

Rubens Tomio Honda

**Estudo Funcional e Estrutural da
Hemoglobina I do Matrinxã
(*Brycon Cephalus*, Pisces)**

RUBENS TOMIO HONDA

**ESTUDO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA HEMOGLOBINA I DO
MATRINXÃ (*Brycon cephalus*, Pisces)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre
em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista “
Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - S. J. do Rio Preto.



T962/01

**ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO ORLANDO BONILLA
RODRIGUEZ**

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO Jr.

1910000962



São José do Rio Preto - SP
2001

577.3

H771e

Biofísica molecular
hemoglobina de peixe

Assunto CAPES: 2.09.01.00-3 - Biofísica molecular

Honda, Rubens Tomio.

Estudo funcional e estrutural da Hb-I do matrinxã (*Brycon cephalus*,
Pisces) / Rubens Tomio Honda. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.
118 f. : il. : 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez.

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

1. Biofísica molecular – Hemoglobina de peixe – Estudo funcional e
estrutural. 2. Cristalização. 3. Sequenciamento. 4. *Brycon cephalus*
(Pisces). I. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Universidade
Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.
Título.

CDU - 577.3

A meus pais

Kunihiro e Akici

"Muitos fatos acontecem em um universo não menos vasto do que o nosso; de inconcebível pequenez. Torna-se necessário muitas ciências diferentes para nos darem visão de conjunto como conjunto."

(Carl Sagan)



AGRADECIMENTOS

Esta tese é produto de um intenso trabalho e da visão de muitas pessoas. Primeiro sou muito grato ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela orientação, paciência, dedicação e confiança. Especialmente grato pela amizade e pelo apoio em meus estudos.

Sou grato também:

ao coorientador Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. do Depto de Física e membros de sua equipe, Fernanda Canduri, Janaina Conrado L. Fonseca, Plínio Delatorre e Valmir Fadel pela amizade e por ter permitido o uso do laboratório.

ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto e Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, pela amizade e pela coordenação do curso de Pós-graduação.

ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo pela participação na banca de qualificação e também por ter permitido o uso do seu laboratório. Aos membros da sua equipe, Flávio A. Vicente de Seixas, Osmar Caôn e Ocimar Antonio de Castro pelas críticas construtivas e sugestões.

a Profa. Dra. Cláudia Bonini do Depto de Biologia pela participação na banca de qualificação, pela amizade e sugestões.

ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron do Depto de Química e Geociências pelo apoio e sugestões.

ao Prof. Dr. Francisco Langeani Netto do Depto de Zoologia e toda a sua equipe pela orientação taxonômica.

aos funcionário(a)s Eliani Nobuco I. Ohira, João Rodrigues dos Santos, Rita Beatriz de Seixas, Paulo Roberto Salinas, Antônio Aparecido Barboza, Ilva Cecílio Bernardes e a Roselene S. Costa Ferreira pela dedicação em suas funções.

a Profa. Dra. Elisabeth Urbinati e a Damares Perecini Rotviero do CAUNESP de Jaboticabal pelo fornecimento das amostras, pela atenção e serviço prestados.

ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene da USP de Ribeirão Preto, assim como ao Vitor Marcel Faça e a Hélien Julie Laure pela amizade e pela colaboração no sequenciamento. Sou muitíssimo grato.

ao Prof. Dr. Prof. Dr. Arno R. Schwantes da UFSCAR e ao Prof. Dr. Carlos F. Sampaio Bonafé da UNICAMP pela valiosa participação na banca de defesa.

aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas deste instituto: Fabio Renato Lombardi, Laura Leticia de Souza, Maristella Conte Anazetti Cecília Dominical Poy e Hamilton Cabral.

ao "Pesque -Pague Primavera" por ter permitido a coleta de sangue de alguns de seus peixes durante o desenvolvimento deste trabalho.

Muitos outros amigos e colegas me apoiaram em vários aspectos no desenvolvimento deste trabalho. Entre esses amigo(a)s estão:

Fabiola Cristina Zucchi, Juliana Marta Sá, Katiane Mara Ferreira, Lucimara Chioato e Roberto Ruller pela hospitalidade em Ribeirão Preto, amizade e carinho. Sou grato a todos.

Outros que conviveram e me motivaram nesta tese incluem Aleck Zander, André L. Cruz, Daniel Shimura, Gustavo Romero, Marcelo Menin, Marcelo Kokubun, Michael E. Pereira, Marco Unaian, Selma A. Tamashiro e Thiago Izzo.

À CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro.



ΔH	Variação de entalpia
ΔH^+	Variação no número de prótons por hemo
Δn_w	Variação do número de moléculas de água entre a forma oxigenada e desoxigenada
Abs	Absorbância
ATP	Adenosina trifosfato
ATZ	Anilino-tiozolinona
AUFS	<i>Absorption unit full scale</i>
a_w	Atividade d'água
BPG	2,3-Bifosfoglicerato
DMPTU	Dimetilfeniltio-uréia
D.P.	Desvio Padrão (<i>Standard deviation</i>)
DPTU	Difeniltio-uréia
DPU	Difeniluréia
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ENDGP	Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
IPP	Inositol pentafosfato
KNF	(Modelo de) Koshland, Némethy e Filmer
K_R	Constante de ligação do oxigênio para as formas R de hemoglobina
K_T	Constante de ligação do oxigênio para as formas T de hemoglobina
MPD	2-metil - 2,4 pentanediol
MWC	(Modelo de) Monod, Wyman e Changeux
n_{50}	Coefficiente de Hill
Osm	Osmolalidade
p_{50}	Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar metade dos sítios da hemoglobina (Expressa em mmHg)
pCO_2	Pressão parcial de dióxido de carbono
PEG	Polietileno Glicol
PITC	Fenilisotiocianato
pO_2	Pressão parcial de oxigênio
PTH	Feniltio-hidantoína
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance liquid chromatography</i>
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
Y	Saturação fracional
ϵ	Coefficiente de absortividade
Å	Angstrom

K_f	Constante crioscópica ($1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$)
R	Constante dos gases ($1,987 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{grau}^{-1}$)
M_w	Molalidade da água pura (55,5)

Abreviações dos aminoácidos

Gly	G	Glicina
Ala	A	Alanina
Val	V	Valina
Leu	L	Leucina
Ile	I	Isoleucina
Pro	P	Prolina
Phe	F	Fenilalanina
Tyr	Y	Tirosina
Trp	W	Triptofano
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Cys	C	Cisteína
Met	M	Metionina
Asn	N	Asparagina
Gln	Q	Glutamina
Asp	D	Aspartato
Glu	E	Glutamato
Lys	K	Lisina
Arg	R	Arginina
His	H	Histidina



Fig 1a . Esquema do grupo hemo	5
Fig 1b. Grupamento hemo com detalhe das histidinas proximais e distais	5
Fig 2. Destaque do movimento entre as globinas na passagem do estado T para R.	7
Fig 3. Movimento da histidina proximal e a mudança no plano do átomo de ferro quando oxigenado	8
Fig 4. Gráfico destacando a cooperatividade de uma Hb tetramérica com a mioglobina (monomérica)	9
Fig 5. Gráfico de Hill	14
Fig 6. Modelo para o processo de oxigenação segundo Colombo e Seixas, 1999.	16
Fig 7. Sítios de interação do BPG na cavidade central de uma hemoglobina tetramérica	21
Fig 8. Modelo para alosterismo de Monod, Wyman e Changeux . . .	26
Fig 9. Modelo alostérico de Koshland, Némethy e Filmer	28
Fig 10a. Esquema alostérico de Smith e Ackers	31
Fig 10b. Níveis energéticos de Smith e Ackers	32
Fig. 11. Fluxograma das principais etapas envolvidas no estudo	



funcional e estrutural da Hb do *B. cephalus* 34

Fig 12. Fotografia de um exemplar adulto de *B. cephalus* 36

Fig 13. Fotografia de um tonômetro 42

Fig 14. Diagrama de fase para cristalização 49

Fig 15. Esquema da câmara de difusão de vapor para formação do
cristal por *hanging drop* 50

Fig 16. Fluxograma das principais etapas realizadas para
sequenciamento da globina beta da Hb-I do *B. cephalus* 53

Fig 17. Esquema da reação de Edman 62

Fig 18a e b. Fotografias de géis de poliacrilamida com amostras
purificadas e hemolisados individuais. 68

Fig 19. Fotografia de uma cromatografia de troca iônica 69

Fig 20a. Gráficos logp50 x pH da Hb-I (stripped, ATP e NaCl) 71

Fig 20b. Gráfico n50 x pH da Hb-I (stripped, ATP e NaCl) 71

Fig 21. Gráfico de van't Hoff obtido da Hb-I stripped 72

Fig 22a. ln p50 x ln aw da Hb-I em pH 7,0 74

Fig 22b. ln aw x n50 da Hb-I em pH 7,0 74

Fig 23a. ln p50 x ln aw da Hb-I em pH 8,5 76

Fig 23b. ln aw x n50 da Hb-I em pH 8,5 76

Fig 24a. Gráficos logp50 x pH da Hb-II (stripped e ATP)	77
Fig 24b. Gráfico n50 x pH da Hb-II (stripped e ATP)	77
Fig 25. Cristal da Hb-I carbomonoxi	78
Fig 26a. Cromatograma da separação por RP-HPLC das globinas P1 e P2	80
Fig 26b. Recromatografia da P1 em RP-HPLC	81
Fig 27. Cromatograma obtido por RP-HPLC do produto da digestão com CNBr.	83
Fig 28a. Alinhamento da sequência primária da globina β da truta com a sequência determinada do matrinxã	85
Fig 28b. Visão da estrutura terciária, com destaque aos resíduos de aminoácidos do matrinxã que possuem identidade com a globina β da truta	86

I. Variação de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs da Hb-I, na transição do estado desoxigenado para oxigenado em diferentes temperaturas.	73
II. Número de moléculas de água ligadas à superfície exposta na transição do estado desoxigenada para oxigenada em pH 7,0.	74
III. Número de moléculas de água ligadas à superfície exposta na transição do estado desoxigenada para oxigenada em pH 8,5.	75
IV. Média da composição de aminoácido do pico 2 da Hb-I do matrinxã.	82



SUMMARY

RESUMO

1. Introdução 1

1.1 Aspectos gerais 1

1.2 Hemoglobina 3

1.2.1 Comportamento alostérico da hemoglobina 14

1.2.1.1 Efeito Bohr 16

1.2.1.2 Efeito Root 18

1.2.1.3 Efeito Haldane 19

1.3 Ligação do íon cloreto 20

1.4 Ligação do íon fosfato 20

1.5 Efeito da temperatura na afinidade da hemoglobina 21

1.6 Soluções adaptativas de peixes teleósteos para troca gasosa .. 22

1.6.1 Multiplicidade de hemoglobina em peixes teleósteos 23

1.7 Modelo para interação cooperativa ou alosterismo 25

1.7.1 Modelo concertado de alosteria de Monod, Wyman e Chageaux (MWC) (Monod et al., 1965) 25

1.7.2 Modelo seqüencial de Koshland, Némethy e Filmer (KNF), 1966. 27

1.7.3 Estudo termodinâmico de Smith e Ackers, 1985 28

2. Objetivos 32

3. Materias e Métodos 34

3.1 Obtenção dos peixes 35

3.2 Coleta de sangue 35

3.3 Hemólise 37



3.4 Análise das isoformas	38
3.5 Purificação das frações de hemoglobinas (Hbs)	38
3.6 Cálculo da concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina	39
3.7 Análise funcional das iso-hemoglobinas	40
3.7.1 Efeito da temperatura na afinidade por oxigênio	45
3.7.2 Avaliação das mudanças conformacionais pelo método de estresse osmótico (Colombo et al., 1992)	46
3.8 Cristalização da hemoglobina I do <i>B. cephalus</i> ligada a monóxido de carbono	48
3.8.1 Método da matriz esparsa	51
3.9 Determinação da seqüência primária da Hb-I do <i>B. cephalus</i> .	53
3.9.1 Remoção do grupo hemo (apo-hemoglobina)	53
3.9.2 Quantificação de proteína pelo método de Bradford	55
3.9.3 Redução e carboximetilação	56
3.9.4 Reação de vinilpiridiletilação	57
3.9.5 Análise da composição de amino ácido da globina P2 do <i>B.</i> <i>cephalus</i> pelo método Picotag-Derivação Pré-Cromatográfica	58
3.9.6 Método de degradação de Edman	61
3.9.7 Identificação do PTH-amino ácido	63
3.9.8 Hidrólise química da globina P2 com Brometo cianogênico (CNBr)	63
3.9.9 Aplicação de amostras, separadas por HPLC, no seqüen- ciador automático	64



3.9.9.1 Aplicação de amostra em suporte de PVDF (Difluoreto de Polivinilideno)	64
3.9.9.2 Aplicação de amostra em suporte de fibra de vidro ..	65
3.10 Comparação das seqüências	66
4. Resultados	67
4.1 Padrão de separação das iso-hemoglobinas do matrinxã (<i>B.cephalus</i>)	67
4.2 Comportamento funcional	69
4.2.1 Efeito Bohr da hemoglobina I (Catódica)	69
4.2.2 Efeito Bohr da hemoglobina II (componente majoritário) ..	76
4.3 Cristalização da Hb-I	78
4.4 Seqüência primária da globina β da Hb-I do <i>B. cephalus</i>	79
5. Discussão	87
5.1 Padrão de separação das iso-hemoglobinas	87
5.2 Ligação do oxigênio à Hb-I do matrinxã	99
6. Conclusões	97
7. Referências Bibliográficas	99
8. Anexos	
Anexo 1	111
Anexo 2	113
Anexo 3	114
Anexo 4	117
Anexo 5	118
Autorização para reprodução	120



SUMMARY

Despite a large number of studies performed with hemoglobin (Hb), the variety of iso-forms found among fishes leads to diverse structural and functional properties. These animals constitute, accordingly, a valuable source to conduct research of the allosteric mechanisms and the structure-function relationships.

In this work we purified two Hb fractions from the teleost fish 'matrinxã' (*Brycon cephalus*), by ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose, in order to perform functional and structural studies.

Oxygen binding was performed by the tonometric method in the pH range between 6.0 and 9.5 in suitable buffers.

The minor component Hb-I in the stripped form showed no Bohr effect: $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = +0.01 \pm 0.01$. In the presence of 0.1M chloride $\Delta H^+ / \text{heme}$ was -0.02 ± 0.01 , essentially the same behavior.

In the presence of 1mM ATP ΔH^+ was -0.15 ± 0.01 in the pH range between 6.5 to 7.5 with slight inversion above that pH: $\Delta H^+ = +0.14 \pm 0.08$.

Oxygen binding for Hb-I was always cooperative. The cooperativity (n_{50}) in the stripped form and in the presence of chloride was around 1.5, with a small increase in the presence of ATP: a average of 1.8 between pH 6.0 and 8.0.

For the stripped major fraction Hb-II, we observed a large Bohr effect $\Delta H^+ = -0.99 \pm 0.1$ between pH 6.5 and 7.5, becoming suddenly null above that pH: $\Delta H^+ = +0.04 \pm 0.04$. In the presence of ATP, Hb-II exhibits a decrease for oxygen-affinity and an increase of the Bohr effect: $\Delta H^+ =$

-1.54 $\pm$ 0.03 between pH 7.0 and 7.5. As before, at a pH above 8.0 the Bohr effect is null: $\Delta H^+ = -0.05 \pm 0.06$.

Cooperativity exhibits a maximum value reaching 2.0 at pH 7.5, decreasing to around 1 above and below this pH.

The study of the temperature effect on Hb-I oxygenation was performed in the presence or not of allosteric effectors at 15, 20, 25 and 30°C keeping the pH constant at 8.5. For all the experimental conditions (stripped, with chloride and ATP) the enthalpy change remained constant around -15.0 $\pm$ 0.2 kcal/mol of oxygen.

The differential number of water molecules bound per tetramer between the oxy and deoxy states (Δn_w) were studied by the osmotic stress method. At pH 7.0 we found $\Delta n_w = 3.6$ ($\Phi^1 = 6$) for stripped Hb-I, 2.6 ($\Phi = 3$) in the presence of 0.1M chloride and 17.2 ($\Phi = 1$) in a presence of 1mM ATP. At pH 8.0 the Δn_w were 10.4 ($\Phi=4$), 19.4 ($\Phi = 7$) and 7.08 ($\Phi = 7$) in the same conditions. The data show for both pH values a small conformational change for the stripped form and in the presence of chloride, having a greater change in the presence of ATP. In second place, the result shows a pH dependent conformational change, that could be related to some functional findings.

The carbomonoxy-Hb-I was crystallized and diffracted, showing a resolution of 2.5 Angstroms (Honda et al., 2000).

The attempts to sequence Hb-I showed that the alpha-chain N-terminus is blocked. We obtained a partial sequence of the beta-chain: 39 residues from the N-terminus and 12 residues from the C-terminus.

¹ Percentage variation of the residues in terms of the experimental data, where the residues are the difference between the experimental value and its estimation.

The known sequence showed high homology with trout Hb-I (*Onchorhynchus mykiss*) when checked with the published sequences using the software BLAST. Critical residues responsible for the Bohr effect, as well as other residues of the phosphate binding site are changed. The partial sequence allowed us to have a preliminary relationship between the changed residues and the functional findings.



Resumo

Apesar dos vários estudos realizados com hemoglobinas (Hb), a grande multiplicidade numérica e funcional encontrada nos peixes teleósteos ainda é objeto de intenso trabalho, uma vez que tem constituído uma fonte valiosa de informações à respeito dos mecanismos alostéricos e as relações estrutura-função nessas proteínas.

Neste trabalho utilizamos duas Hb purificadas do sangue do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) para realizar estudos funcionais e estruturais. Através de eletroforese não desnaturante foram identificados duas frações, Hb-I (catódica) e Hb-II (anódica). A separação das frações foi feita em cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose em gradiente salino.

O estudo da ligação de oxigênio à hemoglobina purificada, foi realizada pelo método tonométrico-modificado na faixa de pH entre 6,0 a 9,5 em tampão e temperatura apropriados. Para a Hb-I *stripped* foi obtida uma variação de prótons por hemo ($\Delta H^+ = \Delta \log p_{50} / \Delta pH$) igual a $+0,01 \pm 0,01$, sendo que na presença de cloreto o ΔH^+ foi de $-0,02 \pm 0,01$, valor próximo a forma *stripped*, indicando um efeito Bohr nulo na faixa de pH entre 6,5 a 8,5 para a forma *stripped* e 7,0 a 8,0 para a forma com cloreto. Já na presença de ATP o ΔH^+ foi para $-0,15 \pm 0,01$ na faixa de pH entre 6,5 a 7,5 com leve inversão do efeito: $\Delta H^+ = +0,14 \pm 0,08$ na faixa entre 8,5 a 9,0. A cooperatividade (n_{50}) na forma *stripped* e na presença de cloreto situa-se em torno de 1,5, com um leve acréscimo na presença de ATP, assumindo um valor médio de 1,8 na faixa de pH 6 a 8.

Para a Hb-II *stripped* foi observado um acentuado efeito Bohr alcalino $\Delta H^+ = -0,99 \pm 0,1$ entre pH 6,5 a 7,5, enquanto que na faixa de pH entre 7,5 a 9,0 o efeito é nulo: $\Delta H^+ = +0,04 \pm 0,04$. Na presença de ATP a Hb-II apresentou diminuição da afinidade por oxigênio e acréscimo do efeito Bohr: $\Delta H^+ = -1,54 \pm 0,03$ em pH entre 7,0 e 7,5. Em pH entre 8,0 e 9,0 o efeito Bohr é anulado: $\Delta H^+ = -0,05 \pm 0,06$. Os valores de n_{50} apresentam um máximo de 2 em pH 7,5, diminuindo até 1 em valores de pH acima e abaixo desse valor.

O estudo do efeito da temperatura na oxigenação da Hb-I foi realizado na presença e na ausência de efetores alostéricos nas temperaturas 15, 20, 25 e 30°C em pH 8,5, sendo acompanhado pela entalpia de oxigenação (ΔH). Nas três condições experimentais (*stripped*, com cloreto e ATP) a entalpia ficou em torno de $-15,0 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$ de oxigênio.

O número de moléculas de água ligadas à superfície exposta na transição do estado desoxigenado para o oxigenado por tetrâmero (Δn_w) foi acompanhado pelo método de estresse osmótico. Em pH 7,0 foi encontrado um Δn_w de 3,6 ($\Phi^1 = 6$) para a Hb-I *stripped*, 2,6 ($\Phi = 3$) na presença de cloreto 0,1M, e 17,2 ($\Phi = 1$) na presença de ATP 1mM. Em pH 8,5 os valores de Δn_w foram de 10,4 ($\Phi = 4$), 19,4 ($\Phi = 7$) e 7,08 ($\Phi = 7$) nas mesmas condições. Os dados mostram para ambos valores de pH pouca mudança conformacional para a forma *stripped* e na presença de cloreto, havendo uma mudança maior na presença de ATP. Em segundo lugar, os dados mostram alterações conformacionais dependentes do pH, que têm paralelo com mudanças na afinidade por oxigênio e efeito Bohr conforme varia o pH.

Os experimentos de cristalização permitiram a obtenção da forma cristalizada da Hb-I ligada a monóxido de carbono, mostrando resolução de 2,5 Angstroms (Honda et al, 2000).

As tentativas de sequenciamento da Hb-I nos permitiu verificar o bloqueio do N-terminal da globina alfa, e a obtenção de 39 resíduos da porção N-terminal e 12 resíduos da C-terminal da globina beta. A comparação destas sequências com os disponíveis nos bancos de dados apontou a Hb-I da truta (*Oncorhynchus mykiss*) como sendo a mais próxima.

Foram encontradas substituições que afetam resíduos responsáveis pelo efeito Bohr e a ligação de fosfatos. Relacionando os principais resíduos responsáveis pelo efeito Bohr com os resíduos da Hb catódica do *B. cephalus* foi possível apontar uma relação entre os aspectos funcionais e estruturais desta hemoglobina.

¹Variação percentual dos resíduos em relação aos dados experimentais, onde os resíduos são a diferença entre o ponto experimental e o ajuste.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais

O oxigênio é encontrado livremente na atmosfera, e contribui com cerca de 21% para a constituição desta. Esse gás é utilizado no metabolismo aeróbico¹ como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, produzindo água e dióxido de carbono, sendo este último liberado para o ambiente pelos órgãos de troca gasosa.

A obtenção de oxigênio a partir do ambiente é um processo relativamente simples para os organismos unicelulares aquáticos. O gás é adquirido por difusão espontânea da atmosfera para o interior citoplasmático através da superfície celular. Conseqüentemente, pequenos organismos não requerem estruturas respiratórias especializadas para obter oxigênio ou para liberar CO₂, nem sistema circulatório especializado.

¹ Muitos seres vivos realizam metabolismo aeróbico para suprir suas necessidades energéticas. O rendimento neste processo é quase 20 vezes maior que o obtido em metabolismo anaeróbico. Estas comparações são feitas em termos da quantidade de ATP obtida por molécula de glicose oxidada, o principal combustível celular.



A evolução dos animais multicelulares maiores e mais complexos, tornou impossível atender à demanda de oxigênio pela simples difusão. Assim, pressões evolutivas dentro do *filo* dos animais levaram a significativas modificações no sistema de troca gasosa pela superfície do corpo. As principais são:

1- o aumento na taxa metabólica na evolução de seres unicelulares para seres ectotérmicos e endotérmicos ².

2- o aparecimento de estruturas anatômicas, com funções específicas, como por exemplo, sistema digestivo, reprodutor, de locomoção e visão. Não encontrados em organismos unicelulares ou multicelulares ancestrais.

3- a mudança da respiração aquática para a aérea, que foi acompanhada da conquista do ambiente terrestre.

A evolução no sentido dos animais maiores e metabolicamente mais ativos foi invariavelmente acompanhada com o desenvolvimento de estruturas mais especializadas e mais complexas na troca gasosa.

² Os termos ecto e endotérmico referem-se aos seres vivos cuja temperatura corporal varia com a do ambiente e aos que possuem temperatura estável, respectivamente.



De igual importância foi a capacidade para fazer circular o oxigênio através do corpo com fluidos especializados (por exemplo: sangue e hemolinfa) através de sistemas vasculares auxiliados com a ação de um ou mais órgãos de bombeamento.

O sangue é o fluido que circula no interior do corpo para transportar gases, nutrientes e produtos de excreção das células. Muitas vezes contém a hemoglobina³ (Hb), presente no interior das células sanguíneas (eritrócitos) ou livre em solução. Essa proteína eleva significativamente a capacidade de transporte de oxigênio do sangue em relação à quantidade que poderia transportar por simples dissolução.

1.2 Hemoglobinas

As hemoglobinas têm sido utilizadas como modelo para compreensão do controle alostérico e da ligação cooperativa (Bettati et al., 1998; Di Cera et al., 1988; Perutz et al., 1993.). Nos vertebrados elas são constituídas por quatro globinas, duas do tipo α e duas do tipo β ,

³ Em algumas fontes bibliográficas a hemoglobina pode aparecer como pertencendo ao grupo das “proteínas respiratórias” ou “pigmentos respiratórios”.

mantidas juntas por ligações não covalentes (interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes salinas).

A capacidade da hemoglobina de se ligar reversivelmente ao oxigênio depende da presença de uma unidade não protéica, chamada hemo (grupo prostético). Cada globina possui um grupamento hemo (Figura 1a e b), e uma hemoglobina sem este grupo é chamada de apo-hemoglobina.

A grande maioria dos resíduos da globina nativa participam da estrutura secundária do tipo alfa hélice.

Com a determinação da primeira estrutura cristalográfica através de raio-X, estes segmentos helicoidais foram designados pelas letras do alfabeto na ordem crescente de A a H de acordo com nomenclatura proposta por Kendrew et al., 1961. As regiões intermediárias entre duas hélices sucessivas são designadas pelas letras das regiões conectadas, como região BC ou FG, para as regiões compreendidas entre as hélices B e C e F e G, respectivamente.



Os resíduos são descritos tomando-se o número do aminoácido em relação ao segmento em que se encontra, o qual é codificado pelas letras A a F com base nas oito hélices, nas sete regiões intermediárias e nas duas regiões terminais. Desta forma, o aminoácido histidina da hélice E na posição 7 é designado His E7 ou, mais precisamente, His E7(63) β , presente na cadeia β . O número entre parênteses representa o número do

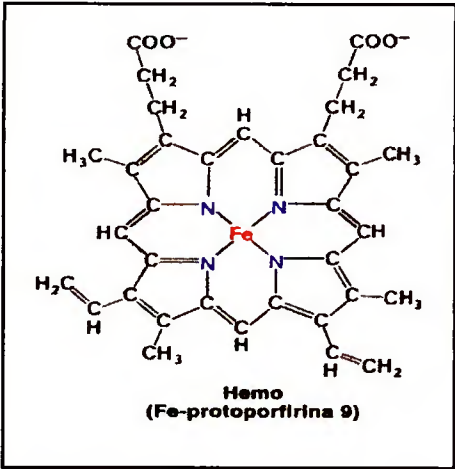


Figura 1a. Estrutura do grupamento hemo composta pela parte orgânica, protoporfirina (quatro anéis pirrólicos). O átomo de ferro no centro se liga aos quatro nitrogênios no centro do anel protoporfirínico. Reproduzido de Stryer, 1996.

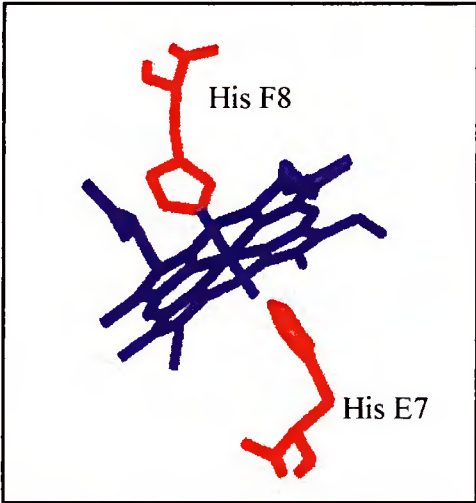


Figura 1b. Representação atômica do ancoramento covalente do grupo heme em uma cadeia polipeptídica de mioglobina ou hemoglobina. A histidina proximal, His F8(92) β , é ligada covalentemente ao átomo de ferro no centro do grupo hemo. Gerado a partir do programa Swiss Pdbviewer v3.6b3.

resíduo na cadeia contado a partir da extremidade N (amino) terminal da cadeia.

Os resíduos hidrofílicos, carregados ou não, dispersam-se em sua maior parte, na superfície da molécula e estão em íntimo contato com o solvente, com o qual formam ligações de hidrogênio, auxiliando a estabilização das conformações nativas da proteína e a sua solubilização em meio aquoso. A maioria das substituições na superfície da hemoglobina não leva à conseqüências perceptíveis⁴. Entretanto, trocas por aminoácidos próximas do grupo hemo afetam o local de ligação ao oxigênio, em vários casos promovendo a auto-oxidação.

Muitas alterações no interior da molécula distorcem a estrutura terciária e produzem hemoglobinas instáveis. Mudanças na interface das subunidades levam a alterações nas propriedades funcionais (Stryer, 1996; Horimoto et al., 1990; Bashford et al., 1987; Lesk & Cothia, 1980; Perutz et al., 1965).

⁴ Uma exceção notável é a anemia falciforme ou Hb S, na qual um resíduo de Glutamato é trocado por um de Valina, levando à polimerização na forma de fibras quando se encontra no estado desoxigenado.



No processo de ligação/dissociação do O_2 , a hemoglobina tetramérica sofre uma mudança estrutural, consistindo de um rearranjo que afeta as quatro subunidades (Perutz, 1979)(Fig 2).

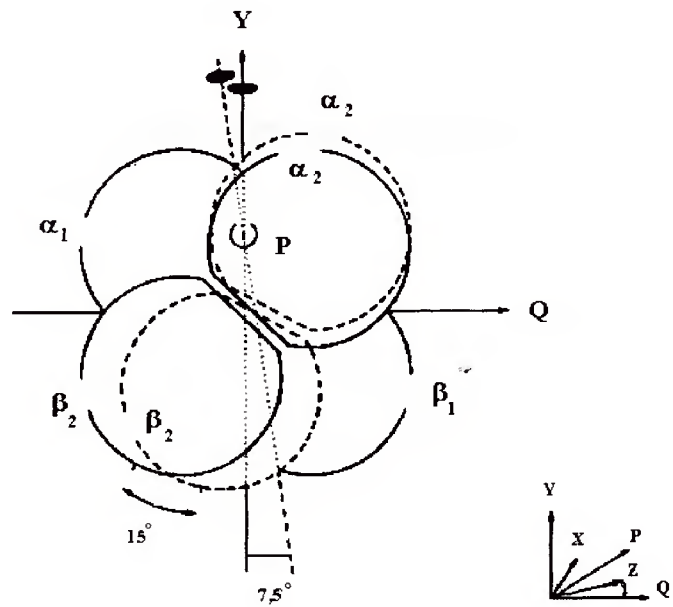


Figura 2. Representação gráfica da mudança estrutural quaternária na oxigenação. Existe uma movimentação de 15° do dímero $\alpha\beta$ em relação ao outro (Perutz, 1979).

O átomo de ferro, que na forma desoxigenada se encontra deslocado 0.6 Angstroms, se move para o plano da porfirina, a fim de formar uma ligação forte com o O_2 , e o hemo se torna plano (Figura 3).

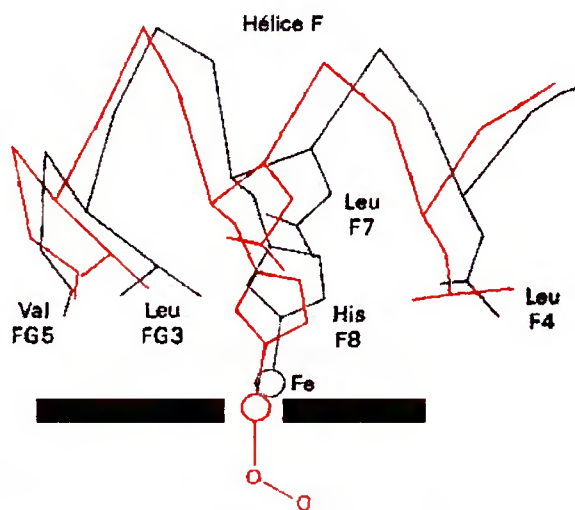


Figura 3. O movimento do átomo de ferro na oxigenação determina uma mudança conformacional na globina. A estrutura oxigenada está mostrada em vermelho e a estrutura desoxigenada em preto (Baldwin & Chothia, 1979).

Este movimento leva a uma diminuição da estabilidade da estrutura quaternária desoxigenada, que leva ao aumento da afinidade a partir de sucessivas ligações (Baldwin & Chothia, 1979) (Fig 4).

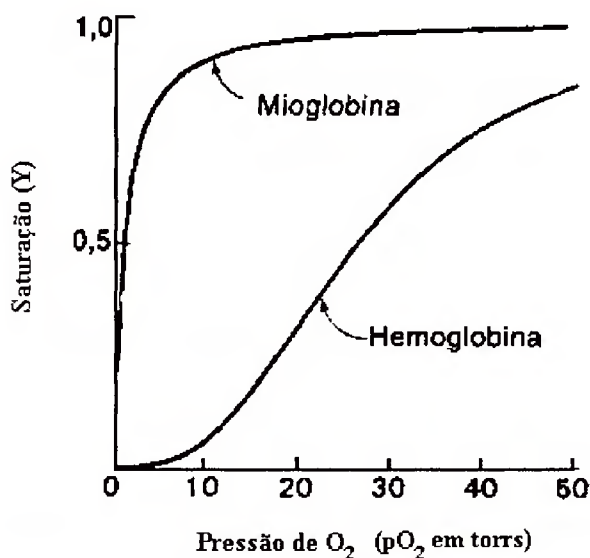


Figura 4. Curvas de oxigenação da mioglobina (hiperbólica) e da hemoglobina (sigmoidal). (Stryer, 1996)

A ligação da primeira molécula de O₂ à hemoglobina facilita as ligações de O₂ seguintes à mesma molécula de hemoglobina, isto é, o O₂ se liga de forma cooperativa. Esta propriedade é chamada de efeito homotrópico. Neste processo a hemoglobina passa de um estado desoxigenado tenso (T), com menor afinidade por oxigênio para um estado conformacional com maior afinidade pelo gás (R).

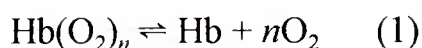
Por outro lado a mioglobina, que possui como principais função o armazenamento⁵, transporte de oxigênio nos músculos até a mitocôndria e manutenção da concentração de oxigênio no interior das células, é uma molécula monomérica; em outras palavras, a ligação do oxigênio a ela não ocorre por um processo cooperativo.

A saturação Y é definida com a fração ocupada de todos os centros hemo de ligação ao oxigênio. O valor de Y pode variar de 0 (todos os centros vazios) a 1 (todos centros ocupados). O gráfico de Y versus pO_2 (pressão parcial do oxigênio), é chamado de curva de dissociação do oxigênio. As curvas de dissociação do oxigênio da mioglobina e da hemoglobina diferem de duas maneiras (Fig 4).

Para qualquer pO_2 dado, Y é maior para a mioglobina do que para a hemoglobina. Isto significa que a mioglobina tem maior afinidade por oxigênio do que a hemoglobina, além de ter sua afinidade independente do pH. A afinidade da Hb por oxigênio pode ser caracterizada por um valor denominado " P_{50} " que é a pressão parcial de oxigênio na qual 50% dos centros estão ocupados (ou seja, na qual $Y = 0,5$).

⁵ A função de armazenamento seria restrita aos animais que fazem mergulho e possuem grandes quantidades de mioglobina nos seus músculos, a exemplo da baleia, cachalote, focas, etc.

Em 1913, Archibald Hill mostrou que a curva de oxigenação da Hb, determinada experimentalmente, pode ser descrita por uma equação deduzida para o equilíbrio hipotético:



A constante de equilíbrio K para a dissociação da oxi-hemoglobina é:

$$K = \frac{[\text{Hb}] [\text{O}_2]^n}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]} \quad (2)$$

A saturação fracional Y (fração de sítios ocupados com o ligante) será:

$$Y = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n] + [\text{Hb}]} \quad (3)$$

$$Y = \frac{\frac{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n}{K}}{\frac{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n}{K} + [\text{Hb}]} = \frac{\frac{[\text{O}_2]^n}{K}}{\frac{[\text{O}_2]^n}{K} + 1} \quad (4)$$

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

Pela lei de Henry, $[O_2]_{\text{diluido}} = k_H \cdot pO_2$ temos:

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

Como para a hemoglobina $K = (P_{50})^n$, então :

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n} \quad (7)$$

podemos agora calcular a fração de sítios saturados sobre os não saturados, a partir da equação 7 :

$$\frac{Y}{1 - Y} = \left(\frac{pO_2}{P_{50}} \right)^n \quad (8)$$

Tomando o logaritmo de ambos os membros, temos:

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

Um gráfico de $\log[Y/(1-Y)]$ versus $\log pO_2$, chamado de “Gráfico de Hill” (Figura 5), aproxima-se de uma linha reta na região em que corta o eixo X em $Y=0,5$, e sua inclinação (n) na faixa intermediária de saturação é chamada de “coeficiente de Hill”. O valor de n é diretamente proporcional à cooperatividade da ligação de O_2 . Se $n = 1$ significa que o O_2 se liga à proteína de forma não cooperativa, como no caso da mioglobina.

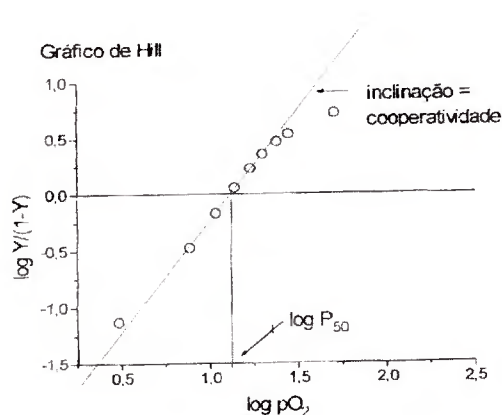


Figura 5. Gráfico de Hill para ligação de O_2 na hemoglobina. A inclinação da curva fornece a cooperatividade da reação (n) e a interseção com o eixo X fornece a pressão de O_2 quando metade dos sítios de ligação da molécula estiverem saturados.

1.2.1 Comportamento alostérico da hemoglobina

A afinidade da Hb por O_2 está sujeita às condições do meio, tais como pH, pCO_2 , concentração de ânions, etc. Os efetores alostéricos fosfatados não são comuns a todas as hemoglobinas, isto é, na hemoglobina adulta da maioria dos mamíferos é o 2,3-bifosfoglicerato (BPG), nos passáros é o inositol pentafofato (IPP) e adenosina trifosfato (ATP) ou guanosina trifosfato (GTP) em peixes teleósteos (Gillen &

Riggs, 1972; Tan et al. 1972; Brunori et al. 1973; Cirooto & Geraci 1975; Isaacks et al. 1976; Chien & Mayo 1980).

Recentemente Colombo et al. (1992) mostraram também o efeito da água de solvatação na estabilização do estado R, desenhando uma metodologia de análise de alterações conformacionais através do controle da atividade de água a_w . Os autores demonstraram que a afinidade da hemoglobina por oxigênio está relacionada com a atividade d'água (a_w), evidenciando que a água não só atua como solvente do sistema biológico, mas também como um ligante com importante papel regulador de diversos processos biológicos a nível molecular.

Para a Hb humana foi observada que 70 ± 2 moléculas de água são ligadas na transição do estado totalmente desoxigenado para o totalmente oxigenado (Colombo et al., 1992; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996).

Em continuidade com esse trabalho Colombo e Seixas (1999) demonstraram que a variação do número de moléculas de água ligadas à hemoglobina, na passagem do estado desoxigenado para o oxigenado é dependente da concentração de ânions presentes em solução. Desta forma, eles sugerem a existência de um estado conformacional



intermediário (P) na presença de ânions e número de moléculas de água ligadas, na passagem de P para R (Figura 6).

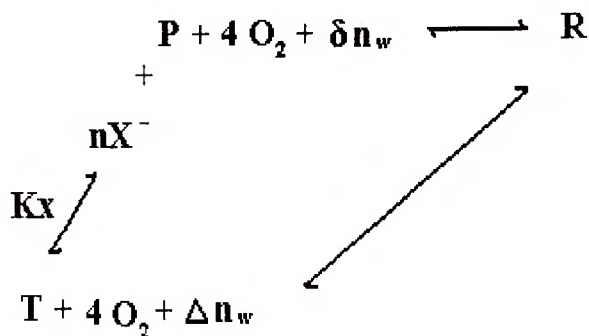


Figura 6. Modelo para o processo de oxigenação da Hb. δn_w representa o número de moléculas de água que são ligadas à Hb na transição entre os estados P e R, Δn_w é o número de moléculas de água na transição entre T e R; Kx é a constante de dissociação do ânion ao estado T e nX^- é a relação estequiométrica do ânion com a desoxi-Hb para a estabilização do estado da Hb. Modelo proposto por Colombo e Seixas, 1999.

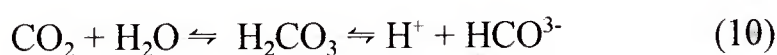
1.2.1.1 Efeito Bohr

A variação da afinidade por oxigênio em virtude da ligação de prótons é denominada efeito Bohr. O mesmo divide-se em dois subtipos: o efeito alcalino e o efeito ácido. O primeiro se relaciona à captação de prótons (H^+) quando ocorre a liberação de O_2 do grupamento hemo e o

efeito Bohr ácido, prótons são ligados quando ocorre a ligação do oxigênio.

O aumento de dióxido de carbono no plasma e sua rápida hidratação causa uma elevação do ácido carbônico (H_2CO_3), por ação da anidrase carbônica, constituindo a forma de transporte no plasma da maior parte do CO_2 .

(Anidrase carbônica)



O aumento na concentração desse e de outros ácidos (principalmente o ácido láctico) diminui o pH do plasma provocando uma queda na afinidade da hemoglobina por oxigênio. Este efeito (Bohr alcalino) é mais comumente encontrado nos vasos sangüíneos dos tecidos, onde há uma concentração maior de prótons e dióxido de carbono, decorrentes da atividade celular.

O mecanismo de transporte de CO_2 no sangue é fundamentalmente diferente do transporte de O_2 . O CO_2 é mais solúvel do que o O_2 e possui maior coeficiente de difusão. Desta forma, uma considerável quantidade de CO_2 está presente no sangue a uma baixa pCO_2 .



O restante do CO_2 é transportado pela Hb, na forma de carbamato ligado reversivelmente, aos grupos aminos terminais, daí que o dióxido de carbono possa diminuir a afinidade da hemoglobina mesmo a um pH constante, devido à sua ligação ocorrer diretamente com os grupos amino terminais das cadeias de hemoglobina (Schmidt-Nielsen, 1999; Stryer, 1996).

Nos peixes o CO_2 também é transportado na forma de bicarbonato, assim como em outros vertebrados; no entanto, o bicarbonato nas brânquias é desidratado para CO_2 ainda dentro dos eritrócitos e então difundido através do epitélio da brânquia para a água (Randall & Val, 1993).

1.2.1.2 Efeito Root

Este efeito, freqüentemente descrito como sendo um efeito Bohr alcalino exagerado, ocorre quando um aumento da concentração de prótons diminui a capacidade de transporte de O_2 , impedindo a total saturação da hemoglobina, mesmo com a aplicação de O_2 puro hiperbárico.



A consequência mais significativa do efeito Root em Hb de peixe tem a ver com a função do sangue na secreção de oxigênio para o interior da bexiga natatória. A bexiga natatória dos peixes teleósteos regula o volume de gás, no seu interior, de acordo com a profundidade da água e desta forma ela têm um mecanismo involuntário de bombeamento de O_2 que mantém regulado o volume do órgão. Para acontecer a secreção de oxigênio, a glândula de gás libera ácido láctico nos capilares aferentes da bexiga natatória. A liberação de H^+ reduz o pH do sangue; em virtude disso, ocorre a redução da afinidade da hemoglobina por O_2 (efeito Root) e força sua liberação na solução; isto aumenta a pO_2 localmente, levando o O_2 para o interior da bexiga natatória (Withers, 1992).

1.2.1.3 Efeito Haldane

Este efeito é recíproco ao efeito ao Bohr alcalino, ocorre principalmente nos capilares alveolares dos pulmões ou nas brânquias onde há uma maior pressão de O_2 . Neste efeito a ligação de O_2 à hemoglobina promove a liberação de íons H^+ .



1.3 Ligação do íon cloreto (Cl^-)

O Cl^- se liga preferencialmente à forma desoxigenada, estabilizando o estado T. Bonaventura & Bonaventura (1978) propuseram que o excesso de cargas positivas na cavidade central, desestabiliza a estrutura T por repulsão eletrostática, e através disto leva o equilíbrio alostérico para a forma estrutural R de maior afinidade. Recentemente tem sido proposto que o efeito do Cl^- é realizado por neutralização das cargas positivas na cavidade central (Perutz et al., 1993).

1.4 Ligação do íon fosfato

Estudos de cristalografia têm demonstrado que apenas uma molécula de fosfato orgânico é ligada a uma molécula de desoxi-hemoglobina humana (Arnone, 1972) e o N-terminal da cadeia β está envolvido na interação iônica com o fosfato (Benesch & Benesch, 1974)(Figura 7).



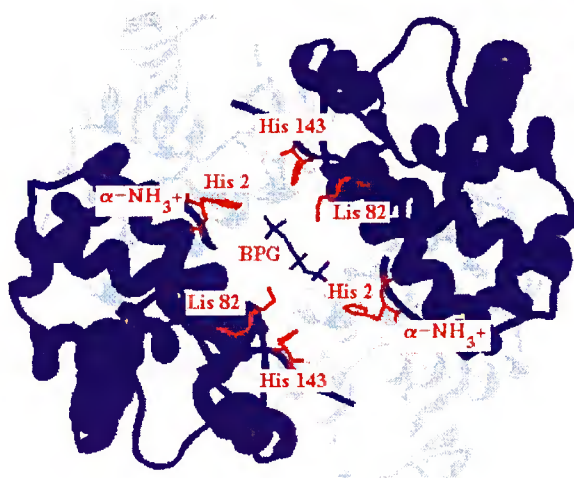


Figura 7. Sítio de ligação do BPG na cavidade central de uma hemoglobina tetramérica. O BPG interage com quatro grupamentos de resíduos de aminoácidos com carga positiva em cada globina β . São eles : His 2, Lis 82, His 143 e grupo alfa amino da Val 1.

1.5 Efeito da temperatura na afinidade da hemoglobina

O aumento da temperatura, na maioria das vezes, produz diminuição da afinidade por O_2 , resultando na descarga de oxigênio nos tecidos (Mayo & Chien, 1980; Carey & Gibson, 1977; Jensen & Weber, 1987) e o efeito da temperatura sobre a afinidade da Hb tem sido acompanhada pela determinação da entalpia de oxigenação (ΔH) (Fago et al., 1997; Binotti et al., 1971; Bonilla et al., 1994).

Animais ectotérmicos como anfíbios, peixes e répteis, sujeitos às variações de temperatura ambiental, eventualmente sofrem alterações significativas das propriedades de transporte de oxigênio do sangue.

1.6 Soluções adaptativas de peixes teleósteos para troca gasosa

Várias soluções adaptativas são encontradas para suprir os baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, principalmente em peixes da Amazônia, onde são encontrados vários ambientes como rios, lagos, paranás (canais), igarapés (canais menores), praias, várzeas (área plana inundada) e igarapós (área de floresta inundada), que possuem uma grande variação no oxigênio dissolvido na água (Val, 1996). Soluções como a respiração aérea acessória têm surgido há muito tempo neste animais, podendo ser respiração aérea obrigatória (ex: *Arapaima gigas* e *Lepidosiren paradoxa*) ou em alguns casos acessória (ex: *Hoplosternum littorale* e *Liposarcus anisitsi*). Estes tipos de respiração consistem no comportamento do animal subir à superfície e ingerir pequenas quantidades da água superficial, onde há maior concentração de oxigênio, ou então efetuar golfadas de ar. Neste sentido também são encontrados



vários locais onde pode ocorrer a troca gasosa: epitélio faringeal, câmara brânquial, bexiga natatória, pulmão verdadeiro, estômago, intestino e lábios (Val, 1996., De Oliveira et al. 2001).

A hemoglobina está na interface ambiente-organismo deparando-se com as variações de concentração do oxigênio no ambiente. Uma série de mecanismos fisiológicos e bioquímicos procura garantir a oxigenação adequada dos tecidos (Weber e Jensen, 1988).

Adaptações encontradas nas propriedades funcionais da hemoglobina no transporte de oxigênio, estão associadas com diferenças na estrutura molecular, e são encontrados em diferentes espécies de peixes e em iso-hemoglobinas descritas num mesmo indivíduo (Weber, 1996).

1.6.1 Multiplicidade de hemoglobinas em peixes teleósteos

Os peixes provavelmente foram os primeiros vertebrados a usarem a hemoglobina como transportadora de oxigênio (Di Prisco & Tamburrini, 1992).



O sistema de transporte de oxigênio nestes animais é caracterizado por múltiplas hemoglobinas (Riggs, 1970), que podem ou não apresentar propriedades funcionais diferentes. A grande multiplicidade tanto em número como em propriedades das Hbs de peixes, obviamente reside no polimorfismo nos loci de globina constituintes dessas Hbs, e duas hipóteses são levantadas para a evolução desse polimorfismo. A primeira seria chamada “selecionista”, tendo embutida a seleção de características com “valor adaptativo”, enquanto a segunda seria a “neutralista”, explicando a diversidade de Hb simplesmente por mutações neutras e deriva genética (Pérez et al., 1995., Kimura, 1989).

A análise exhaustiva dos dados referentes às Hbs de várias espécies de peixes leva a apoiar em definitivo, a segunda hipótese, como causal da maioria absoluta das variações de sequência (Pérez et al. 1995).

Em vários casos as hemoglobinas de peixes têm isoformas que não possuem diferenças funcionais entre si. Um exemplo típico é o relatado por Gillen e Riggs (1972) para carpa (*Cyprinus carpio*) e Weber et al. (1976a) para *Amia calva*.

A coexistência de isoformas com funções distintas tem encorajado, por outro lado, aos partidários do valor adaptativo. De fato, os exemplos



das Hb de truta (Brunori, 1975) e atum (Rossi-Fanelli e Antonini, 1960) dão sustentação a essa corrente, uma vez que seria possível achar uma “explicação plausível” para a função das Hb face a determinadas circunstâncias fisiológicas.

Desta forma, pode ser suposto que espécies com Hb múltiplas atuando em combinação, poderia ter melhor capacidade de transporte de gás durante variações ambientais. Sendo assim, a heterogeneidade da Hb teria valor seletivo em ambientes instáveis.

1.7 Modelos para interação cooperativa ou alosterismo

1.7.1 Modelo concertado de alosteria de Monod, Wyman e Chageaux (MWC) (Monod et al., 1965)

Muitos trabalhos com proteínas alostéricas têm se baseado no modelo alostérico MWC de Monod, Wyman e Changeaux (1965).

Este modelo propõe a existência das duas estruturas quaternárias (R ou T) que estão em equilíbrio uma com a outra (Figura 8).



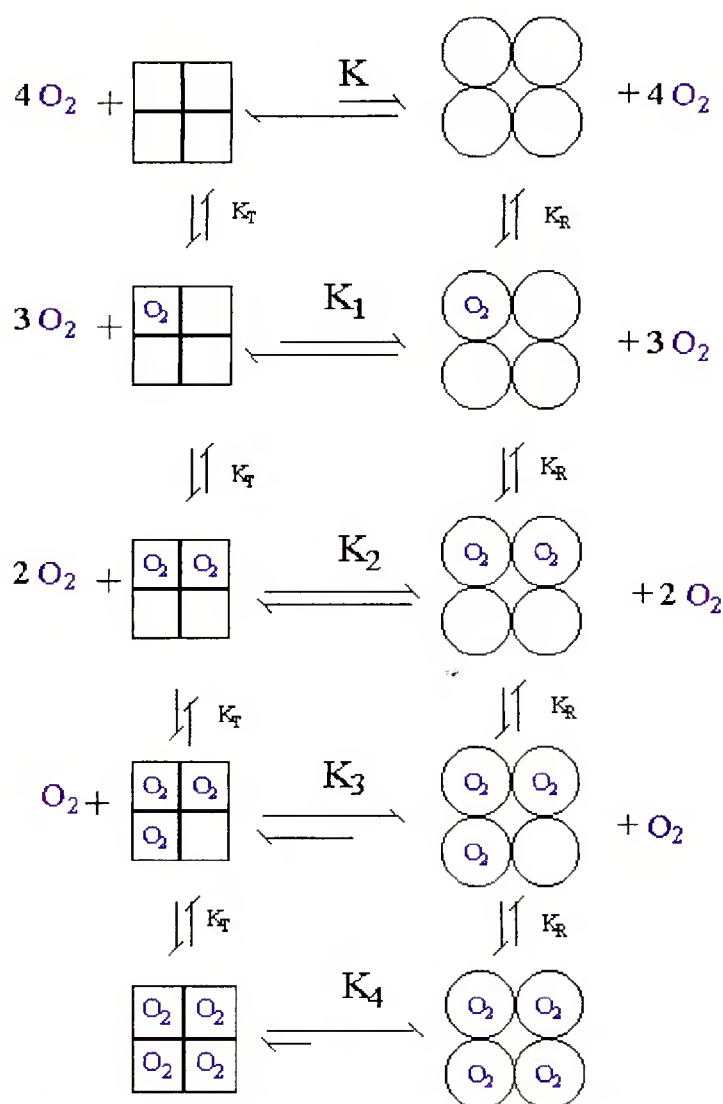


Figura 8 . Ilustração do modelo MWC (concertado) para sistema alostérico com cooperatividade positiva de ligação, utilizando uma hemoglobina tetramérica hipotética. Neste modelo há somente dois estados conformacionais, T e R, com constantes de ligação individuais K_T e K_R , respectivamente (Chang, 1985).

Na ausência do substrato, a enzima existe principalmente na forma T, em equilíbrio com pequenas quantidades da forma R. A presença do substrato desloca o equilíbrio para a produção de mais formas R.

O aumento ou a diminuição da afinidade pelo oxigênio na presença de efetores alostéricos, é explicado pela estabilização de uma das conformações, aumentando ou diminuindo o valor da constante de equilíbrio (K) entre R e T (Campbell, 1995; Baldwin, 1976; Riggs, 1998) e desta forma explicando o efeito cooperativo positivo.

1.7.2 Modelo Seqüencial KNF - (Koshland, Némethy e Filmer, 1966)

Neste modelo as subunidades da forma tetramérica $\alpha_2\beta_2$, podem ser encontradas nos estados conformacionais R ou T. A ligação do primeiro O_2 muda a conformação da subunidade de T para R, facilitando a mesma modificação a subunidades vizinhas (Koshland et al., 1966).

Além disso, por considerar a alteração das subunidades de maneira seqüencial, somente o modelo KNF pode ser utilizado para descrever os



efeitos de cooperatividade positiva quanto os de cooperatividade negativa, quando a ligação de O_2 é progressivamente dificultada.

Neste modelo o aumento ou a diminuição da afinidade na presença de efetores alostéricos, é explicada com base nas modificações na estrutura terciária das subunidades, estabilizando a forma R ou T respectivamente (Fig 9).

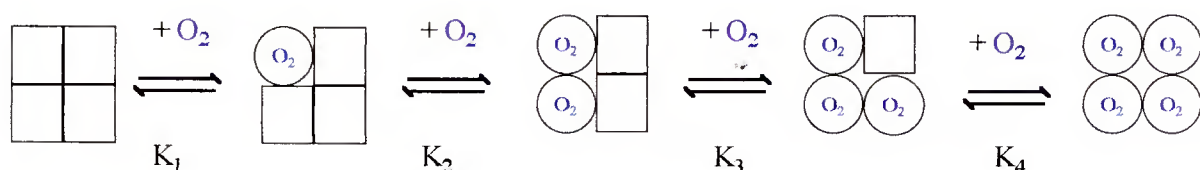


Figura 9. Ilustração do modelo sequencial para ligação cooperativa. A ligação de cada ligante induz uma mudança conformacional na subunidade ligada e em subunidades vizinhas; com isto, aumenta a afinidade por outros ligantes.

1.7.3 Estudo termodinâmico de Smith & Ackers, 1985.

Smith & Ackers estudaram as mudanças do estado termodinâmico no processo de oxigenação de uma hemoglobina tetramérica, como reflexo do comportamento energético da molécula.

Desta maneira, foram obtidas dez espécies tetraméricas e foram calculadas as energias livres de cooperatividade para cada etapa da adição

de uma molécula de oxigênio. Os resultados indicam que a transição do estado $T \rightarrow R$ é acompanhada de três estágios, sendo confirmados por três níveis de energia livre (Fig 10 a e b).

1. A ligação do primeiro ligante gera a transição entre os dois primeiros níveis de energia livre de cooperatividade (11 e 12). Esta transição dispense 3kcal de energia livre quando a subunidade α ou β tornam-se ligadas.

2. O resultado é que altera o tetrâmero (espécies 11 e 12) passando para um segundo nível de energia livre de cooperatividade e para o segundo ou terceiro passo da ligação, dependendo de onde o segundo ligante estará ligado (21 ou 22).

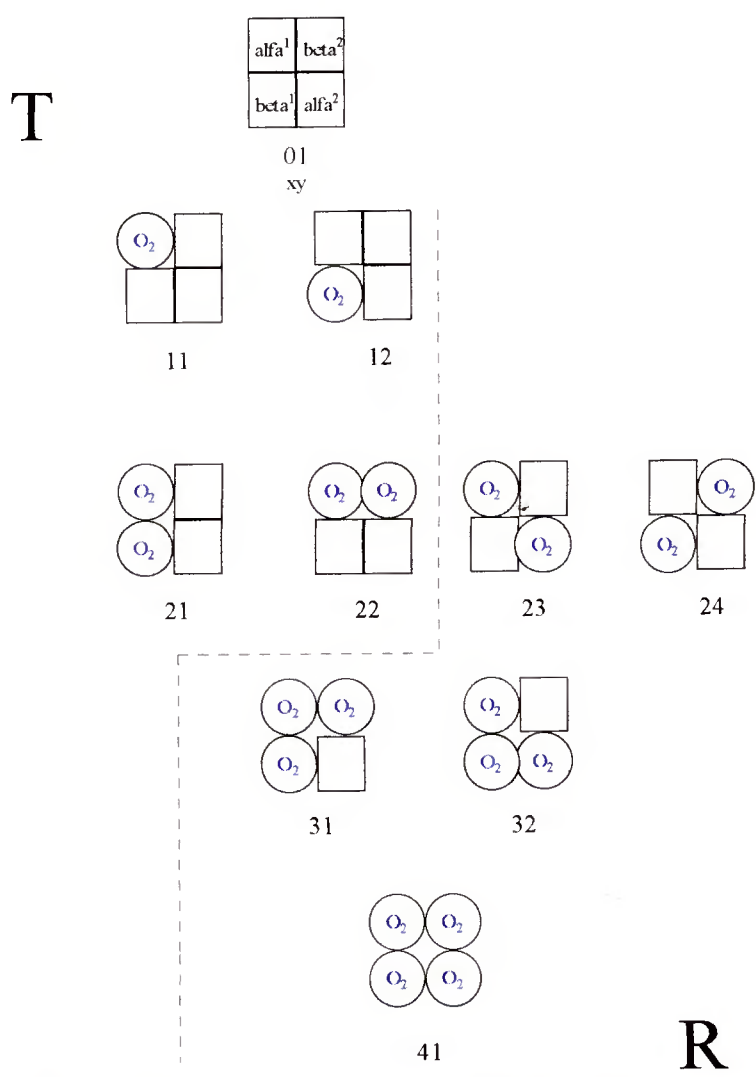
Quando os dois primeiros sítios ligados estão em diferentes tipos de subunidades (espécies 21 e 22) a molécula não troca de nível até que o terceiro ligante esteja ligado. Parece haver uma “seleção” para perda de energia de cooperatividade: se uma subunidade α estiver ligada primeiro, não haverá favorecimento de perda de energia na ligação subsequente da subunidade β e vice-versa. A regra de seleção é operante se o par de subunidade ligada $\alpha\beta$ estiver no mesmo dímero $\alpha_1\beta_1$ ou em dímeros cruzados $\alpha_1\beta_2$. O resultado é um padrão de valores de afinidade

alternados dos passos de ligação que inclui as espécies 21 e 22. Este padrão é apoiado por experimentos em que foram misturadas espécies 01 e 41 em várias proporções que mostraram cooperatividade na oxigenação de dois sítios vazios das espécies 21.

3. Se o segundo ligante se ligar ao mesmo tipo de subunidade (α ou β) o tetrâmero passará ao segundo nível de transição de energia, refletindo 6kcal de energia livre de cooperatividade (espécies 23 e 24). Nota-se que a ocupação dos sítios $\alpha_1\alpha_2$ ou $\beta_1\beta_2$ reflete perturbação estrutural simétrica do tetrâmero enquanto que 21 e 22 são assimétricos. Em uma mistura equilibrada de espécies assimétricas, dominará a distribuição de tetrâmeros ligados duplamente.

4. Qualquer tetrâmero com três ligantes é levado para o terceiro nível de energia livre de cooperatividade (Smith & Ackers, 1985).





O₂

O₂

21

O₂

O₂

O₂

22

O₂

O₂

23

O₂

O₂

24

O₂

O₂

O₂

31

O₂

O₂

O₂

32

O₂

O₂

O₂

O₂

41

R

Figura 10a. Ilustração das dez formas tetraméricas da hemoglobina, conforme proposto por Ackers et al. (1992). Os índices xy distinguem cada espécie particular y com o respectivo número x da molécula de O₂ ligada. A linha tracejada separa os níveis energéticos no processo de oxigenação.

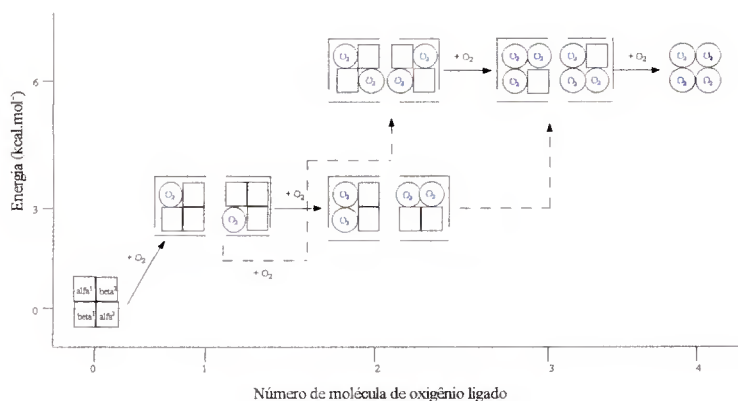


Figura 10b. Diferentes níveis energéticos obtidos para a oxigenação da hemoglobina tetramérica.

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo fazer a caracterização preliminar, nos aspectos funcionais e estruturais, da hemoglobina I (catódica) purificada, componente minoritário do hemolisado da espécie *Brycon cephalus* (matrinxã).

O trabalho realizado inclui:

1. Um estudo funcional (efeito Bohr, efeito da atividade de água, cooperatividade e afinidade por oxigênio) da Hb-I em diferentes pH e na presença de efetores alostéricos.

2. Experiências de obtenção das formas cristalizadas nos estados oxigenado, desoxigenado e ligado a monóxido de carbono.

3. Determinação parcial da seqüência primária.

O componente majoritário, denominado de Hb-II, foi parcialmente caracterizado, e em virtude disso incluímos também esses dados.



3. Materiais e Métodos

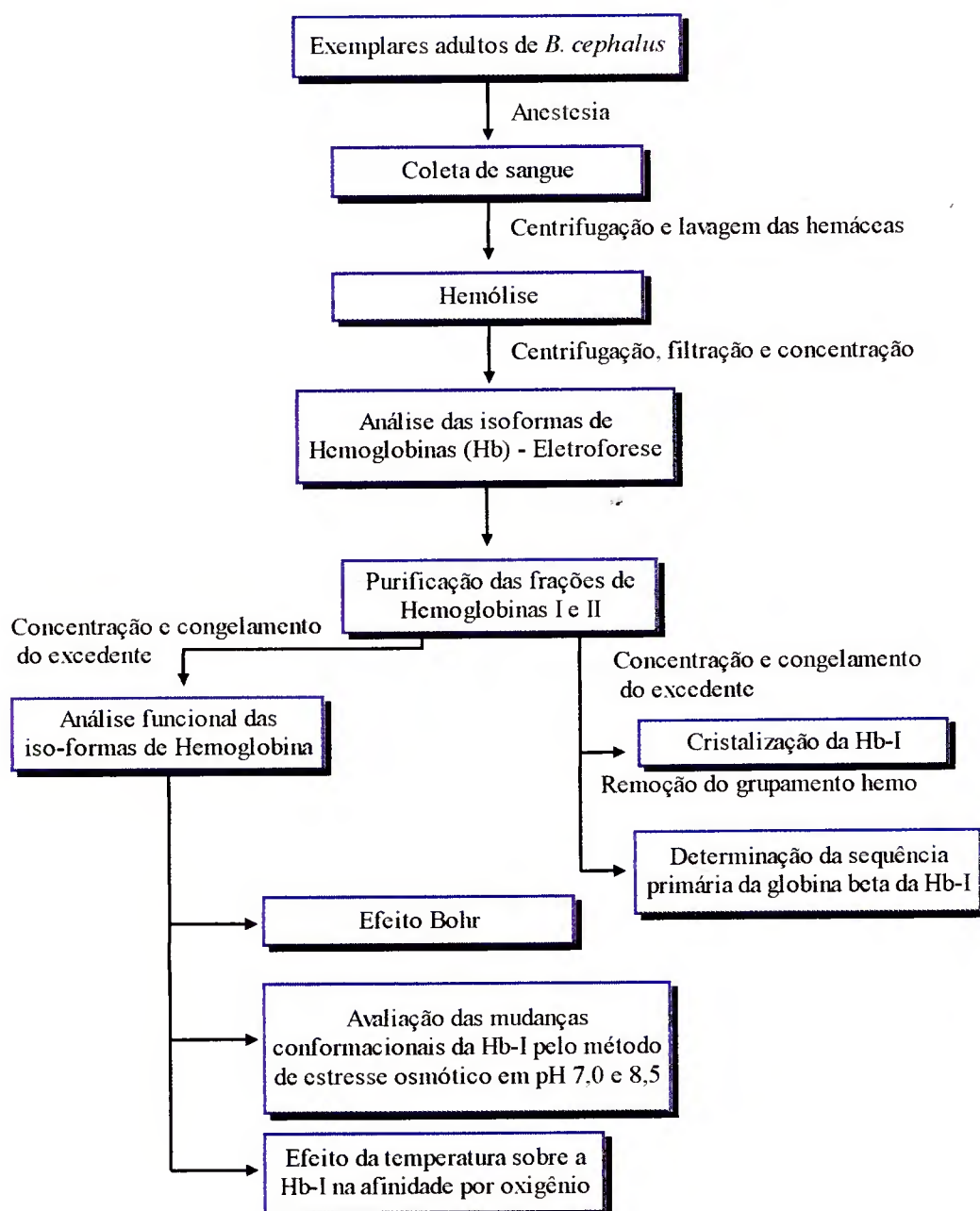


Figura 11. Fluxograma das principais etapas envolvidas nos estudos funcional e estrutural da hemoglobina I do *B. cephalus*.

3.1. Obtenção dos peixes

No primeiro passo da figura 11, a obtenção dos exemplares foi feita junto ao Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp) de Jaboticabal, SP e “Pesque-pague Primavera” próximo à cidade de S. J. do Rio Preto. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Francisco Langeani Neto, do Depto de Zoologia e Botânica da UNESP de Rio Preto. Exemplares do Caunesp foram gentilmente enviados pela Profa. Dra. Elisabeth Urbinati, Diretora daquele Centro, enquanto espécimes representativos dos utilizados no estabelecimento comercial foram conservados para essa finalidade.

3.2 Coleta de sangue

Espécimes adultos de *Brycon cephalus* (Figura 12) foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1g/15 litros de água) por aproximadamente cinco minutos.





Figura 12. Fotografia de um exemplar adulto de *B. cephalus*. Família :Characidae. Subfamília: Bryconinae. Ordem: Characiformes. Classe: Actinopterygii.

O sangue dos exemplares foi coletado por punção da veia caudal com seringa e agulha descartáveis, contendo 1 mL de solução salina tamponada (tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo NaCl a 1%, EDTA 1mM e D-Glicose 0,2 %). O sangue foi transferindo imediatamente para tubos de centrifuga de polipropileno (Corning 50mL) contendo solução salina, com quantidade suficiente para 50mL.

A seguir os tubos foram centrifugados 4 vezes a 380xg durante 7 minutos a 4 °C, com retirada do sobrenadante no final de cada rodada e acrescida de tampão salino previamente descrito, porém sem glicose (Honda et al., 2000).

3.3 Hemólise

A hemólise foi realizada por acréscimo de tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5 (q.s.p 50mL) à papa de hemácias congeladas em nitrogênio líquido, seguido de agitação com bastão de vidro para auxiliar a ruptura da membrana dos eritrócitos.

Em seguida os tubos foram centrifugados a 1520xg durante 20 minutos, tendo sido o sobrenadante concentrado em concentradores centriprep 50 da Amicon.

O hemolisado “stripped”⁵ foi obtido por passagem através de uma coluna de Sephacryl S-100 HR (2,6 x 18 cm) em ambiente refrigerado a 4 °C com tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5. Novamente as amostras foram concentradas por centrifugação, sendo estocadas ao final do processo em nitrogênio líquido, em aliquotas de 1,5 - 2 mL.

⁵ Hemolisado isento de fosfatos e pequenos íons



3.4 Análise das isoformas

A análise das iso-hemoglobinas foi feita em eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida (ENDGP) a 7,5% com gel de empilhamento 4% (Anexo 1) em ambiente refrigerado a 4 °C com tampão de corrida Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M pH 8,3 a 150 V, durante 1h.

As bandas foram fixadas com solução de ácido acético 10%, álcool 25% e glicerol 1,5%, e a análise das bandas foi feita visualmente (Honda et al. 2000).

3.5 Purificação das frações de hemoglobinas (Hbs)

A separação das isoformas de hemoglobina foi feita por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose (2,6 x 15 cm) a 4 °C , com gradiente salino de eluição (0 a 50 mM de NaCl, em volume de 150mL) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,5.

Após a purificação as frações foram concentradas e tiveram um acréscimo de volume de tampão Taps 50mM pH 9,5 (3 vezes o volume



da amostra), com intuito de substituir o tampão anterior, seguido de nova concentração e posterior congelamento em nitrogênio líquido até o momento de uso.

Os componentes isolados tiveram sua purificação aferida por ENDGP como descrito anteriormente.

3.6 Cálculo da concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina

A determinação da concentração da oxi e meta-hemoglobina foi realizada utilizando as leituras de absorbância em 576 e 630 nm, com coeficientes de absortividade ($\epsilon_{576}^{\text{meta}}$, $\epsilon_{576}^{\text{oxi}}$, $\epsilon_{630}^{\text{meta}}$ e $\epsilon_{630}^{\text{oxi}}$)⁶ determinados para a Hb humana (Benesch et al., 1973: Anexo 2).

O cálculo da concentração da Meta-Hb foi obtido, assumindo-se a contribuição de apenas dois comprimentos de onda, 576 e 630 nm:

$$\text{Abs}_{576} = [\text{OxiHb}] \cdot \epsilon_{576}^{\text{oxi}} + [\text{MetaHb}] \cdot \epsilon_{576}^{\text{meta}} \quad (11)$$

⁶ Os coeficientes para meta hemoglobina variam de acordo com o pH



$$\text{Abs}_{630} = [\text{OxiHb}] \cdot \epsilon_{630}^{\text{oxi}} + [\text{MetaHb}] \cdot \epsilon_{630}^{\text{meta}} \quad (12)$$

Dessa forma, a concentração das duas espécies (oxi e meta-hemoglobina, as duas incógnitas) pode ser resolvida conforme segue, onde “Det” é a determinante da matriz:

$$\text{Det} = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{\text{oxi}} & \epsilon_{576}^{\text{meta}} \\ \epsilon_{630}^{\text{oxi}} & \epsilon_{630}^{\text{meta}} \end{vmatrix} \quad (13)$$

$$[\text{MetaHb}] = \frac{\begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{\text{oxi}} & \text{Abs}_{576} \\ \epsilon_{630}^{\text{oxi}} & \text{Abs}_{630} \end{vmatrix}}{\text{Det}} \quad (14)$$

$$[\text{OxiHb}] = \frac{\begin{vmatrix} \text{Abs}_{576} & \epsilon_{576}^{\text{meta}} \\ \text{Abs}_{630} & \epsilon_{630}^{\text{meta}} \end{vmatrix}}{\text{Det}} \quad (15)$$

3.7 Análise funcional das iso-hemoglobinas

O estudo da ligação do oxigênio às hemoglobinas purificadas com concentração 60 μ M (heme), foi realizada pelo método tonométrico modificado (Benesch et al. 1965) utilizando tampões Taps 50 mM (na

faixa de pH que compreende entre 7,5 a 9,5) e tampão Hepes-NaOH 50 mM (na faixa entre 6 a 7). Este método é baseado na desoxigenação de uma solução de hemoglobina de pH conhecido, através de passagens alternadas de nitrogênio e vácuo no interior do tonômetro (Figura 13), acompanhado de leituras espectrofotométricas da absorbância em determinados comprimentos de onda, durante a passagem da hemoglobina da forma desoxigenada para a oxigenada e vice-versa. Utilizamos um espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Várian.

O controle da obtenção da forma desoxigenada foi feito pela relação proposta por Benesch e Benesch (1965):

$$\frac{Abs_{555}}{Abs_{540}} \geq 1,24 \quad (16)$$





Figura 13. Fotografia do tonômetro de borossilicato utilizado para efetuar estudos funcionais da hemoglobina.

que indica a relação entre os coeficientes de absortividade da forma desoxigenada em 555 e 540 nanômetros respectivamente. Não sendo aceito índice abaixo de 1,24.

Antes de desoxigenarmos a solução de hemoglobina realizávamos leitura da absorbância da oxi-hemoglobina inicial para constatar o nível de concentração de meta-hemoglobina, sendo descartados todos os experimentos em que o nível inicial ou final de metaHb ultrapasse 5%.

A reoxigenação era realizada com auxílio de seringas, fazendo a injeção de pequenos volumes de ar no interior dos tonômetros. A cada

acrécimo de ar os tonômetros eram equilibrados em banho com água a temperatura controlada durante um mínimo de 7 minutos. A temperatura do banho era mantida com auxílio de um banho com refrigeração e circulação WK-500 marca Lauda.

Para efeito de cálculo dos parâmetros funcionais e do teor de meta-hemoglobina, foram adotadas as variações das leituras de absorbância em 690 (linha de base da oxi e meta-Hb), 569 (ponto isobéstico), 560 (pico da desoxi-Hb) e 576 e 541 nm (picos da forma oxigenada). As adições de ar prosseguiram até atingir elevados níveis de saturação. Nesse ponto o tonômetro era aberto, a fim de obtermos a leitura da oxi-hemoglobina final (100% de saturação).

A saturação parcial foi calculada a cada adição através da seguinte expressão:

$$Y = (Abs_{\lambda} - Abs_D)/(Abs_O - Abs_D) \quad (17)$$

onde: Y é a saturação parcial (0 a 1), Abs_{λ} é a absorbância em 576, 560 ou 540nm, após a adição de ar. Abs_O e Abs_D são as absorbâncias da



oxiemoglobina inicial e da desoxiemoglobina respectivamente, no mesmo comprimento de onda (λ) em que foi efetuada a leitura de Absorbância.

Os volumes de ar adicionados foram convertidos em pO_2 de acordo com uma modificação da fórmula apresentada por Giardina et al. (1981):

$$PO_2 = \frac{(\%O_2.TB / TA.(PBC - (PV - UR)))}{VT - VA}.VI \quad (18)$$

onde: PO_2 (mmHg) é a pressão parcial de oxigênio, $\%O_2$ é o percentual de do gás na atmosfera (21%), PBC é a pressão atmosférica corrigida (Anexo 5), PV a pressão de vapor de água (segue em anexo 5), UR a umidade relativa, VT o volume do tonômetro, VA o da amostra, e VI o volume de ar injetado em mL.

As modificações no cálculo, a saber a correção da pressão atmosférica para a temperatura e umidade relativa, foram realizadas seguindo o procedimento adotado no laboratório do Prof. Dr. Joseph Bonaventura (Marine Biomedical Center, Duke University Marine Laboratory, North Carolina, USA)(Anexo 5).



Os parâmetros que descrevem as propriedades funcionais de afinidade e cooperatividade foram calculados através de um programa que executa os cálculos antes mencionados e realiza uma representação gráfica de Hill. A partir desse gráfico são escolhidos os pontos para a execução de uma regressão linear ($y = a + bx$) na região em torno de 50% de saturação (região da reta onde intercepta o eixo X), obtendo-se assim o n de Hill, que corresponde à inclinação “ b ” da reta. Por sua vez, a P_{50} (que corresponde a pO_2 na qual 50% dos sítios estão saturados) foi calculada utilizando-se a interseção da reta no eixo y (a):

$$P_{50} = 10^{-a/b} \quad (19)$$

3.7.1 Efeito da temperatura na afinidade por oxigênio

O efeito da temperatura na oxigenação da Hb-I foi investigado pelo método tonométrico na presença e na ausência de Cl^- 0,1M e/ou ATP 1 mM, nas temperaturas 15, 20, 25 e 30 °C controladas por banho termostático com circulador Lauda WK 500. Foi usado o tampão Taps 50mM pH 8,5.



O cálculo da variação de entalpia (ΔH) foi obtido pela expressão:

$$\Delta H = 2,303.a.R$$

onde “a” é a inclinação da reta obtida pelo gráfico $\log P_{50} \times 1/T$ (K^{-1}) e R é constante dos gases ($1,987 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{grau}^{-1}$) (Giardina et al., 1993). A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi obtida pela expressão: $\Delta G = -RT \ln 1/(P_{50} \cdot \text{constante de Henry})$, onde a constante de Henry assume valores de $1,98.10^{-6}$, $1,77.10^{-6}$, $1,66.10^{-6}$ e $1,42.10^{-6}$ para 15, 20, 25 e 30°C respectivamente (Brouwer & Baker-King, 1988; Bonilla et al., 1994).

A variação de entropia (ΔS) foi obtida da expressão: $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$.

3.7.2 Avaliação das mudanças conformacionais pelo método de estresse osmótico (Colombo et al., 1992).

A partir de observações no gráfico de oxigenação da Hb-I (Figura 20), foram escolhidos dois pHs (7,0 e 8,5) para serem utilizados no estudo do efeito do estresse osmótico, onde foi estimado o número de moléculas de água envolvido na mudança conformacional ($T \rightarrow R$).

O processo de desoxigenação e oxigenação da Hb (60 μ M heme) foi realizado pelo método tonométrico variando-se as concentrações da solução estoque de sacarose 30% (soluto neutro) em tampão apropriado. Para pH 7,0 foi utilizado tampão ADA-NaOH 50mM na presença e na ausência de efetores alostéricos (ATP 1mM e Cl⁻ 0,1M) e também variamos a concentração de sacarose 30% em pH 8,5 utilizando tampão Taps-NaOH 50mM. As medidas tonométricas foram realizadas a 20 °C.

Após o experimento de ligação de oxigênio a osmolalidade da solução de Hb foi determinada por depressão do ponto de congelamento, medido em Osmômetro: Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.) no laboratório do Prof. Dr. Marcio F. Colombo.

A atividade d'água (a_w) foi obtida através da expressão :

$$\ln a_w = \frac{\Delta}{K_f M_w} = \frac{-Osm}{M_w} \quad (20)$$

onde Δ é a depressão do ponto de congelamento, $K_f = 1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$ é a constante crioscópica, Osm é a osmolalidade e M_w é a molalidade da água pura (55,5)(Colombo e Bonilla-Rodriguez, 1996).

3.8 Cristalização da hemoglobina I do *B. cephalus*, ligada a monóxido de carbono

O principal objetivo da cristalização de uma macromolécula biológica, tal como proteína, é o estudo estrutural dessa macromolécula por métodos de difração de raio-X. Tal estudo estrutural é fundamental para o conhecimento molecular de vários mecanismos biológicos. Os principais passos envolvidos na resolução da estrutura a nível atômico de uma macromolécula biológica são:



Para crescer cristais de qualquer composto, as moléculas ou íons têm de ser trazidos a um estado de supersaturação (Fig 14), um estado que é termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver uma fase amorfa ou cristalina quando este retornar ao equilíbrio.

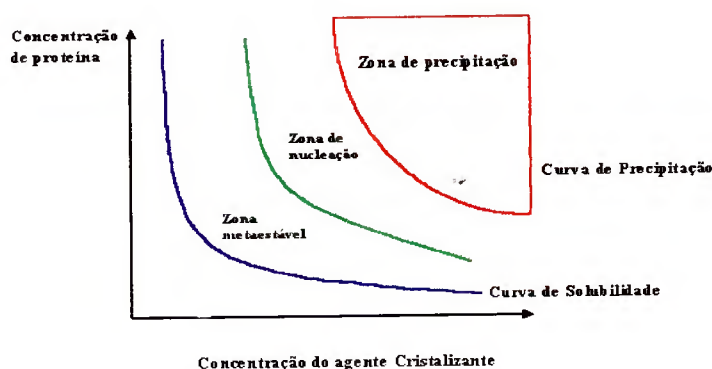


Figura 14. Diagrama de fase para experimento de cristalização. A área acima da curva de solubilidade é a de supersaturação que esta subdividida em três zonas: Zona metaestável, zona de nucleação e zona de precipitação.

Disto segue que o conhecimento das solubilidades macromoleculares é um pré-requisito para o controle das condições de cristalização (Ducruix & Giegé, 1992; Drenth, 1994.).

A “Biocristalização”, como qualquer cristalização, é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve três passos clássicos: nucleação,

crescimento e cessação de crescimento.

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, tendo todas o mesmo objetivo: trazer a solução da macromolécula biológica a um estado de supersaturação. Uma das técnicas mais utilizadas é por difusão de vapor.

Para cristalização por difusão de vapor (Fig 15), uma gota contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente cristalizante a uma concentração mais alta do que na gota.

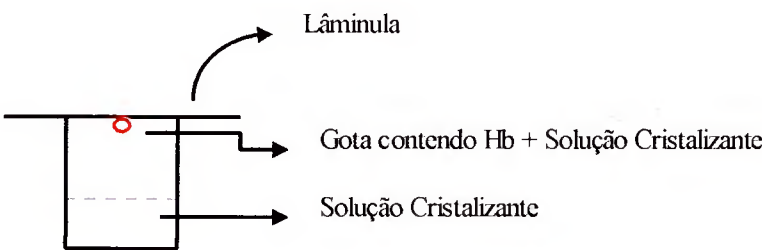


Figura 15. Ilustração da câmara de difusão de vapor associado ao método de “hanging drop”.

O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale

àquela do reservatório (Ducruix & Giegé, 1992; Drenth, 1994.).

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização se assemelhavam, ou seja, havia uma concentração de resultados positivos de cristalização de macromoléculas biológicas usando-se um número limitado de precipitantes, tampões e aditivos. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos foi possível determinar quais tampões, aditivos e agentes precipitantes seriam os mais favoráveis.

Dentro deste raciocínio a Dra. Jaru Jancarick da UC Berkeley propôs o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991), onde diversas condições são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica.

3.8.1 Método da matriz esparsa

A montagem dos experimentos referentes à cristalização foi realizada no Laboratório de Cristalização do Depto de Física - UNESP de Rio Preto



sob coordenação do Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, co-orientador deste trabalho.

A partir das cinquenta soluções cristalizantes previamente preparadas (Anexo 3), nós usamos o método da gota suspensa (do inglês *hanging drop*), para testar as condições de cristalização. Colocamos 1,0 mL de cada uma destas soluções em cada um dos reservatórios de uma caixa Limbro⁷ (Limbro modelo 76-033-05).

Em seguida, 1-2 μ L da solução de hemoglobina ($\pm$ 10mg/mL) foram aplicados sobre lamínula de vidro de 22 x 22 mm que fora siliconizada com 1% Prosil-28 (PCR Inc., Gainseville, Florida. USA) e 1-2 μ L da solução cristalizante do reservatório listada no Anexo 3. Cobrimos cada um dos reservatórios da caixa de Limbro com as respectivas lamínulas de vidro onde temos 1-2 μ L de solução de Hb-I mais 1-2 μ L de solução cristalizante, usando uma graxa de vácuo para auxiliar na vedação (Jancarick & Kim, 1991). A difusão de vapor d'água procede da gota para o reservatório.

7

A caixa de Limbro é feita de plástico e comercialmente é encontrada para uso de cultura de tecidos, contém 24 repartições com coordenadas A, B, C e D na vertical e de 1-6 na horizontal. Cada repartição possui um volume aproximado de 2 mL e diâmetro de 16mm.



3.9. Determinação da seqüência primária da Hb-I do *B. cephalus*

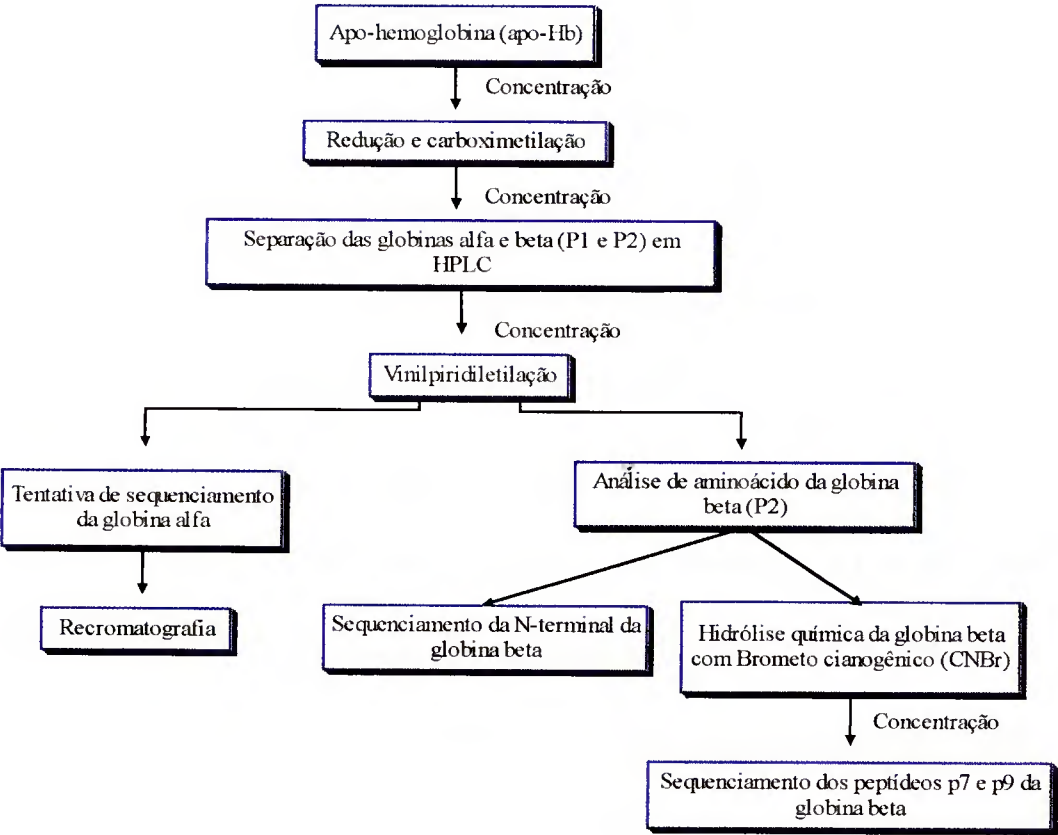


Figura 16. Fluxograma das principais etapas realizadas para o sequenciamento da globina beta da Hb-I do *B. cephalus*.

3.9.1 Remoção do grupo hemo (apo-hemoglobina)

O primeiro passo do fluxograma (fig 16) apo-hemoglobina foi

obtida pelo método modificado com metil-etil-cetona acidificada (Ascoli et al. 1981).

A fração purificada e concentrada foi oxidada (Hb^{+3}) com ferricianeto de potássio na proporção 1:1. Posteriormente o ferricianeto foi removido da solução por filtração em gel Sephadex G-25 eluido com água bidestilada. A solução de meta-hemoglobina foi acidificada com a adição de HCl até aproximadamente 0,2M e logo em seguida foi acrescentado um igual volume de metil-etil cetona (Synth) gelado, agitado e mantido em repouso em gelo durante 5 minutos. O grupo hemo situado na fase superior escura, era removido com pipeta Pasteur; a seguir um novo volume de metil-etil cetona era acrescentado. Este procedimento foi repetido até total clareamento da fase inferior (apo-hemoglobina). A apo-hemoglobina obtida foi dialisada contra 3 trocas de água bidestilada sob agitação a 4 °C.

A concentração da apo-hemoglobina foi feita em concentradores Centricon 10.000, mantendo-a congelada em nitrogênio líquido até o momento de uso.



3.9.2 *Quantificação de proteína pelo método de Bradford* (Bradford, 1976).

Um volume de 50 μ L da solução de apo-hemoglobina foi adicionado a 2,5mL de solução corante contendo azul de Coomassie (Anexo 4) e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos (Tubo 1).

Para o preparo do branco, 50 μ L de água bidestilada foi adicionado a 2,5mL de solução corante e incubado durante 30 minutos na mesma temperatura (Tubo B).

Transcorrido o tempo de incubação as absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

O cálculo da concentração foi feita segundo a expressão :

$$[\text{Proteína (mg/mL)}] = \frac{\text{Abs}(595\text{nm})}{8,55}$$

onde 8,55 é o coeficiente da curva padrão obtido com caseína.



3.9.3 Redução e carboximetilação

Os procedimentos para análise de aminoácidos e sequenciamento foram realizados no Centro de Química de Proteínas da USP-Ribeirão Preto, em colaboração com o Prof. Dr. Lewis J. Greene e do doutorando Vitor Marcel Faça.

As globinas foram reduzidas e alquiladas por carboximetilação segundo protocolo de Matsudaira (1989) e Padovan (1996).

Inicialmente 50 μ L de apo-hemoglobina ($\pm$ 34,4mg/mL) foram diluídas em 500 μ L de solução tampão Tris-HCl 1M e EDTA 2 mM pH 8,2. A solução ficou sob corrente de nitrogênio por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 10,0 mg de cloreto de guanidina e 14 μ mol - 45 μ L de ditioneitol (DTT) diluído em tampão Tris-HCl 1 M pH8,2 e incubado a 37°C em ambiente saturado com nitrogênio durante 2 h para redução e posteriormente foram adicionados 16 μ mol de ácido iodoacético em solução tampão Tris-HCl 1 M pH 8,2; as amostras foram agitadas, fechadas sob nitrogênio e incubadas por 30 min ao abrigo da luz para alquilação. A reação foi interrompida pela adição de 10 μ L de



solução de DTT 50mg.mL⁻¹ (162μmol) em solução tamponante de Tris-HCl 1M pH8,2.

As cadeias foram diluídas em solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e isoladas através de cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC) em coluna Vydac C4 (4,6 x 220 mm) com gradiente de TFA 0,1% (solução A) e acetonitrila 80% e TFA 0,09% (solução B).

O efluente foi monitorado em dois comprimentos de onda simultâneos, 220 e 280 nm, sendo as cadeias coletadas em tubos de eppendorf.

De acordo com a ordem de eluição das globinas, elas foram denominadas P1 e P2, sendo posteriormente concentradas em Speedvac até um volume aproximado de 100μL.

3.9.4 Reação de Vinilpiridiletilação

Foram diluídas entre 1 a 10μg de proteína em um volume entre 50 a 200μL de tampão Tris-HCl 0,25 M contendo guanidina-HCl 6M e 1mM



de EDTA a pH 8,5. Em seguida foram adicionadas 2 μ L de β -mercaptoetanol a 10% e incubadas na presença argônio durante 2 horas a 37 °C.

Transcorrido o tempo, foi adicionado 2 μ L de 4-vinilpiridina seguida de agitação e incubado na presença de argônio durante 2 horas a temperatura ambiente. A dessalinização foi realizada em RP-HPLC e o eluente foi concentrado em *sppedvac*.

3.9.5 Análise da composição de aminoácido da globina P2 do B. cephalus pelo método Picotag-Derivação Pré-Cromatográfica

Um volume de 10 μ L de proteína vinilpiridiletilada ($\pm 623\mu\text{g/mL}$) foi transferido para tubos de borossilicato pirolisados a 400°C por 8 h e secas em concentrador rotatório Savant, modelo Speedvac AS290. Os tubos foram transferidos para um frasco maior de hidrólise, também de borossilicato, com tampa munida de válvula para realização de vácuo. No interior do frasco maior foi aplicado 300 μ L de HCl 6 M bidestilado, em seguida foram feitas quatro alterações de vácuo e nitrogênio, sendo



que, no final foi mantido vácuo. O tubo foi mantido a 110°C por 24 h.

Após a hidrólise ácida em fase vapor, as amostras foram secas em Speedvac por 20 minutos a 50°C. A amostra seca foi ressuspensa com 20µL de solução contendo metanol, água e trietilamina (TEA) nas proporções 2 : 2 : 1. As amostras foram secas durante o mesmo tempo e temperatura do passo anterior.

Foi aplicado 20µL de solução contendo metanol, água, TEA e fenilisotiocianato (PITC) nas proporções 7 : 1 : 1 : 1, seguida de repouso durante 20 minutos à temperatura ambiente (25°C) e novamente a amostra foi seca durante uma hora e meia, a 50°C.

Após a derivação, as amostras foram ressuspensas em volumes de 0,5 mL de tampão de acetato de sódio 0,14 M pH 7,4 contendo 5% de acetonitrila e 0,06% de TEA.

A separação cromatográfica foi realizada em sistema de fase reversa (RP-HPLC) composto por duas bombas *Milton Roy* (modelo constaMetric III), espectrofotômetro *Milton Roy* (modelo Uvmonitor-D), utilizando coluna cromatográfica do tipo Picotag C₁₈ (3,9×150mm), da *Waters*. Utilizou-se solução (solvente A) de acetato de sódio 0,14M, pH

5,6 e TEA 0,5% (v/v) e solução (solvente B) aquosa de acetonitrila 60% (v/v); para eluição dos derivados em gradiente de 10 a 54% de solvente B. A separação foi realizada a 37°C. As amostras foram diluídas (100-500µL) em solução de acetato de sódio 0,14M, pH 7,5, contendo 5% de acetonitrila, aplicando-se 20µl no equipamento. Os melhores resultados foram obtidos com diluição das amostras em 500µL, proporcionando uma separação livre, ou com quantidade reduzida de subprodutos da reação de derivação com PITC.

A quantificação de cada análise foi realizada através da injeção prévia de solução padrão contendo 100pmol de cada aminoácido, derivado simultaneamente com as amostras.

A quantificação foi realizada pela integração da áreas dos picos correspondentes a cada aminoácido (Dupont et al., 1989), feita pelo programa *Thermochrome III* da *Thermo Separation Products*. A identificação dos picos foi realizada com base no tempo de retenção dos aminoácidos.



3.9.6 Método de degradação de Edman

A degradação de Edman remove seqüencialmente cada aminoácido de seu peptídeo. O ciclo de remoção de um aminoácido envolve três passos: identificação, clivagem e conversão (Fig 17) (Matsudaira, 1989).

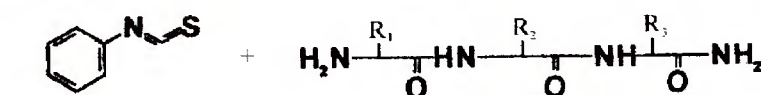
No passo de identificação, o fenilisotiocianato (PITC) modifica quimicamente o grupo α -amino do resíduo N-terminal para a forma PTC-polipeptídeo (pH 8,0-8,5) e favorece a identificação do grupamento α -amino.

Nesta reação ocorre formação de subprodutos pela reação do PITC com água, dimetilfeniltio-uréia (DMPTU), difeniltio-uréia (DPTU) e difeniluréia (DPU), que são removidos do meio por uma mistura de substâncias orgânicas.

Na clivagem o resíduo PTC-N-terminal é rapidamente removido da cadeia sob condições ácidas e sem água, liberando dois produtos, o anilinoctiozolinona aminoácido (ATZ-aminoácido) e o polipeptídeo restante n-1. Este novo polipeptídeo pode sofrer outro ciclo de identificação e clivagem.

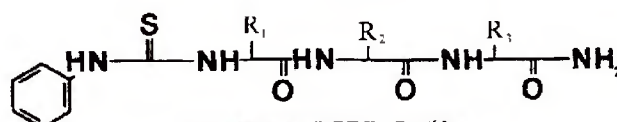


Acoplamento ou
identificação



Feniltiotiociano (PITC)

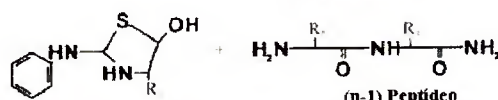
pH 8,0/ 45°C



Feniltiocarbonil (PTC) - Peptídeo

Cltvagem

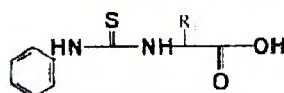
H⁺ | TFA anidro
gás/líquido



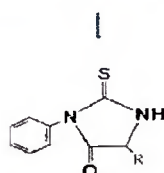
Anilinothiozolinina (ATZ) - Derivado

H⁺/H₂O

Conversão



PTC - Aminoácido



Feniltiohidantoína (PTH) Aminoácido

Figura17. Reação de Edman.

A remoção do ATZ-aminoácido é realizada pela adição de solventes com polaridades marcadamente distintas. Assim, o peptídeo N-1 inicia novo ciclo a partir da neutralização e o ATZ-aminoácido, devido à sua instabilidade, é convertido no derivado de aminoacilfeniltio-hidatoína

(PTH-aminoácido) em meio aquoso ácido. Primeiro o ATZ-aminoácido é hidrolisado a PTC- aminoácido e convertido ao derivado PTH.

3.9.7 Identificação do PTH-aminoácido

A identificação é realizada por leitura de absorbância em comprimento de onda na faixa ultravioleta (269 nm) e cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC). Todos os aminoácidos são removidos por eluição de um gradiente em suporte de fase reversa HPLC. A detecção é feita por tempo de retenção na coluna.

3.9.8 Hidrólise Química da globina P2 com Brometo Cianogênio (CNBr)

A um tubo de eppendorf foram adicionados 170 μ L de globina P2 vinilpiridiletilada (623 μ g/mL), 1,35mL de ácido fórmico, 380 μ L de H₂O e 15 μ L de CNBr ⁸ (90 μ mol/mL) . Este tubo foi agitado vigorosamente

⁸

Devido o Brometo Cianogênico ser altamente tóxico, o preparo da solução deve ser feito



e mantido em repouso com nitrogênio durante 24 h a temperatura ambiente.

Transcorrido o tempo, a solução com CNBr foi seca em speedvac seguida de várias lavagens com TFA 0,1%.

Os peptídios foram separados em coluna C₁₈ (4,6 x 220mm) de RP-HPLC, com volume de aplicação de amostra variando entre 25μL de proteína em 100μL de TFA 0,1% e 50μL de proteína em 300μL de TFA 0,1%.

As amostras separadas foram coletadas em tubo de eppendorf e secas em concentrador rotatório (*Speedvac*).

3.9.9 Aplicação das amostras, separadas por HPLC, no sequenciador automático

3.9.9.1 Aplicação de amostra em suporte de PVDF (Difluoreto de Polivinilideno)

A amostra P2 (900 picomoles) carboximetilada, vinilpiridiletilada

com luva descartável no interior da capela. Após o experimento, todo o material em contato com o CNBr deve ser segregado como resíduo tóxico.



e separada por HPLC foi aplicada em Prosorb (*Applied Biosystems*) e seca sob corrente de argônio, tendo a membrana de PVDF removida para ser montada junto ao seqüenciador.

No programa do seqüenciador foi selecionado o método *Gas Phase Blot Home Rock* (específico para membranas de PVDF). O sequenciamento foi realizado em equipamento *Procise 491* (*Applied Biosystems*) de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.9.2 Aplicação de amostra em suporte de fibra de vidro

Este procedimento consistiu na aplicação da amostra p7 Hb-I (857 picomoles), obtido por digestão química com CNBr e separadas por HPLC, sobre o suporte de fibra de vidro previamente tratada com Polibreno (polímero carregado), seguida de secagem sob corrente de gás argônio (± 3 minutos). Em seguida foi realizada montagem do suporte junto ao seqüenciador.

No programa de sequenciamento foi selecionado o método *Gas Phase Home*. (Utilizado para amostras aplicadas em fibra de vidro).



3.10 Comparação das seqüências

As seqüências obtidas dos resíduos de aminoácidos foram comparadas com seqüências de hemoglobina previamente determinadas e dispostas no *BLAST* (Stephen et al., 1997). Para este feito, foi utilizado um programa disponível na Internet⁹, o *CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment* (Thompson et al., 1994).

⁹ Foi utilizado o serviço oferecido na página www.expasy.ch



4. RESULTADOS

4.1. Padrão de separação das iso-hemoglobinas do matrinxã (*B. cephalus*)

A separação eletroforética das iso-hemoglobinas, apresentou padrão de separação de apenas duas formas distintas. Uma minoritária catódica ($\pm 10\%$ do total) com maior ponto isoelétrico, denominada Hb-I, e outra majoritária Hb-II. Embora o estudo eletroforético para verificar uma provável variação interespecífica não tenha apresentado padrões diferentes de isoformas, o gel mostra algumas pequenas diferenças na proporção de ambas hemoglobinas (Figura 18a e b).

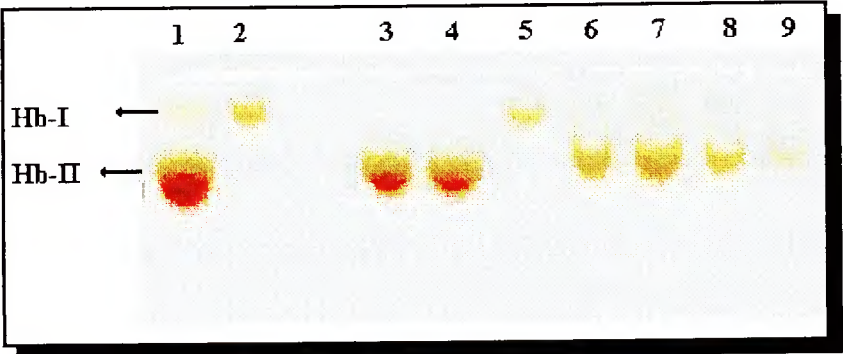


Figura 18a. Eletroforese não desnaturante das iso-hemoglobinas do *B. cephalus* em gel de poliacrilamida a 7,5% . Poços 1- Hemolisado total concentrado; 2- Hb-I (catiônica); 3-4 Hb-II; 5- Hb-I; 6-9 amostras do hemolisado total.

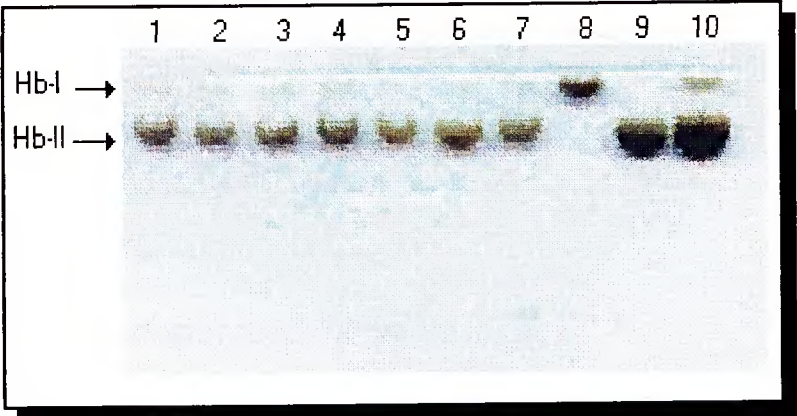


Figura 18b. Eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida a 7,5% das iso-hemoglobinas do *B. cephalus*. Poços 1-7 hemolisados individuais; 8- Hb-I (catiônica); 9- Hb-II (aniônica); 10- hemolisado total concentrado.

A separação cromatográfica confirmou o padrão eletroforético antes citado, eluindo primeiro a fração catódica (Figura 19). Após a purificação efetuamos uma checagem eletroforética da separação, sendo confirmada a pureza das frações concentradas I e II como observado na figura 18.

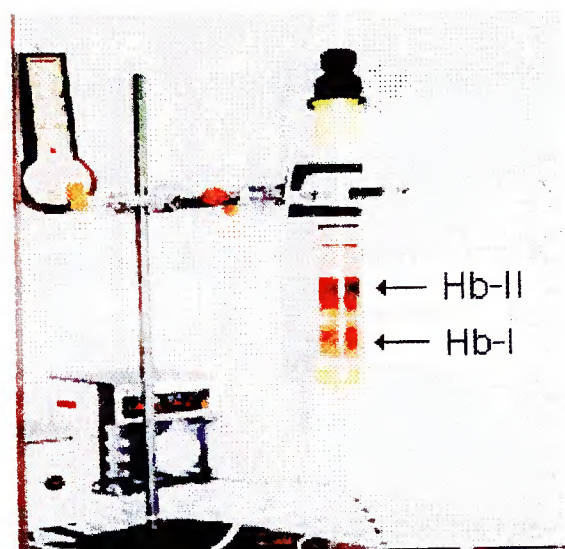


Figura 19. Cromatografia de troca iônica utilizando resina DEAE-Sepharose com gradiente salino (NaCl 50mM) e tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5 para separação das frações I e II do hemolisado do *B. cephalus*.

4.2 Comportamento funcional

4.2.1. Efeito Bohr da Hemoglobina I (catódica)

A ligação do oxigênio em função do pH ($\log P_{50} \times \text{pH}$) e a

cooperatividade em função do pH ($n_{50} \times \text{pH}$) da Hb-I purificada na presença ou não de efetores alostéricos estão demonstradas nas figuras 20a e b respectivamente. O número de prótons ligados entre a forma oxigenada e desoxigenada ($\Delta H^+ = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) indica a ausência de efeito Bohr na forma *stripped* ($\Delta H^+ = +0,01 \pm 0,01$) na faixa de pH entre 6,5 e 8,5. Na presença de NaCl a Hb-I apresenta $\Delta H^+ = -0,02 \pm 0,01$ entre pH 7,0 e 8,0, indicando comportamento bastante próximo da Hb-I *stripped*. Já na presença de ATP a Hb-I mostra uma mudança significativa na afinidade na faixa de pH entre 6,5 e 7,5 ($\Delta H^+ = -0,15 \pm 0,01$). Entre pH 8,5 e 9,0 há uma inversão no efeito ($\Delta H^+ = +0,14 \pm 0,08$).

A ligação de oxigênio é cooperativa em todas as situações estudadas (Figura 20b). Na forma *stripped* e na presença de cloreto o n_{50} permanece em torno de 1,5, com um acréscimo na presença de ATP, quando passa a um valor médio de 1,8 na faixa de pH 6 a 8.



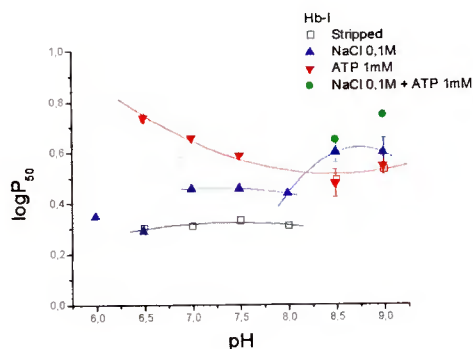


Figura 20a. Gráfico da afinidade por oxigênio da Hb-I do *B. cephalus* em função do pH na presença ou não de efetores alostéricos (NaCl e/ou ATP).

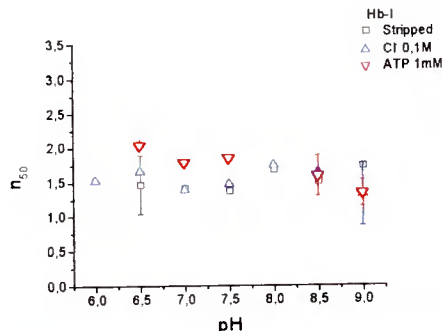


Figura 20b. Cooperatividade (n_{50}) da Hb-I do *B. cephalus* em função do pH, na presença ou na ausência de efetores alostéricos (NaCl ou ATP).

Esse valor diminui para valores iguais aos da forma *stripped* em valores de pH superiores.

Chama a atenção que os valores de P_{50} obtidos acima de pH 8,5 mostram um efeito maior do cloreto em relação ao ATP (repetido várias vezes). Uma outra observação importante é que na mesma faixa de pH alcalino foi constatado um efeito sinérgico de ambos os ânions testados, conseguindo diminuir a afinidade por oxigênio em maior grau do que na forma isolada (pontos em verde na Figura 20a). Esses pontos representam três repetições.

A influência da temperatura na afinidade da Hb-I *stripped*, com ATP ou NaCl, mostrou um decréscimo da $\log P_{50}$ em função do aumento da temperatura, no entanto, este decréscimo ocorre de forma linear nas três situações estudadas como pode ser visto no gráfico de van't Hoff (Figura 21). Da mesma forma, esta semelhança na variação da afinidade pode ser acompanhada pela variação do calor liberado na oxigenação do tetrâmero. Nas três condições experimentais a ΔH não mostra diferença significativa, situando-se em torno de $-15,0 \pm 0,4$ kcal/mol de oxigênio (Tabela I).

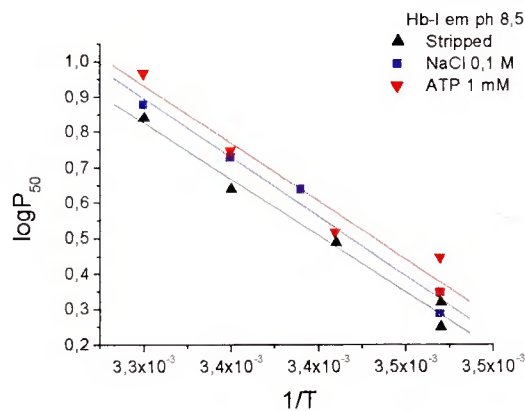


Figura 21. Efeito da temperatura (15,20, 25 e 30°C) sobre a afinidade da Hb-I (Gráfico de van't Hoff) do *B.cephalus* utilizando tampão Taps 50mM pH 8,5.

Tabela I - Parâmetros obtidos a partir do gráfico da figura 21. A variação de entalpia por mol de oxigênio (ΔH) e de entropia (ΔS) foi obtido segundo equação descrita em materiais e métodos. (15, 20, 25 e 30°C) em pH 8,5.

Hb	Condição	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Hb-I <i>B. cephalus</i>	<i>stripped</i>	-14,6 ± 0,23	-7,0 ± 0,10	-25,6 ± 2,34.10 ⁻⁴
	NaCl	-15,3 ± 0,25	-6,9 ± 0,13	-28,3 ± 4,31 .10 ⁻⁴
	ATP	-15,0 ± 0,40	-6,91 ± 0,14	-30,0 ± 2,30.10 ⁻⁴

→ Os dados obtidos com a aplicação da abordagem do estresse osmótico criada por Colombo et al. (1992) (item 3.7.2) aplicada à Hb-I em pH 7,0 apontam para praticamente nenhum aumento da área exposta ao solvente na transição do estado desoxigenado para o oxigenado (Tabela II e Figura 22a e b). Em condição *stripped* a Hb é acompanhada da hidratação com 3,6 moléculas de água (m.a.) e com cloreto 0,1M a situação não é alterada: 2,6 m.a., com cooperatividade em torno de ±1,6 para ambas as situações.

→ Na presença de ATP a Hb-I mostra uma maior exposição de superfície, 17,2 m.a. seguida de um pequeno aumento na cooperatividade: ±2,6 em relação aos valores obtidos durante a caracterização já descrita.

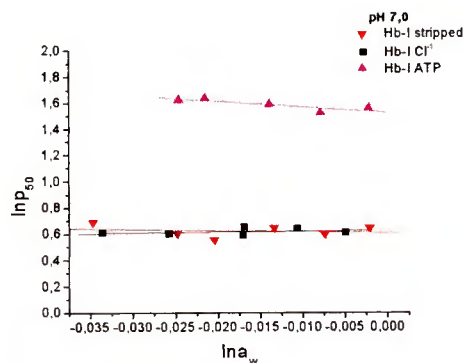


Figura 22a. Gráfico da $\ln P_{50}$ da Hb-I do *B. cephalus* em diferentes concentrações de sacarose em função da $\ln$ da atividade d'água (a_w) utilizando tampão Hepes 50mM pH 7,0, na ausência ou na presença de NaCl 0,1 M ou ATP 1mM..

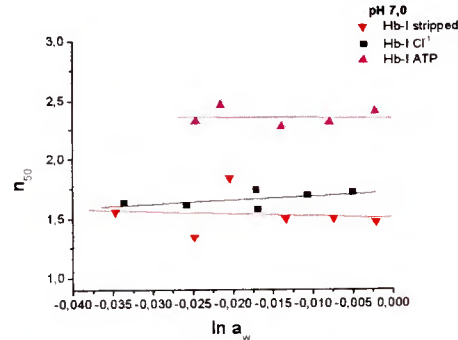


Figura 22b. Gráfico da cooperatividade (n_{50}) da Hb-I do *B. cephalus* em função da $\ln$ da atividade d'água (a_w) em diferentes concentrações de sacarose utilizando tampão Hepes 50mM pH 7,0 na ausência ou na presença de NaCl 0,1M ou ATP 1 mM.

Tabela II - Variação no número de moléculas de água por tetrâmero (Δn_w) na transição do estado totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado medido em solução contendo tampão Hepes 50 mM pH 7,0 com diferentes concentrações de solução estoque contendo sacarose a 30%. Φ é a variação da média aritmética percentual dos resíduos* em relação aos dados experimentais.

Hemoglobina	Condição	Δn_w	Φ (%)
Hb-I <i>B. cephalus</i>	stripped	3,6	6
	NaCl	2,6	3
	ATP	17,2	1

* Diferença entre o ponto experimental e o ajuste.



Em pH 8,5 (Tabela III e Figura 23a e b) a transição T -> R da Hb-I é acompanhada de um grau maior de hidratação: 7,08 m.a. na presença de ATP, e com cloreto 19,4 m.a. A oxigenação da Hb-I *stripped* é acompanhada de 10,4 m.a. A cooperatividade fica em torno de 1,7 para a forma *stripped* e NaCl e de 1,8 na presença de ATP.

Tabela III - Variação no número de moléculas de água por tetrâmero (Δn_w) na transição do estado totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado medido na forma tetramérica com solvente contendo tampão Taps 50 mM pH 8,5 e sacarose. Φ é a média aritmética da variação percentual dos resíduos* em relação aos dados experimentais.

Hemoglobina	Condição	Δn_w	Φ (%)
Hb-I <i>B. cephalus</i>	<i>stripped</i>	10,4	4
	NaCl	19,4	7
	ATP	7,08	7

* Diferença entre o ponto experimental e o ajuste.



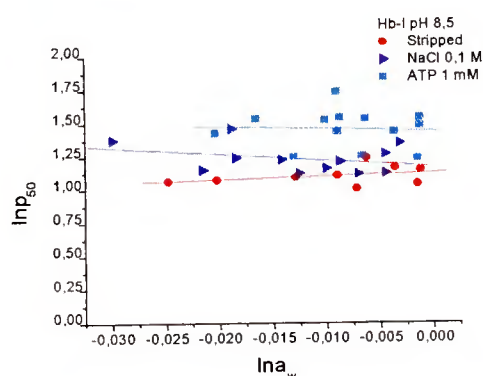


Figura 23a. Gráfico da $\ln p_{50}$ da Hb-I (60 μM) do *B. cephalus*, em função da atividade d'água em diferentes concentrações de sacarose em solução contendo tampão Taps 50mM pH 8,5; na ausência ou na presença de ATP 1mM ou Cl^- 0,1M.

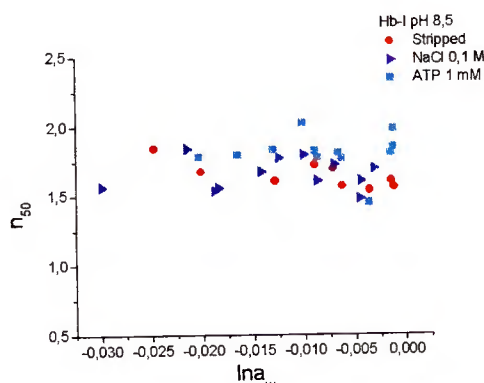


Figura 23b. Gráfico da cooperatividade (n_{50}) da Hb-I do *B. cephalus*, em função da atividade d'água em diferentes concentrações de sacarose em tampão Taps 50 mM pH 8,5; na ausência ou na presença de ATP 1mM ou Cl^- 0,1 M.

4.2.2. Efeito Bohr da hemoglobina II (componente majoritário)

No estudo funcional da Hb-II *stripped* foi observado acentuado efeito Bohr alcalino, $\Delta H^+ = -0,99 \pm 0,1$ (heme) na faixa de pH de 6,5 a 7,5, enquanto que entre pH 7,5 e 9,0 o efeito Bohr é praticamente nulo: $\Delta H^+ = +0,04 \pm 0,04$ (Figura 24a).

Na presença de ATP a Hb-II apresentou diminuição da afinidade por oxigênio e uma elevação do efeito Bohr aparente, $\Delta H^+ = -1,54 \pm 0,03$ em pH entre 7,0 e 7,5, sendo reduzido para $\Delta H^+ = -0,05 \pm 0,06$ na faixa de

pH entre 8,0 e 9,0.

Para as formas *stripped* e com ATP a variação da P_{50} é marcadamente dependente do pH, sendo encontrada uma diferença 7,75 vezes maior para a forma com ATP em pH 7,0. Por outro lado, em pH 8,0 a diferença caiu abruptamente para 2,43.

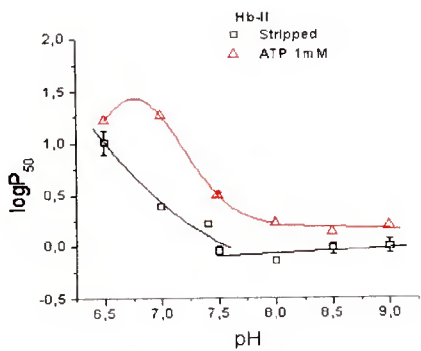


Figura 24a. Dependência da afinidade por oxigênio em função do pH da Hb-II do *B. cephalus*, na presença ou na ausência de efetores alostéricos.

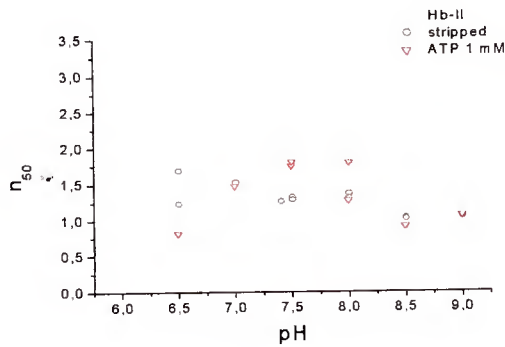


Figura 24b. Cooperatividade (n_{50}) em função do pH da Hb-II do *B. cephalus* na presença ou na ausência de efetores alostéricos.

Os valores de $\log P_{50}$ obtidos para Hb-II foram significativamente diferentes aos obtidos para a Hb-I, sendo que em pH acima de 7,5 a afinidade é maior para a forma Hb-II *stripped* do que para a Hb-I na mesma condição. Acima de pH 8,0 e na presença de ATP a Hb-II mantém a alta afinidade em relação à Hb-I em mesma condição.

A cooperatividade (Figura 24b) mostra uma variação com o pH tanto na presença quanto na ausência de ATP. Os valores ficam em torno de não cooperativos (± 1) nos extremos de pHs, elevando-se de forma continua e atingindo um máximo em torno do pH 7,5 ($\pm 1,75$).

4.3. Cristalização da Hb-I

Cristais de forma hexagonal da forma ligada a monóxido de carbono (CO-Hb) da hemoglobina I (Figura 25) foram obtidos após 2 dias em solução contendo tampão Hepes 0,1 M pH 7,5 e Citrato trissódico di-hidratado 1,4 M.

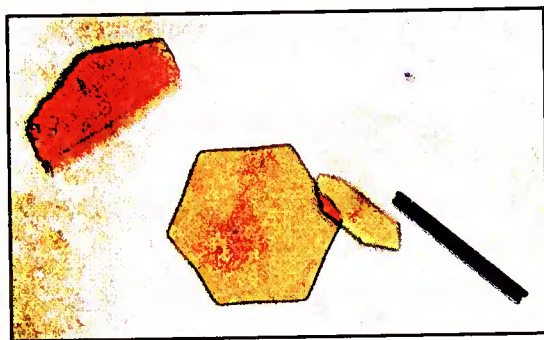


Figura 25. Cristal hexagonal da hemoglobina I (catódica) ligada a monóxido de carbono (CO).

Os dados de difração de raios-X foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas pelo Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr., do Laboratório de Cristalografia do Departamento de Física da Unesp de S. J. do Rio Preto, tendo sido publicados os dados preliminares com resolução de 2,5 Angstroms (Honda et al. 2000).

4.4. Seqüência primária da globina β da Hb-I de B. cephalus

Após a redução e carbometilação, a composição simétrica do tetrâmero foi confirmada pelo fato de terem sido obtidos dois picos de iguais proporções, que segundo a ordem de eluição, foram denominados P1 e P2 respectivamente (Figura 26a).

As tentativas de seqüenciamento do pico 1 indicaram bloqueio da N-terminal como pode ser visto na recromatografia em RP-HPLC, obtido da mesma amostra aplicada no seqüenciador que não apresentou nenhum sinal de resíduo (Figura 26b). Portanto as tentativas de seqüenciamento foram transferidas para a outra globina (P2).

A composição de aminoácidos da globina P2 obtido por hidrólise



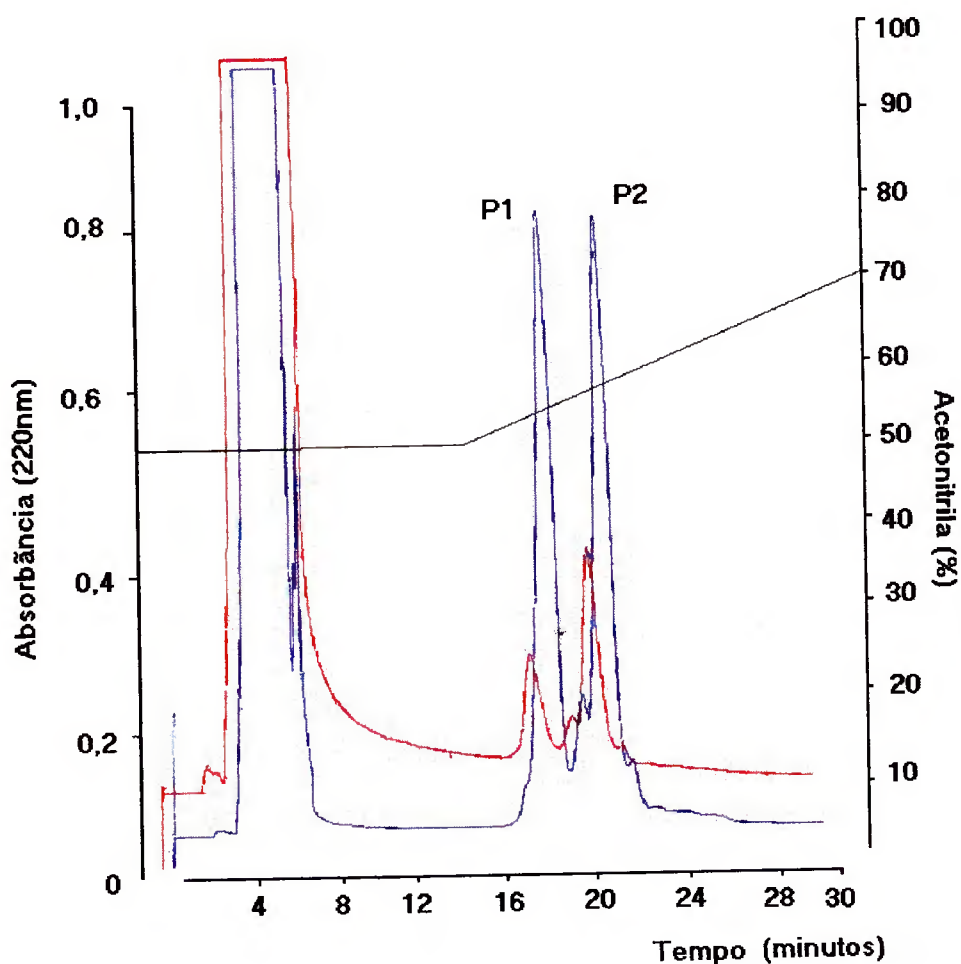


Figura 26a. Separação cromatográfica das cadeias reduzidas e carbometiladas da Hb-I do *B. cephalus*. A separação foi realizada em coluna C_4 com gradiente crescente de 50 a 70% em acetonitrila, sendo o eluido monitorado em dois comprimentos de onda: 220nm (linha azul, em escala) e 280nm (linha vermelha, 0,2 AUFS “Absorption unit full scale”).

ácida está demonstrada na Tabela IV. Segundo a análise, esta globina apresenta 2 a 3 resíduos de metioninas onde as ligações peptídicas do lado carbonila deste resíduo podem ser especificamente clivadas com

brometo cianogênio (CNBr) ⁹.

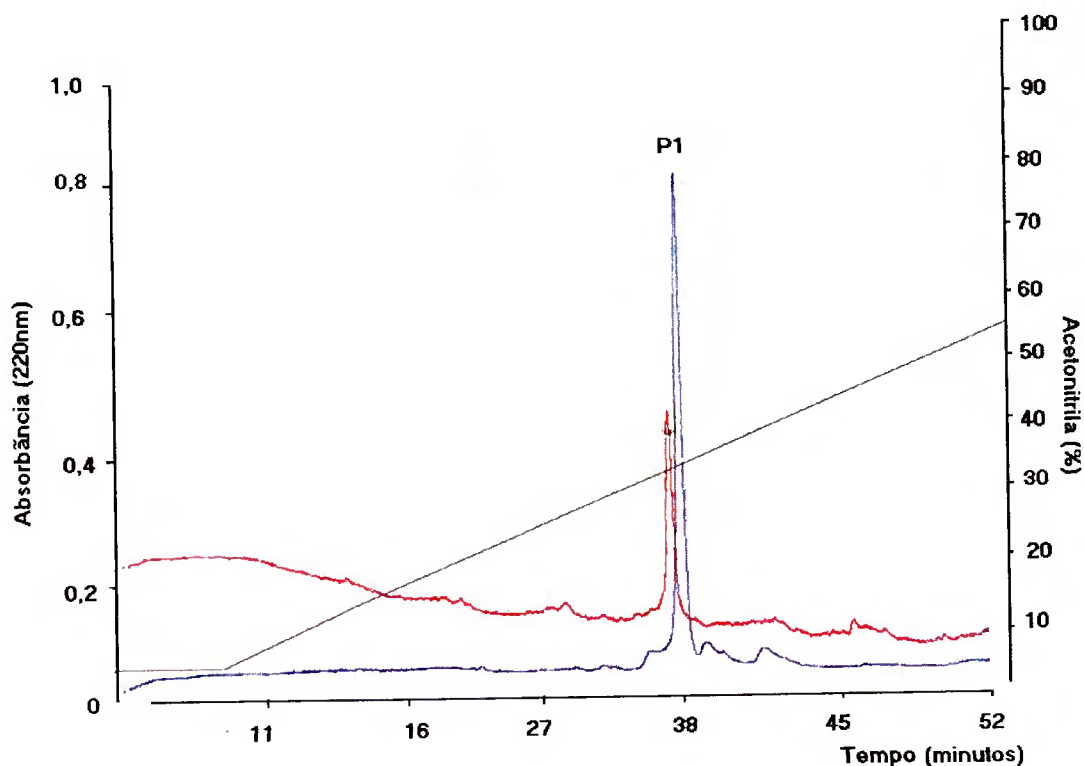


Figura 26b. Recromatografia da globina P1. Separação realizada em RP-HPLC em coluna C₄ com gradiente crescente de 5 a 55% de acetonitrila. O eluido foi monitorado em 220 nm (linha azul) e 280 nm (linha vermelha)

9

Apesar da especificidade de reação com brometo cianogênico, a clivagem das ligações nos resíduos de metionina é dependente da qualidade da solução de brometo cianogênico, da proporção adequada de proteína na reação, assim como, do tempo de reação. A influência destes fatores pode levar a clivagem da proteína em pontos inespecíficos.

Tabela IV - Análises de aminoácido do pico 2 da Hb-I do *B. cephalus*, obtido pelo método de Picotag.

Amino ácidos	1º Amostra	2º Amostra	3º Amostra	4º Amostra
Asp	16,5	14,7	14,0	16,1
Glu	8,2	7,7	7,1	8,4
Ser	9,1	7,9	8,2	9,2
Gly	10,4	10,2	10,6	10,1
His	1,4	1,4	1,3	1,9
Arg	3,9	4,2	3,8	5,0
Thr	3,9	4,8	4,8	4,6
Ala	16,3	17,9	17,7	19,8
Pro	5,3	7,4	7,0	6,4
Tyr	2,7	3,5	3,3	3,7
Val	13,4	13,2	12,9	12,3
Met	1,8	1,5	2,1	2,7
Cys	2,7	3,1	3,0	1,9
Ile	6,8	6,9	6,8	5,1
Leu	17,1	16,3	16,7	15,3
Phe	7,3	6,9	7,2	5,5
Lys	9,6	9,2	10,4	9,0
Total	136	137	136,9	137

O cromatograma da globina P2, obtido em RP-HPLC do produto de reação com CNBr está demonstrada na figura 27, onde são observados

noventa e nove picos principais, numerados (2-10) segundo a ordem de eluição da coluna cromatográfica.

Apesar da especificidade de clivagem do CNBr na porção C-terminal, os picos a mais observados podem ser decorrentes do tempo

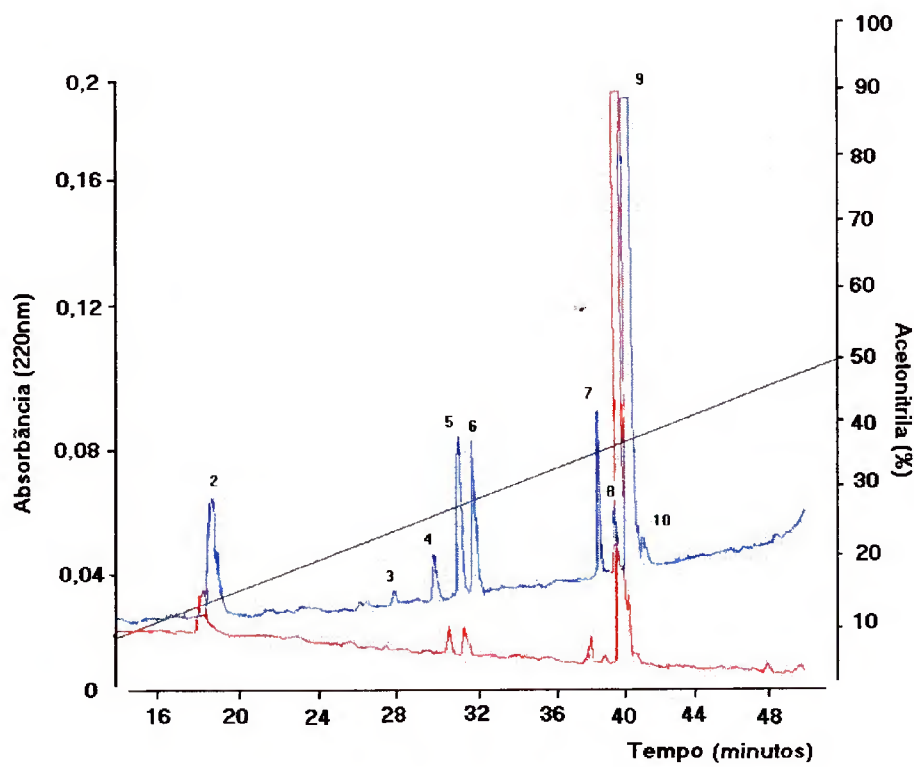


Figura 27. Digestão da globina P2 com CNBr. A mistura de peptídeos foram separadas por RP-HPLC em coluna C₁₈ em gradiente crescente de 10 a 50% de acetonitrila. O eluido foi monitorado em dois comprimentos de onda, 220nm (linha azul, em escala) e 280nm (linha vermelha, 0,05 AUFS).

excessivo de reação, permitindo a hidrólise em outros pontos da cadeia.

A primeira aplicação da globina P2 no sequenciador, permitiu a obtenção de 39 resíduos de aminoácidos: V-E-W-S-D-A-T-Y-S-A-I-S-G-V-W-G-

K-V-N-I-D-E-I-G-P-Q-A-L-G-R-L-L-I-V-Y-P-W-T-Q

Dos picos obtidos pela reação com CNBr, foi possível obter mais 12 resíduos: A-V-V-V-A-A-L-S-S-R-Y-F, a partir do peptídeo p7. A aplicação do peptídeo p9 mostrou em seus primeiros cinco ciclos, os resíduos iniciais da cadeia N-terminal obtida anteriormente.

O programa CLUSTER W (1.8) apontou a globina β da truta (*Salmo gairdneri*; *Salmo irideus* ou *Oncorhynchus mykiss*¹⁰) como sendo a mais próxima da sequência obtida (Figura 28a e b).

Posteriormente, incluímos na comparação, a sequência β da hemoglobina catódica do *Hoplosternum littorale* (Tamoatá) (Weber et al. 2000) que exibe efeito Bohr reverso. Neste trabalho são discutidos os principais resíduos envolvidos no efeito Bohr reverso.

¹⁰

Estes três nomes são encontrados como sinônimo na literatura, sendo atualmente descritos como *Oncorhynchus mykiss*, popularmente conhecidos como “rainbow trout” (Eschemyer, 1998).



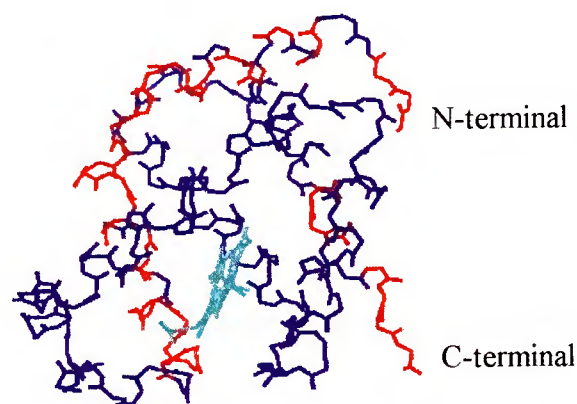


Figura 28b. Estrutura secundária da globina β da truta obtida com auxílio do programa *Swiss- PdbViewer v3.6b3* , destacando os resíduos em que mantém identidade (em vermelho) com a globina do matrinxã. Destaque em verde mostra o grupamento hemo.

Dos 51 resíduos obtidos da cadeia N-terminal da globina P2 da Hb-I catódica do matrinxã, 31 resíduos possuem identidade com a sequência N-terminal e 9 do C-terminal da globina β da Hb-I da truta (78%); dessa forma a antes indefinida fração P2 passou a ser denominada globina ou cadeia β .

Outra comparação de sequência realizada por nós foi com a globina β do tamoatá (*Hoplosternum littorale*) publicada por Weber et al., 2000, sendo encontrados 26 resíduos (67%) com identidade em relação ao N-terminal da cadeia beta do matrinxã.

5. Discussão

5.1 Padrão de separação das iso-hemoglobinas

Um trabalho realizado com hemolisado total (hemoglobinas não purificadas) de matrinxã do Rio Negro (AM), demonstrou oito frações anódicas e duas catódicas em análise eletroforética com gel de amido (Val & Almeida-Val, 1988), manifestando propriedades funcionais semelhantes à Hb-II (majoritária) estudada por nós: presença de efeito Bohr alcalino na forma “stripped” e efeito significativo da ligação de fosfatos somente em pH abaixo de 7,5.

Chama a atenção o fato de encontrarmos um fenótipo tão diferente com apenas duas frações distintas no hemolisado da espécie estudada por nós e serem encontradas dez frações na espécie estudada pelos autores antes mencionados. Sendo assim, fica em aberto em primeiro lugar se de fato estamos lidando com a mesma espécie, uma vez que não há confirmação da identificação da espécie do Rio Negro (citada como *Brycon cf. cephalus*).

Outra alternativa seria estarmos nos deparando com um caso de



perda de expressão gênica ou com processos pós-transcricionais de degradação oxidativa ou enzimática (*in vivo* ou *in vitro*) postulados por Portus et al., (1999^a) para explicar diferenças no fenótipo de hemoglobinas do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Essas diferenças podem estar refletindo mudanças na regulação da expressão gênica ou nos estímulos metabólicos, ambas causadas por pressões ambientais.

De acordo com o contexto anterior, o número reduzido de frações encontrado pode ser um caso de “perda de expressão gênica”, visto que a espécie estudada por nós provém de várias gerações que vêm sendo cultivada em tanques de piscicultura ¹¹, o que poderia ter levado, nestas populações, a uma redução numérica das frações de hemoglobina. Apesar da necessidade desta hipótese ainda ter de ser testada para o matrinxã.

O cultivo da espécie em tanque de piscicultura, onde são encontradas condições ambientais bastante favoráveis, como concentração de oxigênio, temperatura estável, pH e salinidade ideal, pode levar a uma nova forma adaptada da espécie frente a este novo ambiente, durante

¹¹

A espécie *B. cephalus* amplamente cultivada em tanques de piscicultura, principalmente no estado de S. Paulo, possui origem na bacia amazônica, onde têm papel importante na economia da região.

várias gerações ou então há um mecanismo fisiológico mais intrincado que pode diminuir a expressão da hemoglobina.

5.2 Ligação do oxigênio à Hb-I do matrinxã

A variação nas propriedades funcionais da Hb resulta em grande parte da variação na estrutura molecular, determinando propriedades intrínsecas na ligação do O₂ (Weber et al. 1990) e com isto permitindo aos peixes acesso a diferentes tipos de ambientes.

A truta tem sido considerada modelo padrão para diferenciação funcional de hemoglobina, possuindo como característica principal a Hb-I (catódica) que não apresenta mudanças funcionais na presença de fosfato e de variações do pH (Binotti et al., 1971).

Vários estudos com hemoglobinas que apresentam propriedades funcionais pouco comuns, como a hemoglobina catódica da truta (*O. mykiss*) (Brunori et al., 1973) e a hemoglobina catódica do tamoatá (*H. littorale*) (Weber et al., 2000.), vêm trazer informações valiosas a respeito das diferentes estratégias moleculares que são encontradas para suprirem as necessidades gasosas em condições de hipóxia ou de acidose.

A Hb-I (catódica) do matrinxã, conforme apresentado, não mostra efeito Bohr na forma stripped nem na presença de cloreto, e um leve efeito na presença de ATP. Desta forma, a Hb-I do matrinxã assemelha-se à Hb catódica da truta (Hb-I) que apresenta ausência de efeito Bohr em diferentes pHs, temperatura e composição do solvente.

Em relação à Hb catódica do *H. littorale*, esse comportamento é bastante diferente, uma vez que Weber et al. (2000) reportam um efeito Bohr reverso significativo ($\Delta H^+ = 0,38/\text{heme}$) que não muda com cloreto, mas sim com ATP tanto em termos de uma redução significativa da afinidade quanto da reversão do efeito Bohr. A Hb catódica da enguia (*Anguilla anguilla*) (Fago et al. 1995) também mostra um efeito Bohr reverso ($\Delta H^+ = 0,2$), embora menor do que o anterior, mas os efeitos de cloreto e ATP são semelhantes aos do tamoatá.

Cabe observar que, apesar da grande maioria dos casos de ausência de efeito ou presença de efeito Bohr reverso serem atribuídos a hemoglobinas catódicas (de elevado pI) ou de pequena migração anódica, há casos que isto não ocorre, como em bagres (Siluriformes) da bacia Amazônica (Portus et al. 1999^b).

Os 51 resíduos obtidos da globina β da Hb-I do matrinxã (Figura



28a), embora representem apenas uma pequena porção da sequência, apresentam uma notável similaridade com a sequência primária da Hb-I da truta que não manifesta efeito Bohr tanto na forma stripped como na presença de efetores alostéricos.

Em hemoglobina humana os principais grupos responsáveis pelo efeito Bohr alcalino estão localizados em segmentos terminais da cadeia polipeptídica beta e a extremidade N-terminal da cadeia alfa: a Val-NA1 (α 1) e a C-terminal His-HC3 (β 146) (Perutz, 1983., Weber, 1990.). A His-H21 (β 143) é considerada responsável pela expressão do efeito Bohr reverso. (Perutz, et al., 1980).

Na Hb-I do matrinxã encontramos o resíduo N-terminal da cadeia alfa bloqueado, presumivelmente por acetilação. A β 146, por sua vez, se encontra substituído por Phe. As hemoglobinas de truta (Hb-I), enguia e tamoatá (Hb^{Ca}) apresentam as mesmas modificações, indicando desta forma que a ausência de efeito ou presença de efeito Bohr reverso, ocorre principalmente quando os principais resíduos envolvidos no efeito Bohr alcalino são substituídos ou inoperantes. (Weber et al., 2000; Fago et al., 1995; Brunori et al., 1973.).

Como visto anteriormente, os principais resíduos envolvidos na



ligação do fosfato (Item 1.4) na Hb humana são a Val ($\beta 1$), His ($\beta 2$), Lys ($\beta 83$) e His ($\beta 143$). As três espécies citadas apresentam Ser na posição da $\beta 143$. A presença da Ser H21($\beta 143$) ocorre em Hb I de truta e Hb fetal humana que não possuem e possuem pequeno efeito do fosfato, respectivamente (Weber et al. 2000).

A Histidina 2 se encontra substituída por Glutamato (introduzindo uma carga negativa!), não sabemos se a Lisina 83 está presente, e uma Serina (sem carga) ocupa o lugar da Histidina 143, como já citado. O único resíduo confirmado é a Valina terminal, que contribui para o sítio com sua carga positiva no grupo amino. Dessa forma, o sítio de ligação de fosfatos se encontra significativamente afetado, e o comportamento da Hb-I na presença de ATP se torna compreensível.

A presença apenas das histidinas proximais $\beta(92)$ e distais $\beta(63)$ na sequência primária da globina β truta, sugere que as duas histidinas detectadas na análise de aminoácidos da globina β do matrinxã também ocupam as mesmas posições, visto que possuem grande semelhança na composição da sequência primária (Fig. 28a) e manifestam propriedades funcionais semelhantes.

A presença de grupos carregados positivamente na cavidade central

da molécula tetramérica vem trazendo fortes evidências na participação do efeito Bohr reverso, como demonstrado na presença de His-NA2 ($\beta 2$) do *Hoplosternum* ($\Delta H^+ = +0,38$) cujo efeito Bohr é quase duas vezes maior que a Hb da enguia ($\Delta H^+ = + 0,2$) que possui Glu-NA2($\beta 2$), indicando que mais grupos carregados positivamente na cavidade central contribui para este efeito (Weber et al. 2000; Fago et al., 1995).

Apesar da sequência primária da globina β do matrinxã estar incompleta, a análise preliminar dos resíduos envolvidos no efeito Bohr desta hemoglobina, traz forte indicação de que os resíduos apontados são responsáveis em grande parte pela atividade funcional descrita para a Hb-I do matrinxã.

Os gráficos de $\log P_{50}$ vs. o recíproco da temperatura absoluta (Figuras 21) mostram uma relação linear, que mostra que as variações de entalpia ΔH e de entropia ΔS são independentes da temperatura para as formas *stripped*, com cloreto e com ATP (Jensen & Weber, 1987). Medidas de Fago et al. (1997) com hemoglobinas de peixes antárticos mostram um comportamento bem diferente: uma dependência daquelas variáveis com a temperatura, que os autores propõem como sendo uma característica de hemoglobinas com efeito Root ou efeito Bohr



significativo. Experimentos desse tipo com a Hb-II do matrinxã podem fornecer subsídios para elucidar se essa hipótese é correta.

De forma geral, a variação de entalpia intrínseca e o calor de dissolução de O₂ são exotérmicos, enquanto as outras variações são endotérmicas e diminuem o valor do calor aparente de oxigenação: ΔH de dissolução de oxigênio, da transição T→R e a somatória do número de ligantes heterotrópicos liberados pela oxigenação multiplicado por sua respectiva ΔH (Weber et al., 1988; di Prişco et al., 1991):

$$\Delta H_{\text{intr}} = \Delta H_{\text{obs}} - \Delta H_{\text{diss}} - nH^+ \cdot \Delta H_{H^+} - nATP \cdot \Delta H^{ATP} - nCl \cdot \Delta H^{Cl^-}$$

O cálculo da variação de entalpia mostra a ausência de alterações significativas entre as três condições experimentais, situando-se em torno de -15kcal/mol. Esse valor na condição *stripped* representa a variação de entalpia intrínseca, uma vez que utilizamos os coeficientes de Henry (Edsall & Gutfreund, 1984). O processo de oxigenação é dirigido pela variação de entalpia, uma vez que a variação entrópica (de sinal negativo) é desfavorável.

Na medida em que a liberação de ânions conforme se processa a oxigenação é um processo endotérmico, o leve decréscimo no valor da

ΔH aparente confirma a baixa afinidade da Hb-I por ânions observada nos estudos funcionais. Em consequência, o valor de ΔG de oxigenação também não sofre variações significativas, ficando em torno de -7 kcal/mol. Para as três condições o processo de oxigenação é dirigido pela variação da entalpia, e as pequenas variações nesse parâmetro são acompanhadas por variações da ΔS no mesmo sentido, agindo em um mecanismo de compensação e minimizando o efeito sobre a ΔG , conforme observado em hemoglobinas de peixes (Jensen & Weber, 1987) e de serpentes (Bonilla, 1992; Bonilla et al., 1994).

As medidas de variação conformacional acompanhadas na Hb-I em dois valores de pH indicam um padrão diferente do observado por Colombo e Seixas (1999) para Hb humana e bovina, e por nós para a Hb-II da serpente cascavél (trabalho de Doutorado em andamento que coincide com as observações de Colombo e Seixas, 1999). Em primeiro lugar chama a atenção a dependência das variações dos números de moléculas de água em relação ao pH.

O efeito de Cl^- e ATP sobre a afinidade por O_2 na faixa de pH alcalino é explicável com base na sequência conhecida de aminoácidos.



Os efeitos podem ter relação, por exemplo, com a relação de cargas positivas na interface interdimérica com a variação do pH. O esclarecimento do mecanismo virá de novos experimentos funcionais realizados em melhores condições instrumentais e a determinação das estruturas cristalográficas.

Com o objetivo de se obter informações valiosas a respeito da mudança conformacional da Hb-I, experimentos para a obtenção da forma desoxigenada estão sendo realizados. Uma vez obtida a forma cristalina da desoxi-Hb, seguido de bons dados de difração, informações valiosas a respeito da mudança conformacional $T \rightarrow R$ poderão ser obtidos, assim como visualizar as principais interações envolvidas nas observações funcionais.



6. Conclusões

I. As duas frações de hemoglobina descritas por nós não podem ser atribuídas como sendo uma redução numérica das formas encontradas por Val e Almeida-Val em exemplares do Rio Negro (AM), até que seja confirmada a espécie estudada por eles e também confirmarmos o padrão de separação das iso-formas do matrinxã em suporte de gel de amido.

II. A comparação dos principais resíduos do segmento N-terminal e C-terminal da Hb-I com a sequência da Hb^{ca} (Hb-I) da truta, trouxeram fortes indicações da relação estrutura/função. Como por exemplo o bloqueio da N-terminal da globina α e as substituições de resíduos sem carga, reforçando a idéia de que a presença do efeito Bohr reverso ou nulo ocorre principalmente quando os resíduos envolvidos no efeito Bohr alcalino estão bloqueados ou substituídos.

III. Apesar do sucesso na formação e da difração por raio-X dos cristais hexagonais da Hb-I ligada a monóxido de carbono com 2,5 Å de resolução (Honda et al. 2000), torna-se necessário obtermos a sequência



primária completa para realizar o refinamento da estrutura molecular.

IV. Torna-se necessário também um estudo minucioso a respeito da dependência das mudanças conformacionais da Hb-I do matrinxã em relação ao pH e o efeito de ânions.

V. O trabalho merece continuidade realizando:

1) uma comparação da Hb-I com a Hb-I de truta, cristalização em diversas condições, e análise funcional detalhada utilizando cela de oxigenação.

2) dar continuidade nas tentativas de sequenciamento através do cDNA.

3) uma caracterização completa também da Hb-II.



7. Referências Bibliográficas

1. ACKERS, G. K., DOYLE, M. L., MYERS, D. & DAUGHERTY, M. A. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*. v.255, p.54-63, 1992.
2. ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature*. v.237, n.5351, p.146-149, 1972.
3. ASCOLI, F., ROSSI-FANELLI, M. R. & ANTONINI, E. Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. *Meths. Enzymol*, 1981. v.76, p.72-85.
4. BALDWIN, J. & CHOTHIA, C. Haemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.* v.129, p.175-220, 1979.
5. BALDWIN, J. A model of co-operative oxygen binding to haemoglobin. *Br. Med. Bull.* v.32, n.3, p.213-218, 1976.
6. BASHFORD, D., CHOTHIA, C. & LESK, A. M. Determinants of a protein fold unique features of the globin amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* v.196, p.199-216, 1987.
7. BENESCH, R. E. & BENESCH, R. *Adv. Protein Chem.* v.28, p.211-237, 1974.
8. BENESCH, R. E., BENESCH, R. & YUNG, S. *Analytical Biochemistry*. v.55, p.245-248, 1973.
9. BENESCH, R., MACDUFF, G. & BENESCH, R. E. Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer. *Analytical Biochemistry*. v.11, p.81-87, 1965.



10. BETTATI, S., MOZZARELLI, A. & PERUTZ, M. F. Allosteric mechanism of haemoglobin: Rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. *J. Mol. Biol.* v.281, p.581-585, 1998.
11. BINOTTI, I., GIOVENCO, S., GAIRDINA, B., ANTONINI, E., BRUNORI, M & WYMAN, J. Studies on the functional properties of fish haemoglobins. II. The oxygen equilibrium of the isolated haemoglobin components from trout blood. *Archives fo Biochemistry and Biophysics.* v.142, p.274-280, 1971.
12. BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. Anionic control of hemoglobin junction. In: Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities. *Academic Press*, 1978. p.647-663.
13. BONILLA, O. G., FOCESI, Jr. A., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. & CASHON, R. E. Functional properties of the hemoglobin from the south american snake *Mastigodryas bifossatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* v.109A, p.1085-1095, 1994.
14. BONILLA, G.O. (1992) Estrutura-função e evolução em hemoglobinas de ofídios. Tese de Doutorado, I.B., Universidade Estadual de Campinas.
15. BORGESE, T. A., HARRINGTON, J., BORGESE, J. M. & NAGEL, R. L. Thermostability of fish hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* v.72B, p.7-11, 1982.
16. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.



17. BROUWER, M. & BAKER-KING, C. Thermodynamic of the interaction of oxygen with Co(II)-bihistidine and Co(II)-bisbenzylhistidine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.34, p.117-133. 1988.
18. BRUNORI, M. Molecular adaptation to physiological requiremets: Teh hemoglobin system of trout. *Current topics in cell regulation*, v.9, p.1-39, 1975.
19. BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; GIARDINA, B.; BOSSA, F.; ANTONINI, E. Hemoglobins from trout. Strutural and funcitonal properties. *Mol Cell Biochem.* v.1, p.189-196, 1973.
20. CAMPBELL, M. K. *Biochemistry*. 2ed. United States of America. Saunders College Publishing, 655p.
21. CAREY, F. G. & GIBSON, Q. H. Reverse temperature dependence of tuna hemoglobin oxygenation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.78, n.4, p.1376-82, 1977.
22. CHANG, R. *Physical chemistry with applications to biological systems*. 2 ed. New York, MacMillan Publishing C., Inc, 1985.
23. CHIEN, J. C. W.; MAYO, K. H. Carp hemoglobin. I. Precise oxygen equilibrium and analysis according to the models of Adair and of Monod, Wyman and Changeax. *J. Biol. Chem.* v.255, p.970-979, 1980.
24. CIROOTO, C. & GERACI, G. Embryonic chicken hemoglobins. Oxygen equilibrium of two pure componenets. *Comp. Biochem Physiol A*. v.51, p.159-163, 1975.
25. COLOMBO, M. F. & SEIXAS, F. A. V. Novel allosteric conformation of human Hb revealed by the hydration and



- anion effects on O₂ binding. *Biochemistry*, 1999.
26. COLOMBO, M. F. & BONILLA-RODRIGUEZ, G. The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *The Journal of Biological Chemistry*. v.271, p.4895-4899, 1996.
 27. COLOMBO, M. F., RAU, D. C. & PARSEGAN, V. A. Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.91, p.10517-10520, 1994.
 28. COLOMBO, M. F., RAU, D. C. & PARSEGAN, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: A water effect on hemoglobin. *Science*. v.256, p.655-659, 1992.
 29. DE OLIVEIRA, C., TABOGA, S. R., SMARRA, A. L. S., BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Microscopical aspects of accessory air breathing through a modified in the stomach in the armored catfish *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytobios*. v.103, 2000, *no prelo*.
 30. Di PRISCO, G. & TAMBURRINI, M. The hemoglobins of marine and freshwater fish: The search for correlations with physiological adaptation. *Comparative Physiology*. v.102B, p.661-671, 1992.
 31. Di PRISCO, G. CONDO, S. G., TAMBURRINI, M. & GIARDIA, B. Oxygen transport in extreme environments. *TIBS*. v.16, p. 471-474, 1991.
 32. Di CERA, E., DOYLE, M. L. & GILL, S. J. Alkaline Bohr effect of human hemoglobin A₀. *J. Mol. Biol.* v.200, p.593-599, 1988.
 33. DRENTH, J. *Principles of protein X-ray crystallography*.



- New York, Inc; Springer-Verlag, 1994. p.1-18.
34. DUCRUIX, A. & GIEGÉ, R. *Crystallization of nucleic acids and proteins - A practical approach*. New York. IRL Press at Oxford New York Press. 1992. p.73-98.
35. DUPONT, D. R., KEIM, P. S., CHUI, A. H., BELLO, R., BOZZINI, M., WILSON, K. J. *A comprehensive approach to amino acid analysis*. In: *Techniques in Protein Chemistry* (HUGLY, T. E., ed.). San Diego, Academic Press, Inc. 1989. p.284-304.
36. EDSALL, J. T. & GUTFREUND, H. *Biothermodynamics: The study of biochemical processes at equilibrium*. John Wiley & Sons Ltd. 1984.
37. ESCHMEYER, W. N., Editor. *Catalog of fishes. Special Publication*, California Academy of Sciences, San Francisco. 1998. 3 vols. 2905 p.
38. FAGO, A., WELLS, R. M. G. & WEBER, R. E. Temperature dependent enthalpy of oxygenation in antarctic fish hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* v.118B, n.2, p.319-326, 1997.
39. FAGO, A., CARRATORES, V., DI PRISCO, G., FEUERLEIN, R. J., SOTTRUP-JENSEN, L., & WEBER, R. E. The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Amino acid sequence and oxygen equilibria of a reverse Bohr effect hemoglobin with high oxygen affinity and high phosphate sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*. v.270, n.32, p.18897-18902, 1995.
40. GIARDINA, B.; SCATENA, R.; CLEMENTI, M.E.; CERRONI, L.; NUUTINEN, M.; BRIX, O.; SLETTEN, S.N.; CASTAGNOLA, M. & CONDÒ, S.G. Physiological relevance of the overall ΔH of oxygen binding to fetal

- human hemoglobin. *J. Mol. Biol.* v.229, p.512-516, 1993.
41. GIARDINA, B. & AMICONI, G. Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobin by conventional spectrophotometric procedures. *Methods Enzymol.* v.76, p.417-427, 1981.
42. GILLEN, R. G. & RIGGS, A. Structure and function of the hemoglobins of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.* v.247, p.6039-6046, 1972.
43. HILL, A. V. The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. *Biochem. J.*, v.7, p.471-480, 1913.
44. HONDA, R. T., DELATORRÉ, P., FADEL, V., CANDURI, F., DELLAMANO, M., de AZEVEDO Jr., W. & BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Crystallization, preliminary X-ray analysis and molecular replacement solution of carbomonoxy form of hemoglobin-I from the fish *Brycon cephalus*. *Acta Crystallographica Section-D* 56. p.1685-1687, 2000.
45. HORIMOTO, K., SUZUKI, H. & OTSUKA, J. Discrimination between adaptive and neutral amino acid substitutions in vertebrate hemoglobins. *J. Mol. Evol.* v.31, p.302-324, 1990.
46. IMAI, K., SHIH, T. B. D., TAME, J., NAGAI, K. & MIYAZAKI, G. Strutral and functional consequences of amino acid substitutions in hemoglobin as manifested in natural and artificial mutants. *Protein Seq Data Anal.* v.2, p.81-26, 1989.
47. ISAACKS, R. E.; HARKNESS, D. R.; ADLER, J. L.; GOLDMAN, P. H. Studies on avian erythrocyte metabolism. III. Effect of organic phosphates on oxygen affinity of



- embryonic and adult-type hemoglobins of the chick embryo. *Arch. Biochem Biophys.* v.173, p.114-120, 1976.
48. JANCARICK, J. & KIM, S. H. *J. Appl. Crystallog.* v.24, p.409-411, 1991.
49. JENSEN, F. B. & WEBER, R. E. Thermodynamic analysis of precisely measured oxygen equilibria of tench (*Tinca tinca*) hemoglobin and their dependence on ATP and protons. *J. Comp. Physiol B.* v.157. p.137-143, 1987.
50. KAUZMAN, W. Some factores in the interpretation of protein denaturation . *Adv. Protein. Chem.* v.14, p.1-63, 1959.
51. KENDREW, J. C., WATSON, H. C., STRANDBERG, B. E., DICKERSON, R. E., PHILLIPS, D. C. & SHORE, V. C. A partial determination by X-ray methods, and its correlation with chemical data. *Nature*, v.190, n.4777, p.666-670, 1961.
52. KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralist. *Genome*, v.24, p.24-31, 1989.
53. KOSHLAND, Jr., D. E., NENETHY, G. & FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* v.5, p.365-385, 1966.
54. LESK, A. M. & COTHIA, C. How different amino acid sequences determine similar protein structures: The structure and evolutionary dynamics of the globins. *J. Mol. Biol.* v.136, p.225-270, 1980.
55. MATSUDAIRA, P. T. *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing.* Inc. San Diego



- California : Academic Press. 1989, p 1-30.
56. MAYO, K. H. & CHIEN, J. C. M. Effect of temperature on functional properties of carp hemoglobin. *J. Mol. Biol.* v.142, p.63-73, 1980.
57. MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEAUX, J. P. On the nature of the allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* v.12, n.1, p.88-118, 1965.
58. PADOVAN, J. C. Determinação da estrutura primária da cadeia B(β) da hemoglobina do réptil semi-aquático brasileiro, *Liophis miliaris*. São Paulo, 1996. 249p. Tese (doutor) - Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo.
59. PEREZ, J., RYLANDER, K. & NIRCHIO, M. The evolution of multiple haemoglobins in fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, v.5, p.304-319, 1995.
60. PERUTZ, M. F.; FERMI, G.; POYART, C.; PAGNEL, J. & KISTER, J. A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human hemoglobin. *J. Mol. Biol.* v233, n3, p.536-545, 1993.
61. PERUTZ, M. F. Species adaptation in a protein molecule. *Molec. Biol. Evol.* v.1, n.1, p 1-28, 1983.
62. PERUTZ, M. F., KILMARTIN, J. V., NISHIKURA, K. & ROLLEMA, H. S. Identification of residues contributing to the bohr effect of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v.138, p.649-670, 1980.
63. PERUTZ, M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: Influence of structure of the globin on the heme iron. *Ann. Rev. Biochem.* v.48, p.327-386, 1979.

64. PERUTZ, M. F. Electrostatic effects in proteins. *Science*. v.201, p.1187-1191, 1978.
65. PERUTZ, M. F., KENDREW, J. C. & WATSON, H. C. Structure and function of haemoglobin - II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* v13, p 669-678, 1965.
66. PORTUS, M. I., PAULA-SILVA, M. N., VAL, A. L. & ALMEIDA-VAL, M. F. Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* em populações artificiais com diferentes índices de heterogeneidade genética. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, XII, 1999^a, São Carlos. p 162.
67. PORTUS, M. I. & VAL, A. Adaptações funcionais das hemoglobinas de siluriformes da bacia amazônica. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, XII, 1999^b, São Carlos. p 161.
68. RANDAL, D. J. & VAL, A. L. Carbon dioxide and acid transfer in teleost fish. *Xxxx*, v.23, p.69-74, 1993.
69. RIGGS, F. A. Properties of fish hemoglobins. *Fish Physiology*. v.4, p.209-252, 1970.
70. RIGGS, F. A. Self-Association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *The journal of Experimental Biology*. v.201, p.1073-1084, 1998.
71. ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Oxygen equilibrium of hemoglobin from *Thynnus thynnus*. *Nature*. v.186, p.895-896, 1960.
72. SCHIMDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente*. Livraria Santos Editora. São Paulo, 1999. 5 ed., p.67-91.



73. SMITH, F. R. & ACKERS, K. Experimental resolution of cooperative free energies for the ten ligation states of human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.82, p.5347-5351, 1985.
74. STRYER, L. *Bioquímica*. Tradução por Moreira, A. J. M. S., Campos, J. P., Macedo, L. F., Motta, P. A. & Elias, P. R. P. 4ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p.139-170.
75. STEPHEN, F. A., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* v.25, p.3389-3402, 1997.
76. TAN, A. L.; DEYONG, A.; NOBLE, R. W. The pH dependence of the affinity, kinetics and cooperativity of ligand binding to carp hemoglobin, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.* v.247, p.2493-2498, 1972.
77. THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J.; "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice."; *Nucleic Acids Res.* v.22, p.4673-4680, 1994.
78. TOSQUI, P., SEIXAS, F. A. V. & COLOMBO, M. F. On the stabilization of intermediate allosteric states of human and bonive hemoglobin by DPG revealed by the osmotic stress method. In: SBBq-Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXIX, 2000, Caxambu, M-46, p.130.
79. VAL, A. L. *Surviving low oxygen level: Lessons from fishes of the Amazon*. In: Val, A. L., Almeida-Val, V. M. And Randall, D. J. *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: Inpa, 1996. p.59-73.



80. VAL, A.L; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Adaptive features of amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon cf cephalus* and *Brycon cf erythropterus* (Pisces). *Rev. Brasil. Genet.* v.11, p.27-39, 1988.
81. WEBER, R. E., FAGO, A., VAL, A. L., BANG, A., VAN HAUWAERT, ML., DEWILDE, S., ZAL, F. & MOENS, L. Isohemoglobin differentiation in the bimodal-breathing amazon catfish *Hoplosternum littorale*. *The Journal of Biological Chemistry.* v.275, n.23, p.17297-17305, 2000.
82. WEBER, R. E. *Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity.* In: Val, A. L., Almeida-Val, V. M. And Randall, D. J. *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon.* Manaus: Inpa, 1996. p.75-90.
83. WEBER, R. E. *Functional significance and structural basis of multiple hemoglobins with special reference to ectothermic vertebrates.* In: *Animal nutrition and transport processes. 2. Transport, respiration and excretion: Comparative and environmental aspects.* Ed. Truchot, J-P. and Lahlou, B., v.6, p.58-75, 1990.
84. WEBER, R. E. & JENSEN, F. B. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* v.50, p.161-180, 1988.
85. WEBER, R.E.; WELLS, R. M. G. & ROSSETTI, J. E. Adaptations to neoteny in the salamander, *Necturus maculosus*, blood respiratory properties and interactive effects of pH, temperature and ATP on hemoglobin oxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v.80, p.495-501, 1985.



86. WEBER, R. E., WOOD, S. C. & LOMHOLT, J. P. Temperature acclimation and oxygen-binding properties of blood and multiple haemoglobins of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* v.65, p.333-345, 1976a.
87. WITHERS, P. C. *Comparative Animal Physiology*. Saunders College Publishing - Harcourt Brace Jovanovich College Publishers. 1992, p.727-776.



Anexo 1.

Solução estoque para eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (ENDGP)

Tampão do gel (Tpão A)

- | | |
|--------------------------|--------|
| - Tris (P.M. 121,1) | 18,15g |
| - Ajustar com HCl para | pH 8,8 |
| - H ₂ O q.s.p | 100 mL |

Tampão de corrida

- | | |
|-----------------------------|-------|
| - Tris (P.M. 121,1) 0,012 M | 1,51g |
| -Glicina | 7,21g |
| -H ₂ O q.s.p | 1 L |

Persulfato de Amônio 10 % (P.A)

- | | |
|-------------------------|------|
| - Persulfato de Amônio | 0,1g |
| -H ₂ O q.s.p | 1 mL |

Solução de Acrilamida 30,8 % (Sol. A)

- | | |
|------------------------------|--------|
| - Acrilamida (P.M. 71,08) | 30g |
| - Bisacrilamida (P.M. 154,2) | 0,8g |
| - H ₂ O q.s.p | 100 mL |



Modo de preparo do Gel de poliacrilamida 7,5%

- Sol . A	2,5mL
- Tpão A	2,5mL
- H ₂ O	4,9mL
- P.A	30μL
- TEMED	10μL
Volume total	≅ 10mL

Gel de empilhamento 4%

- Sol. A	0,665mL
- Tpão A	1,25mL
- H ₂ O	3mL
- P.A	50μL
- TEMED	10μL
Volume total	≅ 5mL



Anexo 2.

COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR PARA OXI Hb (x 10⁻⁴)

$\lambda(\text{nm})$	Oxi Hb
540	1,46
560	0,867
570	1,18
576	1,58
630	0,014

COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DA META Hb EM FUNÇÃO DO pH

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.

Solução estoque:

Soluções de Sais :

Cloreto de cálcio 2 M

Citrato de sódio 1 M

Acetato de amônio 2 M

Cloreto de magnésio 2 M

Sulfato de amônio 3,5 M

Sulfato de lítio 1,8 M

Acetato de magnésio 2 M

Acetato de sódio 2 M

Fosfato de potássio 1 M

Acetato de zinco 1 M

Acetato de cálcio 1 M

Soluções Tampões :

Acetato de sódio 1 M pH
4,6

Tris 1 M pH 8,5

HEPES 1 M pH 7,5

Cacodilato 1 M pH 6,5

Citrato 1 M pH 5,6

Imidazol 1 M pH 6,5

Soluções Precipitantes :

MPD ¹ 100%

Isopropanol 100%

PEG ² 400 a 100%

PEG 4000 a 50%

PEG 8000 a 50%

PEG 1500 a 50%

Tartarato de sódio e potássio 2 M

Formiato de sódio 4 M

Formiato de magnésio 4 M

Fosfato de amônio 2,5 M

Fosfato de potássio (mono) 2 M, pH 7,0

Fosfato de sódio (mono) 2 M

¹ 2-metil - 2,4 pentanediol

² Polietileno Glicol

Soluções cristalizantes :

Diluir toda solução em quantidade suficiente para 10mL.

	Sal	Tampão	Precipitante
1	0,05M Clorto de cálcio	0,1M Acetato	30% MPD
2	----	----	0,4M Tartarato de Na/K
3	----	----	0,4M Fosfato de amônio
4	----	0,1M Tris	2,0M Sulfato de amônio
5	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	40% MPD
6	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
7	----	0,1M Cacodilato	1,4M Acetato de sódio
8	0,2M Citrato de sódio	0,1M Cacodilato	30% Isopropanol
9	0,2M Acetato de amônio	0,1M Citrato	30% PEG 4K
10	0,2M Acetato de amônio	0,1M Acetato	30% PEG 4K
11	----	0,1M Citrato	1,0M Fosfato de amônio
12	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% Isopropanol
13	0,2M Citrato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 400
14	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Hepes	28% PEG 400
15	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8K
16	----	0,1M Hepes	1,5M Sulfato de lítio
17	0,2M Sulfato de lítio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
18	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	20% PEG 8 K
19	0,2M Acetato de amônio	0,1M Tris	30% Isopropanol
20	0,2M Sulfato de amônio	0,1M Acetato	25% PEG 4 K
21	0,2M Acetato de magnésio	0,1M Cacodilato	30% MPD
22	0,2M Acetato de sódio	0,1M Tris	30% PEG 4 K
23	0,2M Cloreto de magnésio	0,1M Hepes	30% PEG 400
24	0,2M Cloreto de cálcio	0,1M Acetato	20% Isopropanol
25	----	0,1M Imidazol	1,0M Acetato de sódio
26	0,2M Acetato de amônio	0,1M Citrato	30% MPD
27	0,2M Citrato de sódio	0,1M Hepes	20% Isopropanol
28	0,2M Acetato de sódio	0,1M Cacodilato	30% PEG 8 K
29	----	0,1M Hepes	0,8M Tartarato de Na/K
30	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 8 K
31	0,2M Sulfato de amônio	----	30% PEG 4 K

32	----	----	2,0M Sulfato de amônio
33	----	----	4,0M Formiato de sódio
34	----	0,1M Acetato	2,0M Formiato de sódio
35	----	0,1M Hepes	1,8M Fosfato de Na/K
36	----	0,1M Tris	8% PEG 8 K
37	----	0,1M Acetato	8% PEG 4 K
38	----	0,1M Hepes	1,4M Citrato de sódio
39	----	0,1M Hepes	2% PEG 400 2,0M Sulfato de amônio
40	----	0,1M Citrato	20% Isopropanol 20% PEG 4 K
41	----	0,1M Hepes	10% Isopropanol 20% PEG 4 K
42	0,05M Fosfato de potássio	----	20% PEG 8 K
43	----	----	30% PEG 2000 K
44	----	----	0,2M Formiato de magnésio
45	0,2M Acetato de zinco	0,1M Cacodilato	18% PEG 8 K
46	0,2M Acetato de cálcio	0,1M Cacodilato	18% PEG 8 K
47	----	0,1M Acetato	2,0M Sulfato de amônio 5% Isopropanol
48	0,8M Sulfato de lítio	----	2% PEG 8 K
49	1,0M Sulfato de lítio	----	10% PEG 8 K
50	----	----	1,0M Imidazol
51	----	0,1M Hepes	70% MPD
52	0,1M Cloreto de cádmio	0,1M Acetato	30% PEG 400 K
53	0,02M Cloreto de cádmio	0,1M Hepes	30% PEG 4 K

Anexo 4.

Solução corante de Bradford ¹.

- Comassie Brilliant Blue G-250	12,5 mg
- Etanol 95%	6,25 mL
- Ácido fosfórico	12,5 mL
- Água milli-Q	q.s.p 125 mL

¹ Estocar em ambiente refrigerado a 4 °C em frasco escuro em um período máximo de uma semana.



Anexo 5.

Procedimento para correção da pressão barométrica (P.B).

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

$1000 \text{ mBar (hPa)} = 750,062 \text{ mmHg}$

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

onde x é a P.B corrigida (mmHg) e n a pressão em mBar (hPa).

2. Determinar o fator de correção da P.B interpolando o valor baseado na tabela de correção (segue este anexo).

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

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 é determinado 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.

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

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

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

$$Y = [(z-x) \cdot (t_c - t_o)] + x = [(2,96 - 2,8325) \cdot (23,8-23)] + 2,8325 = 2,9345$$

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

A tabela de correção barométrica pela temperatura e a tabela de pressão de vapor d' água foram obtidos no Handbook of Chemistry and physics, 52 ed. , 1971-1972. Published by the Chemical Rubber, Co. Cranwood Parkway, Cleveland, Ohio.



VAPOR PRESSURE OF WATER BELOW 100°C

Pressure of aqueous vapor over water in mm of H₂ for temperatures from -15.8 to 100°C. Values for fractional degrees between 50 and 89 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	128.6
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	4.785	4.715	4.647	58	136.08	137.3	138.5	139.9	141.2
2	5.294	5.219	5.144	5.070	4.998	59	142.60	143.9	145.2	146.6	148.0
3	5.685	5.605	5.525	5.447	5.370	60	149.38	150.7	152.1	153.5	155.0
4	6.101	6.015	5.931	5.848	5.766	61	156.43	157.8	159.3	160.8	162.3
5	6.543	6.453	6.363	6.274	6.187	62	163.77	165.2	166.8	168.3	169.8
6	7.013	6.917	6.822	6.728	6.635	63	171.38	172.9	174.5	176.1	177.7
7	7.513	7.411	7.309	7.209	7.111	64	179.31	180.9	182.5	184.2	185.8
8	8.045	7.936	7.828	7.722	7.617	65	187.54	189.2	190.9	192.6	194.3
9	8.609	8.494	8.380	8.267	8.155	66	196.09	197.8	199.5	201.3	203.1
10	9.209	9.086	8.965	8.845	8.727	67	204.96	206.8	208.6	210.5	212.3
11	9.844	9.714	9.585	9.458	9.333	68	214.17	216.0	218.0	219.9	221.8
12	10.518	10.380	10.244	10.109	9.976	69	223.73	225.7	227.7	229.7	231.7
13	11.231	11.085	10.941	10.799	10.658	70	233.7	235.7	237.7	239.7	241.8
14	11.987	11.833	11.680	11.528	11.379	71	243.9	246.0	248.2	250.3	252.4
15	12.788	12.624	12.462	12.302	12.144	72	254.6	256.8	259.0	261.2	263.4
16	13.634	13.461	13.290	13.121	12.953	73	265.7	268.0	270.2	272.6	274.8
17	14.530	14.347	14.166	13.987	13.809	74	277.2	279.4	281.8	284.2	286.6
18	15.477	15.284	15.092	14.903	14.715	75	289.1	291.5	294.0	296.4	298.8
19	16.477	16.272	16.071	15.871	15.673	76	301.4	303.8	306.4	308.9	311.4
20	17.535	17.319	17.105	16.894	16.685	77	314.1	316.6	319.2	322.0	324.6
21	18.650	18.422	18.197	17.974	17.753	78	327.3	330.0	332.8	335.6	338.2
22	19.827	19.587	19.349	19.113	18.880	79	341.0	343.8	346.6	349.4	352.2
23	21.068	20.815	20.565	20.316	20.070	80	355.1	358.0	361.0	363.8	366.8
24	22.377	22.110	21.845	21.583	21.324	81	369.7	372.6	375.6	378.8	381.8
25	23.756	23.476	23.198	22.922	22.648	82	384.9	388.0	391.2	394.4	397.4
26	25.209	24.912	24.617	24.326	24.039	83	400.6	403.8	407.0	410.2	413.6
27	26.739	26.426	26.117	25.812	25.509	84	416.8	420.2	423.6	426.8	430.2
28	28.349	28.021	27.696	27.374	27.055	85	433.6	437.0	440.4	444.0	447.5
29	30.043	29.697	29.354	29.015	28.680	86	450.9	454.4	458.0	461.6	465.2
30	31.824	31.461	31.102	30.745	30.392	87	468.7	472.4	476.0	479.8	483.4
31	33.695	33.312	32.934	32.561	32.191	88	487.1	491.0	494.7	498.5	502.2
32	35.663	35.261	34.864	34.471	34.082	89	506.1	510.0	513.9	517.8	521.8
33	37.729	37.308	36.891	36.477	36.068	90	525.76	529.77	533.80	537.86	541.95
34	39.898	39.457	39.018	41.251	40.844	91	546.05	550.18	554.35	558.53	562.75
35	42.175	41.737	41.300	40.864	40.434	92	566.99	571.26	575.55	579.87	584.22
36	44.563	44.078	43.595	43.117	42.644	93	588.60	593.00	597.43	601.89	606.38
37	47.067	46.556	46.050	45.549	45.054	94	610.90	615.44	620.01	624.61	629.24
38	49.692	49.157	48.627	48.102	47.582	95	633.90	638.59	643.30	648.05	652.82
39	52.442	51.879	51.323	50.774	50.231	96	657.62	662.45	667.31	672.20	677.12
40	55.324	54.737	54.156	53.580	53.009	97	682.07	687.04	692.05	697.10	702.17
41	58.34	60.22	60.86	60.22	59.58	98	707.27	712.40	717.56	722.75	727.98
						99	733.24	738.53	743.85	749.20	754.58
						100	780.00	785.45	790.93	796.44	802.00
						101	787.57	793.18	798.82	804.50	810.21



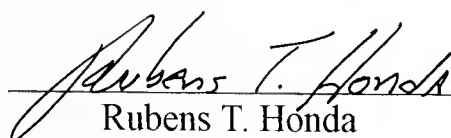
TEMPERATURE CORRECTION FOR BAROMETER READINGS

BRASS SCALE—METRIC UNITS

To reduce readings of a mercurial barometer with a brass scale to 0°C subtract the appropriate quantity as found in the table. These values are based on the coefficient of expansion of mercury (181792 + 0.175t - 0.035118t²) × (10⁻⁹), and of brass 0.0000184 per °C. Corrections are in millimeters.

Temp. °C	Observed height in millimeters																	
	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	.10	.10	.10	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13
2	.20	.21	.21	.21	.22	.22	.22	.23	.23	.23	.24	.24	.24	.25	.25	.25	.25	.26
3	.30	.31	.31	.32	.32	.33	.33	.34	.34	.35	.35	.36	.36	.37	.37	.38	.38	.39
4	.40	.41	.42	.42	.43	.44	.44	.45	.46	.46	.47	.48	.48	.49	.50	.50	.51	.52
5	0.51	0.51	0.52	0.53	0.54	0.55	0.56	0.56	0.57	0.58	0.59	0.60	0.60	0.61	0.62	0.63	0.64	0.64
6	.61	.62	.63	.64	.65	.66	.67	.68	.69	.70	.71	.71	.72	.73	.74	.75	.76	.77
7	.71	.72	.73	.74	.75	.77	.78	.79	.80	.81	.82	.83	.85	.86	.87	.88	.89	.90
8	.81	.82	.84	.85	.86	.87	.89	.90	.91	.93	.94	.95	.97	.98	.99	1.01	1.02	1.03
9	.91	.92	.94	.95	.97	.98	1.00	1.01	1.03	1.04	1.06	1.07	1.09	1.10	1.12	1.13	1.15	1.16
10	1.01	1.03	1.04	1.06	1.08	1.09	1.11	1.13	1.14	1.16	1.17	1.19	1.21	1.22	1.24	1.26	1.27	1.29
11	1.11	1.13	1.15	1.17	1.18	1.20	1.22	1.24	1.26	1.27	1.29	1.31	1.33	1.35	1.36	1.38	1.40	1.42
12	1.21	1.23	1.25	1.27	1.29	1.31	1.33	1.35	1.37	1.39	1.41	1.43	1.45	1.47	1.49	1.51	1.53	1.55
13	1.31	1.34	1.36	1.38	1.40	1.42	1.44	1.46	1.48	1.50	1.53	1.55	1.57	1.59	1.61	1.63	1.65	1.67
14	1.41	1.44	1.46	1.48	1.51	1.53	1.55	1.57	1.60	1.62	1.64	1.67	1.69	1.71	1.73	1.76	1.78	1.80
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	3.75	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

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 07/ 02/ 2001.


Rubens T. Honda



