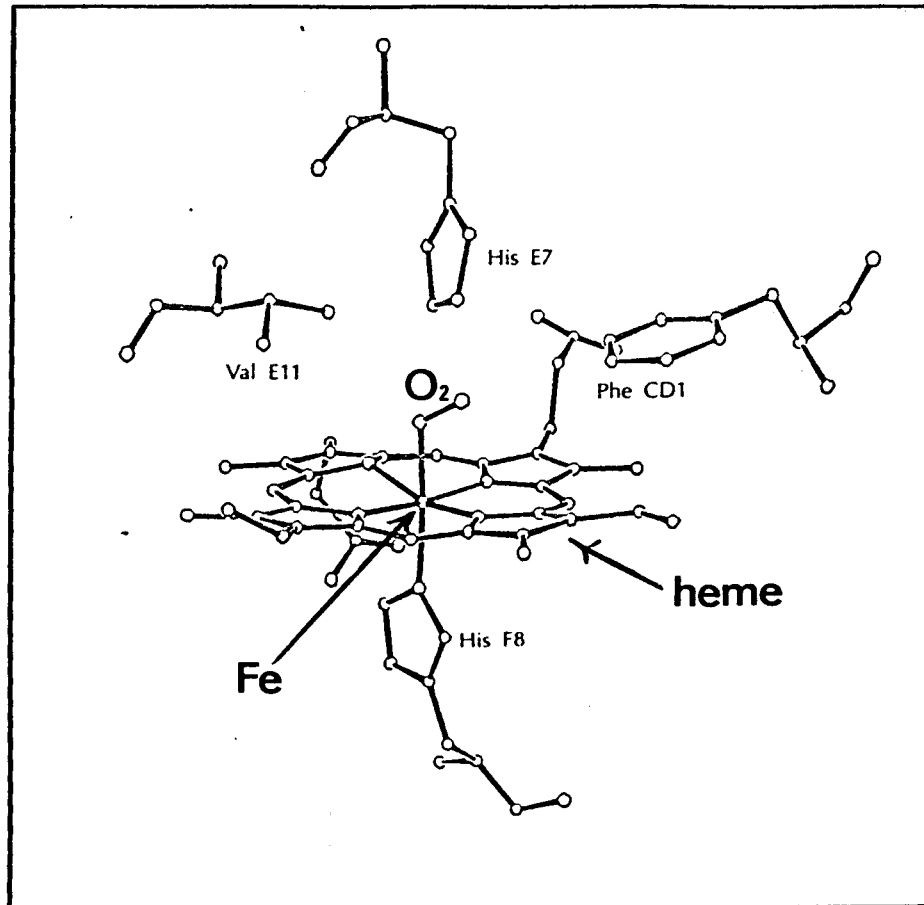


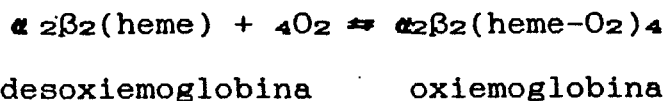
Figura 2 Núcleo heme mostrando os contatos com os resíduos mais importantes citados no texto (RIGGS, 1991b).

No estado ferroso a hemoglobina pode ligar  $O_2$ , CO e NO. Os derivados correspondentes são denominados de oxiemoglobina, carboxiemoglobina e nitrosoemoglobina respectivamente. Quando oxidada, a Hb pode combinar-se com vários ânions:

cianeto (CN<sup>-</sup>), azida (N<sup>-3</sup>), tiocianato (SCN<sup>-</sup>), fluoreto (F<sup>-</sup>), H<sub>2</sub>S, OH<sup>-</sup>, etc.

## ii) Propriedades funcionais

A função fundamental da hemoglobina como dissemos é o transporte de oxigênio nos animais das superfícies de trocas gasosas até os tecidos segundo a seguinte reação reversível:



A curva de saturação da hemoglobina tetramérica de vertebrados<sup>1</sup> é sigmoideal, o que permite sua saturação por O<sub>2</sub> quase completa a nível pulmonar, e facilita sua liberação em valores de tensão de gás encontrados aos níveis teciduais (Fig. 3). Este comportamento sigmoideal demonstra, ainda, a existência de interação ou cooperatividade entre as subunidades durante a interação com o O<sub>2</sub>. Esta cooperatividade advém de mudanças conformacionais entre duas formas da mesma espécie molecular com diferente afinidade pelo O<sub>2</sub>, isto é, a desoxi e oxiemoglobina. A medida da cooperatividade é expressa por uma unidade empírica calculada por Hill na seguinte equação:

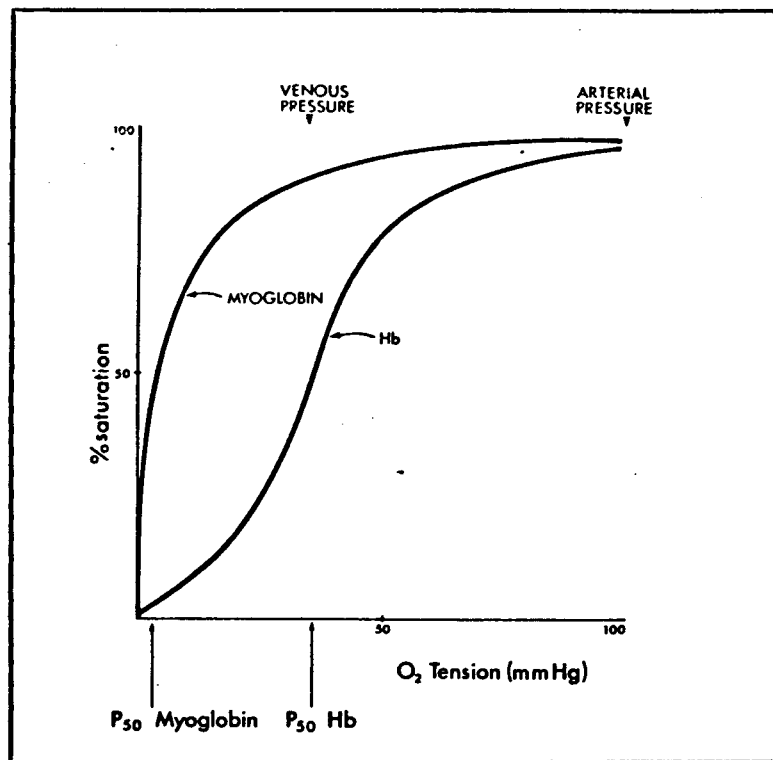
$$Y = K \cdot p\text{O}_2^n / (1 + K \cdot p\text{O}_2^n)$$

onde "Y" é a saturação fracional com O<sub>2</sub>, "K" é a constante

---

<sup>1</sup> Algumas Hbs tetraméricas de invertebrados parecem não apresentar cooperatividade (Garey et al., 1984).

de equilíbrio representando a afinidade pelo gás, " $pO_2$ " é a pressão parcial de  $O_2$  (em mm Hg) e "n" é o chamado "coeficiente de Hill". Na ausência de interação ou cooperatividade entre as subunidades "n" assume o valor de 1, como é o caso da mioglobina ou de hemoglobinas diméricas<sup>2</sup>, cuja curva de



**Figura 3** Curvas de saturação da hemoglobina e da mioglobina mostrando a forma diferente decorrente da cooperação entre as subunidades (HOCHACHKA et al., 1973).

oxigenação (saturação versus a pressão parcial de  $O_2$ ) é hiperbólica (Fig. 3).

O outro parâmetro que caracteriza o comportamento fun-

---

<sup>2</sup> Existem exceções em Hbs diméricas de invertebrados, cujos estudos mostram ligação cooperativa decorrentes de particularidades estruturais (Royer et al., 1985; Tyree et al., 1987).



cional da hemoglobina é o " $P_{50}$ ", que corresponde à pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50 % dos sítios de ligação (hemes), equivalente a " $K_m$ " (constante de Michaelis), usada para enzimas. O  $P_{50}$  é usado na prática como medida da afinidade da Hb por oxigênio, com a ressalva evidente de que o  $P_{50}$  é inversamente proporcional à atividade; quanto maior for o valor de  $P_{50}$ , menor será a afinidade da hemoglobina pelo  $O_2$ . Ambos os parâmetros podem ser calculados a partir do "Gráfico de Hill", que é a representação gráfica de uma curva de oxigenação onde cada ponto representa um par " $\log Y/(1-Y)$ " versus " $\log pO_2$ " (Fig. 4). " $Y$ " e " $pO_2$ " têm o mesmo significado antes descrito. A figura também mostra graficamente como são feitos os cálculos dos valores da tangente " $n$ " da curva, a que deve ser calculada em torno de 50 % de saturação (LEVITZKI, 1978). Nessa condição  $\log (Y/(1-Y))=0$  e " $P_{50}$ " é a pressão parcial de  $O_2$  correspondente. A cooperatividade neste trabalho será representada por " $n_{50}$ ".

Evolutivamente, a hemoglobina adquiriu a capacidade de receber e responder a estímulos do seu ambiente, tais como  $CO_2$ , polifosfatos orgânicos, prótons, etc. Estas propriedades fizeram aumentar sua eficácia no transporte de oxigênio pela interação da hemoglobina com o seu microambiente (o interior do eritrócito). As diferenças estruturais entre hemácias com aparelhagem celular completa e as de mamíferos, possibilitam, às primeiras maior capacidade para a regulação do suprimento de oxigênio para os tecidos, através da interação com os

metabólitos intracelulares. Os moduladores têm em geral afinidade preferencial pelo estado desoxigenado ou "tenso" da hemoglobina chamado "estado T" (de acordo com o modelo de Monod et al., 1965), e a sua ligação confere uma maior estabilidade a esta forma, o que dificulta a passagem para o estado "relaxado" ou oxigenado (estado R).

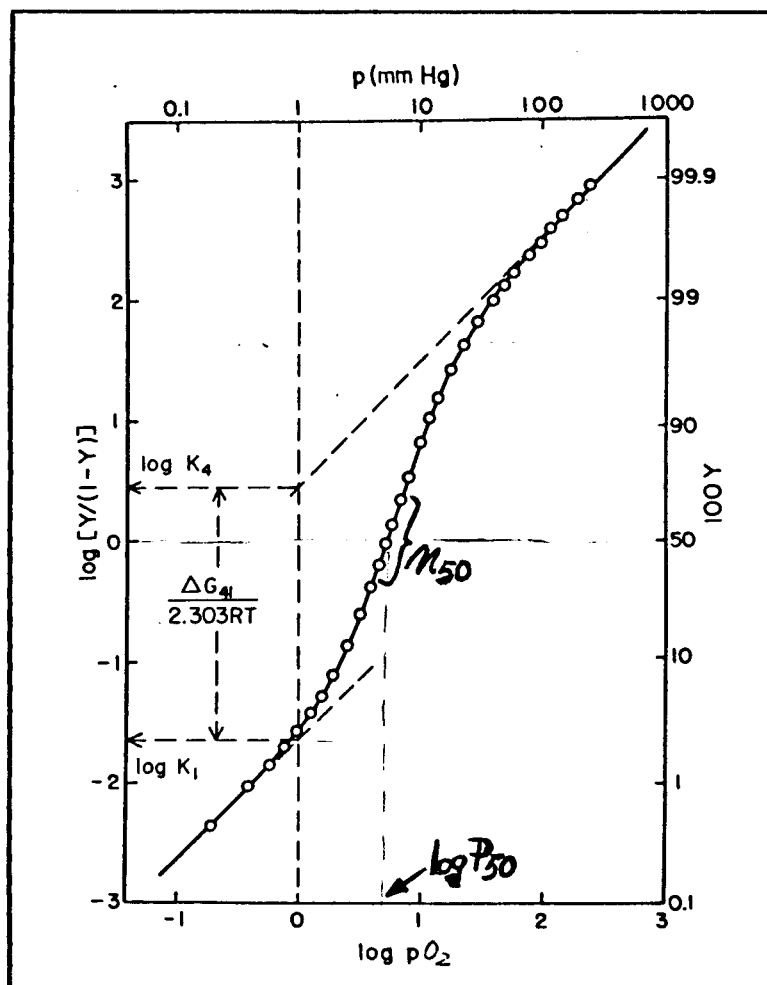


Figura 4 Gráfico de Hill ( $\log [Y/(1-Y)]$  vs.  $\log PO_2$ ) mostrando como são determinados o " $\log P_{50}$ " e a cooperatividade " $n_{50}$ " (IMAI, 1981).

Agindo dessa forma, os moduladores ou "efetores heterotrópicos" diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (moduladores negativos). Estas substâncias são capazes de modificar o comportamento funcional da hemoglobina por se ligarem a sítios que não o heme. Os polifosfatos orgânicos, prótons, cloreto, bicarbonato, uréia, são exemplos de efetores heterotrópicos. Recentes pesquisas apontam, ainda, para o efeito da água de solvatação na regulação alostérica (COLOMBO et al., 1992).

Dependendo do grupo animal, diferentes moduladores foram selecionados evolutivamente: 2,3-DPG em mamíferos, IHP em aves e ATP em vertebrados ectotérmicos, constituem os principais. Dentro do último grupo, temos ainda outros efetores: guanosina trifosfato (GTP), 2,3-DPG, inositol pentafosfato (IPP), etc. (BARTLETT, 1980; PERUTZ, 1984). Entre os peixes parece existir uma relação entre as condições habituais de oxigenação da água e o tipo de nucleotídeo trifosfato (NTP) predominante em seus eritrócitos (WEBER et al., 1988). Em crocodilos a modulação é feita pelo íon bicarbonato (JELKMANN et al., 1980; BAUER et al., 1981; PERUTZ et al., 1981), enquanto que em Squalus acanthias (tubarão) é feita pela uréia, que age como modulador positivo (WEBER et al., 1988).

A seleção de diferentes agentes moduladores se enquadra dentro das adaptações qualitativas exploradas por animais ectotérmicos (WEBER et al., 1988). Outras formas de adaptação incluem:

- variações na concentração de hemoglobina na hemácia,
- variações do hematócrito,
- concentração de metemoglobina na hemácia (embora GRUCA et al., 1980, questionem os altos valores de Hb<sup>+</sup> achados em répteis considerados saudáveis),
- número de grupos sulfidrílicos,
- existência de isoemoglobinas, etc.

Em termos moleculares há, ainda, maiores possibilidades adaptativas, envolvendo mecanismos de associação-dissociação em diversas escalas:

- hemoglobina monomérica (forma oxigenada) em lampréia (BRIEHL, 1963),
- existência de dímeros e tetrâmeros na hemoglobina adulta de Squalus acanthias *in vitro* (após tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M) (FYHN et al., 1975),
- agregação de tetrâmeros em hemoglobina desoxigenada de Rana catesbeiana (ARAKI et al., 1974; TAM et al., 1983),
- transição dímero-tetrâmero na serpente semiaquática Liophis miliaris (MATSUURA et al., 1987) bem como em outros ofídeos (BONILLA et al., 1992; FOCESI et al., 1992).

O efeito específico da diminuição da afinidade por oxigênio produzido pela ligação de prótons denomina-se "Efeito Bohr". Fisiologicamente é de grande importância, uma vez que em condições de acidez facilita a liberação de O<sub>2</sub> para os tecidos. A forma mais simples de calcular este efeito foi proposta por WYMAN (1964):

$$\Delta H^+ = - \partial \log P_{50} / \partial pH = (H^+HbO_2 - H^+Hb)$$

e correlaciona a afinidade por oxigênio com o número de prótons  $H^+$  trocados por heme com o solvente durante a oxigenação (a hemoglobina libera prótons quando se oxigena) segundo a seguinte reação:



$H^+HbO_2$  e  $H^+Hb$  indicam o número de prótons ligados à oxí e desoxiemoglobina respectivamente, em termos de equivalentes por heme. WYMAN (1964) descreveu o processo como sendo devido a mudanças nas constantes de ionização de determinados grupos da hemoglobina durante o processo de oxigenação. Qualquer grupo da hemoglobina que muda o seu  $pK$  entre os estados oxigenado e desoxigenado participa do efeito Bohr, não tendo, necessariamente, uma contribuição particularmente específica para o efeito observado (BUSCH et al., 1990). Essas alterações ocorreriam graças às cargas eletrostáticas desses grupos, devido às mudanças conformacionais da hemoglobina (BUCCI et al., 1985).

A ligação de polifosfatos à desoxiemoglobina ocorre na cavidade central entre as cadeias  $\beta$ , envolvendo na hemoglobina humana (que liga 2,3-DPG) os  $\epsilon$ -amino grupos da valina  $\beta$  1, os imidazóis das histidinas  $\beta$  2 e o  $\epsilon$ -amino grupo da lisina  $\beta$ 82 (BUSCH et al., 1990). Em peixes teleósteos os resíduos que participariam da ligação de ATP apresentam algumas modificações (PERUTZ et al., 1982).

A hemoglobina também participa do transporte de  $CO_2$  dos

tecidos para os pulmões e do equilíbrio ácido-básico do sangue. O transporte de anidrido carbônico, além do mecanismo clássico de tamponamento da hemoglobina, ocorre também por sua combinação com grupos  $\alpha$ -amino não carregados da hemoglobina, formando carbaminoemoglobina. A reação global mostra que a combinação do  $\text{CO}_2$  à hemoglobina dá-se da seguinte forma:



Aproximadamente 0,15 moles de  $\text{CO}_2$  combinam-se por heme à oxiemoglobina e 0,40 à desoxiemoglobina (RIGGS, 1972). A ligação do  $\text{CO}_2$  aos grupos  $\alpha$ -amino das cadeias  $\alpha$  diminui o efeito Bohr como demonstrado por KILMARTIN et al. (1969) porque ocorre liberação de prótons, como mostrado no esquema acima. A combinação do  $\text{CO}_2$  por este mecanismo à hemoglobina e outras proteínas do sangue é responsável por uma parte substancial, embora não a principal, do transporte desse composto (RIGGS, 1972; HOAR, 1983).

### iii - Modelos teóricos

A existência de dois estados com diferentes afinidades em relação ao ligante  $\text{O}_2$  na mesma espécie molecular tem levado os autores a proporem modelos que justificassem este comportamento, desde longa data. Entre os diversos modelos propostos os de ADAIR (1925), de MONOD, WYMAN e CHANGEUX ou

MWC (1965) e o de Koshland-Némethy-Filmer ou KNF (1966) são os mais universalmente aceitos para a hemoglobina e até o presente são usados como ferramenta teórica para explicar efeitos alostéricos de várias proteínas (IMAI, 1973; LEVITZKI, 1978; CHIEN et al., 1980; WEBER et al., 1987; JENSEN et al., 1987; SODE, 1991). O primeiro modelo concebe o processo de oxigenação em passos consecutivos entre a desoxi e a oxiemoglobina. O modelo MWC, por outro lado, é o que parece ser mais aceito; e postula a existência de duas formas moleculares em equilíbrio: uma tensa "T" com baixa afinidade pelo O<sub>2</sub> e outra relaxada "R" de elevada afinidade pelo gás. A oxigenação deslocaria o equilíbrio  $T \rightleftharpoons R$  no sentido da forma "R", enquanto que a ação dos efetores alostéricos em geral ocorreria pelo deslocamento do equilíbrio no sentido inverso, estabilizando a forma "T". O modelo KNF propõe a existência de apenas uma conformação no estado não ligado, com indução de mudanças estruturais pelo ligante.

Entretanto, a existência de apenas 2 estados tem se revelado insuficiente à luz dos conhecimentos atuais, e diversos pesquisadores têm tentado propor modelos baseados no MWC e no KNF que incluiriam pelo menos mais um estado com propriedades intermediárias (ACKERS, 1990; RIGGS, 1991b).

#### iv - Hemoglobina sob o ponto de vista genético e evolutivo

As globinas constituem claros exemplos de evolução por

duplicação gênica e evolução divergente, e o passo fundamental para o aparecimento de heterotetrâmeros (constituídos por dois tipos de globinas) foi a duplicação que originou os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , passo este da maior importância para o desenvolvimento de hemoglobinas capazes de suprir as necessidades fisiológicas de animais de grande porte e talvez para a conquista do ambiente terrestre (THOMPSON, 1980). Segundo LI (1983) e ZUCKERKANDL (1965) o controle de hemoglobinas por genes duplicados facilitaria o refinamento da função protéica, uma vez que cada gene se encontraria sujeito a diferentes mutações.

Concomitantemente, a evolução implicou na diminuição do peso molecular das hemoglobinas e no seu confinamento no interior de eritrócitos (SNYDER, 1977).

A evolução de hemoglobinas de invertebrados teria envolvido, de acordo com RIGGS (1991b): a) duplicação gênica, b) obtenção da seqüência necessária para a secreção de hemoglobinas extracelulares, c) mutações resultantes em substituições, deleções e inserções, e d) perda de êxons. EATON (1980) propôs, que a evolução verificada em vertebrados desde as hemoglobinas monoméricas até as tetraméricas teria ocorrido pela seguinte série de eventos: a) duplicação gênica dando origem às globinas  $\alpha$  e  $\beta$  primitivas, b) mutações que originariam o dímero  $\alpha_1\beta_2$  capaz de ligar o oxigênio cooperativamen-



te<sup>3</sup> (transição oximonômero-desoxidímero), c) evolução do contato  $\alpha_1\beta_1$ , o que permitiria o aumento da cooperatividade, e d) desenvolvimento dos resíduos responsáveis pelo efeito Bohr e ligação de fosfatos e de outros ânions.

Em termos moleculares, o gene de globina (estudado em rato) possui três êxons e dois introns. Esta estrutura está presente em todos os genes de vertebrados e no gene do oligoqueto Lumbricus terrestris. Os genes de globina do inseto Chironomus, por outro lado, não apresentam introns (RIGGS, 1991a). O êxon central codifica os resíduos correspondentes à ligação da proteína com o núcleo heme, bem como a quase todos os contatos interdiméricos  $\alpha_1\beta_2$ . O terceiro êxon é responsável pelos aminoácidos dos contatos  $\alpha_1\beta_1$  (entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  de cada dímero) e, juntamente com o primeiro, codifica a maioria dos resíduos envolvidos com o efeito Bohr e à ligação do 2,3-difosfoglicerato (BLAKE, 1983).

Na perspectiva de separar os diferentes domínios na molécula de hemoproteínas, CRAIK et al. (1981) e DE SANCTIS et al. (1986) através de ação enzimática sobre a apoemoglobina e apomioglobina respectivamente, conseguiram isolar o fragmento correspondente aproximadamente ao êxon central. Este apresenta propriedades de ligação do núcleo heme e possui propriedades funcionais semelhantes às da proteína nativa.

---

<sup>3</sup> A cooperatividade advém neste caso da transição entre as formas moleculares monoméricas e diméricas.

Os trabalhos de ARGOS et al. (1979), mostrando a analogia existente em relação ao éxon central de globinas e dos citocromos b<sub>5</sub> e c<sub>551</sub>, sugerem que estas moléculas possam derivar de uma hemoproteína primitiva codificada pelo segmento citado.

#### v - Hemoglobinas de ofídios

As serpentes (Reptilia, Squamata) constituem um grupo numeroso de grande interesse para o estudo das relações entre fisiologia e meio ambiente, uma vez que, sem abandonar um padrão morfológico comum, as diferentes espécies de ofídios conquistaram os mais diversos ambientes terrestres e aquáticos exibindo grande variedade de comportamentos. De acordo com BELLAIRS (1970) os ofídios tiveram uma radiação adaptativa bem sucedida, se comparada com a de outros grupos animais que adotaram um padrão corporal semelhante (como alguns lagartos, anfíbios ápodes ou as enguias) e que no entanto vivem restritos a certos habitats.

As serpentes têm mostrado a existência de hemoglobinas múltiplas, fato comum em muitos outros grupos animais e que origina-se de genes alélicos e não alélicos (THOMPSON, 1980). As hemoglobinas de ofídios têm sido objeto de diversos estudos tanto do ponto de vista de suas propriedades funcionais (SULLIVAN, 1967; SCHWANTES, 1972; DUGUET et al., 1975; MACMAHON et al., 1975; FOCESI et al., 1980; SEYMOUR et al., 1981;

BIRCHARD et al., 1984; FRIEDMAN et al., 1985; MATSUURA et al., 1987; SODE, 1991; FOCESI et al., 1992) quanto da sua estrutura primária (DUGUET et al., 1974; NAQVI et al., 1987; MATSUURA et al., 1989; ISLAM et al., 1990).

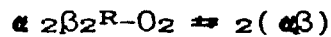
Os estudos preliminares da hemoglobina da serpente semi-aquática *Liophis miliaris* (OGO et al., 1979; MATSUURA et al., 1980) mostraram as seguintes características: a) alta afinidade por oxigênio e valores baixos de cooperatividade na ausência de ATP que diminuíam com o pH até se tornarem iguais a 1; b) baixo efeito Bohr; c) alterações significativas tanto da afinidade por oxigênio quanto da cooperatividade e do efeito Bohr na presença de concentração saturante de ATP; d) comportamento cromatográfico e eletroforético particular.

A partir de estudos de cromatografia de filtração em gel (MATSUURA et al., 1987) foi determinado que: a) a forma oxigenada isenta de fosfatos apresentava volume de eluição compatível com dímeros de hemoglobina humana (PM = 32.000 dáltons), e b) a forma desoxigenada na presença de IHP 1 mM era eluída em volume compatível com o tetrâmero da mesma hemoglobina (PM = 64.000 dáltons). A partir destes achados, que corroboravam os estudos funcionais, foi proposto que ocorreria a transição entre duas formas moleculares da hemoglobina desta serpente.

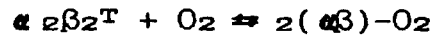
Os mecanismos alternativos propostos para a transição dímero-tetrâmero foram dois:

I)





II)



As interessantes propriedades desta hemoglobina justificaram a determinação da sua seqüência primária (MATSUURA et al., 1989). Foi determinado ainda que o hemolisado de *Liophis miliaris* possui quatro cadeias de globina diferentes entre si em iguais proporções: 2 tipo  $\alpha$  e 2 tipo  $\beta$ . A seqüência de aminoácidos de duas dessas globinas (uma de cada tipo) mostrou, entre outras, duas modificações significativas na interface interdimérica  $\alpha_1\beta_2$ . Os resíduos de ácido glutâmico das cadeias  $\beta$ :Glu- $\beta$ 101(G3) e Glu- $\beta$ 43(CD2) se encontram substituídos por Valina e Treonina, respectivamente, o que levaria, de acordo com os autores, a uma diminuição da atração eletrostática por substituição de duas cargas negativas e poderia explicar a maior tendência à dissociação do tetrâmero desta hemoglobina. O ácido glutâmico  $\beta$ 101 está envolvido na estabilização do tetrâmero de Hb por relacionar-se com o resíduo  $\alpha$ 94Asp e  $\alpha$ 96Val na desoxi e com a  $\alpha$ 94Asp na oxiemoglobina (McDONALD et al., 1985). A cadeia tipo  $\alpha$  mostrou, ainda, a substituição da histidina distal (E7) por uma glutamina.

## vi - Objetivos deste trabalho

A nossa estratégia geral para o estudo das hemoglobinas de serpentes tem por objetivo fornecer uma melhor compreensão das relações entre a fisiologia e ecologia desses répteis e as características de suas hemoglobinas. Tal enfoque vai de encontro ao conceito, explicitado por PERUTZ (1984), de adaptação ao nível molecular (*species adaptation at the molecular level*).

A partir dos achados particularmente interessantes na espécie Liophis miliaris nos propusemos o estudo de hemoglobinas de outras espécies de ofídios, com o objetivo de verificar a existência ou não de proteínas semelhantes, isto é que apresentem transição oxidímero  $\rightleftharpoons$  desoxitetramero bem como a possível relação com os hábitos e ambientes em que vivem. Isso envolveu o estudo das hemoglobinas de espécies associadas com diferentes habitats e comportamentos:

- Mastigodryas bifossatus (Colubridae), conhecida como "jaracuçu-do-brejo", animal muito ativo e agressivo, embora não peçonhento, que habita à beira de cursos de água e banhados.

- Crotalus durissus terrificus (Crotalidae), "cascavel", típico predador de espera, peçonhenta, terrestre. Habita locais secos.

- Bothrops alternatus (Viperidae), "urutu", também considerado como predador de espera, espécie peçonhenta,

terrestre, habita locais úmidos como arrozais e banhados.

- Oxyrhopus trigeminus guibei (Colubridae), "falsa-coral", não peçonhenta, terrestre.

- Acrochordus javanicus (Acrochordidae), encontrada no sudeste asiático. Animal lento, não peçonhento, de hábitat totalmente aquático. .

Procuramos contribuir assim para o melhor conhecimento das hemoglobinas de ofídios que sem dúvida, como veremos, representam um elo de ligação entre as hemoglobinas de vertebrados primitivos e as daqueles mais evoluídos e seguramente podem lançar luzes para a melhor compreensão da evolução das espécies.

## II - MATERIAIS E MÉTODOS

i) **Obtenção e manutenção dos animais** - Ofídios tropicais de diferentes espécies foram obtidos do Instituto Butantan (São Paulo), e do Departamento de Zoologia da UNICAMP. Acrochordus javanicus foi adquirida comercialmente nos Estados Unidos. Sempre foram utilizados animais adultos.

Quando foi necessário manter animais no laboratório, foram utilizados tanques de vidro contendo ou não reservatório de água. Alimentação adequada a cada espécie era oferecida periodicamente.

ii) **Coleta de sangue e preparação do hemolisado** - Os animais eram anestesiados por imersão em banho de gelo e em seguida era injetada heparina (500 u.i./ml/Kg) dissolvida em solução isotônica por via subcutânea e o sangue era obtido por punção da aorta dorsal usando seringas heparinizadas. As hemácias eram lavadas cinco vezes em 20 volumes de solução salina, gelada (1,7 %) contendo EDTA 1 mM. O hemolisado era obtido por lise das hemácias em 5 volumes de água desionizada contendo EDTA 1 mM. A suspensão resultante era centrifugada a 27.000 g. durante 20 minutos para a remoção de partículas de membranas e organelas em geral. O sobrenadante era dialisado durante 20 horas a 4°C contra tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 contendo EDTA 5 mM.

iii) Preparação do hemolisado isento de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular - O hemolisado era passado duas vezes através de coluna de troca iônica Amberlite MB-3 de 5 x 30 cm e concentrado através de ultrafiltros (Diaflo YM-10). Os hemolisados "stripped" eram estocados em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 contendo EDTA 1 mM e mantidos congelados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

iv) Análise e separação de componentes - Eletroforese dos hemolisados foi feita em géis de poliacrilamida a 10 % à temperatura ambiente (HAMES, 1981; GOLDENBERG, 1990). As amostras foram tratadas com ditionito de sódio (1 mg/ml), monóxido de carbono (por passagem do gás sobre a amostra) e  $\beta$ -mercaptoetanol (0,05 % v/v), para estabilização. O tampão (Tris-glicina 50 mM pH 8,3) continha  $\beta$ -mercaptoetanol na mesma concentração das amostras. Hemoglobina humana HbA<sub>0</sub> purificada foi usada como controle.

Determinações do número de globinas foram feitas utilizando géis de poliacrilamida a 15 % em pH 3,2 (BRUMMEL et al., 1970). As amostras foram tratadas com soluções de: ácido acético 2,3 %, uréia 4,7 M previamente desionizada e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,33 M (concentrações finais) a 37°C durante 30 minutos. HbA<sub>0</sub> e suas respectivas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas foram utilizadas como controles.

Isoeletrofocalização foi realizada por três métodos: a) analítica em gel de poliacrilamida (RIGHETTI, 1990), com



amostras tratadas com monóxido de carbono ou mantidas desoxigenadas pela adição de ditionito de sódio (1 mg/ml) baseando-nos no método proposto por Pharmacia para isoeletrofocalização em tubo (gel rods); b) preparativa em coluna refrigerada LKB de 110 e 440 ml (BONAVENTURA et al., 1981), com amostras mantidas como carboxiemoglobina, (CO-Hb) utilizando anfólitos das faixas de 3,5 a 10 e de 7 a 9 misturados em partes iguais e c) preparativa em gel de agarose (CANTAROW, 1982), com amostras na forma de carboxiemoglobina e anfólitos na faixa de 3,5 a 10 e de 7 a 9 misturados em iguais proporções. Este último permitiu a separação das bandas de hemoglobina e a extração das proteínas do gel a serem utilizadas em experimentos de cinética rápida. As amostras foram mantidas na forma de CO-Hb durante o processo de extração e depois, para posterior utilização.

No hemolisado de M. bifossatus foi investigada a ligação de ATP pelos componentes hemoglobínicos presentes no hemolisado através de cromatografia de afinidade. Utilizamos ATP-agarose Sigma (insolubilizado em agarose a 4%). A ligação com desoxiemoglobina foi feita dentro de tonômetro, checando pela absorbância da hemoglobina no sobrenadante.

#### **v) Análise espectrofotométrica de curvas de dissociação de oxigênio**

Para o estudo das propriedades funcionais da hemoglobina foi utilizado o método espectrofotométrico-tonométrico de

acordo com RIGGS et al. (1956) e ROSSI-FANELLI et al. (1958). Tal método baseia-se nas mudanças espectrais que ocorrem na faixa visível durante a passagem da hemoglobina do estado desoxigenado para o oxigenado ou vice-versa (figura 5).

O espectro ótico de hemoproteínas é derivado primariamente de transições de elétrons  $\pi$  da porfirina e parcialmente de transição eletrônica entre o átomo de ferro e a porfirina (IIZUKA et al., 1970).

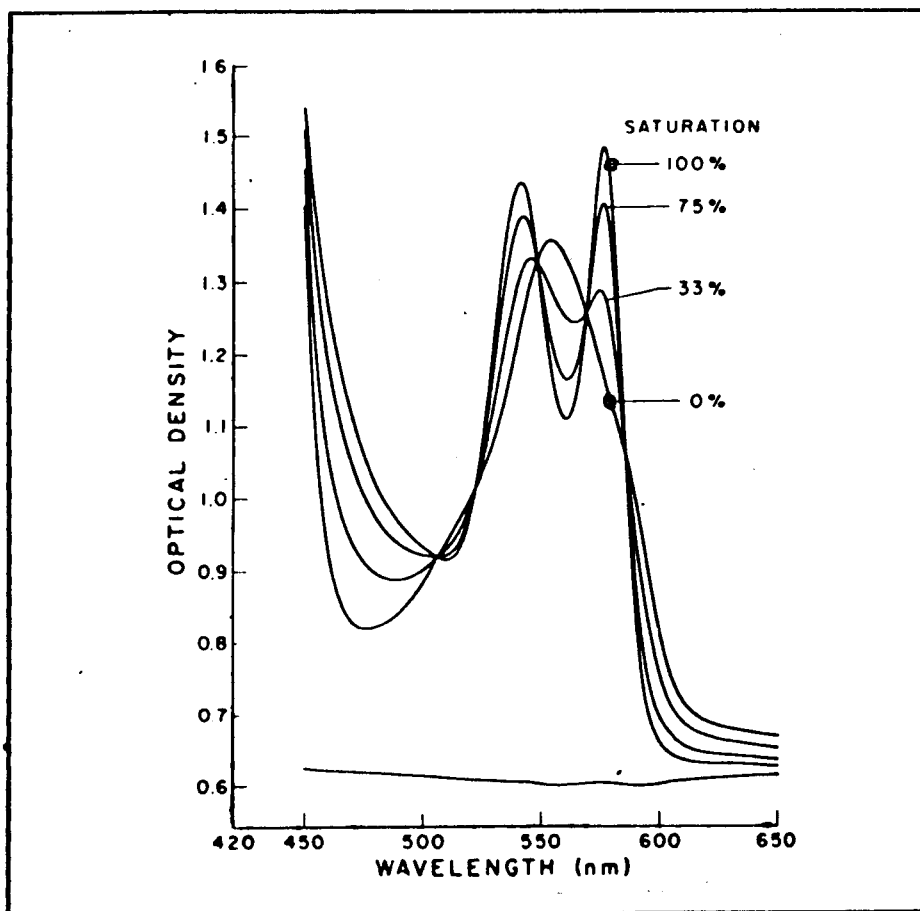


Figura 5 Espectro da oxi e desoxiemoglobina e passos intermediários (ANTONINI et al., 1971).

A solução de hemoglobina é primeiramente preparada por

ajuste da sua concentração e adição do tampão e reagentes. A seguir é medido o pH e a solução é colocada num tonômetro. As leituras de pH foram corrigidas para a temperatura das experiências usando o coeficiente fornecido por GUEFFROY (1978) para tampão Tris e confirmado experimentalmente por nós:  $dpK_a/^\circ C = -0,031$ . A forma desoxigenada é obtida por alternância de ciclos de vácuo e passa gem de nitrogênio, ou simplesmente por passagem desse gás durante tempo suficiente. O tonômetro é então imerso em banho de temperatura constante (em geral 20°C) até atingir o equilíbrio entre as fases gasosa e líquida. A cada 10 minutos foi feita a leitura de absorbâncias entre 500 e 600 nm e a adição de um volume conhecido de ar com auxílio de uma seringa. Em geral adota-se para o cálculo dos parâmetros funcionais a variação das leituras em 541, 560 e 576 nm. As adições de ar prosseguem até se obterem graus elevados de saturação, quando o tonômetro é aberto para a leitura final correspondente à oxiemoglobina (100 % de saturação). A pressão parcial de O<sub>2</sub> em cada adição é calculada através da seguinte equação:

$$\log pO_2 = \frac{\%O_2 \times (TB+273.15)/(TA+273.15) \times PB - CT \times PVH_2O \times U}{(VT- VA)}$$

onde "VT" e "VA" são os volumes do tonômetro e da amostra em ml. respectivamente, "TB" e "TA" são as temperaturas do banho e do ambiente (em °C), "PB" é a pressão barométrica em mm Hg, "CT" é a correção para a temperatura, "PVH<sub>2</sub>O" a pressão de vapor de água, e "U" a umidade relativa. A saturação parcial

correspondente a cada adição é calculada considerando a diferença total de absorbâncias entre as formas deoxi e oxigenada, sendo calculada por regra de três simples em cada passo de acordo com a variação nas leituras nos três comprimentos de onda citados. Todos estes passos são realizados por programas adequados escritos em linguagem "Basic" para espectrofotômetro Hewlett-Packard 8451A (MARSHALL, dados não publicados) e em "Turbo-Basic" (de nossa autoria). Ambos os programas incluem representação gráfica de Hill e regressão linear para o cálculo dos parâmetros funcionais "P<sub>50</sub>" e "n<sub>50</sub>" descritos anteriormente.

vii) Estudos de cinética rápida de dissociação de oxigênio e recombinação de monóxido de carbono - Descreveremos aqui o princípio dos seguintes métodos: fluxo interrompido (stopped flow) e fotólise com luz de alta intensidade (flash photolysis) (ANTONINI et al., 1971). O primeiro método foi utilizado na realização de três experimentos diferentes: i) dissociação de oxigênio (oxygen-off), ii) combinação com CO (CO-combination) e iii) mudança brusca de pH (pH-jump). Na figura 6a está esquematizado o aparelho de fluxo interrompido. As soluções a serem misturadas são colocadas em suas respectivas seringas. As soluções são a seguir forçadas a entrar numa câmara de mistura em alta velocidade por ação de um pistão, e o fluxo é bruscamente interrompido. As mudanças que acontecem na câmara são seguidas com o auxí-

lio de um monocromador que permite detecção rápida conectado a um computador<sup>4</sup>, o que possibilita o estudo das curvas de progresso das reações que ocorrem em curto período, da ordem de milissegundos. Em geral o curso das reações é seguido em 437,5 nm, onde existe um ponto isobéstico entre tetrâmeros e dímeros desoxigenados (BONAVENTURA et al., 1974).

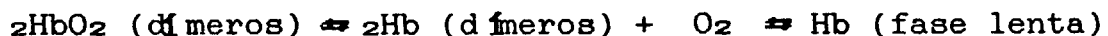
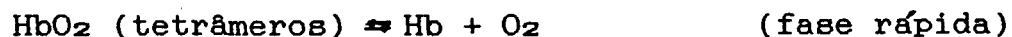
No caso do estudo da dissociação do O<sub>2</sub>, em uma das seringas é colocada a solução de oxiemoglobina e na outra uma solução de agente redutor ditionito de sódio (1 mg/ml). Para a combinação com CO, a primeira seringa contém uma solução de desoxiemoglobina, enquanto que na segunda seringa é colocada uma solução de monóxido de carbono (250 µM). Para o estudo do efeito da variação brusca do pH a segunda seringa tem uma solução tampão de pH elevado (Tris-HCl pH 9) com ditionito de sódio. No nosso caso estudamos o efeito da mudança de pH sobre a amostra desoxigenada, e ambas as seringas continham ditionito de sódio (1 mg/ml). Em todos os casos a concentração da hemoglobina em solução foi cuidadosamente determinada. A reação pode ser esquematizada como segue:

$Fe + X \rightleftharpoons FeX$ , onde "Fe" representa a hemoproteína, "X" o ligante específico, "k<sub>on</sub>" a constante de velocidade da associação e "k<sub>off</sub>" a correspondente à dissociação. A constante de equilíbrio "K" é dada pelo quociente:  $K = k_{on}/k_{off}$ , e  $[FeX] = [FeX]_0 \cdot e^{-k_{off}t}$  assumindo que a reação é de primeira

---

<sup>4</sup> Na ilustração original de ANTONINI et al. (1971) a letra "O" representa um osciloscópio e uma câmera.

ordem. Entretanto, se na solução estiverem presentes concomitantemente tetrâmeros e dímeros, teremos duas fases, onde os primeiros serão a fase rápida e os segundos a lenta, de acordo com o seguinte esquema:



Neste caso o cálculo da velocidade de dissociação é feito considerando duas reações de primeira ordem simultaneamente, devendo ser calculado o quanto aporta cada uma delas à curva experimental. A equação usada é a seguinte:

$$A = A_0 \cdot n \cdot e^{-k_1 t} + A_0 \cdot (1-n) \cdot e^{-k_2 t}$$

onde "A<sub>0</sub>" é a absorbância no tempo zero, "n" é a percentagem da fase rápida, "k<sub>1</sub>" e "k<sub>2</sub>" são as velocidades de cada fase, e "t" o tempo. A constante de associação dímero-tetrâmero é calculada pela seguinte fórmula:

$$K_{4,2} = n / (1-n)^2 [\text{Hb}]$$

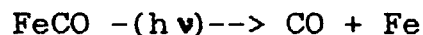
onde [Hb] é a concentração final de hemoglobina (heme).

A associação de dímeros desoxigenados produz um fenômeno chamado "deriva" (drift), verificado em hemoglobina humana muito diluída ou em outras hemoglobinas com tendência à dissociação em dímeros (BONAVENTURA et al., 1974).

A fotólise com flash, por outro lado, baseia-se no fato de que a ligação do CO à hemoglobina é fotodissociável. A quantidade de energia necessária à fotodissociação depende do ligante. No nosso caso utilizamos este método para o estudo da recombinação de CO com a hemoglobina após a aplicação de

um flash à solução de carboxiemoglobina. Esta reação é muito rápida, e a detecção é feita pelo mesmo sistema acoplado a computador citado previamente. A figura 6b esquematiza o aparelho de fotólise com flash. Um aparelho para fotólise consiste de a) uma fonte de luz intensa para produzir a fotodissociação, b) uma cela para conter a amostra, c) uma fonte de luz para a observação de mudanças de absorbância da amostra, d) um dispositivo para selecionar o comprimento de onda para o feixe de observação, e e) um sistema de detecção que transforme mudanças dependentes do tempo na intensidade de luz transmitida pela amostra após a fotólise em sinais elétricos capazes de serem registrados (SAWICKI et al., 1981).

Por ação da luz incidente ocorre a dissociação do ligante de acordo com a reação:



que é revertida após o flash.

Neste caso temos duas fases: a fase rápida devida à presença de dímeros (alta afinidade), e a lenta a-tetrâmeros. Este raciocínio também aplica-se às experiências de combinação com CO, embora neste caso a hemoglobina parte da forma desoxigenada (tensa), enquanto que na fotólise a mudança do estado "R" para o "T" ocorre apenas parcialmente (R. CASHON, comunicação pessoal).

A constante de associação dímero-tetrâmero é calculada através da seguinte equação:  $K_{4,2} = (1-n) / n^2 \text{Hb}$ , onde "n"

e "Hb" têm o significado antes citado (pag. 29 ).

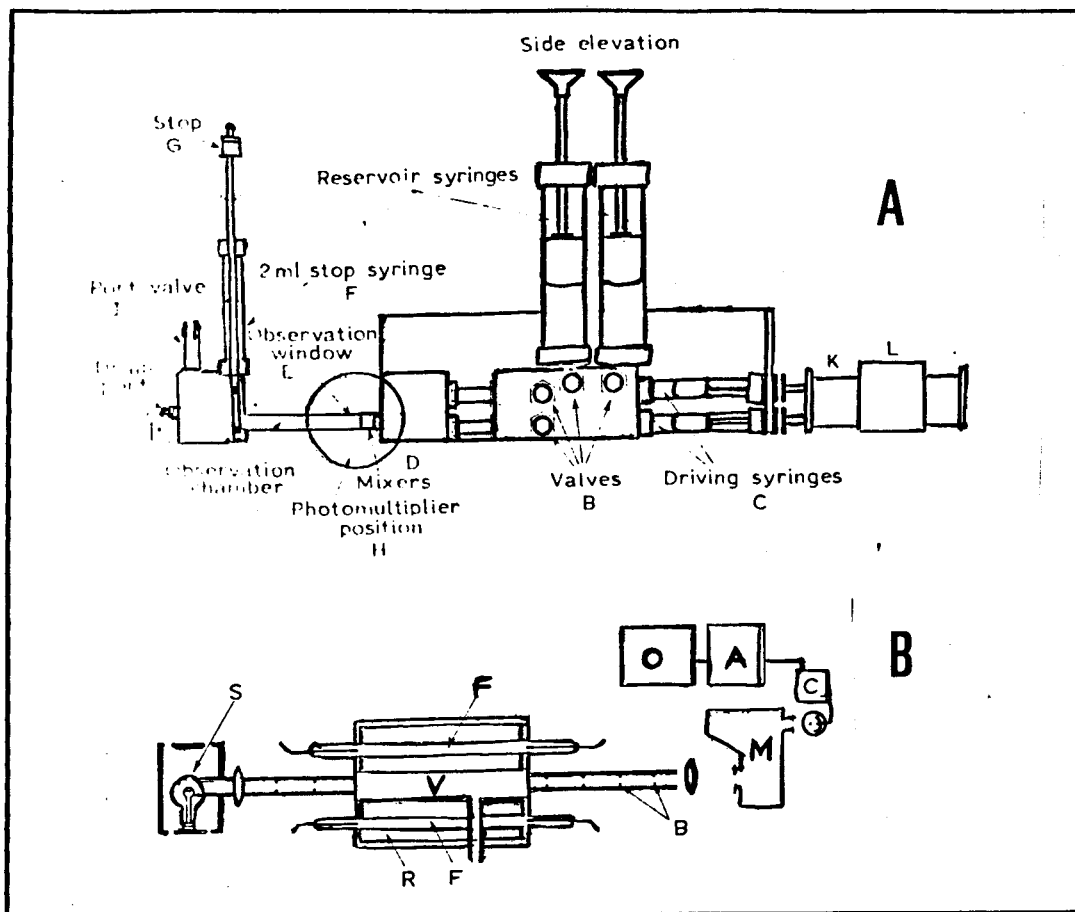


Figura 6 a) Aparelho de fluxo interrompido b) Aparelho de fotólise. A amostra é colocada em "V". O pulso de luz é originado em "F", "M" é o monocromador, "A" é o amplificador, e "O" o microcomputador (ANTONINI et al., 1971)

### viii) Efeito da temperatura sobre a afinidade das hemoglobinas por oxigênio

Os valores da variação de entalpia aparente ( $\Delta H$ ) associada à ligação de oxigênio foram calculadas de acordo com a equação de Van't Hoff (BULL, 1964):

$$\log K_{T1}/K_{T2} = - (\Delta H/4,575) ((T_1-T_2)/(T_1T_2))$$



Utilizamos as constantes da Lei de Henry calculadas por BROUWER et al. (1988)<sup>5</sup> para transformar os valores de  $P_{50}$  em constantes de associação. Através de estimativas dos parâmetros do modelo de Adair realizadas com curvas de oxigenação calculamos que os valores de  $P_{50}$  foram muito próximos da pressão mediana  $P_m$  ( $P_m = (k_1 k_2 k_3 k_4)^{-1/4}$ ).

ix) Estudos de sedimentação em ultracentrifuga analítica - Foram realizados em ultracentrifuga analítica Beckman Modelo E, usando uma cela de dois setores a 20°C. A velocidade de rotação foi de 40.000 r.p.m. e a sedimentação foi monitorada com auxílio de um registrador em papel (scanner), com intervalos de 8 minutos entre os registros. Os coeficientes de sedimentação foram calculados usando um programa BASIC (MARSHALL, dados não publicados), corrigindo os valores para a densidade e viscosidade das soluções. As soluções de hemoglobina eram preparadas nas mesmas condições das destinadas a estudos funcionais, para termos de comparação.

x) Filtração em gel - Foram realizadas várias determinações de peso molecular por filtração em gel utilizando Sephadex G-100 e colunas de 1,5 x 90 cm de acordo com o método utilizado por MATSUURA et al. (1987). O tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM com EDTA 1 mM. Não foram usados

---

<sup>5</sup>  $1,77 \cdot 10^{-6}$  e  $1,42 \cdot 10^{-6}$  a 20 e 30°C respectivamente.

agentes redutores para evitar a formação de pontes dissulfeto.

xi) Estimativa dos parâmetros dos modelos de Adair e MWC - Dados de ligação de oxigênio obtidos experimentalmente foram testados sob a ótica dos modelos formulados por ADAIR (1925) e de MONOD, WYMAN e CHANGEUX (1965). Para a estimativa dos parâmetros foram utilizados pares de dados de saturação fracional "Y" e de pressão parcial de O<sub>2</sub> obtidos em diversos pHs e na presença ou não de ATP 1 mM. O ajuste dos modelos foi avaliado através de um programa de estimativa de parâmetros por mínimos quadrados ("MINSQ", de Micromath Inc., UTAH, 1988), procedimento seguido por vários trabalhos com propósitos semelhantes (IMAI, 1973; CHIEN et al., 1980; WEBER et al., 1987).

**i) Estudos eletroforéticos, de isoeletrofocalização e de separação de componentes**

As análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida mostraram uma única banda para os hemolisados de L. miliaris, C.d. terrificus e A. javanicus. Para os demais hemolisados foram observados dois componentes (figura 7). As determinações do número de globinas revelaram para A. javanicus duas bandas, e quatro para as demais espécies (figura 8). A análise mostra que uma das bandas do hemolisado de A. javanicus e duas em B. alternatus são mais largas, podendo conter mais de um componente. A comparação destas análises com os resultados da eletroforese não foram consistentes e deverão ser discutidos. Através de experimentos realizados em HPLC (cromatografia em fase reversa) foi confirmado o número de cadeias de globina para M. bifossatus (MATSUURA, comunicação pessoal). No hemolisado de B. alternatus, entretanto, foram determinadas oito globinas (FOCESI et al., 1992).

Os experimentos realizados em isoeletrofocalização analítica com CO-Hb mostraram para todos os hemolisados dois componentes principais e várias bandas secundárias que não foram consideradas (figura 9). As amostras mantidas em condição desoxigenada pela adição de ditonito de sódio apresentaram apenas duas bandas bem nítidas com algumas secundárias pouco definidas. A figura 10 mostra o perfil de eluição e a

aparência dos componentes hemoglobínicos do hemolisado de *M. bifossatus* em coluna de isoeletrofocalização preparativa. Os componentes principais mostraram pI muito próximo: 8,02 e 8,07.

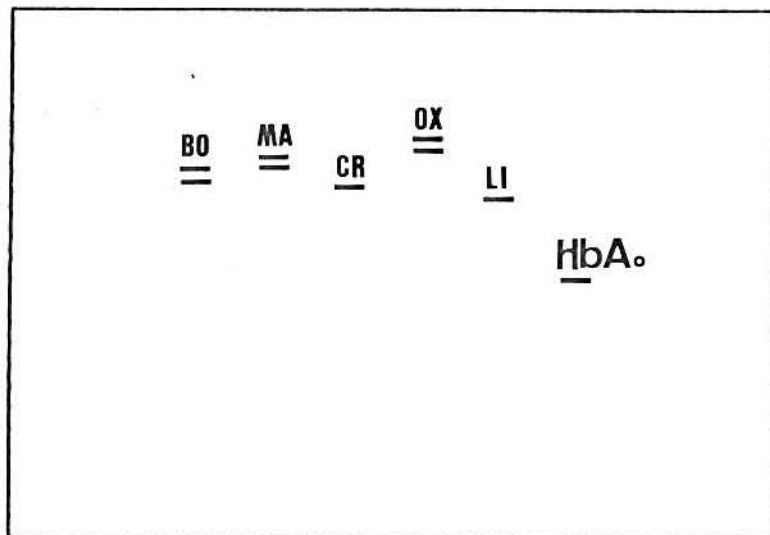


Figura 7. Padrão eletroforético das carboxiemoglobinas de *E. alternatus* (BO), *M. bifossatus* (MA), *C.d. terrificus* (CR), *O.t. guibei* (OX), *L. miliaris* (LI) e Hb humana (HbA<sub>0</sub>).



Figura 8. Determinação do número de globinas por eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida. Os símbolos mantêm o mesmo significado da figura anterior.

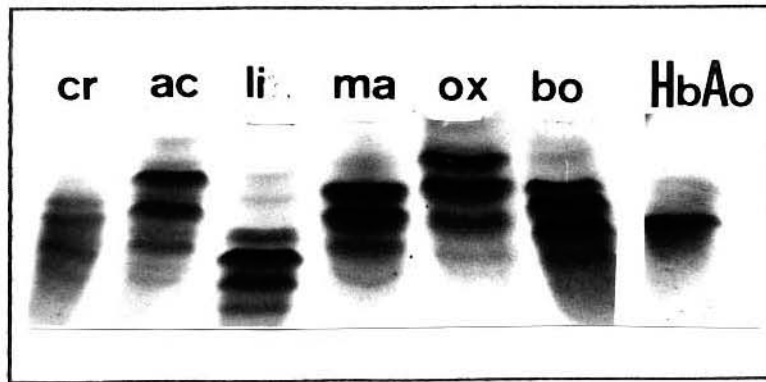


Figura 9. Isoeletrofocalização analítica em poliacrilamida das carboxiemoglobinas das mesmas espécies citadas na figura 7.

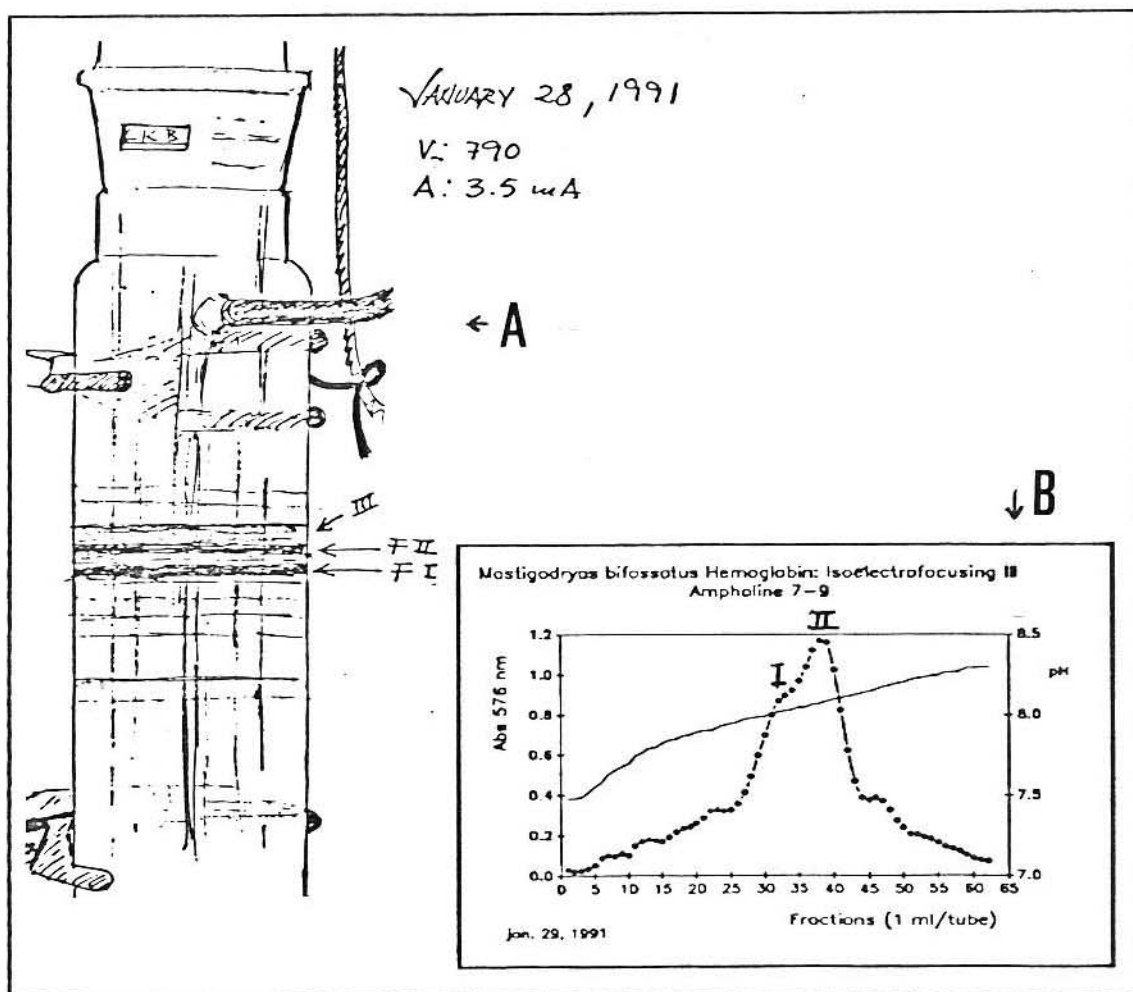


Figura 10. Isoeletrofocalização preparativa em coluna dos componentes hemoglobínicos (CO-Hb) do hemolisado de *M. bifossatus*. a) aspecto da coluna, e b) perfil de eluição das Hbs.

## ii) Estudos funcionais

O comportamento da afinidade por oxigênio a 20°C em função do pH nos hemolisados das cinco espécies "brasileiras" mostram um padrão semelhante na ausência de ATP (figuras 11 e 12), embora os valores de afinidade sejam ligeiramente diferentes para cada espécie. A afinidade aumenta na medida em que diminui a concentração de prótons (os valores de  $\log P_{50}$  diminuem com a elevação do pH). O efeito Bohr calculado entre pH 7 e 8 é menor do que o descrito para Hb humana ( $\Delta H^+ = -0,5$ ) embora o valor varia segundo a espécie (tabela I). Podemos observar que o hemolisado da cascavel (C.d. terrificus) apresenta o menor valor e A. javanicus o maior. A cooperatividade do processo de oxigenação (expresso como  $n_{50}$ ) e o seu comportamento em relação à variação de pH para as mesmas espécies são mostrados nas figuras 11 e 12. Nos hemolisados de quatro espécies os valores diminuem com o pH, atingindo a unidade ou valores muito próximos desta. O comportamento do hemolisado de C.d. terrificus diferencia-se dos demais no sentido de que os valores de cooperatividade, apesar de diminuírem com o pH, permanecem em torno de 2. O hemolisado de A. javanicus, por outro lado, mostrou afinidade por O<sub>2</sub> sensivelmente maior e também maior cooperatividade (figura 12).

Na presença de ATP em concentração saturante (1 mM) a afinidade por oxigênio e a cooperatividade mudam significati-

vamente em todos os hemolisados (figuras 11 e 12). A variação de  $P_{50}$  em cada pH é diferente de acordo com a espécie (tabela II). Nos hemolisados das serpentes brasileiras a curva de  $\log P_{50}$  vs. pH obtida na presença de ATP mantém-se significativamente mais elevada em relação à obtida na ausência do efector até pH 9. Isto reflete uma maior afinidade da Hb pelo efector, talvez decorrente de resíduos que permanecem carregados no sítio de ligação apesar do pH elevado.

Tabela I. Efeito Bohr ( $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ ) entre pH 7 e 8 nos hemolisados de seis espécies de serpentes na ausência e na presença de ATP 1 mM a 20 e 30°C. A concentração de Hb foi de 40-60  $\mu\text{M}$  (heme) em bis-Tris/Tris-HCl 50 mM.

Hemolisado	$\Delta \text{H}^+$ (sem ATP)	$\Delta \text{H}^+$ (com ATP)	Temp. (°C)
<u>L. miliaris</u>	-0,40	-0,50	20
<u>M. bifossatus</u>	-0,30	-0,46	20
	-0,16	-0,22	30
<u>C.d.terrificus</u>	-0,11	-0,39	20
	-0,07	-0,37	30
<u>B. alternatus</u>	-0,29	-0,50	20
	-0,21	-0,51	30
<u>O.t. guibei</u>	-0,28	-0,56	20
	-0,17	-0,43	30
<u>A. javanicus</u>	-0,42	-0,86	20
	-0,35	-0,94	30

Tabela II.  $P_{50}$  e cooperatividade ( $n_{50}$ ) nos hemolisados de seis espécies de serpentes na ausência e na presença de ATP 1 mM.  $\Delta P_{50} = P_{50}$  com ATP/  $P_{50}$  sem ATP. Concentração da Hb: 40-60  $\mu$ M (heme) em bis-Tris/Tris-HCl 50 mM a 20°C.

Hemolisado	condições	$P_{50}$ (mm Hg)	$\Delta P_{50}$	$n_{50}$
<u>L.miliaris</u>	pH 6,5	2,6		2,0
	" + ATP	10,0	3,8 x	3,4
	pH 8,5	0,5		1,1
	" + ATP	1,8	3,6 x	2,1
<u>M.bifossatus</u>	pH 6,5	3,1		2,2
	" + ATP	15,1	4,9 x	3,1
	pH 8,5	0,8		1,1
	" + ATP	4,2	5,1 x	3,0
<u>C.d.terrificus</u>	pH 6,5	1,4		2,7
	" + ATP	11,5	8,3 x	3,4
	pH 8,5	0,8		1,9
	" + ATP	2,7	3,4 x	3,0
<u>B.alternatus</u>	pH 6,5	2,4		2,6
	" + ATP	15,4	6,5 x	2,4
	pH 8,5	0,7		1,0
	" + ATP	2,1	3,2 x	2,3
<u>O.t.guibeii</u>	pH 6,5	2,4		2,6
	" + ATP	14,0	5,4 x	3,1
	pH 8,5	0,7		1,0
	" + ATP	1,6	2,5 x	1,6
<u>A.javanicus</u>	pH 6,5	1,0		3,5
	" +ATP	13,8	13,8 x	2,0
	pH 8,5	0,2		2,4
	" + ATP	0,4	2,8 x	2,8



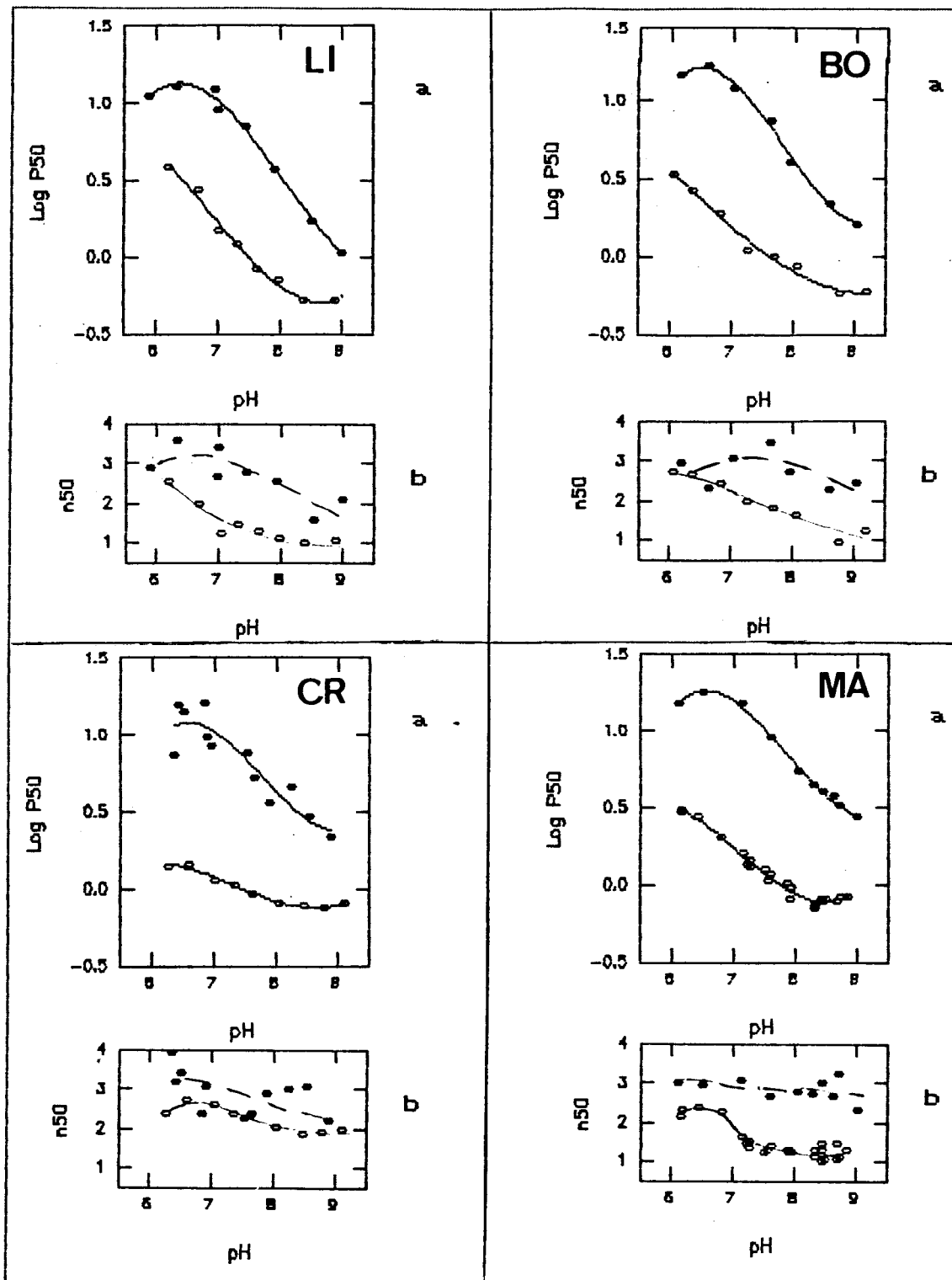


Figura 11. Efeito Bohr (a) e cooperatividade (b) nos hemolisados de *L. miliaris* (LI), *B. alternatus* (BO), *C. d. terrificus* (CR) e *M. bifossatus* (MA) em tampão bis-Tris e Tris-HCl 50 mM a 20°C. (o) sem ATP, (●) com ATP

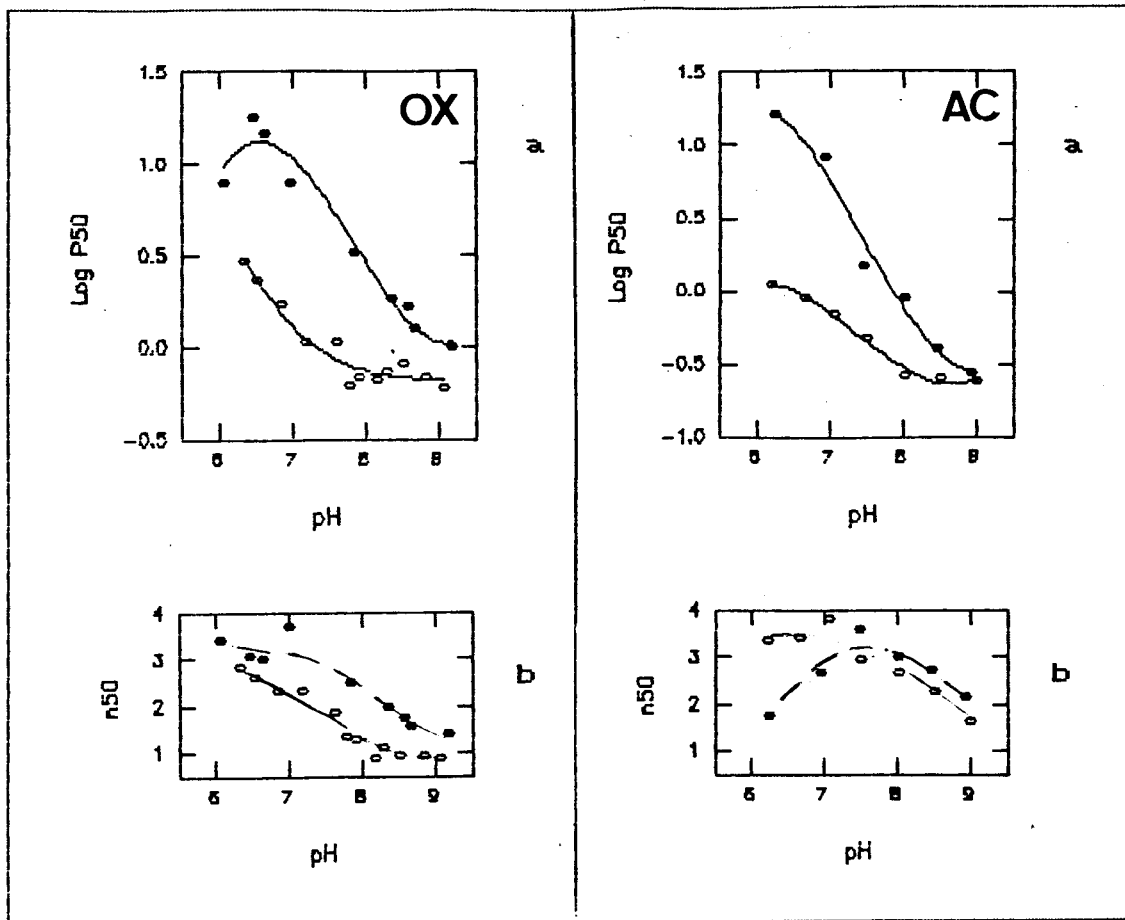
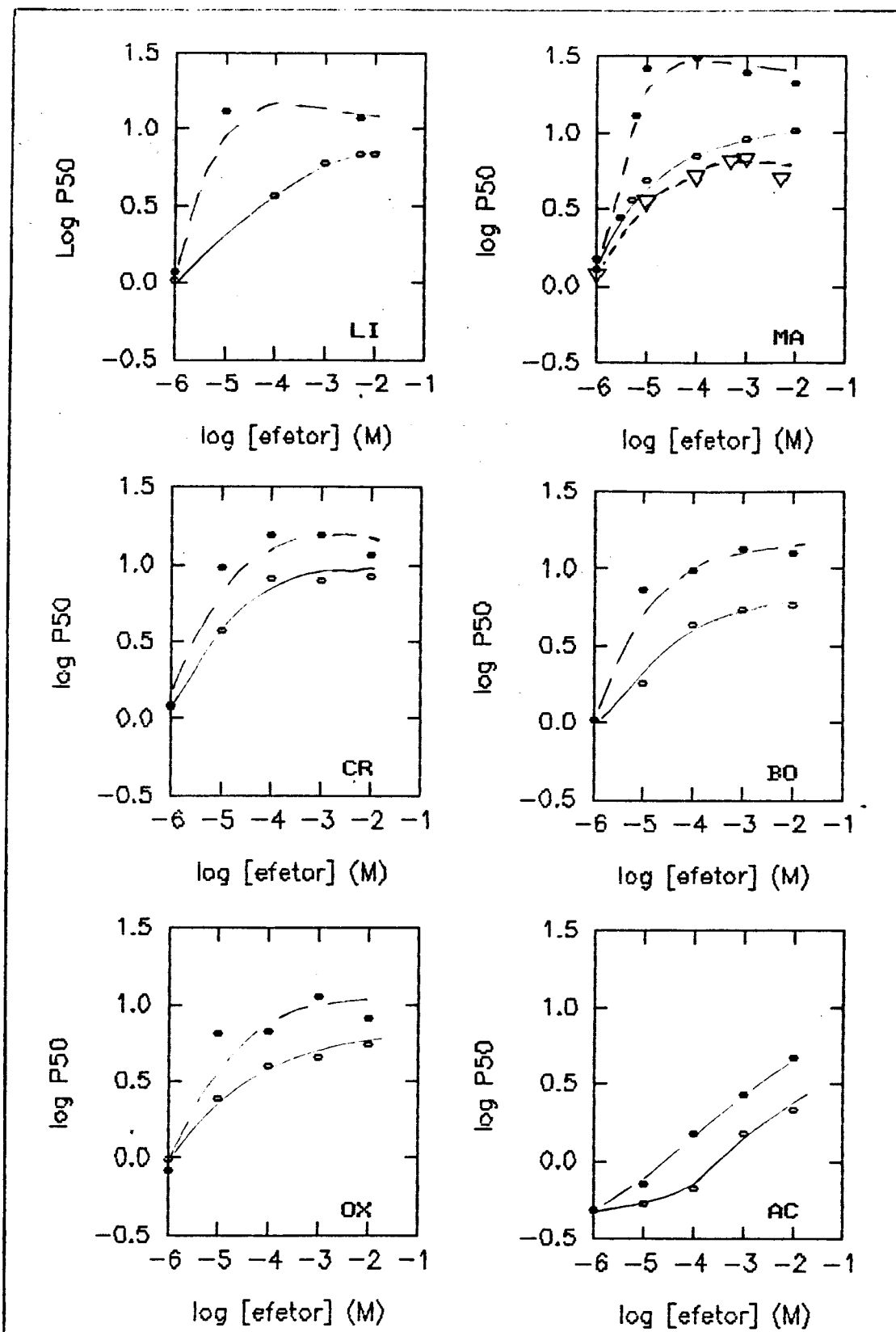


Figura 12. Efeito Bohr (a) e cooperatividade (b) nos hemolisados de *O. t. guibei* (OX) e *A. javanicus* (AC) em tampão bis-Tris e Tris-HCl 50 mM a 20°C. (o) sem ATP, (●) com ATP.



**Figura 13.** Efeito de polifosfatos sobre a afinidade por oxigênio nos hemolisados de *L. miliaris* (LM), *B. alternatus* (BO), *C.d. terrificus* (CR), *M. bifossatus* (MA) *O.t. guibei* (OX) e *A. javanicus* (AC) em tampão Tris-HCl 50 mM ph 7,6 a 20°C. (●) IHP, (○) ATP, (▽) DPG.

Isto sugere que a afinidade por O<sub>2</sub> na presença do efetor é consideravelmente menor mesmo em pH elevado, o que sugere que existam resíduos carregados positivamente no sítio de ligação de fosfato ainda no pH elevado. Este fato já tinha sido observado por FOCESI et al. (1980) nas hemoglobinas de L. miliaris e H. modestus em experiências de cinética rápida. Em A. javanicus, por outro lado, a afinidade por O<sub>2</sub> na presença e na ausência de ATP são aproximadamente iguais em pH elevado (figura 12). O efeito Bohr aumenta consideravelmente (tabela I), atingindo o valor mais alto no hemolisado de A. javanicus, cerca de duas vezes maior em relação aos demais. O efeito de polifosfatos orgânicos na afinidade por oxigênio mostrou, em todos os hemolisados, diminuição maior na presença de IHP do que para ATP nas mesmas concentrações (figura 13). No hemolisado de M. bifossatus foi determinada também a ação de 2,3-DPG, o que se mostrou menos efetivo do que o obtido com ATP (fig.13). Os resultados de estudos funcionais adicionais podem ser considerados em itens que passamos a relatar:

a) **Propriedades funcionais dos componentes** - Foram realizados equilíbrios com oxigênio dos componentes isolados por isoeletrofocalização do hemolisado de M. bifossatus em pH 7,1 e 8,6, nas mesmas condições usadas para o hemolisado total. Em pH 7,1 os valores de afinidade e cooperatividade para a Hb I foram  $P_{50} = 1,21$  mm Hg e  $n_{50} = 2,20$  respectivamente. Para a Hb II esses valores foram  $P_{50} = 1,46$  mm Hg e  $n_{50} = 2,41$ . Em

pH 8,6  $P_{50}$  foi 0,62 mm Hg e  $n_{50} = 1,29$  para a Hb I, enquanto que para a Hb II os respectivos valores foram 0,67 mm Hg e 1,40.

b) Efeito de cloreto - A figura 14 mostra o efeito de diferentes concentrações de cloreto sobre as propriedades de ligação de oxigênio em tampão HEPES 50 mM pH 7,3 do hemolisado de B. alternatus. A afinidade por  $O_2$  diminuiu 3,3 vezes quando a concentração de  $Cl^-$  aumentou de  $10^{-4}$  até 1,0 M, a maior concentração investigada. A cooperatividade aumentou de  $n_{50} = 1,67$  para 2,37.

c) Efeito da concentração de hemoglobina - Estudamos a variação da afinidade por oxigênio e cooperatividade do hemolisado de O.t. guibei sem ATP com menor concentração de hemoglobina: 8  $\mu$ M como heme. Usamos dois tampões: HEPES e bis-Tris-HCl, ambos 50 mM para os pHs menores de 7,5, e HEPES e Tris-HCl na mesma concentração para pH acima daquele valor. Em pH 6,1 a cooperatividade em ambos os tampões foi  $n_{50} = 2,0$ , enquanto que a afinidade permaneceu aproximadamente inalterada, em torno de 2,0 mm Hg. Em pH 7,8 a afinidade aumentou, diminuindo a  $P_{50}$  para 0,48 e 0,57 mm Hg para Tris e HEPES, respectivamente. Ao mesmo tempo, a cooperatividade em ambas as amostras se tornou  $n_{50} = 1,0$ . Em concentrações de Hb mais elevadas os resultados obtidos foram:  $P_{50} = 2,95$  mm Hg e  $N_{50} = 2,82$  em pH 6,2, e  $P_{50} = 0,67$  mm Hg e  $n_{50} = 1,31$  em pH 7,9. O que representa, para as amostras em tampões bis-Tris e Tris, uma elevação da afinidade por  $O_2$  de 1,6 e 2,7 vezes em pHs

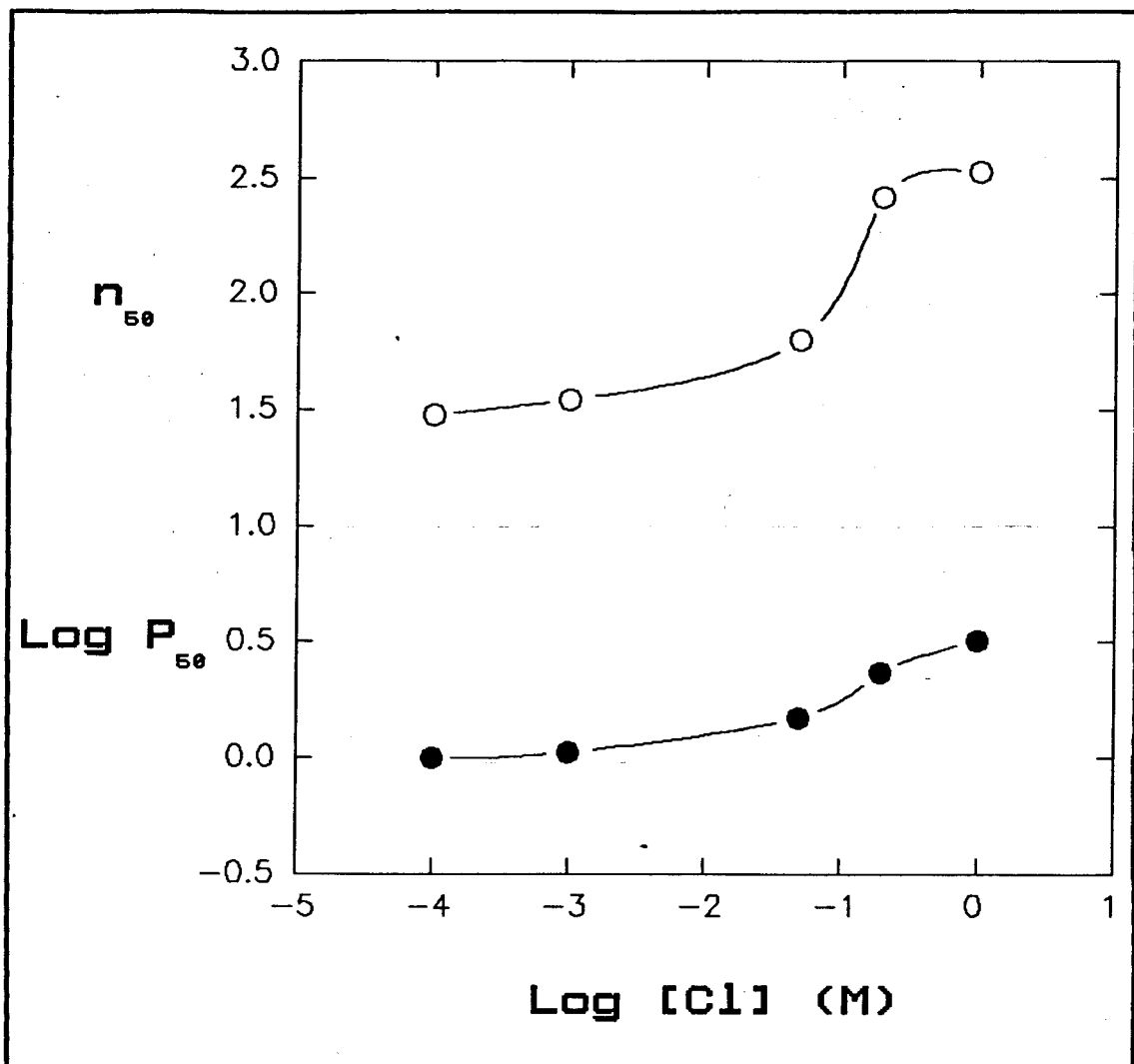


Figura 14 Efeito de cloreto sobre a afinidade ( $\log P_{50}$ ) e cooperatividade ( $n_{50}$ ) do hemolisado de *B. alternatus* a 20°C em tampão HEPES 50 mM pH 7,3. [Hb] 50  $\mu$ M (heme).

baixos e altos respectivamente.

d) **Efeito da temperatura** - Quando os equilíbrios de O<sub>2</sub> com os hemolisados foram realizados a temperatura mais elevada (30°C), a afinidade por oxigênio na ausência e na presença de ATP diminuíram consideravelmente para todas as espécies. Esta diminuição foi maior para o hemolisado na ausência do efetor. A figura 15 mostra a variação da entalpia ( $\Delta H$ ) associada à

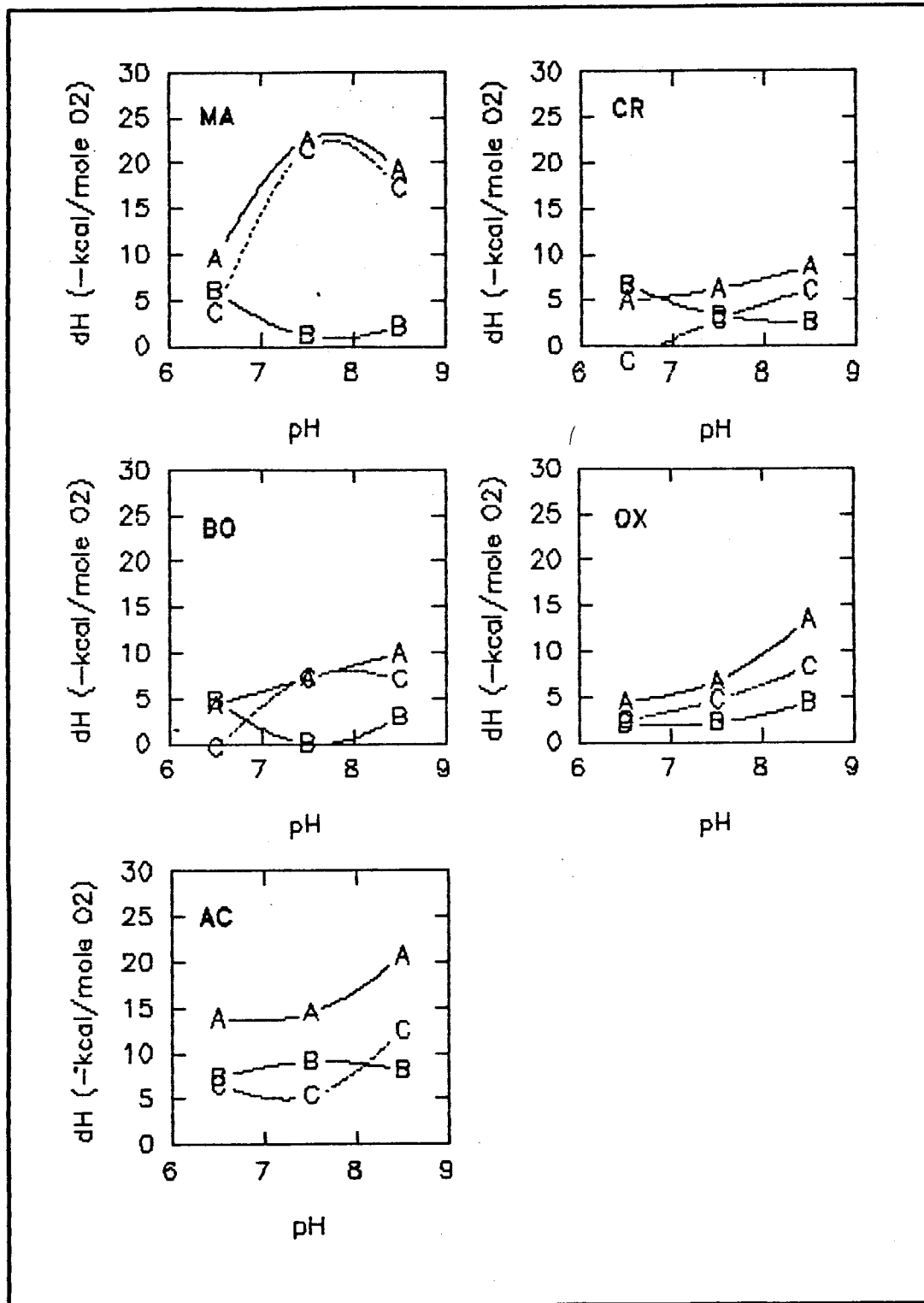


Figura 15. Variação da entalpia ( $\Delta H$ ) em kcal/mol que acompanha a mudança de afinidade por  $O_2$  dos hemolisados de offídeos. Os símbolos das espécies são os mesmos já descritos.

mudança da afinidade por O<sub>2</sub>. Os valores obtidos na ausência de ATP mostram uma tendência a se elevarem proporcionalmente ao pH. Na presença do fosfato, entretanto, o comportamento varia segundo a espécie. Nos hemolisados de M. bifossatus, C.d. terrificus e B. alternatus os valores tendem a diminuir com a elevação do pH; em O.t. guibei e A. javanicus, por outro lado, eles aumentam.

### iii) Cinética rápida

A tabela III mostra os dados referentes aos experimentos de fluxo interrompido (stopped flow) nos hemolisados e componentes hemoglobínicos isolados de M. bifossatus, C.d. terrificus, B. alternatus, O.t. guibei e A. javanicus. Em pH baixo (6,2) e na ausência de ATP, as curvas são bifásicas com exceção de C.d. terrificus, que mostra apenas uma fase lenta. O caráter bifásico mostra a presença de duas formas moleculares: uma que libera O<sub>2</sub> mais facilmente e compatível com tetrâmeros (fase rápida), e outra que o faz lentamente (compatível com dímeros). Em pH mais elevado novamente aparece o comportamento bifásico na maioria dos hemolisados, e a proporção de fase rápida aumenta nos hemolisados de M. bifossatus e O.t. guibei. Nos demais hemolisados a fase rápida diminui (em B. alternatus) ou desaparece (em C.d. terrificus e A. javanicus).

Ao mesmo tempo, a velocidade de dissociação diminui, o que reflete a maior afinidade por O<sub>2</sub> nesse pH. A magnitude da



variação em função do pH foi dependente da espécie estudada.

Na presença de ATP a proporção da fase rápida eleva-se em todos os hemolisados que mostram caráter bifásico, o que reflete a estabilização da forma tetramérica. Os percentuais de fase rápida são maiores em pH 8,2 e a velocidade de dissociação de O<sub>2</sub> diminui nos hemolisados de M. bifossatus, B. alternatus e O.t. guibei. C.d. terrificus por outro lado, praticamente só apresenta a fase rápida, e em A. javanicus em pH elevado não foi constatada a presença de fase rápida.

Os componentes isolados por isoeletrofocalização mostram apenas uma fase com valores de dissociação de O<sub>2</sub> compatíveis com a fase lenta antes descrita (tabela III). A dissociação mostra também ser dependente do pH e da espécie.

A figura 16 mostra um exemplo do fenômeno de deriva descrito no capítulo II, observado em pH elevado nos componentes hemoglobínicos isolados de todos os hemolisados estudados. As hemoglobinas de A. javanicus apresentaram a maior deriva. Com o objetivo de confirmar este achado realizamos experiências de variação brusca de pH (pH-jump) já descrita, na qual comprovamos o fenômeno. Uma observação interessante realizada nessa ocasião foi a ausência de pontos isosbéticos entre dímeros e tetrameros desoxigenados na faixa de Soret. Hemoglobina humana HbA<sub>0</sub> não apresentou deriva nas mesmas condições experimentais.

Na tabela IV são mostrados os dados de combinação do hemolisado e hemoglobinas de M. bifossatus com CO. O hemoli-

sado isento de fosfatos mostra um maior percentual de fase rápida (atribuída a dímeros) em pH elevado, enquanto que o obtido após passagem por DEAE-Sepharose apresenta apenas fase rápida. As Hbs separadas por isoeletrofocalização, por sua vez, apresentam em pH elevado pequena proporção de fase lenta.

A tabela V refere-se aos dados de recombinação com CO após fotólise (flash photolysis) nas Hbs isoladas em isoeletrofocalização das cinco espécies mencionadas na tabela IV. Os dados mostram para todas as espécies variação da velocidade de recombinação com o pH, principalmente em *A. javanicus*, e a elevação da proporção da fase rápida (atribuída a dímeros) a pH mais elevado.

#### iv) Estudos de sedimentação em ultracentrifuga analítica

De acordo com ANTONINI et al. (1971), os valores esperados do coeficiente de sedimentação para tetrâmeros de Hb humana situam-se entre 4,13 e 4,60 s.<sup>6</sup>. Os valores para tetrâmeros de outras espécies animais são compatíveis com essa faixa. Os valores atribuídos a dímeros variam de 3,47 a 3,79 s. Os resultados obtidos por nós com HbAo confirmam os valores antes citados para tetrâmeros.

Os dados obtidos com os hemolisados de todas as espécies de ofídios oscilaram entre os valores esperados para dímeros e tetrâmeros, incluindo valores intermediários. Não foi

---

<sup>6</sup> expresso em Svedbergs (1 s. = 10<sup>-13</sup> segundos).

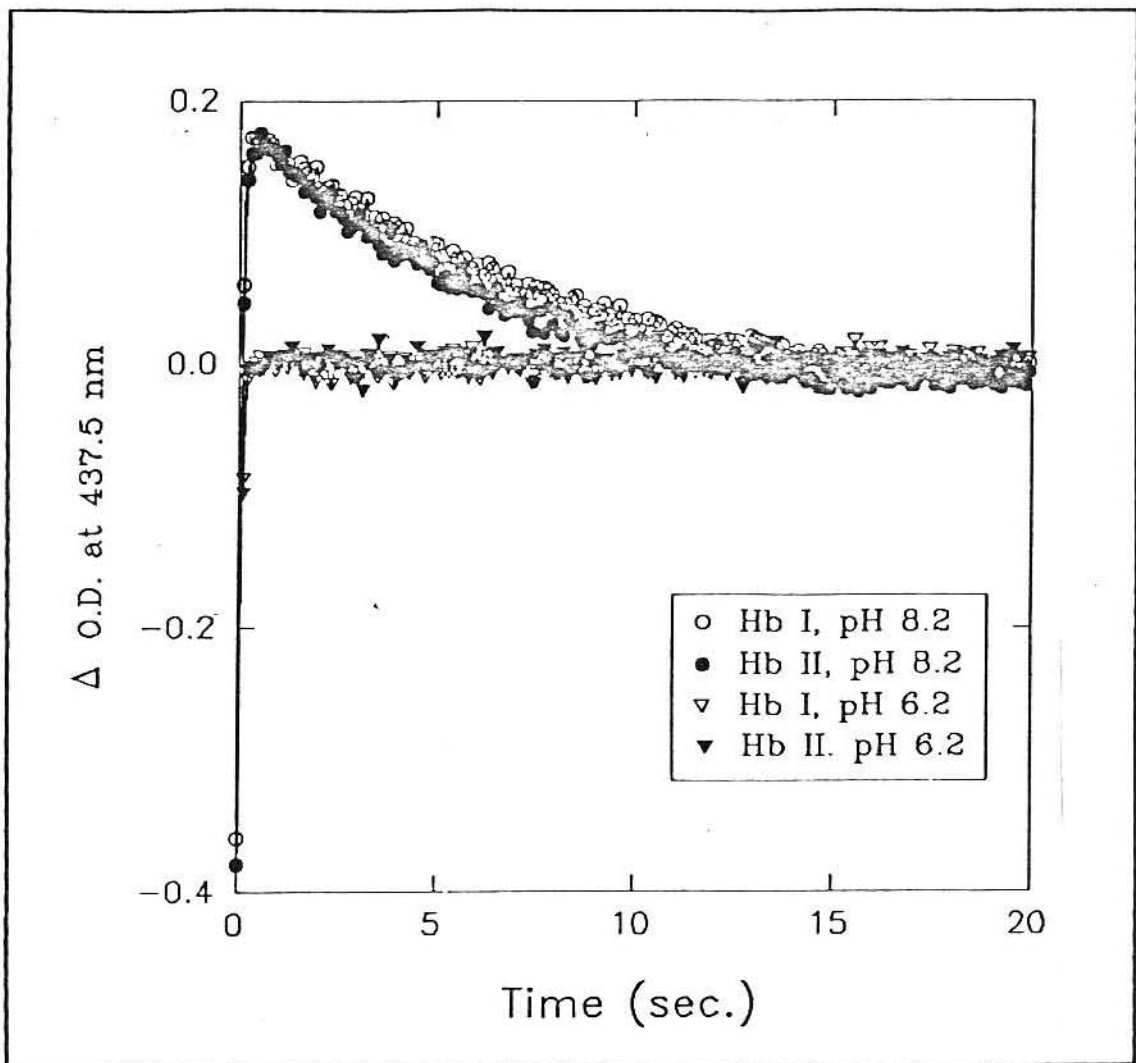


Figura 16 Deriva observada em fluxo interrompido (O<sub>2</sub>-off) nas Hbs de M. bifossatus em Tris-HCl 50 mM pH 8,5.

achada uma tendência clara em relação ao pH, embora os valores sugerissem maior dissociação em pH acima de 7,5. A figura 17 mostra graficamente os valores de sedimentação determinados no hemolisado de M. bifossatus.

Nos vários experimentos que mostraram resultados intermediários foram observados alguns comportamentos interessantes. Em alguns casos os valores de migração variavam entre os esperados para dímeros e tetrameros, e em outros a migração

inicial era compatível com dímeros, passando depois a se comportar como tetrâmeros. Por último, em outras experiências a mesma amostra mostrava, em experimentos diferentes, valores compatíveis com dímeros em uma ocasião e com tetrâmeros em outra. Um exemplo disto constitui a determinação dos valores de sedimentação dos componentes hemoglobínicos de M. bifossatus. A HbI mostrou valores compatíveis com tetrâmeros, enquanto que a HbII apresentou valores de tetrâmero num experimento (4,32 s.) e de dímero em outro (3,64 s.).

Outra observação interessante é o formato da frente de migração registrado no scanner obtido em algumas experiências<sup>7</sup> (Fig. 18). A forma da frente de migração sugere a existência de dois picos unidos por espécies com migração intermediária fruto de um equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros.

#### v - Filtração em gel

Os resultados mostraram em resumo: a) valores compatíveis com dímeros (nos hemolisados de L. miliaris, C. durissus terrificus e B. alternatus), b) valores compatíveis com tetrâmeros (nos mesmos hemolisados, testados em condições semelhantes) e c) uma mistura de ambas as formas. A figura 19 mostra um exemplo deste último comportamento observado em

---

<sup>7</sup> Quando os resultados apresentavam valores de migração situados entre os esperados para dímeros e tetrâmeros.

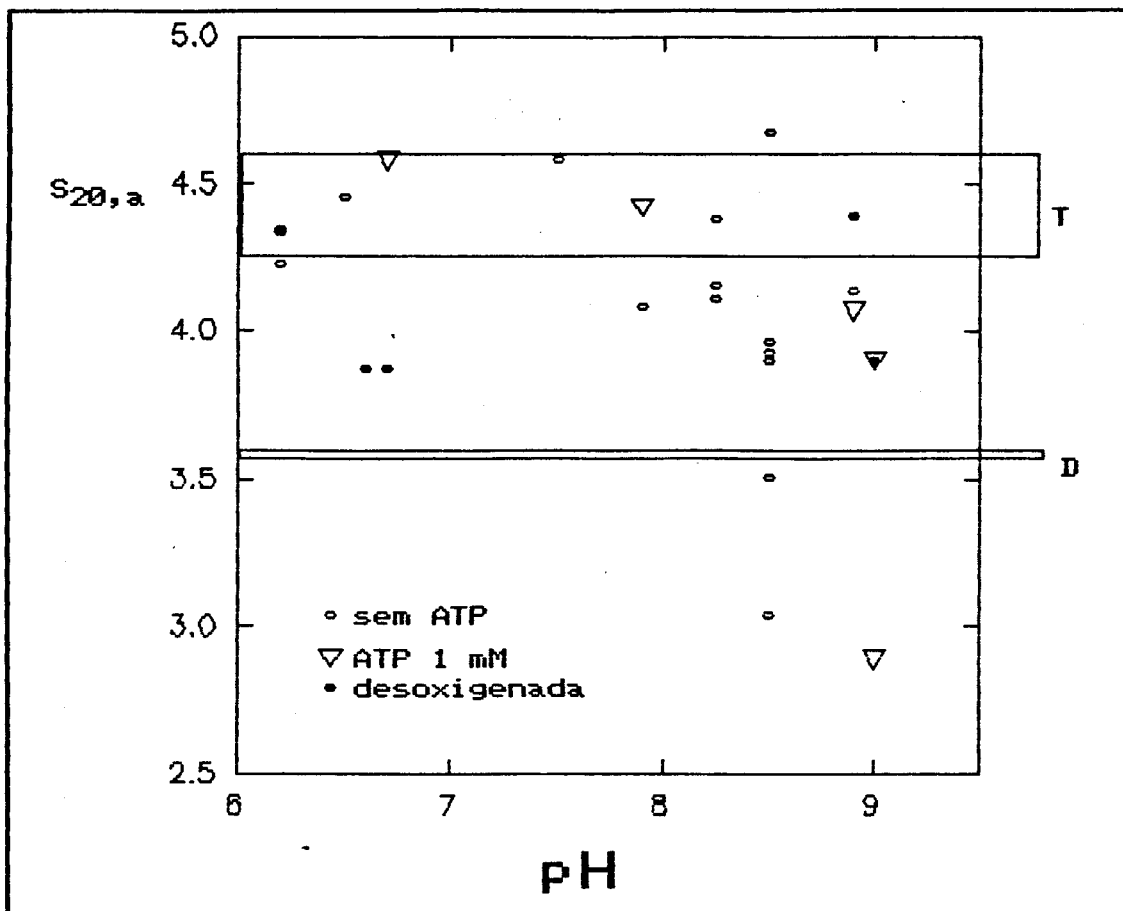


Figura 17 Valores de sedimentação em ultracentrifuga analítica no hemolisado de *M. bifossatus*. bis-Tris/Tris-HCl 50 mM a 20°C. "T" e "D": valores esperados para tetrâmeros e dímeros respectivamente.

experiências realizadas em Sephadex G-100 com oxiemoglobina.

Em alguns hemolisados foi observada a migração de um pico que eluiu no volume de exclusão da coluna. Tal fato acontecia em hemolisados de *C. d. terrificus* e *B. alternatus* após vários dias sob refrigeração, refletindo, presumivelmente, a polimerização de tetrâmeros por pontes dissulfeto.

vi - estimativa de parâmetros dos modelos de Adair e MWC

O modelo de Adair não se mostrou adequado para a des-

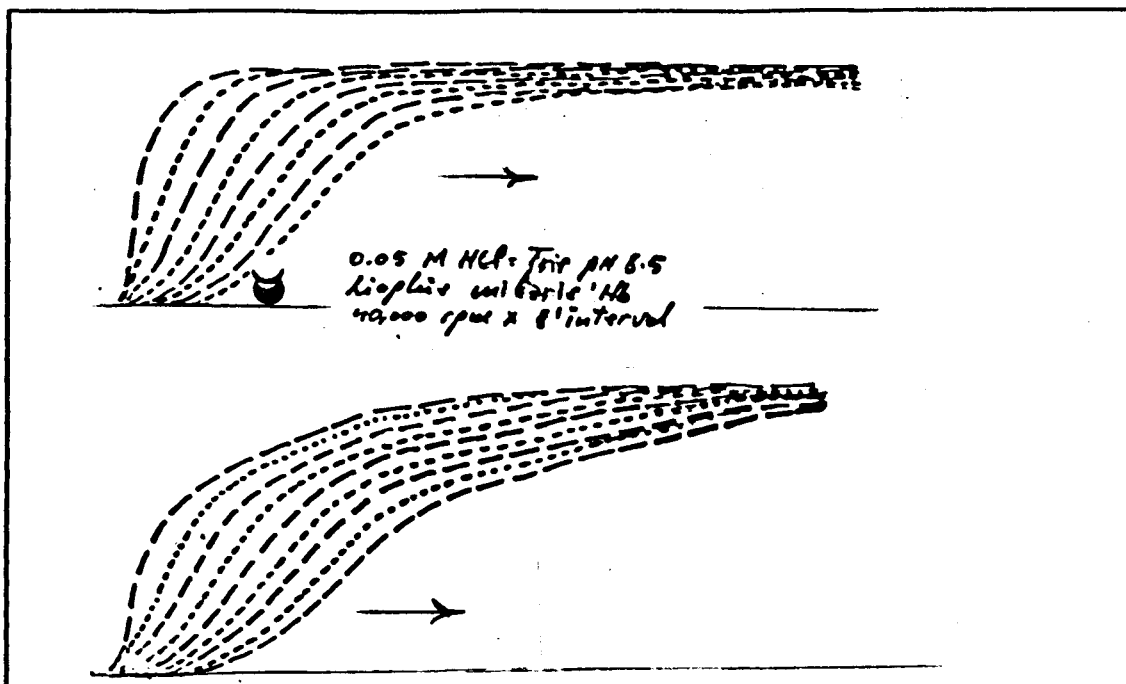


Figura 18 Padrões de migração registrados em scanner e observados no hemolisado de *L. miliaris* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 a 20°C.

crição do comportamento das hemoglobinas testadas, uma vez que a variação das constantes ( $K_1$  a  $K_4$ ) não exhibe um padrão coerente nas diferentes situações. Este comportamento seria esperado na presença de dímeros, dada a extrema sensibilidade deste modelo em relação a fenômenos de dissociação em subunidades.

Os estudos de ajustamento ao modelo MWC, por outro lado, mostraram que as propriedades funcionais das hemoglobinas estudadas podem ser representadas em linhas gerais dentro dos pressupostos desta hipótese, embora seria necessário formular uma derivação do modelo original para uma análise mais apurada. Os dados obtidos são mostrados na figura 20.

Pode ser observado que na ausência de ATP a constante

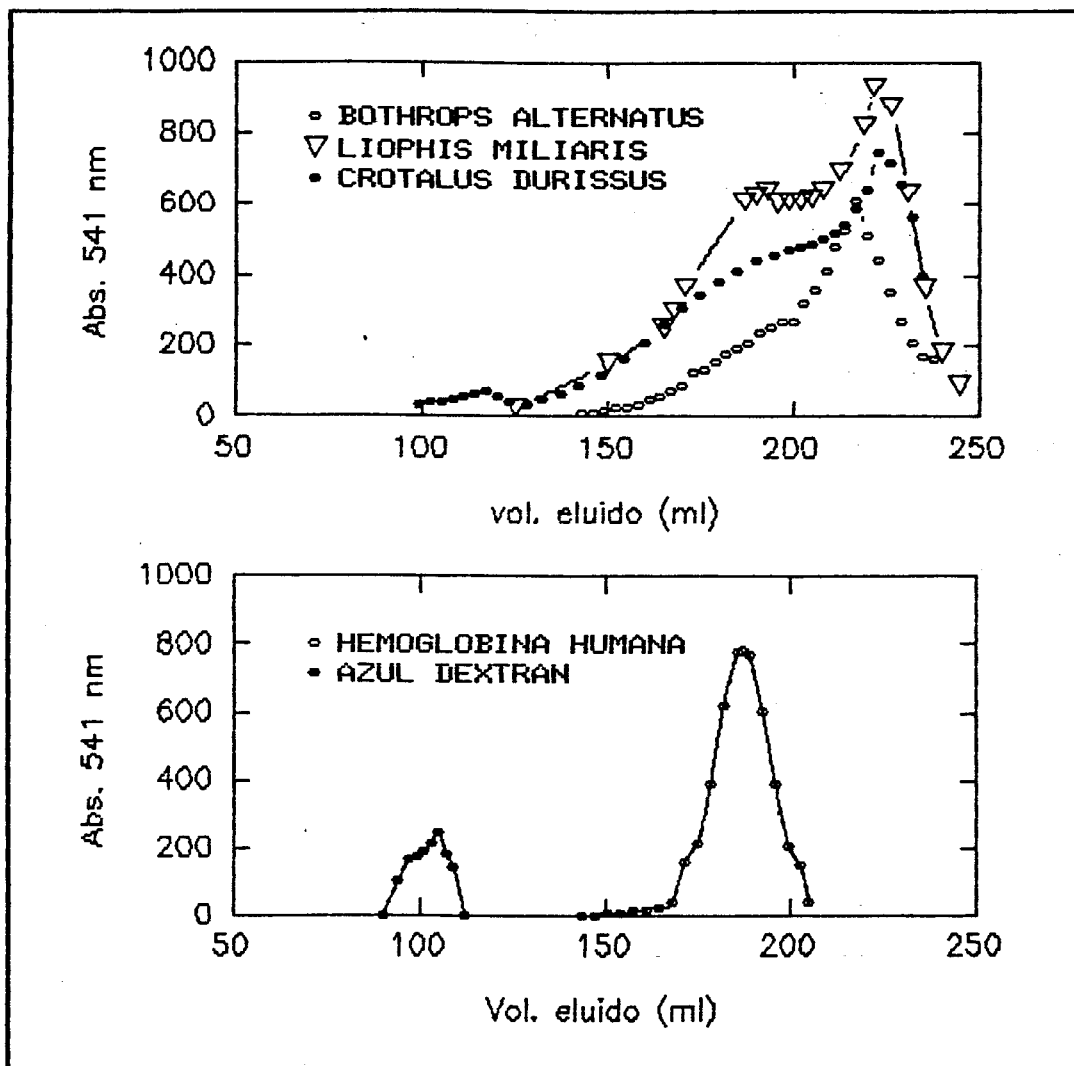


Figura 19 a) Perfil de eluição das hemoglobinas de *L. miliaris*, *B. alternatus* e *C.d. terrificus* em Sephadex G-100. b) Hemoglobina humana e Azul Dextran. Condições: Tris-HCl 50 mM com EDTA 1 mM, 25°C.

alostérica "L" é baixa e diminui com a elevação do pH. Na presença deste fosfato os valores aumentam significativamente, e só decrescem em pH elevado. Os valores estimados das constantes  $K^R$  e  $K^T$  variam com as condições experimentais, fato não contemplado no modelo MWC original e já observado por vários autores (KILMARTIN et al., 1978; IMAI, 1983).

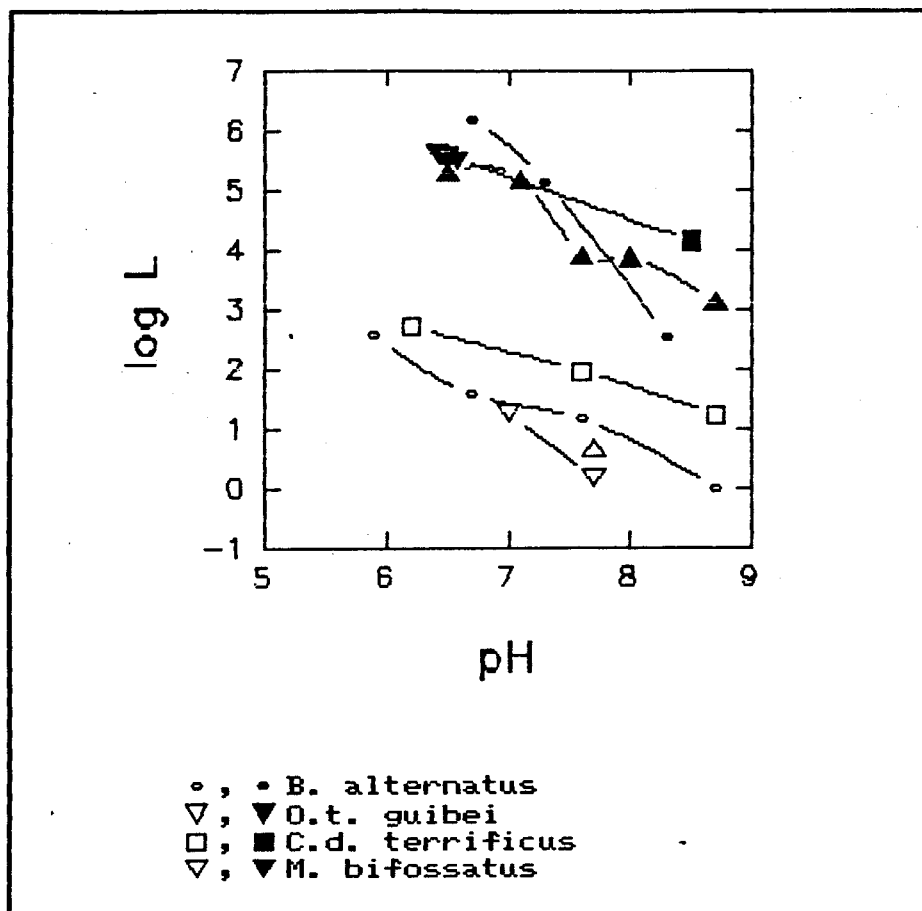


Figura 20 Estimativa dos valores da constante alostérica "L" do modelo MWC na ausência e na presença de ATP em diversos pHs. [Hb] 40-60  $\mu$ M (heme) em tampões bis-Tris e Tris-HCl 50 mM.



TABELA III

Constante de velocidade de dissociação de primeira ordem,  $k'$  para as hemoglobinas de cinco espécies de serpentes determinado por espectrofotometria de fluxo interrompido a 20°C. A concentração final de hemoglobina foi 10  $\mu$ M (heme) em todas as experiências. Os tampões foram bis-Tris-HCl 0,05 M pH 6,2 e Tris-HCl 0,05 M pH 8,2. Hb I e II são os componentes isolados por isoeletrofocalização.

Mastigodryas bifossatus

PROTEINA	pH	k1 (seg <sup>-1</sup> )	k2 (seg <sup>-1</sup> )	Fase rápida (fração)	K <sub>a,2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Hemolisado sem ATP	6,2	61,40	23,95	0,27	5,07.10 <sup>6</sup>
	8,2	41,20	11,97	0,60	3,75.10 <sup>6</sup>
Hemolisado com ATP	6,0	82,30	16,90	0,87	5,15.10 <sup>6</sup>
	8,0	46,75	...	0,97	1,08.10 <sup>6</sup>
Hb I sem ATP	6,2		19,73	0,00	...
	8,2		18,79	0,00	...
Hb II sem ATP	6,2		19,85	0,00	...
	8,2		19,06	0,00	...

Crotalus durissus terrificus

PROTEINA	pH	k1 (seg <sup>-1</sup> )	k2 (seg <sup>-1</sup> )	Fase rápida (fração)	K <sub>a,2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Hemolisado sem ATP	6,2	23,48		1,00	...
	8,2		16,35	0,00	...
Hemolisado + ATP	6,0	42,10	...	0,95	3,80.10 <sup>7</sup>
	8,0	31,40	...	0,92	1,44.10 <sup>7</sup>
Hb I sem ATP	6,2		15,70	0,00	...
	8,2		14,30	0,00	...
Hb II sem ATP	6,2		16,49	0,00	...
	8,2		15,56	0,00	...

Bothrops alternatus

PROTEINA	pH	k1 (seg <sup>-1</sup> )	k2 (seg <sup>-1</sup> )	Fase rápida (fração)	K <sub>4,2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Hemolisado sem ATP	6,2	40,15	17,80	0,79	1,79.10 <sup>6</sup>
	8,2	24,20	9,15	0,69	7,18.10 <sup>5</sup>
Hemolisado + ATP	6,0	98,20	23,90	0,80	2,00.10 <sup>6</sup>
	8,0	40,20	...	0,92	1,44.10 <sup>7</sup>
Hb I sem ATP	6,2		19,88	0,00	...
	8,2		15,68	0,00	...
Hb II sem ATP	6,2		25,56	0,00	...
	8,2		16,72	0,00	...

Oxyrhopus trigeminus guibei

PROTEINA	pH	k1 (seg <sup>-1</sup> )	k2 (seg <sup>-1</sup> )	Fase rápida (fração)	K <sub>4,2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Hemolisado sem ATP	6,2	44,05	25,10	0,32	6,92.10 <sup>4</sup>
	8,2	41,05	10,30	0,68	6,64.10 <sup>5</sup>
Hemolisado + ATP	6,0	147,40	61,90	0,59	3,51.10 <sup>5</sup>
	8,0	50,80	...	0,96	6,00.10 <sup>7</sup>
Hb I sem ATP	6,2		22,79	0,00	...
	8,2		20,28	0,00	...
Hb II sem ATP	6,2		24,12	0,00	...
	8,2		20,39	0,00	...

Acrochordus javanicus

PROTEINA	pH	k1 (seg <sup>-1</sup> )	k2 (seg <sup>-1</sup> )	Fase rápida (fração)	K <sub>4,2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Hemolisado sem ATP	6,2	32,00	15,20	0,81	2,24.10 <sup>6</sup>
	8,2		7,00	0,00	...
Hemolisado + ATP	6,0	132,30	68,95	0,67	6,15.10 <sup>5</sup>
	8,0		10,10	0,00	...
Hb I sem ATP	6,2		13,81	0,00	...
	8,2		5,41	0,00	...
Hb II sem ATP	6,2		13,01	0,00	...
	8,2		5,66	0,00	...

TABELA IV

Combinação de monóxido de carbono com hemoglobina de *M. bifossatus* determinada por espectrofotometria de fluxo interrompido a 20°C. As condições são iguais às citadas na tabela anterior. A constante de 2ª ordem,  $l'$  ( $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ ), foi calculada dividindo a taxa de variação observada pela concentração final de monóxido de carbono.

Proteína	pH	11'	12'	fração da fase rápida	$K_{4,2}$ ( $\text{M}^{-1}$ )
Hemolisado sem ATP	6,0	0,31	0,09	0,82	$2,68 \cdot 10^4$
	8,2	0,47	0,15	0,86	$1,89 \cdot 10^4$
Hemolisado sem ATP após DEAE	6,0	0,30		1,00	...
	8,2	0,45		1,00	...
Hb I sem ATP	6,0	0,31		1,00	...
	8,2	0,51	0,13	0,81	$2,90 \cdot 10^4$
Hb II sem ATP	6,0	0,31		1,00	...
	8,2	0,51	0,13	0,62	$9,89 \cdot 10^4$

TABELA V - Recombinação de monóxido de carbono com hemoglobinas de cinco espécies de serpentes na ausência de ATP após fotólise com flash. Todas as condições são as mesmas descritas na tabela anterior.

Proteína	pH	11'	12'	fração da fase rápida	$K_{4,2}$ ( $M^{-1}$ )
<u>Mastigodryas bifossatus</u>					
Hb I	6,2	0,45		1,00	...
	8,2	0,82	...	0,91	$1,09 \cdot 10^4$
Hb II	6,2	0,54	0,41	0,18	$2,53 \cdot 10^6$
	8,2	0,82		1,00	...
<u>Crotalus durissus terrificus</u>					
Hb I	6,2	0,45		1,00	...
	8,2	0,73		1,00	...
Hb II	6,2	0,44		1,00	...
	8,2	0,75		1,00	...
<u>Bothrops alternatus</u>					
Hb I	6,2	0,72	0,39	0,58	$1,25 \cdot 10^6$
	8,2	1,18	0,26	0,74	$4,75 \cdot 10^4$
Hb II	6,2	0,45	0,39	0,29	$8,44 \cdot 10^6$
	8,2	0,75		1,00	...
<u>Oxyrhopus trigeminus guibei</u>					
Hb I	6,2	2,81	1,01	0,22	$1,61 \cdot 10^6$
	8,2	2,36	0,85	0,60	$1,11 \cdot 10^6$
Hb II	6,2	2,96	1,20	0,24	$1,32 \cdot 10^6$
	8,2	2,56	0,90	0,56	$1,40 \cdot 10^6$
<u>Acrochordus javanicus</u>					
Hb I	6,2	...	0,31	0,04	$6,00 \cdot 10^7$
	8,2	3,23	0,65	0,37	$4,60 \cdot 10^6$
Hb II	6,2	...	0,41	0,07	$1,90 \cdot 10^7$
	8,2	2,20	0,54	0,31	$7,18 \cdot 10^6$

De modo geral as propriedades funcionais dos hemolisados de serpentes analisados na ausência de ATP mostraram: i) um efeito Bohr alcalino menor do que o calculado para a hemoglobina humana, ii) dependência da cooperatividade em função do pH principalmente na forma isenta de fosfatos e em alguns casos também na presença de concentração saturante de ATP, e iii) alterações significativas da afinidade por oxigênio e da cooperatividade na presença de ATP em concentração saturante. Estas propriedades funcionais observadas coincidem em linhas gerais com as descritas na hemoglobina de Liophis miliaris, com algumas ligeiras particularidades para cada espécie. No presente trabalho, contudo, obtivemos um maior efeito Bohr em L. miliaris do que o descrito por MATSUURA et al. (1987). A hemoglobina da espécie Acrochordus javanicus, espécie completamente aquática e considerada primitiva (SEYMOUR, 1981), apresenta um efeito Bohr significativo. Segundo SEYMOUR et al. (1981) tal efeito Bohr seria extremamente benéfico ao animal, uma vez que sua hemoglobina possui elevada afinidade por oxigênio e esta permitiria a captação de O<sub>2</sub> a partir da água (esta espécie é capaz de efetuar trocas gasosas pela pele). Por outro lado o efeito Bohr facilitaria sobremaneira a descarga do gás aos tecidos.

O efeito de ATP sobre a afinidade produzindo um decréscimo significativo da afinidade por oxigênio (tabela II)

sugere que as constantes de associação destas hemoglobinas pelo efector alostérico sejam consideravelmente elevadas. Tal fenômeno teria por objetivo, *in vivo*, assegurar a liberação de O<sub>2</sub> para os tecidos, uma vez que o gradiente do gás entre os vasos sangüíneos e as células é consideravelmente maior em répteis do que em mamíferos devido à menor densidade capilar (POUGH, 1980).

Estudos realizados com hemoglobinas de serpentes já têm descrito um baixo efeito Bohr e dependência da cooperatividade em relação ao pH. Assim, DUGUET et al. (1975) acharam em Vipera aspis um efeito Bohr de -0,1 entre pHs 7 e 8. Os dados obtidos por SEYMOUR et al. (1975) trabalhando com sangue total de serpentes marinhas, mostra valores de efeito Bohr muito baixos ou ausentes e valores de pH de 7,41 e 7,00 em repouso e após exercício respectivamente. O baixo efeito Bohr teria aqui também efeito benéfico evitando que a afinidade em pH ácido diminua demais a ponto de prejudicar a oxigenação do sangue. Isto constituiria uma vantagem em animais com mistura variável de sangue venoso e arterial, como é o caso das serpentes, após esforço físico continuado, quando os níveis de lactato podem aumentar significativamente. Neste particular, os trabalhos de RUBEN (1976, 1979) mostram estreita relação entre os hábitos e a capacidade de efetuar metabolismo anaeróbico. As espécies M. bifossatus e L. miliaris seriam consideradas como forrageadores ativos (racers), capazes de sustentar atividade elevada durante

longos períodos. C. durissus terrificus e B. alternatus seriam dois típicos predadores de espera (sit-and-wait predators), capazes de efetuar curtos períodos de atividade intensa, e os demais seriam consideradas como sendo animais lentos (sluggish).

SHIH (1985) citá três mecanismos capazes de alterar o efeito Bohr alcalino: a) modificação dos resíduos envolvidos no efeito, b) alteração dos aminoácidos do sítio de ligação de efetores, e c) mudança extrema do equilíbrio  $T \rightleftharpoons R$  no sentido do "R", com perda de cooperatividade. MATSUURA et al. (1989) determinaram que tanto os resíduos envolvidos com o efeito Bohr quanto com a ligação de fosfato se encontram preservados em duas globinas de L. miliaris. A terceira opção é a mais plausível causa do baixo efeito Bohr, levando em consideração a tendência dessa hemoglobina em se dissociar. O efeito Bohr aparente seria originado pelo equilíbrio de associação dímero-tetrâmero, o qual aparenta ser dependente do pH (maior dissociação quanto maior o pH) e das condições *in vitro* (a associação em tetrâmeros é proporcional à concentração de ânions no meio).

A dependência da cooperatividade em relação ao pH apresentado por todos os hemolisados estudados na ausência de ATP e por alguns ainda na sua presença, pode, à luz do modelo descrito na hemoglobina de L. miliaris, ser considerado como mais um indicativo da ocorrência de fenômenos similares de dissociação-associação. Em pH baixo os valores de cooperati-

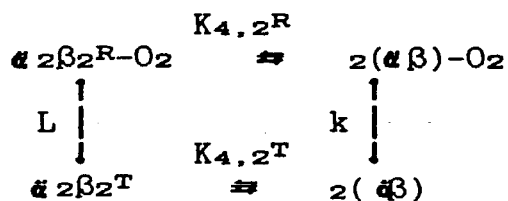
vidade situam-se em torno de 2 ou até acima desse valor, diminuindo com a elevação do pH até se tornarem  $n=1$ , próprio de proteínas não cooperativas. A dissociação do tetrâmero leva à ausência de cooperatividade porque elimina as mudanças de estrutura quaternária que acompanham a oxigenação, e ao mesmo tempo, a afinidade por  $O_2$  aumenta, por não existirem restrições estruturais (RIGGS, 1991b). Este comportamento é típico de hemoglobinas dissociadas em dímeros. Como já tem sido extensivamente descrito na literatura, a cooperatividade e a afinidade por oxigênio são indicativos da estabilidade da molécula tetramérica, embora moléculas muito estabilizadas (em termos do estado "T") apresentem baixa cooperatividade, e afinidade muito baixa por oxigênio. RIGGS escreveu em 1972 que a cooperatividade em hemoglobinas de vertebrados inferiores é freqüentemente dependente do pH, não existindo naquela época uma explicação satisfatória para tal observação.

Por outro lado, os resultados obtidos nas experiências de cinética rápida mostram a existência de proporções significativas de dímeros tanto na dissociação de oxigênio ( $O_2$ -off) quanto na combinação e recombinação de CO (CO-on). Os dados relativos à combinação e recombinação da hemoglobina com CO mostram, como esperado, uma maior proporção de dímeros no pH mais elevado. Isto reflete o comportamento esperado de acordo com os equilíbrios com oxigênio e também tem como subsídio a) as estimativas dos parâmetros do modelo MWC (em especial a constante alostérica "L") que mostram, principal-



mente na ausência de ATP, os valores de L muito baixos e diminuem ainda mais com a elevação do pH. Isto sugere que a proporção de moléculas no estado "relaxado" é muito elevada em relação àquelas no estado "T", aumentando ainda mais em função do pH; b) as determinações dos valores de sedimentação em centrifuga analítica, que apesar de não apresentar uma clara tendência em relação ao pH mostram que existem moléculas com migração compatível com a de dímeros e também valores intermediários que sugerem equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros e possível dissociação em pH elevado; c) diferentes determinações de peso molecular de hemolisados por filtração em gel (na ausência de ATP) em que obtivemos valores de eluição compatíveis com tetrâmeros, com dímeros e em alguns casos obtivemos mistura de ambos. Os dados obtidos com a dissociação de oxigênio em M. bifossatus e O. t. guibei, contudo, mostraram maior proporção de dímeros em pH mais baixo na forma isenta de fosfatos, contra o esperado.

Tais dados sugerem a existência de fenômenos de associação-dissociação entre as formas diméricas e tetraméricas, o que poderia ocorrer segundo o esquema seguinte (simplificado):



As características deste mecanismo poderiam ser resumidas como segue: a) nas hemoglobinas de ofídios estudadas em

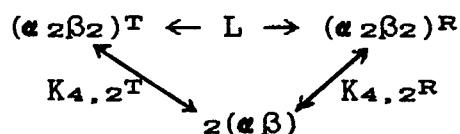
nossas condições experimentais existiriam pelo menos duas formas moleculares básicas:

- tetrâmero "T" na forma desoxigenada na presença de fosfato que durante a oxigenação muda para o estado "R". Esta forma também existe na ausência do efator, porém em muito menor proporção.

- dímeros na forma oxigenada na ausência de fosfato. Na presença do efator a sua concentração dependeria da relação polifosfato:tetrâmero de Hb. Possivelmente os dímeros também existam na forma desoxigenada, em pH elevado, como sugerem as experiências de combinação com CO.

As formas intermediárias em equilíbrio com as anteriores encontradas nos estudos de filtração em gel e de sedimentação evidenciariam uma interconversão entre ambas as formas antes citadas.

De acordo com o modelo descrito por EDELSTEIN (1979) as propriedades da hemoglobina poderiam ser descritas pelo seguinte sistema:



onde "L" é a constante alostérica ( $L = (\alpha_2\beta_2)^T / (\alpha_2\beta_2)^R$ ) e  $K_{4,2}$  com os índices "T" e "R" representa as constantes de dissociação tetrâmero-dímero dos estados T e R, respectivamente. Segundo este esquema, L teria o seu valor alterado através da variação das constantes de dissociação tetrâmero-dímero dos estados T e R. Considerando que  $L = K_{4,2}^R / K_{4,2}^T$ , o maior valor

de L em pH baixo seria devido à elevada dissociação das moléculas no estado R, ou seja, na forma oxigenada, e/ou à diminuição do valor de  $K_{4,2}^T$ . Em pH mais elevado, o valor de L diminuiria pelo aumento relativo da constante de dissociação do estado T (desoxigenado). A elevação do pH desestabilizaria a forma T como comprovado em hemoglobina humana por CHU et al. (1981,1982), produzindo a dimerização ainda da forma desoxigenada, como sugerido pelas experiências de combinação de CO com a hemoglobina de M. bifossatus. Os valores de  $K_{4,2}$  obtidos por cinética rápida sugerem que a principal variação em função do pH ocorre na  $K_{4,2}^T$ . Os valores estimados da constante alostérica "L" também apóiam esta idéia.

À ocorrência de fenômenos de associação-dissociação *in vivo* tem sido proposta por alguns autores. Já em 1965 RIGGS afirmava que pelo menos a maioria (se não todas) as hemoglobinas tetraméricas existiriam em equilíbrio com suas subunidades, embora tal equilíbrio estivesse deslocado no sentido do tetrâmero. MATSUURA et al. (1987) consideraram que a existência do mecanismo de associação-dissociação descrito em L. miliaris possuiria vantagens adaptativas para essa espécie. Mais recentemente PERRELLA et al. (1990) afirmam que a assimetria existente entre as interfaces  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_1\beta_1$  levariam à dissociação do tetrâmero na interface  $\alpha_1\beta_2$  em condições fisiológicas. Os últimos autores também consideram a existência de diferentes re-arranjos moleculares ainda em hemo-

globinas simétricas devido aos diferentes estados de ligação dos dímeros.

Na presença de ATP o comportamento funcional muda significativamente em todos os casos, e a elevação notória da cooperatividade, a diminuição da afinidade por oxigênio e o aumento do valor da constante alostérica "L" são compatíveis com formas tetraméricas. MATSUURA et al. (1987), trabalhando com hemolisado de L. miliaris em filtração em gel na presença de IHP, obtiveram peso molecular de 64 Kd (tetrâmero). Além do efeito específico de fosfato causado pela ligação dessa molécula ao seu sítio específico entre as cadeias beta, parece existir um efeito de cloreto. Este íon foi capaz, em hemolisado de B. alternatus, de elevar proporcionalmente à sua concentração tanto os valores de  $P_{50}$  (diminuindo a afinidade por oxigênio) quanto de cooperatividade ( $n_{50}$ ). Esse comportamento foi observado até a concentração de cloreto de 1 M, condição na qual a hemoglobina humana é dissociada pelo íon (FARMER et al., 1982). Tal comportamento poderia derivar de uma interação com cargas positivas na interface  $\alpha_1\beta_2$ , onde os ânions aumentariam a atração interdimérica e estabilizariam a forma T, ou de um efeito do  $Cl^-$  sobre a água de solvatação, afetando o equilíbrio dímero-tetrâmero no sentido da tetramerização (M.F. COLOMBO, comunicação pessoal).

Sabe-se que o cloreto afeta as constantes de equilíbrio dímero-tetrâmero de hemoglobina humana, principalmente  $K_{4,2^R}$ , a constante referente à oxiemoglobina (CHU et al., 1981). O

efeito de cloreto observado não é comparável, contudo, com o observado por FRONTICELLI et al. (1984) em hemoglobina bovina, onde o íon exerceria o papel de efetor alostérico em lugar de fosfatos.

A existência de hemoglobinas múltiplas em serpentes e em outros répteis tem sido descrita em vários trabalhos (DESSAUER et al., 1957; SCHWANTES, 1972; SULLIVAN, 1974). Este fato é considerado como sendo uma vantagem adaptativa, uma vez que capacitaria a resposta do sistema respiratório a diversas situações fisiológicas (POWERS, 1974; POUGH, 1980). A existência de fenômenos de dissociação permitiria, teoricamente, a formação de diferentes configurações tetraméricas de acordo com a situação fisiológica. A ocorrência de tal fenômeno *in vivo* configuraria um novo mecanismo de controle da atividade de proteínas alostéricas, e a elucidação do seu controle mereceria estudos aprofundados.

Em todas as espécies foi determinada por isoeletrofocalização a existência de pelo menos duas hemoglobinas principais nas amostras desoxigenadas e presentes aproximadamente nas mesmas proporções, o que seria o esperado de acordo com as determinações do número de cadeias de globina. As amostras analisadas pelo mesmo método na forma de carbóxiemoglobina mostraram várias bandas, o que presumivelmente é devido a fenômenos de dissociação. As análises eletroforéticas, por outro lado, revelaram escassa resolução. De acordo com DESSAUER et al (1957) os padrões eletroforéticos de hemoglo-

binas de serpentes não seguem padrões mendelianos, uma vez que "fenótipos esperados" são claramente ausentes. Esta observação poderia estar refletindo fenômenos de associação-dissociação em outras espécies de ofídios.

#### Efeito da temperatura

Os animais ectotérmicos sofrem forte pressão seletiva sobre as propriedades funcionais de suas hemoglobinas. A afinidade por oxigênio dessas proteínas (usualmente expressadas em termos da  $P_{50}$ ) tem de ser compatível com a temperatura ambiental e a disponibilidade de  $O_2$  (HOCHACHKA et al., 1973). Uma vez que a oxigenação da hemoglobina é uma reação exotérmica, a elevação da temperatura produz, seguindo o princípio de *Le Chatelier*, a diminuição da afinidade pelo gás (WOOD, 1980). A variação aparente da entalpia  $\Delta H_{app}$  pode ser considerada como resultado de dois processos exotérmicos: por um lado  $\Delta H_{intr}$  (calor intrínseco de oxigenação) e  $\Delta H_{sol}$  (calor de solução do  $O_2$ ) e, por outro, a liberação endotérmica de efetores de Hb tais como prótons e fosfatos (WEBER et al., 1988; SODE, 1991).

Analisando os resultados em termos da variação de entalpia " $\Delta H$ ", também conhecida como "calor aparente de oxigenação" (POUGH, 1980), vemos que a variação da temperatura sobre a afinidade por oxigênio mostrou um maior efeito no hemolisado na ausência de ATP, comparado com as amostras na presença do efetor, nos quais a ligação do fosfato reduz a  $\Delta H$ , uma vez que essa reação também é exotérmica (WOOD, 1980;

WEBER et al., 1988). Supõe-se que uma menor sensibilidade da afinidade por  $O_2$  estabiliza as propriedades funcionais da hemoglobina de animais ectotérmicos face a mudanças externas da temperatura. Uma maior sensibilidade da afinidade, por outro lado, ajudaria na oxigenação tecidual quando a temperatura aumenta (POUGH, 1980).

Para os hemolisados das espécies terrestres na presença de ATP, a variação de  $\Delta H$  diminuiu com a elevação do pH, com exceção do hemolisado de *O.t. guibei*, no qual  $\Delta H$  pareceu permanecer mais ou menos constante e aumentar levemente em função do pH. Os valores em pH 7,5 permaneceram, contudo, abaixo de -4 kcal/mol. O hemolisado de *A. javanicus*, por outro lado, apresentou valores de  $\Delta H$  maiores em pH 7,5, chegando a -8 kcal/mol. Acima e abaixo desse pH os valores permaneceram aproximadamente constantes. Os valores menores de  $\Delta H$  achados nos hemolisados das espécies de hábitat terrestre e sujeitas, portanto, a variações significativas da sua temperatura corporal, representariam uma proteção contra a variação brusca das propriedades funcionais da hemoglobina, como já foi discutido. É interessante lembrarmos também que, uma vez que a oxigenação é um processo exotérmico, a Hb libera calor dos tecidos nos pulmões, e como sugerido por WEBER et al. (1988), uma menor  $\Delta H$  contribuiria para a conservação da temperatura corpórea. *A. javanicus*, por outro lado, é uma espécie aquática que vive em extremos de temperatura relativamente estreitos, o que a caracterizaria como sendo

"estenotérmica". Talvez, neste caso, a maior sensibilidade à temperatura (expressa como  $\Delta H$ ) represente uma vantagem adaptativa para este ofídio. Outros exemplos de maiores valores de  $\Delta H$  em animais estenotérmicos são citados por WOOD (1980). O mesmo autor cita valores entre -9 e -14 kcal/mol para endotermos (mamíferos). POWERS (1980), entretanto, afirma que tais observações não constituem regra geral, mostrando algumas exceções.

GREENWALD (1971), trabalhando com sangue total da serpente Pituophis catenifer affinis Hallowell (gopher snake), encontrou um efeito significativo da temperatura sobre a afinidade por oxigênio. Usando os seus dados calculamos que  $\Delta H$  seria de -6,8 kcal/mol, valor compatível com nossos dados na presença de ATP em M. bifossatus em pH 6,5 e com A. javanicus em toda a faixa de pH testada. Nas demais espécies achamos valores inferiores. O comportamento das hemoglobinas analisadas sugere que *in vivo*, a oxigenação não seria prejudicada por uma diminuição significativa da afinidade por oxigênio, enquanto que a nível tecidual a liberação do O<sub>2</sub> seria facilitada, principalmente em M. bifossatus, espécie muito ativa. O decréscimo da afinidade por O<sub>2</sub> teria também por objetivo a manutenção do gradiente entre os vasos e os tecidos para compensar o maior consumo de oxigênio a nível tecidual em virtude da temperatura (SCHMIDT-NIELSEN, 1975), o que pode duplicar entre 20 e 30°C, como mostra PYE (1973).

Mudanças na afinidade por oxigênio em hemoglobinas de



ofídios estão estreitamente relacionados com a atividade do animal. Como animais ectotérmicos, eles tem um certo grau de controle da sua temperatura corporal através de modificações comportamentais (POUGH, 1980). Esta habilidade, entretanto, é limitada pelo efeito de flutuações externas da temperatura, e as serpentes tentam evitar valores extremos. Segundo POUGH (1976), a capacidade fracional de O<sub>2</sub> do sangue de ofídios é máxima em temperaturas médias da faixa de atividade (activity temperature range), diminuindo em temperaturas próximas dos extremos. Isto pode estar relacionado à habilidade destes animais de alterarem a viscosidade e hematócrito dependendo da temperatura, de forma a otimizar o transporte de O<sub>2</sub>. De acordo com G. PUORTO (comunicação pessoal) 20 e 30°C poderiam ser consideradas temperaturas próximas dos limites de atividade intensa para as espécies no nosso país. Em 30°C nós achamos uma diminuição do efeito Bohr para o hemolisado na presença e na ausência de ATP. Isto evitaria uma mudança extrema "para a direita" (right shift) da curva de oxigenação quando ocorresse uma elevação da temperatura corporal do ofídio, o que seria prejudicial para a oxigenação da hemoglobina, como comentado anteriormente. Isto seria claro em C. durissus terrificus, animal que devido ao seu hábitat pode experimentar variações consideráveis de temperatura durante o dia e praticamente não apresenta efeito Bohr. Deve ser lembrado, contudo, que animais com períodos de aclimação apresentam valores de  $\Delta H$  menores aos achados *in vitro*,

como mostrado por WOOD (1980).

### Conclusões

Finalmente, a presente tese procurou contribuir para o estudo de hemoglobinas de serpentes e de fato constatou que as presentes em offídios em sua grande maioria possuem propriedades absolutamente diversas das de outros vertebrados. Propriedades que consistem fundamentalmente na transição oxidímero  $\rightleftharpoons$  desoxitetramero durante o transporte de oxigênio e pode sugerir serem estas hemoglobinas um elo na evolução entre as formas presentes em vertebrados primitivos (com transição entre formas diméricas e monoméricas) e mais evoluídos (com formas tetraméricas estáveis). Este mecanismo parece estar presente em offídios independente do seu grau evolutivo, uma vez que foi demonstrada a sua existência tanto em espécies consideradas evoluídas quanto nas tidas como primitivas como B. constrictor (FOCESI et al., 1992) e A. javanicus.

## V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERS, G.K. (1990)**  
The Energetics of Ligand-Linked Subunit Assembly in Hemoglobin Require a Third Allosteric Structure.  
Biophys. Chem. 37:371-382.
- ADAIR, G.S. (1925)**  
The Hemoglobin System. IV. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin.  
J. Biol. Chem. 63:529-538.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. (1971)**  
Hemoglobin and Myoglobin in Their Reaction with Ligands.  
Publ. por North Holland, Amsterdam.
- ARAKI, T.; OKAZAKI, T.; KAJITA, A. & SHUKUYA, R. (1974)**  
Polymerization of Oxygenated and Deoxygenated Bullfrog Hemoglobins.  
Biochim. Biophys. Acta 351:427-436.
- ARGOS, P. & ROSSMANN, M.G. (1979)**  
Structural Comparisons of Heme Binding Proteins.  
Biochemistry 18, 4951-4960.
- BARTLETT, G.R. (1980)**  
Phosphate Compounds in Vertebrate Red Blood Cells.  
Amer. Zool., 20:103-114.
- BAUER, C.; FORSTER, M.; GROS, G.; MOSCA, A.; PERRELLA, M.; ROLLEMA, H.S. & VOGEL, D. (1981)**  
Analysis of Bicarbonate Binding to Crocodylian Hemoglobin.  
J. Biol. Chem. 256:8429-8435.
- BELLAIRS, A. d'A (1970)**  
Reptiles.  
Hutchinson & Co. Ltd., London.
- BIRCHARD, G.F.; BLACK, C.P.; SCHUETT, G.W. & BLACK, V. (1984)**  
Foetal-Maternal Blood Respiratory Properties of an Ovoviviparous Snake the Cottonmouth, Agkistrodon piscivorus.  
J. Exp. Zool. 108:247-255.
- BLAKE, C. (1983)**  
Exons and the Evolution of Proteins.  
TIBS Jan.83:11-13.

- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J. (1974)**  
Effects of pH and Anions on Functional Properties of Hemoglobin from Lemur fulvus fulvus.  
J. Biol. Chem. 249, 3768-3775.
- BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. (1980)**  
Anionic Control of Function in Vertebrate Hemoglobins.  
Amer. Zool. 20:131-138.
- BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. (1981)**  
Preparation of High Molecular Weight Invertebrate Hemoglobins.  
Meth. Enz., 76:43-54.
- BONILLA, G.O.; FOCESI Jr., A.; CASHON, R.; BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. (1992)**  
Functional Properties of the Hemoglobin from the South-American Snake Mastigodryas bifossatus.  
Em preparação.
- BRIEHL, R.W. (1963)**  
The Relation between the Oxygen Equilibrium and Aggregation of Subunits in Lamprey Hemoglobin.  
J. Biol. Chem. 238:2361-2366.
- BROUWER, M. & BAKER-KING, C. (1988)**  
Thermodynamics of the Interaction of Oxygen with Co(II)-bishistidine and Co(II)-bisbenzylhistidine.  
J. Inorg. Chem. 34:117-133.
- BRUMMEL, M & MONTGOMERY, R. (1970)**  
Acrylamide Gel Electrophoresis of the S-Sulfo Derivatives of Fibrinogen.  
Anal. Biochem. 33:28-35.
- BUCCI, E. & FRONTICELLI, C. (1985)**  
Anion Bohr Effect of Human Hemoglobin.  
Biochem. 24:371-376.
- BULL, H.B. (1964)**  
An Introduction to Physical Biochemistry.  
Publ. por F. Davis Company, Philadelphia.
- BUSCH, M.R. & HO, C. (1990)**  
Effects of Anions on the Molecular Basis of the Bohr Effect of Hemoglobin.  
Biophys. Chem. 37:313-322.
- CANTAROW, W.D.; SAVARIS, C & IVES, D.V. (1982)**  
Preparative Electrofocusing in Agarose Slab Gels.  
Electrophoresis 3:85-89.

- CHIEN, J.C.W. & MAYO, K.H. (1980)  
 Carp Hemoglobin. I. Precise Oxygen Equilibrium and  
 Analysis According to the Models of Adair and of Monod,  
 Wyman and Changeux.  
 J. Biol. Chem. 255:9790-9799.
- CHU, A.H. & ACKERS, G.K. (1981)  
 Mutual Effects of Protons, NaCl, and Oxygen on the  
 Dimer-Tetramer Assembly of Human Hemoglobin.  
 J. Biol. Chem. 256:1199-1205.
- CHU, A.H.; PETTIGREW, D.W.; TURNER, B.W. & ACKERS, G.K.  
 (1982)  
 Stability of the  $\alpha 1\beta 2$  Contact in Oxy and Deoxy Human  
 Hemoglobins. Implications for the Mechanism of  
 Cooperativity.  
 In: Hemoglobin and Oxygen Binding, Elsevier North Hol-  
 land Inc.
- COLOMBO, M.F.; RAU, D.C. & PARSEGIAN, V.A. (1992)  
 Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water  
 Effect on Hemoglobin.  
 Science 256, 655-659.
- CRAICK, C.S.; BUCHMAN, S.R. & BEYCHOK, S. (1981)  
 O<sub>2</sub> Binding Properties of the Product of the Central Exon  
 of  $\beta$ -Globin Gene.  
 Nature 291, 87-90.
- DE SANCTIS, G.; FALCIONI, G.; GIARDINA, B. & ASCOLI, I.  
 (1986)  
 Mini-myoglobin: Preparation and Reaction with Oxygen and  
 Carbon Monoxide.  
 J. Mol. Biol. 188, 73-76.
- DESSAUER, H; FOX, W. & RAMIREZ, J.R. (1957)  
 Preliminary Attempt to Correlate Paper-electrophoretic  
 Migration of Hemoglobins with Phylogeny in Amphibia and  
 Reptilia.  
 Arch. Biochem. Biophys. 71:11-16.
- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L. & VALENTINE,  
 J.W. (1977)  
 Evolution.  
 W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- DUGUET, M.; CHAUVET, J.P. & ACHER, R. (1974)  
 Phylogeny of Hemoglobins: the Complete Amino Acid Se-  
 quence of an  $\alpha$ -Chain of Viper (Vipera aspis) Hemoglobin.  
 FEBS Letters 47:333-337.

- DUGUET, M. & ACHER, R. (1975)  
 The Oxygen Dissociation Curve of Viper (Vipera aspis) Hemoglobin: Functional Similarity with Human Hemoglobin Portland.  
 FEBS Letters 60:267-268.
- EATON, W.A. (1980)  
 The Relationship Between Coding Sequences and Function in Haemoglobin.  
 Nature 284:183-185.
- EDELSTEIN, S.J. (1971)  
 Extensions of the Allosteric Model for Haemoglobin.  
 Nature 230:224-227.
- EDELSTEIN, S.J. (1975)  
 Cooperative Interactions of Hemoglobin.  
 Ann. Rev. Biochem. 44:209-232.
- FARMER, M.; BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. (1982)  
 Effects of Anions and CO<sub>2</sub> on the Dissociation of Liganded Human Hemoglobin and Human Hemoglobin Variants.  
 In: Hemoglobin and Oxygen Binding, Elsevier North Holland Inc.
- FOCESI Jr., A.; OGO, S.H.; BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. (1980)  
 Kinetics of Oxygen and Carbon Monoxide Binding to the Hemoglobins of the Water Snakes Liophis miliaris and Helicops modestus.  
 Comp. Biochem. Physiol. 67B:555-559.
- FOCESI Jr., A.; OGO, S.H. & MATSUURA, M.S.A. (1987)  
 Dimer-Tetramer Hemoglobin Transition During Oxygen Transport in Liophis miliaris.  
 In: International Workshop on the Structure, Function and Evolution of Heme proteins 18-19. Coord. por M. Brunori e A. Focesi Jr.
- FOCESI Jr., A.; BONILLA, G.O.; NAGATOMO, C.L. & MATSUURA, M.S.A. (1992)  
 Dimer-Tetramer Transition in Hemoglobin from Liophis miliaris III. The Phenomenon in Snake Species of Different Evolutionary Levels.  
 Comp. Biochem. Physiol., in press.
- FRIEDMAN, J.M.; SCOTT, T.W.; FISANICK, G.J.; SIMON, S.R.; FINDSEN, E.W.; ONDRIAS, M.R. & MACDONALD, V.W. (1985)  
 Localized Control of Ligand Binding in Hemoglobin: Effect of Tertiary Structure on Picosecond Geminate Recombination.  
 Science 229:187-190.

- FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. & ORTH, C. (1984)**  
Solvent Regulation of Oxygen Affinity in Hemoglobin.  
Sensitivity of Bovine Hemoglobin to Chloride Ions.  
J. Biol. Chem. 259:10841-10844.
- FYHN, U.E.H. & SULLIVAN, B. (1975)**  
Elasmobranch Hemoglobins: Dimerization and Polymerization in Various Species.  
Comp. Biochem. Physiol. 50B:119-129.
- GAREY, J.R. & RIGGS, A.F. (1984)**  
Structure and Function of Hemoglobin from Urechis caupo.  
Arch. Biochem. Biophys. 228, 320-331.
- GILL, S.J. (1981)**  
Measurement of Oxygen Binding by means of a Thin Layer Optical Cell.  
Meth. Enz. 76:427-438.
- GOIN, C.J. & GOIN, O.B. (1971)**  
Introduction to Herpetology.  
Publ. por W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- GOLDENBERG, D.P. (1990)**  
Analysis of Protein Conformation by Electrophoresis.  
In: Protein Structure: A Practical Approach, 225-250.  
Ed. por T.E. Creighton, publ. por IRL Press, England.
- GREENWALD, O.E. (1971)**  
The effect of Temperature on the Oxygenation of Gopher Snake Blood.  
Comp. Biochem. Physiol. 40A:865-870.
- GRUCA, M. & GRIGG, G.C. (1980)**  
Methemoglobin Reduction in Crocodile Blood: Are High Levels of MethHb Typical of Healthy Reptiles?  
J. Exp. Zool. 213:305-308.
- GUEFFROY, D.E. (Editor) (1978)**  
A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems.  
Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, California.
- HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. (Editores) (1981)**  
Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach.  
IRL Press Ltd., Oxford & Washington D.C.
- HOAR, W.S. (1983)**  
General and Comparative Physiology.  
Publ. por Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

- HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. (1973)  
Strategies of Biochemical Adaptation.  
Publ. por W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- HOGGE, A.R. & ROMANO-HOGGE, S.A.R.W.L. (1978/79)  
Sinopse das Serpentes Peçonhentas do Brasil.  
Mem. Inst. Butantan 42/43:373-496.
- IMAI, K. (1973)  
Analyses of Oxygen Equilibria of Native and Chemically Modified Human Adult Hemoglobins on the Basis of Adair's Stepwise Oxygenation Theory and the Allosteric Model of Monod, Wyman, and Changeux.  
Biochem. 12:798-808.
- IMAI, K. (1981)  
Analysis of Ligand Binding Equilibria.  
Meth. Enz. 76:470-486.
- IMAI, K. (1983)  
The Monod-Wyman-Changeux Allosteric Model Describes Haemoglobin Oxygenation with only one Adjustable Parameter.  
J. Mol. Biol. 167:741-749.
- IIZUKA, T. & YONETANI, T. (1970)  
Spin Changes in Hemeproteins.  
Adv. Biophys. 1:157-182.
- ISLAM, A.; PERSSON, B.; ZAIDI, Z.H. & JÖRNVALL, H. (1990)  
Sea Snake (Microcephalophis gracilis) Hemoglobin: Primary Structure and Relationships to Other Forms.  
J. Prot. Chem. 9:533-541.
- JELKMANN, W. & BAUER, C. (1980)  
Oxygen Binding Properties of Caiman Blood in the Absence and Presence of Carbon Dioxide.  
Comp. Biochem. Physiol. 65A:331-336.
- JENSEN, F.B. & WEBER, R.E. (1987)  
Thermodynamic Analysis of Precisely Measured Oxygen Equilibria of Tench (Tinca tinca) Hemoglobin and their Dependence on ATP and Protons.  
J. Comp. Physiol. B 157:137-143.
- JOHNSON, M.L.; CORREIA, J.J.; YPHANTIS, D & HALVORSEN, H.R. (1981)  
Analysis of Data from the Analytical Ultracentrifuge by Nonlinear Least-squares Techniques.  
Biophys. J. 36:575-588.



- KILMARTIN, J.V. & ROSSI-BERNARDI, L. (1969)**  
 Inhibition of CO<sub>2</sub> Combination and Reduction of the Bohr Effect in Haemoglobin Chemically Modified at its  $\alpha$ -Amino Groups.  
 Nature 222:1243-1246.
- KILMARTIN, J.V.; IMAI, K.; JONES, R.T.; FARUQUI, A.R.; FOGG, J. & BALDWIN, J.M. (1978)**  
 Role of Bohr Salt Bridges in Cooperativity in Hemoglobin.  
 Biochim. Biophys. Acta 534:15-25.
- KOEHN, R.K.; ZERA, A.J. & HALL, J.G. (1983)**  
 Enzyme Polymorphism and Natural Selection.  
 In: Evolution of Genes and Proteins. Ed. por Nei, M. e Koehn, R.K. Publ. por Sinauer Associates Inc. Publ., Sunderland, Massachussetts.
- KOSHLAND Jr., D.E.; NEMETHY, G. & FILMER, D. (1966)**  
 Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Protein Containing Subunits.  
 Biochemistry 5, 365-385.
- LANDSMANN, J.; DENNIS, E.S.; HIGGINS, T.J.V.; APPLEBY, C.A.; KORITZ, A.A. & PEACOCK, W.J. (1986)**  
 Common Evolutionary Origin of Legume and Non-Legume Plant Haemoglobins.  
 Nature 324:166-168.
- LESK, A.M.; JANIN, J.; WODAK, S. & CLOTHIA, C. (1985)**  
 Haemoglobin: The Surface Buried Between the  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_1\beta_2$  Dimers in the Deoxy and Oxy Structures.  
 J. Mol. Biol. 183:267-270.
- LEVITZKI, A. (1978)**  
 Quantitative Aspects of Allosteric Mechanisms.  
 Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- LI, W.H. (1983)**  
 Evolution of Duplicated Genes and Pseudogenes.  
 In: Evolution of Genes and Proteins. Nei, M. & Koehn, R.K., editores. Publicado por Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachussetts.
- MacMAHON, J.A. & HAMER, A. (1975)**  
 Effects of Temperature and Photoperiod on Oxygenation and other Blood Parameters of the Sidewinder (Crotalus cerastes): Adaptive Significance.  
 Comp. Biochem. Physiol. 51A:59-69.

- McDONALD, M.J.; TURCI, S.M.; BLEICHMAN, M. & STINSON, R.A. (1985)  
Functional and Subunit Assembly Properties of Hemoglobin Alberta ( $\alpha_1\beta_2^{101}$  Glu→Gly).  
J. Mol. Biol. 183:105-112.
- MATSUURA, M.S.A.; OGO, S.H. & FOCESI Jr., A. (1983)  
Multiplicity and Immunological Characterization of the Haemoglobin Components from Liophis miliaris and Helicops modestus.  
Comp. Biochem. Physiol. 76B:915-919.
- MATSUURA, M.S.; OGO, S.H. & FOCESI Jr., A. (1987)  
Dimer-tetramer Transition in Hemoglobins from Liophis miliaris - I. Effect of Organic Polyphosphates.  
Comp. Biochem. Physiol. 86A:683-687.
- MATSUURA, M.S.; FUSHITANI, K. & RIGGS, A.F. (1989)  
The Amino Acid Sequences of the  $\alpha$  and  $\beta$  Chains of Hemoglobin from the Snake, Liophis miliaris.  
J. Biol. Chem. 264:5515-5521.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P. (1965)  
On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model.  
J. Molec. Biol. 12:88-118.
- NAQVI, S.; NADVI, I.N. & ZAIDI, Z.H. (1987)  
Partial Sequence of Hemoglobin from Cobra (Naja naja naja).  
Biosc. Reports 7:813-819.
- OGO, S.H.; ABE, A.S. & FOCESI Jr., A. (1979)  
Oxygen Dissociation Constant in Hemoglobin of Helicops modestus and Liophis miliaris, Two Water-Snakes with Different Morphological Adaptations to their Environment.  
Comp. Biochem. Physiol. 63A:285-289.
- PERRELLA, M.; COLOSIMO, A.; BENAZZI, L.; RIPAMONTI, M. & ROSSI-BERNARDI, L. (1990)  
What the Intermediate Compounds in Ligand Binding to Hemoglobin tell about the Mechanism of Cooperativity.  
Biophys. Chem. 37, 211-223.
- PERUTZ, M.F. (1970)  
Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin.  
Nature 228:726-734.
- PERUTZ, M.F. (1978)  
Hemoglobin Structure and Respiratory Transport.  
Sci. Amer. 239, 92-125.

- PERUTZ, M.F. (1979)  
Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence  
of Structure of the Globin on the Heme Iron.  
Ann. Rev. Biochem. 48, 327-386.
- PERUTZ, M.F.; KILMARTIN, J.V.; NIKISHURA, K.; FOGG, J.H. &  
BUTLER, P.J.G. (1980)  
Identification of Residues Contributing to the Bohr  
Effect of Human Hemoglobin.  
J. Mol. Biol. 138, 649-670.
- PERUTZ, M.F.; BAUER, C.; GROS, G.; LECLERQ, F.; VANDECAS-  
SERIE, C.; SCHNEK, A.G.; BRAUNITZER, G.; FRIDAY, A.E. &  
JOYSEY, K.A. (1981)  
Allosteric Regulation of Crocodilian Haemoglobin.  
Nature 291:682-684.
- PERUTZ, M.F. & BRUNORI, M. (1982)  
Stereochemistry of Cooperative Effects in Fish and  
Amphibian Hemoglobins.  
Nature 299:421-426.
- PERUTZ, M.F. (1984)  
Species Adaptation in a Protein Molecule.  
Adv. Prot. Chem. 36:213-244.
- PERUTZ, M.F. (1990)  
Mechanisms Regulating the Reactions of Human Hemoglobin  
with Oxygen and Carbon Monoxide.  
Ann. Rev. Physiol. 52:1-25.
- POUGH, F.H. (1976)  
The Effect of Temperature on Oxygen Capacity of Reptile  
Blood.  
Physiol. Zool. 49:141-151.
- POUGH, F.H. (1980)  
Blood Oxygen Transport and Delivery in Reptiles.  
Amer. Zool. 20:173-185.
- POWERS, D (1980)  
Molecular Ecology of Teleost Fish Hemoglobins: Strate-  
gies for Adapting to Changing Environments.  
Amer. Zool. 20:139-162.
- PYE, V. (1973)  
Acute Temperature Change and the Oxidation Rates of  
Ectotherm Mitochondria.  
In: Effects of Temperature on Ectothermic Organisms:  
Ecological Implications and Mechanisms of Compensation.  
83-95. Wieser, W. (Editor). Springer-Verlag.

- RIGHETTI, P.G. (1990)**  
Isoelectric Focusing of Proteins in Conventional and Immobilized pH Gradients.  
In: Protein Structure: A Practical Approach, 23-63..  
Ed. por T.E. Creighton, publ. por IRL Press, England.
- RIGGS, A.F. & WOLBACH, R (1956)**  
Sulphydryl Groups and the Structure of Hemoglobin.  
J. Gen. Physiol. 39:585-605.
- RIGGS, A.F. (1965)**  
Functional Properties of Hemoglobins.  
Physiol. Rev. 45:619
- RIGGS, A.F. (1972)**  
Molecular Control of Hemoglobin Function.  
Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukariotic Cells.  
Ed. Ernest Kun & Santiago Grisolia.  
Publ. por John Wiley & Sons, Inc.
- RIGGS, A.F. (1988)**  
The Bohr Effect.  
Ann. Rev. Physiol. 50:181-204.
- RIGGS, A.F. (1991a)**  
Aspects of the Origin and Evolution of Non-Vertebrate Hemoglobins.  
Amer. Zool. 31:535-545.
- RIGGS, A.F. (1991b)**  
Hemoglobins.  
Current Opinion in Structural Biology 1:915-921.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. (1958)**  
Studies on the Oxygen and Carbon-monoxide Equilibria of Human Myoglobin.  
Arch. Biochem. Biophys. 77:428-492.
- ROYER, W.E.; LOVE, W.E. & FENDERSON, F.F. (1985)**  
Cooperative Dimeric and Tetrameric Clam Hemoglobins are Novel Assemblages of Myoglobin Folds.  
Nature 316, 277-280.
- RUBEN, J. (1976)**  
Aerobic and Anaerobic Metabolism During Activity in Snakes.  
J. Comp. Physiol. 109:147-157.

- RUBEN, J. (1979)  
 Blood Physiology During Activity in the Snakes  
Masticophis flagellum (Colubridae) and Crotalus viridis  
 (Crotalidae).  
 Comp. Biochem. Physiol. 64A:577-588.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. (1958)  
 Studies on the Oxygen and Carbon-Monoxide Equilibria of  
 Human Myoglobin.  
 Arch. Biochem. Biophys. 77:428-492.
- SAWICKI, C.A. & MORRIS, R.J. (1981)  
 Flash Photolysis of Hemoglobin.  
 Meth. Enz. 76:667-681.
- SCHEJTER, A. & MARGOLIASH, E. (1985)  
 The Adair Hypothesis.  
 TIBS Dec.:490-492.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. (1975)  
 Animal Physiology: Adaptation and Environment,  
 Cambridge University Press.
- SCHWANTES, A.R. (1972)  
 Hemoglobinas e Haptoglobinas em Serpentes (Squamata,  
 Reptilia). Tese de Doutorado, Universidade Federal do  
 Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SEYMOUR, R.S. & WEBSTER, M.E.D. (1975)  
 Gas Transport and Blood Acid-Base Balance in Diving Sea  
 Snakes.  
 J. Exp. Zool. 191:169-182.
- SEYMOUR, R.S.; DOBSON, G.P. & BALDWIN, J. (1981)  
 Respiratory and Cardiovascular Physiology of the Aquatic  
 Snake, Acrochordus arafurae.  
 J. Comp. Physiol. 144:215-227.
- SHIH, D.T-B.; JONES, R.T.; IMAI, K. & TYUMA, I. (1985)  
 Involvement of Glu G3(101) $\beta$  in the Function of Hemo-  
 globin: Comparative O<sub>2</sub> Equilibrium Studies of Human  
 Mutant Hemoglobins.  
 J. Biol. Chem. 260:5919-5924.
- SNYDER, G.K. (1977)  
 Blood Corpuscles and Blood Hemoglobins: A Possible  
 Example of Coevolution.  
 Science 195:412-413.

- SODE, F. (1991)**  
 Oxygen Binding Characteristics of Whole-Blood and Hemoglobin From the Snake Thamnophis sirtalis.  
 Comp. Biochem. Physiol. 100 B, 697-703.
- SULLIVAN, B. (1967)**  
 Oxygenation Properties of Snake Hemoglobins.  
 Science 157:1308-1310.
- SULLIVAN, B. (1974)**  
 Reptilian Hemoglobins.  
 Chemical Zoology IX (Amphibia and Reptilia).  
 Ed.: M. Florkin e B.T. Scheer.  
 Publ. por Academic Press.
- TAM, L.T. & RIGGS, A.F. (1984)**  
 Oxygen Binding and Aggregation of Bullfrog Hemoglobin.  
 J. Biol. Chem. 259, 2610-2616.
- THOMPSON, E.O.P. (1980)**  
 Amino Acid Sequences of Globin Chains and Their Use in Phylogenetic Divergence Point Estimations.  
 In: The Evolution of Protein Structure and Function: A Symposium in Honor of Professor Emil L. Smith. Ed. por D.S. Sigman e M.A.B. Brazier. Publ. por Academic Press.
- TYREE, B. & WEBSTER, D.A. (1978)**  
 The Binding of Cyanide and Carbon Monoxide to Cytochrome o Purified from Vitreoscilla. Evidence for Subunit-interaction in the Reduced Protein.  
 J. Biol. Chem. 253, 6988-6991.
- VINOGRADOV, S.N. (1985)**  
 The Structure of Invertebrate Extracellular Hemoglobins (Erythrocrucorins and Chlorocrucorins).  
 Comp. Biochem. Physiol. 82 B, 1-15.
- WEBER, R.E.; JENSEN, F.B. & COX, R.P. (1987)**  
 Analysis of Teleost Hemoglobin by Adair and Monod-Wyman-Changeux Models.  
 J. Comp. Physiol. 157:145-152.
- WEBER, R.E. & JENSEN, F.B. (1988)**  
 Functional Adaptations in Hemoglobins from Ectothermic Vertebrates.  
 Ann. Rev. Physiol. 50:161-179.
- WOOD, S (1980)**  
 Adaptation of Red Blood Cell Function to Hypoxia and Temperature in Ectothermic Vertebrates.  
 Amer. Zool. 20:163-172.

WYMAN, J. (1964)

Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin. A  
Second Look.

Adv. Prot. Chem. 19:223-283.

ZUCKERKANDL, E. (1965)

The Evolution of Hemoglobin.

Sci. Amer. 212:110-118.