

*Sistemática e Evolução*

**unesp** 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

*Ecologia e Comportamento*

**GRADUAÇÃO**

*Sistemática e Evolução*

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA ANIMAL

*Biologia Estrutural*

**PÓS-GRAD**





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Estudos estruturais e funcionais das  
hemoglobinas de *Phrynops geoffroanus*  
(Schweigger, 1812)

**Ana Lúcia Ferrarezi**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas,  
Universidade Estadual Paulista, para  
obtenção do título de mestre em  
Biologia Animal.

2006

## COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
Data da Defesa Pública: 23/02/2006

MEMBROS TITULARES:

---

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez (orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luisa Schwantes

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron

MEMBROS SUPLENTE:

---

Prof. Dr. Fábio Renato Lombardi

---

Prof. Dr. Luiz Antonio Florindo

Ferrarezi, Ana Lúcia.

Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812) / Ana Lúcia Ferrarezi – São José do Rio Preto : [s.n.], 2006

140 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Co-orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

**Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas**

1. Hemoglobina. 2. Tartaruga. 3. Polimerização. 4. Oxigenação - Hemoglobina. 5. Eletroforese. 6. Lactato desidrogenase. I. Bonilla Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Bonini-Domingos, Claudia Regina. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 547.963.4

*Dedico este trabalho:*

*À minha família, meus pais Aparecida M. Mastrolói Ferrarezi e Paulo César Ferrarezi, e minhas irmãs Aline Ferrarezi e Andressa Mastrolói Ferrarezi, por sempre incentivarem os meus estudos. Por todo carinho, compreensão e apoio financeiro que recebi. Agradeço por acreditarem em mim.*

*Ao Elison Cortese Duarte, meu grande amor, pela compreensão, amor, carinho e amizade. Especialmente pelo apoio nos momentos de desânimos e incertezas.*

### *Agradeco:*

*À orientação do Profº Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, que me acolheu e me ensinou o caminho da pesquisa. Por me aconselhar no meu trabalho, pela paciência e pelos conhecimentos que me transmitiu.*

*À Profª Drª Claudia Regina Bonini Domingos, pela valiosa co-orientação neste trabalho. Pelos conhecimentos, apoio e incentivo que me foram dedicados.*

*À Profª Drª Eloiza Tajara, por ceder o seu laboratório, e pela ajuda e orientação de suas alunas Profª Drª Andréia Leopoldino e Msc. Alessandra Vidotto nas análises de eletroforese bidimensional, e pelas várias tentativas que nos fizeram perseverar.*

*À Profª Drª Maria Luisa Schwantes e sua aluna Msc. Flavia Munin, pela orientação nas análises enzimáticas, e pela grande contribuição e carinho.*

*Ao Profº Drº Márcio Colombo pelos conselhos e pelo auxílio na análise de alguns dados.*

*Ao Profº Drº Luis Dino Vizotto pela orientação na escolha da espécie a ser trabalhada, dos locais de coleta, e por toda a sua colaboração, apoio e dedicação.*

*Ao Profº Drº Carlos Roberto Ceron pela orientação no estágio de docência, pelas palavras de incentivo e confiança.*

*Aos Professores Doutores Luiz Henrique Florindo e Fábio Renato Lombardi pela contribuição ao meu trabalho durante a argüição do Exame Geral de Qualificação.*

*Ao Profº Drº Classius de Oliveira (coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal) e a Profª Drª Denise Cerqueira Rossa Feres (ex-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal) pelo incentivo e apoio aos alunos do programa.*

*Aos meus pais, pelo apoio, carinho, compreensão e amor, principalmente nos momentos de dificuldade. Pelas alegrias e momentos felizes que vivemos juntos.*

*Às minhas irmãs pelo carinho, amizade, pelas conversas, fofocas e brincadeiras.*

*Ao meu amor, Elison, que com muita paciência, mesmo sem entender muito sobre o meu trabalho, me aconselhou e me apoiou, sempre levantando o meu astral e me dando muito amor e carinho.*

*Às amigas Débora Noma Okamoto e Patrícia Peres Polizelli, pelas contribuições pertinentes ao meu trabalho, pela grande amizade e companheirismo. Pela grande força e ajuda na conclusão deste trabalho. E pelos almoços e lanches da tarde, recheados de conversas agradáveis, fofocas, incentivos e carinho.*

*À amiga Adriana Granzotto, pela amizade, companheirismo, incentivo e apoio.*

*Aos amigos e companheiros do laboratório de bioquímica que sempre contribuíram de alguma forma, com ensinamentos, brincadeiras, alegrias e amizade: Hamilton Cabral, Luciana Puia Moro, Rejane Yuriço Ouchi, Fernanda Dell Antonio Fachini.*

*À técnica do Laboratório de bioquímica Eliane Ohira, pelo apoio e dedicação em nos ajudar.*

*À Patrícia Caetano de Souza e Fábio Renato Lombardi, por todos conhecimentos que me ensinaram e por me transmitirem a paixão pelas hemoglobinas.*

*À amiga Karina Kazue Okada Thomé (“in memoriam”) pela amizade e pelo companheirismo na luta pelo trabalho pioneiro que iniciamos juntas desbravando o mundo das tartarugas.*

*Ao amigo Carlos Eduardo Saranz Zago, que também participou do desbravamento do mundo das tartarugas. Pelas várias visitas que fizemos juntos ao Criadouro, pelas coletas que fizemos, e por todo o auxílio que me prestou neste trabalho.*

*À amiga Luciana de Souza Ondeí, pela grande amizade e paciência em me escutar, e pelas grandes contribuições ao meu trabalho, por me ensinar a fazer e analisar as eletroforeses. Pelo apoio incondicional nos bons e maus momentos do meu trabalho e da minha vida pessoal.*

*Aos amigos do laboratório de hemoglobinas e genética das doenças hematológicas, pelo carinho, apoio, ensinamentos e amizade: Luciane Moreno Storti de Mello, Maria Viviane Queiroz, Paula Juliana A. Zamaro, Wanessa Cristina de Souza, Ana Rosa Salvador, Ana Carolina Bonini Domingos, Ana Luiza Bonini Domingos, Gislane Lelis Vilela de Oliveira, Thiago Yukio Kikuchi Oliveira, Carlos Fabian Mandiburu, Nelson Cazuoto Tukamoto Junior.*

*Às amigas Sabrina Santos Rochel e Maria Etelvina Pinto, pela amizade, carinho e companheirismo.*

*A todos os companheiros do programa de pós-graduação em Biologia Animal, pelo companheirismo durante as disciplinas, os simpósios e os churrascos.*

*À Capes pelo apoio financeiro.*

*À Deus pela vida e pelo caminho que pude percorrer.*

*“Nossas mentes possuem por natureza um insaciável desejo de saber a verdade.” (Cícero, 106-43 a.C.)*

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”  
(Fernando Sabino)*

## ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos Gerais	02
1.2 Ordem TESTUDINES	02
1.3 <i>Phrynosops geoffroanus</i>	06
1.4 Hemoglobina	09
1.5 Modelos Alostéricos	14
1.6 Transporte de Dióxido de Carbono e Efeito Bohr	16
1.7 Ligação de Oxigênio	17
1.8 Efeitores homotrópicos e heterotrópicos	19
1.9 Efeito dos íons cloretos (Cl <sup>-</sup> )	20
1.10 Efeito dos fosfatos orgânicos	20
1.11 Efeito da atividade da água	22
1.12 Efeito da temperatura	22
1.13 Cisteínas e o fenômeno de agregação	22
1.14 Metabolismo anaeróbico e o papel da L-lactato desidrogenase (LDH)	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Coleta das amostras de sangue	31
3.2 Padrão Eletroforético	31
3.2.1 Hemolisado	31
3.2.2 Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose	32
3.2.3 Eletroforese em pH neutro	33
3.2.4 Transparentização	33
3.2.5 Eletroforese de diferenciação em ágar – Fosfato, pH 6,2	33
3.2.6 Eletroforese por focalização isoelétrica	34
3.2.7 Eletroforese de globinas em pH alcalino	35

3.2.8 Eletroforese de globinas em pH ácido	35
3.2.9 HPCLC (Cromatografia líquida catiônica de alta eficiência)	36
3.3 Purificação das hemoglobinas para os estudos funcionais	36
3.4 Estudos Funcionais	37
3.4.1 Cálculo da concentração de Oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina	37
3.4.2 Análise das propriedades de ligação do oxigênio em várias condições e variados pH (Efeito Bohr)	38
3.4.3 Efeito da temperatura na afinidade de ligação com o oxigênio	42
3.4.4 Titulação com ATP	43
3.5 Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio	44
3.6 Análise das Cisteínas	44
3.6.1 Mobilidade eletroforética	45
3.6.2 Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação	46
3.7 Eletroforese Bidimensional	47
3.8 Determinação de LDH (Lactato desidrogenase)	48
3.8.1 Preparação dos extratos para análise eletroforética e cinética	48
3.8.2 Eletroforese em gel de amido	49
3.8.2.1 Coloração histoquímica	49
3.8.3 Ensaio enzimáticos	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Padrão eletroforético	52
4.1.1 Perfil das hemoglobinas em eletroforese	52
4.1.2 Análises do perfil de hemoglobinas por cromatografia líquida catiônica de alta eficiência (HPCLC)	56
4.2 Purificação	57
4.3 Estudos funcionais	57
4.3.1 Efeito Bohr	57
4.3.2 Efeito da Temperatura	60
4.3.3 Titulação com ATP	64
4.4 Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio	65

4.5	Análise das cisteínas	67
4.5.1	Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação	68
4.5.2	Mobilidade eletroforética	70
4.6	Eletroforese Bidimensional	71
4.7	Determinação da Lactato desidrogenase (LDH)	74
4.7.1	Ensaio enzimático	74
4.7.2	Eletroforese em amido	76
5	DISCUSSÃO	78
5.1	Padrão eletroforético	79
5.1.1	Perfil das hemoglobinas em eletroforese	79
5.1.2	Análises por cromatografia líquida catiônica de alta eficiência (HPCLC)	80
5.2	<i>Estudos funcionais</i>	80
5.2.1	Efeito Bohr	80
5.2.2	Efeito da Temperatura	83
5.2.3	Titulação com ATP	86
5.3	Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio	88
5.4	Análise das cisteínas	88
5.4.1	Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação	88
5.4.2	Mobilidade eletroforética	90
5.5	Eletroforese bidimensional	90
5.6	Determinação da Lactato desidrogenase (LDH)	91
6	CONCLUSÃO	93
6.1	Conclusões específicas	94
6.2	Conclusões gerais	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8	ANEXOS	104
1	Protocolo de géis, tampões e corantes utilizados nas análises eletroforéticas.	105
2	Coeficiente de extinção determinados para a hemoglobina humana.	109
3	Pressão atmosférica corrigida.	111

4 Pressão de vapor.	115
5 Protocolo do gel utilizado na análise de mobilidade eletroforética.	117
6 Protocolo do gel e das soluções da eletroforese bidimensional.	119

## ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 01 – Esquema do plastrão e da carapaça do “cágado de barbicha”, com as ossificações dérmicas.	03
FIGURA 02 – Fotografias das Tartarugas de diferentes habitats.	04
FIGURA 03 – Esquema do Pulmão das tartarugas.	05
FIGURA 04 – Esquema do coração, com dois átrios e um ventrículo parcialmente dividido.	06
FIGURA 05 – Fotografias do plastrão, da carapaça e da cabeça do <i>Phrynops geoffroanus</i> .	08
FIGURA 06 – Fotografias do <i>Phrynops geoffroanus</i> .	08
FIGURA 07 – Esquema representando uma hemoglobina tetramérica.	09
FIGURA 08 – Esquema do grupo heme.	10
FIGURA 09 - Esquema representando a movimentação da hemoglobina na transição do estado T para R.	12
FIGURA 10 – Esquema representando a movimentação do grupo heme após a oxigenação e a influencia sob a molécula.	12
FIGURA 11 - Representação esquemática dos contatos da interface interdimerica ( $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ ) na transição de T para R.	13
FIGURA 12 – Esquema das ligações iônicas entre os resíduos de aminoácidos das cadeias alfa e beta, que estão presente no estado T e são quebradas na transição para o estado R.	13
FIGURA 13 – Modelo seqüencial proposto por Koshland, Nemethy e Filmer (KNF) para a cooperatividade.	14
FIGURA 14 - Modelo alostérico de simetria proposto por Monod, Wyman e Changeux (MWC).	15
FIGURA 15 - Gráfico de Hill.	19

FIGURA 16 – Esquema representando a ligação do 2,3-BPG à cavidade central da hemoglobina.	21
FIGURA 17 – Esquema da via glicolítica e os possíveis caminhos a serem percorridos pelo piruvato.	24
FIGURA 18 – Sistema de eletroforese horizontal utilizando acetato de celulose como suporte.	32
FIGURA 19 – Gráfico da diferença entre as leituras espectrais da forma oxigenada e desoxigenada.	39
FIGURA 20 – Fotografia do tonômetro.	39
FIGURA 21 – Esquema da reação do DTT com uma proteína oxidada.	45
FIGURA 22 – Esquema estrutural da cisteína (Cys) e do DTT (Ditiotreitol).	46
FIGURA 23 – Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (pH 8,5).	53
FIGURA 24 - Eletroforese em acetato de celulose em pH neutro.	53
FIGURA 25 - Eletroforese em agar-fosfato, em pH ácido (pH 6,2).	53
FIGURA 26 – Focalização isoeétrica.	55
FIGURA 27 – Eletroforese de globinas em pH ácido.	55
FIGURA 28 – Eletroforese de globinas em pH ácido feito a partir de bandas recortadas da focalização isoeétrica.	55
FIGURA 29 – Cromatograma da separação de hemoglobinas.	56
FIGURA 30 – Gráfico $\log P_{50}$ versus pH.	59
FIGURA 31 - Gráfico $n_{50}$ versus pH, cooperatividade.	60
FIGURA 32 - Gráfico de Van't Hoff, $\log P_{50}$ versus $1/T$ (K).	62
FIGURA 33 - Gráfico da cooperatividade ( $n_{50}$ ) versus $1/T$ (K).	63
FIGURA 34 - Gráfico do $\log P_{50}$ versus log concentração de ATP (M).	65
FIGURA 35 – Gráfico da oxidação por peróxido de hidrogênio.	67
FIGURA 36 - Absorbância normalizada versus volume de eluição (ml).	69
FIGURA 37 – Mobilidade eletroforética.	70
FIGURA 38 – Gel de eletroforese bidimensional sem corar.	72
FIGURA 39 - Gel de eletroforese bidimensional corado com coomassie.	73

FIGURA 40 - Atividade média dos tecidos na presença de 1mM e 10 mM de substrato (piruvato).	75
FIGURA 41 - Razão A/B entre os tecidos analisados.	76
FIGURA 42 – Eletroforese de LDH em amido.	77

## ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 01- Valores da constante de Henry para algumas temperaturas.	42
QUADRO 02 – Indica a massa molecular e absorbância de algumas proteínas utilizadas para a determinação da existência de polímeros.	46
QUADRO 03 – Relaciona os tecidos coletados do <i>Phrynos geoffroanus</i> .	48
QUADRO 04 – Hemoglobinas separadas por HPCLC.	56
QUADRO 05 – Variação da afinidade por oxigênio em função da temperatura para as hemoglobinas de <i>P. geoffroanus</i> .	61
QUADRO 06 – Parâmetros termodinâmicos da ligação de oxigênio pelas hemoglobinas de <i>P. geoffroanus</i> em diferentes condições experimentais.	62
QUADRO 07 – Siglas usadas no gráfico de atividade da LDH e o seu significado.	74
QUADRO 08 - Atividade média da enzima LDH em 1mM e em 10mM do substrato Piruvato nos vários tecidos analisados.	75

## ABREVIACOES

$\Delta G$	Variacão da Energia Livre de Gibbs
$\Delta H$	Variacão da Entalpia
$\Delta S$	Variacão da Entropia
Å	Angstrm ( $1\text{Å}=10^{-10}\text{m}$ )
Abs	Absorbância
ADA	cido N-(2-acetamida)-iminodiacético
ATP	Adenosina Trifosfato
BPG	2,3 – Bifosfoglicerato
BSA	Soro Albumina Bovina
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DTE	Ditioeritol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	cido Etilenodiaminotetracético
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
Hb A <sub>0</sub>	Hemoglobina humana normal (adulta)
HEPES	cido (2-hidroxietil) Piperazina-N-(2-etano Sulfnico)
HPCLC	Cromatografia Líquida Catiônica de Alta Eficiência
IAA	Iodoacetamida
IEF	Isoeletrofocalizaco ou Focalizaco Isoelétrica
IHP	Inositol Hexafosfato
IPP	Inositol Pentafosfato
KCN	Cianeto de Potássio
KDa	Kilodaltons
LDH	Lactato desidrogenase
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio
n <sub>50</sub> ou n <sub>H</sub>	Coefficiente de Hill (cooperatividade)
NAD	Adenina Nicotinamida
Nm	Nanmetro ( $1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$ )
P <sub>50</sub>	Pressão de oxigênio necessária para saturar metade dos sócios de ligao de oxigênio da hemoglobina
pI	Ponto Isoelétrico
PMS	Fenilmetanosulfonil
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAPs	cido (N-Tris[hidroximetil] metil-3-aminopropanosulfnico)
TCA	cido Tricloroacético
TRIS	TRIS (Hidroximetil)aminometano
U.A.	Unidades de absorbância
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade

# 1 INTRODUÇÃO

---

### ***1.1 Aspectos gerais***

Os primeiros fósseis de quelônios encontrados datam do fim do Período Triássico, na Era Mesozóica. E desde quando surgiram até os dias de hoje, pouco se modificaram. Esses animais combinam características primitivas e altamente especializadas que não são compartilhadas com outros grupos de vertebrados.

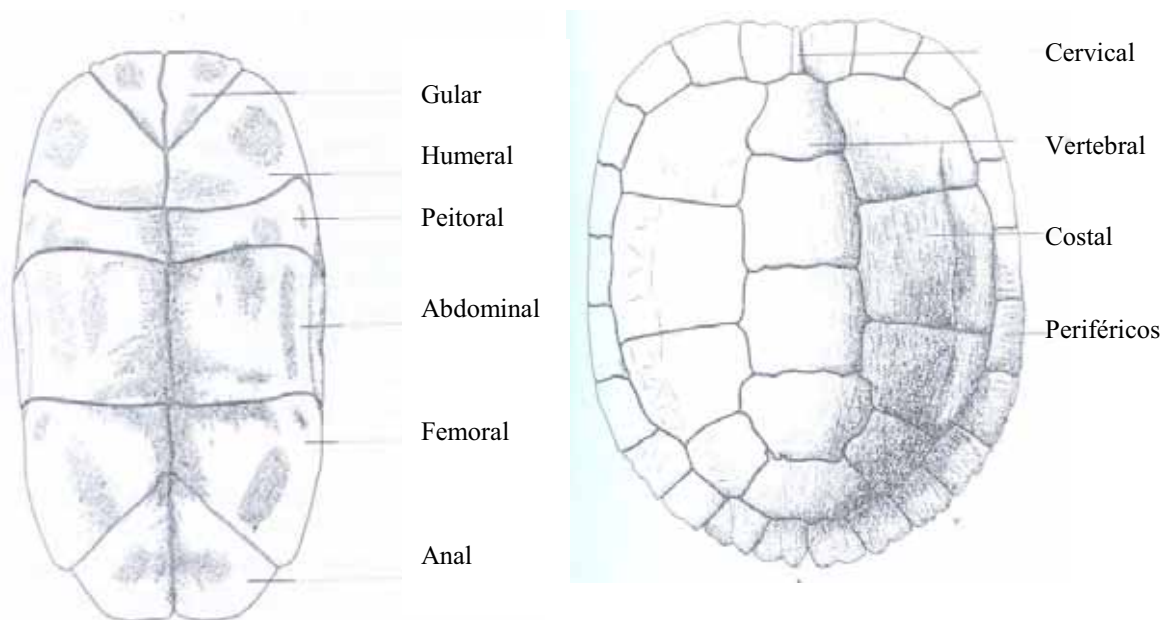
A ordem dos quelônios teve origem entre os amniotas primitivos do Carbonífero superior, sendo evidenciado por uma característica comum entre esses animais: crânio anápsido (“sem um arco”) (POUGH et al., 1999). Atualmente, os quelônios sobreviventes estão classificados na ordem TESTUDINES, na qual se diversificaram no fim do Período Cretáceo, e hoje são 260 espécies divididas em 13 famílias (MEYLAN, 2005).

Os TESTUDINES são subdivididos em duas subordens: os Polycryptodira, na qual está a maioria dos quelônios atuais, que são assim classificados, especialmente pela maneira que a cabeça é encolhida para dentro do casco (jabutis, tartarugas marinhas e algumas tartarugas de água doce), e os Pleurodira, estes animais não encolhem a cabeça para dentro do casco e sim a dobram para o lado (cágados). Os quelônios estão classificados na classe Reptilia, no entanto são considerados animais parafiléticos (ou pararépteis). Embora estejam ligados aos outros répteis por algumas características derivadas compartilhadas, eles não representam uma linhagem monofilética, pois são muito diferentes morfológica, fisiológica e ecologicamente. Além disso, esses animais são tão especializados que nenhum estado intermediário que os ligue a outros vertebrados foi identificado (GAFFNEY; MEYLAN, 1988; POUGH et al., 1999).

### ***1.2 Ordem TESTUDINES***

A característica mais marcante desses animais é o casco que reveste o corpo do animal, formado por carapaça (dorsal) e plastrão (ventral). Possuem vértebras torácicas e costelas soldadas com a carapaça óssea, que é revestida por escudos epidérmicos. Grande parte do plastrão é formado por ossificações dérmicas (Figura 01). A maxila e a mandíbula

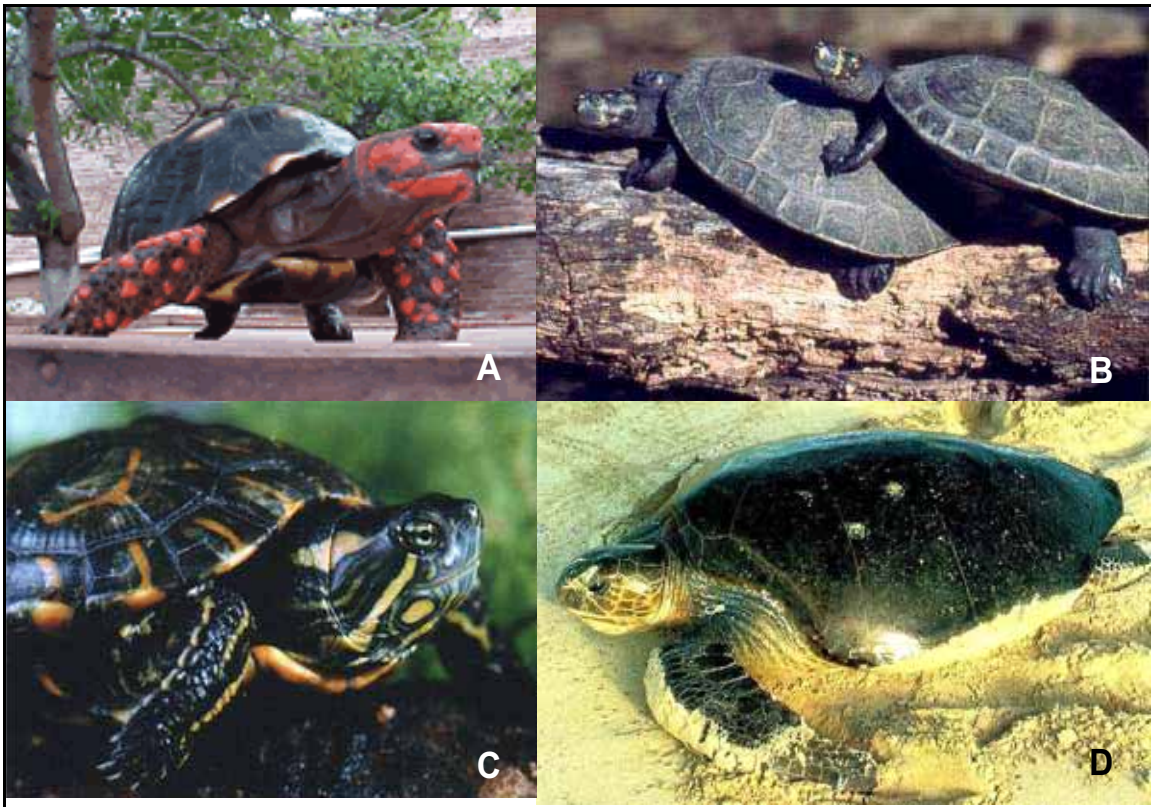
não têm dentes, mas apresentam fortes lâminas cornificadas (POUGH et al., 1999; STORER et al., 2000).



**Figura 01** – Esquema do plastrão e da carapaça, evidenciando as ossificações dérmicas (ASHLEY, 1969).

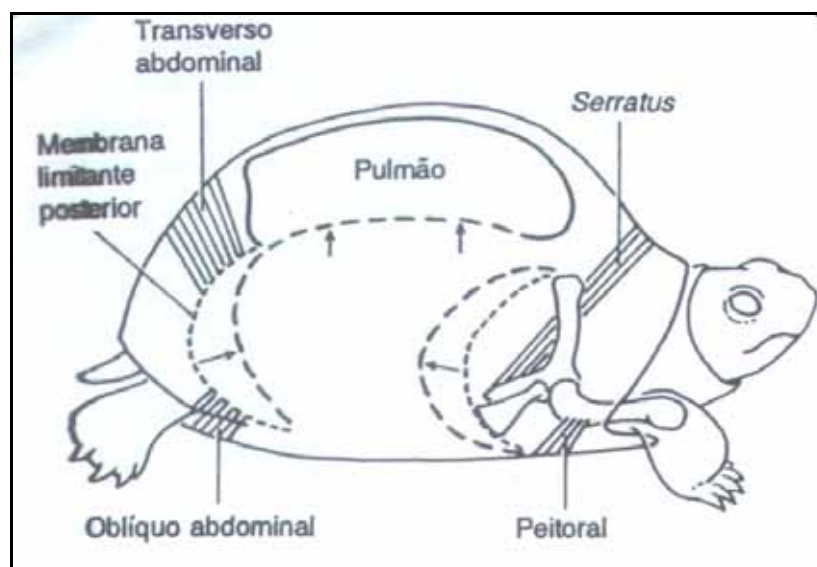
Os quelônios são ectotérmicos, possuem pele escamosa e, em geral, são adaptados para viverem em ambientes secos. Apresentam também outras adaptações importantes como: fecundação interna, órgãos copuladores e a presença de ovos, que são constituídos por uma casca calcária para retardar a perda de umidade. Além de possuírem membranas embrionárias (âmnion, córion, saco vitelínico e alantóide), cuja função é proteger o embrião contra choques mecânicos, fornecer nutrientes e armazenar excretas. Essas características são diferentes das presentes em peixes e anfíbios (ERNEST; BARBOUR, 1989; STORER et al., 2000).

As tartarugas podem ser diferenciadas pelos seus habitats: algumas espécies são exclusivamente terrestres, como os jabutis (*Geochelonia sp*); outras vivem em ambientes fluviais e lacustres como os cágados (*Phrynops sp*) e as tartarugas de água doce (*Trachemys sp*); e existem ainda as espécies que são exclusivamente marinhas (*Caretta caretta*) (Figura 02) (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994).



**Figura 02** – Tartarugas diferenciadas pelo tipo de hábitat. (A) *Geochelone carbonaria*, terrestre ([www.geochelone.com.br](http://www.geochelone.com.br)); (B) *Podocnemys unifilis*, água doce (sub-ordem Pleurodira) ([www.chelonia.org](http://www.chelonia.org)); (C) *Trachemys dorbignyi*, água doce (sub-ordem Polycryptodira) ([www.aw.eti.br/animais/TIGRE.jpg](http://www.aw.eti.br/animais/TIGRE.jpg)); (D) *Chelonia mydas*, marinha ([www.mexconnect.com/](http://www.mexconnect.com/)).

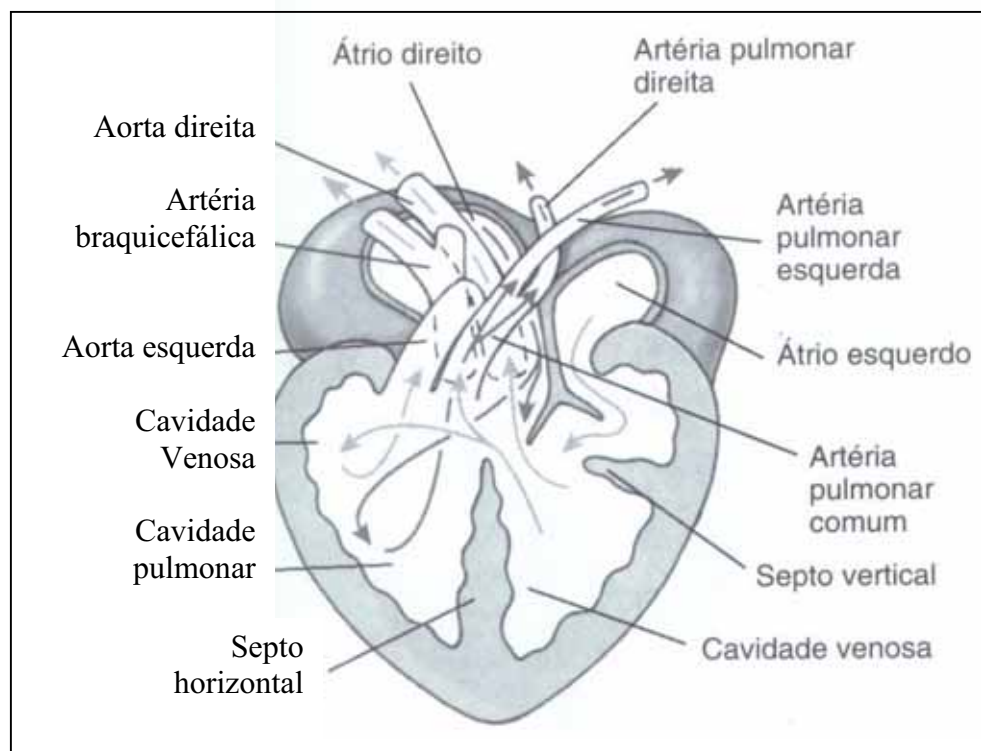
São pulmonados, mas diferentemente dos amniotas primitivos e dos lagartos, eles não movimentam a caixa torácica durante a respiração, devido ao casco rígido. Nestes animais a respiração pulmonar é realizada por meio de mudanças na pressão pulmonar, que ocorrem devido à contração dos músculos que forçam as vísceras, na qual estão ligadas à lâmina diafragmática (Figura 03) (POUGH et al., 1999). Possuem também respiração acessória, como a bucofaringea e, algumas espécies aquáticas, também respiram por meio da cloaca e da pele (JACKSON et al., 2004; STORER et al., 2000).



**Figura 03** – Esquema do Pulmão mostrando os músculos que forçam as vísceras nas mudanças da pressão pulmonar (RANDALL, et al, 2000).

O coração caracteriza-se por possuir três cavidades: dois átrios e um ventrículo (parcialmente dividido) (ERNEST; BARBOUR, 1989). O sistema circulatório é dividido em dois circuitos: sistêmico e pulmonar. O circuito sistêmico transporta sangue oxigenado do coração para todo o corpo, e o circuito pulmonar transporta sangue desoxigenado do coração para os pulmões. Essa morfologia, na qual o ventrículo se apresenta parcialmente dividido, permite a troca de sangue entre os circuitos pulmonar e sistêmico, havendo um desvio da esquerda para direita dentro do coração (POUGH et al., 1999). Quando o animal respira, a resistência ao fluxo através da circulação pulmonar é baixa, e o fluxo sanguíneo é alto. Quando o animal mergulha, ele não respira, então, a resistência vascular pulmonar aumenta, mas a resistência vascular sistêmica diminui, ocorrendo um desvio sanguíneo no

coração, o que diminui o fluxo sanguíneo pulmonar, levando a uma diminuição da frequência dos batimentos cardíacos (Figura 04) (RANDALL, et al., 2000).



**Figura 04** – Esquema do coração, com dois átrios e um ventrículo parcialmente dividido, mostrando a direção do fluxo sanguíneo (RANDALL, et al, 2000).

Alguns desses animais vivem em ambientes aquáticos ou subaquáticos, podendo permanecer submersos por horas, o que nos remete à hipótese de que existam particularidades ou adaptações em suas hemoglobinas, encarregadas de transportar o oxigênio para os diferentes órgãos e tecidos.

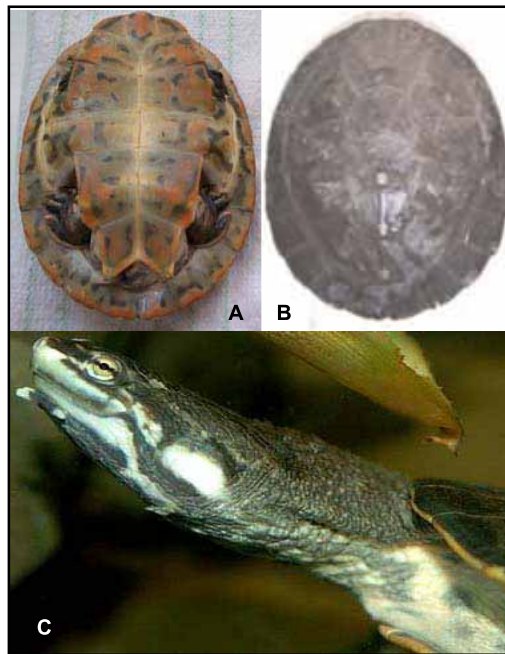
### 1.3 *Phrynops geoffroanus*

A espécie *Phrynops geoffroanus* utilizada neste trabalho possui a seguinte classificação: ordem TESTUDINES, subordem Pleurodira, família Chelidae, subfamília Austrochelidinae e gênero *Phrynops*.

De modo geral, os cágados possuem carapaças baixas, que oferecem pequena resistência ao deslocamento na água, e patas anteriores modificadas em remos que também auxiliam a sua locomoção (POUGH et al. 1999). O *Phrynops geoffroanus* ou “Cágado de Barbicha” (Figura 05 e 06), como é popularmente conhecido, possui carapaça achatada e larga com coloração preta ou cinza esverdeada. O plastrão possui um entalhe anal e tem uma coloração vermelha rosada com manchas irregulares e pretas. A cabeça é larga e lisa, com coloração preta, linhas brancas e irregulares. A parte inferior é branca com linhas e pontos pretos. A característica mais proeminente dessa espécie é uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho. Possui também um par de “barbelas” no “queixo”, e os membros são cinza com manchas brancas. É uma espécie pequena encontrada desde a Colômbia, Venezuela, Guiana, Argentina, Uruguai, extremo sul do Paraguai até sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil. Essa espécie é freqüente em rios, lagos e lagoas com correnteza lenta (ERNEST; BARBOUR, 1989).

A literatura nacional é escassa quando se refere ao perfil hemoglobínico dessa espécie de quelônio, e muito pouco se conhece sobre as hemoglobinas de animais brasileiros e sua relação com os aspectos fisiológicos.

As tartarugas de maneira geral são excelentes mergulhadoras, podendo permanecer longos períodos em baixo d’água; durante longos mergulhos o sangue é desviado para tecidos que possuem tolerância a baixos níveis de oxigênio, como o muscular e o nervoso.



**Figura 05** – *Phrynops geoffroanus*: (A) destaque para a coloração do plastrão e para o entalhe anal (parte inferior do plastrão); (B) destaque para a coloração e o formato da carapaça; (C) em destaque a coloração da cabeça e a presença de barbelas no “queixo” ([www.jjphoto.dk/](http://www.jjphoto.dk/)).

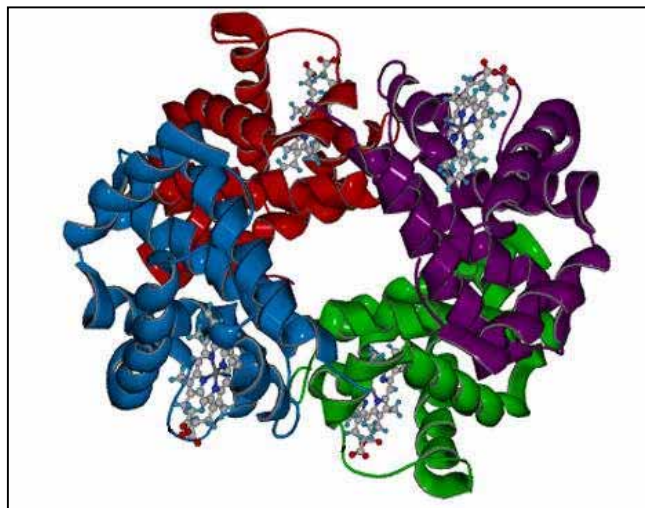


**Figura 06** – *Phrynops geoffroanus*: (A) destaque para a coloração do animal ([www.jjphoto.dk/](http://www.jjphoto.dk/)); (B) destaque para o animal submerso ([www.chelonia.org](http://www.chelonia.org)).

## 1.4 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) está presente nas células vermelhas (hemáceas) do sangue, e é responsável pelo transporte de oxigênio dos órgãos captadores (pulmões ou brânquias) para os demais tecidos, e parte do gás carbônico (15%) no sentido inverso (STRYER, 1992).

Em geral, a hemoglobina de vertebrados, incluindo os répteis (COATES, 1975) é uma proteína tetramérica de massa molecular de aproximadamente 64,5 KD, contendo duas cadeias de globinas de um tipo e duas de outro tipo (geralmente alfa e beta), cada uma delas associada a um grupo prostético, heme, onde o átomo de ferro encontra-se no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Na hemoglobina A humana, cada cadeia de globina alfa contém 141 resíduos de aminoácidos e cada cadeia beta contém 146 resíduos de aminoácidos (Figura 07) (LEHNINGER, 1998).

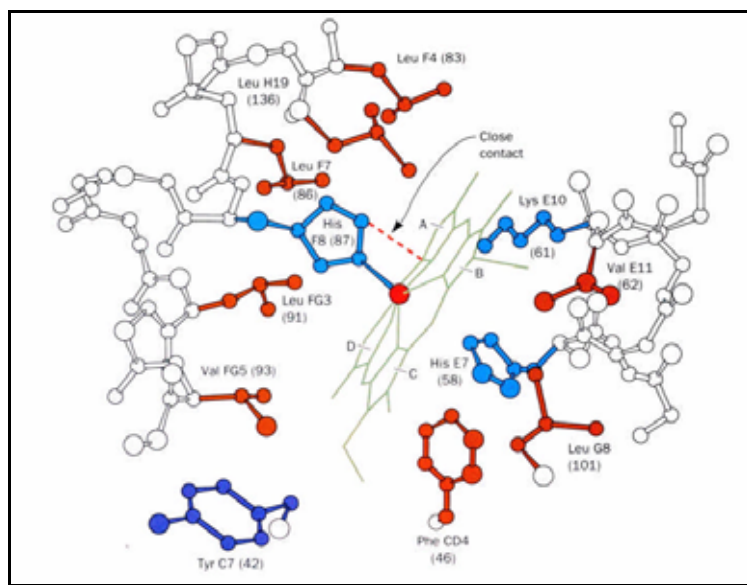


**Figura 07** – Esquema representando uma hemoglobina tetramérica com 2 cadeias do tipo alfa (vermelho e verde) e 2 do tipo beta (azul e roxo), com o grupo heme inserido em cada subunidade ([www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials](http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials)).

Análises por difração de raios X mostraram que a molécula de hemoglobina possui forma globular, com aproximadamente 5,5 nm (ou 55 Å) de diâmetro. As cadeias globínicas enovelam-se em uma estrutura terciária, que reunidas compõem um arranjo tetramérico, formando a estrutura quaternária da molécula (PERUTZ et al., 1960). Esse

arranjo é mantido devido às interações (hidrofóbicas e eletrostáticas) que ocorrem entre os aminoácidos presentes nas cadeias polipeptídicas. As estruturas terciária e quaternária das hemoglobinas, nas diferentes espécies de vertebrados, apresentam muitas semelhanças entre si, quando analisadas por difração de raios X e por análises químicas (LEHNINGER, 1998).

O grupamento heme é constituído por quatro grupos pirrólicos, um átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  coordenado por quatro nitrogênios porfirínicos e um nitrogênio proveniente da Histidina proximal (His F8). A ligação do  $\text{O}_2$  ocorre na cavidade entre o átomo de ferro e a histidina distal (His E7), e o oxigênio forma pontes de hidrogênio entre o Fe e a His (Figura 08) (VOET et al., 2002). Quando o oxigênio está ligado à hemoglobina, diz-se que a molécula está oxigenada, essa reação de ligação é reversível. Então, quando o  $\text{O}_2$  não está ligado, a molécula encontra-se desoxigenada. Sob algumas condições, o  $\text{Fe}^{2+}$  se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ , onde ocorre a ligação de uma molécula de água, formando a meta-hemoglobina. Essa reação é considerada irreversível.



**Figura 08** – Posicionamento do grupo prostético (heme) com o átomo de  $\text{Fe}^{2+}$ , onde se liga o oxigênio (VOET et al., 1995).

Na hemoglobina humana, os hemes estão situados a uma distância de 25 a 37 Å uns dos outros, como não podem interagir eletronicamente, interagem mecanicamente por

movimentos da proteína (STRYER, 1992). Quando a molécula está oxigenada, ocorre uma rotação de aproximadamente  $15^\circ$  de um dos dímeros  $\alpha\beta$  em relação ao outro, aproximando as subunidades  $\beta$  e diminuindo o canal central da hemoglobina (VOET et al., 2002).

A hemoglobina apresenta dois estados conformacionais estáveis: o estado T (tenso) e o estado R (relaxado), com afinidade diferencial em relação ao oxigênio; essa ligação inicia uma série de movimentos que resultam na transição do estado T para o R (Figura 09):

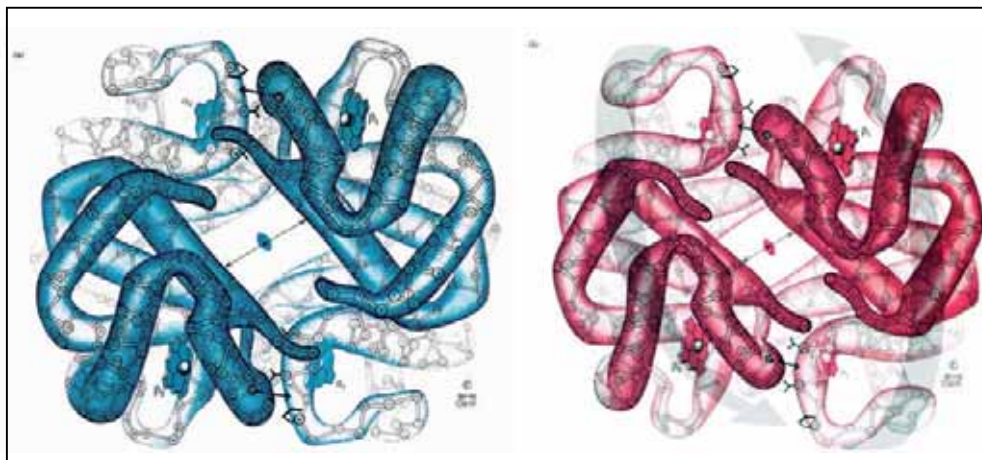
- No estado T, o ferro do anel porfirínico se encontra deslocado  $0,6 \text{ \AA}$  para fora do plano do heme. Quando o  $O_2$  se liga, essa distância se encurta para  $0,1 \text{ \AA}$  e o ferro move-se para o plano do heme. Este movimento diminui a estabilidade da estrutura quaternária desoxigenada, levando a um aumento da afinidade a partir de sucessivas ligações (cooperatividade) (Figura 10) (ACKERS et al., 1992):

- Quando o ferro se desloca carrega junto a histidina proximal (His F8), conseqüentemente a hélice F que está associada a esse aminoácido, desloca-se por  $1 \text{ \AA}$  (Figura 10) (VOET et al, 2002);

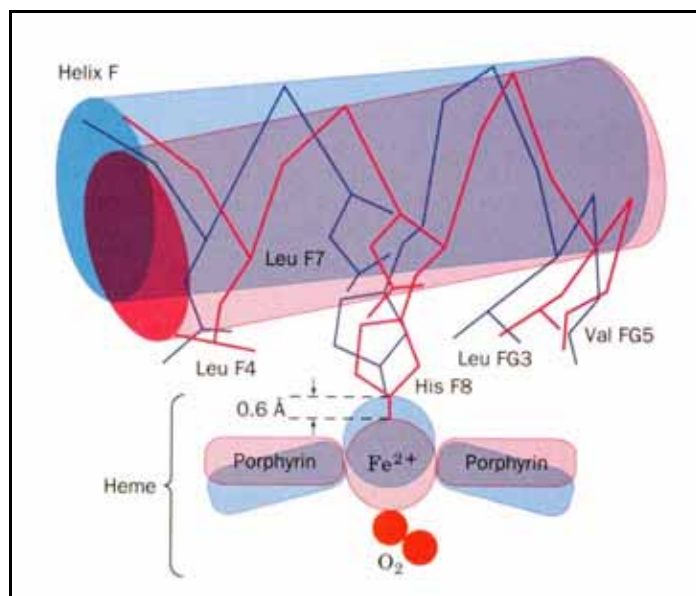
- A maior mudança produzida ocorre na interface interdimérica  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$ . No estado T, a His FG4(97) da cadeia  $\beta$  entra em contato com a Thr C6(41) da cadeia  $\alpha$ . No estado R, a His FG4(97) contacta a Thr C3(38) da cadeia  $\alpha$  (Figura 11) (VOET et al, 2002);

- Uma série de ligações iônicas intra e intersubunidades entre o resíduo C-terminal de cada subunidade (Arg 141 $\alpha$  e His 146 $\beta$ ) estabilizam o estado T. No entanto, após a mudança conformacional causada pela oxigenação, essas ligações são rompidas, não estando presentes no estado R (Figura 12) (VOET et al, 2002).

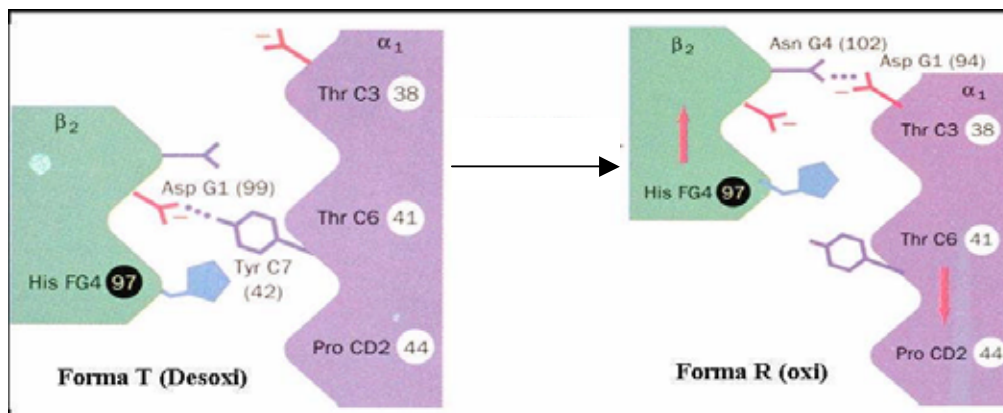
O efeito do estado de ligação ao ligante de um grupo heme sobre a afinidade de ligação ao ligante de outro heme é chamado de cooperatividade (VOET et al, 2002). A hemoglobina com a sua estrutura quaternária torna possível a interação entre os sítios de ligação do grupo heme, e destes com outros ligantes presentes no meio. Essas interações são denominadas de alosteria e são ocasionadas por algumas moléculas específicas, os efetores, que podem ser:  $O_2$ , prótons,  $CO_2$ , cloretos e fosfatos orgânicos (BPG, ATP e GTP) (STRYER, 1992).



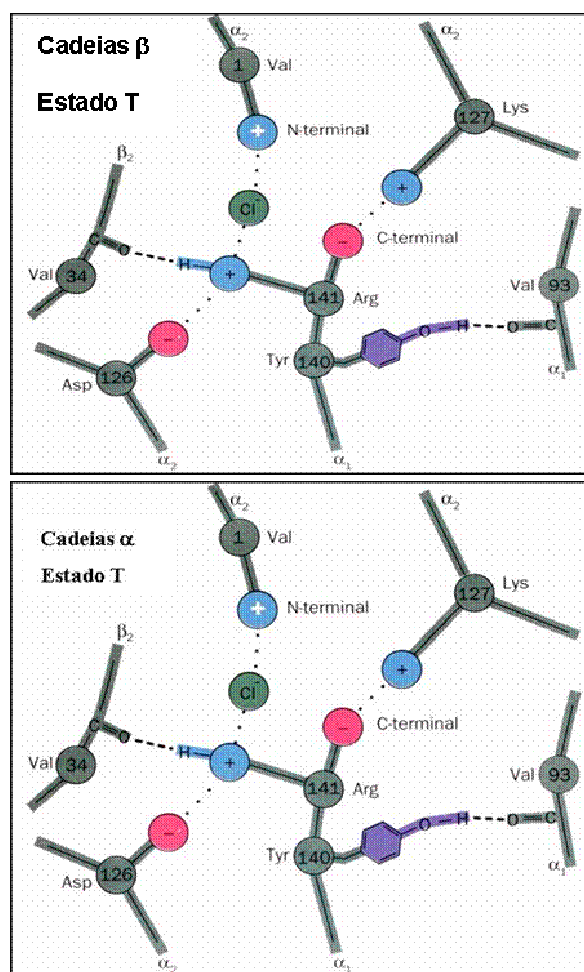
**Figura 09** – Esquema representando a movimentação que ocorre na mudança conformacional do estado T para R; molécula desoxigenada (T - em azul) e molécula oxigenada (R - em vermelho) (VOET et al., 1995).



**Figura 10** – Esquema mostrando a movimentação do grupo heme e da hélice F com a ligação do oxigênio à hemoglobina. A estrutura em vermelho corresponde à forma oxigenada e a em azul a forma desoxigenada. (VOET et al., 1995).



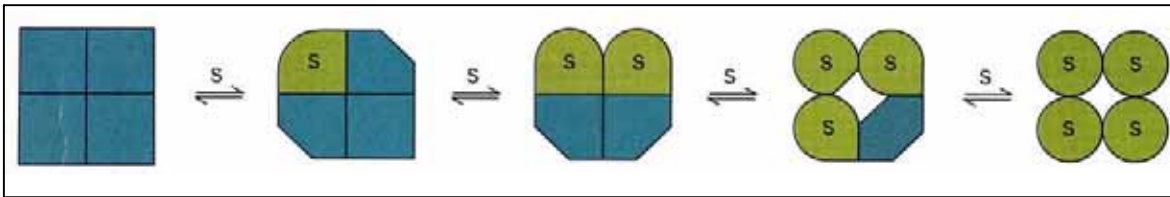
**Figura 11** – Esquema apresentando mudança entre contatos na interface  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$  na transição de T para R após a oxigenação da hemoglobina (VOET et al., 1995).



**Figura 12** – Representação esquemática das ligações iônicas entre os resíduos de aminoácidos da hemoglobina das cadeias alfa e beta, que estão presentes no estado T e são quebradas quando ocorre transição para o estado R (VOET et al., 1995).

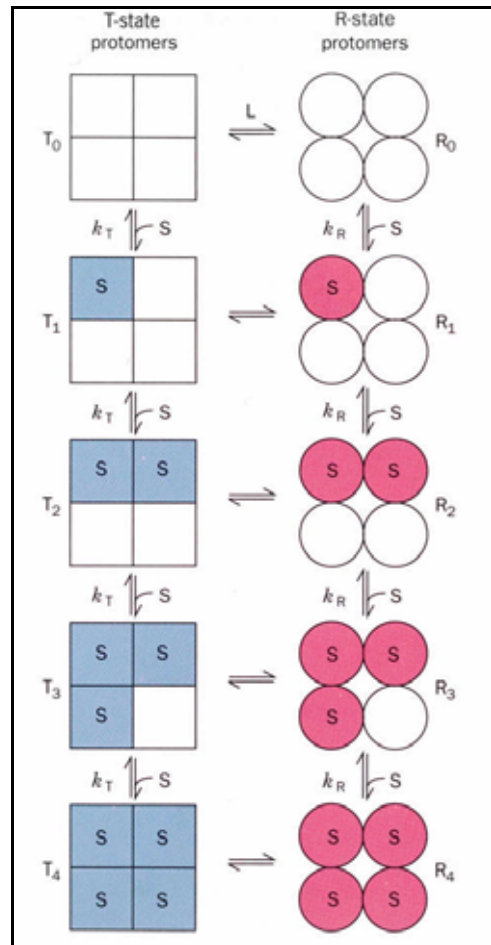
### 1.5 Modelos alostéricos

Dois modelos principais foram propostos para tentar explicar as propriedades funcionais de ligação do  $O_2$  à hemoglobina. Koshland, Nemethy e Filmer (KNF), propuseram o modelo seqüencial de ligação de oxigênio (KOSHLAND et al., 1966). Este modelo propõe que a Hb se encontra em uma determinada conformação no estado desoxigenado. Com a ligação da primeira molécula de  $O_2$  à Hb, a subunidade ligada sofre alteração. Conforme as outras subunidades vão sendo ligadas, também vão sendo alteradas individualmente, promovendo ao final uma mudança estrutural em toda a molécula (Figura 13).



**Figura 13** – Modelo seqüencial proposto por Koshland, Nemethy e Filmer (KNF) para a cooperatividade (VOET et al., 1995).

Um outro modelo, anterior ao de KNF, foi proposto por Monod, Wyman e Changeux (MWC) em 1965. Esses autores consideraram a existência de apenas dois estados conformacionais diferentes para a Hb. Um se encontraria desoxigenado, denominado estado T (tenso), e o outro estaria na forma oxigenada, chamado de estado R (relaxado). Diferente de KNF, este modelo não aceita formas intermediárias em equilíbrio com as formas T e R. Mesmo quando uma molécula de  $O_2$  se liga a um dos sítios heme da Hb, a molécula se mantém em T, até que em determinado momento ocorra a transição de T para R. Isto confere à forma T uma baixa energia se comparada com a energia da forma R. Após a ocupação de todos os sítios, a soma das energias de ligação desfavoráveis torna-se energeticamente favorável (Figura 14) (MONOD et al, 1965).



**Figura 14** – Modelo alostérico de simetria proposto por Monod, Wyman e Changeux (MWC) (VOET et al., 1995).

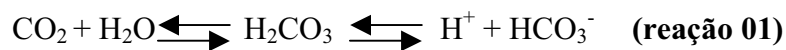
Apesar deste modelo ser o mais aceito atualmente pela comunidade científica, ele se mostra insuficiente para explicar alguns achados recentes. Colombo; Seixas (1999) demonstraram a existência de um estado intermediário entre T e R, observado na desoxi-hemoglobina humana, na qual o equilíbrio alostérico ocorre devido à ligação de cloreto. O estado  $T_x$  é usado para representar a desoxi-hemoglobina complexada com cloreto e o estado  $T_0$ , representa o estado T na ausência do efetor (GIARDINA et al., 2004; JENSEN, 2004).

### 1.6 Transporte de Dióxido de Carbono e Efeito Bohr

As mudanças conformacionais que ocorrem na molécula de Hb com a ligação do oxigênio reduzem os pKs de vários grupos (principalmente o amino-terminal alfa e o carboxi-terminal beta). Essa variação de pH altera a afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub>, isto é, um aumento na concentração de prótons reduz o pH sanguíneo, causando uma redução na afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub>. Quando o pH aumenta ocorre a remoção de prótons da molécula, aumentando a afinidade pelo O<sub>2</sub> em pressões mais baixas. Esse fenômeno, a influência do pH e do CO<sub>2</sub> na ligação do O<sub>2</sub> à Hb, é conhecido como efeito Bohr (JENSEN, 2004; VOET et al, 2002). Em pH ácido a Hb libera O<sub>2</sub> aumenta, pois a diminuição do pH causa uma redução na afinidade de ligação pelo oxigênio. Esse fenômeno é conhecido como Efeito Bohr alcalino ou normal. Quando ocorre um aumento da afinidade da Hb pelo O<sub>2</sub>, em pH ácido, o efeito Bohr passa a ser chamado de ácido ou reverso. O efeito Bohr é importante para a liberação do O<sub>2</sub> da Hb para os tecidos (VOET et al, 2002).

Alguns resíduos de aminoácidos estão envolvidos no efeito Bohr: N-terminal da cadeia α, as cadeias laterais dos resíduos His 122 α e His 146 β (PERUTZ et al., 1980; JENSEN, 2004).

Em tecidos ativos, a diminuição do pH é ocasionada pela elevação da pCO<sub>2</sub> e pelo aumento da concentração de ácido láctico. O CO<sub>2</sub>, dentro das hemácias, reage rapidamente com a água para formar ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) pela ação da anidrase carbônica (reação 01):



O ácido carbônico é instável, pois o seu pKa é 6,35 e o pH do sangue é 7,4. Desse modo, o ácido forma bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e libera H<sup>+</sup>. A maioria do gás carbônico é transportado pelo sangue em forma de bicarbonato dissolvido no plasma (85%) e o restante é transportado pela hemoglobina na forma de carbamato (15%) (reação 02) (CAMPBELL, 2000). Quando o CO<sub>2</sub> entra no sangue em nível tecidual, ele facilita a descarga de O<sub>2</sub> da hemoglobina, e quando deixa o sangue nos pulmões, facilita a captação de O<sub>2</sub> pelo sangue (RANDALL et al., 2000; STRYER, 1992).



### 1.7 Ligação de Oxigênio

Archibald Hill em 1910 foi o primeiro a analisar a curva de oxigenação da hemoglobina, e considerou que a ligação do  $O_2$  à Hb fosse representada pela seguinte equação (HONDA, 2001; LOMBARDI, 2005; PERES, 2004; VOET et al, 2002):



Onde n representa o grau de cooperatividade;

$$K = \frac{[Hb][O_2]^n}{[Hb(O_2)_n]} \quad (2)$$

Onde K é a constante de dissociação da oxi-hemoglobina; [Hb] é a concentração da hemoglobina desoxigenada;  $[O_2]$  é a concentração do oxigênio e  $[Hb(O_2)_n]$  é a concentração da hemoglobina totalmente oxigenada;

A saturação fracional de oxigênio (Y) é definida como a fração ocupada de todos os sítios heme de ligação. O valor de Y varia de 0 (todos os sítios vazios) a 1 (todos os sítios ocupados):

$$Y = \frac{n[Hb(O_2)_n]}{n([Hb] + [Hb(O_2)_n])} \quad (3)$$

Combinando as equações 2 e 3:

$$Y = \frac{\frac{[Hb][O_2]^n}{K}}{\frac{[Hb][O_2]^n}{K} + [Hb]} = \frac{\frac{[O_2]^n}{K}}{\frac{[O_2]^n}{K} + 1} \quad (4)$$

Equação de Hill:

$$Y = \frac{[O_2]^n}{[O_2]^n + K} \quad (5)$$

É conveniente expressar a concentração do  $O_2$  em  $pO_2$ , que é a pressão parcial de oxigênio em mmHg ou Torr:

$$Y = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} \quad (6)$$

Para expressar a fração de oxi-Hb (Y) sobre a fração de desoxi-Hb (1-Y):

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K} \cdot \frac{1}{1 - \frac{[pO_2]^n}{[pO_2]^n + K}} \quad (7)$$

Obtendo o logaritmo da equação 7:

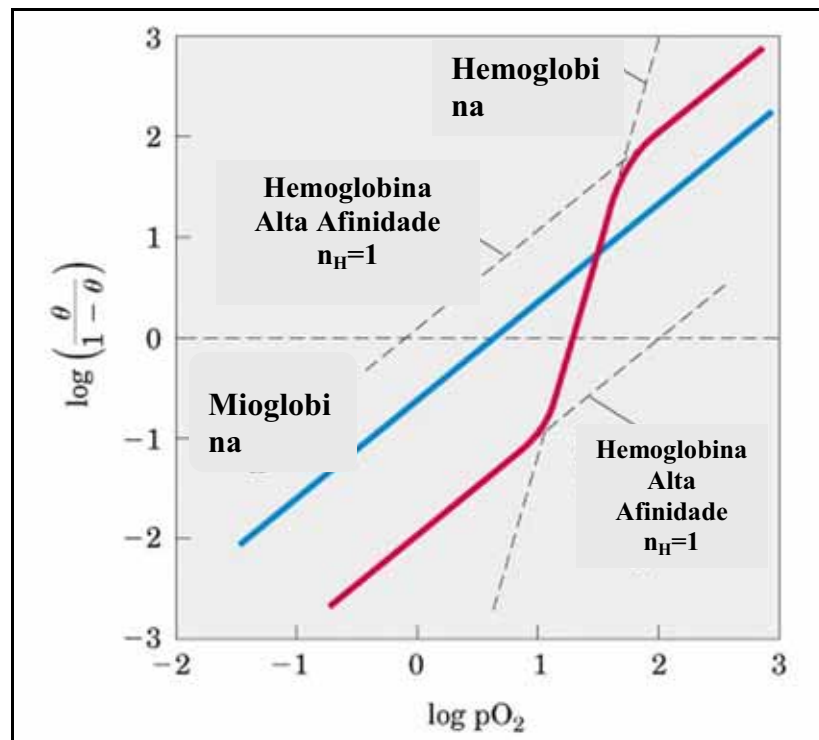
$$\log \left[ \frac{Y}{1-Y} \right] = n \log [pO_2] - n \log K \quad (8)$$

Como para a hemoglobina  $K = P_{50}$ , substituindo na equação 8:

$$\log \left[ \frac{Y}{1-Y} \right] = n \log [pO_2] - n \log P_{50} \quad (9)$$

O gráfico de Hill é obtido pelo  $\log (Y/1-Y)$  versus  $\log pO_2$ , onde a curva de oxigenação da hemoglobina é sigmóide. Essa característica permite que o sangue transfira mais oxigênio para os tecidos do que transferiria se a curva fosse hiperbólica. Esse tipo de curva também indica que existe uma interação cooperativa entre os sítios de ligação da proteína, que pode ser medida pela inclinação  $n$  da curva. O gráfico também permite calcular o  $\log P_{50}$ , que é a pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) necessária para saturar metade

dos sítios de ligação da molécula de Hb. Esse valor é obtido quando a curva de oxigenação intercepta metade da oxigenação ( $Y=0,5$ ), neste ponto, uma reta é extrapolada para o eixo x ( $\log pO_2$ ) (Figura 15). Como podemos observar o gráfico de Hill da mioglobina é linear e apresenta uma inclinação de  $n=1$ , o que indica que ela não apresenta processo cooperativo. A inclinação observada para moléculas com processo cooperativo é de  $n>1$ , essa medida é chamada de coeficiente de Hill ( $n_H$  ou  $n_{50}$ ). Em hemoglobinas humanas normais, essa constante varia de 2,8 a 3,0, mostrando uma alta cooperatividade, mas este número pode variar em Hb anormais e entre Hb de animais de espécies diferentes (LOMBARDI, 2005; VOET et al., 2002).



**Figura 15** – Gráfico de Hill, mostrando  $pO_2$ ,  $Y$  e valores de  $n_{50}$  para mioglobina e hemoglobina (courses.cm.utexas.edu/).

### 1.8 Efeitos homotrópicos e heterotrópicos

O efeito da ligação do oxigênio à Hb pode ser chamado de efeito homotrópico, pois a ligação de uma molécula de oxigênio pode influenciar a ligação de outra molécula do

mesmo gás de modo a facilitar a sua ligação. O efeito heterotrópico é outro tipo de interação encontrado. Essa interação é causada por vários tipos de moléculas: prótons ( $H^+$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), íons cloreto ( $Cl^-$ ), fosfatos orgânicos (BPG, IPP, GTP, ATP), bicarbonato e água. Esses efetores ajudam a modular a função da molécula de Hb e se ligam a ela em sítios diferentes dos sítios de ligação do  $O_2$ . Ligam-se preferencialmente ao estado T da hemoglobina, auxiliando na estabilidade desta forma. Em alguns casos, esses reguladores podem se ligar à forma R, como acontece no efeito Bohr ácido ou reverso. O efeito dos prótons, dióxido de carbono e bicarbonato já foram citados anteriormente. Em seguida, outros reguladores serão discutidos.

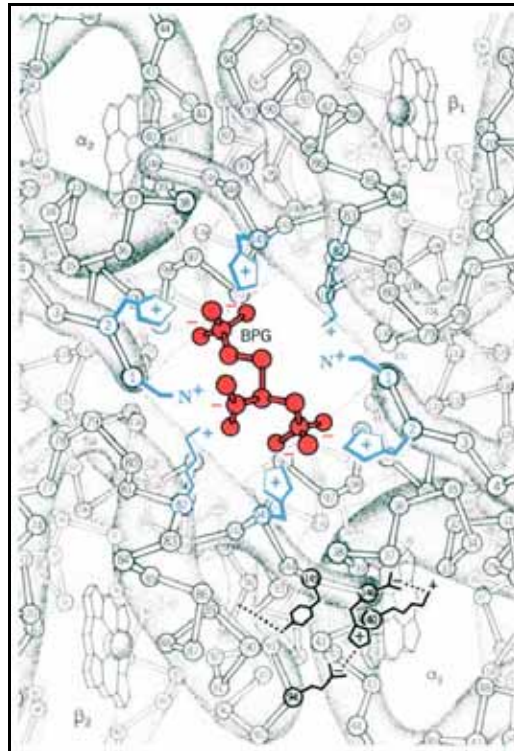
### ***1.9 Efeito dos íons cloreto ( $Cl^-$ )***

O íon cloreto é um efetor alostérico que contribui para a regulação da afinidade da Hb pelo  $O_2$ , ligando-se à forma T. Na presença deste íon a afinidade diminui, e esta regulação ocorre por meio de interações eletrostáticas. Perutz et al (1994) propuseram que a ação do cloreto é neutralizar o excesso de cargas positivas da cavidade central da desoxi-hemoglobina. Na ausência do íon, pode ocorrer um desequilíbrio da forma T, pois o excesso de cargas positivas leva à repulsão eletrostática desestabilizando o estado T. É um ligante não específico, pode-se ligar na superfície externa da molécula (COLOMBO; Seixas, 1999).

### ***1.10 Efeito dos fosfatos orgânicos***

Em 1921, Joseph Barcroft percebeu que a Hb pura tem uma afinidade muito maior do que a Hb no sangue total, e se questionou sobre uma possível substância presente no sangue que poderia levar a isso. Esse composto é o D-2,3-bifosfoglicerato (BPG), que se liga fortemente à desoxi-hemoglobina humana. A presença do BPG nos eritrócitos de mamíferos reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, pois a mantém na conformação desoxigenada. Ele se liga à cavidade central formada neste estado, onde estão expostos as cadeias laterais da His 2 e 143, Lys 82 e os grupos amino-terminais, todos das cadeias beta

(Figura 16). Esses resíduos criam uma região carregada positivamente, adequada à ligação de ânions (cloretos e fosfatos) (ACKERS et al., 1992; VOET et al, 2002).



**Figura 16** – Esquema representando a ligação do BPG à cavidade central da Hb humana (VOET et al., 1995).

O BPG estabiliza a Hb no estado T, e quando ocorre a oxigenação, é expulso pois ocorre uma diminuição da cavidade e a exposição das cargas negativas dos resíduos C-terminal promovem repulsão eletrostática (VOET et al., 2002).

Em outros vertebrados, diferentes fosfatos orgânicos exercem o mesmo efeito. Em répteis, o ATP é um dos principais fosfatos orgânicos que exerce essa função. Outros tipos de fosfatos participam da regulação da oxigenação em alguns vertebrados em geral: IPP e BPG (COATES, 1975).

### ***1.11 Efeito da Atividade da água***

O efeito da atividade da água em uma proteína contribui para a estabilização da sua estrutura nativa. Durante a transição T→R várias interações intersubunidades são quebradas e áreas da molécula de Hb antes escondidas são expostas ao solvente. Essa mudança implica numa diferença de superfície protéica exposta ao solvente entre esses tipos conformacionais, o que leva a uma diferença de hidratação, isto é, uma diferença no número de moléculas de água que se ligam a forma oxigenada e desoxigenada da Hb. (PERES, 2004). Esta relação pode ser medida por meio da dependência da afinidade da Hb pelo oxigênio com a variação da atividade de água, esse método é conhecido como estresse osmótico (COLOMBO et al., 1992; PARSEGIAN et al., 1986).

### ***1.12 Efeito da temperatura***

A variação da temperatura também causa mudanças na afinidade da Hb pelo O<sub>2</sub>, principalmente, em animais ectotérmicos como anfíbios, peixes e répteis, que estão sujeitos à variação da temperatura ambiental. O aumento da temperatura, geralmente, leva a uma diminuição da afinidade por O<sub>2</sub> e à liberação do gás nos tecidos. O efeito da temperatura tem sido investigado pela determinação da entalpia de oxigenação ( $\Delta H$ ) (HONDA, 2001).

As tartarugas marinhas e de água doce desenvolveram um mecanismo particular para a manutenção de oxigênio para os tecidos, quando estão submersos e, especialmente, sob condições de hipóxia (GIARDINA et al., 1992). Esse mecanismo pode ser influenciado pelas condições ambientais (principalmente temperatura) em vertebrados ectotérmicos.

### ***1.13 Cisteínas e o fenômeno de agregação***

Muitos grupos de vertebrados (elasmobrânquios, anfíbios e répteis) possuem hemoglobinas que sofrem polimerização sob condições oxidantes. Essas moléculas contêm grupos SH livres na superfície que formam ligações dissulfeto intermolecular, formando,

então, um agregado de tetrâmeros, que normalmente se iniciam após a hemólise das células vermelhas (FYHN; SULLIVAN, 1975).

O posicionamento das cisteínas também influencia a formação de agregados, se estão posicionadas na superfície externa da molécula podem formar pontes dissulfeto, mas se estão na superfície interna essas ligações não ocorrem. Existe a indicação para uma possível explicação biológica para este fato, as Hbs ricas em grupos SH são normalmente observadas em animais que possuem resistência à hipóxia, como as tartarugas aquáticas, crocodilos e algumas espécies de anfíbios. Propõe-se que estes polímeros, em associação com a resistência à hipóxia, sejam uma estratégia adaptativa de proteção ao oxigênio reativo, pois sob condições oxidantes ocorre um aumento na formação destes (REISCHL, 1989).

#### ***1.14 Metabolismo anaeróbico e o papel da L-lactato desidrogenase (LDH)***

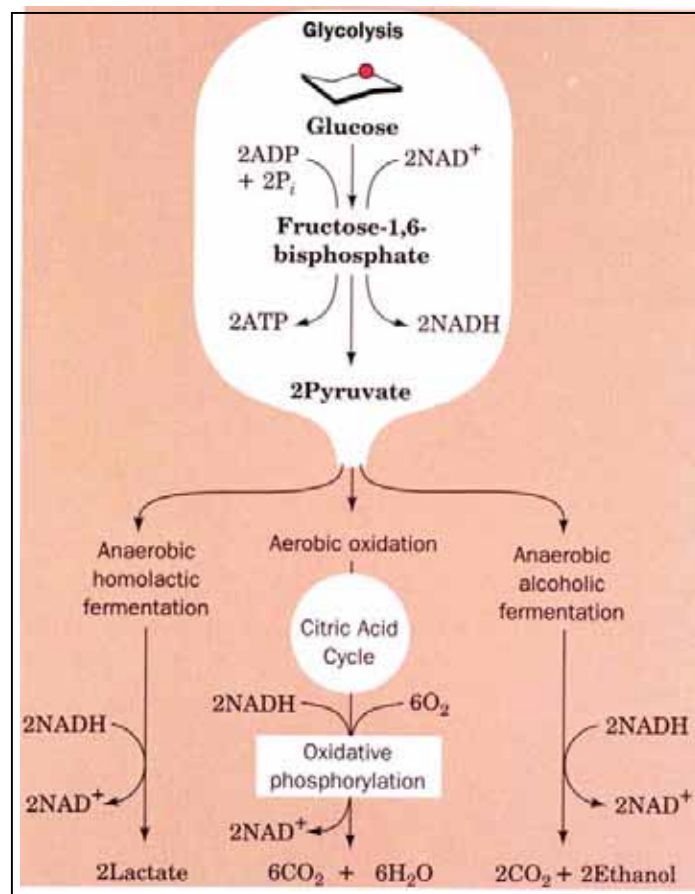
A L-lactato desidrogenase (LDH, EC1.1.1.27) é a enzima responsável pela transformação do piruvato, produto da degradação da glicose pela via glicolítica, em lactato usando  $\text{NAD}^+$  (adenina nicotinamida) como coenzima. A produção desse composto ocorre durante a contração muscular sobre grande esforço ou quando o animal (tartarugas aquáticas) se encontra em condições de hipóxia e anoxia. É uma enzima tetramérica composta pela combinação de subunidades A e B:  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_3\text{B}$ ,  $\text{A}_2\text{B}_2$ ,  $\text{AB}_3$  e  $\text{B}_4$ . Os tetrâmeros  $\text{A}_4$  (ou  $\text{M}_4$ ) e  $\text{B}_4$  (ou  $\text{H}_4$ ) são encontrados em diferentes tipos de tecidos e desempenham diferentes funções, constituindo isoenzimas.

Em vertebrados, as subunidades de LDH são codificadas por dois loci gênicos alelos. O locus LDH-A, codifica a subunidade A e é predominante em músculos brancos (tecido esquelético, por exemplo, o peitoral); o locus LDH-B, codifica a isoenzima B, é predominante em tecidos aeróbicos, como o coração e o cérebro. Mamíferos, pássaros e alguns grupos de peixes possuem um terceiro locus, o LDH-C, que é freqüente em espermatozóitos primários, olhos e cérebro (COPPEs et al., 1987).

A LDH tipo A direciona o piruvato, resultado da degradação da glicose, para o metabolismo anaeróbico, tendo como função principal a redução do piruvato a lactato pelo

NADH, reconstituindo o  $\text{NAD}^+$ . A LDH-B tem como função, o direcionamento do piruvato para o ciclo do ácido cítrico, no qual o lactato é convertido em piruvato por reação da LDH, utilizando o  $\text{NAD}^+$  que é reduzido a NADH (VOET et al, 2002; SHOEI-LUNG LI, 1998).

Quando a LDH produz o lactato e direciona para o metabolismo anaeróbico, o transporte é feito pelo sangue até o fígado, onde o piruvato é regenerado e entra na via da gliconeogênese, onde será convertido em glicose, na qual produzirá ATP anaeróbico. Quando o piruvato é direcionado para o metabolismo aeróbico, ele é convertido em Acetil-CoA e entra no ciclo do ácido cítrico (Figura 17).



**Figura 17** - Esquema da via glicolítica e os possíveis caminhos que o piruvato pode percorrer: dois tipos de glicólise anaeróbica e o ciclo do ácido cítrico (VOET et al., 1995).

Alguns grupos de peixes (por exemplo, ciclídeos da Amazônia) dispõem de estratégias para sobreviverem a um ambiente com baixa concentração de oxigênio. Além

das adaptações fisiológicas, comportamentais e anatômicas, eles combinam a essas características outros tipos de adaptações: a supressão metabólica e ativação do metabolismo anaeróbico. E algumas espécies desse grupo possuem a capacidade de regular as isoformas de LDH (A e B) durante a exposição à hipóxia (CHIPPARI-GOMES et al., 2005).

As aves apresentam altas concentrações de enzimas aeróbicas, especialmente nos músculos responsáveis pela movimentação do vôo. Estudos realizados por Burness et al. (2005), verificaram uma alta capacidade aeróbica em algumas espécies de aves marinhas (*Sterna hirundo*, *Stema fuscata* e *Anous stolidus*).

A princípio acreditava-se que os mamíferos mergulhadores apresentavam metabolismo anaeróbico. No entanto, Castellini et al. (1981), mostraram que as enzimas anaeróbicas dos mamíferos mergulhadores não apresentavam elevada atividade quando comparadas com os mamíferos terrestres. Desse modo, esses animais quando mergulham, estocam oxigênio nos pulmões, no sangue e nos músculos (alta concentração de mioglobina) para a manutenção do metabolismo aeróbico. Contatou-se a presença de atividade de LDH, podendo ocorrer a produção de ATP anaeróbico se necessário, mas acredita-se que a principal função da LDH nestes animais é a conversão do lactato em piruvato, havendo uma grande concentração de LDH tipo B (FUSON et al., 2003; CASTELLINI et al., 1981).

Alguns mecanismos, em vertebrados, compensam a ausência temporária do oxigênio molecular, aumentando a capacidade de geração de ATP anaeróbico. Três características adaptativas dão suporte ao trabalho anaeróbico muscular: (1) um alto potencial glicolítico originado pela alta concentração de enzimas glicolíticas; (2) a presença de isoenzimas musculares específicas afinadas para o direcionamento da função glicolítica; (3) tolerância ao alto acúmulo de lactato (HOCHACHKA; SOMERO, 1973).

Segundo Jackson (1968), o mergulho das tartarugas é dividido em três fases metabólicas (HOCHACHKA; SOMERO, 1973):

- 1ª Fase, durante os primeiros 30 min. A taxa metabólica se mantém constante e a disponibilidade do oxigênio no pulmão cai rapidamente;
- 2ª Fase, duração de 30 min. A taxa metabólica é 40% menor que a inicial e as reservas de oxigênio estão esgotadas;

- 3ª Fase pode durar várias horas ou dias. O animal está em anóxia, e as funções vitais são sustentadas por metabolismo anaeróbico, e se mantém constante em 20% em relação ao metabolismo inicial, nestas condições o animal está em repouso.

Esses animais parecem ser insensíveis à toxicidade ocasionada pelo acúmulo de certas substâncias no organismo, ocorrendo um bloqueio do metabolismo oxidativo, mas não afetando a glicólise anaeróbica. Em tecidos típicos para a função aeróbica (como o coração), onde a capacidade glicolítica é alta, a diferença cinética entre LDH-B<sub>4</sub> e LDH-A<sub>4</sub> inexistente. Nestes casos, a LDH-B<sub>4</sub> não apresenta a usual sensibilidade ao substrato, não sendo inibida quando o piruvato (substrato) se encontra em altas concentrações. Em hipóxia ou anóxia ocorre a regulação da razão do potencial metabólico anaeróbico/aeróbico (HOCHACHKA; SOMERO, 1973).

A análise de algumas enzimas metabólicas e a diversidade estrutural e funcional das hemoglobinas reflete a extraordinária variação da morfologia e adaptação dos integrantes do reino animal. Uma grande variedade de isoformas de hemoglobinas ocorre em vertebrados, e esta diversidade pode representar uma adaptação capaz de lidar com um meio ambiente variável.

Este trabalho tem como enfoque a análise estrutural e funcional das hemoglobinas de *Phrynos geoffroanus*, na tentativa de explicar a capacidade de resistência às condições hipóxicas e anóxicas, bem como outras particularidades que auxiliem o animal à sobrevivência.

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por motivação efetuar a análise das hemoglobinas do “cágado-de-barbicha”, *P. geoffroanus*, realizando uma caracterização inédita na literatura e que contribuirá com os estudos de hemoglobinas de quelônios. Na medida em que a espécie estudada é capaz de permanecer por longos períodos submersa, quisemos observar as propriedades de transporte de oxigênio de suas hemoglobinas, e o controle alostérico exercido sobre elas.

Para isso, traçamos o perfil das isoformas de hemoglobinas em amostras de sangue de *Phrynos geoffroanus* por procedimentos eletroforéticos em diferentes sistemas, efetuamos a caracterização funcional em relação às propriedades de transporte de oxigênio, fizemos análises da agregação ocasionada pela oxidação de cisteínas livres e também efetuamos análise enzimática de LDH em tecidos musculares.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecemos o padrão de migração das hemoglobinas por eletroforese em pH alcalino e pH neutro em acetato de celulose; pH ácido em ágar fosfato, focalização isoelétrica e HPCLC;
- Obtemos o padrão eletroforético de cadeias globínicas em pH alcalino e ácido;
- Para os estudos funcionais: fizemos a purificação parcial das frações de hemoglobina presentes;
- Caracterizamos as propriedades de transporte de oxigênio e controle alostérico das hemoglobinas (utilizando amostras parcialmente purificadas);
- Determinamos a estabilidade estrutural das hemoglobinas;

- Analisamos a existência de agregação de tetrâmeros por meio de eletroforese nativa e filtração em gel;
- Medimos a formação de meta-hemoglobina;
- Realizamos análises das isoenzimas de LDH em tecidos musculares do *Phrynos geoffroanus*;
- Observação: outros procedimentos que pretendíamos executar, como a determinação da constante de associação dímero-tetrâmero e a análise das alterações conformacionais por estresse osmótico, não foram realizadas em virtude da existência de agregação de tetrâmeros que será descrito em “Resultados”.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### ***3.1 Coleta das amostras de sangue***

Foi feita a análise de 22 exemplares da espécie *Phrynops geoffroanus*, separados por sexo, sendo 12 machos e 10 fêmeas, pesando entre 1 e 4 Kg, todos provenientes do criadouro Japurá localizado em Tabapuã –SP.

Antes da coleta do material todos os animais foram higienizados com álcool 70% na junção entre as placas humeral e peitoral, onde fizemos um pequeno orifício com o auxílio de uma agulha de seringa 40x1,2. Posteriormente, com uma seringa, fizemos punção cardíaca (BRITES, 2002). As amostras de sangue (3 a 5 mL) foram acondicionadas em tubos contendo heparina (5000 U.I) como anticoagulante, e mantidas sob refrigeração até sua utilização. Uma parte das amostras foi destinada para análise eletroforética e o restante foi parcialmente purificado e acondicionado em nitrogênio líquido.

### **3.2 Padrão Eletroforético**

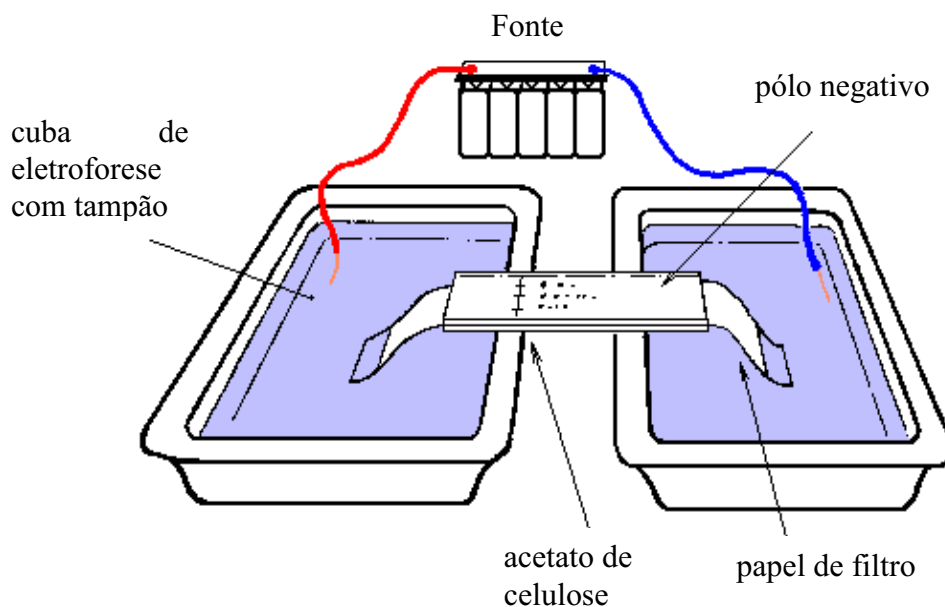
#### *3.2.1 Hemolisado*

Os eritrócitos foram lavados por centrifugação a 2000 xg com solução fisiológica a 0,86% durante 5 min por 4 vezes. Ao volume de células lavadas acrescentou-se o mesmo volume de água deionizada, agitou-se vigorosamente e depois se adicionou o mesmo volume de clorofórmio para a obtenção do hemolisado. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo devidamente identificado e destinado à realização de vários experimentos eletroforéticos.

Quando o hemolisado era destinado à purificação para estudos funcionais, o hemolisado era feito da seguinte maneira: a lavagem das hemácias foi feita com solução fisiológica a 0,86%, em abundância, por centrifugação a 4000 xg e 4°C. A hemólise foi realizada com tampão Tris-HCL 10 mM pH 7,9, sendo os debris removidos por centrifugação a 8500 xg durante 40 minutos e posterior filtração em filtro Millipore.

### 3.2.2 Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (MARENGO-ROWE, 1965)

As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão Tris – EDTA – Borato<sup>1</sup>, pH 8,5 por 15 minutos, e depois foram secas entre folhas de papel absorvente e colocadas na cuba, sendo o mesmo tampão adicionado à cuba de eletroforese. As fitas são suporte para esse tipo de eletroforese, as conexões com os compartimentos eletrolíticos foram feitas por meio de tiras de perfex. As amostras foram aplicadas nas tiras de acetato a 2 cm do pólo negativo, e submetidas a uma corrente de 300 V por 30 minutos, neste caso a corrida foi feita do pólo negativo para o positivo (Figura 18). Após a separação das frações de hemoglobinas, as tiras foram coradas com Ponceau<sup>1</sup> e descoradas com solução contendo 10% de ácido acético glacial e 5% de metanol. As frações foram avaliadas quanto à migração, e foi utilizado padrão de sangue humano, com as hemoglobinas AS (A= normal, e S= variante falciforme).



**Figura 18** – Sistema de eletroforese horizontal utilizando acetato de celulose como suporte.

<sup>1</sup> Ver Anexo 01

### 3.2.3 Eletroforese em pH neutro (DACIE, LEWIS, 1985)

É uma técnica utilizada para identificação e quantificação de hemoglobinas ditas “rápidas”, ou seja, aquelas que têm ponto isoelétrico afastado da neutralidade. As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão pH neutro<sup>1</sup> durante 15 min e após serem secas entre papel absorvente as conexões com os compartimentos eletrolíticos foram feitas, também com tiras de perfex.

Os hemolisados foram aplicadas à 2 cm do pólo negativo e submetidas à 200 volts por 30 minutos, o sentido da corrente foi do pólo negativo para o positivo. A Hb AS humana foi utilizada como padrão. Os métodos de coloração e descoloração utilizados foram os mesmos da técnica anterior.

### 3.2.4 Transparentização

Todas as fitas com as corridas eletroforéticas foram transparentizadas, a fim de facilitar a sua análise. As fitas foram mergulhadas em metanol ( $\pm 25$  mL) por 60 segundos e, em seguida, transferidas para uma solução contendo ácido acético (7 mL), metanol (42,5 mL) e glicerina (0,5 mL) por 40 segundos. Após esse procedimento, elas foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e levadas à estufa a 60°C, para secagem ( $\pm 2$  min). Após secas as fitas de acetato foram destacadas da lâmina e guardadas para análise e documentação.

### 3.2.5 Eletroforese de diferenciação em ágar – Fosfato, pH 6,2 (VELLA, 1968)

A eletroforese em gel de Ágar – Fosfato, pH 6,2 é específica para determinar alguns tipos de hemoglobinas, que em eletroforese em pH alcalino migram em posições semelhantes dificultando sua caracterização.

Para o preparo do gel de ágar-fosfato pesamos 500 mg de ágar-ágar e dissolvemos em 25 mL de Tampão fosfato pH 6,2 com aquecimento. O gel (5 mL) foi aplicado sobre lâminas de microscópio. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas e a conexão com os compartimentos eletrolíticos foi feita com folha dupla de papel de filtro. As frações

foram separadas aplicando uma voltagem de 100 Volts por 40 min, a corrente elétrica foi do pólo positivo para o negativo. O padrão usado foram as Hbs humanas A e S. O gel foi corado com Ponceau<sup>1</sup>. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para completa desidratação do gel, posteriormente foi descorado e seco novamente.

### 3.2.6 Eletroforese por focalização isoelétrica (NAOUM, 1999)

Na focalização isoelétrica (IEF) as proteínas são identificadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) ao longo de um gradiente de pH. Por este processo é possível identificar as isoformas de hemoglobinas. O princípio básico desse tipo de gel reside na separação de espécies moleculares que diferem somente na sua quantidade de carga. É um método analítico de elevada resolução.

Para as nossas análises utilizamos o gel de agarose, que foi preparado pesando-se 0,22g de agarose dissolvida em 13,2 mL de água pura. Após a dissolução em banho-maria foram adicionados 0,8 mL de anfólito pH 3-10 e 0,8 mL de anfólito pH 7-9, e a solução foi aplicada sobre uma placa de vidro (5 x 7 cm). Após a solidificação do gel, foram colocadas duas tiras de papel de filtro (5 x 0,5 cm) nas extremidades. Uma das tiras foi embebida em NaOH 1M (extremidade catódica) e a outra em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M (extremidade anódica). A placa foi colocada sobre um isopor contendo gelo, para dissipação do calor, e coberta por uma placa de acrílico com os eletrodos sobre as tiras de papel de filtro, para que pudesse ocorrer a passagem de corrente elétrica pelo gel.

Foi realizada uma pré-corrída para estabelecimento do gradiente de pH, na qual a corrente foi mantida constante a 5 mA por 25 min. As amostras parcialmente puras foram estabilizadas com monóxido de carbono, para evitar a formação de meta-hemoglobina, impedindo-se assim a geração de artefatos. A amostra foi aplicada diretamente no gel em pequenos orifícios feitos com um pente de plástico. Durante a corrida a corrente é mantida constante a 8 mA durante ± 1,5h. A pré-corrída e a corrida foram realizadas com a cuba de isopor dentro da geladeira. Após a corrida, o gel é fixado com TCA a 20% para a análise das frações encontradas, e quando necessário, depois de desidratado o gel foi corado com Ponceau.

### 3.2.7 Eletroforese de globinas em pH alcalino (SCHNEIDER, 1974)

Para realização dessa eletroforese de separação de globinas utilizamos o tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6 contendo uréia e 2-mercaptoetanol. Essa técnica também utiliza as fitas de acetato de celulose como suporte. Para esse procedimento não foi adicionado clorofórmio ao hemolisado, somente água destilada. O tampão foi preparado no dia anterior (agitação por 12 h), dissolvendo 36g de uréia no tampão Tris-EDTA-Borato antes citado. Ao hemolisado com água (50 µL) foram adicionados 50 µL de tampão e 50 µL de 2-mercaptoetanol, mantidos em repouso por 1 hora. Foi adicionado 6,4 mL de 2-mercaptoetanol ao tampão, e as fitas de acetato foram mergulhadas por 1 hora. As tiras foram secas em papel absorvente e colocadas na cuba. Os contatos eletrolíticos foram feitos com papel de filtro duplo. As amostras foram aplicadas na parte superior da fita próxima do pólo positivo. Foram submetidas a uma corrente de 110 volts por 40 min e a 220 volts por 20 min. A corrida foi do pólo positivo para o negativo. Também foi utilizado padrão humano AS. As fitas foram coradas com Negro de amido<sup>1</sup> e, em seguida, descoradas com solução descorante. Para melhor análise as fitas também foram transparentizadas.

### 3.2.8 Eletroforese de globinas em pH ácido (ALTER *et al*, 1980)

Segue o mesmo princípio da eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino, permitindo a separação das frações de globinas por suas afinidades diferenciadas em pH ácido. A metodologia é bastante precisa para a separação de globinas, podendo também ser utilizada para quantificação das frações.

Este sistema foi realizado em gel de poliacrilamida<sup>1</sup> a 12 % contendo uréia 8 M. Após a polimerização o gel foi submetido a duas pré-corridas, uma a 200 Volts por 1 hora e outra a 150 volts por mais uma hora, sendo que nesta última 10 µL de 2-mercaptoetanol 1 M foi adicionado em cada poço. Ácido acético 5% foi o tampão de corrida usado nos compartimentos eletrolíticos. Após a realização das duas pré-corridas, 1,5 µL de cada amostra foram aplicadas com 10 µL de tampão de amostra<sup>1</sup> contendo uréia e 2-mercaptoetanol para desnaturação das proteínas. A corrida foi realizada a uma corrente

constante de 80 mA e 200 volts por 3 horas. O gel foi corado com Azul de Comassie<sup>1</sup>, e posteriormente descorado e seco.

### 3.2.9 HPCLC (*Cromatografia líquida catiônica de alta eficiência*)

O equipamento utilizado foi VARIANT da BIO-RAD, para separação das isoformas das hemoglobinas do *P. geoffroanus*. Consiste da cromatografia de troca iônica em sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados são responsáveis pela eluição da hemoglobina na coluna detectando alterações de absorbância a 415 nm. Essas alterações foram monitoradas e exibidas em cromatograma da absorbância em razão do tempo. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Foram utilizados Kits de análise para Beta Talassemia e Hb S como padrões, a fim de se comparar as amostras do cágado com algumas hemoglobinas humanas (A, A<sub>2</sub>, Fetal, S, C e D).

Aplicamos 5 µL de sangue total com 1,0 mL de água ultra pura. Aplicamos os padrões e ao final obtivemos a leitura impressa em um cromatograma.

## 3.3 Purificação das hemoglobinas para os estudos funcionais

A retirada de fosfatos para a obtenção do hemolisado “stripped” foi realizada por filtração em gel em resina Sephacryl S 100 HR em tampão Tris-HCl 10 mM com NaCl 0,2 M pH 7,9. A resina foi previamente lavada com água bidestilada em abundância, e equilibrada com tampão ( $V_{\text{tampão}} = 3x$  o volume da resina). Foi realizada a retirada de sal e concentração das amostras em concentradores Centriprep 50 Amicon com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,9, e estocadas em nitrogênio líquido até a sua utilização. Tentativas de purificação por cromatografia de troca iônica não foram bem sucedidas, tendo sido descartadas da metodologia.

### 3.4 Estudos Funcionais

#### 3.4.1 Cálculo da concentração de Oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina

Para a determinação da concentração de hemoglobina (oxi) e hemoglobina (meta) foram utilizadas as leituras espectrais em 576 e 630 nm, com coeficientes de extinção<sup>2</sup> ( $\epsilon_{576}^{meta}$ ,  $\epsilon_{576}^{oxi}$ ,  $\epsilon_{630}^{meta}$ ,  $\epsilon_{630}^{oxi}$ ) determinados para hemoglobina humana (BENESCH et al., 1973).

O cálculo das concentrações foi realizado pelas equações 10 e 11, que correlaciona as absorbâncias (576 e 630 nm) com os seus coeficientes de extinção:

$$Abs_{576} = [oxiHb] * \epsilon_{576}^{oxi} + [metaHb] * \epsilon_{576}^{meta} \quad (10)$$

$$Abs_{630} = [oxiHb] * \epsilon_{630}^{oxi} + [metaHb] * \epsilon_{630}^{meta} \quad (11)$$

Dessa forma, a concentração das duas espécies (as duas incógnitas) pode ser resolvida conforme segue, onde “DET” é a determinante da matriz:

$$DET = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & \epsilon_{576}^{meta} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} \quad (12)$$

$$[metaHb] = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & \epsilon_{576}^{meta} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} / DET \quad (13)$$

$$[oxiHb] = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & \epsilon_{576}^{meta} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix} / DET \quad (14)$$

---

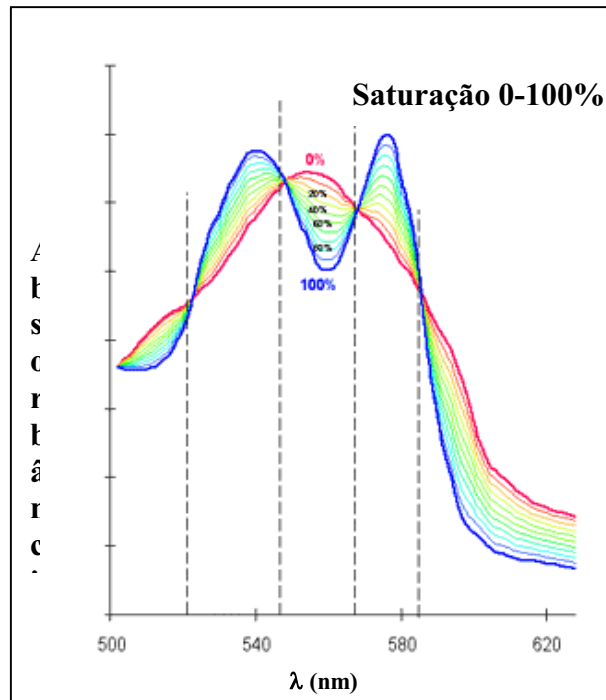
<sup>2</sup> Ver Anexo 02

### 3.4.2 Análise das propriedades de ligação do oxigênio em várias condições e variados pH (Efeito Bohr):

Os experimentos para análise das propriedades de ligação do oxigênio à hemoglobina foram realizados diluindo a Hb concentrada em tampão, sendo a concentração final de 60  $\mu\text{M}$  (heme). Foram utilizados os seguintes tampões: ADA-NaOH 30mM (pH 6,0 e 6,5), HEPES-NaOH 30mM (pH 7,0, 7,5 e 8,0) e TAPS-HCl 30mM (pH 8,5 e 9,0). As análises foram realizadas na ausência (*stripped*) e presença de reguladores alostéricos (Cloreto 100mM, ATP 0,1mM + Cloreto 100mM, ATP 0,1mM e ATP 1mM). Para se evitar a formação de meta-hemoglobina foi acrescentado às soluções de Hb, catalase 2  $\mu\text{M}$  e superóxido dismutase 2,13  $\mu\text{M}$ , de forma a inibir a ação de espécies reativas de oxigênio, íon superóxido e peróxido de hidrogênio..

Foi utilizado o método tonométrico-espectrofotométrico (GIARDINA; AMICONI, 1981), baseado nas variações espectrais que ocorrem durante a mudança entre as formas oxigenada e desoxigenada, usando um espectrofotômetro UV-Visível de duplo feixe Cary 100 da Varian. Antes de se iniciar a desoxigenação foi feita a leitura da absorbância da oxigenação inicial da solução nos seguintes comprimentos de onda: 576, 540 e 555 nm (picos da oxi-hemoglobina), 560 nm (pico da desoxi-hemoglobina), 569 nm (ponto isobéstico), 630 (pico da meta-hemoglobina) e 690 nm (linha de base) (Figura 19). As leituras foram realizadas em todas as etapas e os dados são utilizados para o cálculo da  $P_{50}$ ,  $\log P_{50}$ ,  $n_{50}$  e medição da formação de meta-hemoglobina durante o experimento. Após a leitura inicial das absorbâncias antes citadas, foi feito o processo de desoxigenação da solução de hemoglobina, passando gás nitrogênio umidificado pelo tonômetro (Figura 20), esse processo durou entre 2 e 3 min. Para auxiliar na desoxigenação foi feito vácuo (com uma bomba de vácuo).

Nos casos onde se utilizou ATP, a leitura da oxigenação inicial foi feita antes da adição do mesmo, para se evitar uma subestimação dos valores. Depois da leitura o ATP foi adicionado, procedendo à desoxigenação.



**Figura 19** - Diferença entre as leituras espectrais da forma oxigenada (linha azul) e desoxigenada (linha vermelha) As linhas tracejadas mostram o comprimento de onda dos pontos isobésticos.



**Figura 20** – Fotografia do tonômetro usado nos experimentos de estudos funcionais.

Após a desoxigenação foi feita a leitura espectral, para a avaliação do grau de desoxigenação da solução de acordo com a proposta de Benesch et al (1965), onde Abs 555 e 540 nm são as leituras de absorbância das formas desoxi e oxigenadas. Se o índice observado for maior ou igual a 1,24 (equação 15), a fase seguinte é iniciada:

$$\frac{\text{Abs555}}{\text{Abs540}} \geq 1,24 \quad (15)$$

A etapa seguinte consiste na adição de quantidades conhecidas de ar no tonômetro com uma seringa. Entre uma adição e outra foi esperado um tempo de 7 min (necessário para o equilíbrio entre a fase gasosa e a solução), durante o qual o tonômetro ficou em um banho com circulador e com temperatura controlada (20° C). Após cada adição foi feita a leitura da absorbância (540, 555, 569, 560, 576) para o cálculo da saturação da solução.

Os comprimentos em 576, 560 e 540nm, foram utilizados para o cálculo da saturação fracional (Y):

$$Y = \frac{(A^\lambda - A_0^\lambda)}{(A_{100}^\lambda - A_0^\lambda)} \quad (16)$$

Onde  $\lambda$  é o comprimento de onda,  $A^\lambda$  leitura da absorbância da amostra,  $A_0^\lambda$  e  $A_{100}^\lambda$  as absorbâncias das formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente. Como as leituras foram feitas em três comprimentos de onda, consideraremos a variação total ( $\Delta A_{\text{REF}}$ ) das absorbâncias:

$$\Delta A_{\text{REF}} = (A_{100}^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_{100}^{560}) + (A_{100}^{576} - A_0^{576}) \quad (17)$$

Após cada adição (i) foi feita a leitura das absorbâncias na solução equilibrada:

$$Y = \frac{(A_i^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_i^{560}) + (A_i^{576} - A_0^{576})}{\Delta A_{\text{REF}}} \quad (18)$$

As leituras em 569 nm (ponto isobéptico) permitiram corrigir as medições espectrais. A pressão parcial de O<sub>2</sub> foi calculada pela equação 14 (GIARDINA; AMICONI, 1981), modificada pelo protocolo experimental seguido pelo laboratório do Prof. Dr. Joseph Bonaventura, Duke University, NC, EUA.

$$pO_2 = \frac{(O_2 * \frac{TB}{TA}) * (PBC - (PV * UR))}{VT - VA} * VI \quad (19)$$

Onde a pO<sub>2</sub> (mmHg) é a pressão parcial de oxigênio, O<sub>2</sub> é fração do gás na atmosfera (0,21), PBC é a pressão atmosférica corrigida<sup>3</sup> (mmHg), PV é a pressão de vapor de água<sup>4</sup>, UR é a umidade relativa (%), VT é o volume do tonômetro (mL), VA é o volume da amostra (mL), VI é o volume de ar injetado (mL), TB é a temperatura do banho (°C) e TA é a temperatura ambiente (°C).

As injeções de ar foram feitas até que se conseguissem altos níveis de saturação. Depois o tonômetro era aberto, e era feita a leitura da oxigenação final (100% de saturação). Os dados foram digitados em uma planilha do Excel (Microsoft) e a partir dele obtivemos os valores do log pO<sub>2</sub> e log (Y/1-Y) de cada etapa, que foram transferidos para o Origin 6.0 (Microcal Inc.), onde foi construído o gráfico de Hill para cada condição. A partir desse gráfico pudemos executar uma regressão linear (y= a + b\*x) na região em torno de 50% de saturação (região da reta onde intercepta o eixo x), obtendo-se o n<sub>50</sub>, que corresponde à inclinação da reta. Por sua vez, log P<sub>50</sub> foi calculado utilizando-se a intersecção da reta no eixo y (-a/b) e P<sub>50</sub> = 10<sup>-a/b</sup>. Em cada condição era calculada a porcentagem de meta-hemoglobina formada, e os dados experimentais com 5% ou mais de meta-hemoglobina foram descartados.

Para a verificação da quantidade de prótons liberada quando da ligação de O<sub>2</sub> à Hb, foi utilizada a seguinte equação (JENSEN, 2004):

$$-\Delta H^+ / \text{Heme} = \Delta \log P_{50} / \Delta pH \quad (20)$$

<sup>3,4</sup> Ver Anexos 03 e 04

### 3.4.3 Efeito da temperatura na afinidade de ligação com o oxigênio

O efeito da temperatura foi realizado também pelo método tonométrico-espectrofotométrico (GIARDINA; AMICONI, 1981) (descrito no item 3.4.2) na ausência (*stripped*) ou presença de efetores alostéricos (Cloreto 100 mM e ATP 0,1 mM) e em 15, 20, 25° C controlados por banho termostático. Foi usado tampão HEPES-NaOH 30 mM pH 7,5.

O cálculo da variação da entalpia ( $\Delta H$ ) foi obtido pela equação:

$$\Delta H = 2,303 \cdot a \cdot R \quad (21)$$

Onde “a” é a inclinação da reta obtida pelo gráfico de Van't Hoff ( $\log P_{50}$  versus  $1/T$  (K)) e R é a constante dos gases ( $R = 1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ), e  $\Delta H$  é medido por Kcal/mol (GIARDINA et al, 1993).

A variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi obtida pela expressão:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left[ \frac{1}{P_{50} \cdot C} \right] \quad (22)$$

Onde “C” é a constante de Henry (ver quadro abaixo), e a unidade de medida do  $\Delta G$  é Kcal/mol. A constante possui os seguintes valores (BONILLA et al, 1994):

**Quadro 01** – Valores da constante de Henry para cada temperatura utilizada no trabalho.

Temperatura (°C)	Constante de Henry
15	$1,98 \cdot 10^{-6}$
20	$1,77 \cdot 10^{-6}$
25	$1,42 \cdot 10^{-6}$

A variação da entropia ( $\Delta S$ ) foi obtida por:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S \cdot T \quad \text{ou} \quad \Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (23)$$

$\Delta S$  (cal/mol\*K);

Onde K é a temperatura em unidades Kelvin, que é obtida somando-se a temperatura em graus Celsius com 273 Kelvin ( $T^{\circ}\text{C} + 273 = \text{K}$ ).

#### 3.4.4 Titulação com ATP

O número de moléculas de ATP ligadas à molécula de Hb foi determinado pela equação de inter-relação de Wyman (AMICONI, et al., 1985):

$$-\Delta x = \Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{ATP}] \quad (24)$$

Onde  $\Delta x$  é o número de moléculas de ATP ligadas por heme.

As constantes de associação com ATP a dois sítios foram determinadas por uma estimativa não linear de parâmetros do programa SigmaPlot (JANDEL SCIENTIFIC, EUA), de acordo com a equação seguinte (OLIANAS et al., 2005):

$$\log P_{50} = \log P_0 + \frac{1}{4} \cdot \log \left[ \frac{(1 + K_{1t} [\text{ATP}] + K_{2t} [\text{ATP}]^2)}{(1 + K_{1r} [\text{ATP}] + K_{2r} [\text{ATP}]^2)} \right] \quad (25)$$

Onde  $\log P_{50}$  é o logaritmo observado na presença de ATP,  $\log P_0$  corresponde ao logaritmo da afinidade pelo oxigênio na ausência de ATP,  $K_{1t}$  e  $K_{2t}$  são as constantes de associação do primeiro e segundo sítio da desoxi-hemoglobina,  $K_{1r}$  e  $K_{2r}$  são as constantes de associação para o primeiro e para o segundo sítio da oxi-hemoglobina.

O método utilizado para determinação da  $P_{50}$  em virtude da concentração de ATP foi o tonométrico-espectrofotométrico (GIARDINA; AMICONI, 1981) já descrito

anteriormente. Utilizamos tampão Hepes-NaOH 30 mM pH 7,5 com concentrações de 0,03 a 2 mM de adenosina trifosfato (ATP).

### 3.5 Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio

Realizamos a medição da oxidação de meta-hemoglobina pela adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em amostras não tratadas com agentes redutores dos grupos SH. A concentração de Hb utilizada foi de 60 μM em Tampão Hepes-NaOH 30 mM pH 7,5. Foram utilizadas amostras do cágado *Phrynos geoffroanus* e Hb A<sub>0</sub> humana pura. As leituras espectrais foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Varian durante 15 min após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%.

Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$y=y_0 + A_1*e^{-K_1t} + A_2*e^{-K_2t} \quad (26)$$

Onde A é a amplitude da curva, K é a constante de decaimento da reação, “t” o tempo em segundos, “e” é a base do logaritmo natural, y é absorbância e y<sub>0</sub> é a absorbância no tempo inicial (t=0 min). Essa fórmula é uma regressão não linear aplicada pelo programa Origin 6,0.

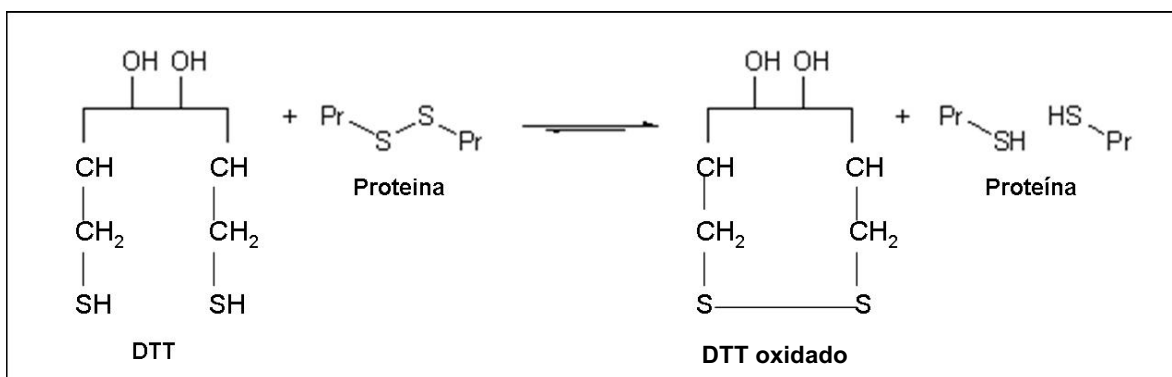
### 3.6 Análise das Cisteínas

A polimerização decorrente da formação de pontes dissulfeto entre as moléculas de hemoglobina é comum em alguns vertebrados, como os elasmobrânquios, anfíbios e alguns répteis (FYHN; SULLIVAN, 1975). O intuito dessa etapa do trabalho foi de comprovar a formação de agregados pela oxidação dos grupos tióis ativos.

### 3.6.1 Mobilidade eletroforética

Esta técnica foi realizada em um gel nativo (não desnaturante)<sup>5</sup> de poliacrilamida a 8%; essa concentração permite visualizar moléculas com massa molecular de 40-200 KDa, assim podemos observar os agregados de tetrâmeros hemoglobínicos mais facilmente. O tampão de corrida<sup>5</sup> utilizado foi Tris-HCl 0,012 M com glicina 0,096 M pH 8,3. As amostras foram preparadas adicionando-se 0,25 M de DTT (ditiotreititol) e 10 µL de glicerol (para sedimentação das amostras no gel). O gel foi submetido a uma corrente de 100 volts por 3 horas. O DTT (Ditiotreititol) é um agente redutor das pontes dissulfeto, e foram aplicadas amostras tratadas e não tratadas de Hb do cágado e de Hb A<sub>0</sub> humana pura. Após a corrida o gel foi fotografado, depois corado com azul de coomassie e descorado. Para registro o gel foi seco em papel celofane verdadeiro com gelatina incolor (CERON et al., 1992).

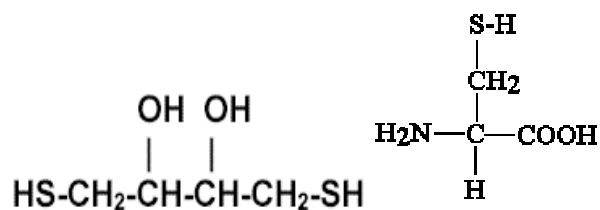
A intenção do tratamento foi de comprovar a existência da polimerização, pois se esse fato realmente ocorre poderemos observar as diferenças no perfil Hb entre as amostras tratadas e não tratadas.



**Figura 21** – Esquema indicando o DTT reagindo com uma proteína oxidada. Ao final da reação a proteína se encontra reduzida e o DTT oxidado.

A figura 21 mostrou a ação do DTT, agente redutor das pontes dissulfeto. Reischl et al (1984) utilizou essa mesma técnica para as Hbs de *Phrynosps hilarii*, porém utilizou tratamento com DTE (Ditioeritrol). A figura 22 mostra a estrutura da cisteína e do DTT.

<sup>5</sup> Ver Anexo 05



**Figura 22** – Esquema estrutural do aminoácido cisteína (Cys) e do ditioneitol (DTT).

### 3.6.2 Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação

Em coluna Pharmacia (2,6 x 22 cm) foi aplicada resina Sephacryl S-100 HR equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,2 M e 1 mM EDTA pH 7,5. A coluna foi calibrada com proteínas globulares de massa molecular conhecida. O volume de eluição das proteínas foi utilizado para determinação do tamanho das moléculas. As análises foram realizadas por leituras espectrais (espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Varian) durante 400 min.

As moléculas usadas para calibrar a coluna e o comprimento utilizado para cada uma nas leituras espectrais foram:

**Quadro 02** – Indica a massa molecular e a absorbância de cada proteína usada para calibrar a coluna.

Proteínas	Massa molecular (KDa)	Abs (nm)
Soro albumina bovina (BSA)	65	280
Mioglobina	17,8	500
Hb A <sub>0</sub> humana pura	64,5	540

O volume eluído foi recolhido em uma proveta, na qual seu peso inicial e o peso final foram computados e a diferença entre eles, dividida pelo tempo, o que nos forneceu o fluxo de eluição em mL/min.

Após as calibrações foi aplicada a amostra de *P. geoffroanus*. A mesma amostra foi aplicada duas vezes. Na primeira vez foi utilizado o tampão já citado (usado em todas as outras moléculas) para eluição e na segunda vez utilizamos o tampão Tris-HCl 10 mM, 0,2 M de NaCl, 1 mM de EDTA e 0,1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (também um agente redutor de pontes dissulfeto). Aplicamos o mesmo volume de todas as moléculas (200  $\mu$ L), porém a concentração foi variável. Os dados foram tratados no programa Origin versão 6.0.

### 3.7 Eletroforese Bidimensional

Esse procedimento foi executado na Faculdade de Medicina e Enfermagem de São José do Rio Preto (FAMERP), com colaboração da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloiza Tajara, e suas alunas, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréia Leopoldino e Msc. Alessandra Vidotto.

A focalização isoeletrica nativa (não desnaturante) foi realizada em fitas de gel (Immobiline pH 3-10, 13 cm - Amersham). Nosso intuito foi separar as iso-hemoglobinas. Uma solução de rehidratação foi colocada em recipientes próprios para a fita, em seguida colocou-se a fita por cima. Na solução havia 2% CHAPS, DTT e 2% de anfólito pH 6-11 e 0,5% de anfólito pH 3-10 e 150 $\mu$ g de Hb. Foi aplicado um acúmulo total de 26500Vh, sendo 12h de rehidratação mais 19h de focalização.

Usamos um gel de poliacrilamida de 12,5%<sup>6</sup> desnaturante (SDS) para a separação das cadeias. Esse sistema teve a intenção de separar as proteínas por massa molecular e pI (ponto isoeletrico). Antes de aplicar a tira sobre o gel, foram feitos dois equilíbrios<sup>6</sup>, o primeiro contendo 6M de uréia, 2% de SDS e DTT por 15 min sob agitação. No segundo equilíbrio havia 6M de uréia, 2 % de SDS e IAA (iodoacetamida, agente redutor de ligações dissulfeto) também por 15 min e agitação. Foi aplicado um padrão de massa molecular (LMW) e o gel foi selado com uma solução seladora de agarose<sup>6</sup>. O tampão de corrida usado foi Tris 76 mM - glicina 10 mM e 1% de SDS pH 8,3. Foi feita uma pré-corrida: 250 V 30 mA 50 W por 30 min. A corrida: 250 V, 60 mA (constante) e 50 W por 5h ou até o azul de bromofenol (presente no marcador) chegar no fim do gel. O gel foi corado com azul de coomassie.

---

<sup>6</sup> Ver Anexo 06

### 3.8 Determinação de LDH (Lactato desidrogenase)

#### 3.8.1 Preparação dos extratos para análise eletroforética e cinética

Os experimentos enzimáticos foram realizados na Universidade Federal de São Carlos (Ufscar), com colaboração da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Luiza Schwantes, e sua aluna Msc. Flavia Munin.

Para este trabalho foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: músculo esquelético peitoral maior e subescapular, deltóide (próximo ao membro superior), reto femoral (próximo ao membro inferior) e cardíaco. O peitoral maior se localiza distalmente sob o plastrão e age como adutor do úmero posterior; o deltóide se localiza na margem anterior sob o plastrão e têm como ação a extensão lateral e anterior da pata dianteira; o reto femoral se localiza na margem posterior sob o plastrão e tem como função a extensão da pata traseira (ASHLEY, 1969).

Foram coletadas amostras de três animais diferentes, sendo dois machos e uma fêmea de 1,8 a 2,2 Kg (Quadro 03), e embebidos em solução salina KCl 0,154 M (1:4, w:v) para a conservação do tecido. As amostras foram colocadas em tubos identificados e armazenados em nitrogênio líquido até a sua utilização.

**Quadro 03** – Relaciona o material coletado de cada indivíduo do *P*.

<b>Espécime 1 (macho)</b>	<b>Espécime 2 (macho)</b>	<b>Espécime 3 (fêmea)</b>
Músculo esquelético Peitoral maior e subescapular	Músculo esquelético Peitoral maior e subescapular	Músculo esquelético Peitoral maior e subescapular
Músculo cardíaco	Músculo esquelético Deltóide (próximo ao membro superior)	-----
-----	Músculo esquelético Reto femoral (próximo ao membro inferior)	-----

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Imidazol 150mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1% e DTT 5mM pH 7,4 na proporção aproximada de 1:1 (w: v), sendo, em seguida, centrifugados a 15.000 g durante 30 min a 5°C em centrífuga refrigerada Sorvall RC5B.

### *3.8.2 Eletroforese em gel de amido*

O sistema eletroforético utilizado foi horizontal (SMITHIES, 1955) com amido de milho, segundo Val et al. (1981). A concentração do gel utilizada foi de 13%. O tampão Tris-Borato 0,07M com EDTA 0,001M (pH 8,6) (ALLENDORF et al., 1977) foi utilizado para o preparo do gel. A corrida eletroforética ocorreu a 4°C, num intervalo médio de 14 horas, e 4V/cm. Durante a corrida foram utilizados dois tampões: Tris-Borato 0,199M com EDTA 0,0029M (pH 8,6) na cuba anódica (ALLENDORF et al., 1977), e Tris-Borato 0,28M com EDTA 0,004M (pH 8,6) (ALLENDORF et al., 1977) na cuba catódica.

Para a aplicação dos extratos dos diferentes tecidos no gel, foram utilizados pequenos retângulos (0,5 x 0,5 cm) de papel de filtro Whatman 3MM, embebidos nas amostras e inseridos, cuidadosamente, de maneira perpendicular ao gel.

#### *3.8.2.1 Coloração histoquímica*

Após a corrida eletroforética, as bandas com atividade para as enzimas foram reveladas através de métodos de coloração histoquímica. Todas as soluções de coloração continham 1,5% de ágar e o gel foi recoberto com a solução de coloração e incubado em estufa a 37°C.

Para a coloração foi utilizado tampão Fosfato de Sódio 0,5M pH 7,0 (ALLENDORF et al., 1977). Na solução de coloração foi adicionado MTT 0,71 mM, PMS 0,29 mM, NAD 0,25 mM e Lactato de lítio 64 mM (ALLENDORF et al., 1977).

### 3.8.3 *Ensaio enzimáticos*

Os níveis de atividade foram determinados em um espectrofotômetro HP UV-VIS G 11007A, com unidade óptica modelo 8452A controlado por computador PC486, com processador matemático e interface HP-1B, software Kinetics. Todos os ensaios foram realizados a 25°C, em tampão de ensaio Imidazol 50mM pH 7,4, com substrato 1 e 10mM piruvato e cofatores NADH 0,15mM e KCN 1mM (DRIEDZIC, ALMEIDA-VAL, 1996). Para análises das atividades enzimáticas foram obtidos valores de média (mM) e desvio padrão.

## **4 RESULTADOS**

---

#### 4.1 Padrão eletroforético

Análises do padrão eletroforético das hemoglobinas e globinas de *P. geoffroanus* foram realizadas a fim de estabelecer algumas características estruturais de relevância para os outros estudos realizados neste trabalho.

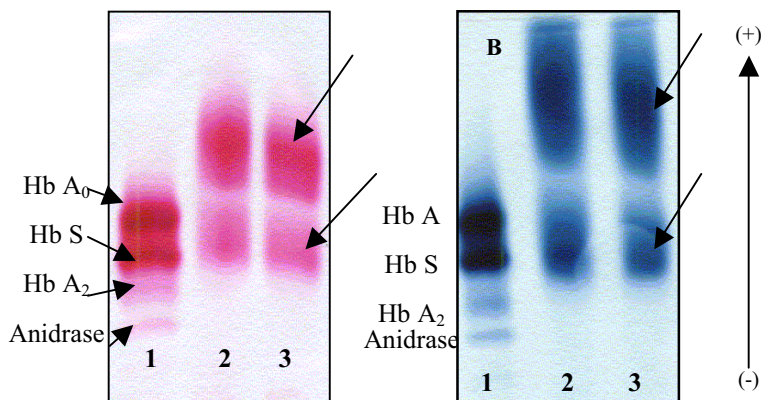
Foram coletadas 22 amostras de sangue de *Phrynosops geoffroanus* (12 machos e 10 fêmeas) as quais foram submetidas, após hemólise, a análises eletroforéticas. Todas as amostras coletadas foram submetidas a diferentes sistemas eletroforéticos no mesmo dia em que foram coletadas, a fim de se evitar alterações das hemoglobinas, como por exemplo, degradação, oxidação, polimerização, etc.

##### 4.1.1 Perfil das hemoglobinas em eletroforese

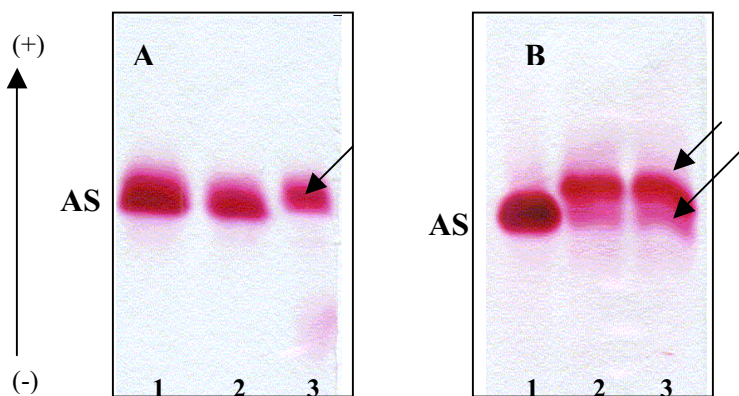
Na eletroforese alcalina (Figura 23) em acetato de celulose (pH 8,5), observou-se a presença de duas frações difusas, sendo a majoritária superior localizada em posição acima da hemoglobina A humana, e outra minoritária com migração próxima a hemoglobina S humana. Algumas frações difusas foram encontradas na eletroforese alcalina, podendo ser explicadas de duas maneiras: (1) Existência de mais de um tipo de Hb migrando em posições muito próximas, ou (2) pela oxidação das cisteínas, mas como sempre utilizamos amostras frescas não pudemos constatar se ocorreriam alterações com o “envelhecimento da amostra”.

Na eletroforese em acetato de celulose em pH neutro (pH 7,0) (Figura 24), observaram-se duas frações próximas, na mesma posição da amostra de hemoglobina humana. Em algumas amostras foi observada uma fração difusa, atribuída à mudança do fornecedor de fita de acetato de celulose.

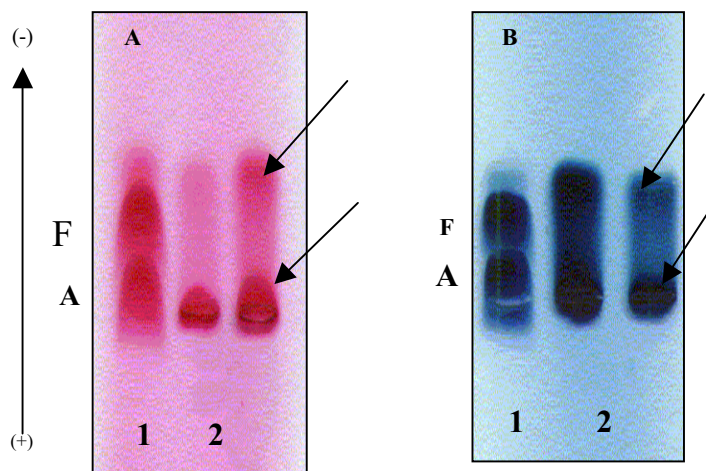
A eletroforese de diferenciação em Ágar – Fosfato (pH 6,2) (Figura 25) apresentou duas frações, uma no ponto de aplicação e outra na posição da hemoglobina Fetal humana, sendo possível observar um rastro entre elas.



**Figura 23** – (A, B) Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino. 1. Padrão AS humano, 2 e 3. Hb de *P. geoffroanus*; As setas indicam as frações difusas evidentes.



**Figura 24** – Eletroforese em acetato de celulose em pH neutro. (A) Mostra apenas uma fração difusa: 1. Padrão AS Humana, 2 e 3. Hb *P. geoffroanus*; (B) Mostra a separação de duas frações: 1. Padrão AS Humana, 2 e 3. Hb de *P. geoffroanus*.



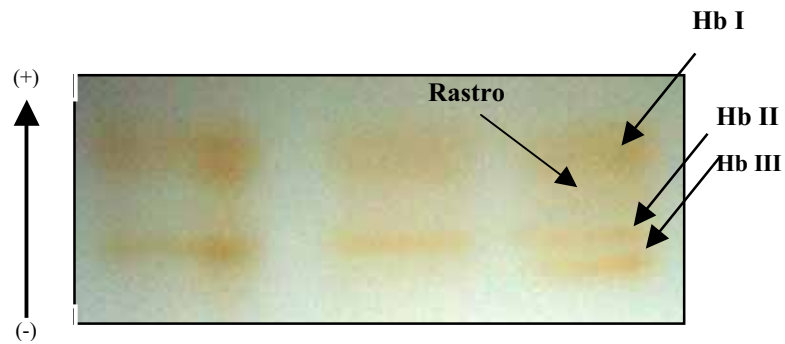
**Figura 25** – Eletroforese em agar-fosfato (pH 6,2) (A, B). 1. Padrão AF humana. 2 e 3. Hb de *P. geoffroanus*.

A focalização isoeétrica (IEF) (Figura 26) permitiu a visualização de três frações hemoglobínicas. Esse método é o mais confiável, pois separa as hemoglobinas pelo pI, podendo ser considerado o método mais sensível utilizado neste trabalho, além de podermos visualizar as frações sem a necessidade de coloração, já que nenhum dos corantes aplicado é específico para hemoglobina, podendo corar outros tipos de proteínas.

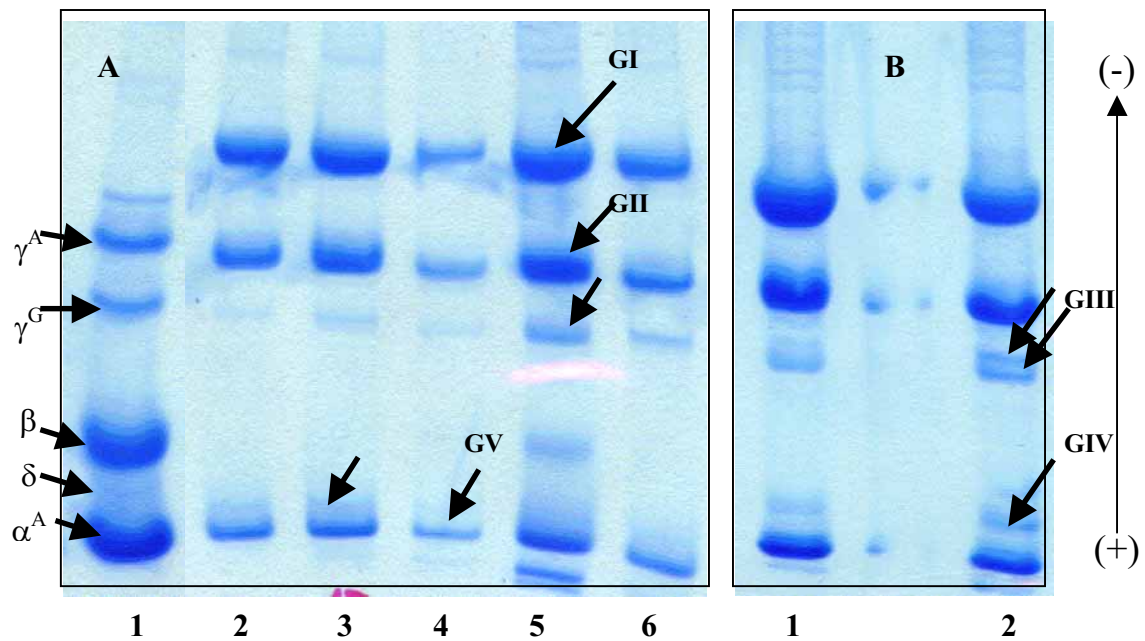
O sistema de análise eletroforética de globinas em pH alcalino não se apresentou eficiente às análises das hemoglobinas do cão *P. geoffroanus*, não sendo possível uma visualização definida das amostras aplicadas.

Nas análises de eletroforese de globinas em pH ácido (Figura 27) foi possível observar cinco frações evidentes, sendo que a primeira fração (GI) está localizada acima da cadeia  $\gamma^A$  humana, a segunda (GII) está entre  $\gamma^A$  e  $\gamma^G$ , a terceira fração (GIII) próxima da  $\gamma^G$ , a quarta (GIV) na posição da cadeia  $\delta$  e a quinta (GV) na posição de  $\alpha^A$  humana. Sendo que em algumas amostras, é possível visualizar uma separação de duas bandas na posição da terceira fração (GIII).

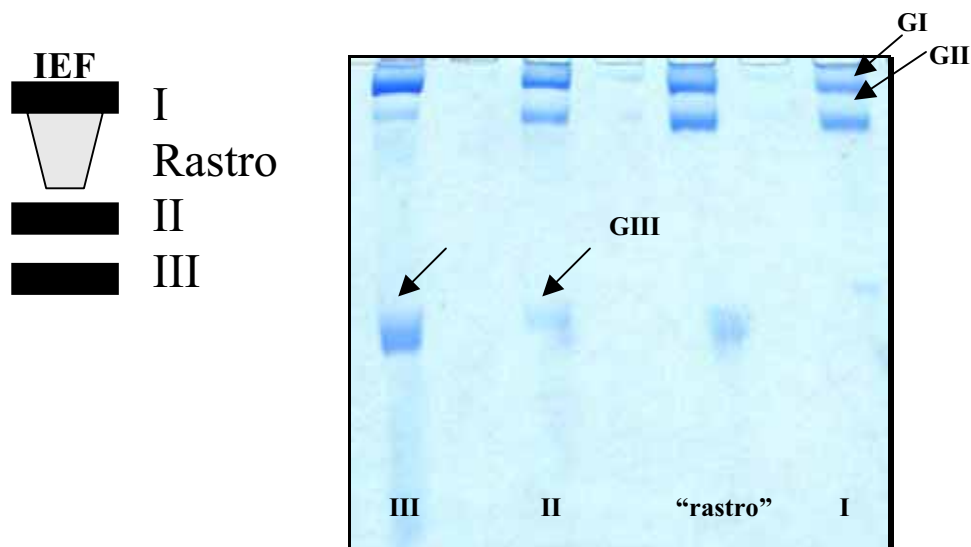
Foi feita uma eletroforese de globinas em pH ácido, onde foram aplicados nos poços bandas recortadas de uma focalização isoeétrica (Figura 28). Observamos duas cadeias globínicas evidentes na fração I e “rastros” (GI e GII), sendo que as duas apresentam uma concentração semelhante das duas cadeias, o que poderia indicar que o “rastros” seria a fração I oxidada. As frações II e III apresentaram três frações (GI, GII e GIII), mas a II apresenta a cadeia GIII em menor concentração, e a fração III apresenta a cadeia GII em menor concentração quando comparadas com as outras frações.



**Figura 26** – Focalização isoeétrica (IEF) de amostras de sangue de *P. Geoffroyanus*. As setas indicam as três frações evidentes. As amostras não foram coradas.



**Figura 27** – Eletroforese de globinas em pH ácido. (A) 1. Hb humana; 2, 3, 4, 5 e 6. Hb *P. Geoffroyanus*; (B) 1 e 2. Hb *P. Geoffroyanus*.



**Figura 28** – Eletroforese de globinas em pH ácido realizado a partir das bandas recortadas de Hb de *P. Geoffroyanus* separada por focalização isoeétrica;

#### 4.1.2 Análises do perfil de hemoglobinas por cromatografia líquida catiônica de alta eficiência (HPCLC):

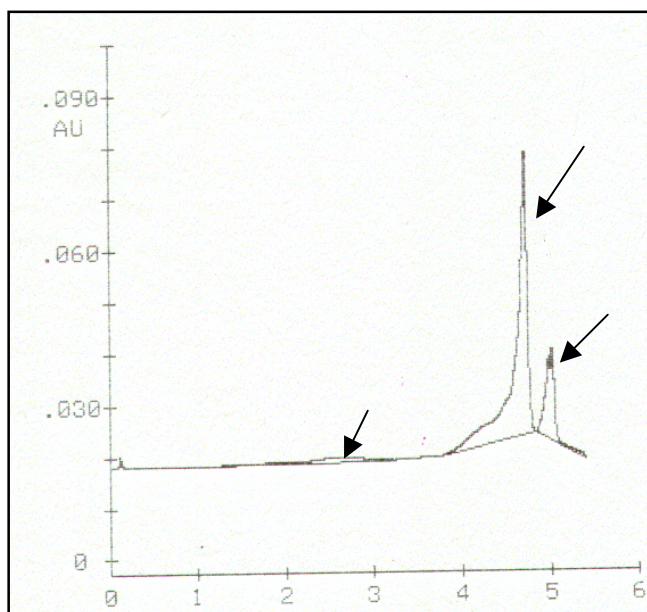
Três hemoglobinas se mostraram mais evidentes (Figura 29). A primeira eluiu na janela da hemoglobina A<sub>0</sub> humana, com tempo de retenção médio de 2,6±0,1 min variando entre os limites de 2,2 min a 2,8 min, e com concentração média de 5,5%, sendo encontrada em 22 amostras, de um total de 24 amostras analisadas nesse sistema.

A segunda, majoritária, apresentou uma concentração média de 67,1% com tempo de retenção médio de 4,70±0,1 min, com variação de 4,65 min a 4,88 min, num total de 22 amostras das 24 analisadas. A terceira hemoglobina foi eluída na janela da hemoglobina C humana, possuindo um tempo de retenção médio de 5,02±0,06 min, variando de 4,97 a 5,02 min e apresentando uma concentração média de 28,5%, observou-se esse componente em 23 amostras (Ver quadro 04).

<b>A<sub>0</sub></b>	<b>5,5%</b>	<b>2,6 min</b>
<b>Unknown</b>	<b>67,1%</b>	<b>4,7 min</b>
<b>C-WINDOW</b>	<b>28,5%</b>	<b>5,02 min</b>

**Quadro 04** - Mostra as hemoglobinas separadas pelo HPCLC, concentração percentual da amostra e tempo de retenção, respectivamente.

**Figura 29** - Gráfico de eluição do HPCLC, mostrando os picos das hemoglobinas mais evidentes de *P. geoffroanus*.



## 4.2 Purificação

Todas as amostras foram parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel em resina Sephacryl S-100 HR para retirada de fosfatos e proteínas contaminantes. Houve várias tentativas de separação das hemoglobinas por cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sepharose, mas sem sucesso. Ocorre precipitação de material protéico na resina e indefinição de frações, prejudicando assim a sua separação.

## 4.3 Estudos funcionais

Objetivou-se o conhecimento das propriedades funcionais das hemoglobinas de *P. geoffroanus*, e sua relação com a sua fisiologia, levando em consideração o hábito de mergulhar e a resistência do animal à hipóxia.

### 4.3.1 Efeito Bohr

Estes dados se referem às propriedades funcionais do hemolisado total de *Phrynops geoffroanus* em relação à variação de pH a 20° C. Analisando o gráfico de  $\log P_{50}$  versus pH (Figura 30) pode-se observar que todas as formas analisadas (*stripped*, Cl<sup>-</sup> 100mM, Cl<sup>-</sup> 100mM + ATP 0,1mM, ATP 0,1mM e ATP 1 mM) apresentaram efeito Bohr alcalino ou normal.

Com a diminuição do pH, a afinidade da molécula pelo O<sub>2</sub> diminuiu em virtude da ligação de prótons (evidente pelo aumento da P<sub>50</sub>), sendo necessária uma maior pO<sub>2</sub> para saturar 50% dos sítios heme da hemoglobina.

Os valores de P<sub>50</sub> na forma *stripped* (sem fosfatos nem cloreto) variam de 7,8 a 1,1 mmHg entre pH 6 a 9, respectivamente. O efeito Bohr ( $\Delta H^+/\text{heme} = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ ), que mede o número de prótons liberados pela hemoglobina, neste caso foi de  $-0,18 \pm 0,02 \text{ H}^+/\text{heme}$ , na faixa de pH entre 7 a 8, mantendo-se constante.

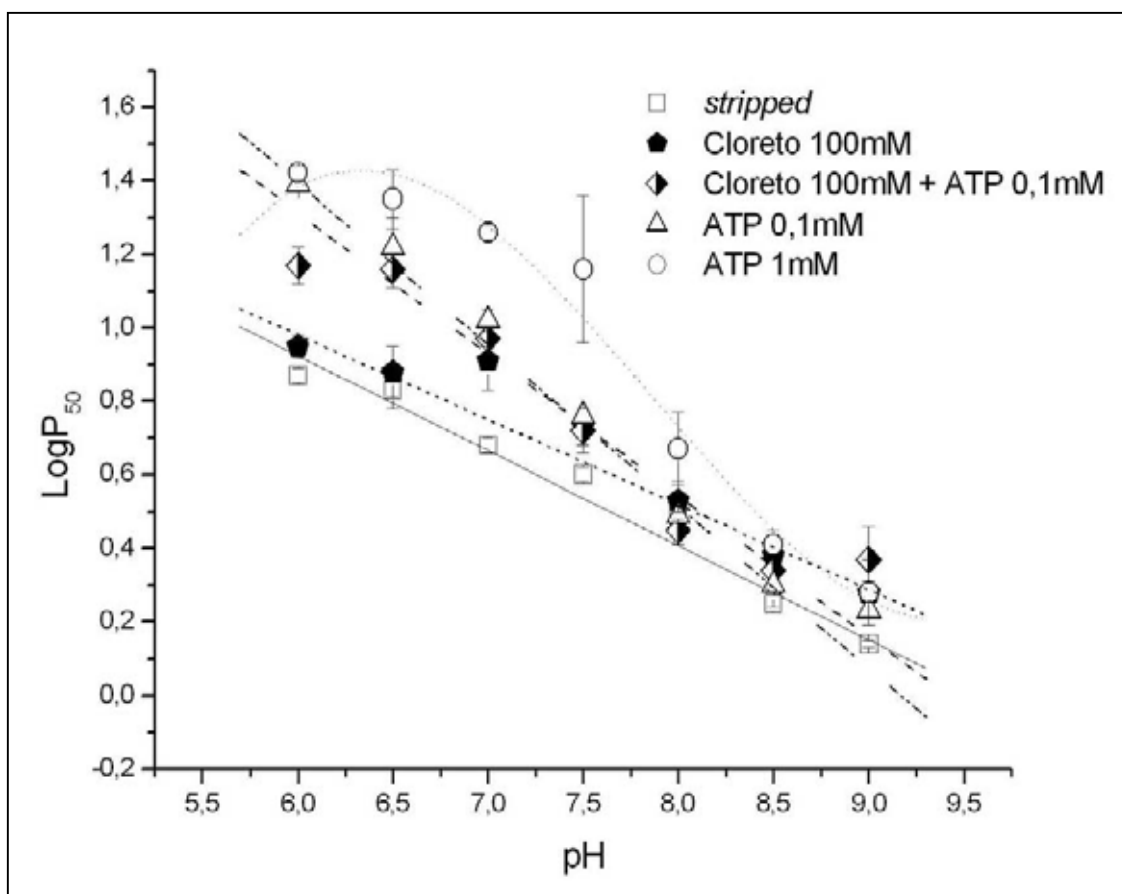
Na presença de Cl<sup>-</sup> (NaCl 0,1M) o comportamento da hemoglobina foi semelhante ao da forma *stripped*, mas ocorreu um decréscimo da afinidade pelo O<sub>2</sub> nos

pHs 7,0 e 7,5, causando um aumento do efeito Bohr, liberando um pouco mais de 1 próton por molécula ( $-0,38 \pm 0,01$  H<sup>+</sup>/heme). Os valores de P<sub>50</sub> variam de 9,6 a 1,8 mmHg entre pH 7,0 a 8,0, maiores que na forma *stripped*.

Na presença simultânea de cloreto (NaCl 100mM) e ATP 0,1 mM, a molécula se comportou de forma semelhante à presença de ATP 0,1mM isoladamente. Entre os pHs 6,0 e 7,5 e no pH 9,0, ocorreu um decréscimo da afinidade se comparados com a forma *stripped* e com o cloreto. Porém, ocorreu um aumento no efeito Bohr entre os pHs 7,0 e 8,0, com medida de  $-0,52 \pm 0,01$  H<sup>+</sup>/heme para Cl<sup>-</sup> + ATP e  $-0,53 \pm 0,01$  H<sup>+</sup>/heme para ATP.

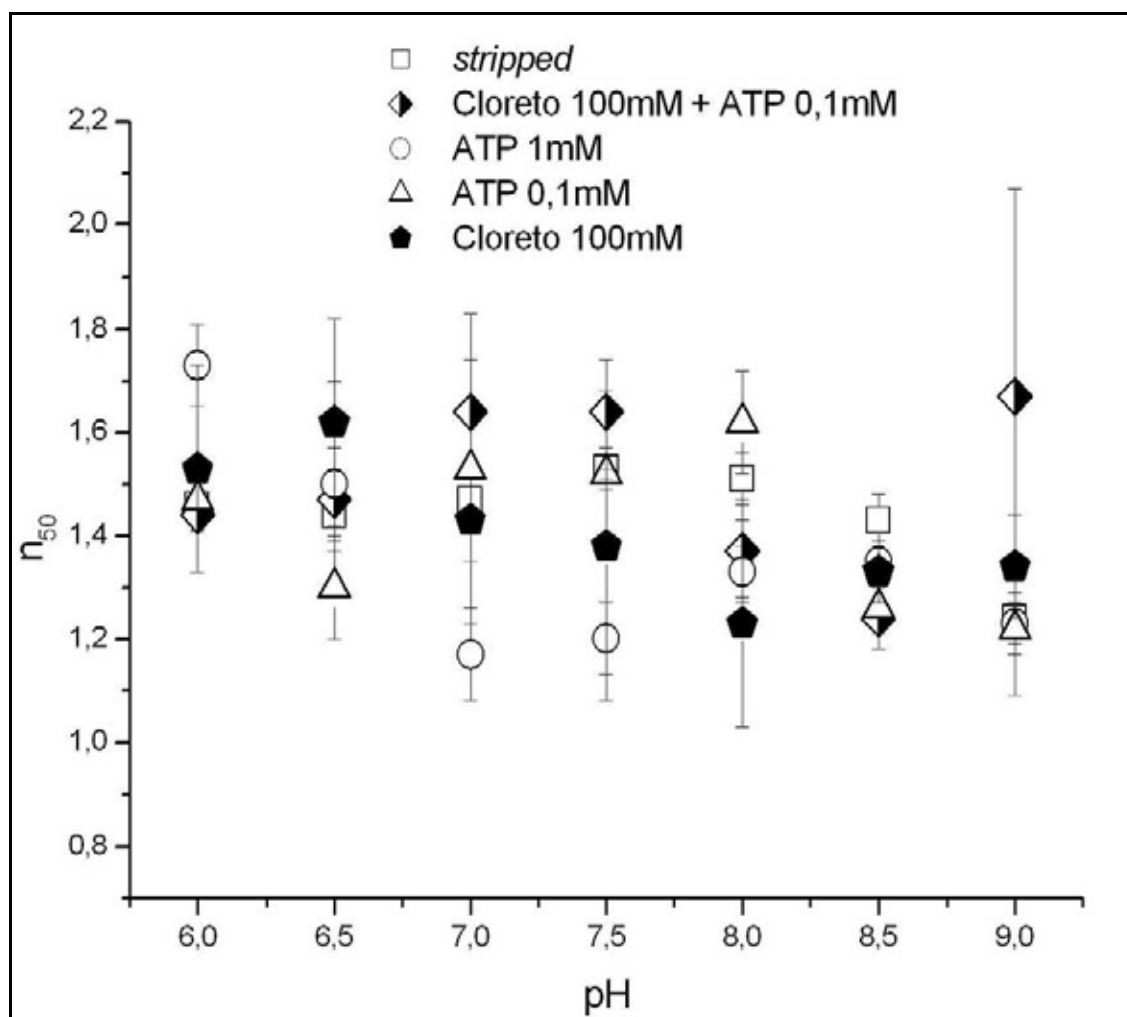
Na presença dos efetores Cl<sup>-</sup> + ATP e ATP 0,1mM, o efeito Bohr foi mais significativo se comparado aos outros, e nessa condição, a molécula apresentou menor afinidade, isto é, para que pudesse ocorrer a ligação com o O<sub>2</sub> foi necessária uma maior pressão parcial de oxigênio, que nestes casos variou de 16,2 a 1,8 mmHg e 24,0 a 1,7 mmHg entre os pHs 6 e 9, respectivamente, as mais altas se comparadas com as outras formas analisadas. No entanto, não houve diferença significativa entre cloreto + ATP e ATP, o que nos mostra que em presença de ATP, o cloreto não teria muita influência sob o comportamento da hemoglobina.

Quando a concentração de ATP foi aumentada (1mM), o efeito Bohr foi o mais significativo entre todas as outras formas analisadas. A liberação de prótons foi de  $-0,57 \pm 0,09$  H<sup>+</sup>/heme, maior do que ocorre na presença de cloreto + ATP 0,1mM e na presença de ATP 0,1mM. Neste caso, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é menor que em todas as outras formas, sendo que a P<sub>50</sub> é mais alta na faixa de pH de 6,0 a 7,5, variando de 26,3 a 15,04 mmHg. Em pH 8,0 a pressão é de 4,74 mmHg. No pH 8,5, a afinidade se encontra no mesmo patamar que na presença de Cloreto, e que na presença de Cloreto + ATP 0,1mM, com P<sub>50</sub> a 2,56 mmHg. No entanto, em pH 9,0 a Hb apresenta uma afinidade maior do que a encontrada na presença de Cloreto + ATP 0,1mM, com o valor da P<sub>50</sub> 1,93 mmHg. Vale ressaltar que nos pHs 6,0, 6,5 e 7,0 o ATP (nas duas concentrações diferentes) foi adicionado à solução de hemoglobina somente após a leitura da forma oxigenada inicial, pois quando essa leitura era realizada após a adição de ATP os valores observados eram subestimados, devido a uma pequena desoxigenação.



**Figura 30** – Gráfico  $\log P_{50}$  versus pH. Mostrando a afinidade da Hb pelo  $O_2$  com a variação do pH, em algumas condições (*stripped*,  $Cl^-$  100mM,  $Cl^-$  100mM + ATP 0,1mM, ATP 0,1mM e ATP 1mM). Dados a  $20^\circ C$ .

A oxigenação das hemoglobinas de *P. geoffranus* foi cooperativa em todas as condições (Figura 31). O coeficiente de Hill ( $n_{50}$ ) na forma *stripped* mostrou-se constante entre os pHs 6,0 a 8,5, com valor em torno de 1,47. No pH 9,0, houve um declínio para 1,24. Na presença de  $Cl^-$ , a cooperatividade variou conforme o pH; os valores foram 1,53 e 1,62, para os pH 6,0 e 6,5, respectivamente, e entre os pHs 7,0 e 8,0, ocorreu um declínio nos valores do coeficiente, sendo que o menor valor chega a 1,23 e nos pHs 8,5 e 9,0, a cooperatividade se mantém constante em torno de 1,33 e 1,34, respectivamente. Na presença de ATP 1mM, a cooperatividade variou de 1,17 a 1,73. Além dessa descrição acima, para todas as condições experimentais é evidente a variação de acordo com o pH, conforme mostrado na figura, situando-se os valores médios entre 1,17 e 1,73.



**Figura 31** – Gráfico  $n_{50}$  versus pH, mostrando os resultados encontrados sobre a cooperatividade do hemolisado de *P. Geoffroyanus*. Dados obtidos a 20° C.

#### 4.3.2 Efeito da Temperatura

Estes dados, também, foram obtidos pelo método tonométrico (GIARDINA; AMICONI, 1981), com o intuito de observar o efeito da temperatura sobre a afinidade do oxigênio pelo hemolisado total de *Phrynosops Geoffroyanus* em pH 7,5, variando a temperatura (15, 20 e 25 °C). Três condições experimentais foram analisadas: *stripped*, presença de ATP 0,1 mM e presença de cloreto (Cl<sup>-</sup>) 0,1 M.

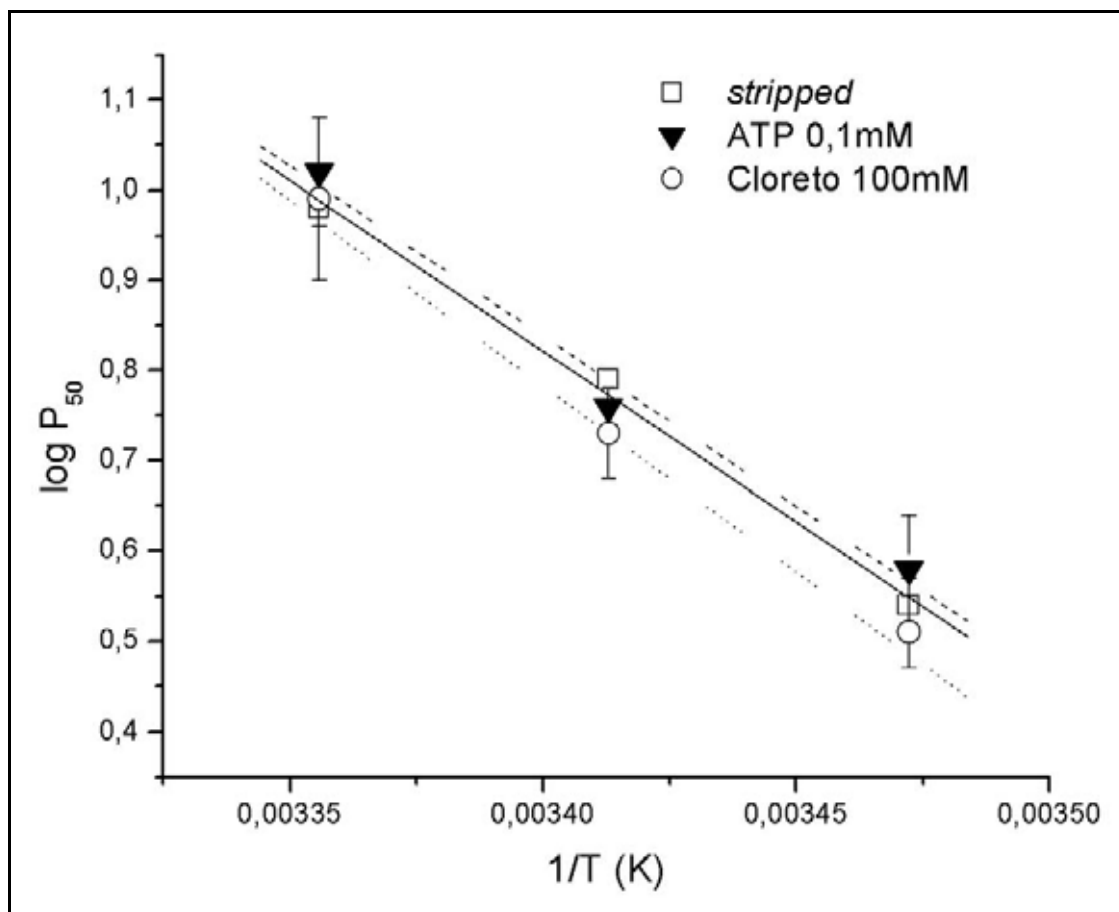
Analisando o gráfico de Van't Hoff ( $\log P_{50}$  versus  $1/T$  (K)) (Figura 32) observamos que a ligação do oxigênio com a hemoglobina sofreu variação com a

mudança de temperatura; quanto maior a temperatura menor foi a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, sendo necessária, então, uma maior  $pO_2$  para saturar a molécula. Esta situação foi observada em todas as condições analisadas, e ocorre devido à natureza exotérmica da oxigenação. O efeito da temperatura também afeta os efetores alostéricos (ATP e  $Cl^-$ ), já que são dependentes da ligação do  $O_2$  pela molécula (HLASTALA et al., 1977).

O quadro abaixo mostra os valores de  $P_{50}$  encontrados nas análises de efeito da temperatura, onde pode se observar que nas três condições a afinidade por  $O_2$  diminuiu proporcionalmente ao aumento da temperatura, sendo os números muito próximos entre a forma *stripped*, presença de ATP e de  $Cl^-$ . No entanto, a  $P_{50}$  se apresentou discretamente mais elevada na presença de ATP em 15 e 25°C, e discretamente menor na presença de cloreto em 15 e 20°C.

**Quadro 05** – Variação da afinidade por oxigênio em função da temperatura para as hemoglobina de *P. geoffroanus*.

Temperatura	$P_{50}$ (mmHg)		
	<i>stripped</i>	ATP	$Cl^-$
15° C	3,5	3,9	3,2
20° C	6,2	5,8	5,4
25° C	9,5	10,5	9,9



**Figura 32** – Gráfico de Van't Hoff,  $\log P_{50}$  versus  $1/T$  (K), mostrando a variação da  $P_{50}$  das hemoglobinas de *P. geoffroanus* em diferentes temperaturas e condições.

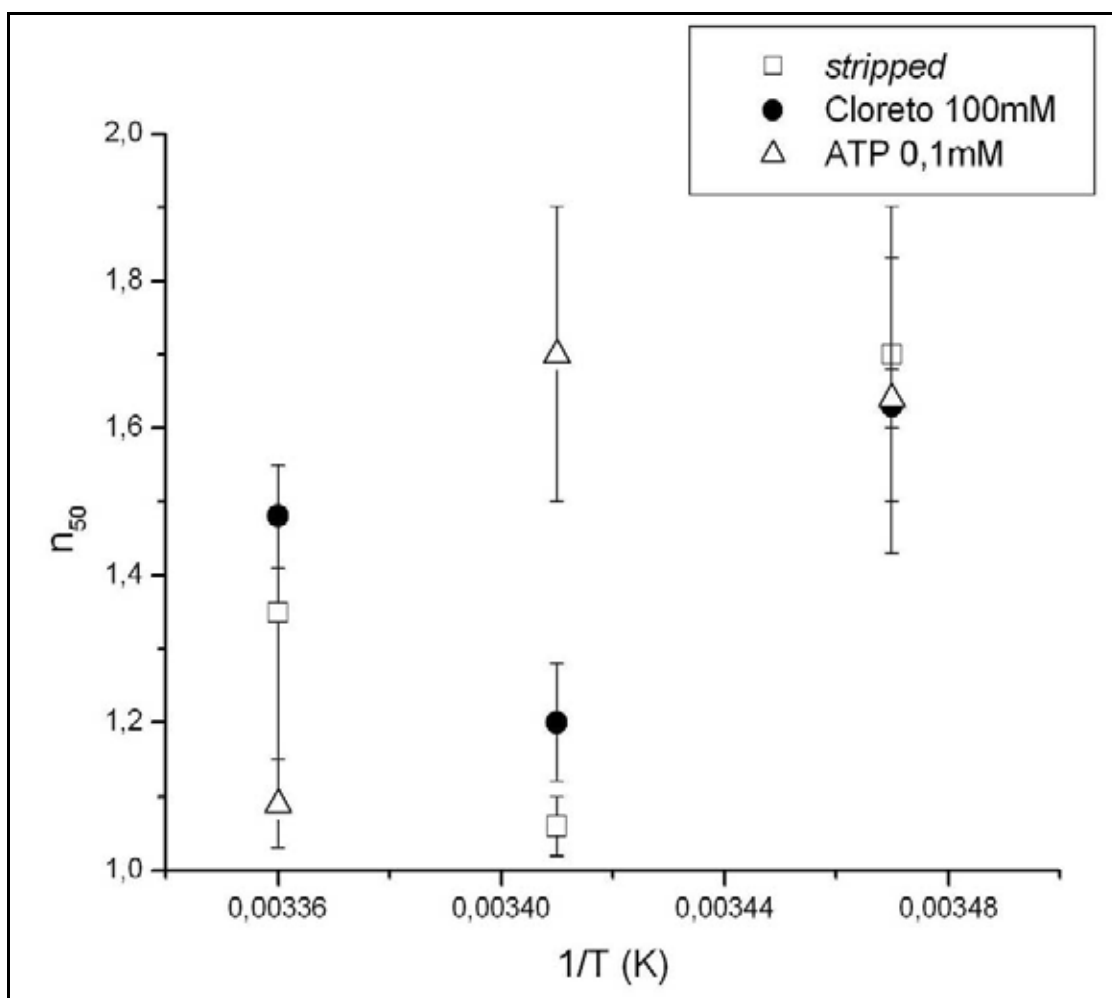
**Quadro 06** – Parâmetros termodinâmicos da ligação de oxigênio pelas hemoglobinas de *P. geoffroanus*, em diferentes condições experimentais.

Condições	$\Delta H$ (Kcal)	$\Delta G$ (Kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol.K)
<i>Stripped</i>	$-17,3 \pm 1,2$	$-6,7 \pm 0,1$	-36,3
Cloreto 0,1 M	$-17,3 \pm 3,1$	$-6,6 \pm 0,1$	-36,1
ATP 0,1 mM	$-18,8 \pm 1,1$	$-6,70 \pm 0,2$	-41,4

Observando o quadro 06, notamos que os valores obtidos para a energia livre de reação ( $\Delta G$ ) foram muito próximos entre si. Por outro lado, a entalpia de oxigenação ( $\Delta H$ ) da hemoglobina, na forma *stripped*, foi de  $-17,3 \pm 1,2$  Kcal, na presença de cloreto,  $-17,3 \pm 3,1$  Kcal e de  $-18,8 \pm 1,1$  Kcal para o ATP. Os valores mostraram-se próximos em todas as condições e ligeiramente maiores na presença de ATP. A variação da entropia ( $\Delta S$ ) foi sempre negativa; aquela obtida na *stripped* foi de  $-36,3$  cal/mol\*K e com cloreto  $-36,1$  cal/mol\*K, mostrando uma discreta variação nos dois

casos. Na presença de ATP, o valor obtido para a entropia foi um pouco maior, - 41,4 cal/mol\*K.

Observando a figura 33, podemos notar que a cooperatividade também varia com a mudança de temperatura. Os maiores valores de  $n_{50}$  apresentados foram obtidos a 15° C, variando de  $1,6\pm 0,2$  a  $1,7\pm 0,2$ , não havendo diferença significativa entre as condições analisadas (*stripped*, Cl<sup>-</sup> e ATP). Em 20° C, os valores encontrados na presença de ATP foram altos, porém, na forma *stripped* ( $1,1\pm 0,04$ ) e com cloreto, ( $1,2\pm 0,08$ ) decaem. Os menores valores apresentados estão a 25° C, variando de  $1,1\pm 0,06$  a  $1,5\pm 0,07$ . Apesar da presença de alguns valores muito baixos, o processo cooperativo se mantém ( $n_{50} > 1$ ). Com o aumento da temperatura a cooperatividade diminui.



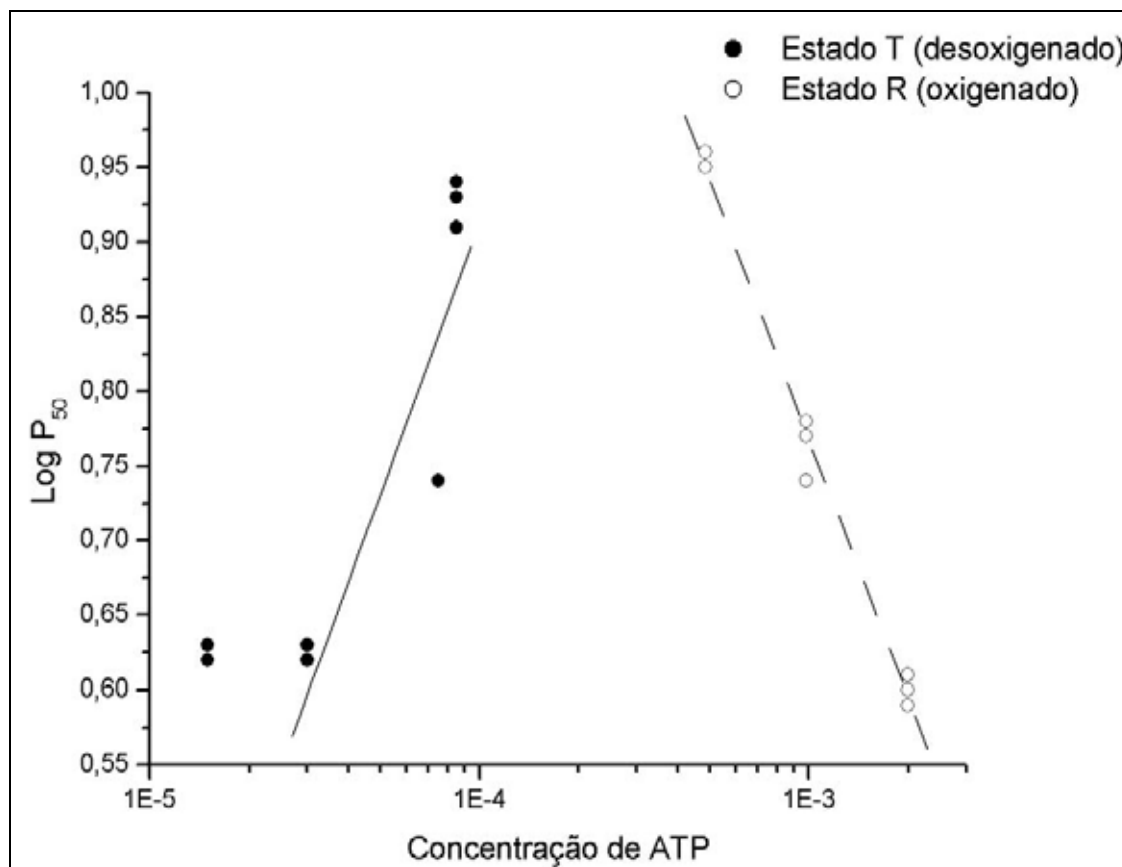
**Figura 33** – Gráfico da cooperatividade ( $n_{50}$ ) versus  $1/T$  (K), mostrando os valores de cooperatividade obtidos para o estudo de efeito da temperatura em várias condições experimentais.

### 4.3.3 Titulação com ATP

Este experimento teve como objetivo a determinação da constante de ligação às formas oxigênio ( $K_O$ ) e desoxigenada ( $K_D$ ) por meio da titulação com fosfatos orgânicos (ATP), estes dados foram obtidos pelo método tonométrico (GIARDINA; AMICONI, 1981). Foram utilizadas concentrações crescentes de ATP (0,03 mM, 0,045 mM, 0,09 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM).

Os resultados (Figura 34) mostraram que a afinidade por oxigênio primeiro decaiu; a  $P_{50}$  aumenta variando de 4,5 mmHg a 6,3 mmHg, até atingir um platô de  $P_{50}=8,5\text{mmHg}$  em concentração 0,1mM, conforme esperado para uma hemoglobina com ligação preferencial por fosfatos à forma desoxigenada, porém, após atingir o platô a afinidade começou a aumentar, e a  $P_{50}$  chegou a 4,0 mmHg para concentração de 2mM. Na fase inicial da titulação, foi obtida uma inclinação ( $\Delta\log P_{50}/\Delta[\text{ATP}]$ ) de  $\Delta x=0,60/\text{heme}$ , sugerindo que existiriam aproximadamente dois sítios de ligação para ATP na forma desoxigenada. Na segunda curva, o  $\Delta x= -0,56/\text{heme}$ , indicou também a existência de pelo menos dois sítios de ligação na forma oxigenada. As constantes de ligação para as formas oxigenada ( $K_O$ ) e desoxigenada ( $K_D$ ) não puderam ser determinadas, pois não foi encontrado um ajuste para esta situação, não havendo uma fórmula que pudesse encontrar um valor coerente para elas. A fórmula usada nas tentativas de ajustar os dados experimentais foi o modelo proposto por Orianas et al. (2005) (equação 25):

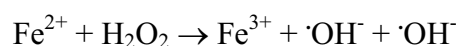
$$\log P_{50} = \log P_0 + 1/4 * \log(1 + K_{1t}[\text{ATP}] + K_{1t} * K_{2t}[\text{ATP}]^2) / (1 + K_{1r}[\text{ATP}] + K_{1r} * K_{2r}[\text{ATP}]^2) \quad (25)$$



**Figura 34** – Gráfico do  $\log P_{50}$  versus  $\log$  concentração de ATP (M), na qual é possível observar uma curva bifásica.

#### 4.4 Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio

Para observação da velocidade da formação de meta-hemoglobina em amostras não tratadas com agentes redutores dos grupos SH, foi adicionada água oxigenada 10% ( $H_2O_2$ ) às amostras de Hb do cão e humana adulta  $A_0$ . Acompanhamos o decréscimo da absorvância no comprimento de onda de 576 nm (pico da oxi-hemoglobina), durante 15 minutos (Figura 35). A seguir a reação do peróxido de hidrogênio com ferro da hemoglobina:



Para o cálculo das velocidades e plotagem do gráfico usamos a equação 26, decaimento exponencial bifásico:

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-K_1 t} + A_2 \cdot e^{-K_2 t} \quad (26)$$

Analisando o gráfico podemos observar que a Hb humana apresenta duas velocidades de reação  $K_1 = 0,41$  U.A./min e  $K_2 = 0,05$  U.A./min, e a diferença da concentração da Hb no  $t=0$  (0,022mM) pela concentração da Hb no  $t=15$  min (0,016mM), foi de 0,006 mM, mostrando que com a formação de meta-hemoglobina, a concentração da forma ferrosa diminuiu 27,3%.

Foram aplicadas duas amostras de hemoglobinas do cágado, uma mais recente ( $H_1$ ) e uma mais antiga ( $H_2$ , 2 meses mais velha), na tentativa de observar a influência do fenômeno de agregação na oxidação da meta-hemoglobina. Apresentando as seguintes velocidades de reação:

- $H_1$  (recente):

$K_1 = 0,99$  U.A./min e  $K_2 = 0,17$  U.A./min;

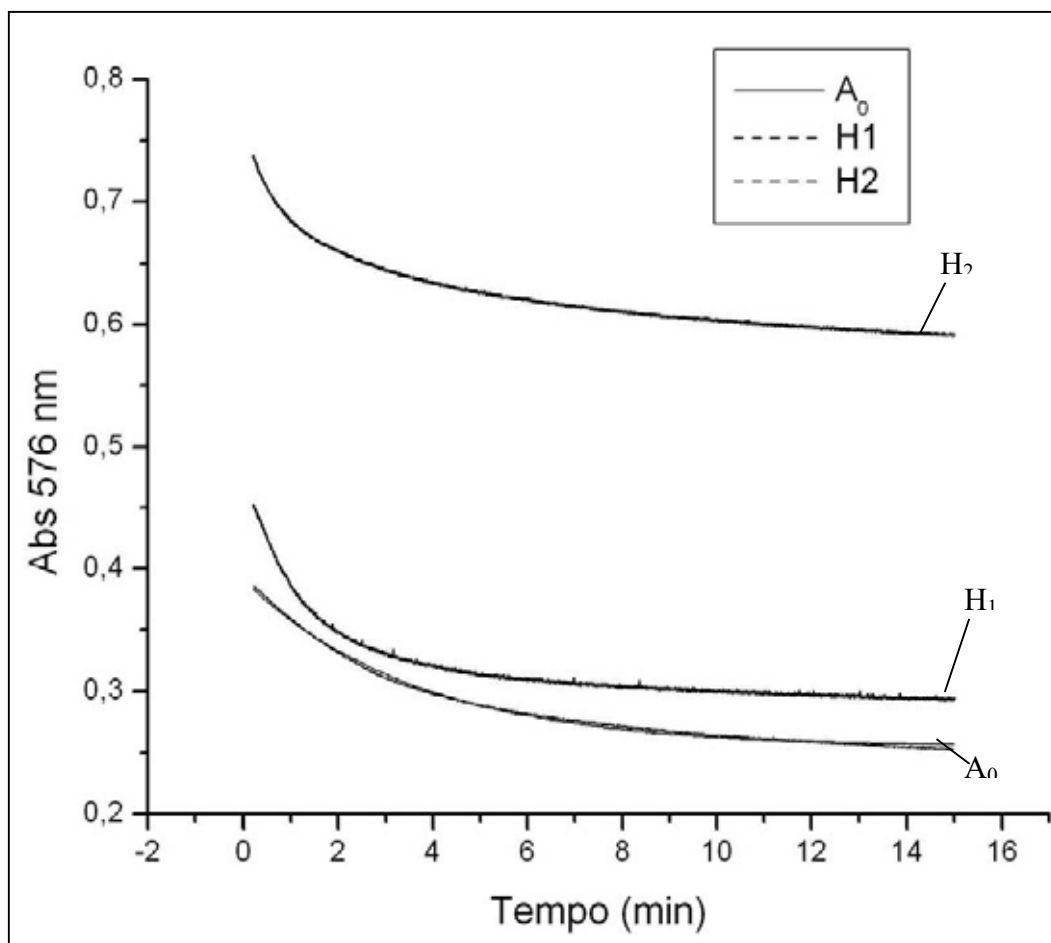
E a diferença de concentração da Hb em  $t=0$  (0,028mM) pela concentração em  $t=15$ min (0,018mM) foi de 0,01mM, indicando que houve uma diminuição da concentração da oxi-hemoglobina de 35,7%.

- $H_2$  (antiga):

$K_1 = 1,35$  U.A./min e  $K_2 = 0,16$  U.A./min;

A diferença de concentração do  $t=0$  (0,046mM) pelo  $t=15$ min (0,037mM) foi de 0,009mM, indicando que houve uma diminuição da concentração de 19,6% na concentração da oxi-hemoglobina.

Podemos observar que, independente do tipo de amostra, em  $K_1$  há um declínio mais rápido da amplitude, isto é, na primeira fase a oxidação é mais rápida. No  $K_2$ , a amplitude é menor e se mantém constante, a oxidação se estabiliza. Constatamos que a hemoglobina humana é mais estável que a hemoglobina do cágado independente do tempo da amostra. A diferença observada entre as Hbs *da P. geoffroanus* poderia ser explicada pela diferença da concentração inicial, pois a  $H_2$  está mais concentrada, diminuindo as proporções entre a Hb e o agente oxidante. Outra possível explicação seria que a amostra mais antiga já poderia ter um pouco de meta-hemoglobina formada, pelo fato de estar guardada a mais tempo.



**Figura 35** – Gráfico da absorvância em 576 nm *versus* tempo (minutos). Mostrando a curva de oxidação de meta-hemoglobina em amostra de sangue Humano A<sub>0</sub> e *Phrynops geoffroanus*.

#### 4.5 Análise das cisteínas

Muitos grupos de vertebrados (elasmobrânquios, anfíbios e répteis) possuem hemoglobinas que sofrem polimerização sob condições oxidantes. Essas moléculas contêm grupos SH livres na superfície, que podem formar ligações dissulfeto entre si, formando, então, agregados de tetrâmeros (FYHN, SULLIVAN, 1975). O intuito dos experimentos realizados foi de comprovar a existência desse comportamento nas hemoglobinas de *P. geoffroanus*.

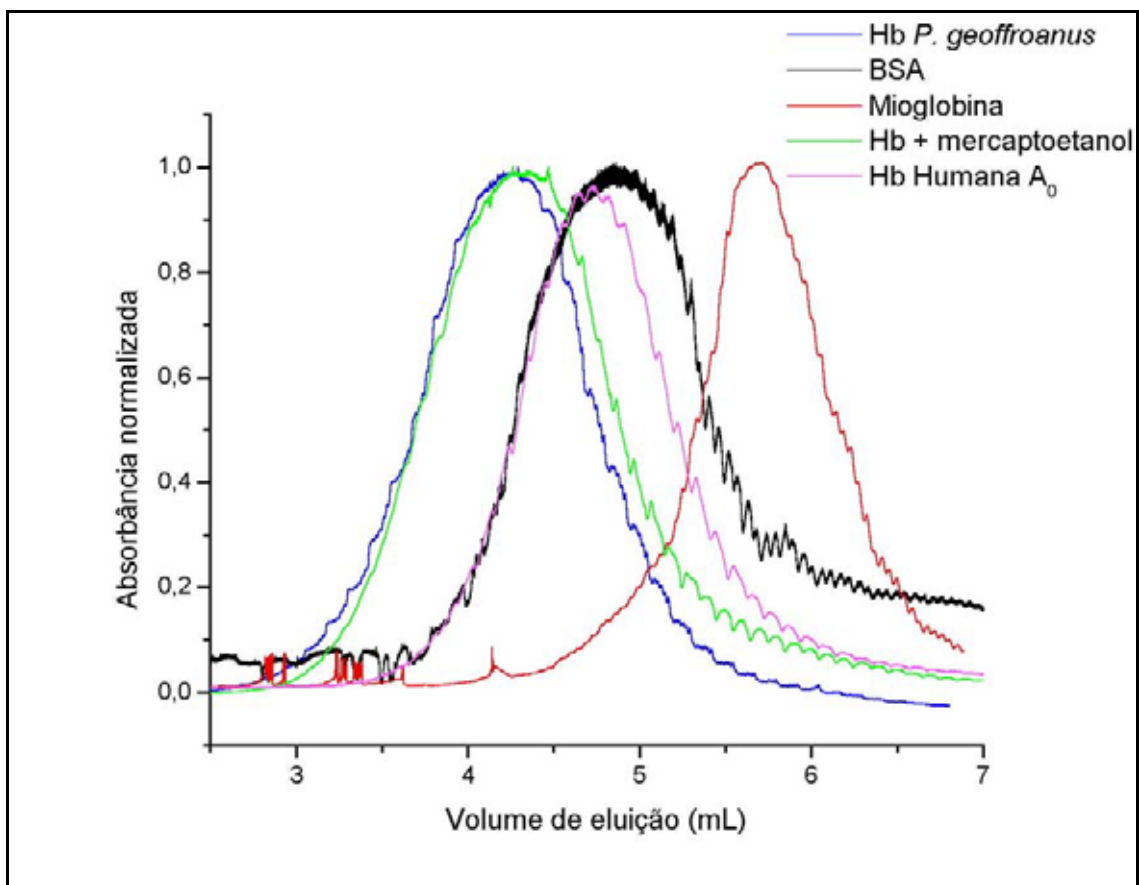
#### 4.5.1 Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação

Proteínas com diferentes massas moleculares foram eluídas em cromatografia de filtração em gel em resina Sephacryl S-100 HR, usando tampão Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA e 0,2 M de NaCl. As proteínas aplicadas foram: soroalbumina bovina (BSA, com massa molecular de 65 KDa), mioglobina (17,8 KDa), hemoglobina humana pura A<sub>0</sub> (64,5 KDa), hemoglobinas do cágado e hemoglobinas do cágado eluídas com tampão contendo 0,1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

A hemoglobina humana foi usada como um padrão de massa molecular conhecida, enquanto que a mioglobina foi usada como um modelo de proteína monomérica. A soro albumina bovina também foi utilizada por apresentar um peso molecular semelhante ao da hemoglobina humana tetramérica.

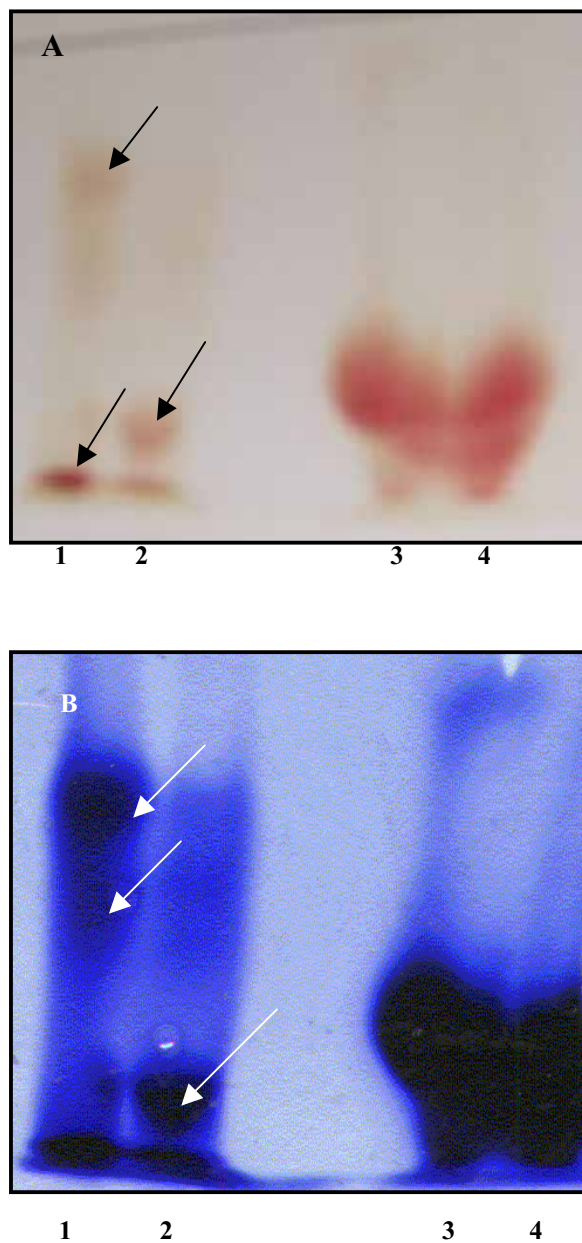
Observando a figura 36, a hemoglobina do *P.geoffroanus* deveria eluir no mesmo volume que a Hb A<sub>0</sub> (4,75 min) e num volume próximo ao da soro albumina (4,89 mL), no entanto ela eluiu antes, com um volume 4,27 mL. Como esperado, a mioglobina é a última proteína a ser eluída, 5,70 mL, ou seja, quanto maior a proteína menor é o volume de eluição.

Após o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, ocorreu um discreto aumento no volume de eluição (4,33 mL), pois com a presença desse composto a polimerização diminuiu. Esse aumento no volume foi discreto devido à baixa molaridade do  $\beta$ -mercaptoetanol aplicado.



**Figura 36** – Absorvância normalizada versus volume de eluição (ml) de amostras de proteínas aplicadas a resina de Sphacryl HR S-100. Hb de *P. geoffroanus* (em azul); Soroalbumina bovina (BSA) (em preto); Mioglobina (em vermelho); Hb de *P. geoffroanus* eluída em tampão com  $\beta$ -mercaptoetanol (em verde); Hb Humana A<sub>0</sub> pura (em rosa).

## 4.5.2 Mobilidade eletroforética



**Figura 37** – (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% de Hb sem o uso de corante: 1. Amostra de *P. Geoffroyanus* sem DTT, 2. Amostra de *P. Geoffroyanus* com DTT, 3. Hb Humana sem DTT, 4. Hb Humana com DTT; (B) O mesmo gel corado com azul de coomassie: 1. Amostra de *P. Geoffroyanus* sem DTT, 2. Amostra de *P. Geoffroyanus* com DTT, 3. Hb Humana sem DTT, 4. Hb Humana com DTT.

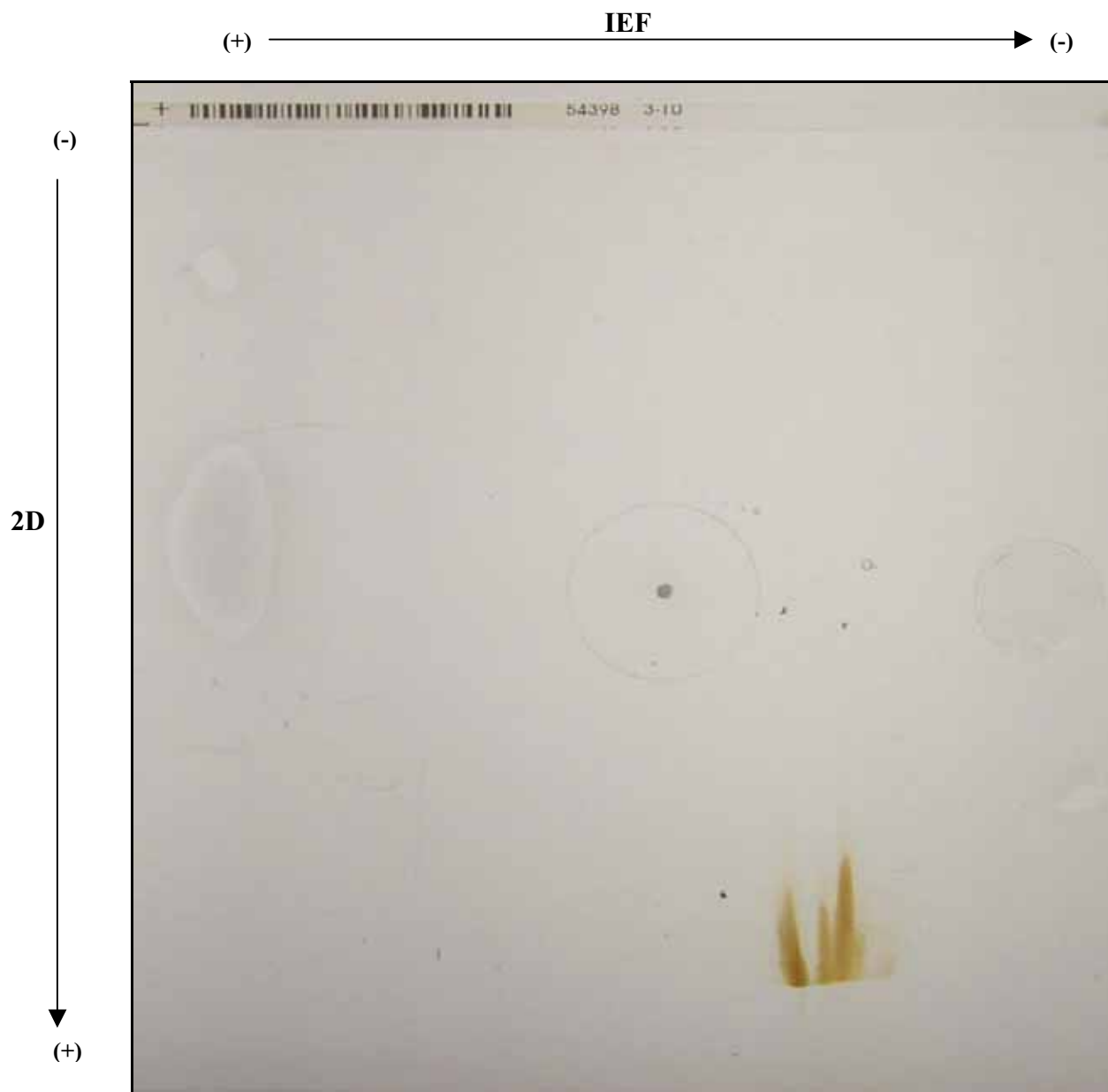
Amostras de Hb humana e do cágado (Figura 37) foram tratadas com DTT (Ditiotreitol) 0,5 M e submetidas a uma eletroforese nativa (PAGE) em um gel a 8% (capaz de separar proteínas entre 40 a 200 KDa). Foram aplicadas no gel amostras tratadas e não tratadas (controle). Não houve diferença entre as amostras humanas na presença ou ausência de DTT. Nas amostras de sangue do cágado houve diferença: na Hb de *P. geoffroanus* controle (sem tratamento), observou-se uma fração superior difusa e uma inferior, enquanto a amostra com DTT apresentou alteração drástica na fração antes citada como difusa que ficou mais definida e próxima à inferior, sugerindo que o produto adicionado reduziu as ligações dissulfeto e, portanto, a polimerização.

O mesmo gel foi corado com azul de coomassie e apresentou uma fração a mais, indicando a presença de outras proteínas, o que nos sugere que a cromatografia de filtração em gel não foi eficiente na separação da hemoglobina de outros tipos protéicos, e que o corante utilizado não é específico para hemoglobinas. As setas indicam as frações de outras proteínas presentes, observadas nas amostras de cágado.

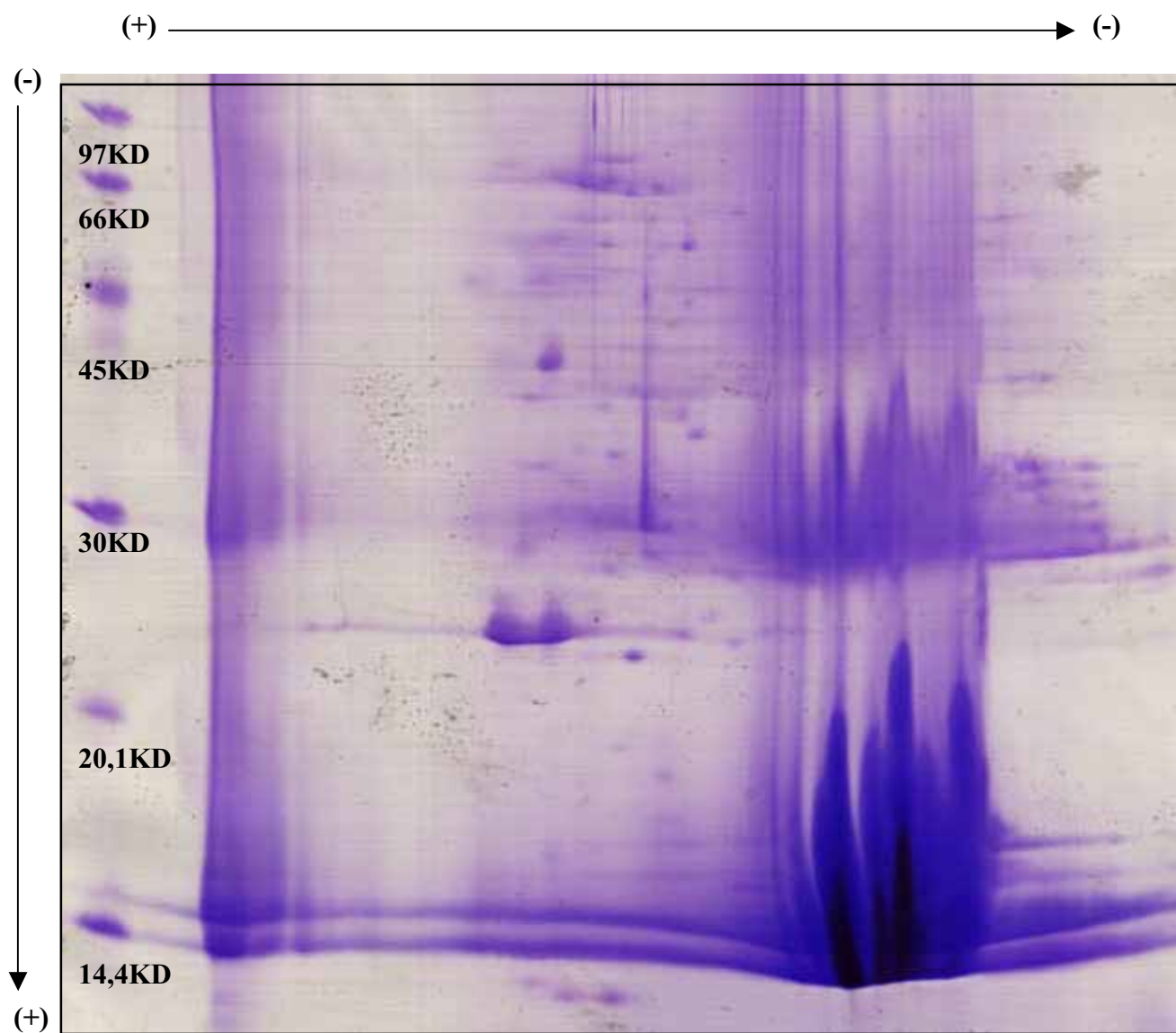
#### **4.6 Eletroforese Bidimensional**

As figuras 38 e 39 mostraram o padrão de frações encontrado no método de eletroforese bidimensional, onde são notadas cinco frações de hemoglobinas. A segunda dimensão é um gel desnaturante, mas como as frações não se apresentaram definidas e sim em um rastro, sugerimos que as cadeias globínicas de cada fração estejam presentes, mas não podemos distingui-las devido à oxidação das frações.

A focalização isoelétrica foi nativa e tivemos o cuidado de adicionar o DTT junto à amostra e à solução de equilíbrio. Como não fizemos o mesmo com a segunda dimensão, provavelmente mesmo tendo sido reduzidas anteriormente, ao entrar no gel, as pontes de dissulfeto se formaram, ocorrendo polimerização novamente. O tampão utilizado na corrida apresentou pH 8,3, superior ao pH de oxidação dos resíduos de cisteína livre. No entanto, podemos observar claramente a existência de cinco isoformas hemoglobínicas com massa e pI semelhantes, essa observação é mais visível na figura 38.



**Figura 38** – Eletroforese bidimensional, evidenciando o rastro das cinco frações de hemoglobinas.



**Figura 39** – Eletroforese bidimensional corada com azul de coomassie, evidenciando as frações entre 14,1KD e 21,4KD.

#### 4.7 Determinação da Lactato desidrogenase (LDH)

O quadro 07 mostra os tipos de tecido coletados de três espécimes de *Phrynos geoffroanus*. Após o processamento do material, foi feita a leitura espectral da atividade enzimática na presença do piruvato como substrato e eletroforese em amido.

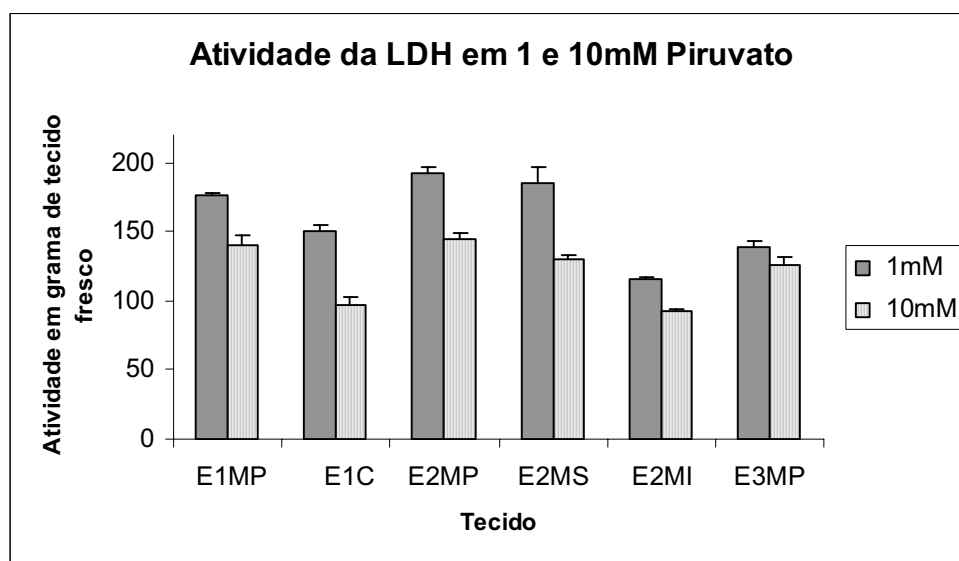
**Quadro 07** – Siglas usadas no gráfico de atividade da LDH e o seu significado.

<b>E1MP</b>	Espécime 1 músculo esquelético Peitoral maior
<b>E1C</b>	Espécime 1 músculo cardíaco
<b>E2MP</b>	Espécime 2 músculo esquelético Peitoral maior
<b>E2MS</b>	Espécime 2 músculo esquelético deltóide
<b>E2MI</b>	Espécime 2 músculo esquelético Reto femoral
<b>E3MP</b>	Espécime 3 músculo esquelético Peitoral maior

##### 4.7.1 Ensaio enzimático

As leituras da atividade foram feitas na presença de 1mM e 10mM de piruvato. O excesso de substrato inibe a ação da LDH-B<sub>4</sub>. Em tecidos, como o músculo cardíaco, onde se espera encontrar uma maior concentração dessa enzima, a inibição normalmente é alta. No entanto, observamos uma baixa inibição da LDH-B<sub>4</sub> em amostras de tecido cardíaco, semelhante com a inibição notada em músculos esqueléticos, onde, freqüentemente, a LDH-A<sub>4</sub> é mais encontrada. A figura 40 e o quadro 08 ilustram a diferença entre as leituras obtidas da atividade enzimática nas duas concentrações de substrato e a variação observada entre as amostras dos diferentes tecidos. Podemos notar que houve diferença de atividade entre o músculo peitoral maior dos três espécimes coletados, sendo o animal 2 o que apresentou maior valor. No entanto, não houve grande diferença nos valores obtidos entre

os músculos esquelético e cardíaco do animal 1, o que sugere uma concentração similar entre as isoenzimas LDH-A<sub>4</sub> e LDH-B<sub>4</sub>, independente do tipo tecidual ou composição com cadeias de propriedades catalíticas semelhantes. O resultado observado das análises entre os músculos esqueléticos do espécime 2, revelou semelhança entre os músculos esqueléticos peitoral maior e deltóide, mas mostrou diferença significativa entre os dois primeiros e o músculo esquelético reto femoral.

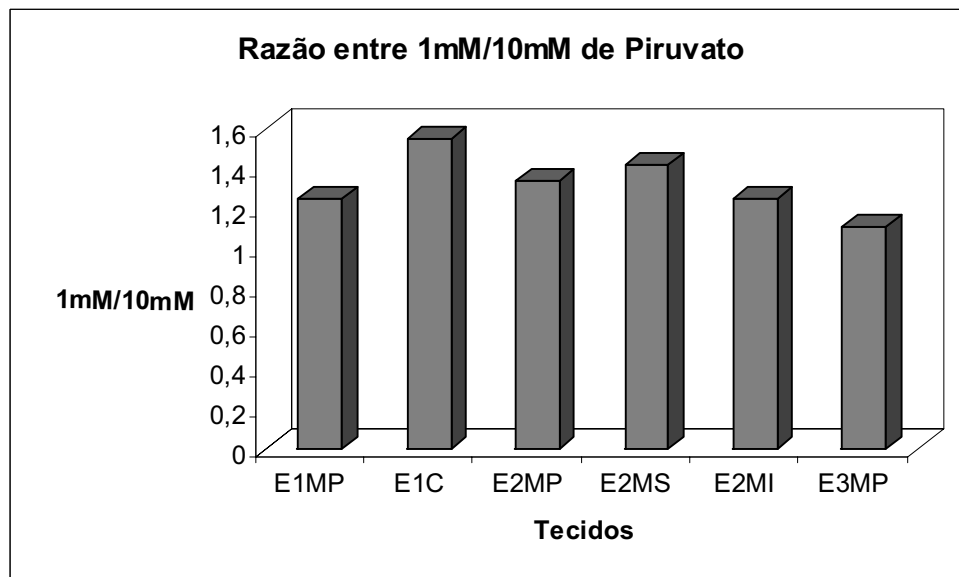


**Figura 40** – Atividade média dos tecidos na presença de 1mM e 10 mM de substrato (piruvato).

**Quadro 08** – Atividade média da enzima LDH em 1mM e em 10mM do substrato Piruvato nos vários tecidos analisados.

Tecido	Atividade em 1mM de Piruvato (mM)	Atividade em 10mM de Piruvato (mM)
E1MP	176±3	140,4±7
E1C	150,9±4	97,1±6
E2MP	192,3±5	144±5
E2MS	185,8±12	130,9±3
E2MI	115,4±2	92,02667±2
E3MP	138,8±5	125,4±6

A figura 41 mostra a razão entre o potencial metabólico anaeróbico/aeróbico (A/B), sendo esse número maior que 1 e menor que 4. Indicando uma alta taxa do metabolismo anaeróbico, inclusive nos tecidos onde se observou as maiores inibições demonstradas no gráfico anterior, como o músculo cardíaco e o músculo esquelético reto femoral.



**Figura 41** – Razão A/B entre os tecidos analisados, na qual os valores encontrados são maiores do 1 e menores do que 4.

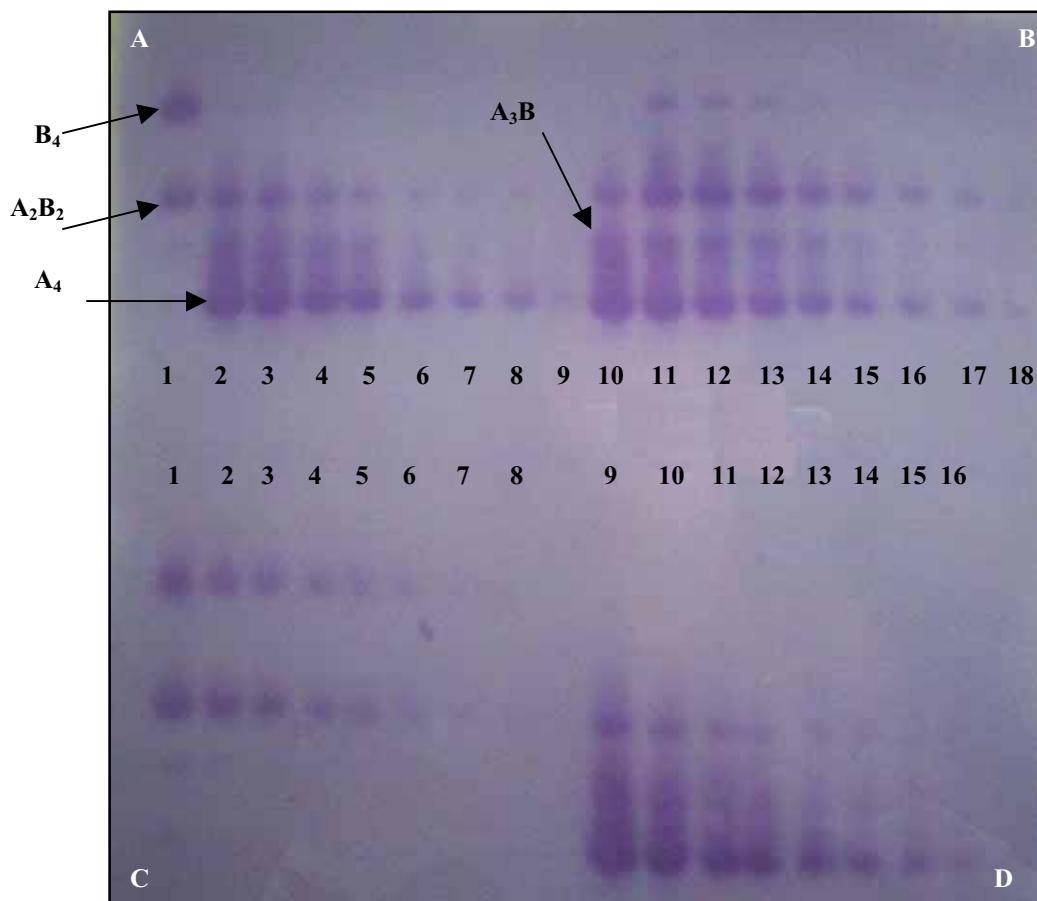
#### 4.7.2 Eletroforese em amido

O padrão de isoenzimas apresentado no gel de amido (Figura 42) demonstrou 4 bandas correspondentes a:  $A_4$ ,  $A_2B_2$ ,  $A_3B$  e  $B_4$ .

Comparando os resultados encontrados na eletroforese e nos ensaios enzimáticos, encontramos as seguintes concentrações nos tecidos analisados:

- Músculo cardíaco (E1): 1A:1,2B;
- Músculo esquelético deltóide (E2): 2A:1B;
- Músculo esquelético peitoral maior (E2): 2A:1B;
- Músculo esquelético reto femoral (E2): 1A:1B.

Em tecidos, como o cardíaco, onde se esperava encontrar uma maior concentração de LDH-B<sub>4</sub>, encontramos números próximos aos da LDH-A<sub>4</sub>.



**Figura 42**– Eletroforese de LDH em amido. (A) 1. músculo cardíaco (E1) (padrão), 2 a 9. músculo esquelético peitoral maior (E2); (B) 10. músculo esquelético deltóide (E2) (padrão), 11 a 18. músculo esquelético reto femoral (E2); (C) músculo cardíaco (E1); (D) músculo esquelético deltóide (E2); Todas as amostras foram aplicadas de acordo com a seguinte diluição: 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128.

## **5 DISCUSSÃO**

---

## 5.1 Padrão eletroforético

### 5.1.1 Perfil das hemoglobinas em eletroforese

Como mostrado, o perfil eletroforético obtido, por focalização isolétrica e por HPCLC, para o sangue da *Phrynosops geoffroanus*, seria composto por três frações de hemoglobinas, que são constituídos por três a cinco tipos de cadeias globínicas combinadas. Em nenhum dos métodos aplicados observou-se diferença entre os vários espécimes utilizados, ou entre machos e fêmeas. O número de frações pode variar dependendo do método analítico utilizado. Esse número foi confirmado pela focalização isoelétrica, que se trata de um método mais sensível que permite visualização, mesmo que os pontos isoelétricos (pI) entre as diferentes hemoglobinas sejam muito próximos, como neste caso. A partir da eletroforese ácida de cadeias realizada na amostra recortada da focalização isoelétrica, podemos sugerir que as iso-hemoglobinas do *P. geoffroanus* são constituídos por duas a três cadeias globínicas com diferentes concentrações.

Nos sistemas eletroforéticos alcalino e neutro, as frações migraram do pólo negativo para o positivo, sendo então as frações encontradas caracterizadas como catiônicas (característica alcalina). No pH ácido 6,2, as frações migram do pólo positivo para o negativo, podendo também evidenciar a característica catiônica da molécula.

Não se pode afirmar que existam duas isoformas alcalinas, pois as frações encontradas se apresentaram difusas (na eletroforese alcalina), o que poderia nos indicar a existência de duas ou mais hemoglobinas migrando juntas, podendo ser explicado pela proximidade do pI. Nesse mesmo sistema, a fração inferior apresentou-se na posição da Hemoglobina S humana, em *Trachemys scripta elegans* também foram observadas frações com posição referente a essa mesma hemoglobina (DESSAUER et al., 1957).

Na eletroforese de globinas em pH ácido, foi possível verificar que as amostras deste animal se degradam rapidamente ocorrendo a formação de frações espúrias, talvez em virtude da oxidação de cisteínas expostas, pois foram observadas frações adicionais que não estão presentes em géis onde foram aplicadas amostras mais recentes.

Sullivan e Riggs (1967) examinaram o perfil eletroforético de mais de cinquenta espécies e subespécies de várias famílias de tartarugas, sendo o número de frações encontradas em eletroforese em pH alcalino (8,4) variáveis de 2 a 5. Em algumas espécies

marinhas (*Caretta caretta* e *Chelonia mydas*) foram encontradas duas frações. Em alguns jabutis como *Geochelone carbonaria* (*Testudo carbonaria*) e *Geochelone denticulata* (*Testudo denticulata*) observaram-se 5 e 2 frações, respectivamente. Eles também examinaram o perfil hemoglobínico do *Batrachemys nasuta*, uma espécie da mesma família e subfamília que a *P. geoffroanus*, onde se observou 4 frações em pH alcalino. Podemos observar que mesmo os animais mais próximos na escala evolutiva, nem sempre apresentam semelhanças quando nos referimos ao padrão eletroforético de Hbs. No entanto, Reischl et al. (1984) verificaram a presença de dois componentes diferentes nas Hbs de *Phrynops hilarii*. *Graptemys geographica*, também apresentou duas frações evidentes em focalização isoelétrica, sendo uma majoritária e a outra apresentando característica mais anódica (MAGINNISS et al, 2004).

#### 5.1.2 Análises por cromatografia líquida catiônica de alta eficiência (HPCLC)

O número de hemoglobinas encontrado é diferente do encontrado nas eletroforeses, podendo ser confirmada a proximidade entre os pls das isoformas. O segundo tipo hemoglobínico observado é o majoritário, o que também pode ser confirmado pelas eletroforeses alcalina e neutra, mas não implica que esta forma esteja em maior quantidade, pois pode haver mais de uma hemoglobina eluindo no mesmo tempo de retenção. Podemos concluir que o número de isoformas de Hbs observada foi três, já que observamos este fato em dois métodos diferentes, sendo um deles muito sensível.

## 5.2 Estudos funcionais

### 5.2.1 Efeito Bohr

A forma *stripped* foi a condição na qual se constatou a maior afinidade da molécula pelo oxigênio, e mesmo com a isenção de efetores alostéricos essa forma apresenta Efeito Bohr alcalino ou normal.

Estudos realizados por Lutz e Lapennas (1982), mostraram que as hemoglobinas de algumas tartarugas marinhas (*Chelonia mydas* e *Caretta caretta*) apresentaram uma alta afinidade na forma *stripped*, porém apresentaram insensibilidade à variação de pH; no sangue o Efeito Bohr é significativo. Eles também observaram que a *C.caretta* (tartaruga cabeçuda) apresentou menor afinidade que a *C. mydas* (tartaruga verde) e que outros répteis, sendo o número de prótons liberados por heme das Hbs desses animais durante a oxigenação,  $-0,30 \text{ H}^+$  para a tartaruga verde e  $-0,34 \text{ H}^+$  para a cabeçuda. Essa diferença marcante na afinidade de ligação da Hb com  $\text{O}_2$  foi surpreendente se considerarmos similaridades entre elas, como tamanho do animal e hábitat. Sugere-se que essa diferença possa ser explicada pela profundidade do mergulho, sendo que a *C. caretta* é mais encontrada freqüentemente em águas profundas se alimentando de uma dieta carnívora (invertebrados bentônicos), enquanto que a *C. mydas* é observada em águas mais rasas, onde se alimenta de algas. De acordo com o autor, a  $\text{pO}_2$  no pulmão eleva-se à medida que a profundidade do mergulho aumenta, de forma que a diminuição da afinidade de oxigenação é uma adaptação a essa profundidade.

Uma recente investigação das propriedades funcionais da Hb de um mamífero mergulhador, a baleia-anã (*Balaenoptera acutorostrata*), indicou a existência de um sofisticado mecanismo modulador baseado na interação dos fosfatos orgânicos,  $\text{CO}_2$  e temperatura (DI PRISCO et al., 1991; BRIX et al., 1990).

Wells e Baldwin (1994) também encontraram um efeito Bohr ( $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ ) igual a  $-0,30 \text{ H}^+$  para *C. mydas*. Observaram também uma baixa afinidade de ligação para a oxigenação na presença de BPG e IHP.

As tartarugas aquáticas mantêm um pulmão volumoso durante o mergulho, pois é no pulmão que o oxigênio está estocado. Então, a influência dos fosfatos orgânicos é vantajosa, pois durante o mergulho a concentração dessas moléculas dentro das hemáceas é baixa, aumetando a afinidade, auxiliando o transporte do gás para os tecidos. Além disso, as tartarugas marinhas e as de água doce apresentam uma alta capacidade anaeróbica (LUTZ; LAPENNAS, 1982).

Os fosfatos orgânicos são os efetores que apresentam maior influência sobre as Hbs do *P.geffroanus*, diminuindo a afinidade pelo O<sub>2</sub>, especialmente nas maiores concentrações de ATP. Contudo, o efeito da ligação de fosfatos é muito inferior ao reportado para hemoglobinas de serpentes (BONILLA et al., 1994).

Torsoni et al. (2002), observaram que a oxigenação da hemoglobina do jabuti *G.denticulata* é fortemente afetada por fosfatos orgânicos (principalmente ATP e IHP), sendo apresentada uma redução da afinidade pelo O<sub>2</sub> na presença destes reguladores, liberando -0,66 e - 0,69H<sup>+</sup>/heme na presença de ATP e IHP, respectivamente. Esses autores sugeriram que um grande efeito Bohr e a sensibilidade dos valores da P<sub>50</sub> modulado por fosfatos regulam a afinidade por oxigenação da hemoglobina, envolvendo fatores que controlam o pH sanguíneo e a concentração de fosfatos orgânicos nas células vermelhas da maioria dos vertebrados.

Os crocodilos também são animais mergulhadores, mas não apresentam sensibilidade a mudanças de pH (BAUER; JELKMAN, 1977).

Reischl et al (1984) conseguiram isolar dois componentes hemoglobínicos do cágado *Phrynops hilarii*, e observaram diferença nas propriedades de ligação entre as duas Hbs isoladas (CI e CII). CI tem uma alta afinidade de oxigenação no pH 7,0 se comparado com o CII, e sofre efeito de fosfatos orgânicos (especialmente ATP, ADP e GTP). O componente CII não apresentou efeito de fosfatos, indicando a falta de sítios de ligação. Quando se analisou o hemolisado (a mistura dos dois componentes) observou-se a presença do efeito dos fosfatos, sendo o ATP a molécula de fosfato orgânico mais influente nestes animais. A liberação de prótons foi de - 0,35 H<sup>+</sup>/heme entre os pHs 6,8-7,8 para CI, -0,8 H<sup>+</sup>/heme entre os pH 7,0 a 8,3 para CII, e o hemolisado total liberou -0,47 H<sup>+</sup>/heme.

O valor da cooperatividade (n<sub>50</sub>) para as Hbs de *P. geffroanus* variou conforme o pH e as condições aplicadas, porém, sempre se mostrou cooperativa, apresentando valores acima de 1. No entanto, a cooperatividade observada é menor do que a encontrada para Hb humana, que varia de 2,8 a 3,0 (VOET et al, 2002). Quando o coeficiente de Hill é menor ou igual a 1, caracteriza um processo não cooperativo de ligação de O<sub>2</sub>, como ocorre com a mioglobina, que é uma proteína monomérica.

A cooperatividade para as Hbs de *P. hylarii* foi alta, apresentando valores próximos à Hb humana e bem maiores que os apresentados pela *P. geoffroanus*, onde  $n=3$  para CI (pH 7,0 a 8,5), 2,8 para CII (em torno do pH 7,0), e para o hemolisado variou de 2 a 3 entre pH 7,0 a 8,5 (REISCHL et al., 1984).

Nas Hbs *G. denticulata* a cooperatividade foi menor que 1,5, mas na presença de efetores alostéricos (ATP), aumenta para aproximadamente 2,0-2,5 (TORSONI et al., 2002).

Para a tartaruga aquática *Trachemys scripta* foram encontrados valores de  $P_{50}$  variando de 20,4 a 20,9 mmHg dentro das células vermelhas. Esses números são aproximados aos encontrados *in vitro* para Hb na presença de efetores, indicando a possível presença deles dentro das células. Os valores de  $n_{50}$  variaram de 1,52 a 2,13, altos se comparados com as Hbs estudadas neste trabalho, sugerindo que as nossas análises poderiam ter resultados diferentes se fossem “*in vivo*” (FRISCHE et al., 2001).

### 5.2.2 Efeito da Temperatura

Como observamos na figura 32, a afinidade de ligação do oxigênio para as hemoglobinas do cágado *P.geoffroanus* é dependente da temperatura. Em 15°C, a afinidade de ligação do O<sub>2</sub> é alta, com o aumento da temperatura (20 e 25°C) nota-se uma diminuição da afinidade de ligação. Esse efeito, também pode ser comprovado pelo quadro 05, onde os valores da  $P_{50}$  aumentam quando a temperatura se eleva. O efeito da temperatura pode ser visto nas três formas analisadas, sendo que a variação entre elas foi discreta, no qual a presença de ATP apresentou a menor afinidade e a presença de cloretos exibiu a maior afinidade.

Estudos realizados em *Testudo graeca* (jabuti) e *Trachemys scripta* (*Pseudemys scripta*, tartaruga de água doce) mostraram que a temperatura não afeta as propriedades de ligação do O<sub>2</sub> entre 20-30°C. Entretanto, a afinidade de oxigenação foi discretamente maior na tartaruga aquática, o que foi considerado pelos autores como uma vantagem adaptativa

para animais mergulhadores. Porém, o mesmo resultado não foi encontrado entre outras espécies de quelônios (BURGGREN et al, 1977).

Os valores de entalpia, energia livre e entropia para as diferentes condições analisadas foram semelhantes. A variação de  $\Delta H$  foi negativa, indicando um processo exotérmico de ligação do oxigênio à molécula, e a entalpia variou pouco entre as formas estudadas, porém se mostrou um pouco maior na presença de ATP. Esse resultado é inesperado, pois sendo a liberação de fosfatos endotérmica, o efeito costuma causar uma redução na exotermia (BONILLA et al., 1994).

O  $\Delta G$  também apresentou valores muito próximos e negativos, sendo responsável pelo direcionamento da reação, que se mostrou termodinamicamente favorável pela contribuição. A  $\Delta S$  mostrou resultados similares e negativos entre as condições, com valores um pouco menores na presença de ATP.

Giardina et al. (1992), encontraram valores positivos para o efeito da temperatura em *Caretta caretta* (tartaruga marinha) em pH abaixo de 6,7 e acima de 7,6, na presença de ATP e BPG. Neste caso, a oxigenação é uma reação endotérmica e os efetores alostéricos contribuem grandemente para o direcionamento da reação. Os autores sugerem que esse efeito seja uma propriedade da molécula, ou que seja efeito de algum íon cuja presença é relevante na determinação das propriedades funcionais das Hbs de tartaruga. Essa sugestão foi feita baseada na relação dos prótons de Bohr no efeito da temperatura, como ocorre em Hbs humanas, na qual os valores mais exotérmicos de entalpia ( $\Delta H = -14$  Kcal/mol) ocorrem em pH alcalino (pH 8,0), pois não ocorre Efeito Bohr e os prótons de Bohr não atuam sobre a reação. Em pH ácido, a entalpia é menos exotérmica devido a liberação desses prótons na oxigenação (reação endotérmica).

Podemos notar pelo gráfico 33, que a cooperatividade também é afetada pela variação da temperatura, sendo que com a diminuição da temperatura a cooperatividade aumenta. No entanto, a cooperatividade varia entre as condições experimentais analisadas, especialmente em 20°C.

Stawski et al (2005) verificou que a cooperatividade em *Emydura signata* (família Chelidae) aumenta com a elevação da temperatura ( $n_{50}$  variou de 1,4 a 2,0), diferentemente do que foi constatado neste trabalho. Estes autores fizeram um estudo comparativo entre essa espécie de tartaruga e uma espécie de lagarto (*Pogona barbata*), onde testaram o efeito

da temperatura (10, 20 e 30° C) ambiente, variando também a sazonalidade. Verificaram que para a espécie de tartaruga não ocorreu variação significativa da  $P_{50}$  entre as diferentes épocas avaliadas, mas a variação da temperatura se mostrou mais significativa. Apresentou valores de  $\Delta H$  (- 40,1 a - 48,2 KJ/mol entre as estações e temperaturas analisadas), considerados altos quando comparados com outros répteis e tartarugas. Esses autores também notaram um aumento no hematócrito e na concentração de Hb nas células vermelhas do sangue, sugerindo uma elevação capacidade carreadora de  $O_2$  pelo animal. No entanto, o efeito da temperatura teve influência significativa sobre a oxigenação da Hb para a espécie de lagarto, no qual os maiores números de  $P_{50}$  foram encontrados nas temperaturas mais altas (20 e 30°C). O  $\Delta H$  (-20,5 a -27,1 KJ/mol) foi considerado baixo se comparado com outras espécies de lagartos e répteis. Isso pode ser explicado pelo fato dos lagartos possuírem um hábito de vida mais dependente da temperatura ambiente, já que para se aquecerem é necessário a exposição ao sol e para se esfriar se escondem em buracos no chão.

O efeito da temperatura sob os efetores no sangue do cágado foi discreto e bem diferente do relatado por Bonilla et al. (1994) em Hbs da serpente (*Mastigodryas bifossatus*). Na forma *stripped* o  $\Delta H$  variou de -9,47 a -22,43 Kcal/mol (pHs 6,5 e 7,5, respectivamente) e se observou uma entropia negativa. Na presença de ATP o  $\Delta H$  variou de -5,94 a -1,14 Kcal/mol (pH 6,5 e 7,5, respectivamente), mas a entropia relatada foi positiva. A cooperatividade também é dependente da temperatura.

Os autores sugerem que a redução da sensibilidade à temperatura poderia estabilizar as propriedades funcionais do sangue de animais ectotérmicos em relação às mudanças externas de temperatura, enquanto que um aumento da sensibilidade poderia auxiliar na distribuição de oxigênio para os tecidos com a elevação da temperatura. Assim, para animais mergulhadores ectotérmicos, a elevação da temperatura da água deve ser acompanhada por elevação da taxa metabólica. O decréscimo da afinidade deve assegurar a descarga de  $O_2$  nos tecidos. O decréscimo da cooperatividade, contudo, pode “controlar” a liberação, ao impedir uma desoxigenação tão eficiente quanto a que é obtida com alta cooperatividade.

### 5.2.3 Titulação com ATP

As análises de titulação com ATP para Hb total do cágado sugeriram a presença de dois sítios de ligação para fosfatos para cada um dos estados estruturais da hemoglobina (desoxigenado e oxigenado), o que não é comum em outros animais.

Os estudos de efeito Bohr e temperatura mostraram que a presença de ATP diminui a afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub>, na presença de uma concentração 0,1mM de ATP, confirmado pela titulação. Foram feitos também, experimentos de Efeito Bohr na presença de 1mM ATP, obtendo-se dados diferentes da titulação. Nessa situação, para o efeito Bohr, ocorreu uma diminuição na afinidade (menor ainda que na presença de 0,1mM ATP), mas os dados de titulação exibiram um aumento na afinidade de ligação pelo oxigênio.

Um estudo da Hb de dromedário (*Camelus dromedarius*) (AMICONI et al., 1985) mostrou também a existência de dois sítios de ligação para fosfatos (um sítio para forma desoxigenada e outro para a forma oxigenada), sendo que a presença deles contribui para a estabilização da molécula no Estado R, aumentando assim a afinidade de ligação da hemoglobina pelo O<sub>2</sub>. Porém, a adição de outros ânions (como cloreto) pode levar a um deslocamento do fosfato do segundo sítio e estabilizar a estrutura terciária com uma baixa afinidade (Estado T).

Olianas et al. (2005) demonstraram a presença de dois sítios de ligação de fosfatos em algumas espécies de Anguiliformes (*Anguilla anguilla*, *Conger conger* e *Muraena helena*) tanto na presença quanto na ausência de 0,5M de NaCl, sendo que a presença dos sítios é considerada freqüente entre Hbs catódicas de Anguiliformes. Os dois sítios de ligação estão localizados na cavidade central da proteína por interação entre resíduos de aminoácidos das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (PELLEGRINI et al, 2003). A Hb de *A. anguilla* apresenta efeito Bohr reverso, porém, a ligação de fosfatos orgânicos modificou o efeito dos prótons eliminando o efeito Bohr reverso (OLIANAS et al, 2005).

A presença de fosfatos nas células vermelhas de alguns animais pode ser essencial em algumas situações. Em caso de hipóxia, a diminuição da concentração de fosfatos aumentam a afinidade da Hb pelo oxigênio. Assim, o papel dessas moléculas é de modulação da Hb, por meio da movimentação de entrada/saída de fosfatos orgânicos do meio externo para a região interna, e a presença de dois sítios mostra diferentes

possibilidades de interação entre as moléculas de fosfato e a proteína (OLIANAS et al, 2005).

Para hemoglobina de *Crotalus durissus terrificus* apenas um sítio ( $\Delta x = -0,25/\text{heme}$ ) de ligação para fosfatos foi observado, sendo as constantes de associação para a forma oxi  $K_O = 1,92 \times 10^2 \text{M}^{-1}$  e para a forma desoxigenada  $K_D = 5,13 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ , sugerindo uma estabilização do estado T (LOMBARDI, 2005).

Podemos interpretar a situação de duas maneiras, a primeira segue a interpretação de Szabo e Karplus (1976), no qual um gráfico bifásico desse tipo é esperado quando a Hb, com 2 sítios de ligação, é capaz de ligar mais moléculas de fosfatos no R do que no estado T.

Na segunda sugestão, cabe observar que, uma vez existindo agregação das isoformas de hemoglobina do cágado *P. geoffroanus*, o comportamento apresentado na titulação com ATP estaria se referindo ao comportamento de várias hemoglobinas e não de apenas uma; essa situação poderia acontecer separadamente, uma em cada tipo de hemoglobina e em estados de oxigenação diferentes.

Em relação à titulação de cisteínas não tivemos resultados repetitivos em virtude da falta de controle sobre a agregação. Por causa da agregação de tetrâmeros observada, alguns experimentos que estavam previstos no projeto inicial não puderam ser realizados: (1) Efeito da atividade da água pelo método de estresse osmótico, (2) Estimativa da constante de associação dímero-tetrâmero da oxi-hemoglobina,  $^4K_2$ , (3) Titulação de cisteínas. Na transição do estado T para R, vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente. Essa mudança na estrutura implica numa diferença de superfície protéica, e conseqüentemente ligação de moléculas de água (camada de solvatação) à proteína oxigenada. Com a formação de agregados, perde-se a possibilidade de analisarmos uma Hb isoladamente, e desse modo, não é possível levar adiante esse estudo. Como sabemos essas hemoglobinas podem estar agregadas em octâmeros ou em moléculas ainda maiores, não sendo possível também medir a constante de associação dímero-tetrâmero.

### 5.3 Oxidação induzida por peróxido de hidrogênio

O gráfico sugere que as hemoglobinas analisadas apresentam uma oxidação inicialmente mais rápida; posteriormente a reação se estabiliza, se tornando mais lenta. A formação de meta-hemoglobina final foi menor na amostra humana, indicando que ela é mais estável do que as amostras de *P. geoffroanus* aplicadas. Também observou-se diferença entre essas amostras, o que pode ser explicado pela alta concentração inicial de Hb, na amostra H<sub>2</sub>, alterando a relação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação à outra amostra, ou essa amostra por ser mais velha já apresentaria uma porcentagem de meta-hemoglobina formada antes de ser aplicação no experimento.

A diferença entre as amostras do cágado, também pode ser explicada pela formação de polímeros, pois a amostra H<sub>2</sub> é uma amostra mais velha e, conseqüentemente, existem mais polímeros formados entre os tetrâmeros. Reischl (1989) relatou que a polimerização extensiva tem sido observada *in vivo* seguida pela formação de meta-hemoglobina. Sullivan e Riggs (1964) também indicaram que Hbs oxidadas e polimerizadas parecem ser um constituinte freqüente em altas concentrações de células vermelhas de algumas espécies de tartarugas.

A menor estabilidade encontrada nas amostras do cágado, provavelmente, ocorre devido às alterações conformacionais ocasionadas pela polimerização, deixando exposto o Fe<sup>2+</sup> do grupo heme, ocorrendo mais facilmente a oxidação, conforme proposto para Hbs de outros quelônios (TORSONI et al., 1996).

### 5.4 Análise das cisteínas

#### 5.4.1 Cromatografia de filtração em gel para análise de agregação

Comparando a eluição da Hb do cágado com a Hb humana e com BSA, pode-se dizer que essa Hb não apresenta apenas a forma tetramérica, pois ela possui uma massa

molecular maior do que 65 KDa. Sugere-se que ela sofra polimerização de agregados pela formação de ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteínas livres. A formação destes polímeros indica a presença de grupos SH na superfície externa da molécula, que são capazes de interagirem entre si, formando ligações dissulfeto entre as Hbs. Moléculas de hemoglobinas ricas em SH são, freqüentemente, encontradas em animais altamente resistentes à hipóxia.

Estudos realizados em 54 espécies e subespécies de tartarugas mostraram ser um fator comum Hbs ricas em grupos tióis livres, nas análises observaram que a maioria das espécies exibiu a presença de grandes polímeros. Entre as espécies estudadas, somente 8 foram de jabuti, e destes, 7 não apresentaram polimerização nas suas hemoglobinas (SULLIVAN, RIGGS, 1967).

Reischl et al. (1984) observaram que a hemoglobina de *Phrynops hilarii* é rica em grupos SH livres (10 –SH por tetrâmero), na qual verificou-se a presença de grandes polímeros por cromatografia de filtração em gel. Torsoni et al. (1996) também encontrou formação de polímeros na hemoglobina do jabuti *Geochelone carbonaria*, principalmente na presença de glutathione oxidada. Sugere-se que as cisteínas possuam um papel protetor no organismo contra ações deletérias do oxigênio reativo, radicais livres, metais catiônicos e outras moléculas tóxicas. Neste caso, a Hb funcionaria como um agente redutor nas células vermelhas do sangue, aumentando a resistência do animal a hipóxia ou a condições de estresse oxidante, já que nestas condições há um aumento de oxigênio reativo (REISCHL, 1989).

Mamíferos mergulhadores possuem músculos ricos em mioglobina, o que é considerado uma estratégia alternativa para resistência à hipóxia; nestes animais não foram encontradas hemoglobinas ricas em –SH. A presença desses grupos em Hbs de tartarugas seria uma alternativa para a sobrevivência do animal à hipóxia, já que seus músculos possuem baixos níveis de mioglobina.

#### 5.4.2 Mobilidade eletroforética

O fato da amostra de Hbs de *P. geoffroanus* sem tratamento ter migrado mais lentamente que a amostra tratada, sugere que a primeira tenha um tamanho maior devido à formação de agregados.

A hemoglobina de *Phrynos hilarii*, também apresentou redução de polímeros após o tratamento com DTE (ditioeritritol) e 2-mercaptoetanol (Reischl et al., 1984). Esses dados comprovam que realmente existe a formação de polímeros devido à presença de ligações dissulfeto. Este fato ocorre com frequência em quelônios, e estes animais também são considerados resistentes a hipóxia e anóxia (Reischl et al., 1984).

Estudos realizados na rã, *Rana temporaria*, demonstraram que a formação de polímeros não ocorre espontaneamente, mas percebeu-se a reação de grupos sulfidrilas entre as moléculas de Hb em eletroforese em gel de poliacrilamida (BARDGARD et al., 1997).

### 5.5 Eletroforese bidimensional

O objetivo ao realizar esta metodologia era tentar quantificar com exatidão o número de globinas presente em cada fração de hemoglobina. A focalização isoelétrica foi nativa, e após a separação das hemoglobinas, a tira de focalização foi adicionada a um gel de poliacrilamida desnaturante, na tentativa de separar a proteína por duas variáveis: massa molecular e ponto isoelétrico.

Foi possível separar as isoformas hemoglobínicas, mas após a aplicação dessas no gel desnaturante houve oxidação das cisteínas livres, e conseqüente formação de polímeros, não sendo evidente a diferenciação das globinas. Os polímeros foram facilmente observados pelos rastros em cada fração tanto na figura do gel corado quanto do gel sem corar. Esse tipo de metodologia ainda não havia sido aplicado em tartarugas para a caracterização de iso-hemoglobinas e suas cadeias polipeptídicas.

## 5.6 Determinação da Lactato desidrogenase (LDH)

Como pudemos observar, o músculo esquelético peitoral maior analisado nos três espécimes apresentou diferença de atividade, sendo que os dois primeiros exibiram valores mais próximos e no terceiro verificou-se a menor atividade. Essa diferença da atividade enzimática no mesmo tecido entre indivíduos diferentes da mesma espécie, pode ser explicada pela época e pela variação das condições do meio na coleta, já que as amostras não foram obtidas todas no mesmo dia.

Esperávamos encontrar uma diferença significativa na inibição da atividade enzimática (10mM de piruvato) entre os músculos esquelético e cardíaco, como normalmente é observado em outros vertebrados. No entanto, essa diferença foi pequena, o que sugere que os dois tipos principais de LDH (A e B) estejam em concentrações próximas, inclusive no coração, onde normalmente o tipo B é mais concentrado. A eletroforese (Figura 42) mostra claramente a presença de duas isoenzimas.

A sensibilidade à inibição do substrato da subunidade B em tecidos mais ativos é importante para o direcionamento de uma maior quantidade de piruvato para o Ciclo de Krebs ao invés de convertê-lo em lactato, aumentando assim os níveis da produção de ATP (BAEYENS, 1987).

Também encontramos diferença nas atividades da enzima em 1mM e 10mM de substrato entre os tecidos esqueléticos do animal 2 (peitoral maior, deltóide e reto femoral), sendo que nos dois primeiros a atividade é similar e a inibição é baixa. Porém, no músculo reto femoral a inibição também é baixa, mas a atividade enzimática é menor que as outras. Esse fato pode ser explicado pela localização dos tecidos, pois o músculo reto femoral é responsável pela extensão das patas traseiras, e os outros se localizam no peito ou próximo a ele, sendo responsáveis ou auxiliando a movimentação das patas dianteiras. Sugerimos então, que o peitoral maior e o deltóide são músculos mais ativos, pois o membro superior é que dá o impulso durante o mergulho, além de estarem em maior atrito com a água do que as patas traseiras.

Na análise da razão do potencial metabólico A/B podemos observar que em todos os tecidos os valores apresentados são próximos e estão sempre em torno de 1. Indicando que

a concentração dos dois tipos de cadeias A e B são similares nos tecidos analisados independentemente do tipo muscular e da localização.

Analisando a eletroforese em amido encontramos quatro tipos evidentes da enzima ( $A_4$ ,  $A_2B_2$ ,  $A_3B$  e  $B_4$ ). Liao et al (2001), encontrou em análises da LDH da tartaruga *Pelodiscus sinensis* (Família Trionychidae) cinco bandas correspondentes a  $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$  e  $B_4$ , esses autores analisaram também tecidos do jacaré *Caiman crocodilus apaporiensis* (Linnaeus, 1758 – família Alligatoridae) e notaram quatro bandas:  $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$  e  $B_4$ .

Observando as porcentagens de A e B calculadas, podemos notar que em tecidos onde se esperava encontrar maior concentração de B, verificamos concentrações iguais ou similares entre A e B. No entanto, onde esperávamos encontrar uma maior concentração de A, encontramos que A apresentou o dobro da concentração de B. Então, realmente existe uma taxa de metabolismo anaeróbico aumentado em tartarugas aquáticas. Segundo Chippari-Gomes et al (2005) alguns peixes (Ciclídeos) são capazes de regular as isoformas de LDH durante a exposição a hipóxia, o que nos leva a crer que o *P. geoffroanus* também tenha essa habilidade.

A mudança de níveis de LDH no coração comprova o deslocamento do metabolismo aeróbico para anaeróbico neste órgão. Então, em condição hipóxica, o coração deste animal inibe o metabolismo oxidativo e ativa a glicólise anaeróbica (HOCHACHKA; SOMERO, 1984).

Southwood et al (2003) analisou as enzimas metabólicas da tartaruga marinha *Chelonia mydas*, e notou que a variação da temperatura também influencia os níveis metabólicos, sendo que a atividade enzimática da LDH foi maior nos tecidos coletados durante o inverno do que no verão.

Altman e Robin (1969) sugerem que a diferença entre as concentrações dessa isoenzima, em tartarugas aquáticas, esteja relacionada à diferença na seqüência de aminoácidos destes animais com as outras espécies de vertebrados já estudados.

## **6 CONCLUSÃO**

---

### 6.1 Conclusões específicas

1. Apesar das dificuldades encontradas nas análises eletroforéticas, sugerimos que presença de frações difusas em diversas eletroforeses do sangue do cágado *P. Geoffroyanus* é constituído por três tipos diferentes de hemoglobinas, como demonstrado nas análises de IEF e HPCLC, e estas, por sua vez, são compostas por três a cinco cadeias globínicas combinadas, possuindo pI próximos e característica catiônica. Por meio da eletroforese bidimensional foi possível comprovar a existência de cinco isoformas de hemoglobinas do cágado *P. Geoffroyanus*, mas a separação das cadeias de globinas não pode ser visualizada. Este método, também mostrou a presença de oxidação das frações hemoglobínicas;
2. Todas as condições analisadas das hemoglobinas de *P. Geoffroyanus* apresentaram efeito Bohr alcalino, sendo mais acentuado na presença de ATP 1mM. A forma *stripped* é a condição na qual a molécula apresenta maior afinidade pelo O<sub>2</sub>. O ATP foi o efetor que apresentou maior influência sob a molécula. Pudemos concluir, também que as Hbs de *P. Geoffroyanus* apresentam processo cooperativo de ligação de O<sub>2</sub> em todas as condições, e em toda faixa de pH analisada;
3. O efeito da temperatura tem influência sobre essas hemoglobinas, sendo 15°C a temperatura mais favorável para a oxigenação (apresentou maior afinidade). Os parâmetros calculados ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  e  $\Delta S$ ) demonstraram que a oxigenação é uma reação favorável e conduzida pelo decréscimo da entalpia. A cooperatividade também é dependente da temperatura, sendo maior em temperatura mais baixa e menor em temperatura mais alta;
4. As análises sugerem a existência de dois sítios para fosfatos orgânicos para as Hbs de *P. Geoffroyanus*, e essas moléculas estabilizam a forma desoxigenada num primeiro momento, e depois estabilizam a forma oxigenada. Sugerimos duas hipóteses: (1) Essa Hb é capaz de ligar mais fosfatos no estado R do que no T, ou (2) Pela agregação dessas Hbs, essa situação poderia ocorrer simultaneamente em vários tipos de Hb e vários estados diferentes;

5. Os experimentos de oxidação por peróxido de hidrogênio mostraram que a hemoglobina humana é mais estável do que as hemoglobinas analisadas neste trabalho, o que pode estar relacionado com a agregação das hemoglobinas;
6. Foi comprovada a existência de polímeros formados por ligações dissulfeto entre as moléculas de hemoglobina, o que pode estar associado com a alta resistência do animal à hipóxia;
7. Este animal possui uma alta taxa de metabolismo anaeróbico, que pode ser observado em todos os tipos de tecidos analisados. Onde observamos também concentrações próximas entre a LDH-A<sub>4</sub> e LDH-B<sub>4</sub> no tecido cardíaco.

## *6.2 Conclusões gerais*

Em conclusão, parte das análises foi prejudicada por fenômenos de agregação, que explicam a baixa quantidade de artigos relativos às hemoglobinas de quelônios. Apesar dessas dificuldades, mostramos que o hemolisado parcialmente purificado liga oxigênio de forma cooperativa, exibindo efeito Bohr alcalino ou normal. A possível existência de 2 sítios de ligação para fosfatos permitiria modular a afinidade por O<sub>2</sub> da Hb do animal durante o período em que permanece submerso. Quando existe apenas um sítio com ligação preferencial na forma desoxigenada, durante a hipóxia a queda da concentração de ATP e a elevação do pH nos eritrócitos levam a um aumento na afinidade por oxigênio. No caso deste animal, o efeito permitiria aumentar ou diminuir a afinidade, dependendo da concentração de ATP. Além de possuírem outras características comprovadas por este trabalho, que poderiam auxiliar a manutenção do animal quando submerso, como a formação de polímeros e a alta taxa de metabolismo anaeróbico.

## **7 REFERÊNCIAS**

---

ACKERS, G. K. et al. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. **Science**, v. 255, p.54-63, Jan., 1992.

ALLENDORF, F. W. et al. Isoenzyme locy in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. **Hereditas**. v. 86, n. 2, p. 179-190, 1977.

ALTER, B. P. et al. Globin chain eletrophoresis: a new approach to the determination of the G $\gamma$ /A $\gamma$  ratio in fetal haemoglobin and to the studies globin synthesis. **British Journal of Haematology**. v. 44, n. 4, p. 527-532, Apr. 1980.

ALTMAN, M.; ROBIN, E. D. Survival during prolonged anaerobiosis as a function of an unusual adaptation involving lactate dehydrogenase subunits. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 30, p. 1179-1187, 1969.

AMICONI, G. et al. Evidence for two oxygen-linked binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. **European Journal of Biochemitry**, v. 150, p.387-393, 1985.

ASCOLI, F.; ROSSI-FANELLI, M. R.; ANTONINI, E. Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 72-87, 1981.

ASHLEY, L. M. **Turtle**. 3 ed., WM. C. Brown, 1969, p.48.

BAEYENS, D. A. The kinetic properties and sensitivity to pyruvate inhibition of tissue lactate dehydrogenase in diving and nondiving reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 86, n. 2, p. 259-264, 1987.

BARDGARD, A. et al. Oxygen binding and aggregation of hemoglobin from the common European, *Rana temporaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 117, n. 2, p. 225-231, 1997.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; YOUNG, S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. **Analytical Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 246-248, 1973.

BENESCH, R.; MACDUFF, G.; BENESCH, R. E., Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 81-87, 1965.

BONILLA, G. O. et al. Functional properties of the hemoglobin from the South American snake *Mastigodryas bifossatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 109, n. 4, p.1085-1095, 1994.

BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudianta, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

BRIX, O. et al. Temperature modulation of oxygen transport in a diving mammal (*Balaenoptera acutorostrata*). **Biochemical Journal**, v. 271, n. 2, p. 509-513, Oct., 1990.

BURGGREN, W.; HAHN, C.E.W.; FOËX, P. Properties of blood oxygen transport in the turtle *Pseudemys scripta* and the tortoise *Testudo graeca*: effects of temperature, CO<sub>2</sub> and pH. **Respiration Physiology**, v. 31 p.39-50, 1977.

BURNES, G., CHARDINE, J. W., DARVEAU, C. A. Flight muscle enzyme activities do not differ between pelagic and near-shore foraging seabird species. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 140, p. 53-58, 2005.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3 ed., Artmed, 2000.

CASTELLINI, M. A.; SOMERO, G. N.; KOOYMAN, G. L. Glicolytic enzyme activities in tissues of marine and terrestrial mammals. **Physiology Zoological**, v. 54, p. 242-252, 1981.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.

CHIPARI-GOMES, A. R. et al. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 141, p. 347-355, 2005.

COATES, M. Hemoglobin function in the vertebrates: An evolutionary model. **Journal of Molecular Evolution**, v.6, n.4, p. 285-307, Dec., 1975.

COLOMBO, M. F., SEIXAS, F. A. V. Novel allosteric conformation of Human Hb revealed by the hydration and anion effects on O<sub>2</sub> binding. **Biochemistry**, v.38, n.36, p.11741-11748, 1999.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C., PERSEGIAN, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. **Science**, v. 256, p. 655-659, 1992.

COPPE, Z. L., SCHWANTES, M. L. B., SCHWANTES, A. R. Adaptative features of enzymes from family Sciaenidae – III. Studies on lactate dehydrogenase (LDH) of fishes from the South coast of Uruguay. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.88, n. 3, p. 1005-1012, 1987.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical hematology**. 6 ed. Elsevier Health Sc, 1985, p. 516.

DESSAUER, H. C.; FOX, W.; RAMÍREZ, R. Preliminary attempt to correlate paper-electrophoretic migration of hemoglobins with phylogeny in amphibia and reptilia. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.71, n. 1, p. 11-16, Sep., 1957.

DI PRISCO, G. et al. Oxygen transport in extreme environments. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, n.12, p. 471-474, Dec, 1991.

ERNEST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Smithsonian Institution, 1989, p. 29-30, 182-183, 209-210.

FRISCHE, S. et al. Oxygen binding by single red blood cells from the re-eared turtle *Trachemys scripta*. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 1679-1684, 2001.

FYHN, U. E. H.; SULLIVAN, B. Elasmobranch hemoglobins: dimerization and polymerization in various species. **Comparative Biochemistry Physiology B**, v.50, n 1, p.119-129, Jan., 1975.

FUSON, A. L. et al. Adaptations to diving hypoxia in the heart, kidneys and splanchnic organs of harbor seals (*Phoca vitulina*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4139-4154, 2003.

GAFFNEY, E. S., MEYLAN, P. A. A phylogeny of turtles. In: BENTON, M. J. **The Phylogeny and Classification of the Tetrapods**. V.1, Clarendon Press, 1988. p.157-219.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. Livraria Varela, 1994. p. 169.

GIARDINA, B.; AMICONI, G. Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobin by conventional spectrophotometric procedures. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 417-427, 1981.

GIARDINA, B.; MOSCA, D.; DE ROSA, M. C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, p. 229-244, 2004.

GIARDINA, B. et al. Physiological relevance of the overall  $\Delta H$  of oxygen binding to fetal human hemoglobin. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, p. 512-516, 1993.

GIARDINA, B. et al. Reduced sensitivity of O<sub>2</sub> transport to allosteric effectors and temperature in loggerhead sea turtle hemoglobin: functional and spectroscopic study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1159 p.129-133, 1992.

HLASTALA, M. P.; WOODSON, R. D.; WRANNE, B. Influence of temperature on hemoglobin-ligand interaction in whole blood. **Journal of Applied Physiology**, v. 43, p. 545-550, 1977.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**. Princeton: Princeton University Press, 1984.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**: mechanism and process in physiological evolution. Oxford: Oxford University Press, 2002.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Strategies of biochemical adaptation**. W.B. Saunders, 1973.

HONDA, R. T. **Estudo funcional e estrutural da hemoglobina I do Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces)**. 2001. 120 f. (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

JACKSON, D. C. et al. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western painted turtles (*Chrysemys picta belli*) at 10° C. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, n. 2, p. 221-227, Oct., 2004.

JACKSON, D. C. Metabolic depression and oxygen depletion in the diving turtles. **Journal of Applied Physiology**, v. 24, p. 503-509, 1968.

JELKMANN, W.; BAUER, C. Oxygen affinity and phosphate compounds of red blood cells during intrauterine development of rabbits. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 372, n. 2, p. 149-156, Dec., 1977.

JENSEN, F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, p. 215-227, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**, 2 ed., Sarvier, 1998. p. 127–152.

KOSHLAND, D. E.; NEMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, p. 365-386, 1966.

LIAO, C. H. et al. Lactate dehydrogenase genes of caiman and Chinese soft-shelled turtle, with emphasis on the molecular phylogenetics and evolution of reptiles. **Gene**, v. 279, p.63-67, 2001.

LOMBARDI, F. R. **Análise estrutural e funcional de hemoglobinas de ofídios**. 2004. 150 f. (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

LUTZ, P. L.; LAPENNAS, G. N. Effects of pH, CO<sub>2</sub> and organic phosphates on oxygen affinity of sea turtle hemoglobins. **Respiration Physiology**, v. 48, p.75-87, 1982.

MAGINNISS, L. A., EKELUND, S. A., ULTSCH, G. R. Blood oxygen transport in common map turtles during simulated hibernation. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 2, p. 232-241, 2004.

MARENCO–ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. **Journal Clinical of Pathology**, v. 18, p. 5-7, 1965.

MEYLAN, P. A. **Tree of life**. Disponível em: <http://tolweb.org/Testudines/14861>. Acesso em: 18 dez. 2005.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEAUX, J. P. On the nature allosteric transitions: a plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, p. 88-118, 1965.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Ed. Santos, 1999.

OLIANAS, A. et al. Two sites for GTP binding in cathodic haemoglobins from Anguiliformes. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.141 p. 400-407, 2005.

PARSEGIAN, V. A., et al. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. **Methods in Enzymology**. v. 127, p. 400-416, 1986.

PERES, P. **Análise funcional integrada com modelagem da hemoglobina catódica do peixe *Hoplosternum littorale***. 2004. 99 f. (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

PELLEGRINI, M. et al. Structural-functional characterization of the cathodic haemoglobin *conger ell conger conger*: molecular modelling study of an additional phosphate-binding site. **Biochemical Journal**, v. 372, p. 679-686, Jun., 2003.

PERUTZ, M. F., KILMARTIN, J. V., NISHIKURA, K., FOGG, J. H., BUTLER, P. J. G., ROLLEMA. H. S. Identification of residues contributing to the Bohr effect of Human Haemoglobin, **Journal of Molecular Biology**, v. 138, p. 649-670, 1980.

PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T. B.; WILLIAMSON, D. The chloride effect human haemoglobin: A new kind of allosteric mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, p. 550-560, 1994.

PERUTZ, M. F. et al. Structure of hemoglobin: a three-dimensional at 5,5 resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v.13, p. 416-427, 1960.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. 2 ed., Atheneu, 1999. p. 356.

RANDALL, D. et al. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4 ed. Guanabara Koogan, 2000.

REISCHL, E. Sulphydryl-rich hemoglobins in reptiles: a defense against reactive oxygen species? In: WOODHEAD, A. V. (ed.) **Nonmammalian animal models for biomedical research**, Boca Ranton: CRC Press, 1989. p. 309-318.

REISCHL, E. et al. Bohr effect, electron spin resonance spectroscopy and subunit dissociation of the hemoglobin components from the turtle *Phrynops hilarii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 78, n.1, p. 251-257, 1984.

REISCHL, E. et al. Oxygen binding and acid base status of blood from the freshwater turtle, *Phrynops hilarii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.78, n. 2, p. 443-446, 1984.

REISCHL, E.; HAMPE, O. G.; CRESTANA, R. H. Time course of SH group disappearance from the haemoglobins of the turtle *Phrynops hilarii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 77, n. 1 p.207-210, 1984.

SCHNEIDER, R. G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins – suchas S, D, G and P or A<sub>2</sub>, C, E, and O – by electrophoresis of the globin chains. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1111–1115, Sept., 1974.

SHOEI-LUNG LI, S. Structure, regulation and evolution of vertebrate lactate dehydrogenase genes. **Zoological studies**, v. 37, n.1, p. 1-6, 1998.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Aminolaevolonic dehydrase**, v. 6r, p. 629-641, 1955.

STAWSKI, C. Y. et al. Temperature and respiratory properties of whole blood in two reptiles: *Pogona barbata* and *Emydura signata*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, p. 1-11, 2005.

STORER, I. S. et al. **Zoologia geral**. 6 ed., Ed. Nacional, 2000.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3 ed., Guanabara Koogan, 1992.

SOUTHWOOD, A. L.; DARVEAU, C. A.; JONES, D. R. Metabolic and cardiovascular adjustments of juvenile green turtles to seasonal changes in temperatura and photoperiod. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 4521-4231, 2003.

SULLIVAN, B.; RIGGS, A. Haemoglobin: reversal of oxidation and polymerization in turtle red cells. **Nature**, v. 204, n. 4963, p. 1098-1099, Dec., 1964.

SULLIVAN, B.; RIGGS, A. Structure, function and evolution of turtle hemoglobins – II. Electrophoretic studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 23, p. 449-458, 1967.

SZABO, A.; KARPLUS, M. Analysis of the interaction of organic phosphates with hemoglobin. **Biochemistry**, v. 15, n. 13, p.2869-2877, 1976.

TORSONI, M. A. et al. Effect of thiol reagents on functional properties and heme oxidation in the hemoglobin of *Geochelone carbonaria*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 40, n. 2, p. 355-364, Oct., 1996.

TORSONI, M. A. et al. Functional behavior of tortoise hemoglobin *Geochelone denticulate*. **Brazilian Journal of Biology A**, v. 62, n. 4, p. 725-733, 2002.

VAL, A. L.; SCHWANTES, A. R.; SCHWANTES, M. L. B.; DE LUCA, P. H. Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 992-996, 1981.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, p. 440, 1968.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2 ed., John Wiley and Sons, 1995.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, 2 ed., Artmed, 2002.

WELLS, R. M. G.; BALDWIN, J. Oxygen transport in marine green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings: blood viscosity and control of hemoglobin oxygen-affinity. **The Journal of Experimental Biology**, v. 188, p. 103-114, 1994.

## **8 ANEXOS**

---

# **ANEXO 1**

---

### Protocolo: Análises eletroforéticas

1. *Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8,6*

Tris hidroximetil aminometano	10,2 g
Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
Ácido Bórico	3,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

2. *Tampão pH neutro*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,11 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,66 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

3. *Ponceau*

Ponceau S	0,5 g
Ácido Tricloroacético	5,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

4. *Negro de Amido*

Negro de amido 10B	0,5 g
Álcool metílico	45 mL
Ácido acético glacial	5,0 mL
Água destilada	45 mL

5. *Eletroforese de globinas em pH ácido*

a. *Solução estoque de poliacrilamida (60:0,4)*

Acrilamida	15 g
Bis-acrilamida	0,1 g
Água destilada q.s.p.	25 mL

## b. Uréia 8 M

Uréia	12 g
Água destilada q.s.p.	25 mL

## c. Mercaptoenol 1M

2-Mercaptoetanol	35 µL
Água destilada q.s.p.	500 mL

## d. Tampão para Corrida – Ácido acético 5%

Ácido acético glacial	50 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

## e. Gel de poliacrilamida 12%

Solução estoque	2,5 mL
Ácido acético	625 µL
Uréia 8 M	9,375 mL
Triton X-100	250 µL
Persulfato de amônio a 25%	30 mg
TEMED	100 µL

## f. Tampão de Amostra

Uréia 8M	1,25 mL
Ácido acético glacial	125 µL
2-mercaptoetanol	125 µL
Pironina Y	1,0 mg

6. *Azul de coomassie*

Coomassie G-250	0,4 g
Ácido acético glacial	14 mL
Álcool etílico	100 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

## **ANEXO 2**

---

**Coefficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) para a oxi-hemoglobina ( $\times 10^{-4}M$ ).**

$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ para a oxi-hemoglobina
540	1,46
560	0,87
570	1,18
576	1,58
630	0,014

**Coefficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) da meta-hemoglobina em função do pH ( $\times 10^{-4}M$ ).**

pH	540	560	570	576	630
6,2	0,583	0,357	0,340	0,342	0,394
6,4	0,583	0,358	0,341	0,344	0,392
6,6	0,586	0,363	0,349	0,354	0,391
6,8	0,596	0,372	0,363	0,368	0,388
7,0	0,610	0,387	0,383	0,388	0,384
7,2	0,629	0,406	0,407	0,414	0,376
7,4	0,652	0,430	0,435	0,445	0,363
7,6	0,679	0,460	0,471	0,485	0,344
7,8	0,714	0,497	0,514	0,534	0,310
8,0	0,754	0,542	0,564	0,593	0,293
8,2	0,799	0,589	0,619	0,652	0,268
8,4	0,844	0,636	0,672	0,713	0,243
8,6	0,886	0,679	0,722	0,765	0,220
8,8	0,922	0,716	0,766	0,813	0,199

**ANEXO 3**

---

### Procedimentos para correção da pressão barométrica (P.B.)

1- Transformar a leitura do barômetro, se for em mBar (hPa), em mmHg:

1000mBar (hPa) \_\_\_\_\_ 750,062 mmHg

Portanto: 
$$x = \frac{n * 750,062 \text{ (mmHg)}}{1000}$$

Onde  $x$  é a pressão barométrica corrigida em mmHg e  $n$  a pressão (em hPa) lida no barômetro durante o experimento.

2- Determinar o fator de correção da P.B. interpolando o valor baseado na tabela de correção.

Note que a P.B. da tabela varia de 10 em 10 unidades e a temperatura de uma a uma. Desta forma, o cálculo para valores intermediários de P.B. ou de temperatura é realizado da seguinte forma:

Exemplo: P.B.=757,5 mmHg e T=23,8°C

P.B. T°C	750 mmHg	757,5 mmHg	760 mmHg
23	2,81	X	2,84
23,8		Y	
24	2,93	Z	2,97

X e Z são determinados multiplicando a diferença entre o valor de correção da maior pressão e o valor de correção da menor pressão (ambos na mesma temperatura) pela diferença entre a P.B. medida e a menor P.B., dividido por 10. Somando-se a isto, o menor valor de correção.

$$X = [(2,84 - 2,81) * (757,5 - 750)/10] + 2,81 = 2,8325$$

$$Z = [(2,97 - 2,93) * (757,5 - 750)/10] + 2,93 = 2,96$$

A determinação de Y é realizada pela multiplicação da diferença entre X e Z com o valor da diferença entre a temperatura medida com a menor temperatura. Soma-se isto o valor de X:

$$Y=[(Z - X) * (tc-to)] + X = [(2,96 - 2,83250 * (23,8 - 23)] + 2,8325 = 2,9345.$$

2,9345 é o fator de correção a ser subtraído da P.B. lida.

## CORRECTION FOR BAROMETER (Continued)

BRASS SCALE—METRIC UNITS (Continued)

Temp. °C	Observed height in millimeters																		
	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	
15	1.52	1.54	1.56	1.59	1.61	1.64	1.66	1.69	1.71	1.74	1.76	1.78	1.81	1.83	1.86	1.88	1.91	1.93	
16	1.62	1.64	1.67	1.69	1.72	1.75	1.77	1.80	1.82	1.85	1.88	1.90	1.93	1.96	1.98	2.01	2.03	2.06	
17	1.72	1.74	1.77	1.80	1.83	1.86	1.88	1.91	1.94	1.97	1.99	2.02	2.05	2.08	2.10	2.13	2.16	2.19	
18	1.82	1.85	1.88	1.91	1.93	1.96	1.99	2.02	2.05	2.08	2.11	2.14	2.17	2.20	2.23	2.26	2.29	2.32	
19	1.92	1.95	1.98	2.01	2.04	2.07	2.10	2.13	2.17	2.20	2.23	2.26	2.29	2.32	2.35	2.38	2.41	2.44	
20	2.02	2.05	2.08	2.12	2.15	2.18	2.21	2.25	2.28	2.31	2.34	2.38	2.41	2.44	2.47	2.51	2.54	2.57	
21	2.12	2.15	2.19	2.22	2.26	2.29	2.32	2.36	2.39	2.43	2.46	2.50	2.53	2.56	2.60	2.63	2.67	2.70	
22	2.22	2.26	2.29	2.33	2.36	2.40	2.43	2.47	2.51	2.54	2.58	2.61	2.65	2.69	2.72	2.76	2.79	2.83	
23	2.32	2.36	2.40	2.43	2.47	2.51	2.54	2.58	2.62	2.66	2.69	2.73	2.77	2.81	2.84	2.88	2.92	2.96	
24	2.42	2.46	2.50	2.54	2.58	2.62	2.66	2.69	2.73	2.77	2.81	2.85	2.89	2.93	2.97	3.01	3.05	3.08	
25	2.52	2.56	2.60	2.64	2.68	2.72	2.77	2.81	2.85	2.89	2.93	2.97	3.01	3.05	3.09	3.13	3.17	3.21	
26	2.62	2.66	2.71	2.75	2.79	2.83	2.88	2.92	2.96	3.00	3.04	3.09	3.13	3.17	3.21	3.26	3.30	3.34	
27	2.72	2.77	2.81	2.85	2.90	2.94	2.99	3.03	3.07	3.12	3.16	3.20	3.25	3.29	3.34	3.38	3.42	3.47	
28	2.82	2.87	2.91	2.96	3.00	3.05	3.10	3.14	3.19	3.23	3.28	3.32	3.37	3.41	3.46	3.51	3.55	3.60	
29	2.92	2.97	3.02	3.06	3.11	3.16	3.21	3.25	3.30	3.35	3.39	3.44	3.49	3.54	3.58	3.63	3.68	3.72	
30	3.02	3.07	3.12	3.17	3.22	3.27	3.32	3.36	3.41	3.46	3.51	3.56	3.61	3.66	3.71	3.75	3.80	3.85	
31	3.12	3.17	3.22	3.27	3.32	3.37	3.43	3.48	3.53	3.58	3.63	3.68	3.73	3.78	3.83	3.88	3.93	3.98	
32	3.22	3.28	3.33	3.38	3.43	3.48	3.54	3.59	3.64	3.69	3.74	3.79	3.85	3.90	3.95	4.00	4.05	4.11	
33	3.32	3.38	3.43	3.48	3.54	3.59	3.64	3.70	3.75	3.81	3.86	3.91	3.97	4.02	4.07	4.13	4.18	4.23	
34	3.42	3.48	3.53	3.59	3.64	3.70	3.76	3.81	3.87	3.92	3.98	4.03	4.09	4.14	4.20	4.25	4.31	4.36	
35	3.52	3.58	3.64	3.69	3.75	3.81	3.86	3.92	3.98	4.03	4.09	4.15	4.21	4.26	4.32	4.38	4.43	4.49	

BRASS SCALE—ENGLISH UNITS

**ANEXO 4**

---

## VAPOR PRESSURE OF WATER BELOW 100°C

Pressure of aqueous vapor over water in mm of Hg for temperatures from -15.8 to 100°C. Values for fractional degrees between 50 and 59 were obtained by interpolation.

Temp. °C	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	Temp. °C	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
-15	1.436	1.414	1.390	1.368	1.345	42	61.50	62.14	62.80	63.46	64.12
-14	1.560	1.534	1.511	1.485	1.460	43	64.80	65.48	66.16	66.86	67.56
-13	1.691	1.665	1.637	1.611	1.585	44	68.26	68.97	69.69	70.41	71.14
-12	1.834	1.804	1.776	1.748	1.720	45	71.88	72.62	73.36	74.12	74.88
-11	1.987	1.955	1.924	1.893	1.863	46	75.65	76.43	77.21	78.00	78.80
-10	2.149	2.116	2.084	2.050	2.018	47	79.60	80.41	81.23	82.05	82.87
-9	2.326	2.289	2.254	2.219	2.184	48	83.71	84.56	85.42	86.28	87.14
-8	2.514	2.475	2.437	2.399	2.362	49	88.02	88.90	89.79	90.69	91.59
-7	2.715	2.674	2.633	2.593	2.553	50	92.51	93.5	94.4	95.3	96.3
-6	2.931	2.887	2.843	2.800	2.757	51	97.20	98.2	99.1	100.1	101.1
-5	3.163	3.115	3.069	3.022	2.976	52	102.09	103.1	104.1	105.1	106.2
-4	3.410	3.359	3.309	3.259	3.211	53	107.20	108.2	109.3	110.4	111.4
-3	3.673	3.620	3.567	3.514	3.461	54	112.51	113.6	114.7	115.8	116.9
-2	3.956	3.898	3.841	3.785	3.730	55	118.04	119.1	120.3	121.5	122.6
-1	4.258	4.196	4.135	4.075	4.016	56	123.80	125.0	126.2	127.4	128.3
0	4.579	4.513	4.448	4.385	4.320	57	129.82	131.0	132.3	133.5	134.7
1	4.926	4.858	4.791	4.725	4.655	58	136.08	137.3	138.5	139.9	141.2
2	5.294	5.224	5.157	5.091	5.021	59	142.60	143.9	145.2	146.6	148.0
3	5.685	5.613	5.544	5.475	5.405	60	149.38	150.7	152.1	153.5	155.0
4	6.101	6.027	5.956	5.885	5.813	61	156.43	157.8	159.3	160.8	162.3
5	6.543	6.467	6.393	6.318	6.243	62	163.77	165.2	166.8	168.3	169.8
6	7.013	6.935	6.858	6.781	6.704	63	171.38	172.9	174.5	176.1	177.7
7	7.513	7.433	7.354	7.275	7.195	64	179.31	180.9	182.5	184.2	185.8
8	8.045	7.963	7.882	7.801	7.720	65	187.54	189.2	190.9	192.6	194.3
9	8.609	8.525	8.442	8.359	8.276	66	196.09	197.8	199.5	201.3	203.1
10	9.209	9.123	9.038	8.953	8.868	67	204.96	206.8	208.6	210.5	212.3
11	9.844	9.756	9.669	9.582	9.495	68	214.17	216.0	218.0	219.9	221.8
12	10.518	10.428	10.338	10.248	10.157	69	223.73	225.7	227.7	229.7	231.7
13	11.231	11.139	11.047	10.955	10.862	70	233.7	235.7	237.7	239.7	241.8
14	11.987	11.893	11.799	11.705	11.611	71	243.9	246.0	248.2	250.3	252.4
15	12.788	12.692	12.596	12.500	12.404	72	254.6	256.8	259.0	261.2	263.4
16	13.634	13.536	13.438	13.340	13.242	73	265.7	268.0	270.2	272.6	274.8
17	14.530	14.430	14.330	14.230	14.130	74	277.2	279.4	281.8	284.2	286.6
18	15.477	15.375	15.273	15.171	15.069	75	289.1	291.5	294.0	296.4	298.8
19	16.477	16.373	16.269	16.165	16.061	76	301.4	303.8	306.4	308.9	311.4
20	17.535	17.429	17.323	17.217	17.111	77	314.1	316.6	319.2	322.0	324.6
21	18.650	18.542	18.434	18.326	18.218	78	327.3	330.0	332.8	335.6	338.2
22	19.827	19.717	19.607	19.497	19.387	79	341.0	343.8	346.6	349.4	352.2
23	21.068	20.956	20.844	20.732	20.620	80	355.1	358.0	361.0	363.8	366.8
24	22.377	22.263	22.149	22.035	21.921	81	369.7	372.6	375.6	378.8	381.8
25	23.756	23.640	23.524	23.408	23.292	82	384.9	388.0	391.2	394.4	397.4
26	25.209	25.091	24.973	24.855	24.737	83	400.6	403.8	407.0	410.2	413.6
27	26.739	26.619	26.499	26.379	26.259	84	416.8	420.2	423.6	426.8	430.2
28	28.349	28.227	28.105	27.983	27.861	85	433.6	437.0	440.4	444.0	447.5
29	30.043	29.919	29.795	29.671	29.547	86	450.9	454.4	458.0	461.6	465.2
30	31.824	31.698	31.572	31.446	31.320	87	468.7	472.4	476.0	479.8	483.4
31	33.695	33.567	33.439	33.311	33.183	88	487.1	491.0	494.7	498.5	502.2
32	35.663	35.533	35.403	35.273	35.143	89	506.1	510.0	513.9	517.8	521.8
33	37.729	37.597	37.465	37.333	37.201	90	525.76	529.77	533.80	537.86	541.95
34	39.898	39.764	39.630	39.496	39.362	91	546.05	550.18	554.35	558.53	562.75
35	42.175	42.039	41.903	41.767	41.631	92	566.99	571.26	575.55	579.87	584.22
36	44.563	44.425	44.287	44.149	44.011	93	588.60	593.00	597.43	601.89	606.38
37	47.067	46.927	46.787	46.647	46.507	94	610.90	615.44	620.01	624.61	629.24
38	49.692	49.549	49.406	49.263	49.120	95	633.90	638.59	643.30	648.05	652.82
39	52.442	52.297	52.152	52.007	51.862	96	657.62	662.45	667.31	672.20	677.12
40	55.324	55.177	55.030	54.883	54.736	97	682.07	687.04	692.05	697.10	702.17
41	58.34	58.194	58.047	57.899	57.752	98	707.27	712.40	717.56	722.75	727.98
						99	733.24	738.53	743.85	749.20	754.58
						100	760.00	765.45	770.93	776.44	782.00
						101	787.57	793.18	798.82	804.50	810.21

## **ANEXO 5**

---

**Protocolo: Mobilidade Eletroforética***1. Solução estoque de poliacrilamida 30%*

Bis-acrilamida	0,8 g
Acrilamida	30 g
Água ultra pura q.s.p.	100 mL

*2. Gel Nativo 8%*

Solução estoque de poliacrilamida 30%	5,4 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	4,0 mL
Água ultra pura	10,3 mL
Persulfato de amônio 10%	130 µL
TEMED	20 µL
Volume Final	20 mL

*3. Tampão de Corrida*

Tris-HCl 0,012 M	1,51 g
Glicina 0,096 M	7,21 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

## **ANEXO 6**

---

## Protocolo: Eletroforese Bidimensional

### 1. Solução de rehidratação (IEF)

CHAPS 2%	0,025 g
DTT	0,007 g
Anfólito pH 3-10	1,25 µL
Anfólito pH 6-11	5 µL
Proteína (Variável, depende da concentração da amostra)	100 µL
Água ultra pura q.s.p.	1,25 mL

### 2. Solução de equilíbrio

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	10 mL
Uréia 6 M	72,07 g
Glicerol 30% (v/v)	69 mL
SDS 2%	4 g
Azul de bromofenol 0,002% (w/v)	400 µL
Água bidestilada q.s.p.	200 mL

Para o 1º Equilíbrio adiciona-se á solução anterior:

DTT	0,1 g
-----	-------

Para o 2º Equilíbrio adiciona-se á solução anterior:

IAA	0,25 g
-----	--------

### 3. Gel de poliacrilamida 12,5%

Solução estoque de acrilamida 30%	41,7 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	25 mL
SDS 10%	1 mL
Água bidestilada	31,8 mL
Persulfato de amônio 10%	500 µL
TEMED	33 µL
Volume Final	100 mL

4. *Tampão de Corrida*

Tris 76 mM – Glicina 10 mM	
SDS	5 g
Água bidestilada q.s.p.	5 L

5. *Solução seladora de agarose*

Tampão Tris-HCl 25 mM-Glicina 192 mM com 0,1% SDS pH 8,3	100 mL
Agarose	0,5 g
Azul de bromofenol 0,002%	200 µL