

Este exemplar  
corresponde à versão  
final da tese aprovada  
pela comissão julgadora  
Fabíola Cardillo aprovada  
pela comissão julgadora

FABIOLA CARDILLO

ATIVIDADE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS NAS  
PROPRIEDADES LIGANTES DA HEMOGLOBINA EXTRACELULAR  
DE *Glossoscolex paulistus* (OLIGOCHAETA, GLOSSOSCOLECÍDAE)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientador:

Prof. Dr. Benedito de Oliveira

CAMPINAS-SP

1989

Este trabalho foi realizado com os auxílios fi  
nanceiros provenientes da  
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
(FAPESP), do  
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNO  
LÓGICO (CNPq) e da  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISAS DA UNICAMP.

Este trabalho foi realizado no  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PROTEÍ  
NAS DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMI  
CA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE CAMPINAS.

Dedico aos meus pais,  
ao José  
e a minha amiga  
Dolores Rodrigues Costa.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela sua dedicação e incentivo como orientador.

Ao Prof. Dr. Marcos Garcia Costa, Coordenador da Subcomissão de Pós-Graduação em Imunologia, pelo apoio e atenção dispensados.

Aos Profs. Dr. José Roberto Giglio, Dr. Marco Antonio Zago, Dr. Ivan de Carvalho e Dra. Nilce C. Meirelles, pela discussão do trabalho e sugestões apresentadas.

Aos Docentes José Camillo Novelo e Dr. Sérgio Marangoni, pelo estímulo nas atividades científicas desenvolvidas.

A Docente Eneida de Paula, pela solicitude e colaboração nos ensaios de oxigenação.

As minhas Colegas Ellen Cristina T. Landucci, Gabriela M. Rennebeck e Rizoleta M. Marques.

A todos aqueles que de certa forma auxiliaram na execução deste trabalho.

## ÍNDICE

I	INTRODUÇÃO . . . . .	2
II	MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	17
	1. Purificação da eritrocruorina . . . . .	18
	2. Preparo de antígenos. . . . .	19
	3. Imunização dos animais. . . . .	19
	4. Imunodifusão. . . . .	20
	5. Imunoeletroforese . . . . .	20
	6. Precipitação com Sulfato de Amônio. . . . .	22
	7. Cromatografia em DEAE-celulose. . . . .	22
	8. Eletroforese em gel de Poliacrilamida . . . . .	23
	9. Digestão pela papaína . . . . .	25
	10. Dosagem de proteínas. . . . .	26
	11. Equilíbrio de oxigênio com eritrocruorina pu rificada. . . . .	27
III	RESULTADOS . . . . .	35
	1. Teste de dupla difusão em gel de ágar do so ro de coelhos imunizados com eritrocruorina	36
	2. Cromatografia em DEAE-celulose do soro imu ne de coelhos . . . . .	36
	3. Análise imunoeletroforética das frações ob tidas por cromatografia de troca iônica a partir do soro de coelhos imunizados com e-	

eritrocruorina . . . . .	39
4. Demonstração de atividade de anticorpos das das frações obtidas no fracionamento do <u>so</u> ro de coelho antieritrocruorina em DEAE-ce- lulose. . . . .	41
5. Controle da digestão pela papaína da IgG de coelho anti-eritrocruorina. . . . .	41
6. Eletroforese em gel de Poliacrilamida da IgG de coelho e de seus fragmentos papaínicos. . .	41
7. Análise espectral da eritrocruorina em <u>pre</u> sença de anticorpos de coelho imunizado com eritrocruorina. . . . .	48
8. Imunoglobulina G anti-eritrocruorina modifi <u>ca</u> ca as curvas de equilíbrio do oxigênio com a eritrocruorina. . . . .	52
9. Interação de proteínas totais com a eritro- cruorina. . . . .	54
10. Fragmentos papaínicos de IgG anti-eritrocru <u>o</u> rina afetam o comportamento da eritrocruo- rina no Plot de Hill. . . . .	58
IV DISCUSSÃO. . . . .	61
V CONCLUSÕES . . . . .	75
VI RESUMO . . . . .	77
VII SUMMARY. . . . .	79
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	81

INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

A transição do estágio de vida anaeróbico para aeróbico foi um grande passo evolutivo, proporcionando aumento na extração de energia a partir da glicose na presença de oxigênio. Bactérias primitivas são seres anaeróbicos e sobrevivem pela fermentação de compostos orgânicos para geração de ATP, tendo possivelmente evoluído na ausência de oxigênio (MARGULIS, L., 1984). Dois principais mecanismos permitiram o suprimento adequado e contínuo de  $O_2$ , possibilitando o desenvolvimento da condição aeróbica de vida: o primeiro foi um sistema circulatório que ativamente libera este gás para os tecidos. A segunda principal adaptação foi a aquisição de moléculas carreadoras para suprir a limitação imposta pela baixa solubilidade do oxigênio em água (ZUCKERKANDL, E., 1965).

A hemoglobina é uma proteína respiratória que liga oxigênio reversivelmente pelo fato de conter ferroporfirina (protoheme) como grupo prostético

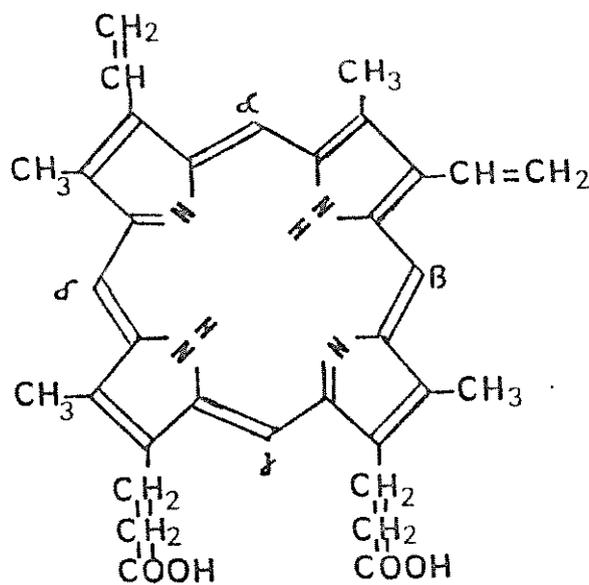
(KEILIN, D. & HARTREE, F.R.S., 1951). Em seus estados ferrosos, a capacidade de ligar a molécula de forma reversível faz com que tanto hemoglobinas como mioglobinas sejam únicas entre as outras proteínas que contêm heme e diferentes da maioria de outros componentes heme ferrosos, que são rapidamente oxidados na presença da molécula de oxigênio (CRAIK, C.S. et al, 1981).

Eritrocruorinas apresentam-se sob forma de hemoglobina extracelular e são caracterizadas por dois discos hexagonais sobrepostos quando observadas ao microscópio eletrônico (MESSERSCHMIDT, U. et al, 1983). Estudos de ultracentrifugação feitos por Svedberg em 1930 revelaram peso molecular em torno de 2.300.000 a 3.800.000. Contudo, através de equilíbrio de sedimentação e Raios X de pequeno ângulo, estas proteínas apresentaram 3.500.000 a 4.000.000. O conteúdo de ferro é particularmente baixo nestas moléculas, sendo apenas 2/3 do conteúdo de ferro de vertebrados. Isto sugere que pelo menos 1/3 das subunidades sejam monoméricas e não contêm heme. Este tipo de eritrocruorina é encontrado extensivamente entre as 3 classes de anelídeos (Poliqueta, Oligoqueta, Hirudínea). Deve ser incluído neste grupo o pigmento respiratório verde denominado clorocruorina, que apresenta o grupamento heme alterado (com formila no lugar de vinila na posição 2), presente em quatro famílias de poliquetas. As propriedades físico-químicas das pou

cas clorocruorinas estudadas são muito similares às propriedades das eritrocruorinas (VINOGRADOV, S.N., 1985).

O termo heme refere-se a um complexo de íons metálicos (Fe, Mg, Mn, Zn, Sn, Cd, Co, Cu, Cr, Ag) ligados a um anel porfirínico denominado protoporfirina IX (MAINES, M.D., 1988). Porfirinas são constituídas por um tetrapirrol cíclico e seus anéis pirrólicos são inter-ligados por quatro pontes de metileno denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (Fig. 1). O grupamento heme é portanto o responsável pela ligação do oxigênio à molécula carreadora (PERUTZ, M.F., 1979).

Muito pouco é conhecido até agora acerca de "sutis" modificações na estrutura quaternária de certas hemoglobinas de anelídeos. Sabe-se, porém, que embora o conteúdo ferro da hemoglobina de *Nephtys* seja aproximadamente igual ao de *Lumbricus* e *Arenicola*, a cooperatividade na ligação da molécula de oxigênio é baixa em comparação às duas outras. Diferenças na dissociação destas hemoglobinas, no conteúdo de  $\alpha$ -hélice e no seu comportamento funcional poderiam refletir diferenças nos detalhes de suas estruturas quaternárias, que por sua vez manifestar-se-iam nas curvas de difração de Raios-X. Estas variações poderiam ainda estar envolvidas em diferenças filogenéticas entre hemoglobinas e clorocruorinas de anelídeos (KOPPENHEFFER, T.L. & GINSBERG, S.M., 1978).



PROTOPORFIRINA IX

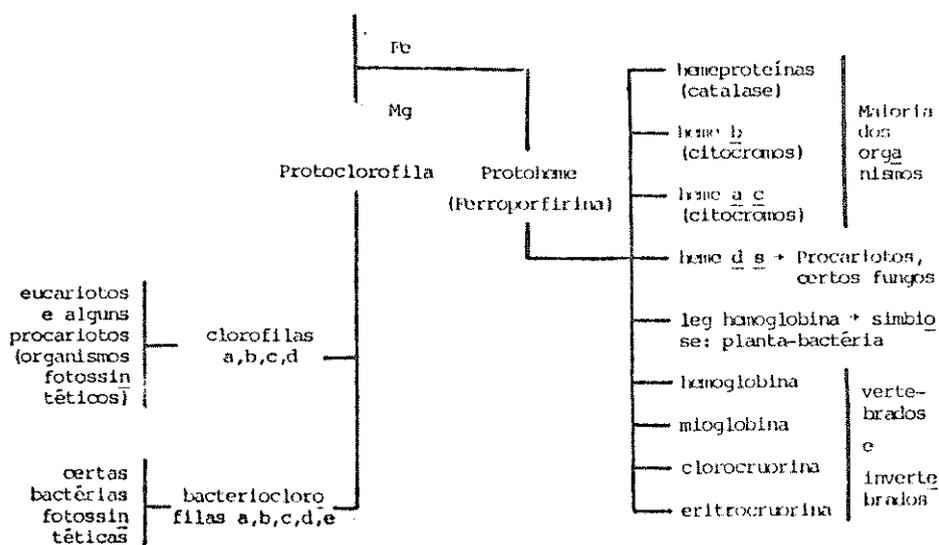


Figura 1 - Biosíntese de heme e sua ocorrência natural. Modificado à partir de HENDRY, G.A.F. & JONES, O.T.G.; 1980 e de MAINES, M.D.; 1980.

A função da hemoglobina parece ser adaptada para suportar pressões ambientais ao mesmo tempo que supre as necessidades metabólicas. O eficiente transporte de  $O_2$  requer que a hemoglobina se combine com o oxigênio a pressões reduzidas e deixe-o nos capilares dos tecidos a pressões apropriadas ao metabolismo (RIGGS A., 1976; KILMARTIN, J.V., 1974). Isto é favorecido pelo efeito Bohr — variação da afinidade pelo oxigênio segundo mudanças no pH.

Estudos comparativos da função de proteínas respiratórias permitem o esclarecimento de possíveis mecanismos gerais, que revelam certas relações evolucionárias pela natureza análoga de sua função fisiológica (DIXON, G.H., 1966). A duplicação de um único gene parece ocupar um papel principal na evolução de novas funções. Por este mecanismo, que permite a manutenção de velhas funções enquanto outras novas são adicionadas, os organismos podem aumentar em complexidade (WILSON, A. C. et al, 1977).

A expressão de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  em hemoglobinas de vertebrados deve-se ter originado a partir da duplicação de um gene ancestral comum há pelo menos 400 milhões de anos, quando notáveis modificações ambientais tiveram lugar (GOODMAN, M. et al, 1975). Assim é de se supor que a evolução da hemoglobina deva

ter envolvido adaptações seletivas à sucessão de mudanças fisiológicas e ambientais, promovendo o "empacotamento" de hemoglobinas no interior de eritrócitos de vertebrados através do significado evolutivo de sua função regulatória (RIGGS, A., 1976).

É pela existência de vários genes que a ausência de alguns deles não prejudicaria o desenvolvimento de uma função. Isto acontece porque devemos considerar que a taxa de evolução de uma proteína depende ainda da proporção em que aquela proteína é dispensável ou não rara à sobrevivência e reprodução de um organismo. Como exemplo, temos que a resposta imune a um dado antígeno envolve a síntese de muitas imunoglobulinas, que são produtos de muitos genes estruturais. Se algum daqueles genes estruturais estivessem faltando ou fossem inativos, ainda assim o organismo formaria anticorpos contra o antígeno em questão. (WILSON A.C. et al, 1977).

Na ausência de um mecanismo de duplicação gênica ou devido à inexistência de determinados genes, outras proteínas poderiam se ocupar do desempenho de certas funções. Embora hemoglobinas sejam encontradas em vários filós de invertebrados, sua existência não é constante. Esta ocorrência intermitente entre os invertebrados poderia ser devida tanto à presença intermitente de genes globina funcionais bem como a defei

tos no mecanismo de sua expressão. É por esta razão que apesar de defeitos ou ausência na expressão de genes globina, outras moléculas apresentam função análoga àquela de hemoglobinas (VINOGRADOV, S.N., 1985).

É muito provável que exista um mecanismo compensatório para carrear oxigênio na dependência do habitat de cada invertebrado, envolvendo naturalmente o efeito Bohr como mecanismo regulatório da afinidade pelo oxigênio e cooperatividade. Fosfatos orgânicos como cofatores alostéricos (2,3 difosfoglicerato) e ATP parecem regular a captação de oxigênio nos vertebrados (BENESCH, R. & BENESCH, R.E., 1969). Já nas eritrocruorinas, encontramos pouca ou nenhuma ação de fosfatos orgânicos nas moléculas devido ao ambiente extracelular em que se encontram, onde haveria dificuldade de regulação dos níveis destas substâncias. Contudo, fosfatos inorgânicos parecem aumentar a afinidade das eritrocruorinas pelo oxigênio. A complexidade estrutural e funcional neste caso parecem compensar um menor número de órgãos nos anelídeos, com maior atividade regulatória a nível molecular (WEBER, R.E., 1980).

A afinidade pelo oxigênio da hemoglobina depende das concentrações relativas das formas oxigenada e deoxigenada. Se o número de moléculas na conformação oxi aumenta, a afinidade pelo oxigênio da

amostra de sangue é aumentada também (Fig. 2). Mamíferos geralmente não sofrem muita variação com respeito à afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, pois geralmente vivem em ambientes onde a tensão de oxigênio é praticamente constante. Contudo, em certas ocasiões - quando são expostos à baixa pressão parcial de oxigênio, como no caso de altitude exagerada, há diminuição na afinidade pelo oxigênio (EATON, J.W., 1974). Comparados a os vertebrados, as hemoglobinas de invertebrados apresentam uma notável variação em suas propriedades funcionais, que se manifestam nos principais grupos sistemáticos de animais e nas diferentes categorias histológicas e moleculares do pigmento. Esta variabilidade é representativa da capacidade adaptativa de uma gama de condições internas sob as quais as hemoglobinas desenvolvem suas funções (WEBER, R.E., 1980).

Estudos de captação de oxigênio pela eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* demonstraram correlação entre o estado de oxiredução do grupo sulfidril (SH) com a afinidade pelo oxigênio, sugerindo uma transição no equilíbrio da conformação metaestável - quando as pontes dissulfeto são quebradas (MEIRELLES, N. C. et al, 1985). O estado de dissociação em pH alcalino está também relacionado com suas propriedades ligantes, sendo maior a afinidade pelo oxigênio em pH 8.0 do que em pH 7.2 (MEIRELLES, N.C. et al, 1987).

O processo de dissociação da eritrocruorina é complexo, envolvendo diferentes tendências a despolimerização em subunidades com o aumento de pH. A dissociação da eritrocruorina de *Lumbricus terrestris* em pH alcalino demonstra ser dependente de oxigênio, ao menos qualitativamente. Esta eritrocruorina, sob condições dissociantes, reage de maneira a que parte das moléculas correspondam a uma fração da população total que se dissocia irreversivelmente, enquanto o restante permanece intacto. O estado final reflete somente em parte uma situação de equilíbrio, uma vez que as moléculas intactas não se apresentam em equilíbrio com os componentes dissociados em um dado pH. Qualitativamente, o efeito da oxigenação é também promover dissociação no caso de hemoglobinas de mamíferos e hemocianinas. Isto significa que para parte do sistema que está em equilíbrio, as pequenas subunidades apresentam maior afinidade pelo oxigênio do que as maiores (CHIANCONE, E. et al, 1972). Pode-se sugerir que o aumento na afinidade pelo oxigênio seja provavelmente o resultado da dissociação da molécula nativa em sub-unidades de alta afinidade pelo oxigênio em pH acima de 8.0 (CHUNG, M.C.M. & ELLERTON, H.D., 1979).

Constatam-se variações fisiológicas entre eritrocruorinas e hemoglobinas de mamíferos, encontrando-se ainda ampla diversificação quando são com

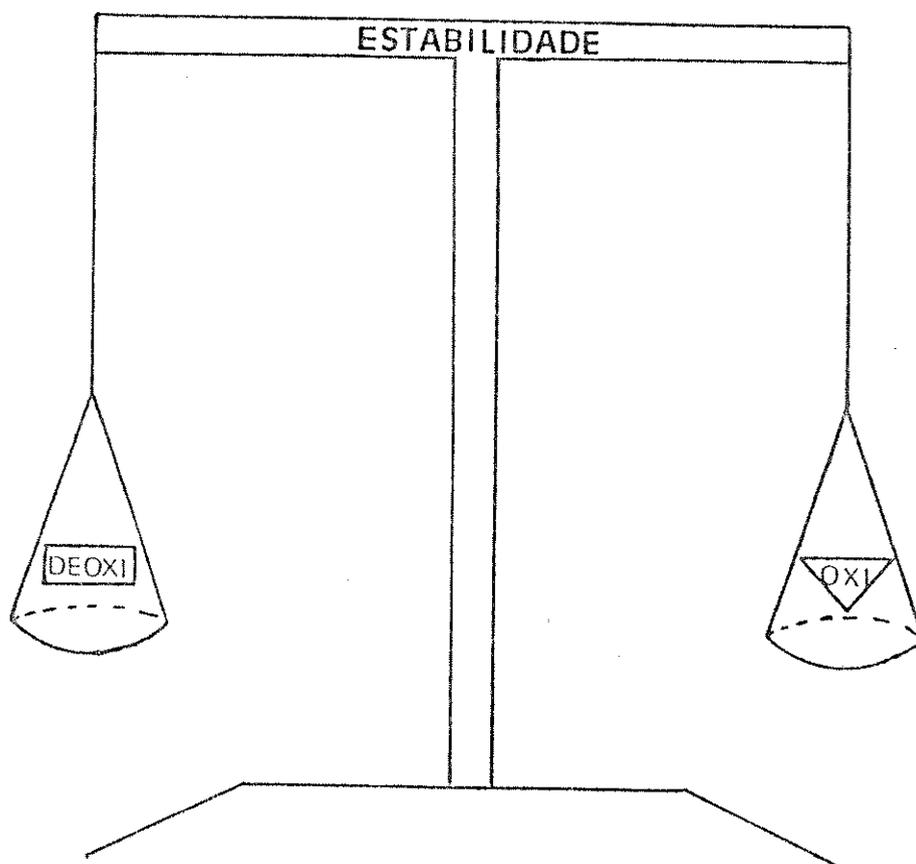


Figura 2 - A afinidade pelo oxigênio de uma hemoglobina normal depende do número de moléculas na configuração oxi e do número de moléculas na configuração deoxi. Modificado de CHARACHE, S., 1974.

paradas várias espécies de anelídeos — figura 3. Através destes dados e mais o conhecimento de que há modificação do comportamento fisiológico em outros filos, é de se supor que a filogenia, o estado de agregação e o sítio histológico destas proteínas revelem pouca influência em suas propriedades funcionais principais (WEBER, R.E., 1980). Há grande inconstância na funcionalidade da eritrocruorina com respeito à afinidade pelo oxigênio, cooperatividade e à presença e magnitude do efeito Bohr. Algumas eritrocruorinas apresentam propriedades ligantes intermediárias aos extremos de alta e baixa afinidade tais como *Pista pacífica*, *Thelepus crispus*, *Hae mopsis sanguisuga* e *Eunice aphroditois* (TERWILLIGER, R.C. 1974; GARLICK, R.L. & TERWILLIGER, R.C. 1975; WOOD, E.J. et al, 1976; BANNISTER, J.V. et al, 1976).

A cooperatividade dos sítios ligantes da molécula de eritrocruorina é medida através do ângulo obtido nas curvas de equilíbrio com o oxigênio em 50% de saturação, sendo denominado coeficiente de Hill (n). Este coeficiente é em geral heterogêneo e dependente de pH (CHUNG, M.C.M. & ELLERTON, H.D., 1979) com uma curva de equilíbrio trifásica que apresenta menor interação heme-heme em maiores concentrações do ligante (MEIRELLES, N. C. et al, 1984). Isso é diferente do que ocorre em hemoglobinas de mamíferos, que apresentam "n" homogêneo mesmo quando existe alteração da afinidade pelo oxigênio pe

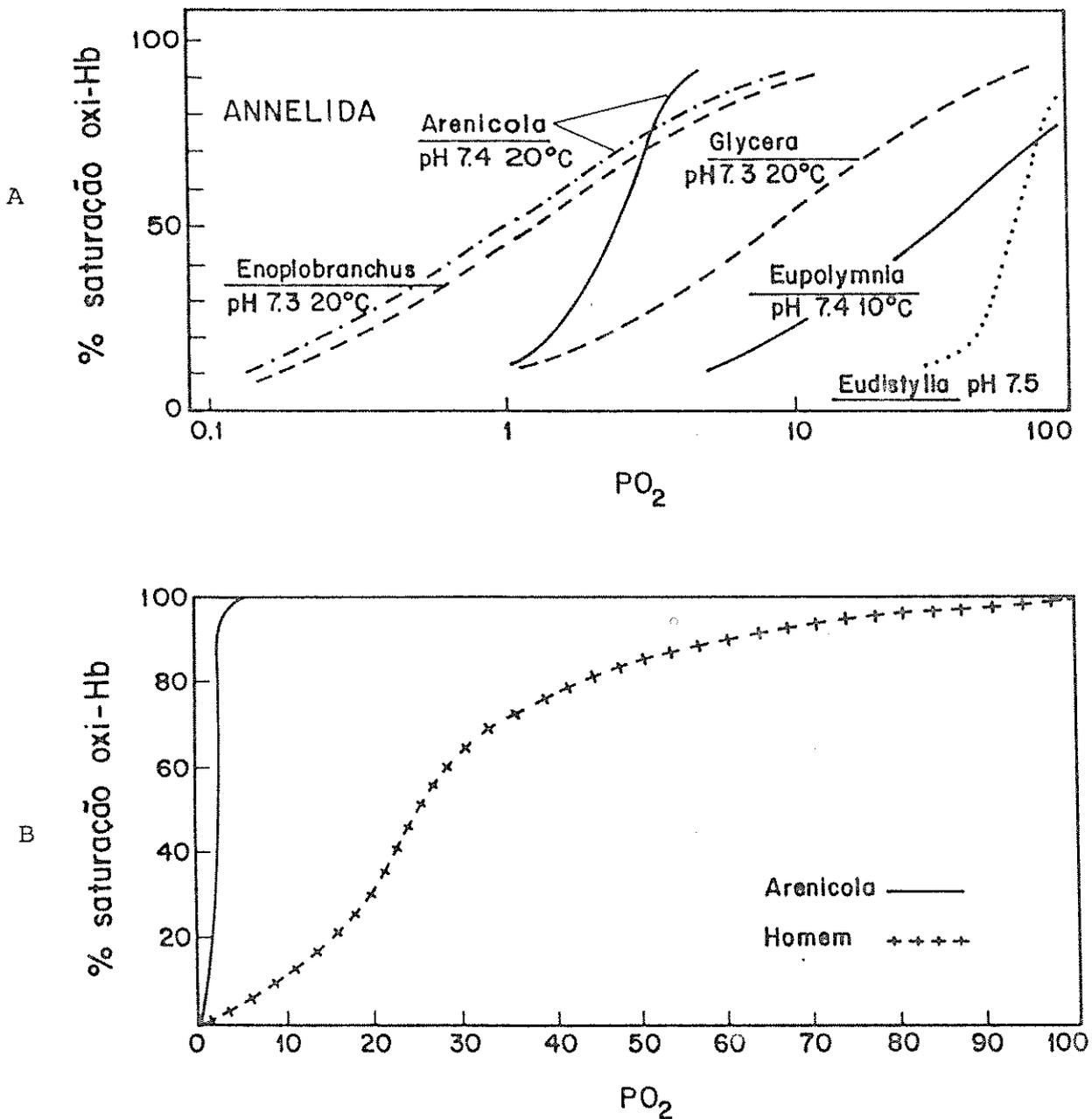


Figura 3 - Curvas de equilíbrio de alguns pigmentos respiratórios.- Em 3A, curvas de oxigenação de anelídeos. Em (—): hemoglobinas poliméricas extracelulares. Em (---): hemoglobinas oligoméricas, geralmente eritrocíticas. Em (-.-): hemoglobinas tissulares. Em (...): clorocruorinas. Em 3B são apresentadas as curvas de oxigenação da hemoglobina do anelídeo *Arenicola marina* e da hemoglobina humana. Adaptado de WEBER, R.E., 1980 e de LEHMAN H. & HUNTSMAN, R.G., 1966.

la presença de cianeto de sódio (EATON, W.J., 1974).

Curiosamente, o sangue de anelídeos — ao contrário do que ocorre com o pigmento respiratório purificado — não sofre modificações dependentes de temperatura no comportamento de ligação do oxigênio, embora sofra modificações dependentes de pH. Isto sugere que componentes do sangue devam exercer algum efeito protetor na conformação da proteína (GIARDINA, B et al, 1975). Trabalhos recentes demonstram que cátions divalentes protegem a estrutura de muitas hemoglobinas e clorocruorinas da dissociação em pH alcalino. Este efeito protetor não parece ocorrer com cátions de solo alcalino testados em pH ácido (POLIDORI, G. et al, 1988), parecendo haver modificação da configuração estrutural na ausência de cátions divalentes (CHIANCONE, E. et al, 1988).

A configuração estrutural de hemoglobinas vem sendo continuamente estudada, por possibilitar explicações de suas propriedades alostéricas e de cooperatividade. Estes mecanismos moleculares foram estudados por PERUTZ em 1970 e 1972 através de estudos de difração em Raios X, revelando extensa modificação da estrutura quaternária da hemoglobina. Estas mudanças são evidenciadas entre seus estados deoxi de baixa afinidade e oxi de alta afinidade e induzidos a partir de pequenas modificações de sua estrutura terciária (EDELSTEIN, S.J. 1975).

Para definir as alterações que ocorrem na estrutura terciária de hemoglobinas, W. Steigemann e E. Weber utilizaram como modelo a hemoglobina monomérica de um inseto. Por tratar-se de um monômero, a determinação de sua estrutura em difração de Raios X tornou-se mais acessível. Verificaram que as principais modificações estruturais pareciam estar concentradas ao redor do grupamento heme: rearranjos das cadeias laterais de aminoácidos, em contato com heme, transmitem as mudanças à superfície molecular por interações não-covalentes de suas cadeias laterais e principais resíduos circunvizinhos (STEIGEMAN, W. & WEBER, E., 1978).

As propriedades ligantes das eritrocruorinas são também traduzidas a partir do espectro de absorção da luz visível, baseadas no metal contido em seu anel porfirínico. Possuem um grupamento heme similar àquele de hemoglobinas de vertebrados, o que permite um espectro de absorção próximo ao ultravioleta (banda de Soret) e duas outras bandas menos intensas à luz visível, sendo estas últimas as responsáveis pela coloração vermelha da maioria das hemoproteínas. Este padrão é observado em grande parte dos anelídeos (ROSSIFANELLI, M.R. et al, 1970).

A purificação e isolamento destas proteínas permitem sua caracterização, constituindo-

-se em material quimicamente puro para imunização de animais e para produção de antisoros específicos. Nossos estudos têm como objetivo demonstrar modificações da afinidade pelo oxigênio da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* e as alterações de seu espectro de absorção pelo efeito de imunoglobulinas G específicas e de seu fragmento papáinico Fab. É de se esperar que este efeito ocorra através do bloqueio de regiões imunodominantes estruturalmente relacionadas com a associação do oxigênio à molécula de eritrocruorina, já que proteínas alostéricas sofrem modificações conformacionais consequentes de sua interação com outras moléculas, evidenciando alterações de suas funções (REICHLIN, M. et al, 1969). A finalidade desta observação é o estudo comparativo da captação de oxigênio por estas proteínas com ou sem bloqueio de superfície, fornecendo dados estruturais que possibilitem interpretações de natureza molecular e filogenética.

MATERIAL E MÉTODOS

## 1. PURIFICAÇÃO DA ERITROCRUORINA

Espécimes de *G. paulistus* pesando  $15,2 \pm 2,7$ g foram obtidos do solo de Rio Claro, Estado de São Paulo, e foram mantidos a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com terra proveniente do local de coleta, como descrito por MEIRELLES N.C. *et al*, 1985. O sangue foi coletado a partir do vaso dorsal após anestesia por imersão do animal em 5-7% de solução alcoólica a 5-7% (v/v) MARKS D.H. *et al*, 1981

A solução contendo eritrocruorina foi obtida por diluição de 0,5 ml do sangue em 2 ml de tampão fosfato 0.1M, pH 7.2, contendo EDTA  $10^{-3}$  M. Os resíduos celulares foram separados por centrifugação a 16.000 rpm (Eppendorf) por 5 minutos e o sobrenadante foi dializado durante a noite contra o mesmo tampão. A eritrocruorina foi precipitada por centrifugação a 250.000 g (Beckman), o "pellet" foi dissolvido no tampão fosfato e centrifugado mais duas vezes sob as mesmas condições. A eritrocruorina foi estocada a  $4^{\circ}\text{C}$  (MEIRELLES N.C. *et al*, 1985).

## 2. PREPARO DE ANTÍGENOS

Como antígenos foram utilizados: eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* e proteínas totais do soro de coelhos de linhagem não-definida ("outbred").

O adjuvante foi preparado segundo FREUND J., 1965. Em um almofariz foram emulsificadas em 15g de lanolina em 85ml de nujol; adicionou-se, então, 100mg de BCG. Os antígenos utilizados foram dissolvidos em solução salina 0.15M. Esta mistura foi homogeneizada no adjuvante de Freund preparado como acima descrito, de modo a se obter concentração final de 10mg Antígeno / ml.

## 3. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

### a) Produção de antisoro específico

Coelhos "outbred" receberam duas injeções de eritrocruorina em adjuvante incompleto de Freund (AIF) nos linfonodos (OLIVEIRA A.R., 1975). As amostras de sangue foram coletadas após duas semanas, e o antisoro foi mantido em alíquotas e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### b) Produção de antisoro anti-proteínas

totais do soro de coelho

Um carneiro foi imunizado com

1.0 ml do antígeno em adjuvante completo de Freund (ACF), distribuído pela via intramuscular. Após 7, 14, 21 dias foi aplicado 1 ml do antígeno em salina diluído de 1:2 por via intradérmica em vários locais. O antisoro cole<sup>u</sup>tado foi testado contra soro total de coelho e guardado a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. IMUNODIFUSÃO

A dupla difusão em gel de ágar (OUCHTERLONY, O., 1956) foi realizada em ágar 1% e solução salina 0.15M, sobre lâmina de microscópio. O gel foi perfurado e o material aplicado. Após 24 horas de reação a lâmina foi lavada em solução salina 0.20M por 48 horas, seca e posteriormente corada em negro de amido 0.1%. A descoloração da lâmina foi realizada em solução contendo metanol - ácido acético -  $\text{H}_2\text{O}$  (2:1:2).

#### 5. IMUNOELETROFORESE

##### a) Imunoeletroforese em gel de ágar

A imunoeletroforese (GRABAR P. e WILLIAMS C.A., 1953) foi realizada em gel de ágar 1%. O ágar fundido (15 ml) foi colocado sobre duas lâminas de vidro de 25 x 75 mm dispostas em suporte de plástico. Os poços e as canaletas foram impressos no ágar gelificado utilizando-se um impressor metálico.

A eletroforese foi realizada em

tampão veronal pH 8.6, 0,05 M, utilizando-se fonte estabilizadora Beckman Duostat e corrente de 30 mA/lâmina durante 100 minutos.

Após a aplicação dos antisoros, as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas. A lavagem foi feita em solução salina fisiológica. As lâminas foram secas e coradas com negro de amido 0,1%. A descoloração foi realizada em metanol ácido acético - H<sub>2</sub>O (2:1:2 v/v).

#### b) Imunoeletroforese em gel de agarose

A imunoeletroforese em camada delgada de agarose foi realizada sobre um suporte fino de plástico contendo 1% de agarose, 5% de sacarose e 0,035% de sal dissódico EDTA em tampão veronal 0,065 M, pH 8,6. Foi aplicada uma diferença de potencial de 90 V/placa durante 1 hora para corrida eletroforética do material contido nos poços. Após a corrida, os antisoros foram colocados nas canaletas centrais e a placa de agarose foi colocada em temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte à aplicação, as placas foram coradas com negro de amido 0,1% em solução de ácido acético 10% por 10 minutos e o excesso de corante, eliminado com solução de ácido acético glacial 10%. A lâmina utilizada possui 80 cm<sup>2</sup> de área.

## 6. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

O soro de coelho foi precipitado com sulfato de amônio na concentração final de 50% sob agitação lenta a 6°C. O material foi centrifugado por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. O precipitado (fração pseudoglobulina) foi redissolvido em tampão fosfato 0,1M pH 8.6 e dializado contra esta mesma solução no pH 8,0 e 5mM, por 24 horas. A ausência de íons sulfato foi confirmada através de teste qualitativo com cloreto de bário a 2% em meio clorídrico. O material, obtido deste modo, foi centrifugado durante 30 minutos e o precipitado foi desprezado, sendo o sobrenadante (pseudoglobulina), utilizado no fracionamento.

## 7. CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE

O soro de coelho anti-eritrocruorina, no volume de 3ml, foi aplicado no topo da coluna de DEAE-celulose (DE-52 Whatman). A coluna, medindo 40 x 1cm, foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 5mM pH 8.0 (OLIVEIRA B. *et al*, 1970), a 4°C.

As frações eluídas em tampão fosfato pH 8.0, e NaCl 0,5M, foram coletadas no volume de 3ml /tubo em fluxo descendente de 12ml/hora (aparelhagem Gil

son). A leitura dos eluatos foi realizada por absorção ( $\lambda=280$  nm) em espectrofotômetro (Beckman mod. 25), utilizando cubetas de quartzo de 1.0cm de caminho óptico. Após a leitura as frações foram dializadas contra água deionizada por um período de 24 horas em câmara fria, e em seguida liofilizadas e estocadas a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

## 8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O método utilizado na análise eletroforética em poliacrilamida foi modificado de SHAPIRO A.L. *et al*, 1967; WEBBER K. & OSBORN M., 1969 e LAEMLI U.K., 1970.

### Preparação do gel

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de solução de acrilamida e 30% e Bis-acrilamida a 0,8%. Esta solução foi preparada em água deionizada previamente filtrada, e mantida sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O gel de concentração (5% de acrilamida em tampão tris-HCl 0,125 M pH 6,8, e Duodecil Sulfato de Sódio [SDS] 0,1%) foi polimerizado pela adição de TEMED (NNN'N' tetrametiletilenodiamina) e persulfato

de amônio a 0,05%.

O gel de separação, (contendo 10% de acrilamida em tampão tris-HCl 0,375 M pH 8.8 SDS a 0,08%, persulfato de amônio a 0,02% e TEMED a 0,045%), foi colocado entre duas placas de vidro plano, separadas por espaçadores de acrílico com 2mm de espessura. Após a polimerização do gel citado, o gel de concentração foi colocado sobre aquele de separação e a peça para impressão dos poços foi inserida entre as placas.

#### Preparação da amostra

As amostras de proteínas foram dissolvidas em tampão tris-HCl 1,0M pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,001% de bromofenol; a concentração final foi de 1mg/ml de proteínas. Estas amostras foram analisadas na sua forma não reduzida e na sua forma reduzida (DTT, 1M). As amostras foram submetidas ao calor (água em ebulição) durante dois minutos.

Como marcadores foram utilizadas as amostras: proteína monoclonal de Bence Jones dímero (P.M. 50.000), a imunoglobulina monoclonal FKW isotipo IgG<sub>3</sub> (P.M. 160.000), e mioglobina de baleia (P.M.17.816).

A eletroforese foi realizada em

tampão tris-HCl 0,0625M, glicina 0,192M e SDS a 0,1% a 100V durante 4 horas.

## 9. DIGESTÃO PELA PAPAÍNA

A digestão pela papaína foi efetuada segundo as condições descritas por PORTER R.R., - 1959.

As imunoglobulinas IgG "lenta" de coelho, purificadas por cromatografia em DEAE-celulose, foram submetidas à digestão pela papaína (Worthington Biochemical Corporation) na relação enzima-substrato 1:100mg em presença de cisteína 0.1M volume final 5.0ml e pH ajustado para 8.4. Os tempos de incubação a 37°C foram de 12 a 24 horas. A reação enzimática foi interrompida com iodo-acetato 0.1M pH 8.0, e o digesto submetido à análise imunoeletroforética.

### Purificação dos fragmentos obtidos pela digestão com papaína

O digesto total (100mg) foi dializado em tampão fosfato 5mM, pH 8.0 durante 24 horas, logo após centrifugado durante 15 minutos a 5.000rpm. O digesto foi então aplicado em coluna de DEAE-celulose (DE

52 Whatman) equilibrada no tampão inicial de diálise; - nestas condições foi obtido um primeiro pico de absorvância em 280 nm; a coluna foi "lavada" exaustivamente neste - tampão e em seguida foi aplicada uma solução de NaCl 0.1 M, com a qual foi obtido um segundo pico de absorvância em 280 nm.

#### 10. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas do soro dos animais foi determinado pelo reativo de biureto, modificado por DITTEBRANDT M., 1948. O método modificado de Dittebrandt permite uma maior sensibilidade para dosar proteínas (20 a 400ug), utilizando-se para o reagente: - 9.0g de tartarato de sódio e potássio, 3.0g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 5.0g de iodeto de potássio e hidróxido de sódio a 10%, completando-se o volume para 1.000 ml.

A fração IgG do soro de coelhos foi determinada através de  $E_{1\text{cm}}^{1\%} 278 \text{ nm} = 13,68$  (NOELKEN M.E. et al, 1965) e seu fragmento papaínico monovalente foi quantificado por  $E_{1\text{cm}}^{1\%} 278 \text{ nm} = 15,30$ .

A dosagem de proteínas na solução de eritrocruorina foi realizada à partir da razão heme/molar  $E_{1\text{M}}^{1\text{cm}} 415\text{nm} = 125.000$  (ANTONINI E & BRUNORI M, 1971).

## 11. EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO COM ERITROCRUORINA PURIFICADA

O equilíbrio da hemeproteína do tipo eritrocruorina com o oxigênio pode ser traçado segundo a equação de Hill, que em 1910 propôs a existência de moléculas poliméricas com alguns sítios de ligação para o oxigênio, contidas em soluções de hemoglobina. Hill considerou "n" como sendo o grau de polimerização médio e o equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio pôde ser descrito como:  $Hb + nO_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_n$ . Contudo, a hipótese de Hill original não teve significado físico direto já que a reação da hemoglobina com ligantes não representa uma reação de enésima ordem verdadeira. Era de se esperar que o valor de "n" fosse, neste caso, igual a quatro, pois a hemoglobina humana possui quatro sítios ligantes. Porém, foi encontrado que "n" é igual a 2,8 devido a mudanças alostéricas que ocorrem nas outras três cadeias após a ligação do primeiro oxigênio. Por esta razão foram necessários ajustes dos dados experimentais para determinação das curvas de dissociação da hemoglobina pelo oxigênio, assumindo-se "n" como coeficiente de Hill. O uso da equação de Hill simplifica a comparação entre diferentes curvas de dissociação fornecendo indicações acerca de interações com ligantes (ANTONINI E, BRUNORI M, - 1971).

As curvas de equilíbrio levam a uma reta quando  $\log[Y/(1-Y)]$  é colocado no gráfico em função  $\log PO_2$  (pressão parcial de oxigênio) para os valores de Y facilmente acessíveis a medidas, ou seja, entre 0,1 e 0,9 — onde Y é a fração da forma oxigenada da hemoglobina (e/ou eritrocruorina). Esse gráfico é conhecido como "Plot de Hill".

Para as medidas de oxigenação e desoxigenação da eritrocruorina de *G. paulistus* foram utilizados tonômetros constituídos de tubos Thumberg modificados e desenvolvidos a partir do modelo descrito por ROSSI-FANELLI A. e ANTONINI E. (1958) e por BENESH R. et al (1965) (Fig. 4). Cada um dos tonômetros continha um tubo de Thumberg (provido de um sistema de válvulas de regulagem para a canalização da passagem do ligante gasoso) e a este tubo foi adaptada uma cubeta óptica de vidro pirex com 1,0cm de caminho óptico. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a docente Eneida de Paula no laboratório da Dr<sup>a</sup> Nilce Meirelles.

O tonômetro foi calibrado para obtenção da capacidade gasosa (constante tonométrica = Kt) através da diferença de peso entre o tonômetro totalmente cheio de água e somente com 3ml de H<sub>2</sub>O (sendo este último o volume de solução utilizado para o experimento).

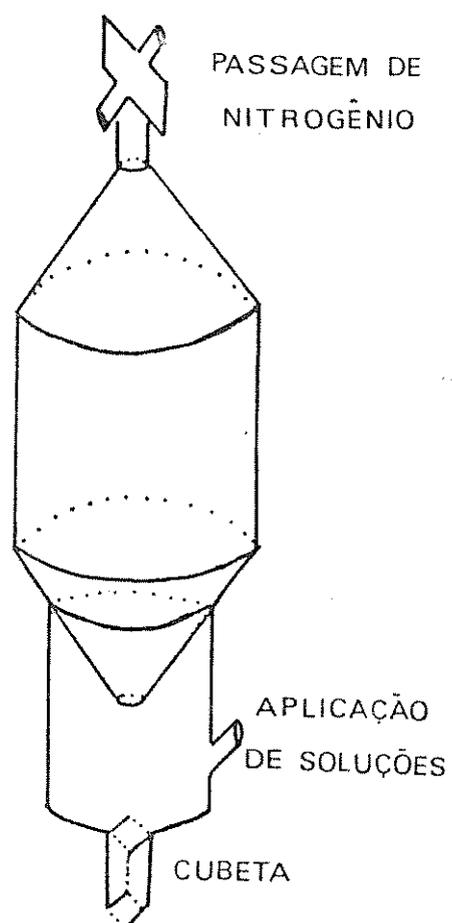


Figura 4 - Esquema de tonômetro utilizado nos ensaios de saturação da eritrocruorina pelo oxigênio.

A solução de eritrocruorina sob a forma oxi (oxihemoglobina) foi diluída em tampão tris-HCl 0,05 M, no pH 7.2, adequado para garantir a atividade funcional da proteína; a concentração final de eritrocruorina em solução tampão foi de aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  M dosada através de  $\Sigma_M^{1\text{cm}} 415 = 125.000/\text{heme}$  (ANTONINI E. & BRUNORI M., 1971).

Em seguida, o tonômetro recebeu quantidade constante de nitrogênio, até que a eritrocruorina passasse para a forma desoxigenada, verificada através do espectro de varredura (desvio do pico para 428nm, Fig. 5). Para a obtenção gradativa de oxihemoglobina, eram adicionados volumes crescentes de ar a cada 10 minutos, registrando-se o espectro de 450 a 380nm através de um registrador automático, acoplado ao espectrofotômetro (Varian-634). A cada adição de ar submeteu-se o tonômetro a um banho a 20°C sob agitação — tempo necessário para equilíbrio das fases líquida e gasosa dentro do tonômetro. As medidas de extensão da oxigenação da eritrocruorina foram determinadas a partir de leitura à luz visível no espectrofotômetro citado, a 419 e 428nm (região de Soret), segundo metodologia descrita por ROSSI-FANELLI A. & ANTONINI E., 1958 para soluções de proteínas altamente diluídas. A análise espectral da eritrocruorina entre 400 e 600nm foi realizada em espectrofotômetro DMS-100 (Imbralab), cedido pelo Sr. Diretor da Divisão Técnico-Científica do Instituto de Química da UNICAMP, Dr.

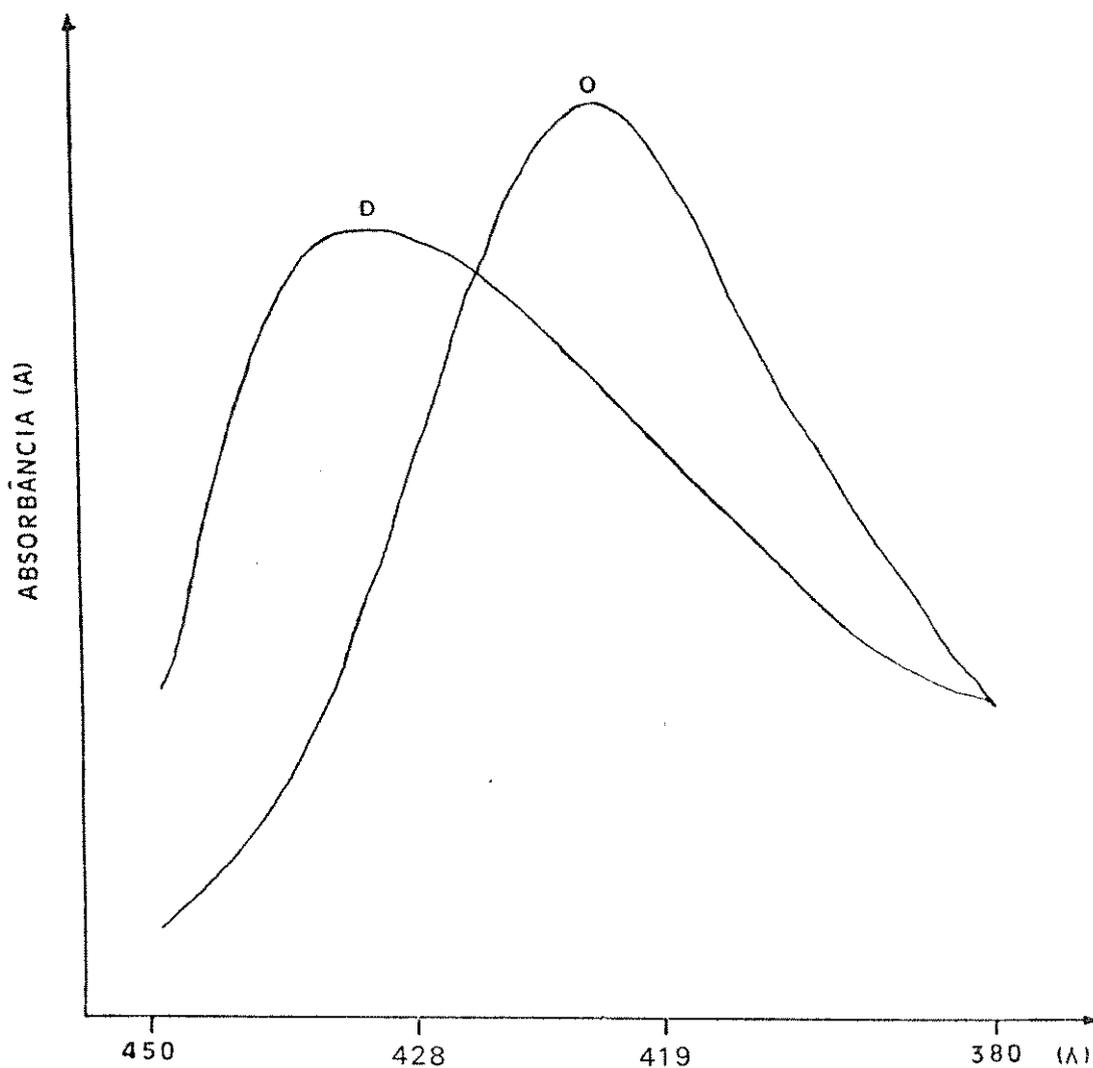


Figura 5 - Curvas experimentais de equilíbrio de eritrocruorina com oxigênio pelo método espectrofotométrico. A variação da absorvância (A) em função do comprimento de onda ( $\lambda$ ) pode ser observada de 450 a 380nm. O pico à direita corresponde à forma oxigênio ( $\lambda=419$ ), enquanto à esquerda podemos observar o pico correspondente à forma desoxigênio ( $\lambda=428$  nm) da eritrocruorina.

Carlos A. Caetano.

Para dosagem e obtenção das outras curvas de oxigênio a eritrocruorina foi colocada em presença de:

1. Controle (sorc de carneiro não-imunizado).
2. Soro total de coelho imunizado com eritrocruorina.
3. Fração IgG de coelho imunizado com eritrocruorina.
4. Pico 1 obtido da cromatografia de troca iônica - do digesto papaínico total da IgG de coelho.
5. Albumina humana.

O gráfico de Hill foi traçado a partir dos valores logarítmicos de saturação da forma oxi (Y%) em função de pressões parciais de oxigênio ( $PO_2$ ). O cálculo de Y% foi obtido a partir dos resultados de absorbância após medição em espectrofotômetro, como mostrado na Tabela 1. Estes dados exemplificam a obtenção do Plot de Hill de uma solução no volume de 3ml (eritrocruorina diluída em tampão tris-HCl 0,05M, concentração final  $5 \times 10^{-6}$  M).

Os valores de  $P_{50}$  (pressão de oxigênio para saturação de 50% dos sítios ligantes da he

TABELA 1 - CÁLCULO PARA OBTENÇÃO DE P<sub>50</sub> PELO MÉTODO ROSSI-FANELLI & ANTONINI (1958)

VOL.	Abs <sub>1</sub>	Abs <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> %	Y <sub>2</sub> %	Ȳ%	$\frac{Y}{100-Y}$	PO <sub>2</sub>	$\log \frac{Y}{1-Y}$	log PO <sub>2</sub>
oxi	0,585	0,349	0,057	-0,202	100,000	100,000	-	-	-	-	-
deoxi	0,528	0,551	-	-	0,000	0,000	-	-	-	-	-
2,0 ml	0,542	0,524	0,014	-0,027	24,561	13,366	18,963	0,2339	1,56	-0,6309	0,1931
3,0 ml	0,536	0,502	0,008	-0,049	14,035	18,963	19,143	0,2367	2,34	-0,6258	0,3692
4,0 ml	0,540	0,490	0,012	-0,061	21,052	30,198	25,625	0,3445	3,12	-0,4628	0,4941
5,0 ml	0,522	0,457	0,006	-0,094	10,526	46,534	28,530	0,3835	3,90	-0,4162	0,5910
6,0 ml	0,540	0,460	0,012	-0,091	21,052	45,049	33,050	0,4936	4,68	-0,3066	0,6608
8,0 ml	0,546	0,440	0,018	-0,111	31,578	54,950	43,264	0,7625	6,24	-0,1177	0,7951
10,0 ml	0,548	0,416	0,020	-0,136	35,087	67,326	51,206	1,0494	7,80	0,0294	0,8920
13,0 ml	0,559	0,406	0,031	-0,145	54,385	71,782	63,083	1,7087	10,14	0,2326	1,0060
16,0 ml	0,557	0,379	0,029	-0,172	50,877	85,148	68,012	2,1261	12,48	0,3235	1,0921

VOL = volume de ar injetado (acumulado)

Abs1 = absorvância lida a 419 nm

Abs2 = absorvância lida a 428 nm

D = resultado das diferenças das absorvâncias entre eritrocruorina oxi e de oxigenada

Y% = porcentagem de saturação dos sítios ligantes da eritrocruorina (média de Y1% e Y2%)

moglobina) foram determinados quando  $\log [Y/(1-Y)] = 0$ . Já o coeficiente de Hill é calculado através da inclinação da reta traçada nos valores de saturação de maior estabilidade (entre 20% e 80%, MEIRELLES N.C.; PAULA E.; GASPAR J.O., 1984). Finalmente, para o cálculo de  $PO_2$  (pressão parcial de oxigênio) no tonômetro, é utilizada a equação de Boyle-Mariotti ( $P_1V_1 = P_2V_2$ ), onde:  $P_1$  é a pressão parcial de oxigênio no ar atmosférico (156 torr);  $V_1$  é o volume de ar injetado;  $P_2$  é a pressão parcial de oxigênio no tonômetro;  $V_2$  é o volume da fase gasosa (constante tonométrica). Exemplo:

. adição 1:

$$P_1 = 156 \text{ torr}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$P_2 = ?$$

$$V_2 = Kt = 203 - 3 = 200 \text{ ml}$$

$$156 \text{ torr} \times 1 \text{ ml} = P_2 \times 200 \text{ ml}$$

$$P_2 = 0.75 \text{ torr}$$

. adição 2:

$$P_1 = 156 \text{ torr}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

$$P_2 = ?$$

$$V_2 = 200 \text{ ml}$$

$$P_2 = 1.56 \text{ torr}$$

RESULTADOS

## 1. TESTE DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR DO SORO DE COELHOS IMUNIZADOS COM ERITROCRUORINA

O teste de dupla difusão em gel de ágar mostra, na figura 6, vários arcos de precipitação correspondentes às proteínas séricas do soro de coelho (Ra-a-Erc) reveladas pelo anti-soro produzido em carneiros (Sh-a-Ra). Esta figura demonstra ainda identidade antigênica total entre as proteínas do soro de coelho aplicado em três poços alternados.

O arco correspondente à Imunoglobulina G purificada (IgG-a-Erc) mostra relação de identidade com a proteína sérica IgG homóloga contida no soro total de coelho. Uma relação de não identidade é observada entre a IgG e a proteína que se apresenta sob a forma de um arco mais espesso no soro total de coelho.

## 2. CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE DO SORO IMUNE DE COELHOS

A figura 7 mostra a análise cromatográfica da fração pseudoglobulina do soro imune de coelho em DEAE-celulose. Duas frações com absorvância a 280 nm relativamente alta foram obtidas e denominadas pico 1 e pico RC. O pico 1 foi eluído em tampão fosfato 5 mM

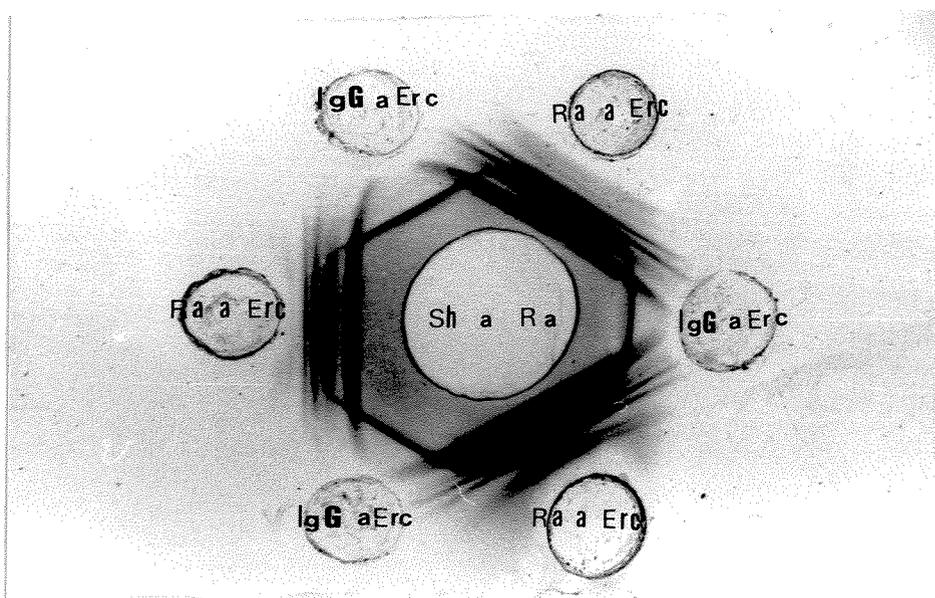


Figura 6 - Dupla difusão em duas dimensões em gel de ágar do soro de carneiro (Sh-a-Ra) hiperimunizado com proteínas totais do soro de coelho anti-eritrocruorina; este antígeno foi aplicado no poço central da figura. A fração IgG do soro de coelho (IgG-a-Erc) e o soro total de coelho (Ra-a-Erc) foram aplicados nos poços periféricos de maneira alternada. Pode-se observar uma relação de identidade da fração IgG de coelho purificada (IgG-a-Erc) com o componente homólogo do soro total de coelho (Ra-a-Erc). Uma relação de não identidade entre a IgG e o arco mais espesso do soro total de coelho (Ra-a-Erc) é observada.

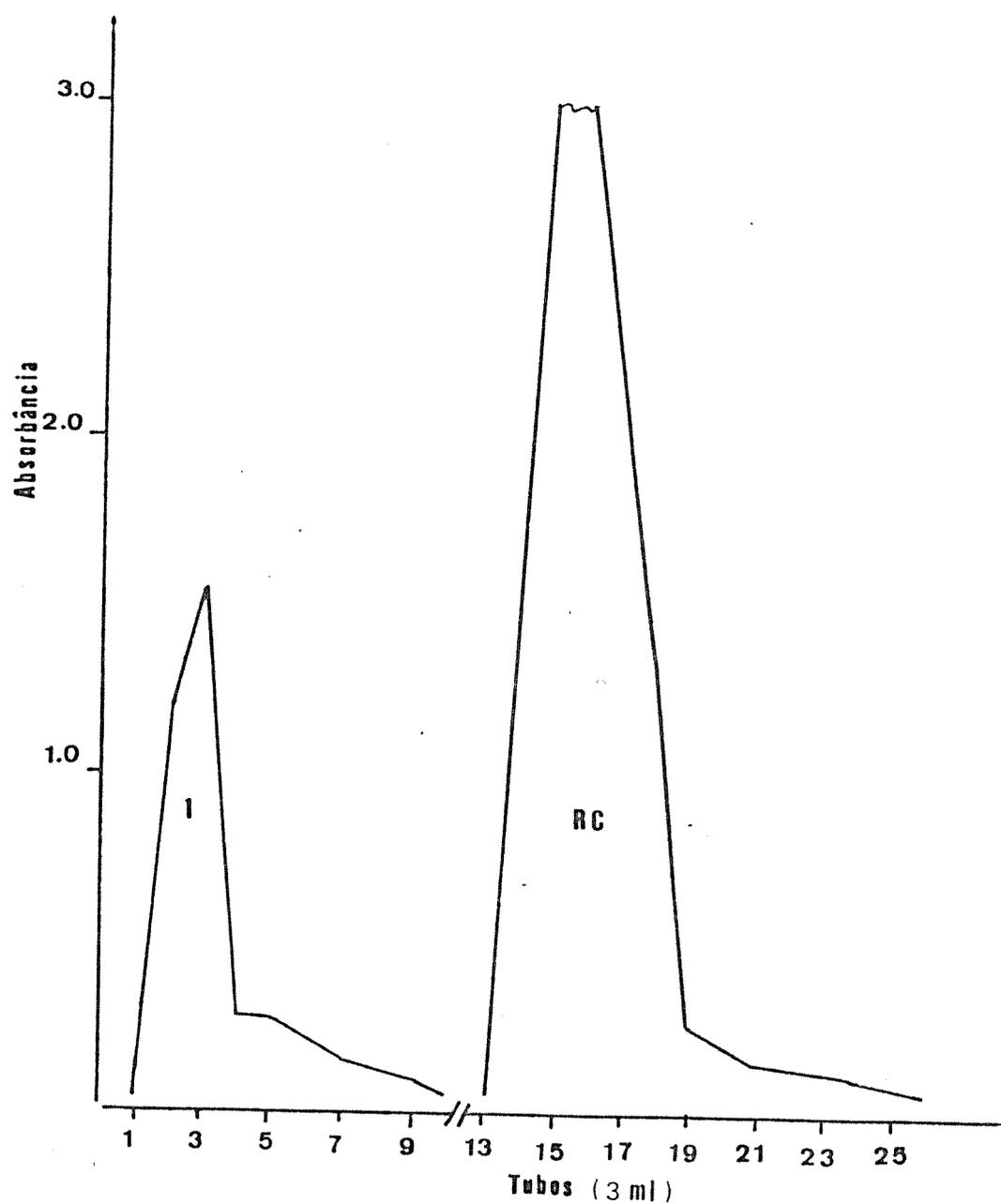


Figura 7 - Cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose (dimensões da coluna: 40x1 cm), equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8.0 e condutividade 800  $\mu$ S à temperatura aproximada de 20-25°C. O soro de coelho imunizado com eritrócruorina (Ra-a-Erc) foi aplicado ao topo da coluna, resultando um primeiro pico eluído em baixa concentração iônica (pico 1). O segundo pico (RC) foi eluído em NaCl 0.5 M.

pH 8.0 e apresentou A<sub>280</sub>, no seu ápice, de 1,500. Após o restabelecimento da densidade ótica a níveis constantes e baixos, foi aplicada à coluna uma solução de cloreto de sódio 0.5 M para remoção das demais proteínas (pico RC) adsorvidas à resina no tampão inicial.

### 3. ANÁLISE IMUNOELETRÓFORÉTICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA A PARTIR DO SORO DE COELHOS IMUNIZADOS COM ERITROCRUORINA

O soro total de coelho (Ra-a-Erc) analisado pela técnica de imunoeletroforese (fig. 8A) e revelado pelo soro de carneiro anti-soro total de coelho (Sh--a-Ra), apresenta um espectro de linhas de precipitação correspondente ao padrão normal esperado, - destacando-se a proteína IgG mais catódica e a albumina como um arco espesso anódico. Na fração cromatográfica RC obtida do fracionamento do soro de coelho (Ra-a-Erc) em DEAE-celulose é evidente um arco de precipitação de mobilidade típica de IgG rápida em relação ao anodo.

A fração IgG de coelho purificada em DEAE-celulose, quando revelada pelo antisoro Sh--a-Ra, apresenta-se na imunoeletroforese da figura 8B como um único arco de mobilidade lenta em relação ao ano-

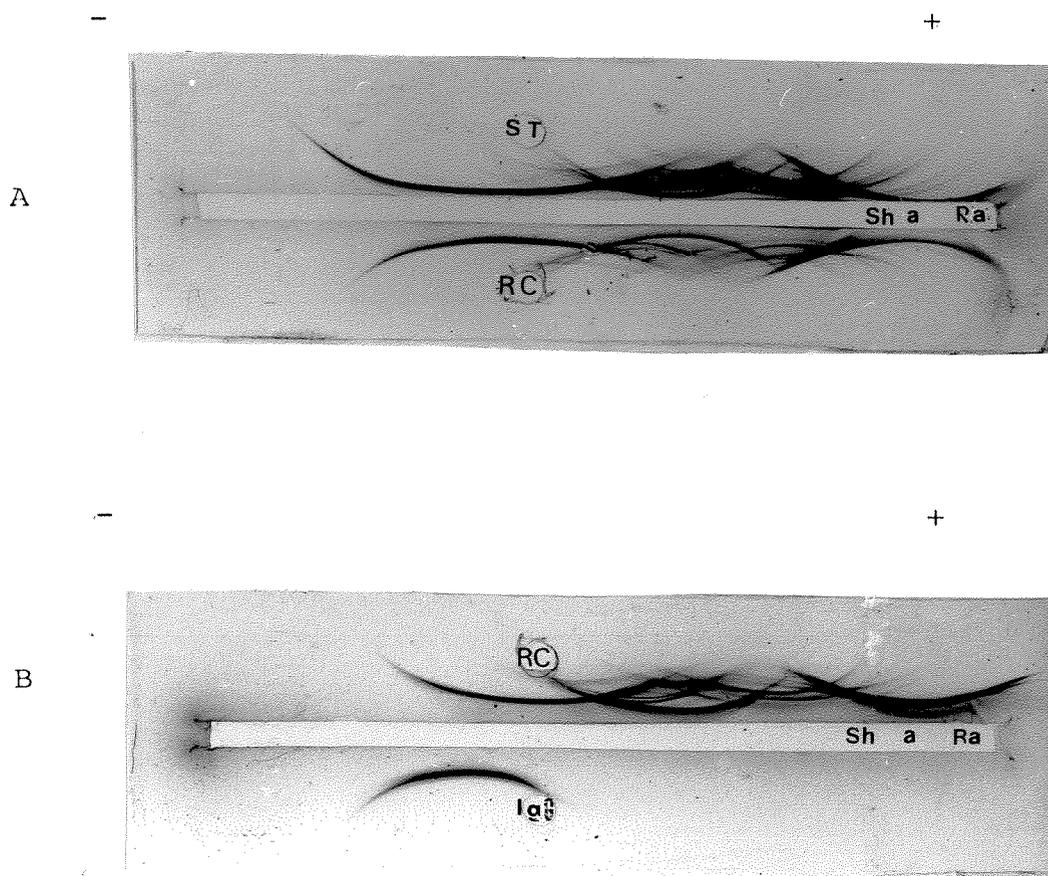


Figura 8 - Análise imunoeletroforética das proteínas tipo IgG do soro de coelho anti-eritrocruorina, obtidas por cromatografia em DEAE-celulose. Em 8A, no poço denominado ST foram aplicados 15 ul de soro total de coelho imunizado com eritrocruorina (Ra-a-Erc). No poço de baixo foi aplicada a fração RC obtida de cromatografia em DEAE-celulose. Como revelador foi utilizado um soro de carneiro anti-proteínas totais de coelho (Sh-a-Ra). Imunoglobulinas de mobilidade eletroforética tipicamente IgG podem ser observadas tanto no soro total de coelho como na fração RC (IgG e IgG-RC).

Na figura 8B a fração RC foi aplicada no poço superior; no inferior foi aplicada a fração 1 obtida de cromatografia do soro imune de coelho (Ra-a-Erc) em DEAE-celulose. Como revelador foi utilizado soro de carneiro anti-soro total de coelho (Sh-a-Ra). Um único arco de precipitação correspondente à IgG lenta purificada pode ser visto. Na fração RC se detecta um arco de precipitação que corresponde à IgG de mobilidade rápida em relação ao ano.

do. Nesta mesma figura pode-se observar na fração RC o arco que corresponde à IgG rápida que constitui essa fração.

#### 4. DEMONSTRAÇÃO DE ATIVIDADE DE ANTICORPO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO FRACIONAMENTO DO SORO DE COELHO ANTI-ERITROCRUORINA EM DEAE-CELULOSE

A imunoeletroforese em placa de agarose (fig. 9) permitiu a visualização de pelo menos três linhas de precipitação da eritrocrúorina, reveladas pela fração IgG (purificada e colocada nas canaletas). - Dois arcos mais anódicos apresentam reação de não identidade imunológica nítida. O arco mais catódico evidencia, pela sua forma, uma relação de não identidade com a proteína contígua.

#### 5. CONTROLE DA DIGESTÃO PELA PAPAÍNA DA IgG DE COELHO ANTI-ERITROCRUORINA

A cromatografia em DEAE-celulose do digesto total papaínico de IgG de coelho anti-eritrocrúorina (figura 10) mostra um pico de A280 correspondente ao "break through" da coluna denominado pico 1. Ao tratarmos a resina da coluna com NaCl



Figura 9 - Imunoeletroforese em gel de agarose da eritrocruorina purificada, revelada pela IgG de coelho anti-eritrocruorina (IgG-a-Erc) aplicada nas canaletas. Três arcos de precipitação correspondentes à eritrocruorina purificada são revelados. Relação de não identidade imunológica é observada entre esses componentes.

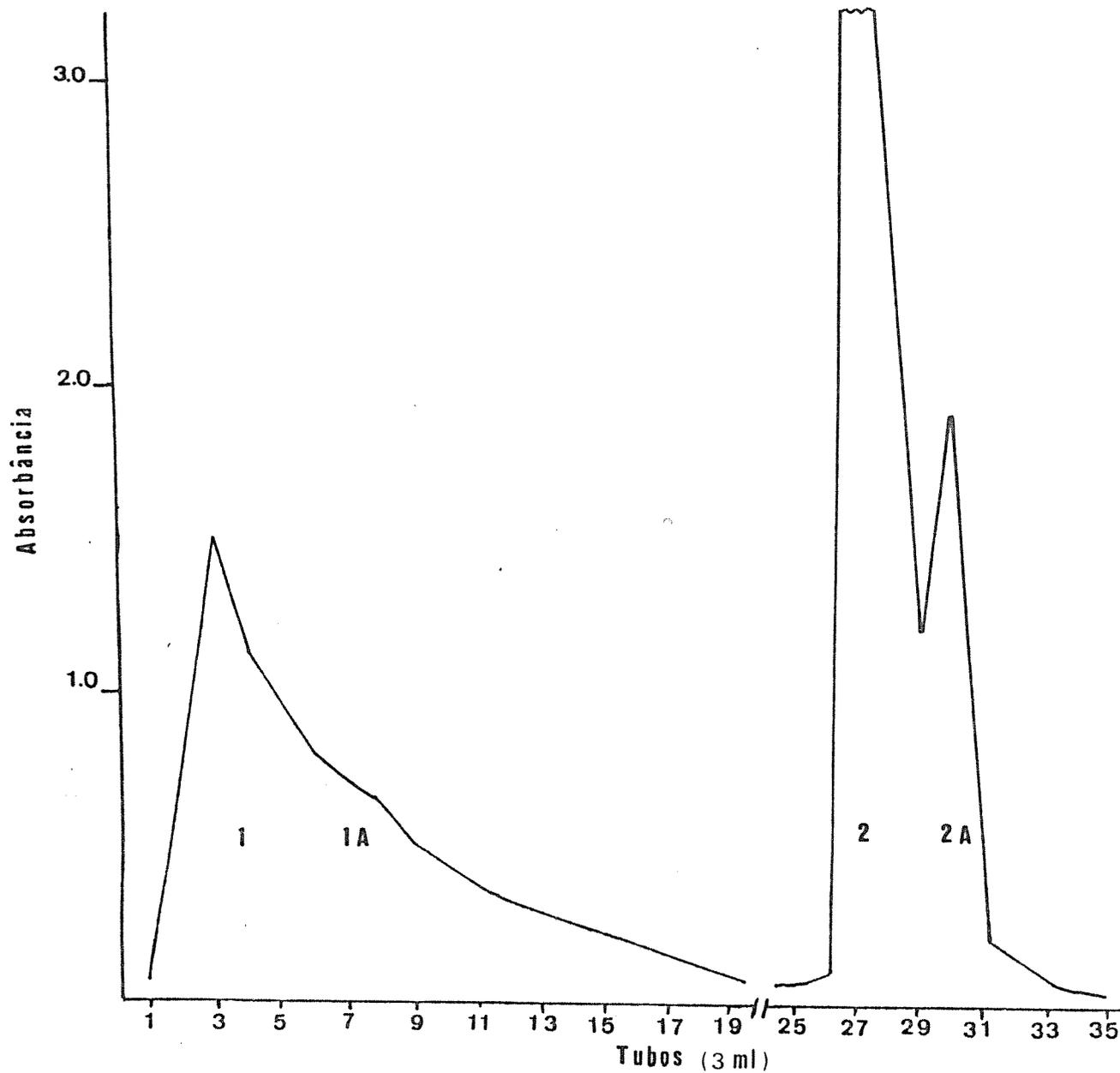


Figura 10 - Padrão obtido de cromatografia do digesto total das imunoglobulinas G anti-eritrocruorina digeridas pela papaína (tempo de digestão de 12 a 24 horas). A resina de troca aniônica (DE-52 Whatman) foi utilizada após ter sido equilibrada em tampão fosfato 5 mM pH 8.0 (coluna de 20 x 1 cm). As frações 1 e 1A passam livremente pela coluna. O material restante correspondente aos picos 2 e 2A são eluídos em NaCl 0.5 M.

0.5 M é obtida uma segunda fração que foi denominada pico 2. Em um intervalo de 12 a 24 horas de hidrólise, mantendo-se a concentração enzima-substrato constante, não se verificou alteração significativa do padrão obtido. A fração correspondente ao pico 1 mostrou indícios de uma ou mais subfrações denominadas 1A. A fração correspondente ao pico 2 apresenta frequentemente um "ombro" de densidade ótica relevante (pico 2A).

A figura 11 mostra o controle imoeletroforético de uma digestão papaínica de IgG de coelho purificada cujo tempo de digestão foi de 24 horas e cujo revelador foi um soro de carneiro imunizado com soro total de coelho (Sh-a-Ra). Observa-se relação de não identidade entre o arco de precipitação que corresponde à fração 1 e aquele correspondente à fração 2. Como controle foi utilizado digesto total de IgG e a IgG purificada. A análise do digesto total mostra pelo menos três arcos de precipitação. A fração que corresponde ao pico 2 mostra dois componentes principais que guardam relação de não identidade imunológica.

## 6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA IgG DE COELHO E DE SEUS FRAGMENTOS PAPAÍNICOS

A imunoglobulina G de coelho (Ra

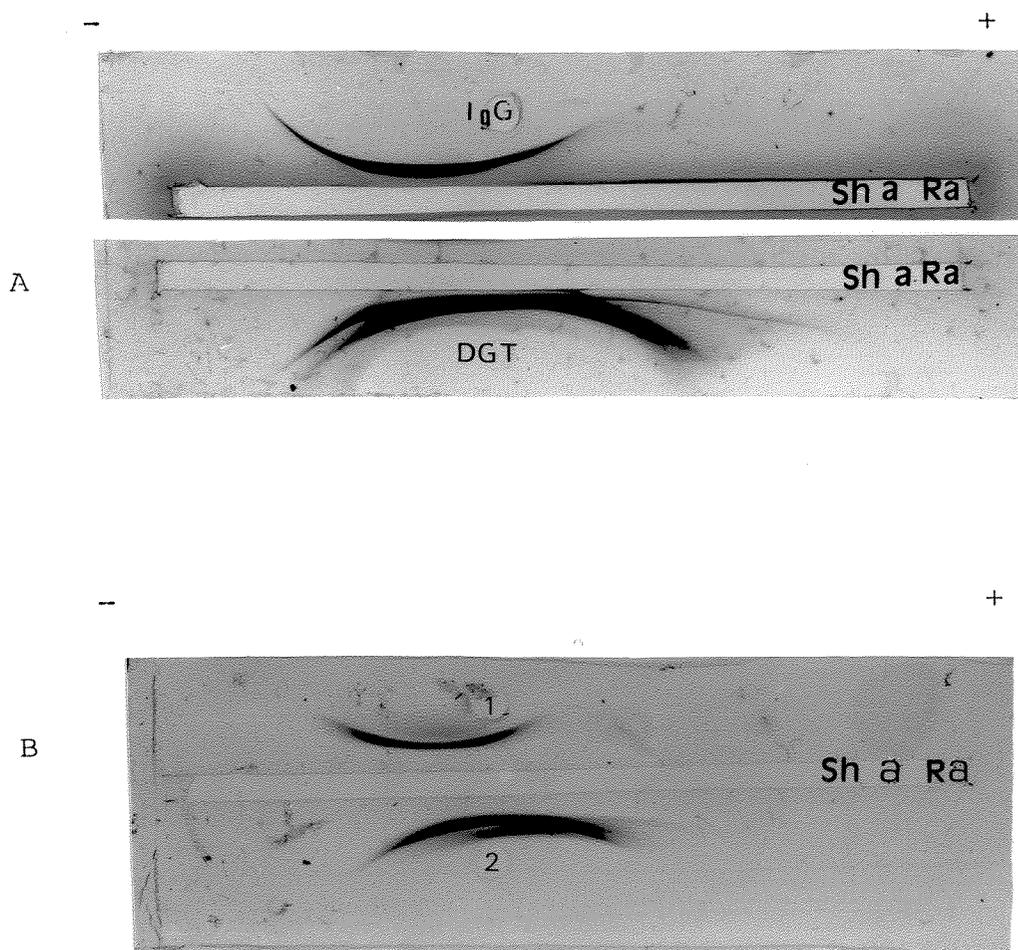


Figura 11 - Análise imunoeletroforética do digesto obtido após ação da papaína por 24 horas sobre as imunoglobulinas G de coelho. As proteínas isotipo IgG digeridas, foram reveladas por soro de carneiro anti-proteínas totais do soro de coelhos. Na fig. 11A, a IgG purificada foi aplicada no poço superior; no poço inferior foi aplicado o digesto total (DGT). Na fig. 11B o pico 1 obtido da cromatografia do digesto total foi colocado no poço superior; no poço inferior foi aplicado o pico 2. O digesto total caracteriza-se pela presença de três arcos de precipitação. A IgG purificada mostra um único arco de precipitação quando revelada pelo antisoro. A fração contida no pico 2 da cromatografia mostra dois componentes que exibem entre si relação de não identidade.

IgG) purificada mostra em PAGE/SDS a 10% uma banda principal na interface gel de concentração e gel de corrida. - Sob sua forma reduzida a IgG apresenta duas bandas de mobilidade correspondente às cadeias pesadas H e às cadeias leves L, como se observa na figura 12.

As proteínas contidas no pico 1 (obtido de cromatografia do digesto papaínico total da IgG de coelho), mostram migração semelhante àquelas das cadeias polipeptídicas H que apresentam peso molecular de 50.000; em condições redutoras estas proteínas migram como cadeias leves (PM 25.000) de imunoglobulinas - monoclonais FKW e proteína de Bence Jones (BJ BJJO) monômero.

O material que corresponde ao pico 2 apresenta mobilidade idêntica àquela das proteínas de Bence Jones (BJ BJJO) não reduzida, ou seja, no seu estado dimérico. Após redução esta banda apresenta migração típica de cadeias leves de imunoglobulinas monoclonais IgG<sub>3</sub> FKW.

A eritrocruorina em seu estado nativo apresenta quatro componentes: o principal componente apresenta-se como uma banda dupla de migração semelhante àquela das proteínas de Bence Jones dímero. Esta mesma banda de eritrocruorina migra ainda com mobilidade

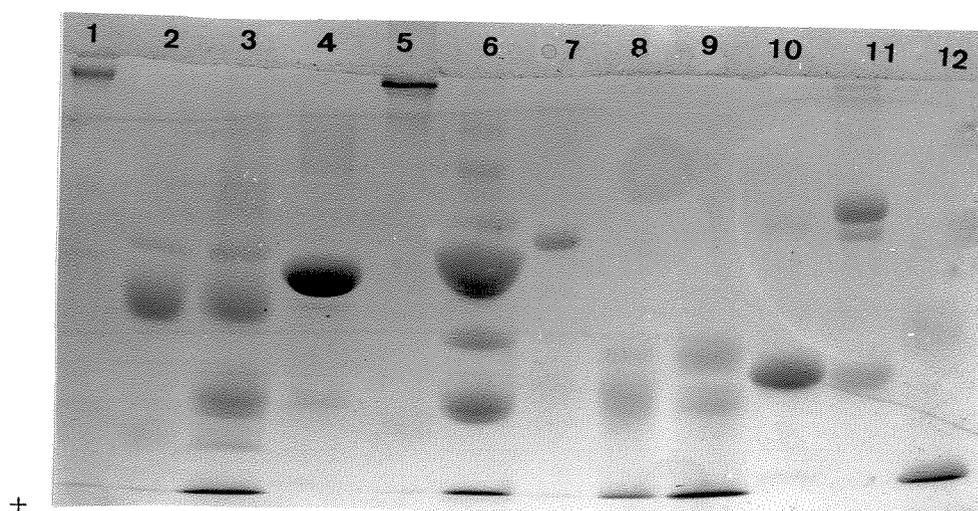


Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 10%, da imunoglobulina G de coelho nas suas formas nativa e digerida pela papaína antes e após redução com DTT 0,1M. As proteínas não reduzidas foram aplicadas em: (1) IgG de coelho; (2) Pico 1 obtido de cromatografia de troca iônica do digesto total papaínico da IgG de coelho; (3) Pico 2 isolado a partir de cromatografia de IgG de coelho digerida pela papaína; (4) Proteína monoclonal de Bence Jones (BJ JJ0) dímero; (5) Proteína monoclonal FKW isotipo IgG<sub>3</sub>; (6) Eritrocruorina. Estas mesmas proteínas foram aplicadas na mesma ordem em (7), (8), (9), (10), (11) e em (12) foi aplicada Mioglobina, todas em condições redutoras.

As cadeias leves que correspondem a 25 Kd (L) e as cadeias pesadas que correspondem a 50 Kd (H) são evidenciadas após redução com DTT. A proteína de Bence Jones reduzida (BJ JJ0) apresenta-se sob a forma de monômero e migra como única banda, correspondendo ao peso molecular das cadeias leves de imunoglobulinas G.

semelhante àquela das proteínas contidas no pico 1 obtido de cromatografia do digesto papaínico total da IgG de coelho. Dois componentes da eritrocruorina mostram migração entre as cadeias pesadas (H) e as cadeias leves (L) das proteínas mielomatosas FKW; destas, a banda de migração maior situa-se quase que paralelamente às cadeias leves. Uma outra banda não tão evidente e de migração idêntica à de mioglobina pode ser visualizada.

#### 7. ANÁLISE ESPECTRAL DA ERITROCRUORINA EM PRESENÇA DE ANTICORPOS DE COELHO IMUNIZADO COM ERITROCRUORINA

O espectro característico da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* apresenta três picos de absorção para a sua forma oxigenada: um deles situa-se próximo à região de ultravioleta do espectrofotômetro (Banda de Soret) e os outros dois picos (539,4 e 574,6 nm) situam-se dentro da faixa de luz visível (figura 13). Na sua forma deoxigenada, são evidenciados dois diferentes picos: o primeiro deles situa-se na região de Soret (luz visível) e o segundo pico de absorção é evidenciado na faixa de 563 nm (figura 14).

Nas figuras 14 e 15A, em ensaios de equilíbrio com o oxigênio, a eritrocruorina de *G.*

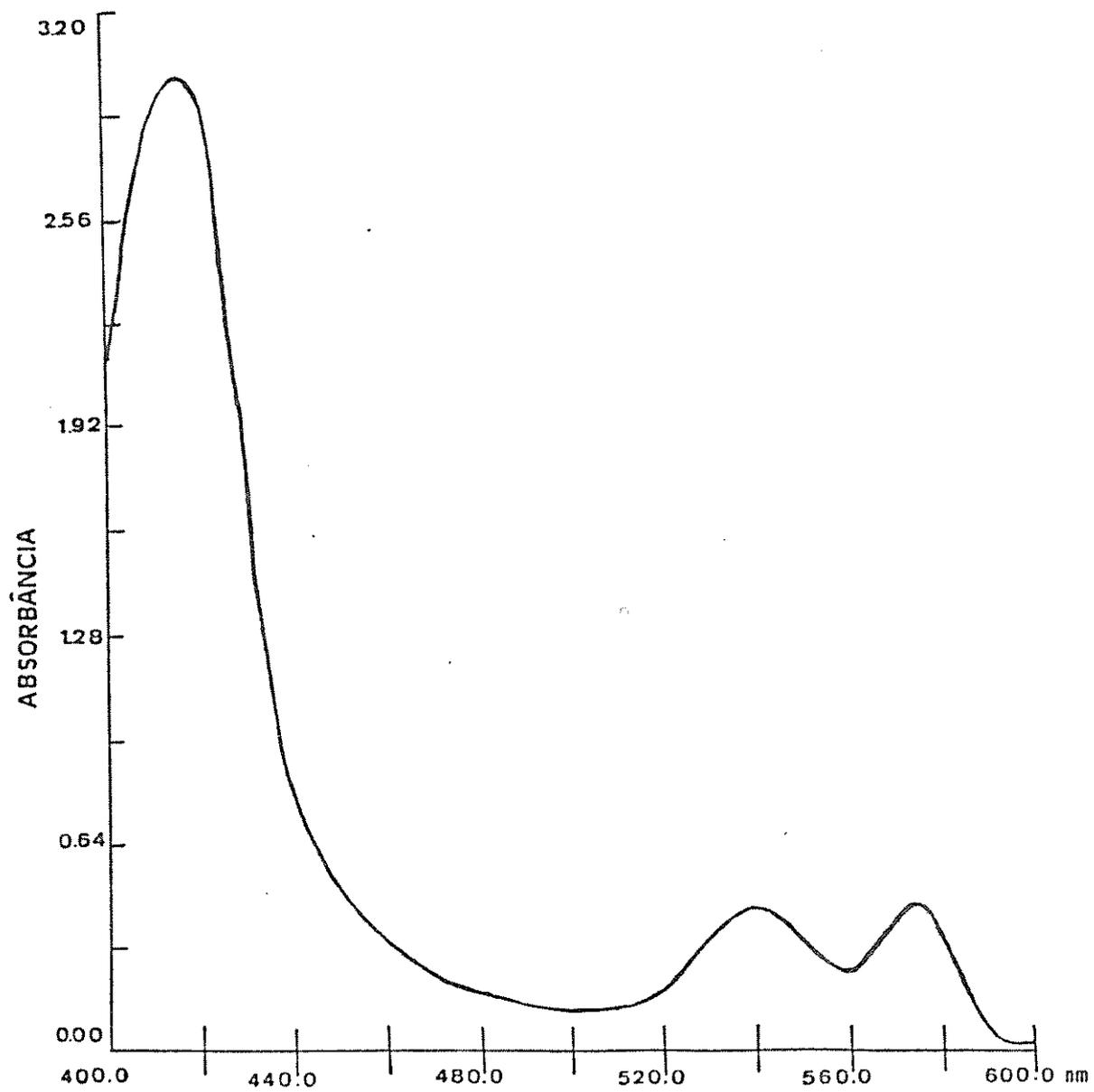


Figura 13 - Espectro de absorção da eritrocruorina de 400 a 600 nm — forma oxigenada. Três diferentes picos são visualizados; entre 500 e 600 nm pode ser observado um pico de absorção a 539.4 nm e um outro pico a 574.6 nm. A eritrocruorina  $12,1 \times 10^{-6}$  M foi dissolvida em tampão tris-HCl pH 7.2 0,05 M.

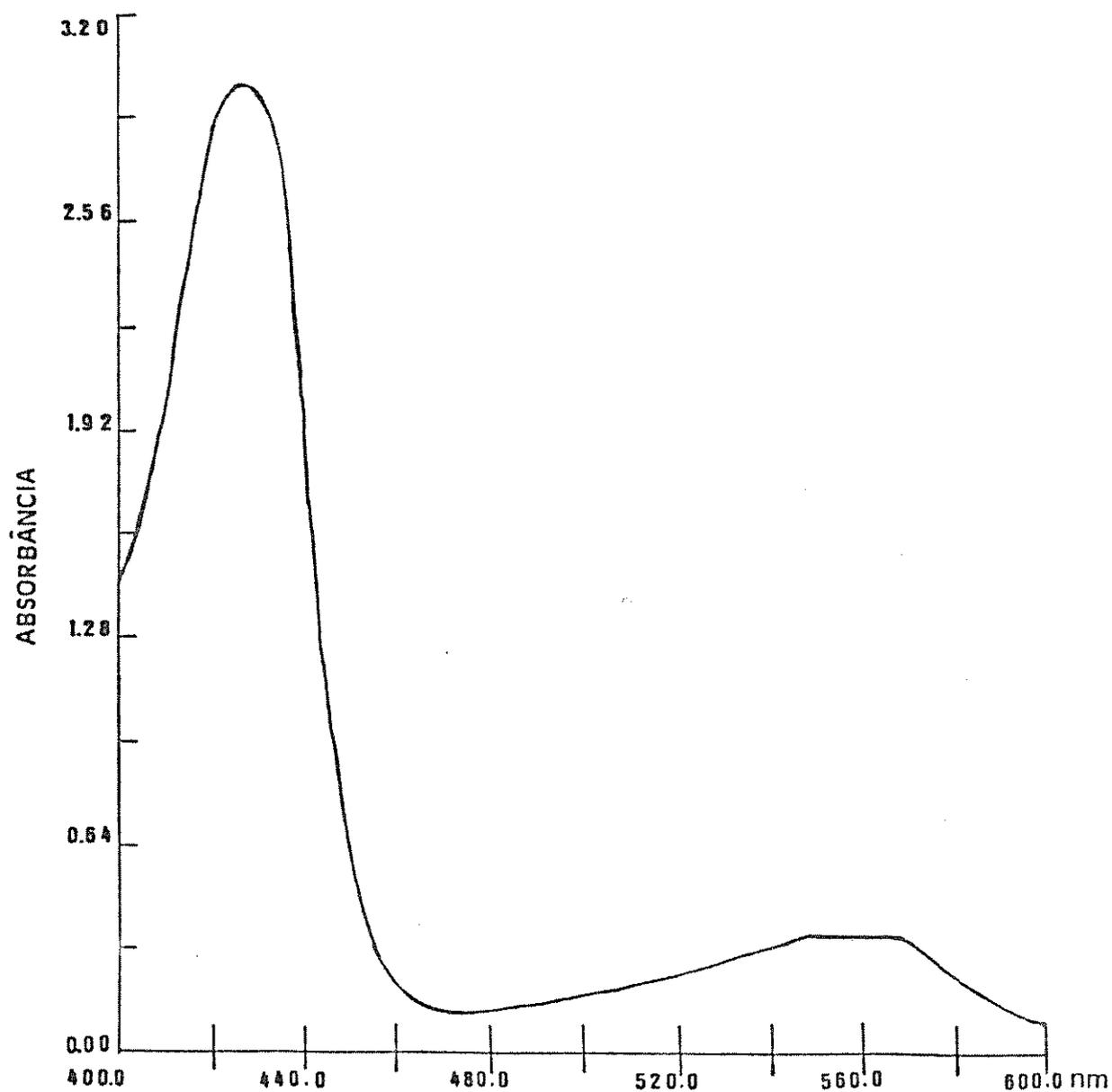


Figura 14 - Curva experimental da eritrocruorina, obtida pelo método do espectrofotométrico, com varredura de 400 a 600 nm — forma deoxigenada. São visualizados dois picos de absorção máxima; espectro visível de 500 a 600 nm mostra uma curva pouco definida próxima a 563 nm. A solução utilizada foi tri $\text{-HCl}$  0,05 M pH 7.2, contendo eritrocruorina  $12,1 \times 10^{-6}$  M em ditonito de sódio 0,1 M.

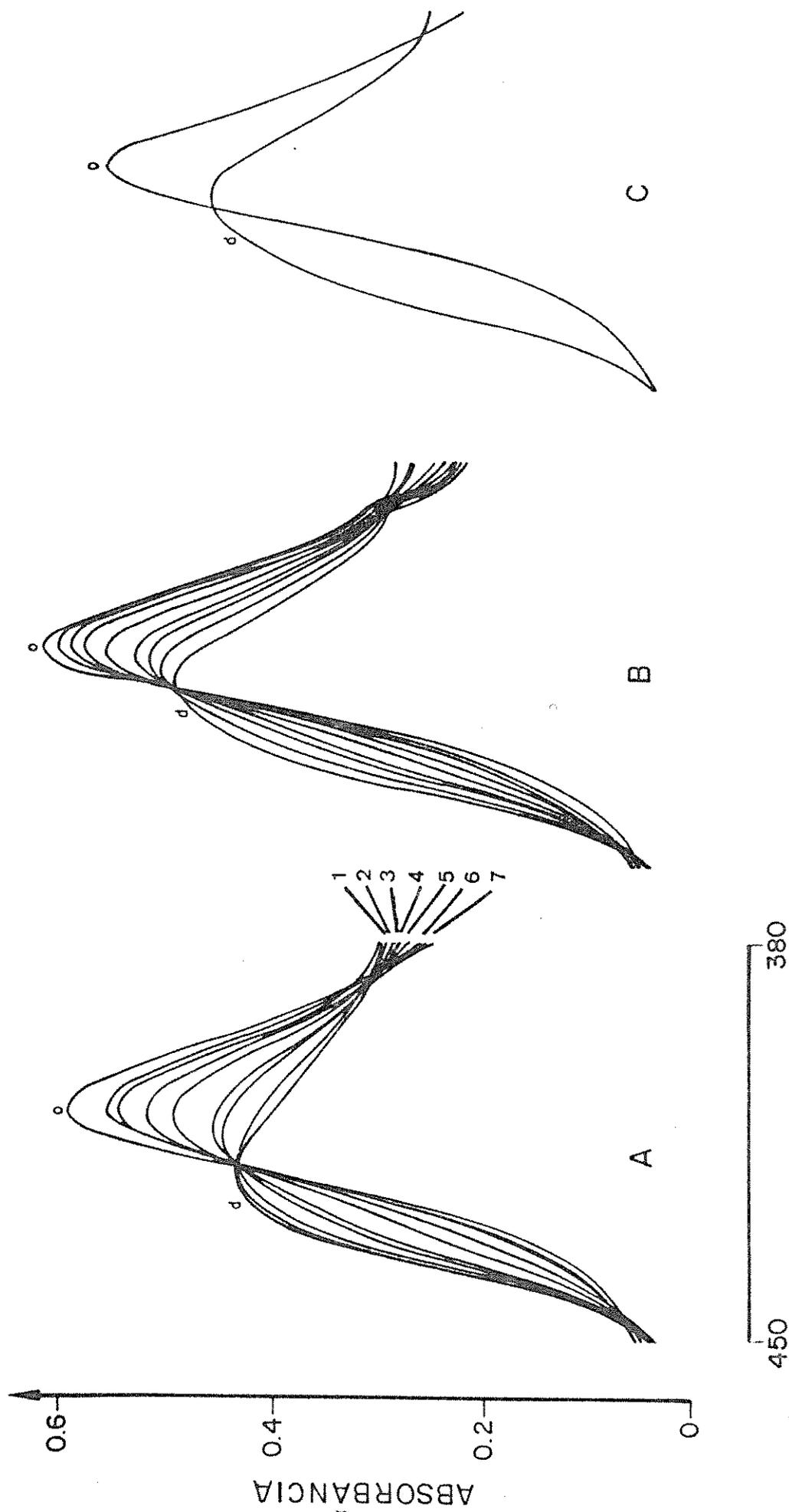


Figura 15 - Espectro da eritrocruorina na região de Soret (de 450 a 380 nm). Em (A) Eritrocruorina  $10^{-6}$  M [heme] em tampão tris-HCl, pH 7.4 nas formas oxi, deoxi e intermediárias (assinaladas de 1 a 7), durante o Equilíbrio de O<sub>2</sub> xigenação. (B) Eritrocruorina na presença de anticorpo purificado  $10^{-7}$  M. (C) Eritrocruorina na presença de anticorpo purificado  $8 \cdot 10^{-7}$  M, detalhando o desvio do pico de absorção da deoxieritrocruorina para a direita.

*paulistus* apresenta dois picos de absorção: a oxieritrocruorina com um pico máximo a 419 nm e a eritrocruorina' deoxigenada com um pico máximo a 428 nm (Banda de Soret). Este comportamento é modificado pelo efeito de imunoglobulinas IgG de coelhos imunizados com eritrocruorina, causando alterações no espectro da deoxieritrocruorina evidenciadas por um desvio para a direita do pico máximo de absorção a 428 nm (figura 15B).

Na figura 15C podemos observar em destaque o desvio para a direita do pico em 428nm pela presença de anticorpo isotipo IgG.

A análise espectral da eritrocruorina demonstra, em amostras separadas, a manutenção dos pontos isosbéticos (390, 422, 466 nm).

#### 8. IMUNOGLOBULINA G ANTI-ERITROCRUORINA MODIFICA AS CURVAS DE EQUILÍBRIO DO OXIGÊNIO COM A ERITROCRUORINA

O efeito de quantidades de IgG específica nas curvas de equilíbrio com o oxigênio é demonstrado na figura 16. Os valores de  $P_{50}$  obtidos a partir de três amostras que continham eritrocruorina em presença de IgG revelam um desvio para a esquerda das curvas

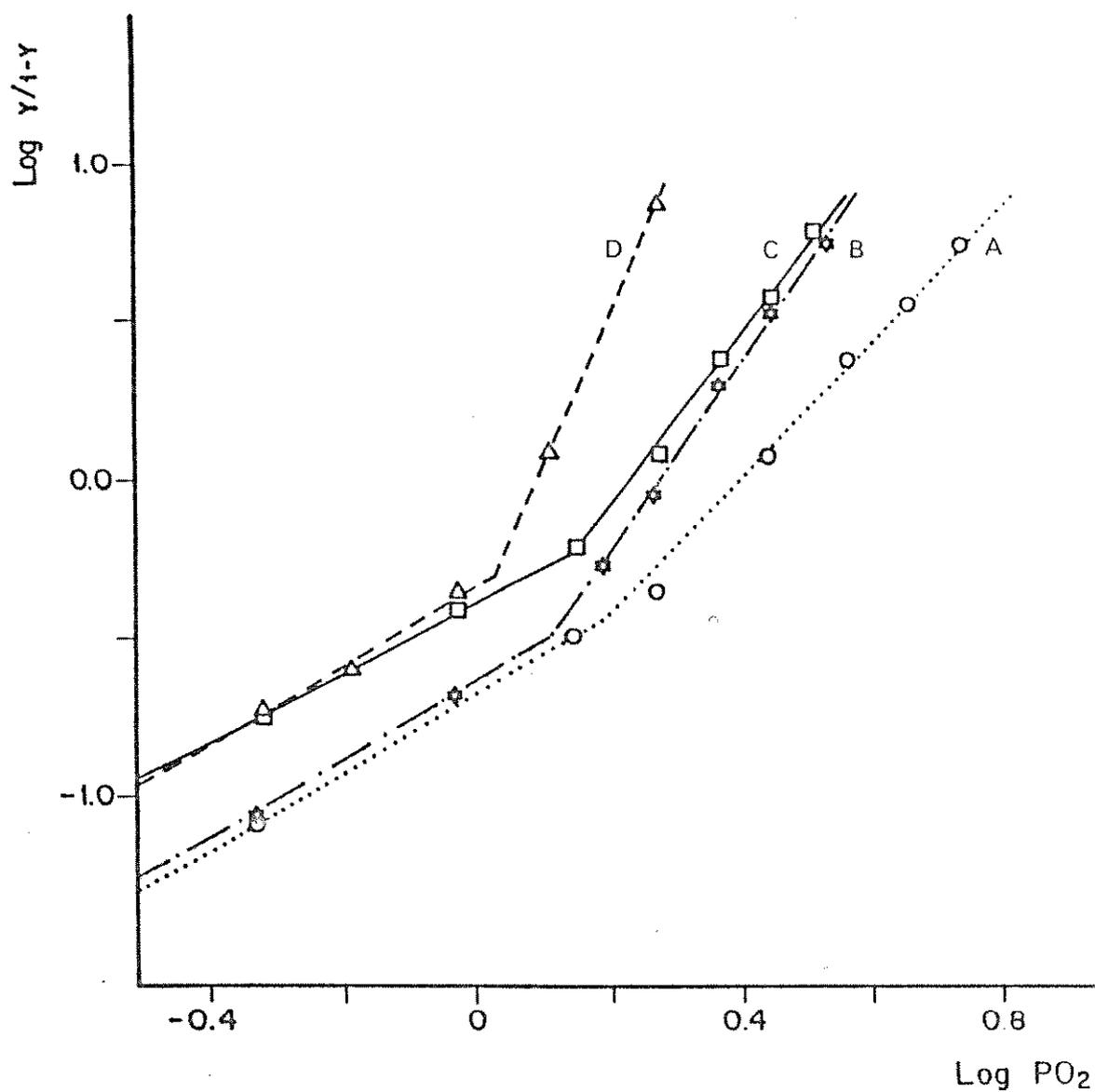


Figura 16 - Plot de Hill - Curvas de Equilíbrio da Eritrocuorina - com o oxigênio. Em (A) eritrocuorina  $10^{-6}M$ . (B) eritrocuorina  $10^{-6}M$  em presença de anticorpo específico  $10^{-8}M$ . (C) eritrocuorina  $10^{-6}M$  na presença de anticorpo específico  $10^{-7}M$ . (D) eritrocuorina  $10^{-6}M$  na presença de anticorpo específico  $2 \cdot 10^{-7}M$ . Neste ensaio, foi utilizado tampão tris-HCl  $0.05M$ , pH 7.4,  $T=20^{\circ}C$ .

vas de equilíbrio, evidenciando diminuição dos valores (1,905; 1,710; 1,253 Torr) quando comparadas ao controle (eritrocruorina  $P_{50} = 2,500$  Torr).

A Tabela 2 mostra que as curvas de oxigenação da eritrocruorina sofrem um desvio para a esquerda na presença de antisoro específico (amostra 4: Ra-a-Erc) ou de IgG purificada (amostras 2 e 3: IgG-a-Erc). No caso da amostra 5 (Ra-a-Erc) é evidenciado um desvio das curvas de equilíbrio para a direita.

Observa-se ainda na Tabela 2 - que nenhuma alteração das curvas é evidenciada com eritrocruorina na presença de soro de carneiro não imunizado (amostra 6: Sh WS) em comparação ao controle (amostra 1: eritrocruorina). A concentração dos diferentes soros foi ajustada de maneira idêntica, com a intenção de se obter um padrão similar de concentração proteica.

## 9. INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS COM A ERITROCRUORINA

Proteínas em excesso causam um desvio para a direita da curva de oxigenação, como mostrado nas figuras 17 e 18. Uma das amostras, composta de eritrocruorina  $6 \cdot 10^{-6}$  M e albumina humana na concen

TABELA 2 - P<sub>50</sub> e "n" (Coeficiente de Hill) da eritrocruorina (Erc) em presença de anticorpo específico (IgG-a-Erc), soro total específico (Ra-a-Erc) e soro total de carneiro não imunizado (Sh ST).

Amostras	Erc [heme] $\mu$ M	[IgG-a-Erc] $\mu$ M	[Ra-a-Erc] mg/ml	[Sh ST] mg/ml	heme/IgG razão molar	n	log P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub> (torr)
1	6,64	-	-	-	-	1,965	0,745	5,5590
2	6,07	0,746	-	-	8/1	2,987	0,595	3,9355
3	6,07	1,492	-	-	4/1	1,700	0,280	1,9055
4	6,93	-	1,534	-	9/1*	2,342	0,670	4,6773
5	6,93	-	3,840**	-	4/1*	n.d.	1,105	12,7350
6	6,50	-	-	1,4666	-	1,400	0,785	6,0954

\* Considerando anticorpos específicos entre 5-10%, \*\* Condições de excesso de proteínas totais, n.d. = não determinado.

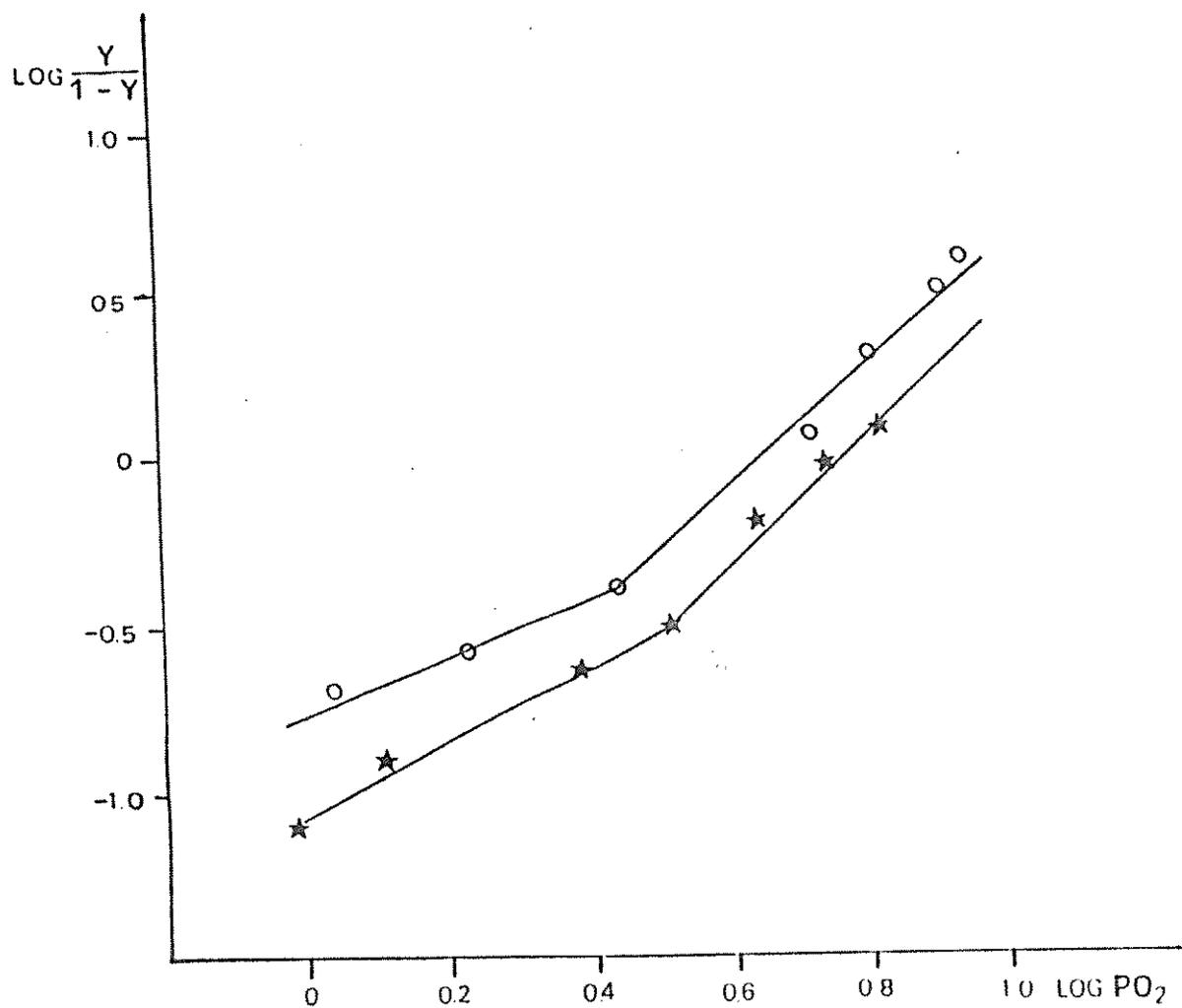


Figura 17 - "Plot de Hill" - Curvas de equilíbrio da eritrocruorina na presença de albumina humana. Em (o) Erc (eritrocruorina)  $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ . Em (★) Erc  $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$  e albumina  $172 \cdot 10^{-6} \text{M}$ .

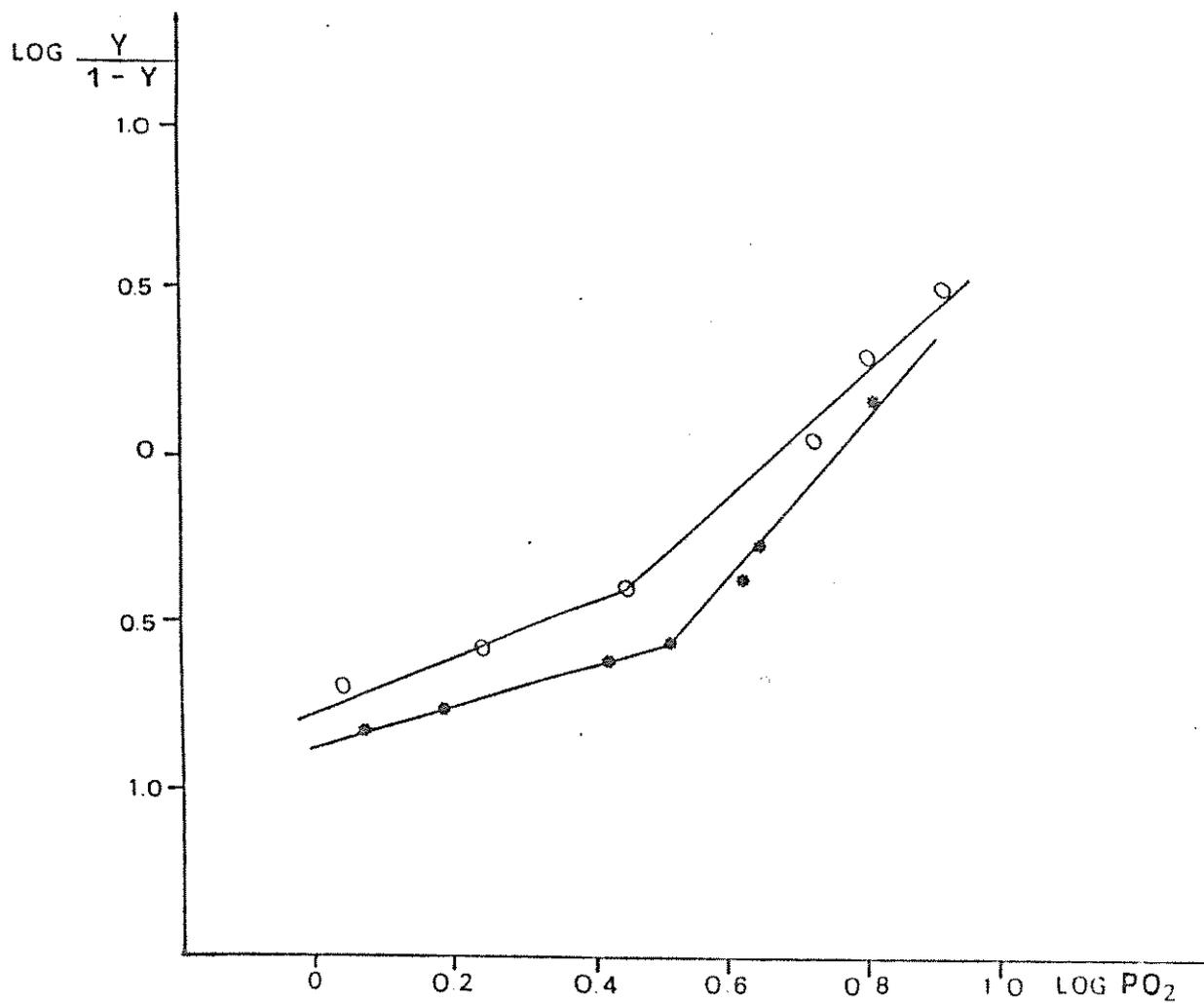


Figura 18 - "Plot de Hill" - Curvas de oxigenação da eritrocruorina contendo albumina humana e IgG de coelho específico. Em (o) Erc  $6 \cdot 10^{-6}M$ . Em (\*) Erc  $6 \cdot 10^{-6}M$ , albumina  $172 \cdot 10^{-6}M$  e IgG  $1,31 \cdot 10^{-6}M$ .

tração final  $172 \times 10^{-6} \text{ M}$ , apresenta um deslocamento para a direita das curvas de equilíbrio (figura 17). O mesmo deslocamento é evidenciado em outra amostra contendo eritrocruorina  $6 \times 10^{-6} \text{ M}$  em presença de albumina e IgG, nas concentrações finais  $172 \times 10^{-6} \text{ M}$  e  $1,31 \times 10^{-6} \text{ M}$  respectivamente (figura 18).

Estas amostras foram comparadas ao controle (eritrocruorina  $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) e as alterações das curvas de equilíbrio são evidenciadas através de  $P_{50}$ , por um aumento de 4,466 Torr para 5,649 Torr no caso de eritrocruorina em presença de albumina. Na amostra contendo eritrocruorina com albumina e IgG específica há um aumento de 4,466 Torr para 5,623 Torr.

#### 10. FRAGMENTOS PAPAÍNICOS DE IgG ANTI-ERITROCRUORINA AFETAM O COMPORTAMENTO DA ERITROCRUORINA NO PLOT DE HILL

Na presença de quantidades crescentes do pico 1 isolado por cromatografia de troca aniônica do digesto papaínico total de IgG, verificou-se que as curvas de oxigenação da eritrocruorina deslocam-se para a esquerda (figura 19). Deste desvio resultaram os seguintes valores de  $P_{50}$ : 5,888 Torr para eritrocruorina ( $2,88 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) na presença de pico 1 ( $1,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ ); e

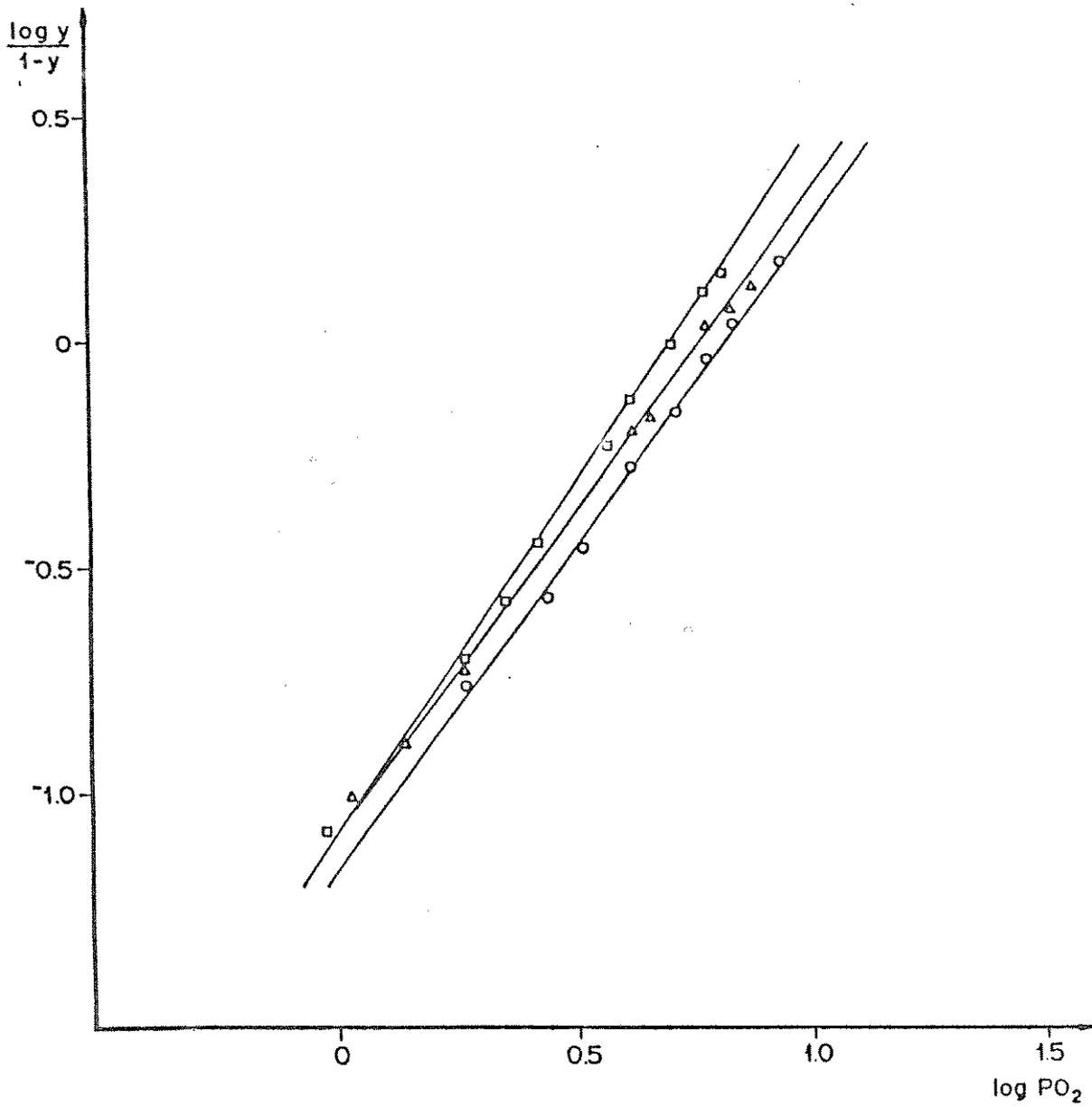


Figura 19 - Curvas de equilíbrio da eritrocruorina de *G. paulistus* na presença de fragmentos Fab obtidos a partir da digestão papaínica de IgG específica. Em (o) Erc (eritrocruorina)  $5,6 \times 10^{-6}M$ . Em ( $\Delta$ ) Erc  $5,6 \times 10^{-6}M$  e Fab  $1,3 \times 10^{-6}M$ . Em ( $\square$ ) Erc  $5,6 \times 10^{-6}M$  e Fab  $2,6 \times 10^{-6}M$ .

5,011 Torr para eritrocruorina ( $2,8 \times 10^{-6}$  M) na presença de pico 1 ( $2,8 \times 10^{-6}$  M).

A comparação destes valores com o controle (eritrocruorina  $2,8 \times 10^{-6}$  M;  $P_{50} = 6,456$  - Torr) confirma o deslocamento para a esquerda das curvas de oxigenação.

DISCUSSÃO

O transporte de oxigênio em grande número de anelídeos é mediado por arranjos conformacionais de macromoléculas gigantes denominadas eritrocruorinas. Na intenção de se estudar as modificações da configuração oxi, bem como deoxigenada destas proteínas, espécimes de *G. paulistus* — uma minhoca gigante — foram obtidos, e seu sangue submetido à ultracentrifugação. Seu pigmento respiratório (eritrocruorina) foi isolado e em seguida passamos à imunização de coelhos de linhagem não-definida para obtenção de antisoro policlonal anti-eritrocruorina.

Os resultados de imunodifusão dupla em duas dimensões (OUCHTERLONY, O., 1953) do soro total de coelhos e de IgG de coelho isolada por cromatografia aniônica, revelados por soro de carneiro imunizado com proteínas totais do soro de coelhos (figura 6) sugerem a existência de identidade parcial entre a imunoglobulina G e sua fração homóloga no soro total. Esta observação é consistente com evidências experimentais indicativas de que estas proteínas sejam parte integrante das proteínas séricas correspondentes às imunoglobulinas IgG de coelhos. Estas proteínas não se constituem numa única espécie molecular, sendo heterogêneas e potencialmente contendo uma grande variedade de anticorpos distintos (NOELKEN, M.E. et al, 1965).

A cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose do soro de coelho imunizado com proteína respiratória do tipo eritrocruorina (figura 7), evidenciou a separação do sistema precipitante IgG em aparentemente duas populações: uma delas constitui o primeiro pico eluído, de migração lenta em relação ao anodo e com arco de precipitação de mobilidade semelhante à IgG de cobaia (OLIVEIRA, B. et al, 1970) e de *Tayassu tajacu* (LOVO-FARAH, M.F., 1988) - figura 8A. A outra população de IgG que se apresenta contida na fração RC (figura 8B) possui migração rápida característica da subclasse IgG<sub>1</sub> descrita na cobaia (BENACERRAF, B., 1963), camundongo (FAHEY, J.L., et al, 1964) e outros vertebrados - (COE, J.E., 1968; KIM, Y.B. et al, 1966; MURPHY, F.A. et al, 1965). Não está claro se a separação de IgG de coelhos em diferentes mobilidades acontece apenas pelo efeito da diferença de cargas, ou se por variação na sua composição e estrutura (SELA, M. et al, 1963), embora tais anticorpos difiram um do outro por possuírem sítios de ligação de variadas especificidades, partilhando ao menos em parte de diferenças em sua sequência de aminoácidos e composição (NOELKEN, M.E. et al, 1965).

A especificidade da IgG de coelho anti-eritrocruorina de mobilidade "lenta" é apresentada na figura 9. Notam-se três linhas de precipitação aparentes, que evidenciam o reconhecimento antigênico de

pelo menos três componentes da eritrocruorina que migram diversamente. Estes componentes parecem apresentar cargas distintas, sugerindo que possam conter variações em sua composição de aminoácidos.

A imunoglobulina IgG do soro de coelhos, digerida pela papaína, apresentou um digesto papaínico total (DGT) que foi cromatografado em DEAE-celulose (figura 10). Obtiveram-se três picos de densidade ótica: o pico 1 e fração 1A; e picos 2 e 2A. Os primeiros picos eluídos (picos 1 e 1A) correspondem à fração Fab de IgG "lenta" (segundo a mobilidade eletroforética da molécula nativa). A grande heterogeneidade existente na porção Fab da IgG de coelho utilizada é demonstrada, em parte, pelo perfil cromatográfico dos picos 1 e 1A, que se apresentam distribuídos no fracionamento de DGT quase que de maneira uniforme. Em geral, a porção -Fab de IgG de coelhos difere entre si, sendo composta -por diferentes populações moleculares (PORTER, R.R., 1959).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; figura 12) da IgG "lenta" de coelho mostrou que esta proteína comporta-se como única banda, o que foi útil na determinação de seu grau de pureza. Após redução com DTT estas proteínas apresentaram -cadeias pesadas (H) semelhantes àquelas de seu marcador (proteínas FKW do isotipo IgG3) e uma banda menos inten

sa correspondente às cadeias leves (L).

O pico 1 obtido de cromatografia de troca aniônica do digesto total de IgG apresenta-se sob a forma de uma banda principal com mobilidades, em gel de acrilamida, compatível com a mobilidade da proteína de Bence Jones (BJ BJJO) dímero. Após redução, as proteínas contidas no pico 1, consideradas fragmentos Fab, possuem mobilidade semelhante àquela de proteína de Bence Jones monômero (redução com DTT). Os picos 2 e 2A (fragmento Fc da IgG de coelho) mostram duas significantes bandas: uma delas, de peso molecular 50.000, corresponde à contaminação por Fab (picos 1 e 1A). A outra, de menor peso molecular, coincide com um dos componentes da eritrocruorina que apresenta 28 Kd.

A eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* apresenta quatro componentes na eletroforese em acrilamida, que apresentam peso molecular definido: um componente principal de aproximadamente 50.000, cuja mobilidade é semelhante à mobilidade da proteína de Bence Jones dímero; o segundo componente apresenta 33 Kd. Já o terceiro e quarto componentes apresentam respectivamente 28 Kd e 12-16 Kd (MEIRELLES, N.C. et al, 1985).

Interessantemente, um dos

componentes da eritrocruorina mostra mobilidade idêntica àquela da mioglobina. Isto poderia indicar a possibilidade de semelhanças estruturais entre as duas proteínas, já que hemoglobinas e mioglobinas possuem uma cadeia polipeptídica ancestral comum. Estudos de comparação entre a sequência de aminoácidos de alguns mamíferos e hemoglobinas de *Glycera* (POLICHAETA) e lampréia foram realizados por LEHMAN & ROMERO-HERRERA. Existem respectivamente 105 e 102 diferenças sequenciais entre estas hemoglobinas e a mioglobina humana, demonstrando neste caso uma taxa de evolução aparentemente constante, baseando-se no fato de que estas formas evoluíram separadamente do "estoque" ancestral de mamíferos por cerca de 540 e 420 milhões de anos. Ainda nesta linha de raciocínio, o estudo evolutivo de mioglobinas não pode ser dissociado de sua função. A mioglobina assemelha-se à hemoglobina nos contatos de heme, mas não nos seus sítios particulares, responsáveis pela interação heme-heme. Os resíduos hidrofóbicos internos são similares em todas as globinas (LEHMANN, H. & ROMERO-HERRERA, A.E., 1974).

Uma das maneiras de se estudar as modificações da configuração estrutural de hemoglobinas é através dos estudos em espectrofotometria. Na figura 13, a análise espectral da hemoglobina extracelular de *G. paulistus* (utilizando-se varredura de 400 a 600 nm)

demonstra três picos de absorção para a sua forma oxigenada, que se situam a 419, 539,4 e 574,6 nm. A figura 14 mostra apenas dois picos de absorção: um deles situado na banda de Soret (428 nm) e o outro pico, não muito bem caracterizado, a 563 nm, ambos correspondentes à eritrocruorina deoxigenada. Através destes resultados e baseando-se na metodologia utilizada por ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E., 1958 e modificada por MEIRELLES, N.C., 1985, 1987, evitamos erros de alta magnitude através de leituras a 419 nm e 428 nm para obtenção das curvas de oxigenação em equilíbrios isosbéticos.

A manutenção dos pontos isosbéticos a 390, 422 e 426 nm (figura 15) mostra consistentemente que estamos lidando com uma única espécie molecular. Este dado revela ainda que a eritrocruorina encontra-se em seu estado nativo e que o pH, a diluição da solução bem como a temperatura ambiente foram mantidos durante o experimento. Variação na força iônica de 0,02 até 2M em solução de NaCl não provocou alguma modificação no espectro da eritrocruorina.

Na figura 15B e 15C há um deslocamento das curvas para a direita, o que pode ser indicio de alteração na configuração molecular da eritrocruorina em presença de IgG específica. A configuração molecular que deve principalmente estar envolvida neste tipo

de alteração parece ser referente à deoxieritrocruorina. A concentração da eritrocruorina em relação à concentração de IgG foi estimada através da razão molar heme/IgG. Esta determinação foi possível uma vez que a taxa média de grupamentos heme por molécula de eritrocruorina é de 136, significando 10,5 grupamentos heme por monômero (COSTA, M.C.P. et al, 1988).

O significado evolutivo de uma proteína pode ser avaliado não somente por modificações em sua sequência de aminoácidos, mas também pela sua variação conformacional. Existem evidências sugerindo que sequências de aminoácidos que diferem entre si podem assumir conformações quase idênticas. Talvez o melhor exemplo de similaridade conformacional com a mesma atividade biológica, mas com sequências primárias inteiramente diferentes, seja o que envolve famílias de hemoglobinas e mioglobinas. Para que sejam eficientes, estas proteínas devem possuir uma estrutura que venha prevenir a oxidação e permita a ligação de oxigênio ao  $Fe^{2+}$ , ocasionando uma modificação conformacional que libera o oxigênio em condições apropriadas. Estes requisitos são portanto fortemente dependentes de suas propriedades conformacionais. A Leg hemoglobina difere da hemoglobina humana em 137 aminoácidos e ainda assim ambas possuem estruturas tridimensionais similares e contêm heme, funcionando como carreadores de oxigênio. Outras pesquisas su

gerem ainda que em certos casos a sequência primária não determina especificidade e função, referindo-se à especificidade de anticorpos anti-dextran com pequenas diferenças de tamanho, forma, estrutura e constantes de ligação. Estes anticorpos exibem diferenças significantes nas sequências de aminoácidos em seus três CDR ("complementarity determining regions") sem que haja distúrbios de especificidade funcional. Assim, função idêntica não requer necessariamente sequência primária idêntica. A natureza não deve selecionar através de sequências primárias, e sim para conformações funcionais (ERLANGER, B.F., 1989).

Se as sequências de aminoácidos e estrutura terciária em duas sequências são similares, seria simples aceitar a idéia de homologia. Mas se uma das situações existe, e a outra não, como poderíamos avaliar? O melhor princípio é que duas proteínas podem ser classificadas como homólogas se forem fortemente similares nas regiões de suas estruturas onde não exista razão funcional para isto, embora tal afirmação seja discutível por não conhecermos todas as funções de cada proteína (DICKERSON, R.E., 1971). A única evidência remanescente de uma origem comum, neste caso, deve estar com segurança na conservação de sua estrutura terciária e função (LILJAS, A. & ROSSMANN, M.G., 1974).

Os estudos realizados a partir

das curvas de equilíbrio da eritrocruorina com o oxigênio demonstraram que hemeproteína aumenta sua afinidade' em presença de IgG específica purificada (figura 16). Este efeito parece ser dependente de concentração com desvio das curvas gradativamente para a esquerda no "Plot de Hill". Resultados obtidos com hemoglobina humana foram concordantes com os resultados acima apresentados - (REICHLIN, M. et al, 1969).

Na Tabela 2, quatro diferentes tipos de amostras foram utilizadas no ensaio de equilíbrio com o oxigênio: Eritrocruorina (amostra 1). Eritrocruorina na presença de soro de coelho anti-eritrocruorina (amostras 4 e 5). Eritrocruorina com IgG específica purificada (amostras 2 e 3). Eritrocruorina com soro de carneiro não imunizado (amostra 6). Tanto o soro total como a IgG específica foram capazes de induzir aumento de afinidade, medido em 50% de saturação dos sítios da eritrocruorina pelo oxigênio e evidenciado por um desvio' das curvas para a esquerda. Foi observada uma diminuição de afinidade (desvio para a direita das curvas) no caso de amostras em condições de "excesso de proteínas totais" (amostra 5) — como explicar esta observação? Os dados obtidos "falam" a favor de uma possível interação de proteínas outras que não IgG, presentes no soro total de animais imunizados com eritrocruorina. Não foram verifi cadas variações da eritrocruorina sozinha ou na presença

de soro de carneiro não imunizado.

Os estudos em cristalografia de Raios X permitem observações precisas dos rearranjos es pontâneos e da cooperatividade que ocorrem na molécula de eritrocruorina (ROYER JR, W.E. et al, 1987), aqui ava liados por fotometria. Na Tabela 2, a cooperatividade - mostra-se de acordo com a literatura, com valores de "n" acima de 1.0 e interação heme-heme positiva (SANTUCCI, R. et al, 1984). De maneira geral, os valores de "n" em 50% de saturação (P50) aumentam cerca de uma unidade quan do comparados ao controle (eritrocruorina, amostra 1), o que pode ser interpretado como modificação na cooperati- vidade da molécula, ou seja, uma alteração na interação' do oxigênio com os grupamentos heme da eritrocruorina - quando em presença de outras proteínas.

Para estimar se a diminuição da afinidade da hemeproteína pelo oxigênio ocorreria sempre em presença de excesso de proteínas totais, utilizamos u ma amostra de eritrocruorina com albumina humana (figura 17) e outra amostra contendo eritrocruorina com albumina e IgG específica (figura 18). Ambas as curvas de oxige- nação deslocaram-se para a direita e revelaram diminui ção da afinidade da eritrocruorina pelo oxigênio, com va lores similares em P50 — respectivamente 5,649 e 5,623 torr. Pode-se sugerir que este efeito seja obtido por efetivar as

interações existentes entre as cadeias polipeptídicas da proteína respiratória em questão, semelhante ao que ocorre na hemoglobina humana. Recombinação de subunidades isoladas do tipo monomérica (cadeias  $\alpha$ ) ou tetramérica (cadeias  $\beta$ ) da hemoglobina humana, resulta em uma drástica diminuição da afinidade pelo oxigênio (ANTONINI, E. et al, 1965).

O potencial da interação de cooperatividade entre as numerosas subunidades de pigmentos respiratórios de alto peso molecular é extenso, existindo uma ampla expressão deste fenômeno. Na figura 19, o gráfico representativo das curvas de oxigenação da eritrocruorina em amostra contendo o fragmento papáinico - Fab de IgG específica confirma o padrão obtido com a molécula de IgG nativa e difere daquele obtido com proteínas totais. Neste mesmo gráfico observamos um gradativo aumento de afinidade pelo oxigênio, segundo aumento na concentração de Fab contida na amostra: estes valores variam de 5,88 até 5,01 torr em P50. Sugerimos que este desvio deva ocorrer devido à desestabilização da conformação deoxieritrocruorina, causada pela interação não-covalente específica do fragmento Fab com a superfície da molécula.

Torna-se complexa a avaliação - do sítio exato de ligação de proteínas específicas e de

proteínas totais na molécula de eritrocruorina, embora saibamos que proteínas tais como a albumina possuam propriedades de ligação ao grupo porfirínico, no soro de mamíferos (MULLER-EBERHARD, V. & MORGAN, W.T., 1975). O estudo comparativo junto a invertebrados permite, contudo, uma melhor compreensão dos fenômenos ligados às propriedades alostéricas de pigmentos respiratórios, bem como o entendimento da evolução destas proteínas.

As eritrocruorinas são distribuídas em todo o filo de invertebrados, e particularmente - entre alguns nematóides (TERWILLIGER, R.C., 1980). A alimentação dos nematóides parasitas varia muito: alguns alimentam-se de conteúdo intestinal de seu hospedeiro, - outros de muco, de elementos do tecido e de sangue. A digestão dos alimentos ingeridos é efetuada por enzimas que, no caso de sugadores de sangue, cindem a oxihemoglobina em hemoglobina e finalmente em hematina. O oxigênio assim obtido é utilizado pelo verme em seu metabolismo para combiná-lo com sua própria hemoglobina. Em certos casos, como nos ancilostomídeos, admite-se que o sangue por eles sugado seja mais importante como fonte de oxigênio do que de alimentação. De um modo geral, todavia, os nematóides são anaeróbios facultativos, porém - não obrigatórios. Obtêm a energia principalmente pelo desdobramento do glicogênio, porém na sua maioria utilizam-se do oxigênio livre em graus diferentes. Além de

enzimas que agem na fermentação da glicose (glicólise), - muitos deles possuem pigmentos respiratórios (PESSOA, S. B. 1982). O estudo das propriedades fisiológicas de nematóides na presença de anticorpos específicos, abriria a possibilidade do desenvolvimento de métodos profiláticos contra certas patologias causadas por estes parasitas, através do bloqueio de suas regiões imunodominantes comprometidas com a ligação de oxigênio.

CONCLUSÕES

1. O espectro característico da eritrocruorina de *G. paulistus* (OLIGOCHAETA; GLOSSOSCOLECIDADE), em ensaios de oxigenação, apresenta um pico máximo a 419 nm para a forma oxigenada e um pico a 428 nm para a deoxieritrocruorina.
2. Este comportamento é modificado pelo efeito de anti\_soro de coelhos, por IgG específica e por seus fragmentos papáinicos Fab.
3. O desvio para a direita do espectro (deoxieritrocruorina) demonstra que há aumento na afinidade da heme proteína pelo oxigênio, traduzido a partir do "plot de Hill".
4. Uma afinidade diminuída é observada quando grandes quantidades de proteínas totais são utilizadas.
5. Nenhuma diferença no espectro da deoxieritrocruorina foi detectada com eritrocruorina sozinha ou com eritrocruorina na presença de soro total de carneiro não imunizado.

RESUMO

Eritrocruorinas são proteínas - respiratórias responsáveis pelo transporte de oxigênio, - possuem peso molecular acima de  $3 \times 10^6$  e estão presentes na hemolinfa de anelídeos. O espectro característico da eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* em ensaios de Equilíbrio com o Oxigênio mostra a oxieritrocruorina com um pico máximo de absorção a 419 nm, e sua forma deoxigenada com um pico máximo a 428 nm. Este comportamento é modificado pelo efeito de antisoro de coelhos específicos, - co, por IgG específica e por fragmento Fab específicos, - revelando uma alteração do espectro de absorção da eri - trocruorina por um desvio para a esquerda das Curvas no "Plot de Hill". Este desvio demonstra uma afinidade aumentada da hemoproteína pelo oxigênio. Não foram observadas modificações do espectro da eritrocruorina sozinha ou na presença de soro de carneiro não imunizado. A con - centração de proteínas dos diferentes soros foi ajusta - da, na intenção de se obter quantidade similar de pro - teína. Por outro lado, uma diminuição na afinidade pe - lo oxigênio é observada quando são usadas grandes quanti - dades de proteínas totais do soro - talvez devido à inte - ração não específica de proteínas outras que não IgG, e - xistentes no soro total específico.

SUMMARY

Erythrocruorins are respiratory proteins responsible for the oxygen transport, having molecular weight over  $3 \times 10^6$ , present in the haemolymph of annelids. The characteristic spectrum of the erythrocruorin from *Glossoxolex paulistus* in a Oxygen Equilibrium assay shows the oxyerythrocruorin with a maximum absorption peak at 419 nm and the deoxygenated form with a maximum at 428 nm. This behavior is modified by the effect of a whole specific antiserum raised in rabbits, by specific IgG antibodies and by specific Fab fragments, showing an alteration of the erythrocruorin spectrum by a deviation to the left of the Hill Plot Curves. This deviation denotes an increasing affinity to the oxygen of the heme protein. No differences in the spectrum of the erythrocruorin were detected with erythrocruorin alone, or in the presence of whole serum of a non-immunized sheep. Protein concentration of the different sera were adjusted, in order to have a similar amount of protein. On the other hand, a decreased affinity to the oxygen is observed when larger amounts of the whole serum protein are used — perhaps due to non-specific interaction of non IgG molecules of the whole specific antiserum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONINI, E.; BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; WYMAN, J. & ROSSI-FANELLI, A. The properties of the isolated  $\alpha$  e  $\beta$  chains of human hemoglobin. III. Observations on the equilibria kinetics of the reactions with gases. J. Molec. Biol., 12: 375-384, 1965.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. Hsmoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands. Amsterdam, North Holland, 436, 1971.
- BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H.; ANASTASI, A. & WOOD, E.J. Isolation, characterization and Oxygen Equilibrium of an extracellular haemoglobin from *Eunice aphroditois*. Biochem. J., 159: 35-42, 1976.
- BENACERRAF, B.; OVARY, Z.; BLOCH, K.J. & FRANKLIN, E. C. Properties of guinea-pig 7 S antibodies. I - Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7 S antibodies. J. Exp. Med., 117: 937-949, 1963.
- BENESCH, R. & BENESCH, R.E. Organic phosphatases as regulators of oxygen release by haemoglobin. Nature, 221: 618-622, 1969.
- CARDILLO, F.; PAULA, E.; RENNEBECK, G.M.; MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. Erythrocrucorin-binding serum proteins. Manuscript in preparation.

- BENESCH, R.; MACDUFF, G. & BENESCH, R.E. Determination of Oxygen Equilibrium with a versatile new tonometer. Analyt. Biochem., 11: 81-87, 1965.
- CHARACHE, S. A manifestation of abnormal hemoglobins of man: altered oxygen affinity. Ann. New York Acad. Sci., 241: 449-455, 1974.
- CHIANCONE, E.; VECHINI, P.; FANELLI, M.R.R. & ANTONI NI, E. Studies on Erythrocrucorin. II. Dissociation of EarthWorm Erythrocrucorin. J. Mol. Biol., 70: 73-84, 1972.
- CHIANCONE, E.; BRENOVITZ, M.; ASCOLI, F.; BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. *Amphitrite ornata* erythrocrucorin.- I - Structural properties and characterization of subunit interactions. Biochim. Biophys. Acta, 623: 146-162, 1988.
- CHUNG, M.C.M. & ELLERTON, H.D. The physico-chemical and functional properties of extracellular respiratory haemoglobins and chlorocruorins. Prog. Biophys. Molec. Biol., 35: 53-102, 1979.
- COE, J.E. The immune response in the hamster - Definition of two 7S globulin classes: 7S  $\gamma$ 1 and 7S  $\gamma$ 2. J. Immunol., 100: 507-515, 1968.

- COSTA, M.C.P.; BONAFÉ, C.F.; MEIRELLES, N.C. & GALEM-BECK, F. Sedimentation coefficient and minimum - molecular weight of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (OLIGOCHAETA). Braz. J. Med. Biol. Res., 21: 115-118, 1988.
- CRAIK, C.S.; BUCKMAN, S.R.; BEYCHOK, S. O<sub>2</sub> binding properties of the product of the central exon of B globin gene. Nature, 291: 87-90, 1981.
- DICKERSON, R.E. Sequence and structure homologies in bacterial and Mammalian - type cytochromes. J. Mol. Biol., 57: 1-15, 1971.
- DITTEBRANDT, M. Application of the Weich Selbaum Buiuret Reagent to the determination of spinal fluid protein. Am. J. Clin. Path., 18: 439-443, 1948.
- DIXON, G.H. Mechanisms of protein evolution. Essays Biochem., 2: 147-204, 1966.
- EATON, J.W. Oxygen affinity and environmental adaptation. Ann. New York Acad. Sci., 241: 491-497, 1974.
- EDELSTEIN, S.J. Cooperative interactions of hemoglobin. Annu. Rev. Biochem., 44: 209-232, 1975.

ERLANGER, B.F. Some thoughts on the structural basis of internal imagery. Immunol. Today, 10: 151-152, 1989.

FAHEY, J.L.; WENDERLICH, J. & MISCHELL, R. The - immunoglobulins of mice. II - Two subclasses of mouse 7S globulins: gamma 2a and gamma 2b globulins. J. Exp. Med., 120: 243-251, 1964.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuber. Res., 7: 130-132, 1965.

GARLICK, R.L. & TERWILLIGER, R.C. The quaternary structure and Oxygen Equilibrium properties of the vascular - hemoglobin of the terebellid polichaete, *Thelepus crispus* Johnson. Comp. Biochem. Physiol., 51A:

GIARDINA, B.; CHIANCONE, E. & ANTONINI, E. Studies on erythrocrucorin. J. Mol. Biol., 93: 1-10, 1975.

GOODMAN, M.; MOORE, G.W. & MATSUDA, G. Darwinian evolution in the genealogy of haemoglobin. Nature, 253:603-608, 1975.

GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno chimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. Biochem. Biophys. Acta, 10: 193-194, 1953.

HENDRY, G.A.F. & JONES, O.T.G. Haems and chlorophylls:-  
comparison of function and formation. J. Med. Genetics,  
17: 1-14, 1980.

KEILIN, S. & HARTREE, E.F. Relationship between -  
hemoglobin and erythrocytes. Nature, 168: 266-269,  
1951.

KILMARTIN, J.V. The alkaline Bohr effect of human  
hemoglobin. Ann. New York Acad. Sci., 241: 465-471,  
1974.

KIM, Y.B.; BRADLEY, S.G. & WATSON, D.W. Ontogeny of  
the immune response. I - Development of Immunoglobulins  
in germ-free and conventional colostrum-deprived -  
piglets. J. Immunol., 97(1): 52-63, 1966a.

KOPPENHEFFER, T.L. & GINSBERG, S.M. A comparative -  
immunochemical study of hemoglobins from the earthworm  
and horseleech. Comp. Biochem. Physiol., 61A:97-100,  
1978.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during  
the Assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature,  
227: 680-685, 1970.

LEHMANN, H. & HUTSMANN, R.G. Man's haemoglobins. North-

-Holland Publishing Company-Amsterdam, Chapter 1: 1-  
-14, 1966.

LEHMANN, H. & ROMERO-HERRERA, A.E. Comparative structure  
of myoglobin: primates and tree-shrew. Ann. New York  
Acad. Sci., 241: 411-415, 1974.

LILJAS, A. & ROSSMANN, M.G. X-Ray studies of protein  
interactions. Ann. Rev. of Biochem., 43: 475-503,  
1974.

LOVO-FARAH, M.F. O Isotipo IgG de Artiodactilos. As I  
munoglobulinas G do Pecari brasileiro. Campinas, -  
1988. Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campi  
nas.

MAINES, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity,  
regulatory mechanisms, and clinical applications. The  
Faseb J., 2(10): 2557-2567, 1988.

MARGULIS, L. Early Life. Published by Jones and Bartlett  
Publishers, Inc.: "Evolution and Cells". 16 / "Life  
without oxygen", 41, 1984.

MARKS, D.H.; STEIN, E.A. & COOPER, E.L. Acid phosphatase  
changes associated with response to foreign tissue in  
the earthworm *Lumbricus terrestris*. Comp. Biochem.  
Physiol., 68A: 681-683, 1981.

MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; PAULA, E.; CARDILLO, F.; RENNEBECK, G.M.; MARANGONI, S. The effect of specific antibodies on the Oxygen Equilibrium of the Erythrocrucorin from *Glossoscolex paulistus* (OLIGOCHAETA, Glossoscolecidae). Submitted to Comp. Biochem. Physiol., 1989.

MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, A.R.; PAULA, E.; MARANGONI, S.; RENNEBECK, G.M. Erythrocrucorin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae): dissociation at alkaline pH and its ligand properties as revealed by chemical, immunochemical and electron microscopy studies. Comp. Biochem. Physiol., 88A(2): 377-379, 1987.

MEIRELLES, N.C.; OLIVEIRA, B.; PAULA, E. de; MARANGONI, S.; MARQUES, R.M.F. Erythrocrucorin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae): presence of disulfide bonds and their relation to ligand - properties. Comp. Biochem. Physiol., 82B: 203-205, 1985.

MEIRELLES, N.C.; PAULA, E.; GASPAR, J.O. Propriedades funcionais da hemoglobina extracelular do oligochaeta *Pherentima hawayana*. Anais do II Encontro Paulista de Fisiologia Comparada (IV Seminário Regional de Ecologia), São Carlos-SP, 1984.

- MESSERSCHMIDT, U.; WILHELM, P.; PILZ, I.; KAPP, O.H. & VINOGRADOV, S.N. The molecular size and shape of the extracellular hemoglobin of *Nephtys incisa*. Biochem. Biophys. Acta, 742: 366-373, 1983.
- MULLER-EBERHARD, U. & MORGAN, W.T. Porphyrin-binding proteins in serum. Ann. New York Acad. Sci., 244: 624-650, 1975.
- MURPHY, F.A.; OSEBOLD, J.W. & AOLUND, O. Physical heterogeneity of bovine j-globulins: characterization of  $\gamma$ M and  $\gamma$ G globulins. Arch. Biochem. Biophys., 112: 126-136, 1965.
- NOELKEN, M.E.; NELSON, A.C.; BUCKIL III, C.& E TANFORD, C. Gross Conformation of rabbit 7S immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. J. Biol. Chem., 240: 218-224, 1965.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. Summa Phytopathol., 1(1): 61-64, 1975.
- OLIVEIRA, B.; OSLER, A.G.; SIRAGANIAN, R.P. & SANDBERG, A.L. The biologic activities of guinea-pig antibodies. I - Separation of gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins and their participation in the allergic reaction of

- immediate types. J. Immunol., 104: 320-328, 1970.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reaction in gels. IV  
- Types of reactions in co-ordinated system of diffusion.  
Acta Path. Microbiol. Scand., 32: 231-240, 1953.
- PERUTZ, M.F. Regulation of the oxygen affinity of -  
hemoglobin: influence of structure of the globin on  
the heme iron. Ann. Rev. Biochem., 48: 327-386, 1979.
- POLIDORI, G.; MAINWARING, M.G. & VINOGRADOV, S.N. The  
effect of alkaline earth cations and of ionic strength  
on the dissociation of earthworm hemoglobin at alkaline  
pH. Comp. Biochem. Phys., 89A(4): 541-545, 1988.
- PORTER, R.R. The hydrolysis of rabbit gamma globulin  
and antibodies with crystalline papain. J. Biochem.,  
73: 119-126, 1959.
- POWERS, D.A. The molecular ecology of teleost fish -  
hemoglobins: strategies for adapting to changing  
environments. Ann. New York Acad. Sci., : 472-490,  
1974.
- REICHLIN, M.; UDEM, L. & RANNEY, H.M. The effect of  
specific antibody on the oxygen equilibrium of human  
hemoglobin. Biochem. Biophys. Acta, 175: 49-54, 1969.

- RIGGS, A. Factors in the evolution of hemoglobin - function. Feder. Proced., 35(10): 2115-2118, 1976.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human Myoglobin. Archs. Biochem. Biophys., 77: 478-491, 1958.
- ROSSI-FANELLI, M.R.R.; CHIANCONE, E.; VECCHINI, P. & ANTONINI, E. Studies on erythrocrucorin. 1 - Physicochemical properties of earthworm erythrocrucorin. Archs. Biochem. Biophys., 141: 278-283, 1970.
- ROYER JR, W.E.; HENDRICKSON, W.A. & LOVE, W.E. Crystals of *Lumbricus erythrocrucorin*. J. Mol. Biol., 197: 149-153, 1987.
- SANTUCCI, R.; CHIANCONE, E.; GIARDINA, B. Oxygen binding to *Octolasion complanatum* erythrocrucorin. Modulation of Homo and Heterotropic interactions by Cations. J. Mol. Biol., 179: 713-727, 1984.
- SELA, M.; GIVOL, D. & MOZES, E. Resolution of rabbit  $\gamma$  globulin into two fractions by chromatography on diethylaminoethyl-Sephadex. Biochem. Biophys. Acta, 78: 649-657, 1963.
- SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E. & MARZEL JR, J.V. Molecular

- weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrilamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm., 28(5): 815-820, 1967.
- STEIGEMANN, W. & WEBER, E. Structure of erythrocrucorin in different ligand states refined at 1.4Å<sup>0</sup> resolution. J. Mol. Biol., 127: 309-338, 1979.
- TERWILLIGER, R.C. Oxygen equilibria of the vascular and coelomic hemoglobins of the terebellid polychaete, *Pista pacifica*. Evidence for an oxygen transfer system. Comp. Biochem. Physiol., 48A: 745-755, 1974.
- TERWILLIGER, R.C. Structures of invertebrates hemoglobins. Am. Zool., 20(1): 53-67. 1980.
- WEBER, K. & OSBORN, M. The reability of molecular weight determination by duodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16): 4406-4412, 1969.
- WEBER, R.E. Functions of Invertebrate haemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. Amer. Zool., 20: 79-101, 1980.
- WILSON, A.C.; CARLSON, S.S.; WHITE, T.J. Biochemical Evolution. Ann. Rev. Biochem., 46: 573-639, 1977.

VINOGRADOV, S.N. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins: Erythrocrucorins and chlorocrucorins. Comp. Biochem. Physiol., 82B: 1-15, 1985.

WOOD, E.J. & MOSBY, L.J. & ROBINSON, M.S. Characterization of the Extracellular Haemoglobin of *Haemopsis sanguisuga* (L.). Biochem. J., 153: 589-596, 1976.

ZUCKERKANDL, E. The evolution of haemoglobin. Sci.Am., 212(5): 110-118, 1965.

#### REFERÊNCIA COMPLEMENTAR

PESSÔA, S.B. Parasitologia Médica. Ed. Guanabara Koogan. 1982, Capítulo 45: 492-506.