

ALDO FOCESI JÚNIOR

AÇÃO DE EFETORES ALOSTÉRICOS SÔBRE HEMOGLOBINAS  
DE ANIMAIS DE DIFERENTES ESPÉCIES

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Livre-docente em Bioquímica.

CAMPINAS S.P.

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À Maria Elisa,

Mônica, Humberto e Sylvia

Homenagem póstuma aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Walter August Hadler, diretor do Instituto de Biologia pelo apoio incondicional desde nossa chegada ao Departamento de Bioquímica.

Ao Professor Dr. Zeferino Vaz pela confiança que em nos depositou, convidando-nos para chefiar o Departamento de Bioquímica.

Aos colegas do Departamento, sem os quais a tese não poderia ser realizada, em especial aos doutores: Nilce C. Meirelles, Lucia P.S. Airoidi, Anibal E. Vercesi, Satie H. Ogo, Maria S.A. Matsuura e aos meus orientados, doutores: Maria Laise C. Vieira e Hélio F. Vieira.

As Srtas. Maria Luiza de Souza e Mirian Elizandi da Silva pelo esmero no serviço de datilografia.

Aos órgãos que financiaram a maior parte destas pesquisas: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e National Science Foundation.

## ÍNDICE

	PAGINA
INTRODUÇÃO	01
Equilíbrio da hemoglobina com oxigênio.	02
Determinação de interações heterotrópicas (Efeito Bohr).	04
Estudo cinético das reações de hemoglobina com ligantes.	05
Mudanças estruturais que ocorrem na reação de hemoglobi <u>n</u> a com ligantes.	11
Efeito do polifosfato orgânico sobre a afinidade da he <u>m</u> oglobina por ligante.	18
MATERIAL E MÉTODOS	24
Animais utilizados.	24
Preparação do hemolisado.	24
Preparação de hemoglobina isenta de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular.	25
Análise e purificação dos componentes das hemoglobinas.	25
Separação dos componentes da hemoglobina por cromatogra <u>f</u> ia de troca iônica.	27
Método espectrofotométrico de determinação da curva de dissociação do oxigênio.	27
Determinação do efeito Bohr.	29
Estudos cinéticos da reação de hemoglobinas com oxigênio.	30
Determinações fluorimétricas.	31
Aparelhos e reagentes utilizados.	31
RESULTADOS	32
Efeito de adenosina trifosfato sobre hemoglobina de <i>Bufo paracnemis</i> e <i>Pipa carvalhoi</i> .	32
Efeito de adenosina trifosfato sobre hemoglobinas de <i>Helicops modestus</i> e <i>Liophis miliaris</i> .	32
Estudos de equilíbrio das hemoglobinas com oxigênio.	34
Estudos cinéticos.	34

Caracterização dos componentes de hemoglobinas de <i>Pterygoplichtys pardalis</i> (acari-bodo).	38
Estudos de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio.	40
Estudos cinéticos.	40
Efeito de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido) sobre hemoglobina humana.	46
DISCUSSÃO	51
RESUMO	62
SUMMARY	64
BIBLIOGRAFIA	66

## INTRODUÇÃO

O transporte de oxigênio dos pulmões até os tecidos nos animais superiores não pode ser explicado por um processo de simples difusão. A hemoglobina é responsável por 99% deste transporte. A saturação da hemoglobina pelo oxigênio nos pulmões é total nas condições normais, uma vez que a pressão de oxigênio alveolar é mais que suficiente para saturá-la. A liberação tecidual do oxigênio, por outro lado depende fundamentalmente da forma da curva de ligação oxigênio-hemoglobina e da afinidade da hemoglobina pelo gás. A curva de oxigenação é sigmoide e a porção média desta curva é pois muito sensível às variações das pressões de oxigênio em níveis fisiológicos. Desta forma a oxihemoglobina responde facilmente às mudanças na pressão de oxigênio.

A hemoglobina é uma proteína bastante complexa para responder às várias condições de oxigenação a que o animal é submetido. É uma molécula tetramérica constituída de duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$ . Cada subunidade contém um grupo heme cujo centro possui um átomo de ferro que liga oxigênio ou outro ligante, reversivelmente. O grupo heme, por sua vez está unido à proteína de cada subunidade por ligação covalente entre o átomo de ferro e um resíduo de histidina conhecida como histidina proximal. A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta quando a saturação por este ligante aumenta, e a busca de uma explicação estrutural para esta cooperatividade ou interação heme-heme, a fazem um modelo de proteína dos mais interessantes e "per se" poderia justificar a intensidade com que os pesquisadores estudam hemoglobina.

Na presente introdução procuraremos discutir dois aspectos do estudo da ligação Hemoglobina-Ligante. O primeiro, do ponto de vista experimental, envolvendo equilíbrio e cinética das reações e o segundo do ponto de vista estrutural.

Equilíbrio da hemoglobina com oxigênio (Antonini & Brunori, 1971)

A reação do ferro hemínico da hemoglobina com ligantes é como vimos reversível e pode pois ser tratada como um equilíbrio dinâmico. Um mesmo estado final é alcançado quando o ligante é adicionado à proteína não ligada ou é retirado da proteína totalmente ligada, e uma vez atingido o estado final a composição do sistema permanece constante. Evidentemente está se assumindo que ambos, hemoglobina e ligante, são estáveis, o que não ocorre rigorosamente. A lei da ação das massas descreve a ligação reversível entre o ligante e a hemoglobina. Contudo a proteína pode ter mais de um sítio para o ligante e a teoria de equilíbrios múltiplos poderia ser aplicada.

Tomemos o caso de uma macromolécula com um sítio de ligação. A situação mais simples é representada por um sistema quimicamente homogêneo na qual cada molécula de proteína contém um único sítio de ligação. No caso, o equilíbrio pode ser representado:



Sendo K a constante de equilíbrio de dissociação, pela lei da ação das massas temos:

$$K = \frac{(PX)}{(P)(X)} \quad (1)$$

Para ligantes gasosos, a atividade na fase líquida ( caso do oxigênio com hemoglobina) é dada pela pressão parcial da fase gasosa ou melhor  $(X) = K' pX$  e a equação fica:

$$K'' = \frac{(PX)}{(P)pX} \quad (2)$$

onde  $K'' = KK'$

Experimentalmente se usa a quantidade  $\bar{Y}$ , que representa a fração de proteína saturada com um ligante definido, como:

$$\bar{Y} = \frac{(PX)}{(P) + (PX)} \quad (3)$$

Pela equação (1) temos:

$$(PX) = K(P)(X)$$

substituindo na equação (3) temos:

$$\bar{Y} = \frac{K(X)}{1 + K(X)} \quad (4)$$

substituindo (X) por pX temos:

$$\bar{Y} = \frac{K'' pX}{1 + K'' pX} \quad (5)$$

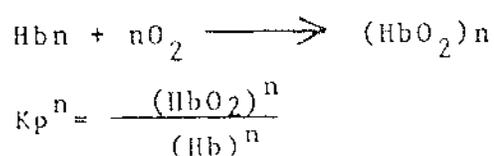
As duas últimas equações da lei da ação das massas (4) e (5) expressam  $\bar{Y}$  como função da (X) ou pX respectivamente. Ainda pela equação (4) e (5) podemos escrever:

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K(X) = K'' pX$$

Os dados experimentais podem ser aplicados mais facilmente na forma logarítmica porque a equação promove um gráfico linear,

$$\log \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \log K + \log(X)$$

Se o sistema é considerado homogêneo, isto é se todos os sítios são equivalentes e independentes para o ligante, esta equação se aplica perfeitamente. Hill (1910) sem conhecer o peso molecular da hemoglobina representou a reação da hemoglobina com o oxigênio:



ou

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K(X)^n$$

Colocando-se num gráfico ("Hill plot")  $\log(\bar{Y}/1-\bar{Y})$  versus  $\log p$  ou  $\log X$ , obtêm-se uma linha reta onde  $n$  é a ordem aparente da reação que apesar de não ser verdadeira é utilizada hoje com muitas vantagens para a representação dos dados de ligação da hemoglobina com ligantes. Assim somente dois parâmetros,  $\log P_{50}$  que indica a afinidade pelo ligante e  $n$  que está relacionado com a curva de dissociação, dão imediata descrição do caráter do processo da ligação. Quando  $n$  é igual a 1 a curva é hiperbólica, se  $n$  é maior que 1 ela é sigmoide e acusa a presença de interações heme-heme "positivas". Para valores de  $n$  menores que 1 pode-se esperar ou interação "negativa" heme-heme ou sítios independentes com afinidades diferentes pelo ligante.

#### Determinação de interações heterotrópicas (Efeito Bohr)

A ligação de hemoglobina com outros ligantes, além do oxigênio p.ex., caso de íons hidrogênio (interação heterotrópica) envolve dois aspectos tanto de reciprocidade como termodinâmico isto é : i) efeito de um terceiro componente sobre o equilíbrio da hemoglobina com o ligante oxigênio e ii) diferenças na interação com o terceiro componente ( $H^+$ ) tais como aquelas entre o ligante unido e a hemoglobina deoxigenada.

O efeito Bohr foi inicialmente descrito por Bohr, Krogh e Hasselbach (1904) como o efeito do  $CO_2$  sobre a curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio. Contudo o efeito foi "corrigido" para ácido carbônico como um doador de próton (Cristiansen et al, 1914). Hoje se assume como sendo o efeito do pH do meio sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e seu significado é aquele de um fenômeno da ligação entre sítios para  $O_2$  (hemes) e sítios para prótons (cadeia laterais dos aminoácidos da hemoglobina). O  $CO_2$  tem um efeito específico sobre o grupo amino terminal. Wyman (1948) desenvolveu

a equação para este efeito:

$$\left(\frac{\partial \log P}{\partial \text{pH}}\right)_{\bar{Y}} = \left(-\frac{\partial H^+}{\partial \bar{Y}}\right)_{\text{pH}}$$

Por esta equação pode-se conhecer as transições de pressão parcial (p) do ligante com o pH (a uma certa saturação  $\bar{Y}$ ) bem como as trocas do número de prótons ligados pela proteína com a saturação fracional (a pH constante).

Pela introdução do conceito de atividade média do ligante pode-se observar:

$$\left(\frac{\partial \log P_m}{\partial \text{pH}}\right) = (H^+_{\text{HbO}_2} - H^+_{\text{Hb}}) = \Delta H^+$$

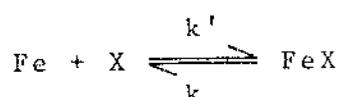
onde  $\Delta H^+$  é a diferença de número de prótons ligados entre as formas oxi e deoxihemoglobina expresso em equivalentes por sítio de  $O_2$ .

Experimentalmente pode-se medir o efeito Bohr, espectrofotometricamente, examinando-se as curvas de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio em presença de tampões de diferentes pH entre 5 e 9.

Estudo cinético das reações de hemoglobina com ligantes (Antonini & Brunori, 1971).

A cinética das reações de hemoglobina com ligantes tem sido investigada por cerca de 70 anos e tem proporcionado informações tão ou mais importantes que os estudos de equilíbrio, tando do ponto de vista da relação estrutura-função como sobre mecanismo da reação. Infelizmente a cinética de tais reações é tão complexa que é impossível acomodar os dados dentro de um sistema de equações simples. De modo esquemático procuraremos discutí-la:

Vamos supor inicialmente o caso da reação de mioglobina com um ligante:



onde Fe representa a proteína-heme, X o ligante específico para ferro,  $k'$  a constante de velocidade de combinação ( $k_{on}$ ) e  $k$  a constante de velocidade de dissociação ( $k_{off}$ ). A constante de equilíbrio da reação é dada por  $K = k'/k$  e a velocidade do processo pode ser indicado por:

$$\frac{d(Fe)}{dt} = \frac{d(FeX)}{dt} = k'(Fe)(X) - k(FeX)$$

Se a reação é permitida com grande excesso de (X) em comparação a (Fe), o produto  $k'(X) = k''$  é constante, e a equação fica:

$$= k''(Fe) - k(FeX)$$

e sua forma integrada,

$$\ln \frac{(Fe)_0 - (Fe)_{eq}}{(Fe) - (Fe)_{eq}} = (k'' + k)t$$

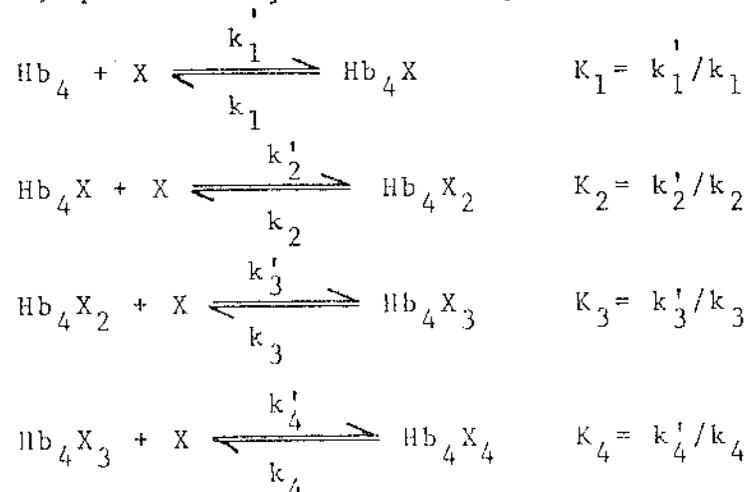
$(Fe)_0$ ,  $(Fe)_{eq}$  e  $(Fe)$  são respectivamente as concentrações dos sítios livres no tempo zero, no equilíbrio e no tempo  $t$ . O gráfico  $(k'' + k)$  versus  $(X)$  resulta em uma linha reta cuja intersecção no eixo das ordenadas é  $k$  e cuja inclinação é  $k'$ . Quando a velocidade de dissociação é muito pequena em relação à de combinação (como mioglobina + CO, p.ex) podemos eliminar o termo  $k(FeX)$  e a forma integrada da equação fica, se considerarmos as concentrações iniciais de Fe e X iguais:

$$\frac{1}{(Fe)} - \frac{1}{(Fe)_0} = k't$$

Para fins práticos a comparação das constantes de equilíbrio e cinéticas para reações de mioglobina com diferentes ligantes, torna nítido que as mudanças de afinidade de um ligante para outro são determinadas pelas medidas nas constantes "on" e "off". Contudo nos casos mais comuns quando o ligante muda de  $O_2$  para NO, por exemplo, há diminuição da velocidade de dissociação, que varia de até um milhão de vezes entre os dois gases.

No caso de proteínas simples como mioglobina os dados cinéticos podem ser razoavelmente descritos por equações simples, contudo para reações como as de hemoglobina (ferrosa) com ligantes são

muito mais complexos e grandes dificuldades de interpretação são oferecidas. A maioria dos estudos cinéticos de hemoglobinas tem sido interpretada de acordo com o modelo de Adair (1925) com quatro passos de equilíbrio, quatro reações "on" e quatro "off".



Hoje pode-se, em condições especiais, individualizar cada uma destas constantes.

Abordaremos agora somente dois tipos de reações, por finalidades práticas:

1) Reações de Combinação da Hemoglobina com Ligantes.

A cinética da reação de diferentes ligantes com desoxihemoglobina é quantitativamente diferente, isto é, os ligantes reagem a velocidades diferentes. Contudo ela sempre mostra a mesma característica fundamental: Quando a velocidade da reação "on" predomina sobre "off", o que se passa na presença de grande excesso de ligante, podem ser feitas as seguintes generalizações: i) a velocidade de combinação é proporcional à primeira potência da concentração do ligante. Esta foi a primeira prova direta do modelo físico da equação de Hill que predizia que a velocidade era proporcional a potência  $n$  (Roughton, 1935), ii) a forma da curva de progresso não corresponde a de uma reação de segunda ordem, e os valores da constante apresentam aumento em função do tempo de reação. Este fenômeno constitui evidência clara da interação heme-heme e reflete o fato de uma ou mais constantes de velocidade de reação em cadeia aumentar como resultado da ligação inicial do ligante. A velocidade inicial extrapo

lada pode ser usada para calcular a primeira constante de Adair. Algumas vezes como no caso do ligante CO, a constante aparente de segunda ordem diminui à medida que a reação se processa, indicando heterogeneidade intramolecular ou interação negativa entre os sítios de ligação, iii) a forma da curva de progresso da reação de combinação (quando k pode ser desprezado) parece permanecer a mesma com o aumento da concentração do ligante ( $10^3 \text{sec}^{-1}$ ), iv) a velocidade de combinação é pouco afetada pelo pH, e o efeito Bohr no equilíbrio reflete principalmente mudanças na velocidade de dissociação.

## 2) Reação de Dissociação Hemoglobina-Ligante.

A velocidade da reação  $\text{HbX} \rightarrow \text{Hb} + \text{X}$  (deoxigenação da  $\text{HbO}_2$  na presença de ditionito p.ex.) é um processo de primeira ordem (Gibson 1959). Contudo foi observado que a constante de velocidade pode aumentar em função do tempo de reação. Não há nenhuma evidência que a dissociação da primeira molécula do ligante a partir de hemoglobina saturada é seguida de dissociação mais rápida das outras moléculas (Antonini & Brunori 1970).

Para estudo da velocidade de combinação e de dissociação de hemoglobinas com ligantes, especificamente oxigênio e monóxido de carbono, abordaremos alguns métodos empregados e que foram utilizados na presente tese:

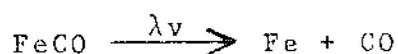
### a) Determinação de cinética rápida da reação de dissociação de oxihemoglobina ("stopped flow")

A reação de dissociação da oxihemoglobina é muito rápida e métodos especiais precisam ser aplicados para acompanhar sua velocidade, assim utilizam-se em tais determinações métodos de mistura rápida. Duas soluções contendo: a primeira oxihemoglobina e a outra de ditionito de sódio são utilizadas. Os dois reagentes são forçados, a alta velocidade, a penetrar numa câmara de mistura. Após, as soluções são deslocadas para um tubo de observação localizado mais

próximo possível do ponto de mistura. O fluxo é subitamente interrompido por mecanismo apropriado e as mudanças que ocorrem na porção de fluido presente no tubo de observação são acompanhadas por um sistema rápido de detecção (usualmente em osciloscópio de memória).

b) Determinação de cinética rápida de combinação do deoxihemoglobina com monóxido de carbono ("flash photolysis")

Todos os derivados ligados de hemoglobina ferrosa são fotodissociáveis embora o rendimento quântico varie grandemente de um ligante para outro. Esta assertiva é a base do uso de métodos fotolíticos para estudo das reações de hemoglobina com ligantes (Gibson, 1956): Quando soluções de hemoglobina ligada são expostas a pulso luminoso intenso através de um "flash" eletrônico ocorre a dissociação do ligante:



No fim da exposição a luz, o sistema retorna ao equilíbrio (escuro) e portanto a reação:



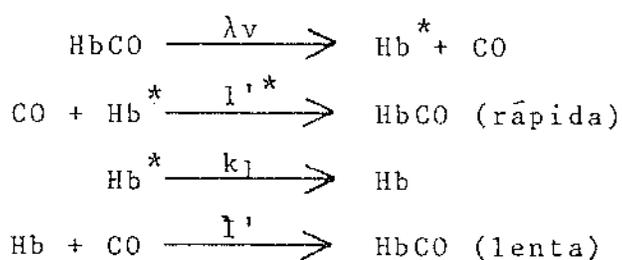
pode ser registrada por sistema apropriado. Para o caso do CO mesmo lâmpadas de uso fotográficas podem ser usadas. O tempo morto dos aparelhos depende das características do pulso de luz e é geralmente de alguns microsegundos até milissegundos.

De especial interesse é o comportamento cinético da carboxihemoglobina submetida a ação da luz, onde dois casos podem ser considerados:

1) Alta concentração de hemoglobina ( $>10^{-4}$  M heme). Quando a HbCO é fotodissociada por flash rápido, a reação de recombinação se mostra com uma fase rápida inicial correspondendo a velocidade muito maior que aquela obtida nos experimentos de fluxo interrompido e a parte remanescente (fase lenta) é semelhante àquela obtida por aqueles métodos. Em concentrações altas de HbCO este fenômeno é evidente a 0°C

e pH 9. Nestas condições a fase rápida torna-se mais rápida ainda com a concentração de CO e depende também do "flash" sendo mais evidente em flash de curta duração.

A interpretação destes fatos (Gibson, 1959) é de que a forma de "reação instantânea" da hemoglobina,  $Hb^*$  é o fotoproduto inicial, quando HbCO sofre fotólise. Esta forma recombina com o ligante com velocidade pelo menos 20 vezes superior a aquela da Hb normal, tem vida curta e as seguintes reações são postuladas:



O valor de  $l'^*$  é  $2 \times 10^6 M^{-1} \text{seg}^{-1}$  (pH 9,0 e  $1^\circ C$ ) e a constante cinética da reação global de Hb humana "normal" com CO é  $l' = 4 \times 10^4 M^{-1} \text{seg}^{-1}$ .

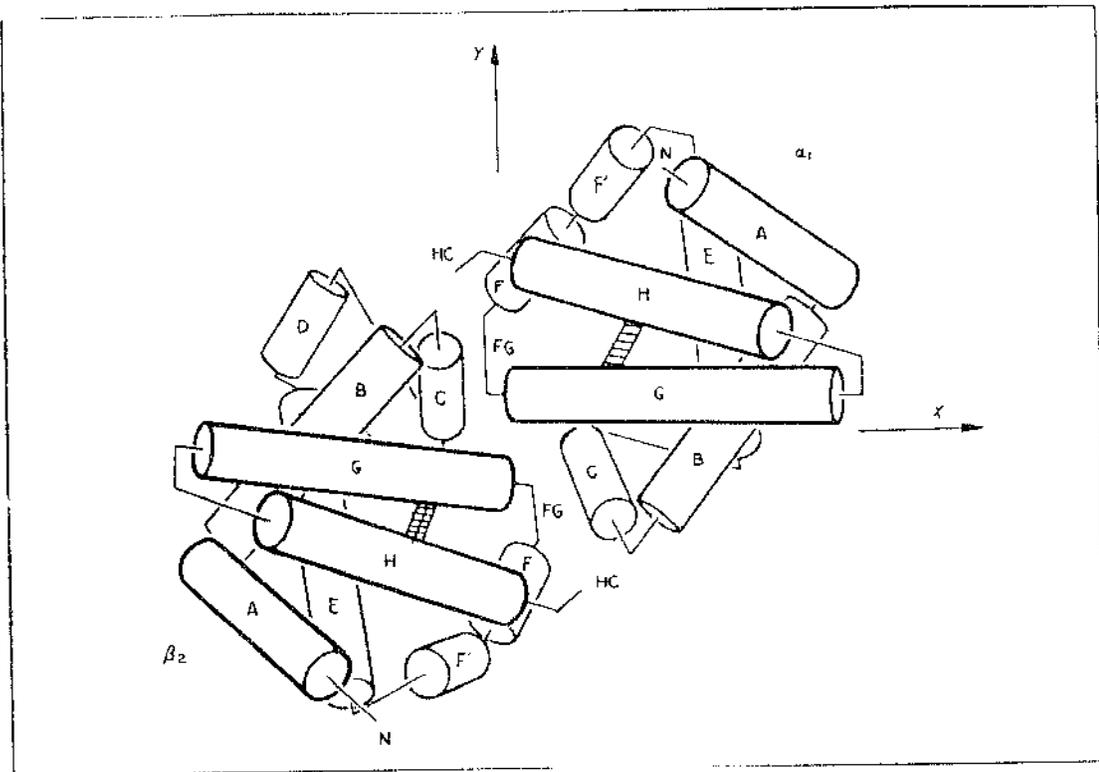
2) Baixas concentrações de hemoglobina ( $< 10^{-5} M$  heme). As formas que "reagem instantaneamente" da hemoglobina quando sua concentração é alta, torna-se evidente a pH 9, como vimos. Já em pH 7 elas podem ser desprezíveis e só aparece se a solução for diluída, neste caso mesmo em pH 7 tais formas aumentam de proporção. De acordo com Gibson e Antonini (1967) a pH 7 em soluções diluídas, o material que "reage instantaneamente" não depende da concentração de CO mostrando que ele não se transforma em material de "reage lentamente" em tempos curtos. A diferença do comportamento da reação com CO a pH 7 para soluções diluídas encontradas entre os experimentos realizados por fotólise ou técnicas de mistura rápida, sugere que as propriedades cinéticas de deoxihemoglobina variam dependendo do tempo de formação do derivado ligado. Assim pode-se prever que o material que "reage instantaneamente" aparecerá mesmo em experimentos de mistura rápida se as condições experimentais são tais que a deoxihemoglobi-

na reage com CO logo após sua formação p.ex., a partir de oxihemoglobina. O experimento a seguir elucidada esta assertiva: quando oxihemoglobina é misturada com ditionito, de modo que o oxigênio é liberado com um tempo médio de 10-30 mseg. e logo após a deoxihemoglobina formada é misturada com CO, a reação torna-se bifásica, revelando componentes rápido e lento na mesma proporção qua aparece em experimentos de fotólise. Quando diversamente a deoxihemoglobina "envelhece" por um ou mais minutos, o material se converte completamente na forma de "reage lentamente". O experimento descrito indica que o processo lento está associado com mudanças que ocorrem na reatividade após a remoção do ligante em solução diluída. Inversamente mudanças lentas também ocorrem após a formação de hemoglobina saturada a partir da deoxihemoglobina diluída. Experimentos combinados de fluxo interrompido e fotólise na qual HbCO é sujeita ao "flash" em tempos diferentes após sua formação a partir de deoxihemoglobina diluída demonstram aquela assertiva. Assim pouco ou nenhum componente que "reage instantaneamente" está presente inicialmente pela fotodissociação, mas sua quantidade aumenta dentro de alguns segundos. Estes fatos são interpretados por mudanças nas propriedades do sistema com o tempo, que refletem os processos de dissociação que ocorrem em soluções diluídas de hemoglobina saturada mas não na deoxihemoglobina.

#### Mudanças estruturais que ocorrem na reação de hemoglobina com ligantes.

Os estudos de equilíbrio e cinética das reações da hemoglobina com ligantes possibilitaram junto com estudos estruturais, a interpretação detalhada do fenômeno de ligação, bem como das mudanças estruturais que ocorrem quando a deoxihemoglobina passa a oxihemoglobina. Assim é bem conhecido o fato das estruturas tridimensio-

nais tanto da hemoglobina deoxigenada como daquela ligada a um ligante, por estudos de cristalografia de Raio X realizados por Perutz e seus associados (Fermi, 1975; Heidner et al, 1976; Ladner et al, 1977). As duas formas são semelhantes consistindo de sete regiões helicoidais (indicadas por letras do alfabeto) nas sub-unidades  $\alpha$  e oito na  $\beta$ , com regiões não helicoidais entre as hêlices, além daquelas regiões dos grupos amino e carboxila terminais (Figura 1).



*Figura 1: Diagrama esquemático do dímero  $\alpha_1\beta_2$ . As hêlices estão representadas por cilindros designados de A a H, os hemes estão representados por bastões achureados. A interface entre  $\alpha_1\beta_2$  é formada pela região não-helicoidal FG e a hêlice C. No caso de deoxihemoglobina os resíduos carboxila terminal HC também participam da interface. O eixo Z omitido está situado perpendicularmente ao plano do papel (Baldwin & Chothia, 1979).*

*completo*

A estrutura quaternária da hemoglobina, entretanto difere quando ela está deoxigenada ou não, e foi mostrado que a cooperatividade está associada a estas estruturas, e às mudanças na mesma que ocorrem durante a ligação (Baldwin, 1975). A natureza das mudanças entre as duas formas é complexa e de acordo com Perutz (1970, 1972, 1976) inclui: i) Os átomos de ferro, cuja posição relativa aos planos dos radicais heme se encontram alterados de acordo com as estruturas oxigênio ou deoxihemoglobina. ii) Os resíduos carboxila terminais das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  que formam pontes salinas entre si na forma deoxigenada e não na forma ligada. iii) A forma oxigenada sofre hidratação estérica pela qual Val Ell se liga na sub-unidade  $\beta$ .

Os mecanismos propostos podem ser arranjados num "esquema" que se encaixa no modelo alostérico de 2-estados de cooperatividade, proposto por Monod, Wyman, Changeux (1965) (MWC) pelo qual pontes adicionais que estabilizam as formas de baixa afinidade (chamada forma T) são identificadas como pontes salinas. Perutz sugeriu que o equilíbrio entre as duas estruturas quaternárias é estabelecido pela distância entre os átomos de ferro e a histidina proximal. Esta distância diminui quando a forma deoxigenada da hemoglobina passa a ser oxigenada, e esta diminuição parece ser sequencial, à medida que cada sub-unidade vai sendo ligada ao oxigênio. Os movimentos do átomo de ferro para fora e para dentro do plano do heme parece dar início às mudanças na estrutura terciária que causam movimentos mais amplos nos resíduos carboxila-terminais e ainda rompimento das pontes salinas inter sub-unidades. A forma de baixa afinidade pelo oxigênio (T) parece ser originada por utilização da energia de rompimento de tais pontes salinas. Este fato parece não estar confirmado, mas Perutz (1972) também sugere que a afinidade reduzida do estado de baixa afinidade é devido a "tensão" imposta ao heme pela estrutura quaternária na forma deoxi, tal tensão se opõe a transição

*completo*

*completo*

*Passa muito tempo*

entre os estados de alto spin do átomo de ferro na ausência do ligante e o estado de baixo spin quando o oxigênio está ligado. A base estrutural desta tensão não pode ainda ser explicada.

Embora os estudos da estrutura na hemoglobina sejam complexos e fascinantes, o possível significado biológico que possa ter a modulação da proteína pela afinidade intrínseca do ligante dos grupos heme e da transmissão dos efeitos de uma sub-unidade para ambas sub-unidades talvez mereçam certa ênfase nesta introdução. Cálculos quantitativos da energia associada às transições das várias estruturas que poderiam ocorrer no grupo heme pela ligação com o ligante, foram descritos recentemente (Baldwin & Chothia, 1979). Os autores indicam que a geometria mais favorável para o complexo heme-ligante é influenciado por dois fatores: um devido ao tamanho do átomo de ferro e outro devido ao ligante axial ao qual o ferro se liga. Para um complexo ferroso de cinco ligações de coordenação de alto spin como a deoxihemoglobina, os dois fatores se combinam para dar uma posição preferencial ao átomo de ferro fora do plano dos nitrogênios porfirínicos do heme. A repulsão estérica entre tais nitrogênios e o ligante axial, o N(ε) da histidina proximal na deoxihemoglobina também favorecem a posição descrita. De acordo com tais estimativas se o átomo de ferro for impedido de sair do plano do heme, a maior parte da energia (~3kcal) proveria da repulsão estérica entre N(ε) da histidina e os nitrogênios pirrólicos. Seus cálculos indicam ainda que o heme é suficientemente flexível para acomodar o grande átomo de ferro com somente gastos mínimos de energia (<0,5kcal) Para a 6a. coordenação do complexo de baixo spin como a carbomonóxide hemoglobina, os dois fatores se combinam para dar uma posição preferencial, ou internamente, ou muito próximo do plano dos N-porfirínicos. A repulsão estérica entre estes nitrogênios e os dois ligantes axiais impedem que um dos dois ligantes se aproxime muito do plano

dos hemes. O plano dos nitrogênios em relação aos átomos de ferro, minimiza a repulsão estérica total. Na hemoglobina a estrutura da proteína é que restringe os movimentos dos átomos de ferro, se ele não pode se mover a uma posição ótima, esta restrição se reflete em uma afinidade reduzida para o ligante. A afinidade do grupo heme pelo ligante depende pois da liberdade que o átomo de ferro tem para se mover entre posições mais favoráveis quando o ligante se liga ou desliga.

A afinidade da hemoglobina para o 1º ligante é menor que para o quarto ligante por um fator que varia de 150 a 300. A afinidade das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas e da mioglobina é um pouco menor que aquela da hemoglobina para o seu quarto ligante. A baixa afinidade do 1º ligante pela hemoglobina parece ser causada por repulsão estérica originada da posição da hélice F da sub-unidade  $\beta$  em relação aos hemes na estrutura terciária-quaternária da deoxihemoglobina, de tal forma que o átomo de ferro ligado à histidina F8 não pode se mover no plano do heme sem repulsão estérica e assim a compactação não pode ser relaxada. Por outro lado, a alta afinidade da hemoglobina pelo seu quarto ligante é devido a posição da hélice F na estrutura terciária-quaternária disposta de tal forma que o átomo de ferro pode estar próximo do plano do heme sem induzir qualquer tipo de tensão. Em resumo, estas conformações (a estrutura quaternária deoxi com a hélice F em sua posição característica) estão associadas com baixa afinidade, enquanto que a estrutura quaternária ligada, devido a forma da hélice F, está associada a alta afinidade. A cooperatividade, isto é, o aumento da afinidade pelo ligante proporcional ao número de ligantes unidos a hemoglobina pode ser alcançada pela molécula mudando sua estrutura quaternária.

Hoje a tendência é de todos os experimentos com hemoglobina serem interpretados em termos do modelo de 2-estados. A teoria

original de MWC da interação alostérica foi apresentada como um modelo com certo número de parâmetros na realidade menor que os observados, isto é, quatro constantes da ligação da curva de equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio. Sabe-se ainda que o elemento essencial da descrição dos 2-estados é o fato de haver duas estruturas quaternárias em equilíbrio com diferentes propriedades de ligação para o ligante e para protômeros ou inibidores. Se a mudança das afinidades devido às trocas estruturais que ocorrem sem alteração na estrutura quaternária é pequena, comparada àquela produzida por tais alterações de estrutura, muitas previsões do modelo simples ainda se aplicam.

Ainda de acordo com Baldwin & Chothia, 1979 para o mecanismo dos 2-estados ser operante, a forma T (baixa afinidade) da proteína precisa ser mais estável que a R (alta afinidade) quando as sub-unidades estão livres. Uma vez que a afinidade do estado R da hemoglobina é muito semelhante à afinidade do dímero  $\alpha_1\beta_1$  fica evidente que a energia livre de dissociação de  $R_0$  é muito semelhante àquela da estrutura  $R_4$ . E a energia livre de mudança entre a estrutura  $T_0$  e  $R_0$ ,  $RT \log L$ , (onde  $L = (T_0)/(R_0)$ ) é igual à diferença entre as trocas de  $\Delta G$  associadas com a dissociação de  $T_0$  ao dímero e  $R_0$  ao dímero. Assim a estabilidade de  $T_0$  (deoxihemoglobina) em relação a  $R_4$  (totalmente ligada) pode ser explicada pelas constantes de dissociação destas estruturas. A baixa afinidade do estado T depende da facilidade com que a sub-unidade pode relaxar e da compactação induzida pela união do ligante e quanto mais facilmente a estrutura rígida pode relaxar maior aumento se espera na afinidade.

Neste ponto de nossa revisão trataremos de um efeito já descrito, conhecido como Efeito Bohr, pelo qual a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a cooperatividade da mesma depende do pH. Como resultado da afinidade recíproca da hemoglobina pelo oxigênio e íons hidrogênio, a liberação tecidual do oxigênio, é facilitada pelo

acúmulo de ácido carbônico nas células sanguíneas. A base molecular do efeito Bohr já foi estabelecida:

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a cooperatividade da mesma dependem pois do pH. Em regiões de pH alcalino, prótons se ligam mais fortemente à deoxihemoglobina que à hemoglobina saturada, resultando num aumento da afinidade pelo oxigênio quando o pH aumenta. A maioria dos sítios para prótons foram identificados (Kilmartin, 1977; Nishibura, 1978) e há razão estrutural pela qual dois destes sítios ligam próton no estado T e não no estado R, e este é o motivo do pH afetar o valor de L. Curvas cuidadosas de equilíbrio de oxigênio mostram que, para hemoglobina normal, a afinidade do estado T também aumenta com o pH, isto significa que algumas ou todas as interações que contribuem para o efeito Bohr precisam também contribuir para compactação deste estado. Uma das interações que contribue efetivamente para o efeito Bohr é a ponte de hidrogênio entre His $\beta$ 46 e Asp $\beta$ 94 que está presente no estado T. Uma segunda contribuição é aquela entre os grupos de resíduos de aminoácidos na cavidade interna da molécula entre as cadeias  $\alpha$ . Estes resíduos incluem  $\alpha$  aminogruppo de Val $\alpha_1$ 1 ao qual o próton participa; além destes, as cadeias laterais de Lis $\alpha_1$ 127, Asp $\alpha_1$ 6 e Asp $\alpha_1$ 126 e ainda o grupo carboxila terminal e cadeia lateral de Arg $\alpha_2$ 141. Um íon cloreto ligado entre as cadeias  $\alpha$  também contribue para interação. Uma outra contribuição está associada com His $\alpha$ 122 (Nishikura, 1978).

Apesar do conhecimento dos aminoácidos que contribuem para o sítio de prótons, não há ainda razões estruturais para explicar a mudança de pK que ocorre entre hemoglobina deoxi e totalmente saturada. Em resumo pode-se assumir que em pH baixo as ligações descritas acima são fortes e o relaxamento da forma T compacta é mais difícil. Em pH alto estas ligações são mais fracas e a forma compacta T pode ser relaxada mais facilmente.

Embora a origem estrutural exata das mudanças de  $pK$  dos grupos Bohr, que ocorrem não seja clara, é sabido que no estado R totalmente saturado, as pontes de hidrogênio dos grupos Bohr são rompidas, e no estado T ligado, elas retêm suas posições na interface das sub-unidades que são semelhantes aquelas do estado T não ligado (Anderson, 1973, 1975). O aumento da flexibilidade das sub-unidades do estado T causa um aumento na sua afinidade de modo a tornar mais fácil para elas relaxar a compactação provocada pelos ligantes. Diminuindo a flexibilidade, o efeito é oposto. As pequenas mudanças estruturais que ocorrem quando o ligante se une à sub-unidade no estado T pode influenciar a afinidade das sub-unidades vizinhas também em pequena extensão e tais mudanças não são necessariamente as mesmas em todas as condições e para todas as hemoglobinas mutantes ou modificadas. Kilmartin et al (1978) mostram isto no estado T. O mecanismo geral da cooperatividade, contudo, permanece o mesmo em todas as condições e dependendo do equilíbrio entre duas estruturas quaternárias que diferem em suas afinidades para o ligante. A origem desta cooperatividade está condicionada à diferença nas posições relativas da hélice F e do radical heme em cada sub-unidade e, somente na sub-unidade  $\beta$ , nas diferentes posições relativas ao heme e à hélice E. As duas estruturas alternativas ao redor do heme são determinadas pelos dois empacotamentos alternativos das interfaces  $\alpha_1\beta_2$ .

Efeito de polifosfato orgânico sobre a afinidade da hemoglobina por ligantes.

Sendo o objetivo da presente tese o estudo do efeito de fosfato orgânicos sobre a afinidade da hemoglobina de diferentes animais por ligantes, procuraremos abordar mais detalhadamente o assunto.

Há mais de 50 anos sabe-se que a afinidade do sangue total pelo oxigênio aumenta após a rutura do glóbulo vermelho no processo de hemólise. Isto levou Barcroft & Camis em 1909 a especularem sobre "alguma terceira substância" presente na hemácia, que formaria parte integral do complexo hemoglobina-oxigênio (Adair et al, 1921) e que se diluiria na preparação de soluções de hemoglobina. Logo após. Greenwal (1925) demonstrou a alta concentração de D-2,3-difosfoglicerato (DPG) em glóbulos vermelhos de porcos. Estes achados foram extendidos a outras espécies inclusive ao homem (Rapoport and Guest, 1941). Mais tarde Chanutin & Curnish (1967) demonstraram que DPG forma complexo com hemoglobina em solução de baixa força iônica. E finalmente um efeito dramático do composto na afinidade de hemoglobina pelo oxigênio foi descrito por Benesch & Benesch (1967). Os resultados destas pesquisas contribuíram definitivamente para novos caminhos em fisiologia e medicina.

Hoje se conhece bem que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e por fosfatos orgânicos são recíprocas e análogas ao efeito Bohr. A afinidade da proteína pelo oxigênio, portanto, varia inversamente com a concentração de DPG. Este seria a terceira substância de Barcroft, a responsável pela diminuição da afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio nos glóbulos vermelhos intactos, não diluídos por hemólise.

As evidências da participação do DPG "in vivo" e "in vitro" podem ser enumeradas : 1) A queda do DPG intracelular em acidose experimental (Rapoport, 1936) e durante a estocagem do sangue ( Bartlett and Barnet, 1960) é acompanhada pelo aumento da afinidade do mesmo pelo oxigênio. No caso de estocagem, o aumento da afinidade retorna aos valores normais após a síntese de novo do DPG. ii) Nas altitudes o oposto ocorre, pois os níveis de DPG aumentam e isto está correlacionado com a diminuição da afinidade do sangue pelo oxigênio.

As trocas são reversíveis quando a pressão barométrica volta ao normal (Lenfant et al, 1968). iii) Indivíduos com deficiências de piruvato quinase, com altos níveis de DPG, apresentam afinidade da hemoglobina pelo oxigênio com valores extremamente baixos (Mourdjinis et al, 1969). iv) Em contraste, a diminuição nos níveis de DPG causada por deficiência de hexoquinase é acompanhada pelo aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Delivoria-Papadopoulos et al, 1969). As consequências clínicas neste caso são severas. v) Em outros processos como hipoxemia, diminuição da carga cardíaca, doenças pulmonares, anêmia, etc, observa-se aumento nos níveis de DPG e abaixamento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ( Oski et al, 1969; Lenfant et al, 1970; Edwards et al, 1968). vi) No caso da anêmia falciforme, a elevação do DPG intracelular é discutível, uma vez que a estabilização da deoxihemoglobina pelo DPG favorecia a formação de hemácias em foice. De acordo com Rapoport e Luebering (1950) os glóbulos vermelhos sintetizam DPG através de um desvio da via glicolítica, mecanismo sujeito a controle retroativo ( feed back).

Entre os fosfatos orgânicos que diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, o DPG é o mais abundante no eritrócito humano normal, sua concentração é praticamente igual a da hemoglobina, cerca 5 mM. O ATP, outro fosfato orgânico, é aquele que possui concentração mais alta depois do DPG (1,3 mM). Porém de acordo com Bunn et al (1971) os íons magnésio intracelulares eliminam o ATP como efector alostérico de hemoglobina. A concentração do fosfato inorgânico na célula é 0,5 mM. É interessante notar que em algumas espécies, tais como aves e répteis, o DPG é substituído por inositol pentafosfato, IPP (Johnson and Tate, 1969) e ainda que em outras espécies como ungulados e felinos, faltam quantidade significativa de qualquer fosfato orgânico em suas hemácias (Rapoport e Guest, 1941).

De qualquer forma, é hoje claro que na hemoglobina encontra-se ligada quantidades variadas de cofatores fosfato e a remoção destas moléculas altamente carregadas é necessária para o estudo funcional destas proteínas. Tais íons podem ser removidos através de diálise, filtração em gel e resina de troca iônica. O estudo do equilíbrio entre oxigênio e hemoglobina sem cofatores ("stripped") mostra alta afinidade da mesma pelo oxigênio. O ponto de meia saturação da hemoglobina pelo oxigênio corresponde a uma constante de associação de  $6,7 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$  ou  $\Delta G$  de ligação de  $-6,5 \text{ kcal/mol}$ .

A ligação do fosfato orgânico à hemoglobina ocorre na forma deoxi, mas pode ocorrer de modo inespecífico mesmo na forma oxigenada, dependendo de fatores como força iônica e pH. Esta é a explicação dos achados de Chanutin e Hermann (1969) para a ligação de DPG à oxihemoglobina. Comparando-se o efeito de fosfato orgânico ao efeito Bohr, Wyman (1948) previu que a formulação quantitativa para este último é igualmente aplicável no caso do DPG, de modo que o deslocamento da curva de dissociação da hemoglobina em função da concentração de DPG pode ser prevista, e as mudanças nos valores das constantes de ligação para oxigênio poderiam ser observadas experimentalmente. Os valores de  $P_{50}$ , isto é, da pressão de oxigênio necessária para oxigenar 50% das moléculas da hemoglobina e os valores de  $n$  (coeficiente de Hill) possibilitam ainda a medida da constante de dissociação do complexo DPG-deoxihemoglobina que é  $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$  a  $20^\circ\text{C}$ . É interessante notar que o DPG ligado a deoxihemoglobina é liberado pela ligação do 2º ou 3º oxigênio quando ocorrem mudanças na estrutura quaternária entre as conformações deoxi para oxi. Estes estudos foram realizados por MacQuarrie e Gibson (1971) pelo uso de pireno trissulfato que é um análogo fluorescente do DPG. Outros cálculos de Tyuma et al (1973) através das constantes de ligação dos quatro passos de oxigenação de hemoglobina na presença ou não de DPG

na base do modelo de Adair, mostram que somente a afinidade do último oxigênio ( $K_4$ ) não está diminuída e os valores de  $K_1$  e  $K_2$  estão igualmente diminuídos embora o maior efeito esteja associado a  $K_3$ .

A base molecular da ligação de polifosfatos orgânicos à hemoglobina pode ser descrita. Tanto DPG como ATP ou IPP se ligam como se sabe, a deoxihemoglobina em sítio localizado no espaço entre as cadeias  $\beta$  (Arnone, 1972). Os fosfatos se ligam aos  $\alpha$  aminogrupos e a His2, Lys82 e His143 da sub-unidade  $\beta$ . Tais moléculas também se ligam à hemoglobina saturada com oxigênio mas de modo muito menos eficiente como dissemos e os sítios não são conhecidos por causa da falta de "espaço" suficiente para os fosfatos quando as cadeias  $\beta$  estão com sua estrutura quaternária saturada. A ligação forte do fosfato ao estado T e fraca ao estado R propicia a explicação para a diminuição observada da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Assim, a pequena mudança na estrutura terciária condicionada pela tentativa de relaxamento da sub-unidade  $\beta$  do estado T compactado compromete a hélice F. A presença de IPP ligado a Lis82 (F'3) faz com que a hemoglobina fique recompactada pelo relaxamento da sub-unidade, diminuindo assim a afinidade da sub-unidade. A ligação de IPP diminui pois a afinidade da sub-unidade  $\beta$  do estado T. A ligação de IPP se enfraquecerá quando um outro ligante se une a uma das sub-unidades  $\beta$  do mesmo estado T. A afinidade das vizinhanças de sub-unidade  $\beta$  aumentará ligeiramente como consequência, isto significa que as curvas de equilíbrio de oxigênio com hemoglobina na presença de IPP ou DPG não podem ser distintas entre si, pelos parâmetros do modelo de 2-estados. Contudo, a origem estrutural do efeito de fosfato orgânico sobre a ligação com o oxigênio é aquela de ligação mais forte na forma de baixa afinidade da hemoglobina (forma T) e mais fraca naquela de alta afinidade (forma R) em equilíbrio com ele.

Tem sido nosso objetivo, desde que começamos estudar hemoglobinas, adquirir maiores conhecimentos sobre efetores alostéricos em hemoglobinas de diferentes espécies animais que vivem nas mais variadas condições ambientais. Para tal acumulamos dados sobre efeito de adenosina trifosfato sobre hemoglobinas de anfíbios, répteis, peixes e mesmo mamíferos. Acreditamos que o efeito de ATP serve de modelo para outros polifosfatos.

Na presente tese procuramos demonstrar que o efeito de efetores heterotrômicos sobre hemoglobinas está intimamente associado com o habitat e condições de oxigenações às quais os animais são submetidos, independentemente da existência de determinado fosfato orgânico na hemácia. Assim estudamos as propriedades funcionais das hemoglobinas de dois anfíbios anuros de diferentes famílias, ( Pipídea e Bufonidae) com habitat diversos, respectivamente aquático e terrestre ( Meirelles et al, 1979; Vieira et al, 1979). Estudamos também répteis da mesma família (Colubridae) com habitat diversos (Ogo et al, 1979; Ogo & Focesi, 1979) e ainda diferentes hemoglobinas de um mesmo peixe (Brunori et al, 1979). Verificamos que a resposta das hemoglobinas a efetores polifosfatos está ligada ao comportamento do animal. Alguns dos experimentos descritos na presente tese já foram publicados ou estão em via de publicação e outros são originais e preliminares, como é o caso por exemplo da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), que está sendo proposto como um novo efetor alostérico e cujos resultados acreditamos poderão dar início a uma série de estudos sobre este polifosfato e suas possíveis implicações fisiológicas.

*[Handwritten signatures and stamps are visible at the bottom of the page, including a circular stamp with the text "BIBLIOTECA DE GENÉTICA" and "UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO".]*

## MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

*Pipa carvalhoi*, anfíbio aquático mesmo na fase adulta, era capturado no sul da Bahia e mantido em tanques contendo água aclorizada a 25°C. A alimentação dos espécimes era feita com vegetais e fígado cozido. Os animais pesavam de 10 a 15 g e eram utilizados o mais cedo possível, pois em cativeiro intensa anemia era observada com o tempo.

*Bufo paracnemis*, anuro terrestre, adulto capturado na região de Campinas, SP, era sacrificado logo após a captura.

*Helicops modestus*, serpente aquática de comportamento dócil com adaptações anatômicas no aparelho respiratório para viver na água, era obtida em lagoas em Jundiaí, SP, e mantida em tanques como o descrito. A alimentação consistia de peixes frescos.

*Liophis miliaris*, serpente irritadiça, de habitat considerado terrestre embora se alimente de peixes, o que a faz se dirigir à água ocasionalmente, era capturada e mantida como *H. modestus*.

*Pterygoplichtys pardalis*, peixe da Bacia Amazônica, provavelmente um dos bagres mais comuns encontrados naquela região, era capturado e sacrificado em seguida. O animal apresenta fisiologia respiratória bastante interessante porque além de guelras é provido de um sistema alternativo de troca de oxigênio nos intestinos, o que o torna parcialmente aeróbico.

Preparação do hemolisado

Os animais eram anestesiados em banho de gelo a 4°C e sangrados através do coração. O sangue era heparinizado e centrifugado

por 5 minutos a 3.000 rpm, o plasma separado e os eritrócitos lavados 3 vezes com solução de NaCl 0,15 M. A hemólise era processada com 2 volumes de água destilada e após 1 hora de agitação a temperatura ambiente, a solução era centrifugada a 0°C a 10.000 rpm por 5 minutos. Restos celulares eram eliminados.

Preparação de hemoglobina isenta de íons e moléculas orgânicas de baixo peso molecular ("stripped").

Soluções de hemoglobinas previamente cromatografadas em Sephadex G-25 eram passadas por sistema de 3 colunas de cromatografia de troca iônica com dimensões de 10-15 cm x 1-1,5 cm. A primeira coluna continha Dowex 1-X8 (Acetato<sup>-</sup>), a segunda Dowex 50W-X<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e a terceira a mistura: Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>)/Amberlite IR-4B (OH<sup>-</sup>), todas pré-equilibradas com água bidestilada em vidro neutro.

Alternativamente, tratamento com Sephadex G-25 e resina mista A-501-X<sub>8</sub>(D) Bioired (Dowex 1x8/50WX8) se revelou suficiente para se obter hemoglobina isenta de cofatores de alta afinidade pelo oxigênio.

Análise e purificação dos componentes das hemoglobinas.

Eventualmente analisavam-se os componentes dos hemolisados por eletroforese de disco em poliacrilamida. A técnica de análise dos componentes da hemoglobina foi a descrita por Ornstein & Davis (1964), com pequenas adaptações, utilizando-se poliacrilamida 7,5% pH 8,9. Os animais eram analisados individualmente.

Os geles utilizados foram designados; gel de resolução e gel de contraste, e eram preparados imediatamente antes do uso misturando-se soluções estoques, com as seguintes composições, mantidas a 4°C: Solução "A" 30% de Acrilamida e 0,8% de bisacrilamida. Solu-

ção "B" 8,5% de Tris, 0,4% de TEMED (tetrametil-etileno diamina) e 24 ml de HCl 1 N. Solução "C" 0,1% de persulfato de amônio. Solução "D" 5% de acrilamida e 1,25% de bisacrilamida. E solução "E" 12,9 ml de ácido fosfórico 1 M, 2,9% de Tris e 0,1% de TEMED em um volume final de 100 ml. O gel de resolução era preparado misturando-se as soluções "A", "B" e "C" na proporção de 1:1:2, e o gel de contraste, misturando-se as soluções "D", "E" e "C", na proporção 2:1:2.

Na preparação dos suportes de gel para a análise eletroforética eram utilizados tubos de vidro de dimensões 10 x 0,5 cm, devidamente lavados e secos, colocados em posição vertical e cobertos cuidadosamente na sua parte inferior com uma membrana de "parafilm" para evitar vazamento do gel. Nestes tubos era adicionado o gel de resolução até uma altura aproximada de 6 a 7 cm cobrindo-se imediatamente com 0,5 ml de água destilada. A camada de água era retirada após 30-40 minutos e o gel de contraste era adicionado sobre o gel de resolução, até uma altura de 1,5 cm a 2,0 cm, cobrindo-se novamente com uma camada de água; a polimerização deste segundo gel era obtida num período de 40 a 60 minutos, após o qual os tubos eram conectados a um sistema de 2 cubas.

A montagem do sistema de eletroforese se fazia inserindo-se os tubos em orifícios existentes numa delas, a superior, e o conjunto, tubos e cuba superior, era submerso na cuba inferior. Os sistemas de tampões utilizados nas cubas foram: Tris-Glicina 0,05 M pH 8,9 na cuba superior e Tris-Cl 0,1 M pH 8,1 na cuba inferior.

As amostras para a migração eletroforética eram recentemente preparadas misturando-se 0,1 ml de solução de carboxihemoglobina 1 mg/ml, 0,3 ml de glicerol e 0,05 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 M em tampão Tris-Glicina 0,05 M pH 8,9.

Em cada tubo era adicionado 10 a 20  $\mu$ l de amostra, 10  $\mu$ l de de soroalbumina (0,02 g/ml) e 0,2 ml de tampão Tris-glicina 0,05 M

pH 8,9 contendo: azul de bromofenol a 0,05% e azida de sódio a 0,02% em tampão fosfato de sódio 0,1 M. Finalmente após conexão com uma fonte de corrente contínua, a eletroforese era mantida durante 2 a 3 horas com uma intensidade de corrente da ordem de 2 mA por tubo. Terminada a migração, o que se constatava pelo "front" do azul de bromofenol, os geles eram removidos cuidadosamente dos tubos e imediatamente colocados na solução de coloração durante 2 a 3 horas após o qual eram feitas lavagens sucessivas com solução descorante durante 24 a 36 horas, tempo necessário para visualizar nitidamente as bandas de proteína.

Para coloração do gel era utilizada solução contendo 0,5% "comassie blue" em 250 ml de metanol 95%, 250 ml de água e 46 ml de ácido acético 18 N. Como descorante era utilizada uma solução contendo 1,4% de metanol e 7% de ácido acético em água.

#### Separação dos componentes de hemoglobina por cromatografia de troca iônica.

Para a separação dos componentes de hemoglobina de *P. pardalis* identificados por eletroforese em poliacrilamida, utilizou-se coluna de troca iônica (40 x 2,0 cm) DEAE-Sephadex A-50, pré-equilibrada com tampão Tris 0,05 M pH 9,0. O volume total era de 15 a 20 ml de hemolisado isento de cofatores. A amostra era eluída por aplicação de um gradiente linear de pH utilizando-se tampão Tris-Cl 0,05 M pH 9,0 e Tris-acetato 0,05 M pH 6,0. Frações de 5 ml eram coletadas em um Coletor de Frações modelo Buchler.

#### Método espectrofotométrico de determinação da curva de dissociação do oxigênio.

Quando um gás está em equilíbrio com uma solução, a pressão parcial do mesmo, na fase gasosa é proporcional à concentração

do gás em solução. Para o caso do oxigênio, a 20°C a pressão parcial de 1 mm Hg (fase gasosa) corresponde à concentração de  $1,82 \times 10^{-6}$  M (água ou solução muito diluída). A saturação fracional  $\bar{Y}$  (fração de oxihemoglobina) pode ser determinada medindo-se a concentração do heme livre e ligado ao ligante (oxigênio). Estas concentrações podem ser determinadas espectrofotometricamente, baseando-se na diferença espectral que existe entre oxi e deoxihemoglobina em vários comprimentos de onda. Para hemoglobina, algumas assertivas são implícitas no método. i) A relação entre oxigênio e o grupo hemínico é considerado 1:1 e ii) Em saturações intermediárias as propriedades espectrais de heme livre corresponde àquelas da deoxihemoglobina e as propriedades do heme ligado corresponde àquelas de hemoglobina totalmente saturada (Antonini & Brunori, 1971).

Na prática, uma solução de oxihemoglobina é colocada em um tonômetro construído com uma célula espectrofotométrica de modo que permita medidas adequadas de acordo com Riggs & Wolbach (1956). O sistema é então desoxigenado ou equilibrado com gás inerte (nitrogênio ou argônio) e a deoxihemoglobina formada é avaliada por suas propriedades espectrais. Oxigênio é então introduzido no sistema em pequenas quantidades conhecidas de ar, a pressão atmosférica, após cada adição a fase gasosa é equilibrada por 10 minutos com a solução, a temperatura constante, e o espectro de absorção é determinado. O processo é repetido e curvas de saturação são obtidas após cada adição. Finalmente o tonômetro é aberto e exposto ao ar e o espectro da hemoglobina totalmente oxigenada é registrado. Nestas condições a saturação fracional é calculada a partir da hemoglobina nas formas deoxi e totalmente saturada. A pressão de  $O_2$  no tonômetro é calculada pela quantidade de ar introduzida, multiplicada pela pressão parcial de oxigênio do ar e dividida pelo volume da fase gasosa do tonômetro, de acordo com a lei de Boyle-Mariotti.

$$PO_2(\text{atm}) \times V_a(\text{inj}) = PO_2(\text{ton}) \times V \text{ g\u00e1s (ton)}$$

Sendo a  $PO_2$  a press\u00e3o parcial de oxig\u00eanio no ar atmosf\u00e9rico (156mmHg) e  $V \text{ g\u00e1s(ton)}$  o volume da fase gasosa do ton\u00f4metro constante, temos:

$$PO_2(\text{ton}) = \frac{156 \times V_a(\text{inj})}{V \text{ g\u00e1s(ton)}}$$

Colocando-se num gr\u00e1fico os valores de  $\log PO_2$  em abscissas e  $\log K = \log \bar{Y}/1-\bar{Y}$  em ordenadas obt\u00eam-se uma linha reta em satura\u00e7\u00f5es de 10% a 90%, podendo-se determinar o valor de  $P_{1/2}$  ou  $P_{50}$  isto \u00e9, da press\u00e3o de oxig\u00eanio necess\u00e1ria para saturar 50% da hemoglobina e ainda o valor de  $\underline{n}$  ou  $n_H$  (coeficiente de Hill) atrav\u00e9s da inclina\u00e7\u00e3o da reta obtida. A determina\u00e7\u00e3o desses par\u00e2metros \u00e9 facilitada pelo uso de calculadora modelo Sharp-Compet-364 R munida de impressora.

#### Determina\u00e7\u00e3o de efeito Bohr

O efeito Bohr pode ser determinado espectrofotometricamente atrav\u00e9s de curvas de equil\u00edbrio de hemoglobina com oxig\u00eanio como descrito, em diferentes pH, utilizando-se tamp\u00f5es com pH variando entre 5 e 9 com for\u00e7a i\u00f4nica estabelecida. A maioria dos experimentos eram realizados com tamp\u00f5es; tris, bis-tris, fosfato, contendo  $10^{-3} \text{M}$  EDTA.

O efeito Bohr \u00e9 calculado atrav\u00e9s da equa\u00e7\u00e3o:

$$\frac{\Delta \log P_{1/2}}{\Delta \text{pH}} = \Delta H^+$$

onde  $\Delta H^+$  representa o efeito, e  $P_{1/2}$ , a press\u00e3o de oxig\u00eanio necess\u00e1ria para saturar 50% das mol\u00e9culas de hemoglobina.

Estudos cinéticos da reação de hemoglobinas com oxigênio.

1. Cinética de dissociação de oxihemoglobina.

A reação de dissociação:  $\text{HbO}_2 \xrightarrow{k} \text{Hb} + \text{O}_2$  pode ser estudada através da mistura de solução de oxihemoglobina em concentração determinada com solução de ditonito de sódio 10 mg/ml na presença de tampões com diferentes pH e força iônica. As soluções eram misturadas em equipamento de fluxo interrompido ("stopped flow") modelo Gibson-Durum equipado com freio pneumático. Calibrações de comprimento de onda eram feitas usando-se lâmpadas de hidrogênio a 486,13 nm e 656,28 nm. O tempo-morto do aparelho era de 2 mseg. Curvas de progresso da reação de dissociação obtidas do "eclan" de um osciloscópio modelo Tektronix 564 eram fotografadas, ampliadas em ampliador fotográfico sobre papel milimetrado e as curvas de transmitância em tempos diferentes eram obtidas. Após transformação em absorbância, a constante de velocidade era calculada pela equação:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{\Delta A_0}{\Delta A}$$

Posteriormente a análise dos dados foram facilitadas pelo uso de um computador PDP 11/E (Digital Equipment Comparison) munido de equipamento de aquisição e manutenção de dados modelo Dasar (American Instruments Comp.).

2. Cinética de combinação de hemoglobina com monóxido de carbono.

As reações de combinação da hemoglobina com monóxido de carbono:  $\text{Hb} + \text{CO} \xrightarrow{k'} \text{HbCO}$  eram analisadas através de equipamento de "flash photolysis" pelo qual soluções de carboxihemoglobina em determinado pH na presença de efetores ou não, eram iluminadas por lâmpadas de flash rápido ( $\pm 30 \mu\text{seg}$ ) equipado de micropul-

sador modelo B (Xeno comp.). A energia de descarga era de 400 J e o tempo necessário para recuperação de osciloscópio junto com fotomultiplicadora era menor que 1 mseg. Nestas condições a carboxihemoglobina se dissocia em CO e deoxihemoglobina, que se recombina. O tempo de recombinação é muito mais lento, e computado pelas mudanças espectrais entre as formas deoxi e carboxihemoglobina permitia traçar curvas, onde as constantes de velocidades podiam ser calculadas como descrito.

Outro método utilizado para analisar a reação de combinação com CO foi o de fluxo interrompido onde soluções de deoxihemoglobina (hemoglobina tratada por ditionito de sódio) era misturada com solução de monóxido de carbono e a velocidade de combinação analisada como descrito.

#### Determinações fluorimétricas

Estudos de ligação de hemoglobina com NADPH foram realizados em espectrofluorímetro modelo Aminco-Bowman equipado com registrador 7044 A XY Hewlett-Packard.

#### Aparelhos e reagentes utilizados

Os outros equipamentos utilizados para as determinações, além daqueles descritos, foram Espectrofotômetro Zeiss DMR-21, Zeiss PMQ-2, Cary 14, Varian modelo 634, Ultracentrifugador Sorvall RC-2B, pHmetros Methron, etc. Os reagentes utilizados foram de grau analítico de procedência Sigma, Merck ou equivalente.

## RESULTADOS

Efeito de adenosina trifosfato sobre hemoglobinas de *Bufo paracnemis* e *Pipa carvalhoi*.

Nestes estudos dois anfíbios de habitat diferentes foram analisados: *Bufo paracnemis*, anuro de características "terrestres" e *Pipa carvalhoi*, de habitat exclusivamente aquático mesmo na fase adulta. Foi nossa intenção determinar as propriedades funcionais das hemoglobinas destes anfíbios e as possíveis implicações do habitat nestas propriedades.

As curvas de equilíbrio com oxigênio das hemoglobinas de *Pipa carvalhoi* em função do pH foram estabelecidas tanto com o hemolisado total como com o componente I que representa 68% do hemolisado. Para hemoglobina de *Bufo paracnemis* só o hemolisado foi analisado. A figura 2 mostra que o valor do efeito Bohr, expresso em  $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ , é muito baixo (-0,03) na ausência de ATP para as hemoglobinas dos dois anfíbios. Nas hemoglobinas de *Pipa carvalhoi* na presença de ATP  $10^{-3} M$  o valor do efeito Bohr aumenta consideravelmente passando a -0,46 para o componente I isolado e um pouco menor, da ordem de -0,38 para o hemolisado total. É importante notar que com relação as hemoglobinas de *Bufo paracnemis*, o ATP não mostrou nenhuma influência sobre o efeito Bohr conservando seu valor ao redor de -0,03, como mostra também a figura 2.

Efeito de adenosina trifosfato sobre as hemoglobinas de *Helicops modestus* e *Liophis miliaris*.

Os estudos se limitaram agora a duas espécies de serpentes aquáticas pertencentes a mesma família Colubridae, *Helicops modestus*,

serpente muito aquática inclusive com adaptações morfológicas para viver na água e *Liophis miliaris* semi-aquática. Verificamos aqui que mesmo entre animais da mesma família, os polifosfatos podem apresentar sobre as hemoglobinas, efeitos bastante diferentes.

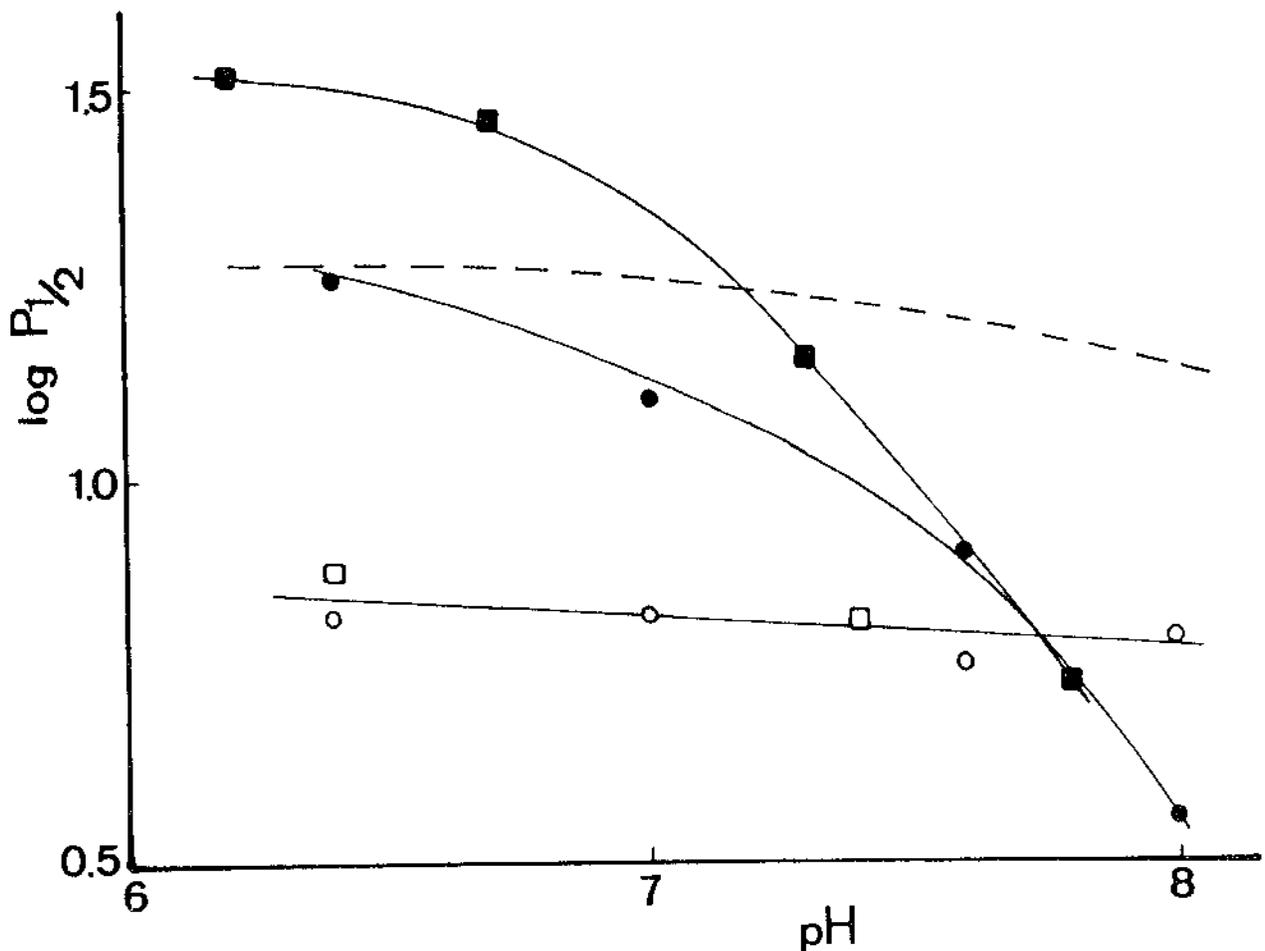


Figura 2: Afinidade das hemoglobinas de *Pipa carvalhoi* e *Bufo paracnemis* pelo oxigênio, em função do pH. Os símbolos □ e ○ representam respectivamente os valores obtidos com hemolisado total e componente I de *Pipa carvalhoi*, em tampão fosfato 0,1 M, na ausência de cofatores. Os símbolos ● e ■ representam os valores obtidos com hemolisado e componente I de *Pipa carvalhoi* na presença de ATP 1 mM, respectivamente. A linha pontilhada representa os valores encontrados para hemolisado de *Bufo paracnemis* na presença ou não de ATP 1 mM.

Estudos de equilíbrio das hemoglobinas com oxigênio.

As curvas de equilíbrio das hemoglobinas das serpentes a 25°C e num intervalo de pH de 6,0 a 8,0, na presença ou não de poli-fosfato orgânico (figura 3) mostram que a afinidade das hemoglobi-nas pelo oxigênio é maior para *Helicops modestus* (1,0 mm de Hg) nos mesmos valores de pH (7,0), em comparação com *Liophis miliaris*, 1,40 mm Hg. Na realidade estes valores de afinidade são extremamen-te altos em relação a hemoglobina de outros animais. Analisados na presença de ATP estes valores tornam-se 8,91 mm Hg para *Helicops modestus* e 17,8 mm Hg para *Liophis miliaris* (pH 7,0). O ATP tem pois nas hemoglobinas de ambas as serpentes efeito muito pronunciado.

Quanto ao efeito Bohr as hemoglobinas de *Helicops modestus* apresentam valores menores (-0,07) que as de *Liophis miliaris* (-0,30) ambos na ausência de cofatores. Por adição do ATP 1 mM estes valo-res aumentam passando para -0,55 e -0,9 respectivamente.

Estudos cinéticos.

As curvas de progresso da reação de dissociação de oxigê-nio das hemoglobinas das duas serpentes foram obtidas por equipamen-to de fluxo interrompido através da rápida mistura de solução de he-moglobina 10 µM contendo EDTA 10<sup>-3</sup>M com solução 10 mg/ml de ditioni-to de sódio. Tampões bis-tris 0,05 M (após a mistura) em três pH di-ferentes 6,93, 7,95 e 8,9 foram usados. Os estudos cinéticos de dis-sociação da oxihemoglobina (reação de pseudo primeira ordem), reve-laram que para *Liophis miliaris* as constantes cinéticas  $k=30,5 \text{ seg}^{-1}$  são mais elevadas em pH mais baixos, tornando-se menores, o que corresponde a reação mais lenta, à medida que o pH aumenta. A ta-bela I mostra estes resultados. As hemoglobinas de *Helicops modes-tus* submetidas ao mesmo tratamento mostraram muito menor dependen-

cia do pH, mantendo o valor de  $k = 16,5 \text{ seg}^{-1}$ . Por tratamento com ATP 1 mM, as curvas cinéticas da reação de dissociação do oxigênio (tabela I) das duas serpentes mostraram que as oxihemoglobinas se dissociam muito mais rapidamente, principalmente em pH baixo. As constantes de pseudo primeira ordem aumentam pois, três vezes a pH 7 e 1,5 vezes a pH 9 na presença do efetor, para as hemoglobinas de *Liophis miliaris*. Para hemoglobinas de *Helicops modestus* as constantes não atingem valores tão elevados. Os resultados de dissociação de  $O_2$  pelas hemoglobinas das duas serpentes tanto na ausência como na presença de ATP estão de acordo com os dados de equilíbrio.

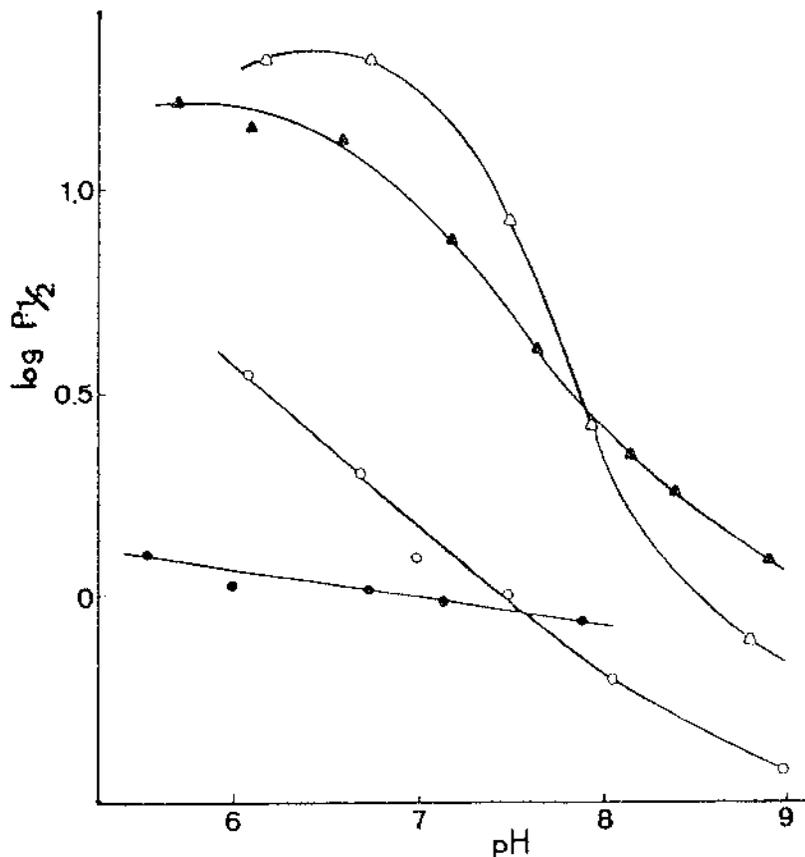


Figura 3: Tensão de oxigênio a meia saturação dos hemolisados de *Helicops modestus* (● ▲) e *Liophis miliaris* (○ △) em função do pH, na ausência de cofatores (círculos) e na presença de ATP 1 mM (triângulos). As condições estão descritas no texto.

TABELA I - Constantes de velocidade da reação de dissociação do oxigênio (k) para hemoglobinas de *Liophis miliaris* e *Helicops modestus* em função de pH na presença ou não de ATP  $10^{-3}$  M. As constantes de velocidades estão expressas em segundos<sup>-1</sup>.

pH	<i>Liophis miliaris</i>		<i>Helicops modestus</i>	
	isenta de cofatores	$10^{-3}$ M ATP	isenta de cofatores	$10^{-3}$ M ATP
6,93	30	80	16	47
7,95	23	46	17	30
8,9	14	23	15	22

As reações de combinação com monóxido de carbono foram obtidas: i) por fluxo interrompido, misturando-se solução 50 mM de CO com solução 10  $\mu$ M do deoxihemoglobina (contendo  $2 \times 10^{-3}$  M de EDTA) e ii) por fotólise de solução de carboxihemoglobina 100  $\mu$ M. Os resultados obtidos na presença de ATP  $10^{-3}$  M se mostraram diferentes pelos dois métodos de análise (tabela II), mormente para hemoglobinas de *Helicops modestus*.

TABELA II - Constantes de velocidade da reação de combinação do monóxido de carbono (l') com hemoglobinas de *Liophis miliaris* e *Helicops modestus* na presença de ATP  $10^{-3}$  M em função de pH, obtidos por experimentos de fluxo interrompido e fotólise. A concentração de CO foi de 50  $\mu$ M. As constantes de velocidades estão expressas em segundos<sup>-1</sup>.

pH	<i>Liophis miliaris</i>		<i>Helicops modestus</i>	
	fluxo	fotólise	fluxo	fotólise
6,93	7	8	11	19
7,95	11	13	11	26
8,9	22	25	16	40

As figuras 4 e 5 mostram as curvas de progresso das reações de combinação do CO com hemoglobinas respectivamente de *Helicops modestus* e de *Liophis miliaris*, na presença ou não de ATP  $10^{-3}$  M, em dois pH 7 e 9. Pode-se notar que a reação de combinação do CO com hemoglobina de *Helicops modestus* (figura 4) é fortemente autocatalítica enquanto que a de *Liophis miliaris* não apresenta curvas do comportamento bifásico (figura 5).

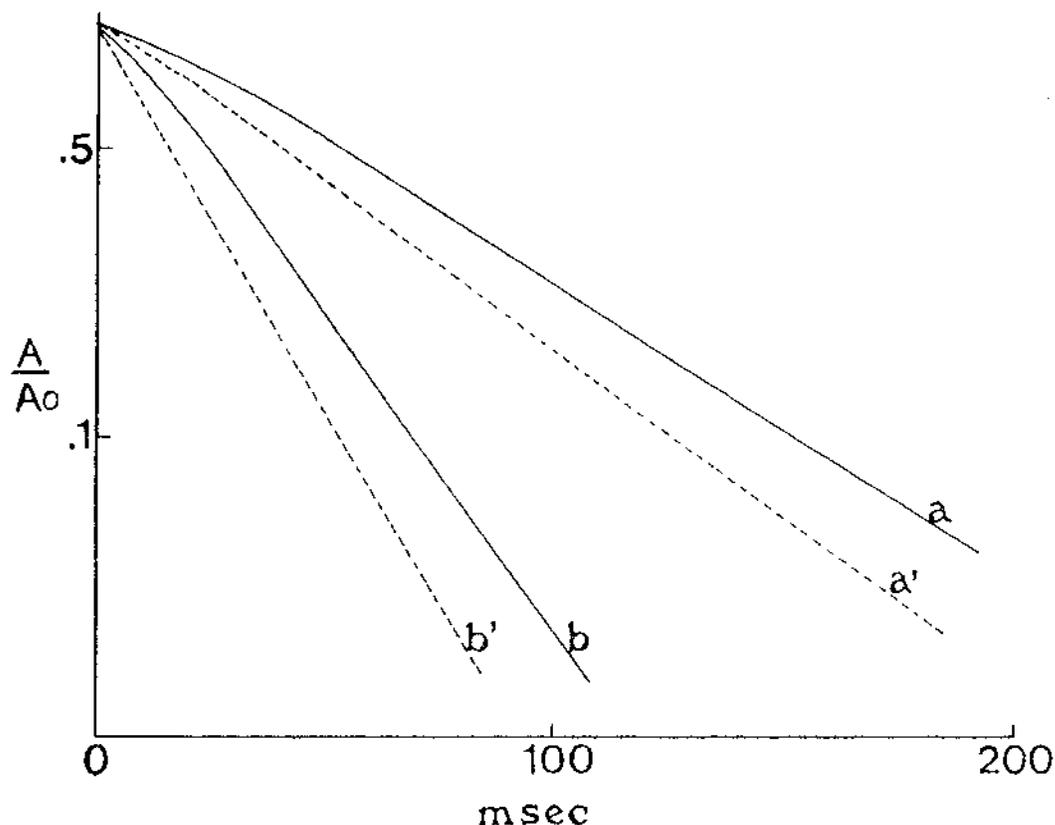


Figura 4: Curva de progresso da reação de combinação, a  $25^{\circ}\text{C}$ , de hemoglobinas de *Helicops modestus* com monóxido de carbono após fotólise. As curvas contínuas, a e b representam valores obtidos com hemoglobina isenta de cofatores em pH 7 e 9 respectivamente. As curvas pontilhadas, a' e b' representam os valores na presença de ATP 1 mM respectivamente a pH 7 (a') e pH 9 (b').

A figura 6 resume os resultados obtidos das constantes de velocidade das reações de dissociação de oxigênio e combinação de CO em função do pH com as hemoglobinas das duas serpentes. O maior efeito Bohr da hemoglobina de *Liophis miliaris* isenta de cofatores em comparação com a de *Helicops modestus* é evidente. O efeito alostérico do ATP analisado sobre o efeito Bohr se mostrou mais pronunciado na hemoglobina de *Liophis miliaris*.

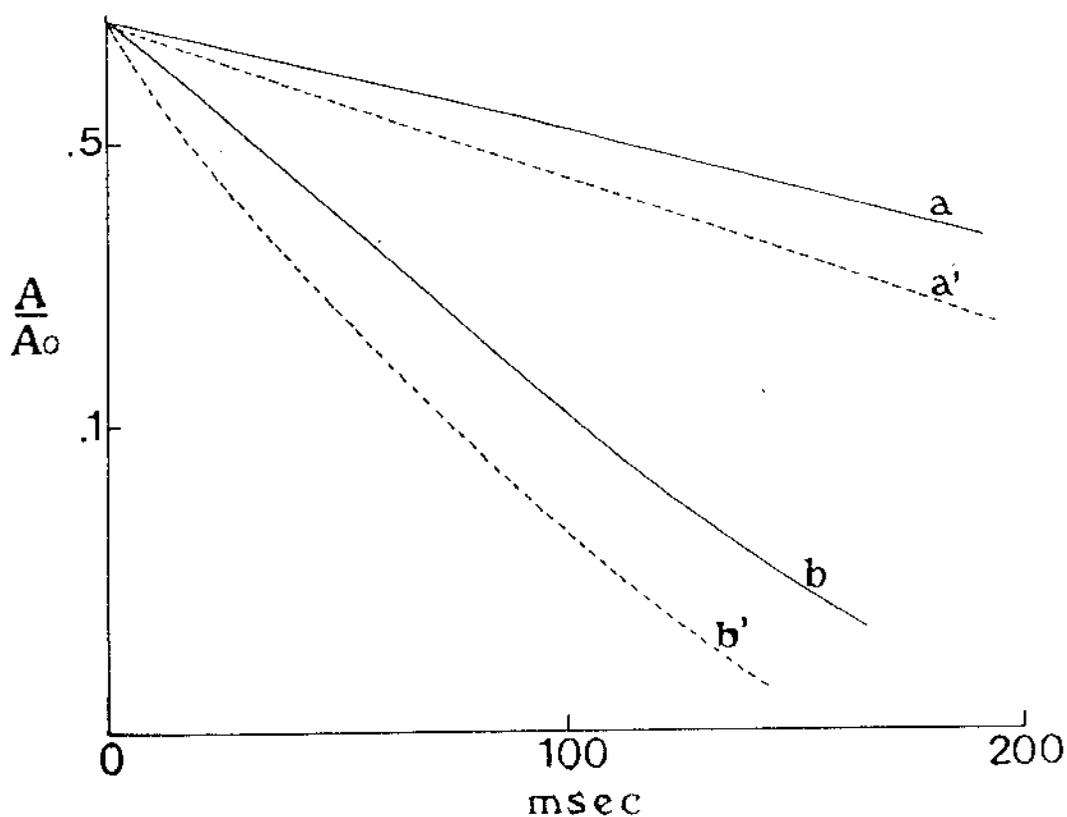


Figura 5: Curvas de progresso das reações de combinação de hemoglobinas de *L. miliaris* com monóxido de carbono a 25°C após fotólise. As linhas contínuas, a e b representam os valores obtidos de pH 7 e 9 respectivamente, e as linhas pontilhadas os valores em pH 7 (a') e pH 9 (b') na presença de ATP 1 mM.

Caracterização dos componentes de hemoglobinas de *Pterygoplichtys pardalis* (acari-bodo).

O acari-bodo é um dos numerosos cascudos existentes na Baía Amazônica que possui em suas hemácias quatro hemoglobinas. Estudos cautelosos de suas propriedades nos parecem relevantes para o melhor entendimento das causas da multiplicidade de componentes encontrados não só neste, mas na grande maioria dos peixes. Eletroforética e cromatograficamente os quatro componentes tem comportamento interessante uma vez que um deles que corresponde a 50% do hemo-

lisado se separa dos outros três de mobilidade próximas entre si. Os componentes separados foram avaliados quanto as suas propriedades de ligar oxigênio (estudos de equilíbrio) bem como quanto as suas propriedades cinéticas. Notamos que dentro do mesmo indivíduo grandes diferenças existem quanto às respostas dos componentes a efetores polifosfatos.

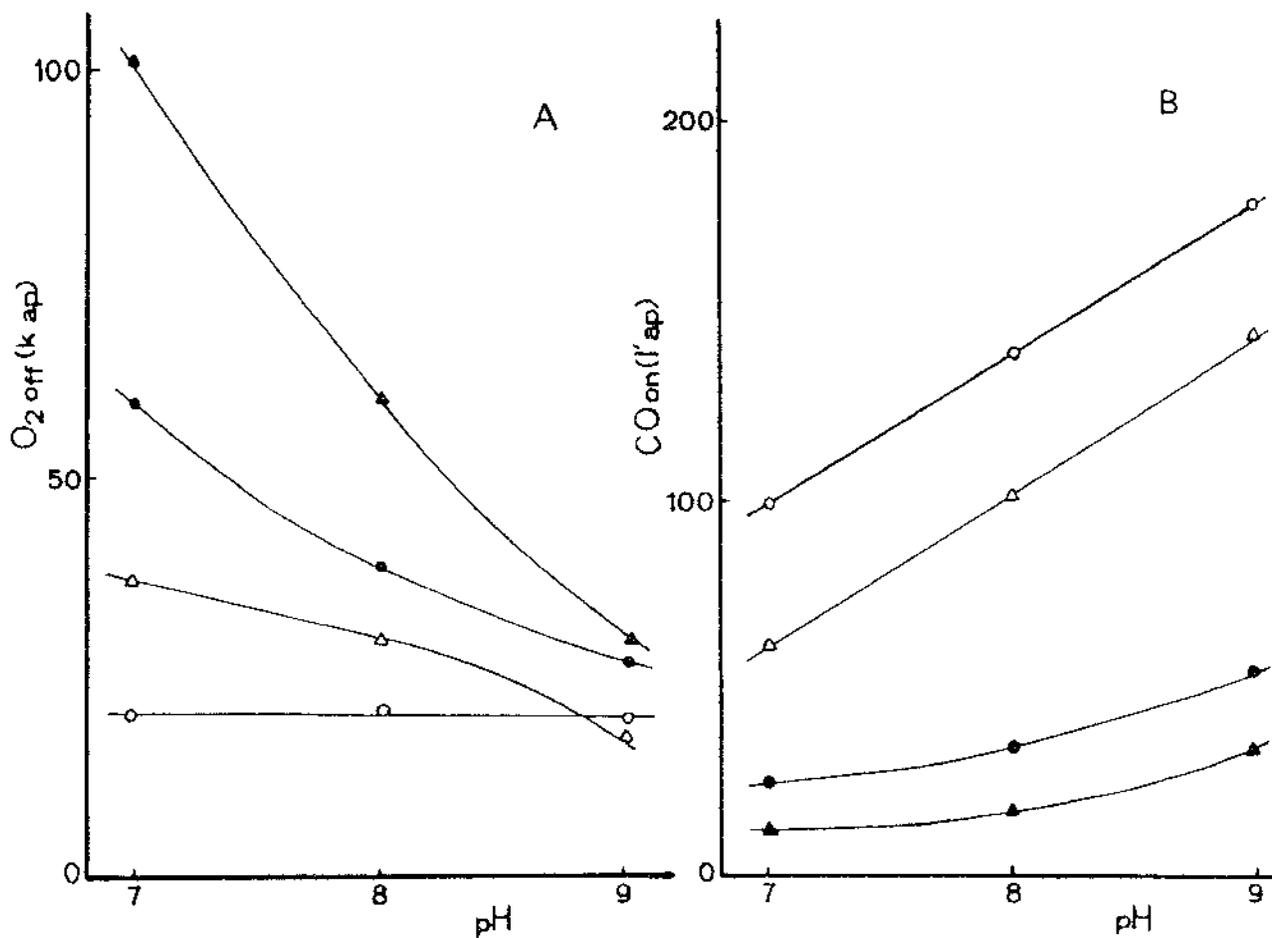


Figura 6: Efeito do pH sobre a velocidade de dissociação de oxigênio (6A) e combinação de monóxido de carbono (6B) a  $25^{\circ}C$ . Os triângulos e círculos vazios representam os valores de  $k$  ou  $l'$  obtidos na ausência de cofatores para as hemoglobinas de *L. miliaris* ( $\Delta$ ) e *H. modestus* ( $\circ$ ). Os triângulos e círculos escuros representam os valores obtidos para *L. miliaris* ( $\blacktriangle$ ) e *H. modestus* ( $\bullet$ ) na presença de ATP 1 mM.

### Estudos de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio.

As curvas de equilíbrio do componente I com o  $O_2$  na ausência de cofatores, são claramente cooperativas com valores do coeficiente de Hill ( $n$ ) variando de 1,9 em pH 6,7 a 1,3 em pH 8,1. As curvas da figura 7 mostram que o componente I tem um efeito Bohr reverso pequeno, e o efeito de ATP (1 mM) é insignificante em pH > 7,5. Contudo em pH mais baixo, o ATP diminui substancialmente a afinidade desta hemoglobina pelo oxigênio e também os valores de  $n$ . Já o componente IV na ausência de cofatores ou na presença de ATP apresenta nítido efeito Bohr normal e semelhantes entre si. Os dados estão pois em contraste com aqueles encontrados para o componente I graças ao marcado efeito Bohr do componente IV  $\Delta H^+ = 1$ . Os componentes II e III mostraram comportamento idênticos ao componente IV.

### Estudos Cinéticos.

A figura 8 mostra as constantes de pseudo primeira ordem de dissociação do oxigênio para  $HbO_2$  após tratamento por ditionito de sódio em função do pH. O comportamento destas constantes em relação ao pH é idêntico para os componentes II, III e IV e diferentes para o componente I. Tanto na presença como na ausência de ATP o comportamento das constantes é consistente com os achados do equilíbrio. Assim o componente I na ausência de cofatores apresenta efeito Bohr reverso bem pequeno e pela adição de ATP as constantes de dissociação (off) aumentam consideravelmente (em pH abaixo de 6,5). O componente III mostrou um forte efeito Bohr positivo (abaixo de pH 7) e os valores de  $k$  aumentaram por um fator de 10 quando pH passa de 7 para 5,3. Além disto nenhum efeito de ATP foi observado sobre a cinética da dissociação de oxigênio do componente III.

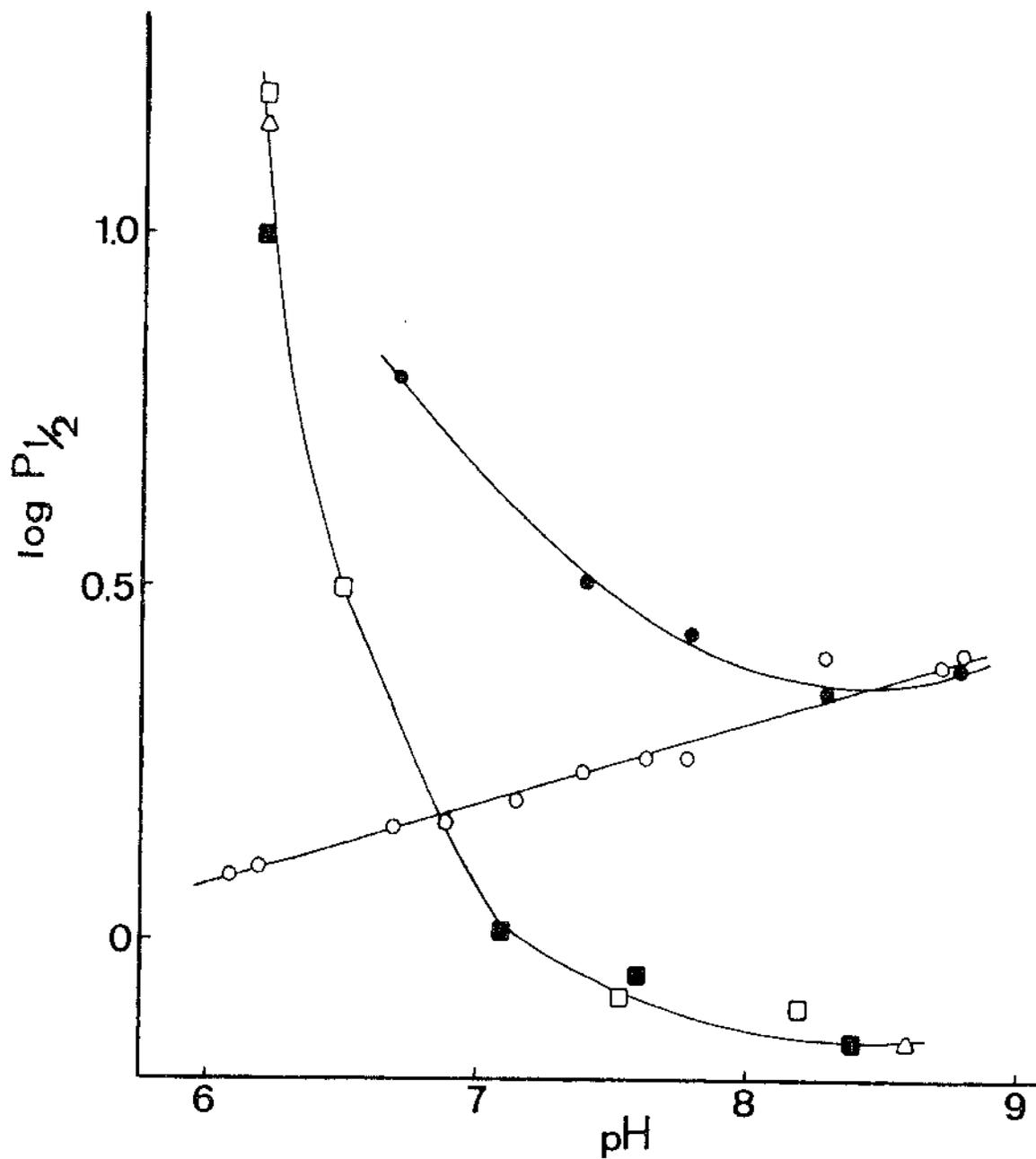


Figura 7: Efeito Bohr do oxigênio dos componentes de hemoglobina de *P. pardalis*. O componente I é indicado por círculos: ○, isento de cofatores; ●, + 1 mM ATP. O componente IV é indicado por quadrados: □, isento de cofatores ■, + 1 mM ATP. O componente III isento de cofatores é indicado por triângulos. Condições: tampão bis-tris ou tris 0,05 M -EDTA 1 mM e 25°C. Concentração hemoglobina ~ 1 mg/ml.

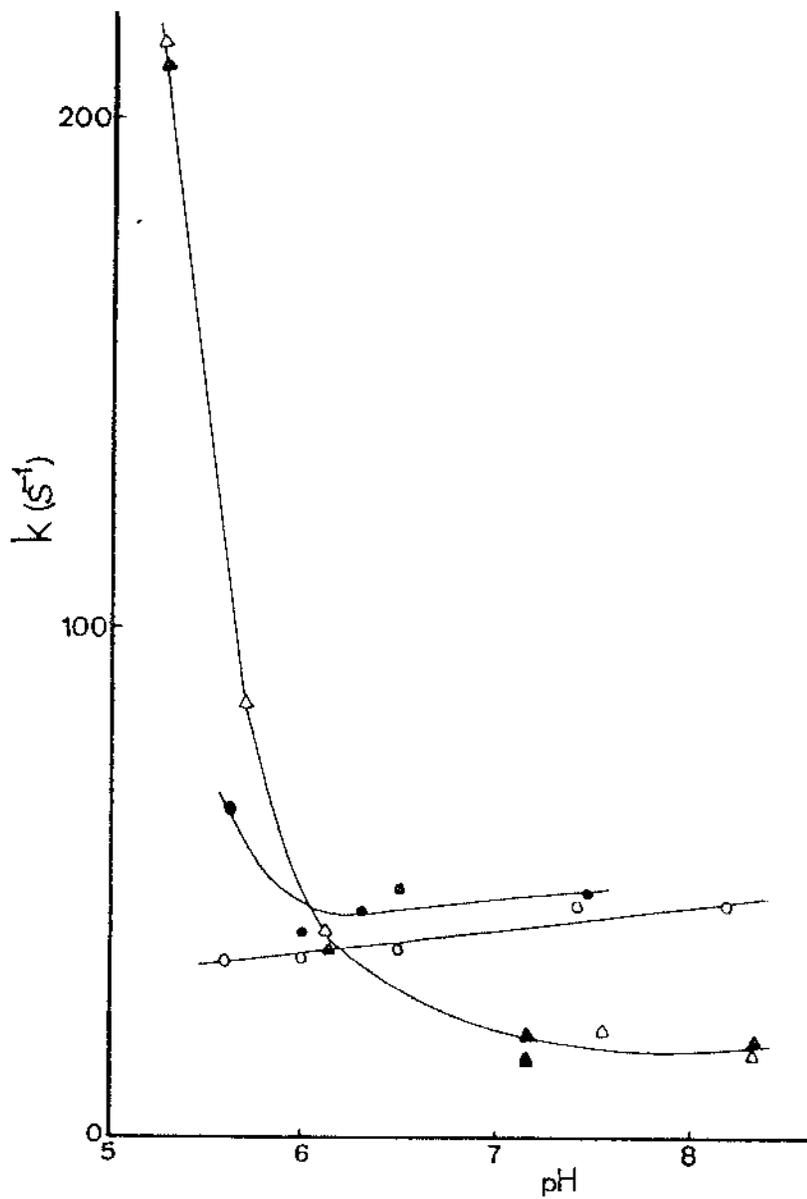


Figura 8: Efeito de pH sobre a constante de velocidade de dissociação de oxigênio ( $k$ ) para i) componente I de *P.pardalis* na ausência ( $\circ$ ) e presença de ATP 1,25 mM ( $\bullet$ ), ii) do componente III na ausência ( $\Delta$ ) e presença de ATP 1,25 mM ( $\blacktriangle$ ). Tampão utilizado: bis tris ou tris 0,05 M a 25°C. Concentração de hemoglobina aproximadamente 25  $\mu$ M (heme).

A reação de combinação de deoxihemoglobina com CO foi estudada para todos componentes: i) em condições de ausência de cofatores, ii) em função da concentração de CO, iii) em dois valores de pH, 5,6 e 7,7. Nestes valores de pH a reação analisada como de pseudo-primeira ordem apresentou constantes cinéticas  $k_1'$ , aumentando linearmente com a concentração do ligante. A concentração de CO variou de 7 a 43  $\mu\text{M}$  e a de hemoglobina foi 2,5  $\mu\text{M}$  (como heme). Aqui também os componentes II, III e IV comportam-se semelhantemente enquanto o componente I difere dos três. A figura 9 mostra os valores da constante de velocidade de segunda ordem em função do pH, na ausência e presença de ATP 1 mM, para os componentes I e IV. Deve-se notar que a curva de progresso da reação de deoxihemoglobina com CO mostrou-se autocatalítica. Resultados outros mostraram que o componente IV se combina com CO através de reação que é homogênea a pH abaixo de 7 e heterogênea a pH acima deste. O efeito Bohr já evidenciado nos experimentos de equilíbrio, isto é, a ausência de efeito de ATP sobre ele, pode ser constatado.

A figura 10 mostra os resultados dos experimentos da ação da luz, realizados com os componentes I por fotodissociação total e parcial (10% de fotodissociação) e os dados demonstram que: i) por ação de flash que promove fotólise completa na presença ou ausência de ATP, a reação é claramente autocatalítica, ii) sob fotólise parcial (10% de fotodissociação) a combinação com o CO se dá muito mais rapidamente, contudo o caráter autocatalítico não foi evidenciado. A adição de ATP em qualquer caso teve efeito muito pequeno na velocidade de recombinação do CO com hemoglobina, principalmente em condições da fotólise completa.

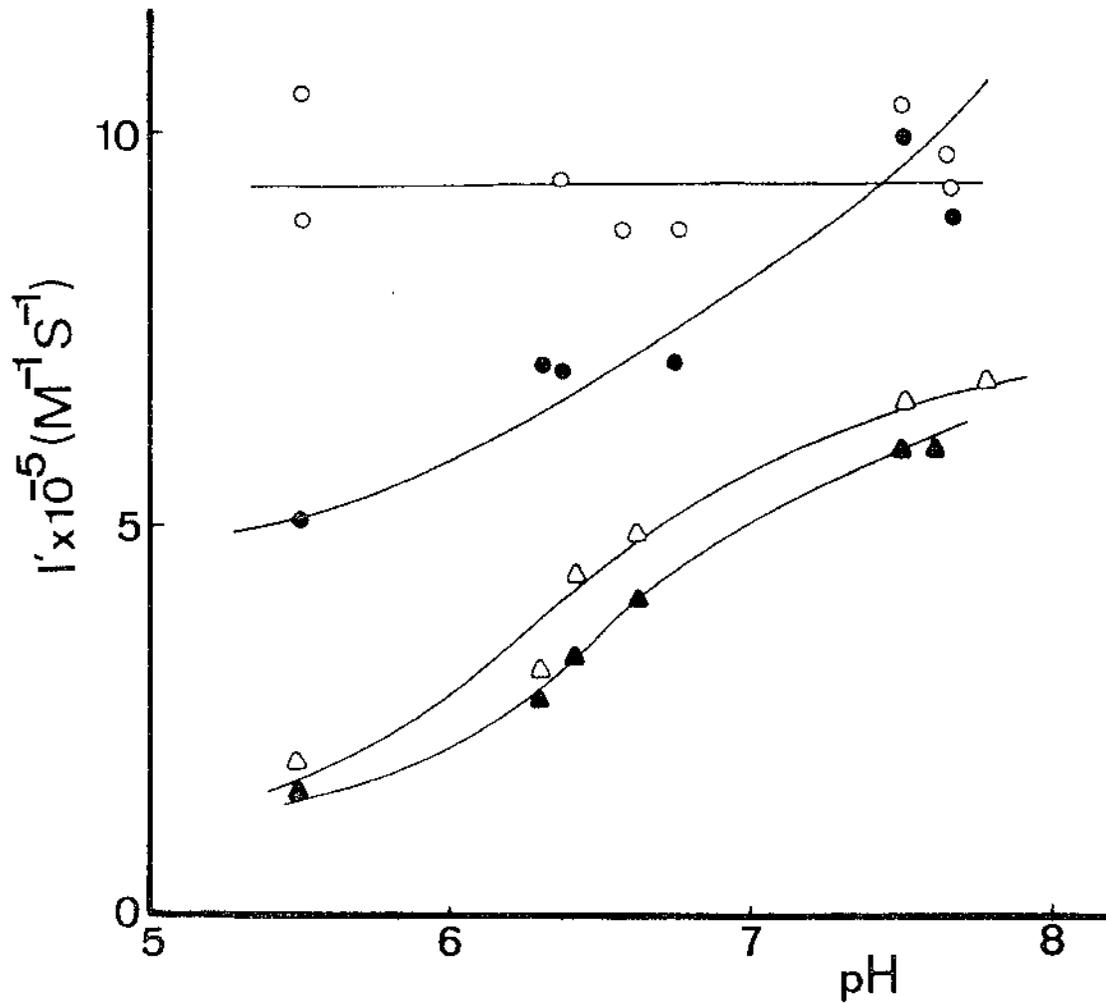
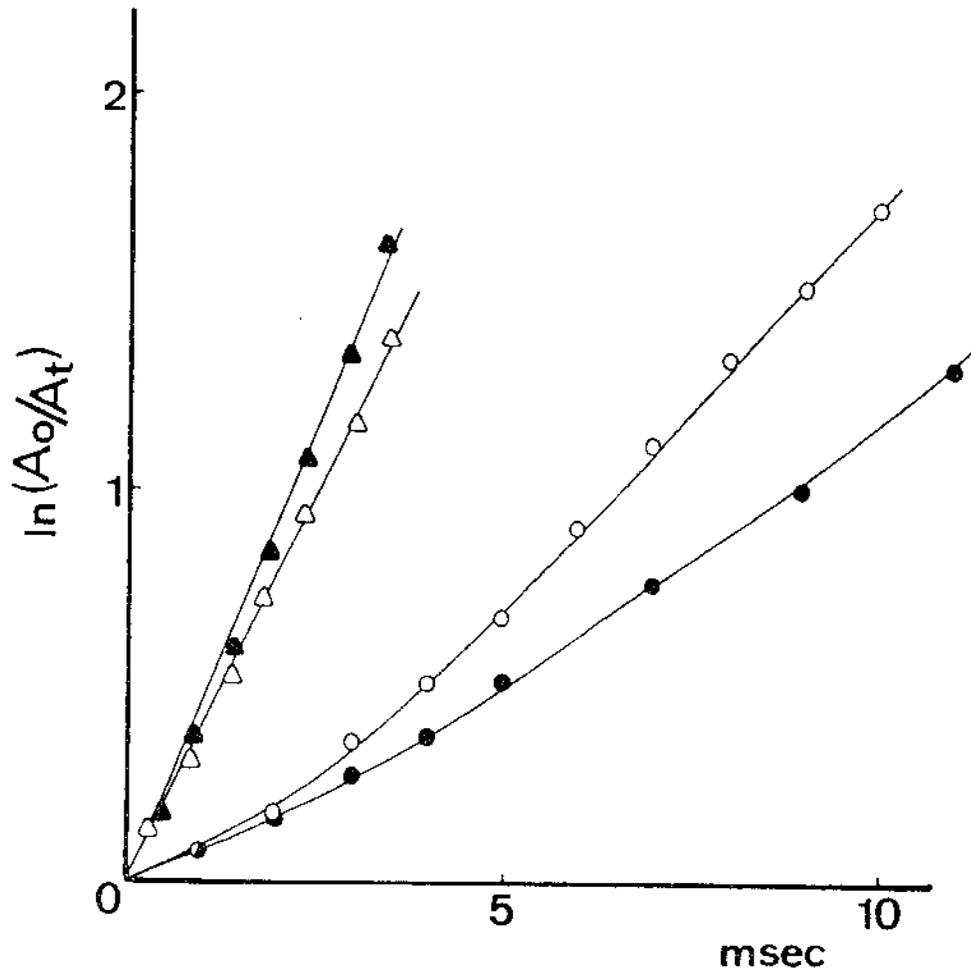


Figura 9: Dependência de pH da constante de velocidade para combinação de CO ( $l'$ ) para deoxihemoglobina de *P.pardalis*. Componente I sem (○) e com (●) ATP 1,25 mM; Componente IV sem (△) e com (▲) ATP 1 mM. Concentração de hemoglobina: aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  (heme). Tampões bis-tris ou tris 0,05 M a 20°C.



*Figura 10: Efeito do grau de fotodissociação sobre as curvas de progresso de combinação do componente I da hemoglobina de P.pardalis - com monóxido de carbono. Os experimentos foram feitos a pH 5,4 sem (símbolos claros) e com ATP 1 mM (símbolos escuros). Os resultados da fotólise total estão representados em círculos ( $\circ$  $\bullet$ ) e da fotólise parcial (10% da fotodissociação) em triângulos ( $\triangle$  $\blacktriangle$ ). Tampão bis-tris 0,05 M, 25°C.*

Efeito de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido) sobre hemoglobina humana.

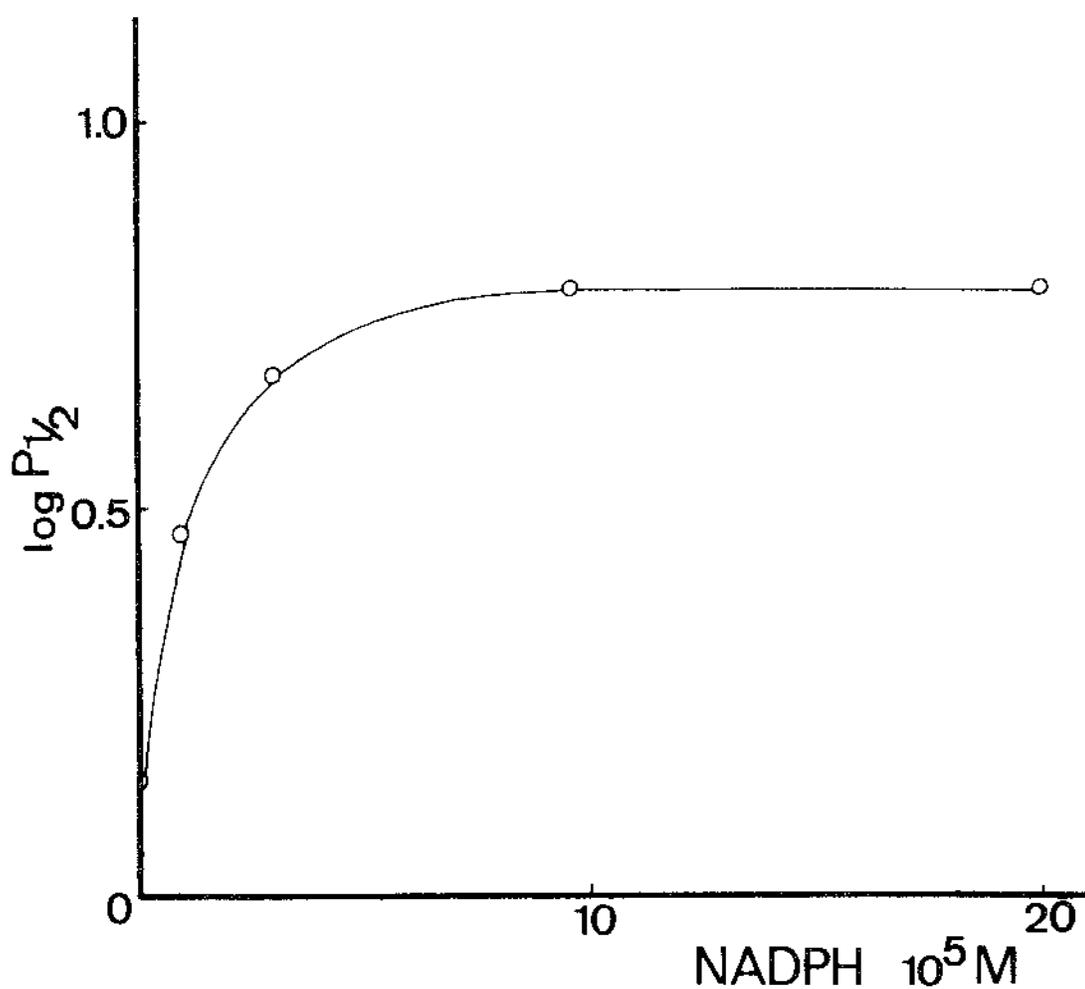
NADPH é um polifosfato orgânico abundante em hemácias humanas e de muitos animais, servindo inclusive como fonte de obtenção. A análise de sua estrutura mostrou a possibilidade de ensaiá-lo como efector heterotrópico de hemoglobina humana. Desta forma executamos estudos de equilíbrio da proteína com oxigênio com participação do nucleotídeo.

O efeito reversível do NADPH na concentração de  $10^{-3}$  M está demonstrado na tabela III. Pelos dados da tabela pode-se notar que hemoglobina isenta de cofatores tratada com o polifosfato e "desionizada", isto é, novamente isenta de cofatores, mantém sua alta afinidade pelo oxigênio inicial, isto é: NADPH se liga reversivelmente a proteína e não modifica suas propriedades funcionais.

TABELA III - Reversibilidade do efeito de NADPH sobre hemoglobina humana.  $P_{1/2}$  representa os valores de meia saturação da hemoglobina e  $n$  é coeficiente de Hill.

Tratamento	$P_{1/2}$	$n$
hemoglobina normal	1,01	2,5
isenta de cofatores	0,33	2,1
na presença de NADPH	0,78	1,9
após extração do NADPH	0,33	2,1

Para se determinar o número de moléculas de NADPH que produz valor máximo  $P_{1/2}$ , isto é, o número de sítios para o mesmo na hemoglobina, experimentos com diferentes concentrações de NADPH foram efetuados em dois diferentes pH (7 e 7,4). A figura 11 mostra os valores da constante de dissociação ( $P_{1/2}$ ) em função da concentração do efetor em pH 7,0. O valor máximo de  $P_{50}$  alcançado foi com concentração de NADPH da ordem de  $2 \times 10^{-4}$  M nos dois pH, o que corresponde evidentemente ao valor mínimo da constante de afinidade de hemoglobina pelo oxigênio e a uma razão NADPH/heme de cerca de 3.



*Figura 11: Efeito de NADPH sobre a meia-saturação da hemoglobina humana pelo oxigênio. Condições: tampão tris-cloreto 0,05 M pH 7, a 25°C.*

A figura 12 mostra os valores da constante de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diferentes pH (efeito Bohr) tanto na ausência como na presença de NADPH  $2 \times 10^{-4}$  M. Pode-se notar que os valores do efeito Bohr não mudam significativamente com o nucleotídeo. A cooperatividade da hemoglobina também não muda muito quando se analisam os valores do coeficiente de Hill.

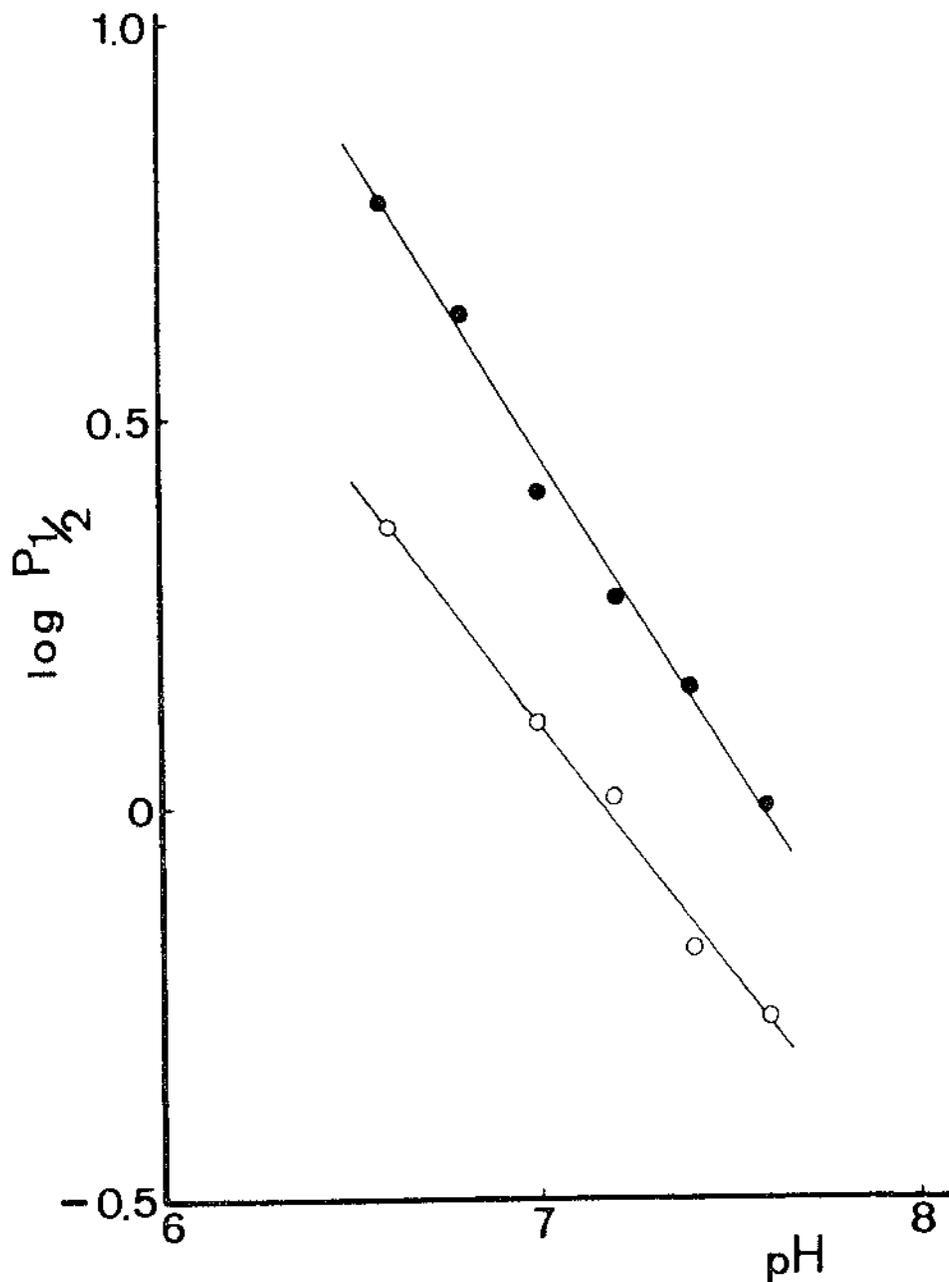


Figura 12: Influência do pH sobre a afinidade de hemoglobina humana pelo oxigênio na ausência (○) e presença (●) de NADPH  $1 \times 10^{-4}$  M. Tampão bis-tris ou tris 0,05 M.

Levando em consideração que polifosfatos se ligam preferencialmente à forma deoxi da hemoglobina, experimentos foram idealizados para constatar o mesmo fenômeno com NADPH. Estes experimentos foram grandemente facilitados por ser o NADPH nucleotídeo que fluoresce em determinado comprimento de onda quando excitado por luz visível ou ultra violeta. Desta forma hemoglobina humana, que não possui fluorescência graças ao grupo heme, foi tratada com NADPH  $2 \times 10^{-4}$  M em tampão bis-tris-Cl 0,05 M pH 7. Nestas condições, grande parte da fluorescência do NADPH é "absorvida" internamente pela hemoglobina demonstrando que ele se liga à proteína (primeira parte da tabela IV). Quando a mistura é deoxigenada num tonômetro e seu espectro de fluorescência determinado, a diminuição torna-se maior ainda demonstrando que a ligação do nucleotídeo é mais forte à deoxihemoglobina. Uma vez aberto o tonômetro de modo a permitir o contato da solução com o ar, a fluorescência do NADPH isto é, aquela obtida antes da transformação de oxi em deoxihemoglobina é recuperada revelando que o nucleotídeo se liga à deoxi e desliga da oxihemoglobina (segunda parte da tabela IV). A tabela IV indica além disto que 2,3-difosfoglicerato, conhecido efator alostérico de hemoglobina inibe competitivamente a ligação NADPH-hemoglobina, demonstrando que NADPH e DPG ocupam provavelmente os mesmos sítios, na proteína (terceira parte da tabela IV).

TABELA IV - Unidades relativas de fluorescência de NADPH  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  em tampão bis-tris 0.05 M pH 7.0 submetido a diferentes condições. Comprimento de onda de excitação: 340 nm.

Experimento	Unidades relativas
NADPH	0.36
NADPH + HbA $0.7 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.17
NADPH + HbA $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.06
NADPH + deoxi HbA $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.01
NADPH + oxi HbA $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.06
NADPH + DPG $3 \times 10^{-3} \text{ M}$	0.34
NADPH + DPG $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ + HbA $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.10

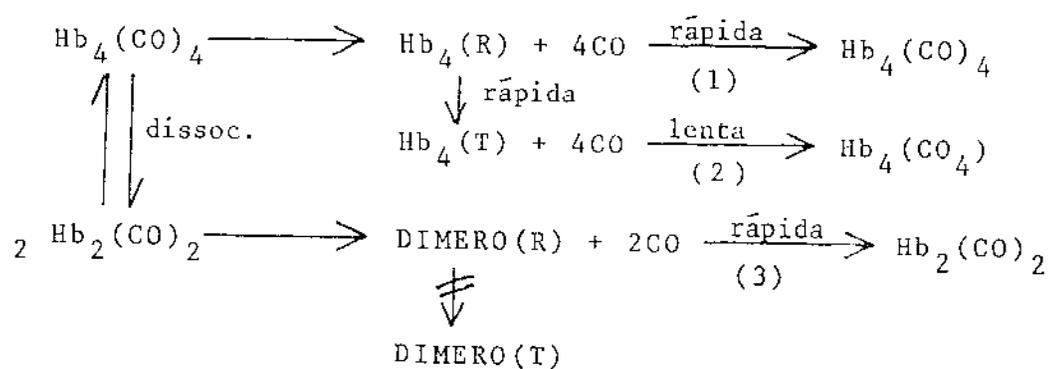
## DISCUSSÃO

Na presente tese procuramos estabelecer que o efeito de polifosfatos, no caso ATP, sobre a hemoglobina não é universal. Assim, nem sempre se pode demonstrar a ação dos efetores em diferentes hemoglobinas e isto parece ser verdade quando se estuda a mesma classe de animal, a mesma família ou o mesmo animal. Desta forma os dois anfíbios anuros *Pipa carvalhoi* e *Bufo paracnemis* pertencentes a diferentes famílias, Pipídiæ e Bufonidæ, possuem hemoglobinas cujas funções diferem fundamentalmente do ponto de vista de seu comportamento frente ao ATP: Hemoglobinas de *B. paracnemis* apresentam efeito Bohr da ordem de  $-0.03$  tanto na ausência como na presença de ATP, enquanto que aquelas de *P. carvalhoi* mostram grande diferença dependendo da presença do nucleotídeo passando de  $-0.03$  para  $-0.46$  quando as hemoglobinas são tratadas com ATP. É interessante observar que a maioria dos anuros, na fase adulta, estudados possuem hemoglobinas que não respondem a efetores polifosfato. Já o girino de *Rana catesbeiana*, por exemplo, apresentam hemoglobinas nas quais o efeito do ATP é nítido (Riggs, 1951). A *Pipa carvalhoi* parece comportar-se neste ponto de vista como girino da outra espécie.

Estudamos também hemoglobinas de dois répteis *Liophis miliaris* e *Helicops modestus* pertencentes a mesma família Colubridæ e notamos que embora suas hemoglobinas respondam ao ATP, o fazem de maneira bem diversa apesar do parentesco dos animais. Assim estudos do equilíbrio de reação das hemoglobinas com oxigênio em função do pH revelaram não só grande afinidade de ambas pelo gás mas também maior influencia de ATP no efeito Bohr das hemoglobinas de *L. miliaris* (que passa de  $-0,30$  para  $-0,9$ ) que nas de *H. modestus*

(de -0,07 a -0,50). Os dados cinéticos comprovam aqueles do equilíbrio: As constantes de velocidade de dissociação do oxigênio diminuem com o aumento do pH em *L.miliaris* e mantem-se praticamente constante com o pH, na hemoglobina de *H.modestus*. Na presença do ATP as constantes de velocidade aumentam nas hemoglobinas das duas serpentes em pH abaixo de 7. Reações de combinação de hemoglobina com monóxido de carbono foram analisadas através de experiências de fluxo interrompido e fotólise e como era de se esperar as variações das constantes de velocidade na presença ou não do ATP não são tão pronunciadas em função do pH. A análise da curva de progresso mostra também ser a reação de combinação da deoxihemoglobina com o CO autocatalítica para *H.modestus* revelando grande interação heme-heme nas hemoglobinas deste réptil.

Outro ponto de interesse foi a diferença encontrada entre as constantes cinéticas quando se analisa a reação:  $Hb + CO$  por estudos cinéticos pelos dois métodos acima. Tais diferenças podem ser interpretadas do seguinte modo: Nas experiências de fluxo interrompido temos esquematicamente:  $CO + Hb \xrightleftharpoons{l} HbCO$ , onde  $l$  é lenta, enquanto que nas experiências de fotólise temos:



Este esquema de reações, onde (R) e (T) representam as formas tetraméricas nos dois estados, mostra que as duas fases características da reação de combinação com CO podem ser devidas às reações (1) e (2) combinadas (rápida e lenta) ou (2) e (3) combinadas (lenta e

rápida). A participação da reação (3) no processo poderia ser analisada com concentrações diferentes de hemoglobina pois quanto mais diluída maior a dissociação do tetrâmero em dímero.

Fundamentalmente tanto em hemoglobinas de animais de diferentes famílias como daqueles pertencentes a mesma família a resposta da proteína com relação ao efetor ATP parece estar relacionada com o habitat ou com as condições metabólicas do animal para fazer frente à disponibilidade do oxigênio do ambiente. Assim *P. carvalhoi*, anuro aquático, apresenta hemoglobinas cuja resposta ao efetor é semelhante a aquelas de girinos de outras espécies de anfíbios, e estes resultados poderiam ser interpretados tendo em vista as características dos animais que são de comportamento dócil vivendo a maior parte do tempo dentro da água, imóveis, respirando com frequência de 3-4 vezes por hora. Em tais condições suas necessidades metabólicas devem ser muito baixas. Contudo, o esforço súbito realizado esporadicamente pelo animal no ato da alimentação ou fuga, p.ex., exigiria maiores quantidades de energia como forma de ATP que por sua vez diminuiria a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumentando ponderavelmente a descarga do gás aos seus tecidos. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado para os dois répteis estudados ambos da mesma família. Assim *H. modestus* é serpente aquática inclusive com adaptações morfológicas do aparelho respiratório para viver na água e além disto suas características são de animal dócil com metabolismo baixo. O efeito Bohr de suas hemoglobinas é muito baixo. Já *L. miliaris*, serpente semi-aquática de comportamento irritadiço, possui hemoglobinas com pronunciado efeito Bohr mesmo em condições de ausência de cofatores. Na presença de ATP ambas apresentam intenso efeito Bohr que poderia ser interpretado nas mesmas bases daqueles descritos para *P. carvalhoi*. Nesse caso é in-

interessante citar alguns resultados publicados por nós (Ogo e Focesi, 1979) onde estimulamos mecanicamente os animais até ~~exaustão~~ e ensaiamos lactato no sangue dos mesmos e notamos muito maior aumento do metabolismo na *L.miliaris*, este aumento ocasionaria abaixamento do pH sangüíneo e conseqüentemente menor afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. O efeito do lactato e do ATP se somariam no caso de maior esforço dos animais possibilitando maior oxigenação tecidual.

De posse destes resultados surgiu a questão de ser a mesma ou diferentes hemoglobinas responsáveis pela resposta dos efetores alostéricos nos animais estudados. É importante salientar que os animais de modo geral possuem múltiplas hemoglobinas em seus hemolisados, e desta forma poderia se esperar que entre eles uma apresentaria maior efeito do ATP p.ex., e passasse a funcionar em condições especiais. Surgiu então oportunidade de se estudar um peixe com múltiplas hemoglobinas e averiguar possíveis diferenças funcionais entre elas. O peixe escolhido foi *P.pardalis* cujo hemolisado possui quatro hemoglobinas que podem ser separadas por cromatografia de troca iônica. Estudos de equilíbrio e cinética revelaram que estas hemoglobinas podem ser divididas em dois grupos funcionalmente diferentes: o primeiro com um único componente e um segundo com três componentes de comportamentos semelhantes entre si, como passamos a relatar.

As curvas de equilíbrio de hemoglobina com oxigênio na ausência de cofatores mostraram para o componente I um pequeno efeito Bohr reverso e para os componentes II, III e IV nítido efeito Bohr normal. Na presença do ATP contudo o componente I mostra pronunciado efeito Bohr normal enquanto que nos outros componentes não se notou nenhuma alteração da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diferentes pH, por efeito do nucleotídeo. O peixe possui pois

hemoglobinas que se comportam diferentemente frente tanto a prótons como a ATP.

As reações de combinação da hemoglobina de *P. pardalis* com monóxido de carbono foram estudadas em paralelo com todos os componentes em diferentes condições. As constantes de velocidade das reações de pseudo primeira ordem aumentam linearmente com a concentração de CO. Estes experimentos confirmaram a semelhança entre os componentes II, III e IV e ainda revelaram que o componente I é diferente daqueles três. Assim a reação para o componente I é independente do pH e mostra efeito de ATP somente em regiões de pH baixo, isto é, em pH entre 5,5 e 6. As constantes de velocidade da combinação de CO diminuem pela adição a ATP. As curvas de progresso de tal reação de combinação se mostraram homogêneas (segunda ordem) ou ligeiramente autocatalíticas dependendo do pH e da presença de ATP. No caso do componente IV a reação de combinação com CO é essencialmente homogênea em valores de pH menores que 7 e ligeiramente heterogênea em pH maior que 7. A dependência do pH dos valores de  $l'$  é indicado pelo efeito Bohr normal pois os valores de  $P_{50}$  mudam cerca de quatro vezes quando o pH sobe de 5,5 para 7. Por adição de ATP pequena variação de  $l'$  foi observada em diferentes pH bem como a quase completa falta do efeito do ATP encontrado nos estudos cinéticos dos componentes II, III e IV, o que está de acordo com achados de equilíbrio.

Experimentos da ação da luz sobre carboxihemoglobina foram executados com o componente I com dois diferentes níveis de fotodissociação. Tais experimentos revelaram dois pontos importantes: i) a fotólise total na ausência ou presença de ATP é reação claramente autocatalítica e não evidencia formas de "reações instantâneas" devido a presença de dímeros na solução, em contraste com os

achados na hemoglobina A (Antonini & Brunori, 1971), ii) fotólise parcial (10% de fotodissociação) mostra que a reação de combinação com CO é muito mais rápida que aquela da fotólise total, o que constitui indicação direta da presença de espécies que "reagem instantaneamente" e que se encontram significativamente populosas em baixos níveis de fotólise, isto é, altas saturações do CO. É necessário notar que nos dois pH a adição do ATP não teve efeito sobre a velocidade de combinação com CO em fotólise parcial, enquanto apresentou algum efeito nos experimentos de fotólise completa.

Os dados de dissociação do oxigênio das hemoglobinas por método de desoxigenação na presença de ditonito de sódio, investigado em pH 5,5 e 7,8 na ausência do ATP mostraram em todos os casos que as curvas de progresso são consistente com aquelas de reação de primeira ordem. Aqui também os componentes II, III e IV são muito semelhantes entre si enquanto que o componente I é diferente dos outros três. Assim o componente I na ausência de cofatores é caracterizado por pequeno efeito Bohr reverso e a adição do ATP aumenta muito estas constantes em pH abaixo de 7. O componente III mostra efeito Bohr fortemente positivo (abaixo de pH 7) e valores de  $k'$  estão aumentados por um fator de 10, quando o pH passa de 7 para 5,3. Além disto nenhum efeito do ATP sobre a cinética de dissociação de  $O_2$  foi observada para o componente III.

As principais conclusões que puderam ser extraídas dos estudos com os componentes da hemoglobina de *P.pardalis* foram: i) os quatro componentes principais da hemoglobina deste peixe podem ser divididos funcionalmente em dois grupos representados pelo componente I e pelos componentes II, III e IV. Estes três últimos são muito semelhantes tanto do ponto de vista de equilíbrio como a se julgar pela cinética das reações com  $O_2$  e CO, ii) os resultados de

equilíbrio estão de acordo com os dados cinéticos e esta conclusão se estende também aos efetores alostéricos: prótons e ATP, iii) o componente I que representa metade do conteúdo de hemoglobina dos hemolisados é caracterizado, quando isento de cofatores, por efeito Bohr reverso e muito baixo e a sua afinidade global depende do ATP em pH baixos. Cineticamente o efeito do ATP se manifesta pela diminuição na constante de velocidade de combinação de CO e aumento daquela de dissociação do oxigênio, iv) os componentes II, III e IV que juntos compreendem cerca de 50% do hemolisado são funcionalmente semelhantes entre si e diferentes do componente I. Assim o seu efeito Bohr para  $O_2$  é grande e sua constante de afinidade de cresce cerca de 20 vezes do pH 8,5 para 6,2. Os dados cinéticos revelam a) grande aumento da velocidade de dissociação de oxigênio e b) uma diminuição significativa da constante da velocidade de combinação com CO com a diminuição do pH. Além disto o efeito do ATP é muito pequeno em qualquer pH analisado, v) o conjunto destes resultados leva-nos a concluir que os vários componentes da hemoglobina de *P.pardalis* se juntam em duas categorias caracterizados por propriedades funcionais que são complementares com respeito a influência de efetores alostéricos típicos. Este fato sugere que a presença de múltiplos componentes com propriedades funcionais distintas parece ser comum em peixes embora não seja universal. Evidentemente nenhuma explicação categórica pode ser oferecida no presente mas consideramos que a relação entre propriedades funcionais e papel fisiológico destas hemoglobinas devem existir como foi discutido para o caso dos outros animais. A existência de subgrupos de hemoglobinas complementares funcionalmente, parece ser fenômeno geral. Tal complementaridade pode adquirir significado se puder ser provado que os vários componentes co-existem dentro do

mesmo eritrócito como já foi demonstrado com sangue de truta ( Brunori et al, 1974).

De nossos estudos com hemoglobinas animais parece-nos ter ficado claro que uma correlação entre as necessidades metabólicas de cada animal e as propriedades funcionais das hemoglobinas deve existir. Foi também para nós evidente que a disponibilidade de oxigênio no ambiente em que o animal vive, é fator importante de adaptação de suas hemoglobinas. Assim um animal vivendo em ambiente de escassez de gás possuiria uma ou mais hemoglobinas que responderiam prontamente às necessidades teciduais de  $O_2$  através da descarga mais efetiva do mesmo aos tecidos. Neste caso a hemoglobina seria mais sensível a ação dos efetores e a afinidade pelo ligante seria maior, isto é, pequena elevação na concentração de prótons ou ATP, produziria grande e adequado efeito sobre aquela afinidade. Já naqueles animais que vivem em abundância de oxigênio a estrutura de suas hemoglobinas seria mais resistente não permitindo que os efetores alostéricos alterassem sobremaneira a sua afinidade pelo gás.

Finalmente, rememorando o papel dos efetores polifosfato na diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio resta-nos uma questão que nos pareceu relevante. Poderiam as hemoglobinas insensíveis a polifosfatos cumprir seu papel fisiológico adequadamente? Tendo em vista a necessidade de "3ª substância" de Barcroft, fica difícil responder a pergunta baseado exclusivamente no efeito protônico (Efeito Bohr) de animais pois é pouco provável que as mudanças do pH dos tecidos pudessem ocasionar por si só maior ou menor descarga do oxigênio nestes animais, pois tais variações de pH deveriam ser substanciais para que tal ocorresse de acordo com cálculos teóricos, e so valores extremos poderiam ter

significado naquele efeito. Fica subentendido que estamos discutindo somente aquelas hemoglobinas não sujeita a efetores alostéricos conhecidos (DPG, ATP, IPP).

Estas e outras ponderações ~~levaram-nos a estudar~~ NADPH como efector alostérico de hemoglobina. Para isto amostras de hemoglobinas humanas normais foram analisadas quanto a sua afinidade por oxigênio na presença ou não do efector. Inicialmente verificamos a reversibilidade da ligação do efector. Uma vez assegurada que nenhuma perturbação estrutural na hemoglobina pela presença do NADPH pudesse ser assinalada, curvas de equilíbrio foram traçadas em diferentes pH e o efeito foi amplamente confirmado. É interessante observar que as concentrações ótimas de NADPH, isto é, aquelas necessárias para produzir valores menores de  $P_{1/2}$  são pelo menos cinco vezes inferiores a qualquer outro efector alostérico conhecido, inclusive DPG. X

Outros estudos agora mais de caráter estrutural para verificar a forma de hemoglobina (oxi ou deoxi) a qual NADPH se liga foram feitos espectrofluorimetricamente, utilizando-se a propriedade da coenzima de emitir luz quando excitado em determinado comprimento de onda. Foi possível concluir que embora o nucleotídeo se ligue a oxihemoglobina, sua ligação a deoxi é mais forte. O mesmo fenômeno foi observado com DPG embora indiretamente. Acreditamos que este método se constitui muito adequado para estudar o caráter não só da ligação NADPH-hemoglobina, como de polifosfatos à proteína de modo geral.

Um dado de bastante interesse que poderia ser citado é o efeito do DPG sobre hemoglobina S. Este polifosfato apresenta efeito bem menor nesta hemoglobina, enquanto que NADPH apresenta efeito muito pronunciado tal qual aquele sobre a hemoglobina A

(Meirelles e Focesi, 1979). Em outras palavras o efeito do NADPH tanto na hemoglobina A como na hemoglobina S é quantitativamente idêntico o que não acontece com DPG. Se for considerada a correlação do sistema de glicose-6-fosfato desidrogenase àquele de hemoglobina S, poderíamos sugerir o envolvimento do NADPH no processo. Evidentemente estes dados são muito preliminares mas de qualquer forma interessantes tendo em vista a universalidade do NADPH nos eritrócitos dos animais.

A principal crítica que poderia advir sobre envolvimento do NADPH no processo de descarga de oxigênio da hemoglobina em níveis teciduais é a sua baixa concentração na hemácia, da ordem de  $5 \times 10^{-5}$  M em comparação à do DPG, de  $5 \times 10^{-3}$  M. Este fato tornaria seu efeito desprezível na hemácia humana. Evidentemente a razão NADPH/hemoglobina de 1:1 seria necessária para que se pudesse explicar um efeito fisiológico tal como aquele que acontece com o DPG. Contudo alguns dados de caráter funcional com relação ao DPG podem ser discutidos: i) o fato de DPG e nenhum outro efector alostérico estar presente nas hemoglobinas de alguns animais. ii) a dificuldade em se demonstrar o desligamento do DPG quando a hemoglobina passa da forma deoxi para oxi aos níveis dos pulmões. Evidentemente se o efector permanece ligado à forma oxigenada da hemoglobina o processo de combinação com o oxigênio estaria prejudicado. iii) a resposta eficaz da hemoglobina S ao NADPH e não ao DPG que foi observado em nossos resultados.

Do discutido poderia-se especular sobre a possível participação do NADPH no processo da dissociação do oxigênio pela hemoglobina em nível tecidual, se se evocasse um mecanismo de "turnover" para processo no qual a hemoglobina funcionaria como substrato de um sistema enzimático e que o NADPH funcionaria como coen

zima ligado a uma enzima, e o complexo NADPH-enzima seria responsável pela deoxigenação do grande número de moléculas da hemoglobina. O sistema redox NADPH/NADP estaria acoplado de alguma forma ao sistema oxi/deoxihemoglobina. Nenhuma base experimental, por ora, parece suportar nossa proposta de um mecanismo para explicação do efeito alostérico de NADPH "in vivo". Tais conjecturas deverão entretanto ser consideradas no futuro.

Resta-nos finalmente a importância que pode tomar o NADPH no estudo da natureza dos sítios de ligação de polifosfatos às hemoglobinas, graças a fluorescência do composto quando excitado. Tal propriedade certamente contribuiria para o melhor conhecimento de tais ligações.

Finalmente os resultados da presente tese nos possibilitam enveredar por diferentes caminhos que poderiam levar a conhecimentos mais sólidos sobre estrutura e função de hemoglobinas, proteína respiratória fundamental a todo reino animal. Esperamos ainda ter aberto perspectivas para novos estudos que aliás já estão sendo em parte realizados em nossos laboratórios e que presumivelmente poderão trazer luzes a natureza e ao mecanismo pelo qual efetores alostéricos atuam diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, descarregando-o aos tecidos para executar suas funções vitais a nível da cadeia respiratória.

## RESUMO

Os estudos de equilíbrio e cinética de hemoglobinas de diferentes espécies animais levaram as seguintes conclusões:

1. Hemoglobinas de anfíbios de duas espécies *Bufo paracnemis* (Bufo nidae) de habitat terrestre e *Pipa carvalhoi* (Pipidae) aquático, mostraram respectivamente efeito Bohr muito baixo na ausência de cofatores. Na presença de ATP a hemoglobina de *Bufo paracnemis* não apresenta alteração deste efeito, enquanto que aquelas de *Pipa carvalhoi* mostram aumento substancial pelo nucleotídeo.
2. Estudos de equilíbrio e cinética de hemoglobina de duas serpentes da mesma família (Colubridae): *Helicops modestus*, aquática e *Liophis miliaris* semi-aquática, mostraram efeito Bohr muito baixo na hemoglobina da primeira e efeito ponderável naquela de *Liophis miliaris*. O ATP produz grande efeito nas hemoglobinas de ambas as espécies mormente na mais terrestre. Os dados cinéticos estão de acordo com os dados do equilíbrio.
3. Estudos de equilíbrio e cinética dos quatro componentes de hemoglobina do peixe *Pterygoplichthys pardalis* mostraram que eles podem ser divididos em dois grupos funcionais distintos: um primeiro (componente I) com pequeno efeito Bohr reverso na ausência de ATP e grande efeito Bohr normal na sua presença. Por outro lado o segundo grupo, com os componentes II, III, IV com comportamento semelhantes entre si, mostra efeito Bohr normal mais evidente em pH baixo, efeito que não se altera por ATP.
4. Os resultados no caso dos anfíbios e répteis estudados, são consistentes com uma relação íntima entre o habitat ou a taxa metabólica dos animais e a disponibilidade de oxigênio do meio. No

caso do peixe a complementaridade de função dos diferentes componentes da hemoglobina é discutida.

5. Foi proposto um efetor alostérico abundante em glóbulos vermelhos de animais, o NADPH. Estudos de equilíbrios com oxigênio demonstram sua eficiência como efetor de hemoglobina humana. A ligação hemoglobina-NADPH foi analisada espectrofluorimetricamente.

## SUMMARY

Equilibrium and kinetic studies of hemoglobin from different animal species allow us to the following conclusions:

1. Hemoglobins from two amphibian species *Bufo paracnemis*, with terrestrial habitat and *Pipa carvalhoi* an aquatic animal, showed Bohr effect very low, closed to zero. In the presence of ATP, *Bufo paracnemis* hemoglobins still did not present Bohr effect whereas those of *Pipa carvalhoi* showed a definitive increase in such effect by the nucleotide.
2. Equilibrium and kinetic studies of hemoglobins from two water-snakes of the same family (Colubridae): *Helicops modestus*, aquatic and *Liophis miliaris* semi-aquatic, showed a reasonable Bohr effect only in the less aquatic species and absence in that of *H. modestus*. The ATP however induces a remarkable effect in both snake's hemoglobins, mainly in the terrestrial one. The kinetic data are in agreement with those of equilibrium.
3. Equilibrium and kinetic studies of four hemoglobin components from *Pterygoplychtis pardalis*, an amazon catfish, allow us to separate in two groups of components, with different functional properties: the first (component I) with small Bohr effect which increases with ATP, and the second group (components II, III and IV) which, instead showed a very large normal Bohr effect that does not change by ATP. The components from the second group are functionally similar.
4. The results found with the amphibia and reptiles studies are consistent with a relationship between either the habitat or the metabolic rate of the animals and the oxygen

disposability of the ambient. Concerning to the fish it was possible to discuss the complementarity of the component functions.

5. It was proposed as alosteric effector, NADPH, abundant in animal red cells. The equilibrium studies with oxygen showed its efficiency on human hemoglobin. The hemoglobin-NADPH binding was also analysed by spectrofluorimetry.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAIR, G.S., BARCROFT, J. & BOCK, A.V. (1921) - The identity of haemoglobin in human beings. J.Physiol (London), 55: 332.
- ADAIR, G.S. (1925) - The hemoglobin System VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. J.Biol.Chem, 63: 529-545.
- ANDERSON, L. (1973) - Intermediate structure of normal human haemoglobin: Methaemoglobin in the deoxy quaternary conformation. J.Mol.Biol, 79: 495-506.
- ANDERSON, L. (1975) - Structures of deoxy and carbonmonoxy haemoglobin Kansas in the deoxy quaternary conformation. J.Mol. Biol, 94: 33-49.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. (1970) - Hemoglobin. Ann.Rev.Biochem, 39: 977-1042.
- ANTONINI, E., BRUNORI, M. (1971) - Hemoglobin and Myoglobin in their Reaction with Ligands. North Holland Publishing Company. Amsterdam - London.
- ARNONE, A. (1972) - X-ray diffraction study of binding of 2,3 - diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. Nature, 237:146-149.
- BALDWIN, J.M. (1975) - Structure and function of haemoglobin. Prog. Biophys.Molec.Biol, 29: 225-320.
- BALDWIN, J.M., & CHOTHIA, C. (1979) - Haemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. J.Mol.Biol, 129: 175-220.
- BARCROFT, J. and CAMIS, M. (1909) - The dissociation curve of blood. J.Physiol (London), 39: 118.

- BARTLETT, G.R. and BARNET, H.N. (1960) - Changes in the phosphate compounds of the human red blood cell during bank storage. J.Clin.Invest, 39: 56.
- BENESCH, R. and BENESCH, R.E. (1967) - The effect of organic phosphate from the human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Commun, 26: 162-167.
- BOHR, C.K., HASSELBALCH, & KROGH, A. (1904) - Weber einen in biologischer beziehung wichtigen einfluss, den die kohlen säurespannung des blutes auf dessen säuerstoffbindung übt. Skand.Arch.Physiol, 16: 402-412.
- BRUNORI, M., GIARDINA, B., ANTONINI, E., BENEDETTI, P.T. & BIANCHINI, G. (1974) - Distribution of the haemoglobin components of trout blood among the erythrocytes: Observations by single cell spectroscopy. J.Molec.Biol, 86: 165-169.
- BRUNORI, M., BONAVENTURA, J., FOCESI, Jr.A., GALDAMES, I.PORTUS, M. & WILSON, M.T. (1979) - Separation and characterization of the hemoglobin components of Pterygoplichthys pardalis, the acari - bodo. Comp.Biochem.Physiol, 62: 173-178.
- BUNN, H.F., RANSIL, B.J., e CHAO, A. (1971) - The interaction between erythrocyte organic phosphates, magnesium ion, and hemoglobin. J.Biol.Chem, 246: 5273-5279.
- CHANUTIN, A. and CURNISH, R.R. (1967) - Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch.Biochem.Biophys, 121: 96-102.
- CHANUTIN, A. & HERMANN, E. (1969) - The interaction of organic and inorganic phosphates with haemoglobin. Arch.Biochem.Biophys, 131: 180-184.
- CHRISTIANSEN, J., DOUGLAS, C.C. & HALDANE, J.S. (1914) - The adsorption and dissociation of carbon dioxide by human blood. J.Physiol, 48: 244-277.

- DELIVORIA - PAPADOPOULOS, M., OSKI, F.A. and GOTTLIEB, A.J. (1969)  
Oxygen-hemoglobin dissociation curves: Effect of inherited  
enzyme defects of the red cell. Science, 165: 601-603.
- EDWARDS, M.J., NOVY, M.J., WALTERS, C.L. and METCALFE, J. (1968)  
Improved Oxygen Release: an adaptation of mature red cells to  
hypoxia. J.Clin.Invest, 47: 1851-1857.
- FERMI, G. (1975) - Three-dimensional Fourier synthesis of human  
deoxyhaemoglobin at 2.5 Å resolution: Refinement of the atomic  
model. J.Mol.Biol, 97: 237-256.
- GIBSON, Q.H. (1956) - An apparatus for flash photolysis and its  
application to the reactions of myoglobin with gases. J.Physiol,  
134: 112-122.
- GIBSON, Q.H. (1959) - The kinetics of Reactions between Haemoglobin  
and gases. Biophys.Chem, 9: 1-53.
- GIBSON, Q.H. & ANTONINI, E. (1967) - Observations on rapidly  
reacting hemoglobin. J.Biol.Chem, 242: 4678-4681.
- GREENWALD, I. (1925) - A new type of phosphoric acid compound  
isolated from blood, with some remarks on the effect of  
substitution the rotation of l-glyceric acid. J.Biol.Chem,  
63: 339-349.
- HEIDNER, E.J., LADNER, R.C. & PERUTZ, M.F. (1976) - Structure of  
horse carbonmonoxyhaemoglobin. J.Mol.Biol, 104: 707-722.
- HILL, A.V. (1910) - The possible effects of the aggregation of the  
molecules of haemoglobin on its dissociation curve. J.Physiol,  
40: IV-VII.
- JOHNSON, L.F. and TATE, M.E. (1969) - Structure of "phytic acids".  
Can.J.Chem, 47: 63-73.

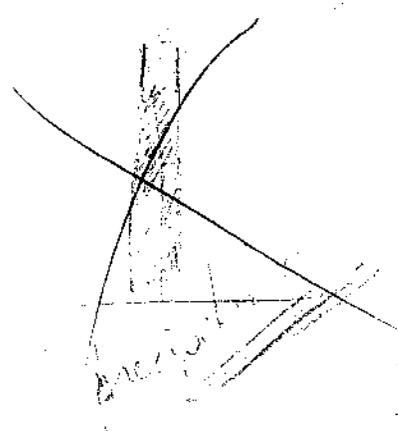
- KILMARTIN, J.V., ANDERSON, N.L. & OGAWA, S. (1978) - Response of the Bohr Group salt bridges to ligation of the T state of haemoglobin Kansas. J.Mol.Biol, 123: 71-87.
- LADNER, R.C., HEIDNER, E.J. & PERUTZ, M.F. (1977) - The structure of horse methaemoglobin at 2.0 Å resolution. J.Mol.Biol, 114: 385-414.
- LENFANT, C., TORRANCE, J., ENGLISH, E., FINCH, C.A., REYNAFARCE, C., RAMOS, J. & FAURA, J. (1968) - Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. J.Clin, Invest, 47: 2652-2656.
- LENFANT, C., TORRANCE, J.D., WOODSON, R. and FINCH, C.A. (1970) - Adaptation to Hypoxia. Adv.Exp.Med.Biol, 6: 203-212.
- MACQUARRIE, R. and GIBSON, Q.H. (1971) - Use of a fluorescent analogue of 2,3-diphosphoglycerate as a Probe of human hemoglobin conformation during carbon monoxide binding. J.Biol.Chem, 246: 5832-5834.
- MEIRELLES, N.C., VIEIRA, M.L.C., AIROLDI, L.P.S. & FOCESI, Jr.A. (1979) - Some larval properties of Pipa carvalhoi adult hemoglobins. Comp.Biochem.Physiol, 62A, 859-862.
- MEIRELLES, N.C. & FOCESI, Jr.A. (1979) - Resultados não publicados
- MONOD, J., WYMAN, J. & CHARGEUX, J.P. (1965) - On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J.Mol.Biol, 12: 88-118.
- MOURDJINIS, A., WALTERS, C., EDWARDS, M.J., KOLER, R.D., VANDERHEIDEN, B. and METCALFE, J. (1969) - Improved oxygen delivery in pyruvate kinase deficiency (PK-def.). Clin.Res, 17: 153.
- NISHIBURA, K. (1978) - Identification of Histidine-122 $\alpha$  in Human haemoglobin as one of the unknown Alkaline Bohr groups by hydrogen<sup>3</sup>tritium exchange. Biochem.J, 173: 651-657.

- OGO, S.H., ABE, A.S. & FOCESI, Jr.A. (1979) - Oxygen dissociation constants in haemoglobins of Helicops modestus and Liophis miliaris, two water-snakes with different morphological adaptations to their aquatic environments. Comp.Biochem.Physiol, 63: 285-289.
- OGO, S.H. and FOCESI, Jr.A. (1979) - The haemoglobin Bohr effect and lactic acid content of the blood of two water-snakes with different degrees of aquatic adaptation. Experientia, 35: 862.
- ORNSTEIN, L. & DAVIS, B.J. (1964) - Disc electrophoresis - I. Background and theory. Ann.N.Y.Acad.Sci, 121: 321-349.
- OSKI, F.A., GOTTLIEB, A.J., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., & MILLER, W.W. (1969) - Red cells 2,3-diphosphoglycerate levels in subjects with chronic hypoxemia. N.England.J.Med, 280: 1165-1166.
- PERUTZ, M.F. (1970) - Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Haem-haem interaction and the problem of allostery. The Bohr effect and combination with organic phosphates. Nature (London), 228: 726-739.
- PERUTZ, M.F. (1972) - Nature of Haem-haem Interaction. Nature (London), 237: 495-499.
- PERUTZ, M.F. (1976) - Structure and mechanism of haemoglobin. Brit. Med.Bull, 32: 195-208.
- RAPOPORT, S. (1936) - Über Phosphorglycerinsäure als transportsubstanz des Blutphosphors und ihr verhalten bei experimenteller ammonchloridazidose I. Biochem.Z, 289: 411-415.
- RAPOPORT, S. and GUEST, G.M. (1941) - Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood of various vertebrates. J.Biol.Chem, 138: 269-282.

- RAPOPORT, S. & LUEBERING, J. (1950) - The formation of 2,3 - diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: the existence of a diphosphoglycerate mutase. J.Biol.Chem, 183: 507-516.
- RIGGS, A. (1951) - The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog. J.Gen.Physiol, 35: 23-40.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R.A. (1956) - Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. J.Gen.Physiol, 39: 585-605.
- ROUGHTON, F.J.W. (1935) - Recent work on carbon dioxide transport by the blood. Physiol.Rev, 15: 241-296.
- TYUMA, I., IMAI, K. & SHIMIZU. (1973) - Analysis of oxygen equilibrium of hemoglobin and control mechanisms of organic phosphates. Biochemistry, 12: 1491-1498.
- VIEIRA, H.F., VIEIRA, M.L.C., MEIRELLES, N.C. & FOCESI, Jr.A. (1979) - Pipa carvalhoi haemoglobin V. Reactive Sulfhydryl groups . I.R.C.S. Medical Science, 7 125.
- WYMAN, J. Jr. (1948) - Heme Proteins. In: Advances in Protein chemistry (Ed. Anson M. & Edsall J.T.), Academic Press, New York, vol IV pp. 410-531.

M. S. ...

...  
...  
... (Uma ...)



...  
...  
interação ...



...  
...

...  
...

Modificados) Alostóricos