

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
HEMOGLOBINAS DE SKUA (*CATHARACTA
MACCORMICKI*)**

Gustavo Fraga Landini

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração: Genética e Evolução.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L257ce

Landini, Gustavo Fraga.

Caracterização estrutural e funcional de hemoglobinas de skua, *Catharacta maccormicki* / Gustavo Fraga Landini. -- São Carlos : UFSCar, 2003.

49 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2002.

1. Aves. 2. Aves - hemoglobina. 3. Aves antárticas. 4. Fosfatos intraeritrocitários. 5. Eletroforese. 6. Ave – migração. 7. Análise cromatográfica I. Título.

CDD: 598 (20^a)

Mestrando

Gustavo Fraga Landini

Orientador

Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes pelo incentivo durante todos estes anos em que fui seu orientado e por seu exemplo de pesquisador e amigo.

À Prof. Dra. Maria Luiza Barcellos Schwantes, pela sua amizade e pelas inúmeras contribuições para a elaboração deste e de outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Alfredo Di Vito Neto, pelo seu bom humor e sugestões ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo dos Santos, por suas contribuições ao trabalho.

À FAPESP (Proc. 99/06389-0) pelo apoio financeiro desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pela gentileza em ceder água Milli-Q para nossos experimentos.

A todas as pessoas do laboratório de Evolução Molecular: Elane, Hugo, Marc, Flávia, Regina, Huita, Elke, Simoni, Paulo, Fernando, Fabiana, pelo auxílio, companheirismo e amizade.

À Rose, Regiane e Tatiane da Secretaria da Pós-Graduação, pela inúmera ajuda prestada durante todo este tempo.

À Leila, pelos vários “galhos quebrados” durante a execução deste trabalho.

Ao meu pai, que certamente estava ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, irmãos e família , pelo apoio, incentivo e carinho.

À Adriana, amiga, companheira e grande amor de minha vida.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente, nos ajudaram a completar mais uma fase de nossas vidas.

Agradeço a Deus por ter me dado força a prosseguir nos momentos mais difíceis.

“Há homens que lutam um dia, e são bons;
Há outros que lutam um ano, e são melhores;
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;
Porém há os que lutam toda a vida
Estes são os imprescindíveis”.

“Bertold Brecht”

ABREVIATURAS

Bis-Tris	Bis (2 hidroxil metil) amino tris (hidroxil metil) metano
2,3 DPG	2,3 Difosfoglicerato
Hb	Hemoglobina
IP6 ou IHP	Inositol hexafosfato
IP5	Inositol pentafosfato
L	Litro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
n	Coefficiente de Hill
nm	Nanômetros
P_{50}	Pressão de O_2 para saturar 50% da hemoglobina
Tris	Tris hidroxil metil amino metano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Foto de exemplar adulto de <i>Catharacta maccormicki</i>	8
Figura 4.1	Foto de eletroforese em gel de amido.....	26
Figura 4.2	Comportamento funcional das hemoglobinas de <i>C. maccormicki</i> em função do pH na presença e ausência de fosfatos.....	29
Figura 4.3	Perfil cromatográfico de skuas coletadas no verão.....	31
Figura 4.4	Perfil cromatográfico de fosfatos de skuas coletadas no inverno.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções de coloração e lavagem em gel de amido.....	15
Tabela 2. Tampões utilizados em experimentos de equilíbrio de oxigenação.....	18
Tabela 3. Valores obtidos de nucleotídeos, inverno e verão.....	33
Tabela 4. Concentrações de inositol em μM de P / mL de RBC.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura	2
1.2 Função	4
1.3 Aves	5
1.4 Hemoglobinas de aves	5
1.4 <i>Catharacta maccormicki</i> (skuas)	6
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material	11
3.1.1 Extrato de fosfatos intraeritrocitários	11
3.1.2 Solução de hemoglobina	12
3.2 Métodos	12
3.2.1 Eletroforese	12
3.2.2 Eletroforese em gel de amido	13
3.3.1 Filtração em coluna Sephadex G-25	14
3.3.2 Espectrofotometria	16
3.3.3 Equilíbrio de oxigênio	16
3.3.4 Cromatografia	20
3.3.4.1 Dosagem de fosfatos orgânicos intraeritrocitários (não inositóis)	20
3.3.4.2 Inositóis	21
3.3.4.3 Dosagem de 2,3DPG intraeritrocitário	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Eletroforeses	25
4.2 Equilíbrio de oxigenação	25
4.2.1 <i>Stripped</i>	25
4.2.2 Adição de fosfatos	27
4.3 Dosagem de fosfatos orgânicos intraeritrocitários	30

4.3.1 Dosagem de nucleotídeos	30
4.3.2 Concentração de inosíóis	33
4.3.3 Dosagens de 2,3DPG intraeritrocitário	34
5. DISCUSSÃO	36
5.1 Eletroforeses	36
5.2 Equilíbrio de oxigenação <i>stripped</i>	37
5.3 Dosagem de fosfatos	40
6. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

Foram estudadas amostras de hemoglobinas de *Catharacta maccormicki*, ou skua, uma espécie de ave antártica, coletadas no inverno e no verão. Foram analisados: o padrão eletroforético das Hb em gel de amido; as afinidades hemoglobina-oxigênio em sangue total e na forma *stripped*; a influência de fosfatos orgânicos capazes de alterar essa afinidade e os níveis destes fosfatos intraeritrocitários. Não foram encontradas, em sangue, diferenças na afinidade Hb-O₂ para amostras coletadas no inverno e no verão, o que nos leva a crer, a princípio, que a migração (inverno) não seja um fator determinante para modificações funcionais a este nível. A amplitude de efeito Bohr para as duas situações foi praticamente a mesma, $\phi = -2,1$, indicando efeito Bohr normal para ambas. Em eletroforese, os 5 exemplares coletados, mostraram dois componentes, não havendo, portanto indicações de variação intra-específica. Em hemoglobina *stripped* os valores de P50 são inferiores aos obtidos para equilíbrio em sangue total, evidenciando uma maior afinidade da hemoglobina ao oxigênio na ausência de possíveis moduladores. O efeito Bohr do lado alcalino (pH 7 – 8) foi normal, amplitude $\phi = -1,9$ e do lado ácido (pH 6 – 7), reverso, característica de hemoglobinas de aves. Também testamos a influência dos fosfatos orgânicos que podem alterar esta afinidade. Os moduladores testados foram o 2,3-difosfo glicerato (2,3 DPG) e o inositol hexafosfato (IHP) que foram adicionados à hemoglobina *stripped*. Observamos modulação negativa da hemoglobina com a adição destes, sendo o do IHP mais efetivo que o 2,3DPG. Em animais coletados no inverno, encontramos apenas a presença de GTP em seus eritrócitos. Porém, animais do verão, GTP foi ausente e ATP presente. Observamos não existir diferenças entre a concentração dos tipos de inositóis encontrados para as duas situações, sendo que encontramos, tanto em amostra de inverno quanto em de verão, a presença de IP5 e IP6 conjuntamente, e em quantidades relativamente semelhantes. 2,3DPG intraeritrocitário não foi encontrado em qualquer amostra.

ABSTRACT

Hemoglobin samples of *Catharacta maccormiki* (Skua), an Antarctic bird, collected in winter and in summer were studied. Starch gel electrophoretic pattern hemoglobin oxygen affinities on blood and stripped hemoglobin; influence of organic phosphates that may change affinity and level of those intra-erythrocytic phosphates were analyzed. No differences were found in Hb-O₂ affinities for samples collected in winter and in summer, which leads to believe that migration (Winter) is not a factor for the oxygen affinities in blood. Bohr effect for both situations was practically the same ($\Phi = -2,1$), indicating normal Bohr effect. The 5 samples show a electrophoretic pattern of two components, so, no evidence of intra-specific variation was found. For the stripped hemoglobin the P50 values were inferior to the ones obtained for whole blood, showing a higher affinity for the hemoglobin to oxygen in the absence of possible modulators. The Bohr effect in the alkaline side (pH 7 – 8) was normal ($\Phi = -1,9$), and in the acid side it was reverse, characteristic of birds hemoglobin. The influence of organic phosphates that could affect oxygen affinity was also tested. 2,3-diphosphoglycerate (2,3DPG) and inositol hexaphosphate (IHP) were added to the stripped hemoglobin in order to test them as modulators. Negative hemoglobin oxygen affinity modulation was observed after addition of both phosphates. IHP is more effective than 2,3DPG. For animal collected during winter only the GTP was present in its erythrocytes, while the summer ones ATP was found instead of GTP. No differences was found in the concentration of inositol penta and hexaphosphphate in samples collected in the two seasons. No 2,3DPG were found in any sample.

1. INTRODUÇÃO

O processo de evolução biológica consiste de modificações na constituição genética dos organismos. Cada indivíduo experimenta, durante a vida, diversas mudanças em sua morfologia, fisiologia, comportamento, etc. Estas mudanças não permanecem, muito pelo contrário, elas desaparecem junto com o organismo. Mudanças no material genético, entretanto, são transmitidas de um indivíduo ao seu descendente e, deste modo acumuladas a cada geração. A grande diversidade de organismos vivos é o resultado destas mudanças genéticas acumuladas (AYALA, 1978).

A hemoglobina é a principal proteína situada na interface organismo/ambiente, sendo responsável pelo transporte do oxigênio do ambiente aos tecidos. Devido a este fato, o estudo funcional desta proteína e do tecido no qual ocorre, o sangue, é de grande interesse, uma vez que o complexo respiratório é um excelente modelo para o estudo de estratégias adaptativas à mudanças ambientais (POWERS, 1980).

A distribuição filogenética da hemoglobina é muito ampla sendo encontrada tanto em vertebrados, quanto em invertebrados (gastrópodes, artrópodes, anelídeos e equinodermas). Além destes organismos, algumas leguminosas, fungos (*Penicillium notatum* e *Neurospora crassa*), leveduras (*Saccharomyces sp.*), protozoários (*Paramecium caudatum*) e bactérias (GRATZER & ALLISON, 1960; SCHIMIDT-NIELSEN, 1983; ECKERT & RANDALL, 1988; GLOMSKI & TAMBURLIN, 1989) podem também possuir hemoglobina.

1.1 Estrutura

PERUTZ, em 1936, começou a elucidar a estrutura tridimensional da molécula de hemoglobina através de difração de raio X. Em 1959, ele obteve uma imagem de densidade eletrônica de baixa resolução da oxi-hemoglobina de cavalo, seguida, anos depois, de mapas de alta resolução de oxi e desoxi-hemoglobina, tanto eqüina quanto humana (STRYER, 1992).

A principal função da hemoglobina, de transportar oxigênio para os tecidos, está intimamente relacionada com sua estrutura quaternária. A hemoglobina é uma proteína conjugada, constituída de uma parte protéica, a globina, e de um grupo prostético, o heme, que é um complexo ferro-porfirina IX (WINTROBE, 1974), com um peso molecular de 64.500 dáltons.

A porção protéica formada pelas globinas, em função da composição de aminoácidos, é a responsável pelas diferenças encontradas nas propriedades funcionais das hemoglobinas. Nos vertebrados, a hemoglobina aparece constituída por quatro cadeias de globina: duas α e duas β , muito semelhantes entre si, porém com algumas pequenas diferenças nas suas seqüências primárias e no número de resíduos de aminoácidos. Assim, na hemoglobina humana, as cadeias α e ζ contêm 141 aminoácidos, enquanto que as β , γ e δ , 146 (ANTONINI & BRUNORI, 1974; PERUTZ, 1982). A hemoglobina A1 de adultos é constituída por duas cadeias α e duas β , cada uma delas com um grupo heme situado no interior de uma bolsa constituída por resíduos hidrofóbicos, que asseguram a manutenção do ferro hemínico sob a forma ferrosa, indispensável à ligação do oxigênio pelo heme. O fundamental desta ligação é o de ser reversível, permitindo a hemoglobina liberar, em nível tecidual, o oxigênio ligado a ela em nível pulmonar

(ANTONINI & BRUNORI, 1971). As quatro cadeias polipeptídicas encontram-se num arranjo tetraédrico irregular. Cada subunidade α está em contato com ambas as β , porém existe uma baixa interação entre as duas cadeias α , ou, entre as duas β .

A porção não proteica da molécula de hemoglobina é formada pelos grupos heme localizados em fendas próximas a face externa da molécula. O grupo heme é constituído de uma parte orgânica e de um átomo de ferro. A parte orgânica, protoporfirina, é constituída por quatro anéis pirrólicos aos quais são ligados por pontes metâmicas, formando um anel tetrapirrólico. Quatro radicais metil, dois vinil e dois de propionato estão ligados ao anel tetrapirrólico. O átomo de ferro se liga a quatro nitrogênios, no centro do anel da protoporfirina. Este átomo se mantém no estado ferroso (Fe^{+2}), durante os processos de oxigenação e de desoxigenação, a fim de manter suas propriedades funcionais. A oxidação do ferro (Fe^{+2} a Fe^{+3}) resulta na formação da meta-hemoglobina que a torna incapaz de realizar a ligação com o O_2 , de modo reversível. Nos eritrócitos, foi detectado um sistema enzimático capaz de reduzir a pequena quantidade de meta-hemoglobina formada *in vivo*, para a forma ferrosa (Fe^{+2}) (KEILIN & HARTREE, 1951; BRAUNITZER et al., 1961; LEE & SMITH, 1965; KARPLUS, 1982; PERUTZ, 1982; DICKERSON & GEIS, 1983).

A capacidade da hemoglobina de realizar uma reação reversível com o O_2 molecular reside no fato dela conter esse grupo heme. A reversibilidade da ligação do oxigênio molecular é a base da função fisiológica da Hb -- o transporte desse gás do meio externo para os tecidos.

1.2 Função

A hemoglobina é caracterizada, funcionalmente, pela sua afinidade ao oxigênio, dada através de seu P_{50} - pressão de O_2 necessária para saturar 50% dessa molécula com esse gás. Outra característica é sua cooperatividade, dada pelo coeficiente de Hill, n , (quando $n > 1$, a oxigenação de um grupo heme acelera a dos demais na mesma molécula).

A forma sigmóide da curva de equilíbrio de ligantes em hemoglobinas reflete a presença de interações heme-heme. O termo “interações heme-heme”, é puramente descritivo, e não implica em algo sobre o mecanismo pelo qual o efeito é realizado. Genericamente, o valor de n , na equação de Hill, é usado como índice empírico da interação heme-heme, no equilíbrio de Hb com ligantes.

Efetores alostéricos modificam a curva de afinidade da hemoglobina em relação ao oxigênio para regular sua função. Como exemplo temos o efeito Bohr, descrito por Bohr et al., (1904), que é a influência do pH (íons H^+) sobre a afinidade Hb- O_2 .

A função da hemoglobina parece ser adaptada às necessidades metabólicas e ambientais do animal. A adaptação corresponde às variações da capacidade de transporte de oxigênio e, para tanto, o organismo lança mão de maior ou menor produção de hemoglobina ou ação de efetores que melhoram o transporte de oxigênio (RIGGS, 1976).

Alguns grupos de animais apresentam hemoglobinas insensíveis a moduladores, tais como gatos, peixes-bruxa, bovinos e ovinos. Segundo FRONTICELLI (1990), os íons cloro seriam responsáveis pela modulação das hemoglobinas de bovinos, embora PERUTZ e FERMI (1993) afirmem que o sítio

de ligação da hemoglobina ao cloro, não seja, nos bovinos e ovinos, diferente dos demais mamíferos.

1.3 Aves

As aves constituem a maior classe de vertebrados terrestres (aproximadamente 8.700 espécies) e possuem a capacidade de moverem-se no ar, o mais difícil de todos os meios. São animais ativos e sua capacidade de voar é a característica que torna este fato mais evidente.

A evolução da endotermia permite às aves manterem-se ativas em grandes amplitudes de temperaturas ambientais e no vôo, possibilitando uma grande mobilidade e permitindo melhores oportunidades na procura de alimento, escape de predadores e possibilidade de migração, aparentemente, fatores determinantes no sucesso deste grupo (VILLEE et al., 1988). A maioria das características anatômicas das aves pode estar relacionada, direta ou indiretamente, à endotermia e ao vôo.

1.4 Hemoglobinas de aves

As hemoglobinas de aves, de um modo geral, possuem baixa afinidade ao oxigênio, com valores de P50 situando-se entre 40 e 50 mm Hg, em pH fisiológico. A baixa afinidade promove um descarregamento mais eficiente do oxigênio, o que é benéfico aos animais que possuem temperatura corpórea e atividade metabólica altas (JOHANSEN & LENFANT, 1972).

As aves adultas diferem de outros vertebrados por não possuírem 2,3 difosfoglicerato (BPG), mas sim, inositol pentafofato (IP5) como maior composto fosfatado orgânico (BARTLETT, 1980; 1982c; BARTLETT & BORGESE, 1976).

Esse exerce a mesma influência na ligação Hb-O₂ que o DPG em mamíferos, nas soluções de hemoglobina, de tal forma que a hemoglobina *stripped* de galinha e de mamíferos possuem, aproximadamente, as mesmas afinidades ao oxigênio.

A Hb *stripped* de aves, em presença de uma concentração equimolar de BPG e IP5, mostra que o IP5 é mais eficiente que o BPG na diminuição da afinidade das hemoglobinas ao oxigênio (JOHANSEN & LENFANT, 1972). RIEIRA et al. (1991) também demonstraram que o IP5, em concentrações fisiológicas, é o modulador primário da função da hemoglobina em codorniz.

O IP5 é um poderoso efetor alostérico negativo da hemoglobina diminuindo a sua afinidade pelo oxigênio. Em consequência disto, vários trabalhos têm demonstrado que o IP5 pode servir como um ajuste para a adaptação a hipóxia. Animais sujeitos a grandes altitudes possuem maior afinidade do sangue ao oxigênio do que seus relacionados vivendo em locais de baixa altitude (BARTELS et al., 1963; BULLARD et al., 1966; CHIODI, 1971).

1.4 *Catharacta maccormicki* (skuas)

As skuas são caracterizadas, principalmente, pelo fato de serem aves que migram para locais mais quentes em decorrência do início do inverno antártico. Ao saírem da Antártida, podem migrar para a América do Sul ou para o sul do continente australiano. Retornam à Antártida quando as condições estão mais propícias para reprodução e posterior cuidados e alimentação da prole. Após a postura de seus ovos, entre novembro e dezembro, ocorre uma pequena incubação de aproximadamente 30 dias, ao qual eclode um novo filhote. Mesmo com o intenso cuidado por parte parental (espécies nidícolas), predadores atacam seus ovos e a taxa de sobrevivência decresce muito nesta fase. Durante os meses

quentes e, na presença dos filhotes, as skuas predam vorazmente ovos e filhotes de pinguins. Outras espécies de skuas se alimentam de peixes e também de krill, um microcrustáceo.

A espécie em questão é bastante sociável, mas tanto pode viver em pequenos grupos como solitárias.

A skua, *Catharacta maccormicki* ou gaivota rapineira, (Fig. 1.1) é uma ave característica da Antártida. Possui bico forte em forma de gancho e plumagem escura. Essas aves são bastante agressivas e defendem seu território contra todos os invasores, inclusive o homem, lançando-se em vôo rasante sobre ele. Possuem uma atração especial por ovos e pequenos filhotes de pingüins.

As skuas vivem em casais e seus ninhos são covas construídas nos musgos, onde põem de um a dois ovos de um verde cinza-oliva com manchas escuras. Seus filhotes são de cor marrom acinzentado claro. Uma característica interessante dessas aves é que elas podem migrar também para o ártico, durante o inverno antártico. Em 1979, uma skua polar, anilhada para estudo, próxima à estação americana Palmer, foi encontrada seis meses depois por esquimós na Groenlândia, tendo percorrido 14 mil quilômetros.



Figura 1.1 Exemplar adulto de Skua, *Catharacta maccormicki*.

Alfredo Di Vito Neto, em seu projeto financiado pelo CNPq em cooperação com o PROANTAR intitulado “Estresse Migratório em Aves Antárticas”, verificou em seus experimentos, ausência de diferenças na afinidade Hb-O₂, em sangue total, entre skuas coletadas no final do inverno (Outubro) e final do verão (Fevereiro).

Diferenças na afinidade Hb-O₂ em sangue total, foram encontradas em *Pygoscelis antarctica* (pinguins), em dois períodos distintos de coleta, inverno e verão. É possível que estas diferenças encontradas sejam devidas a alterações nos níveis de moduladores decorrentes de migrações sazonais a que estes animais estão submetidos (VITO NETO, SANTOS & SCHWANTES, 1998 - Relatório ao CNPq).

2. OBJETIVOS

Como parte de um projeto mais amplo que pretende estudar algumas espécies de aves que habitam o continente antártico, no início e no final da estação de procriação (Outubro e Fevereiro, respectivamente), nosso objetivo principal foi o de comparar as possíveis adaptações metabólicas ao estresse migratório em decorrência das condições ambientais extremas que estas aves estão sujeitas.

A partir dos dados sobre equilíbrio de oxigenação em sangue já obtidos por VITO NETO et al., (1998), foram realizadas:

1. Caracterização eletroforética das hemoglobinas de *C. maccormicki*;
2. Análises quantitativa e qualitativa de fosfatos orgânicos intraeritrocitários;
3. Caracterização das propriedades funcionais das hemoglobinas purificadas em relação à sua afinidade ao oxigênio e
4. Determinação do efeito da modulação da afinidade Hb-O₂ por parte do IHP (inositol hexafosfato), 2,3DPG (difosfoglicerato) e íons cloro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Neste projeto estudamos a espécie antártica *Catharacta maccormicki*, também conhecida por skua. As amostras de sangue foram coletadas por Alfredo de Vito Neto e Marcelo dos Santos, nas excursões realizadas na Antártida em 1997, na Baía do Almirantado, num projeto CNPq/PROANTAR. Foram realizadas duas delas, uma em Outubro (final do inverno) e outra em Fevereiro (final do verão), para tentar verificar o efeito no metabolismo em decorrência do estresse migratório a que algumas espécies estão submetidas.

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia maior da asa e coletados em tubos heparinizados do tipo vacutainer.

3.1.1 Extrato de fosfatos intraeritrocitários

Das amostras de sangue destinadas ao estudo de fosfatos intraeritrocitários, foram determinados o volume e o hematócrito.

Dessas amostras, descartou-se o plasma e adicionou-se em seguida ácido perclórico 7% para ocorrer a lise e a liberação dos fosfatos eritrocitários (BARTLETT, 1959). Após, centrifugou-se a amostra a 3500g numa centrífuga **FANEN** durante cinco minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio (GREANEY & POWERS, 1978). O processo foi repetido três vezes para a garantia da extração total dos fosfatos.

A solução de ácido perclórico, contendo os fosfatos intraeritrocitários, foi neutralizada com KOH 6M e a seguir, congelada no local de coleta e em seguida estocada a - 20°C. De acordo com a metodologia descrita, a extração dos fosfatos tem que ser realizada com o sangue recém retirado do animal, sendo este

procedimento não operado por nós, mas sim na estação da baía do Almirantado, na Antártida, pelos dois pesquisadores anteriormente citados.

3.1.2 Solução de hemoglobina

O sangue, obtido como descrito em 3.1, foi lavado com solução de NaCl 0,9% (solução fisiológica), centrifugado a 1.500 rpm (1050 g) numa **Centrífuga Fanen**, por quatro minutos, repetindo o processo por três vezes consecutivas, para se retirar ao máximo, o plasma sangüíneo. Após este procedimento, todo o precipitado (eritrócitos) foi congelado para experimentos posteriores.

No laboratório da UFSCar, foi acrescentado a cada volume de amostra, um volume de solução hemolisante (Tris-HCl pH 8,0; 0,02M) e, para uma hemólise mais efetiva, foram congeladas e descongeladas por três vezes consecutivas, sendo levadas para centrifugação a 12.100 g (10.000 rpm) numa centrífuga **Sorvall RC5B**, a 4°C, para eliminação do estroma. O sobrenadante (hemolisado) foi utilizado para eletroforese, experimentos de equilíbrio de oxigenação e efeito de fosfatos intraeritrocitários.

3.2 Métodos

3.2.1 Eletroforese

As proteínas diferem em conteúdo e seqüência de aminoácidos, e num dado pH, a sua carga líquida também é diferente. A eletroforese é um método que se utiliza desta diferença para, em um dado campo elétrico, separar as proteínas. Esta separação é feita tanto pela carga elétrica total da proteína, como também pelas suas dimensões, pois a substância de que é feito o gel (amido ou poliacrilamida) possui poros que impõem uma resistência mecânica à passagem

das moléculas, isto é, ocorre uma filtração que é realizada segundo o tamanho e o formato das moléculas.

3.2.2 Eletroforese em gel de amido

As eletroforeses foram realizadas com o intuito de se caracterizar os componentes hemoglobínicos da espécie em estudo. A metodologia utilizada foi a descrita por SMITHIES (1955, 1959) numa concentração de 13% de amido de milho, preparado segundo VAL et al. (1981).

O sistema tampão do gel foi o Tris-Borato-EDTA ácido 0,036M, pH 8,6. Nas cubas, foi utilizado o Borato 0,35M, pH 8,6 acertado com NaOH 50% (SMITHIES, et al., 1966).

A cocção foi realizada num bico de gás, em um balão de fundo redondo, com agitação contínua, até o aparecimento das primeiras bolhas de fervura no fundo do frasco, momento em que foi adicionado 2ml de KCN 0,1M pH 8,0. Após a deaeração, o gel foi colocado em uma placa de acrílico, previamente untada com óleo mineral para facilitar sua retirada. Após o resfriamento do gel até 4°C, a aplicação das amostras foi feita inserindo-se pequenos retângulos de papel WHATMAN 3MM (1,0 x 0,5 cm) em cortes transversais previamente feitos a uma distância de 7 centímetros da extremidade catódica.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a 4°C com diferença de potencial de 5V/cm durante seis horas, utilizando uma fonte de tensão Permatron. Após a migração, o gel foi seccionado no sentido horizontal. A primeira metade foi corada com Amido Black 10B, para proteínas totais, e a outra corada com Benzidina, específica para proteínas com atividade peroxidásica (tabela 1). Após serem

lavados, os géis foram transparentizados entre duas folhas de papel celofane, o que permite uma melhor conservação para posterior análise.

3.3.1 Filtração em coluna Sephadex G-25

A filtração em coluna de Sephadex permite a obtenção de uma solução de hemoglobina livre de moléculas contaminantes, principalmente de fosfatos eritrocitários. Para redução da metahemoglobina, geralmente presente quando a amostra é congelada, a filtração foi realizada na presença de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$). A hemoglobina elui rapidamente pela coluna e o ditionito, ligado à resina, a transforma em desoxihemoglobina (Petersen et al., 1987). A solução de hemoglobina ao sair, entra em contato com o ar atmosférico, oxigenando-se por completo e conservando o ferro reduzido.

A resina foi empacotada em uma coluna de 35 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro interno e equilibrada numa solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8,0. A filtração foi realizada em câmara fria a 4°C.

A amostra ainda foi passada por uma coluna com resina aniônica/catiônica, Amberlite MB3.

Tabela 1. Soluções de coloração e lavagem em gel de amido.

AMIDO BLACK 10B	BENZIDINA
Solução saturada de amido black	Benzidina 1 g
Metanol 1 volume	Nitroprussiato de Na 1 cristal
Água destilada 1 volume	Metanol 75 ml

SOLUÇÕES DE LAVAGEM

AMIDO BLACK 10 B	BENZIDINA
Ácido acético 0,2 volumes	Éter 1 volume
Metanol 1 volume	Metanol 2 volumes
Água destilada 1 volume	Ácido acético (20ml) para abaixar pH e H₂O₂ 20V (10ml)

3.3.2 Espectrofotometria

A análise da solução de hemoglobina *stripped* foi verificada pela varredura entre 600 e 500 nm realizadas num espectrofotômetro modelo **HP UV- Vis G1107A**. As confirmações da redução da metahemoglobina foram realizadas de acordo com os coeficientes de extinção dos derivados ferrosos, segundo ANTONINI & BRUNORI (1971).

3.3.3 Equilíbrio de oxigênio

As medidas de afinidade ao oxigênio foram realizadas pelo método espectrofotométrico descrito por RIGGS & WOLBACH (1956). Trata-se de um método que se utiliza das mudanças espectrais que ocorrem na faixa da luz visível durante a passagem do estado desoxigenado para o oxigenado.

De acordo com o grau de oxigenação da molécula, a hemoglobina expõe diferentemente os átomos de ferro de seus grupos tetrapirrólicos (ANTONINI & BRUNORI, 1971; VILLELA, 1979). Hemoglobinas com taxas diferentes de oxigenação possuem diferentes conformações espaciais apresentando diferentes espectros de absorção. Através desses espectros diferenciais pode-se correlacionar pressão de oxigênio e taxa de oxigenação da hemoglobina.

Primeiramente, foi determinada a diluição necessária da hemoglobina para a obtenção de um pico de absorção máxima de 0,85. Para tanto, a amostra foi diluída 60X e lida em absorbância 580 nm, assim determinando-se o volume de solução de hemoglobina para cada tonômetro pela fórmula:

$$v = \frac{0,85 \times 3}{L \times 60}$$

onde:

v = volume de hemoglobina para os tonômetros

3 = volume da cubeta dos tonômetros

0,85 = leitura da absorbância em 580nm

L = leitura da concentração da hemoglobina em 580nm

60 = diluição

A partir deste cálculo, foi determinado o volume de amostra, o volume do tampão e da água destilada, num total de 3ml para cada tonômetro, em pHs pré-determinados (Tabela 2).

A partir daí, a amostra de hemoglobina foi desoxigenada dentro de um tonômetro, submetendo-a primeiramente a vácuo e em seguida a injeções de nitrogênio, alternadamente, equilibrando o vácuo com a solução de Hb num banho rotativo. Em seguida um espectro de absorção da desoxihemoglobina foi traçado entre 500 e 600nm.

Após a primeira curva, foram injetados quantidades conhecidas e crescentes de ar e traçados novos espectros, e após o mínimo de quatro injeções, o tonômetro foi exposto à pressão de O₂ ambiente aí então foi traçado o espectro final (100% oxigenada). Ao final, o pH resultante da amostra em cada tonômetro foi anotado.

pH	Sal	Molaridade
7,0	Bis-Tris Cl ⁻	0,1
7,2	Bis-Tris Cl ⁻	0,1
7,4	Bis-Tris Cl ⁻	0,1
7,6	Tris Cl ⁻	0,1
7,8	Tris Cl ⁻	0,1
8,0	Tris Cl ⁻	0,1
8,2	Tris Cl ⁻	0,1
8,4	Tris Cl ⁻	0,1
8,6	Tris Cl ⁻	0,1
8,8	Tris Cl ⁻	0,1
9,0	Tris Cl ⁻	0,1

Tabela 2 - Tampões utilizados nos experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina *stripped* de *Catharacta maccormicki*.

A pressão de O₂ para cada oxigenação parcial da hemoglobina é dada pela fórmula:

$$PO_2 = R \times V \quad , \text{onde:}$$

PO₂ = pressão de O₂ no interior do tonômetro

V = volume de ar injetado

R = constante dada pela fórmula:

$$R = \frac{Tb / Ta \{0,21 [Pbc - (PVxUR)]\}}{Vt - Va}$$

onde:

Tb = temperatura do banho em K

Ta = temperatura do ambiente em K

Pbc = pressão barométrica corrigida

PV = pressão de vapor de água

UR = umidade relativa do ar

Vt = volume do tonômetro

Va = volume de amostra colocada no tonômetro

Y = saturação parcial da hemoglobina

Um gráfico de log PO₂ x log Y/1-Y foi feito para cada experimento, através do qual determinamos o valor de log P50 e o coeficiente de Hill (*n*) pela declividade da reta obtida. Como as curvas foram feitas em diferentes pHs, foi traçada a curva final de efeito Bohr ($\Phi = \Delta \log P50 / \Delta pH$).

Utilizando-se da mesma metodologia descrita acima tentamos verificar como alguns compostos orgânicos fosfatados poderiam influenciar a afinidade da hemoglobina ao oxigênio. IHP (em lugar de IP5, por este ser excessivamente caro) e 2,3DPG foram os fosfatos orgânicos (moduladores) testados em uma relação molar de 1:8 (Hb:modulador). O volume de solução de moduladores necessários para gerar esta relação molar foi calculado pela fórmula:

$$\frac{mM[P] \times \frac{vol.[P]}{vol.amostra}}{\frac{D577}{4}} = 8$$

onde:

mM de [P] = molaridade da solução de IP5 ou 2,3DPG

vol. de [P] = volume de solução de fosfato orgânico para gerar a relação 1:8

4 = subunidade por tetrâmero de hemoglobina

8 = relação efetor/tetrâmero de Hb desejada

D = 0,85/14,6

O volume do efetor, assim calculado, foi adicionado ao tonômetro juntamente com as demais substâncias mantendo-se o volume final de 3ml.

3.3.4 Cromatografia

O princípio básico da cromatografia de troca iônica é a ligação de moléculas de carga contrária a da resina. Através da passagem de um gradiente de eluente (pH ou salino), promove-se uma troca seletiva das moléculas aprisionadas.

3.3.4.1 Dosagem de fosfatos orgânicos intraeritrocitários (não inositolis)

Para a análise dos nucleotídeos, extraídos dos eritrócitos, foi utilizada uma coluna cromatográfica fabricada por nós, com a resina Q-Sepharose *Fast Flow* (trocadora iônica forte). A referida coluna, foi confeccionada a partir da colagem de duas seringas plásticas de 3mL cada. As dimensões internas da coluna foram de 11cm de comprimento por 1cm de diâmetro. Foi usado o controlador do **Fast Protein Liquid Chromatography** (FPLC) da Pharmacia LKB.

O sistema de tampões utilizados foi o Trietanolamina (TEA) 20mM, pH 7,5 (1,35ml de TEA em 500ml de água milli-Q - pH acertado com HCl 1N), com gradiente salino de 0 a 1,0 M de KCl de acordo com BARTLETT (1978a).

Os pontos de eluição para cada nucleotídeo da curva padrão (AMP, ADP, ATP, GTP) foram determinados através da aplicação, primeiramente, de cada substância isolada, para localizarmos onde cada um destes era eluído. Em seguida, aplicávamos uma mistura de todos (com um volume final de 50 μ L), e então seguíamos a eluição dos mesmos no ultravioleta em 254nm.

O extrato de fosfato de cada condição (Outubro e Fevereiro) foi centrifugado a 1500g por cinco minutos, e o sobrenadante aplicado na coluna, sendo em média, 10 μ L de amostra. Os resultados obtidos foram então comparados ao padrão anteriormente determinado.

3.3.4.2 Inositóis

A 2^a metodologia que adotamos foi a descrita por BARTLETT (1959). Trata-se de uma cromatografia de troca iônica (aniônica) que baseia-se no aprisionamento eletrostático de moléculas com carga contrária à da resina. Através de uma passagem de um gradiente de eluente, promove-se uma troca seletiva das moléculas aprisionadas.

Para a quantificação dos inositóis intraeritrocitários, utilizamos a mesma resina do experimento anterior, porém, o novo gradiente teve de ser alterado para que ocorresse o desprendimento total de inositóis e sua posterior separação mais eficiente.

Assim, a partir da amostra previamente aplicada no item **3.3.4.1**, esta foi eluída com 1L de um gradiente linear de zero a 1N de HCl. Para tanto, dois vasos comunicantes, um contendo 500mL de água deionizada e o outro 500mL de HCl, foram conectados à coluna através de uma bomba peristáltica, submetendo-se a coluna a um fluxo constante de 1mL/min e a um gradiente linear de 0 a 1N de HCl. Utilizamos um coletor de frações **REDIRAC** para obtermos frações de 5ml do eluato proveniente da coluna.

Para determinar-se o conteúdo total de fósforo, realizamos leituras de absorvância em 830nm das amostras já cromatografadas (frações coletadas). As amostras a serem lidas foram preparadas segundo BARTLLET, (1959). De cada tubo coletado, 0,5mL de cada fração foi transferida para outro tubo de ensaio, ao qual se adicionou 0,5mL de H₂SO₄ 10N, levando-os a uma estufa **FANEN**, modelo **320 SG**, com circulação mecânica de ar, a 180° C por no mínimo 3 horas, para que ocorresse a digestão total dos fosfatos orgânicos. Após este procedimento, foram colocadas duas gotas de H₂O₂ e deixadas mais uma hora na estufa.

Após o resfriamento total dos tubos, adicionou-se a cada um deles, 0,2mL de molibdato de amônio a 5%, água deionizada para obtermos um volume de 4,8mL e 0,2mL de reagente Fisk & Subbarow a 0,25% (15g de NaHSO₃ ; 250mg de redutor de Fisk & Subbarow (amino-naphthol sulphonic acid) e 500mg de Na₂SO₃) com o auxílio de dispensadores Oxford.

Depois de agitados, os tubos foram levados ao banho maria fervente por dez minutos. Em seguida, uma coloração azul, diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico originalmente presente, se desenvolveu e a densidade óptica desta coloração foi determinada em 830nm.

A quantidade de fósforo foi determinada através de uma curva padrão com concentrações conhecidas e crescentes de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Às essas soluções foram adicionados às mesmas substâncias da fase de coloração das amostras (0,5mL de H_2SO_4 10N, 0,2mL de Molibdato de amônio a 5%, 0,2mL de reagente Fisk Subbarow a 0,25% e água deionizada). A coloração azul obtida foi proporcional à concentração de fósforo e as densidades ópticas foram obtidas em 830nm e posteriormente convertidas em molaridade.

Estas molaridades foram ajustadas para 1,0mL de células vermelhas empacotadas e plotadas contra o volume de eluato, e os picos correspondentes às diferentes formas de inosítois foram identificados segundo sua posição de eluição.

A concentração de cada fosfato orgânico detectado na corrida cromatográfica foi determinada pela seguinte fórmula:

$$X = \frac{[AMOSTRA]X[VolumePadrão]X[Sensibilidade]}{[VolumeAmostra]x[SensibilidadePadrão]}$$

onde:

X= fosfato orgânico

[AMOSTRA] = foi determinada pela comparação das retas dos picos cromatográficos dos fosfatos do padrão em relação aos fosfatos de cada amostra.

3.3.4.3 Dosagem de 2,3DPG intraeritrocitário

A determinação dos níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3DPG) intraeritrocitário foi realizada através da utilização de um Kit da **Sigma Diagnostics**. Este kit é baseado na reação de conversão do 2,3DPG em Gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) com liberação de NAD. O decréscimo de absorvância em 340nm, causado pela oxidação do NADH a NAD, reflete a quantidade de 2,3DPG originalmente presente nos extratos de fosfatos.

4. RESULTADOS

4.1 Eletroforeses

A figura 4.1 mostra o padrão eletroforético, obtido em gel de amido, da hemoglobina dos 5 exemplares estudados. Nessa, pode-se observar que o número de componentes não varia. Nessa figura, podemos comparar o padrão hemoglobínico obtido da espécie com o padrão humano.

4.2 Equilíbrio de oxigenação

4.2.1 *Stripped*

Experimentos realizados no intuito de se descrever o comportamento funcional da hemoglobina *stripped*, ou seja, na ausência de possíveis moduladores e/ou pequenas moléculas que pudessem alterar a afinidade hemoglobina/oxigênio, são mostrados na figura 4.2.

O valor de efeito Bohr entre os pHs 6,0 e 7,5 foi de $\Phi = 0,52$ e, entre os pHs 7,6 e 9,0 foi de $\Phi = -0,48$. No lado ácido, o efeito Bohr é reverso, ou seja, o valor de Φ é positivo, em função dos aumentos dos valores de P50 em relação aos aumentos nos valores de pH.

Os valores de n (coeficiente de Hill) também se apresentaram próximos a 1,0 em todos os pHs estudados. O menor valor encontrado por nós foi de $n = 0,89$ em pH 7,25. O maior valor encontrado foi de $n = 1,27$ em pH 8,6. Portanto podemos supor cooperatividade muito baixa e/ou nula nesta espécie de ave, sob estas condições. Em alguns casos isolados, encontramos valores de cooperatividade tão altos quanto 4 e 5.

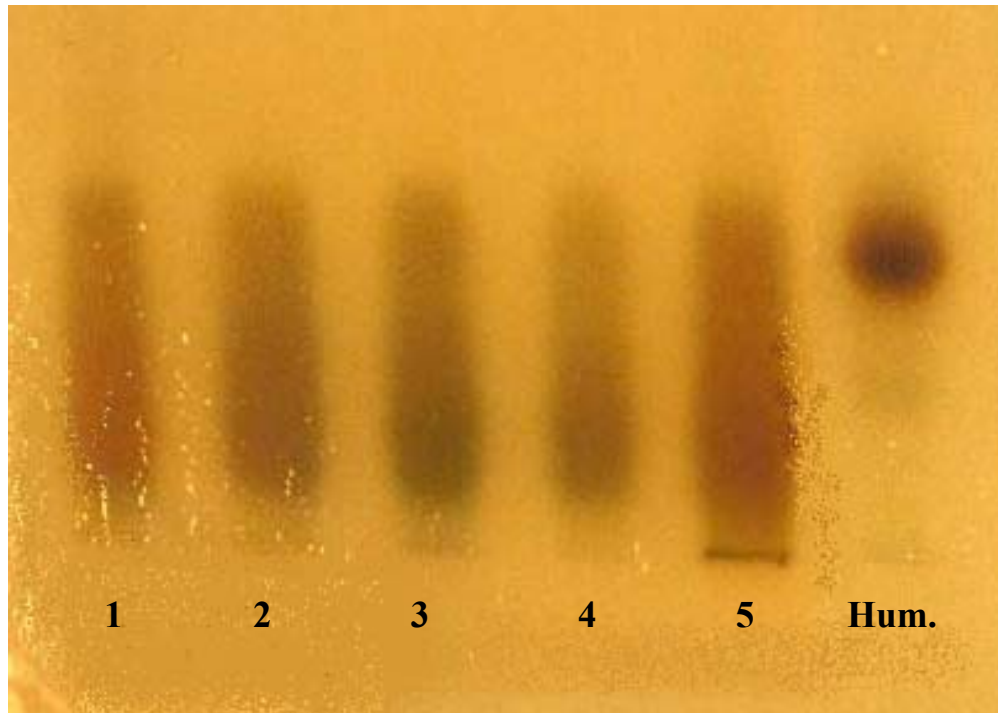


Figura 4.1 Padrão eletroforético das hemoglobinas em gel de amido para *C. maccormicki*, em comparação com o padrão humano. **1, 2 e 3**, animais coletados no verão; **4 e 5**, inverno; **Hum.**, hemoglobina humana.

Quando comparados com os de equilíbrio em sangue, os valores de P50 obtidos em Hb *stripped* são inferiores, indicando, assim uma afinidade maior ao oxigênio pela hemoglobina na ausência de moduladores (Figura 4.2). Deste modo, podemos supor que haja modulação por parte de fosfatos a este nível.

4.2.2 Adição de fosfatos

Os experimentos de equilíbrio de oxigenação na presença de IHP e 2,3 DPG (10mM), foram realizados na relação 1:8 (Hb: modulador) e o comportamento funcional das hemoglobinas de *C. maccormicki* é apresentado, comparativamente tanto à Hb *stripped* quanto ao sangue, na figura 4.2.

A presença de IHP diminuiu sensivelmente a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, efeito que não se observa com a adição de 2,3DPG. Os valores de P50 obtidos na presença de 2,3-DPG são muito semelhantes aos valores de Hb *stripped*, o que indica ser, provavelmente o IP5, o modulador das hemoglobinas dessa espécie.

O valor de efeito Bohr (Φ) do lado ácido foi de $\Phi = 1,08$ (efeito Bohr reverso) quando o IHP estava presente e de $\Phi = 0,89$ na presença de 2,3DPG. Esses valores, se comparados à hemoglobina *stripped* ($\Phi = 0,52$) são 2,08 vezes maiores para o IHP e 1,71 vezes maiores para o 2,3DPG, o que podemos supor, que no lado ácido, a influência em acentuar o efeito Bohr é mais pronunciada na presença de IHP.

Do lado alcalino (pH 7,5 a 8,5), o valor de efeito Bohr foi de $\Phi = - 0,41$ (efeito Bohr normal) para a presença de IHP e de $\Phi = - 0,44$ para a de 2,3DPG.

Acima de pH 8,5, quando comparamos os valores de P50 na presença de IHP e 2,3-DPG aos da Hb *stripped*, verifica-se valores de P50 muito próximos, sugerindo que os fosfatos orgânicos não se encontram mais ligados à hemoglobina nesses pHs.

Os valores de coeficiente de Hill (n) tanto para a presença de IHP quanto para a presença de 2,3DPG, foram próximos a 1,0 indicando que não existe cooperatividade entre os grupos heme.

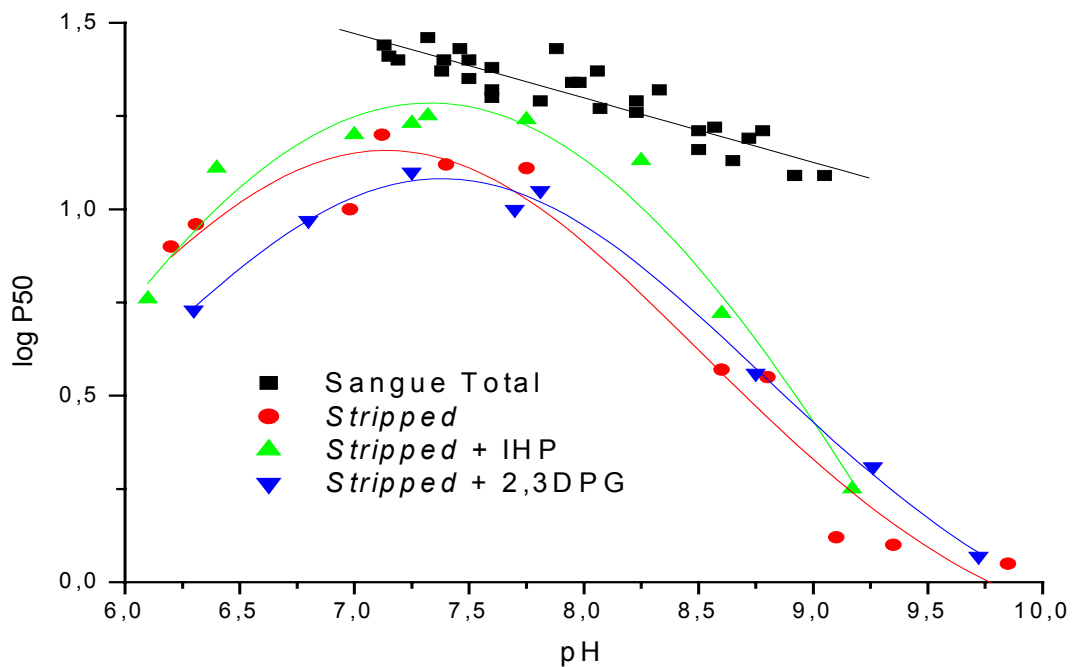


Figura 4.2 Comportamento funcional das hemoglobinas de *Catharacta maccormicki* em função do pH em tampão Tris-HCl à 20°C. Concentração de IHP e 2,3DPG: 10mM.

4.3 Dosagem de fosfatos orgânicos intraeritrocitários

4.3.1 Dosagem de nucleotídeos

Os cromatogramas dos extratos dos indivíduos coletados no verão e no inverno são mostrados nas figuras **4.3** e **4.4**, respectivamente. Podemos notar a presença, em ambas condições, de ADP em concentrações diferentes, sendo o do verão 3,12 vezes superior ao do inverno. Além disso, podemos notar a presença de ATP no verão e sua ausência no inverno, e o GTP presente no inverno e ausente no verão.

Os resultados das análises para as dosagens de nucleotídeos são mostrados na **tabela 3**.

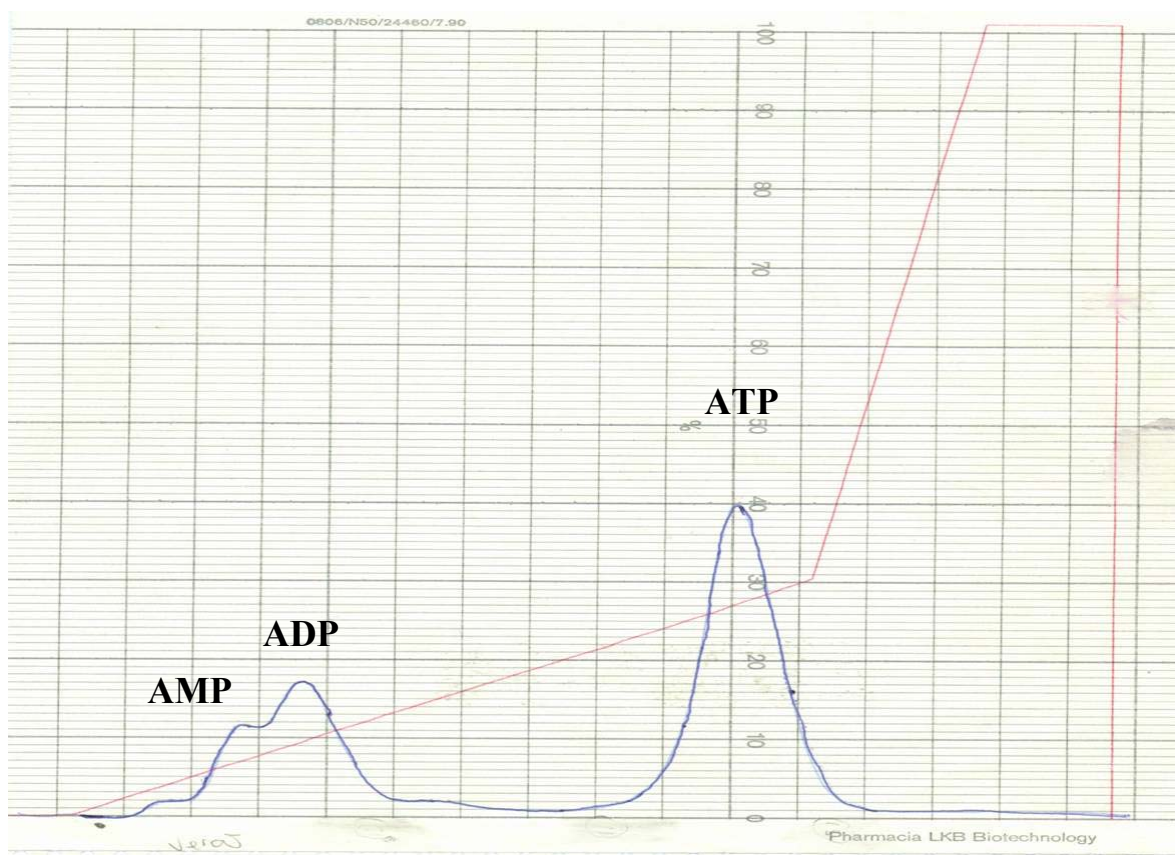


Figura 4.3 Perfil cromatográfico de fosfatos de skuas coletadas no verão.

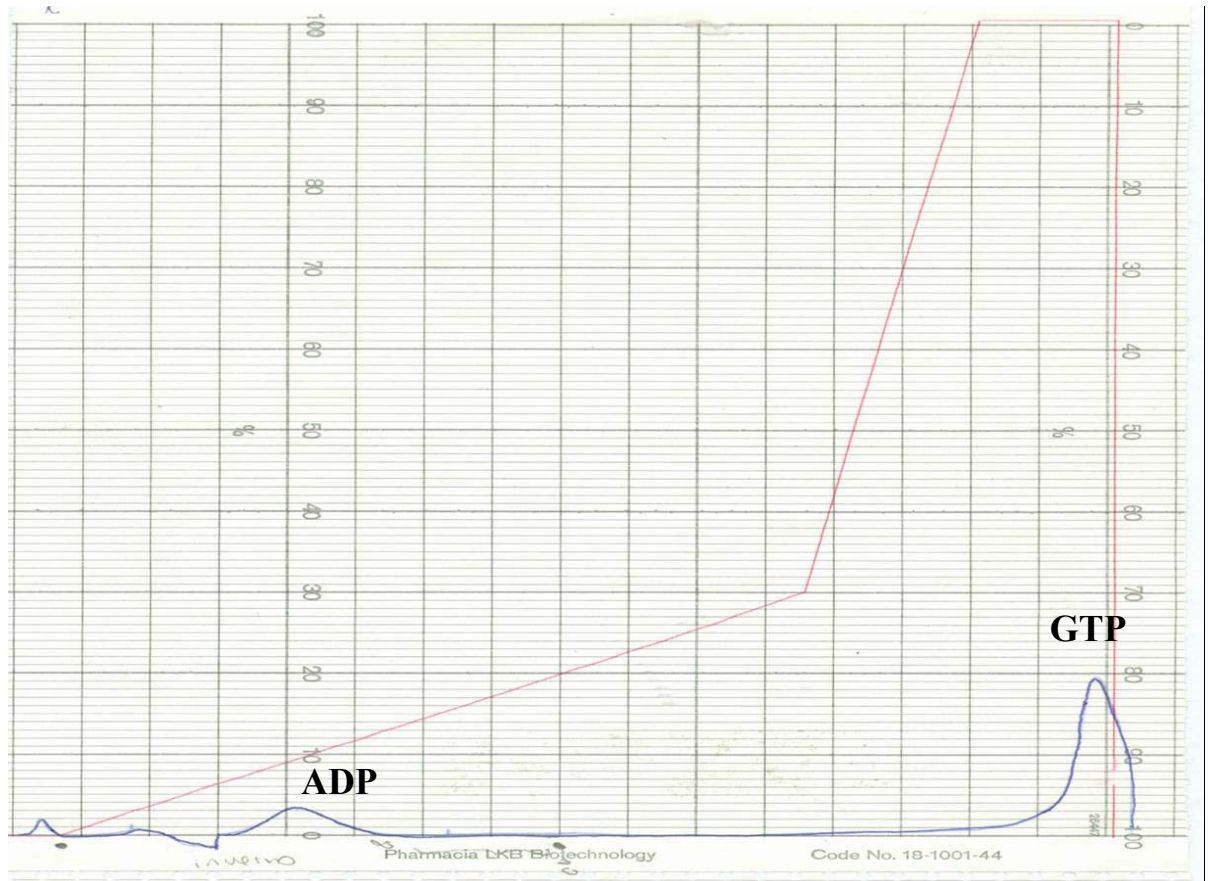


Figura 4.4 Perfil cromatográfico de fosfatos de skuas coletadas no inverno.

Tabela 3 – Valores obtidos de nucleotídeos em função das duas condições, inverno e verão, **em mM de P/mL de RBC.**

	INVERNO	VERÃO
AMP	0 (zero)	1,25± 0,3
ADP	0,41 ± 0,02	1,75± 0,25
ATP	0 (zero)	0,36± 0,11
GTP	0,16 ± 0,01	0 (zero)
2,3DPG	0 (zero)	0 (zero)

4.3.2 Concentração de inositóis

Os resultados das concentrações de inositóis para as duas condições estudadas estão sumarizados na **tabela 4** , onde são apresentadas as concentrações em μmol de P / mL de RBC.

Observamos não existir diferenças significativas entre os tipos de inositóis encontrados para as duas situações, sendo que encontramos, em ambas, a presença de IP5 e IHP conjuntamente, e em quantidades relativamente semelhantes. A soma dos valores de inverno e verão nos dá um valor muito próximo, situação que será discutida mais adiante. Não encontramos IP4 ou IP3 em nossas amostras.

A metodologia aqui utilizada seguiu as prescrições de BARTLETT (1959), que recomenda o reagente de Fisk & Subbarow a 0,25%.

Há de se notar, novamente, que durante a execução de nosso projeto, passamos por inúmeras dificuldades em relação às cromatografias de inositóis, pois atualmente a bibliografia existente a este respeito, é escassa. No início de nossos experimentos, a resina que estávamos utilizando era a Dowex (1X8, 400 MESH) a qual, nos parecia não ser eficiente em separar corretamente os nucleotídeos. Acreditamos que isso tenha acontecido devido às concentrações do sal e do tampão ainda não serem as corretas. Porém, seu desempenho na cromatografia de inositóis foi excelente.

Mesmo de posse de dados relativamente confiáveis em inositóis, tanto quantitativa como qualitativamente, continuamos nossos experimentos de separação cromatográfica, porém substituindo a resina anteriormente utilizada para a Q Sepharose *Fast Flow*. Surpreendentemente, esta foi eficiente tanto em cromatografar os nucleotídeos, como os inositóis, o que não era esperado.

A partir de então, utilizamos essa resina para separar os dois tipos de fosfatos intraeritrocitários, nucleotídeos e inositóis.

4.3.3 Dosagens de 2,3DPG intraeritrocitário

Os experimentos realizados com o Kit de detecção de DPG intraeritrocitário, da **Sigma-Aldrich**, não demonstraram a presença do referido composto nas duas situações nas quais as amostras foram coletadas.

Tabela 4. Concentrações de Inositol em μmol de P / mL de RBC, para as duas condições estudadas, inverno e verão. Dados referentes às médias dos animais em cada época do ano, sendo que verão $n = 3$ e inverno $n = 2$.

CONDIÇÃO	IP5	IP6	IP5/IP6	ΣTotal
VERÃO	2,13 \pm 0,25	0,61 \pm 0,10	3,5	2,74 \pm 0,27
INVERNO	2,01 \pm 0,18	0,67 \pm 0,13	3,0	2,68 \pm 0,16

5. DISCUSSÃO

Algumas aves voam melhor que outras, sendo que a energia para o vôo é um fator determinante na sua vida. Alguns problemas mecânicos relacionados ao vôo impuseram certas limitações anatômicas em aves voadoras.

Muitas estratégias e adaptações permitem que o custo energético do vôo seja minimizado e levam a um desempenho compatível com suas necessidades ecológicas (RAYNER, 1982). Estudos mais abrangentes se fazem necessários para elucidar as alterações metabólicas associadas com os diferentes níveis de atividade em diferentes tipos de vôo.

5.1 Eletroforeses

As proteínas são formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas. Por sua vez, cada cadeia possui sua seqüência de aminoácidos particular. Como as proteínas diferem em conteúdo e seqüência de aminoácidos, as técnicas de eletroforese separam-nas segundo seu ponto isoelétrico e os poros do gel filtram-nas segundo seu tamanho e forma.

Alguns aminoácidos, ditos não neutros, apresentam radicais ionizáveis, além daqueles comprometidos na ligação peptídica. Estes radicais, quando na superfície da molécula, determinam sua carga de acordo com o pH. O pH em que a molécula não se desloca num campo elétrico nem para o cátodo, nem para o ânodo, é chamado ponto isoelétrico. Moléculas carregadas, em solução, colocadas num campo elétrico, migram a uma distância que é proporcional à sua carga externa total.

A fim de identificar os diferentes componentes hemoglobínicos, foram realizadas eletroforeses em gel de amido. O padrão eletroforético das

hemoglobinas em gel de amido por nós obtido é semelhante aos descritos por HIEBL et al. (1987a,b,c) onde relatam a presença de dois componentes hemoglobínicos em *Aegypies monachos*, *Accipiter gentilis* e *Chloephaga melanoptera*; e por HUBER et al. (1988), onde apenas um componente hemoglobínico foi encontrado em *Eudytes crestatus* (pinguim).

As hemoglobinas de aves têm apresentado dificuldades de separação eletroforética (TAIPEIRO, comunicação pessoal). Diante dos primeiros resultados inconclusivos, adicionamos à solução de hemoglobina, 10mM de fosfatos orgânicos (IHP ou 2,3DPG). Não encontramos diferença nos resultados obtidos para nenhum dos dois tratamentos realizados. Porém, a adição de KCN no gel e na amostra tornou a definição dos componentes um pouco melhor, permitindo-nos inferir o padrão eletroforético da ave estudada.

Nossos dados eletroforéticos confirmam a idéia de que as hemoglobinas de aves possuem baixa heterogeneidade (DUNLAP et al., 1956).

5.2 Equilíbrio de oxigenação *stripped*

A afinidade Hb-O₂ da hemoglobina dos vertebrados é regulada por efetores alostéricos como cloretos (Cl⁻), íons hidrogênio (H⁺), dióxido de carbono (CO₂) e vários tipos de fosfatos orgânicos, além do efeito da temperatura e salinidade (WEBER, JANSEN, 1988; WEBER, WELLS, 1989). Em geral, o aumento de qualquer um destes fatores ou parâmetros físicos dentro do eritrócito provoca uma diminuição da afinidade Hb-O₂.

Nos experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue total já realizados na Estação Comandante Ferraz (Antártida), em dois períodos distintos de coleta, não foi encontrada diferença significativa nos gráficos de afinidade para os dois

períodos. Estes dados nos levam a crer, a princípio, que a migração não seja um fator determinante para modificações funcionais no nível de fosfatos orgânicos.

O comportamento do hemolisado total, na ausência de fosfatos, poderia ser explicado pelo modelo de MONOD, WYMAN & CHANGEUX (1965). Em pH ácido a alta concentração de íons H^+ estabiliza a hemoglobina no estado tenso ("T") de baixa afinidade (consequentemente alto P50) e uma pequena cooperatividade. Em pH alcalino a menor concentração de íons H^+ desloca o equilíbrio conformacional para o estado relaxado ("R") de alta afinidade (baixo P50).

As aves adultas diferem da maioria dos outros vertebrados por possuírem IP5 (inositol pentafofato) ao invés de DPG, como maior composto fosfatado orgânico (GRATZER & ALLISON, 1960). Esse, exerce a mesma influência na ligação Hb-O₂ , como faz o DPG em mamíferos nas soluções de hemoglobina, de tal forma que a Hb *stripped* de galinha e de mamíferos possuam aproximadamente as mesmas afinidades Hb-O₂.

Nossos resultados ainda estão de acordo com a descrição na literatura, onde relata-se que a influência do IP5 em diminuir a afinidade Hb-O₂ é mais pronunciada do que em DPG. Também RIEIRA et al. (1991), demonstraram que o IP5, em concentrações fisiológicas, é o modulador primário em codorniz.

Para a espécie analisada neste trabalho, observamos que o IHP diminui a afinidade da ligação hemoglobina/oxigênio em comparação com a Hb *stripped*, sugerindo que este fosfato atue negativamente na afinidade Hb-O₂ e de acordo com o fato das aves possuírem os Inositóis como principais moduladores.

Os valores obtidos para o índice de Hill sempre se mantiveram ao redor de 1,0 indicando cooperatividade baixa e/ou ausente. Porém, em algumas situações, os valores obtidos foram incrivelmente altos, alcançando até 5. É possível que

esteja ocorrendo a polimerização das moléculas de hemoglobina, talvez em função do estado conformacional ou proporção dos dois componentes.

COBB et al. (1992) demonstraram que no equilíbrio de oxigenação em hemoglobina em galinha, os coeficientes de Hill alcançam valores tão altos quanto 5 a 7, em pressões de oxigenação de 80 a 90% e que os componentes D, mas não os A, se auto-associam para formar octâmeros. Desde que os componentes A e D têm em comum a cadeia β , eles concluíram que os contatos tetrâmero-tetrâmero devem depender de resíduos (provavelmente Lys-71, Gly-78 e Glu-82) na superfície da cadeia α .

TAIPEIRO (1999), em seu trabalho que compara a função da hemoglobina de aves de acordo com o tipo de vôo, também encontra eventualmente valores de cooperatividade muito altos, levando-nos a crer que tenha ocorrido polimerização eventual dos tetrâmeros de hemoglobina, por razões que ainda não pudemos esclarecer.

A adição de fosfatos à hemoglobina *stripped* não alterou os valores de cooperatividade, mantendo-se os mesmos, tanto em sangue como no hemolisado. Este fato ainda precisa ser confirmado, pois KNAPP et al. (1999) encontraram, em hemoglobinas de galinha, aumentos de valores de cooperatividade “in vitro” na presença de IHP.

Durante a atividade ligada ao vôo prolongado, observa-se ao nível muscular, um aumento pela demanda de oxigênio, uma grande quantidade de calor devido ao aumento da taxa de reações metabólicas e concomitante diminuição do pH pela produção de ácido láctico e/ou pelo aumento da temperatura. As aves que fazem vôo prolongado utilizam principalmente gordura

como suprimento energético e, sob essas condições o efeito Bohr pode ser reduzido devido ao efeito Haldane (GIARDINA et al., 1990).

5.3 Dosagem de fosfatos

A análise pormenorizada dos cromatogramas obtidos para animais coletados no inverno e no verão, nos permite visualizar diferenças marcantes entre os fosfatos eritrocitários cromatografados.

Num primeiro momento, há a presença, em ambos, de ADP em níveis também encontrados por outros autores em outras espécies de aves. Porém, o mais interessante é a presença de uma substância com mesmo tempo de eluição cromatográfica do GTP em amostras de inverno e sua ausência no verão. Com o ATP, ocorreu exatamente ao contrário, ou seja, a sua presença no verão e ausência no inverno.

Em função da dúvida se estes compostos eram ou não ATP e/ou GTP, realizamos várias outras cromatografias onde as frações correspondentes aos picos de GTP e ATP foram coletadas. Estas amostras foram então dializadas e concentradas para que estivessem numa concentração suficiente para que fossem lidas num espectrofotômetro, e em seguida comparadas num padrão. *A priori*, podemos indicar a presença exclusiva de GTP em amostras de inverno e a exclusividade de ATP em amostras de verão. Não encontramos relatos de dados semelhantes na literatura. Entretanto, é possível que o GTP não tenha função específica de modular hemoglobina em aves, pois a concentração encontrada é muito baixa.

A partir destes dados, faz-se necessário que alguns experimentos sejam realizados em equilíbrio de oxigenação *stripped*, com a subsequente adição de

GTP nas concentrações encontradas, para se determinar exatamente se este composto pode agir como modulador intraeritrocitário.

Como ainda existem muito poucos dados referentes a fosfatos de aves e o fato de encontrarmos GTP intraeritrocitário em nossas amostras, sugerem que mais experimentos terão de ser realizados para confirmar ou refutar sua presença.

SUAREZ et al. (1990), através de determinações de atividades de enzimas-chave do catabolismo dos carboidratos, gorduras e aminoácidos em beija-flores, concluíram que altas demandas por ATP durante o exercício máximo que o bater de asas requer, somente poderiam ser suportadas pela oxidação de carboidratos. A oxidação de ácidos graxos poderia suportar taxas substancialmente mais baixas de *turnover* de ATP, indicando que seriam usados como fonte de energia em situações de trabalho muscular mais prolongadas, como por exemplo, durante a migração. Esses autores encontraram, também, que a inibição da oxidação do piruvato pela oxidação do palmitoil-CoA, seria o mecanismo pelo qual a oxidação de ácidos graxos inibiria a oxidação de carboidratos na fase de transição do vôo de curto prazo para o de longo prazo.

Os músculos do vôo possuem atividade máxima (as maiores conhecidas para musculatura esquelética entre os vertebrados) da hexoquinase e carnitina palmitoil transferase, indicando o uso exclusivo de glicose ou ácidos graxos de cadeia longa (durante o período de jejum) como fontes primárias de energia (SUAREZ et al., 1990). Além destes fatores, esses autores encontraram atividades da piruvato carboxilase (enzima envolvida na gliconeogênese) e acetil-CoA carboxilase (enzima envolvida na síntese de ácidos graxos) em alta atividade no fígado de beija-flores, indicando que a atividade biossintética está ajustada para fazer frente às altas demandas por substratos metabólicos, que são utilizados com

máxima eficiência, isto é, grande capacidade oxidativa evidenciada pela alta atividade da enzima citrato sintase. Esta grande capacidade oxidativa é acompanhada por um proporcional aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD-Mn) nos músculos do vôo, indicando que a toxicidade do oxigênio não é um fator restritivo ao desempenho aeróbico (BICUDO & ZERBINATTI, 1995).

Portanto, todas as adaptações histológicas, fisiológicas e metabólicas, somente serão eficientes *in vivo* como resultado da capacidade de captar e entregar o oxigênio (função primária da hemoglobina) de forma a sustentar o metabolismo aeróbico.

Os dados obtidos em relação aos níveis de inositóis encontrados nos eritrócitos de *Catharacta maccormicki* são muito interessantes sob o ponto de vista de que esta ave é migratória por excelência. Em ambas situações, inverno e verão, encontramos IP5 e IP6 em concentrações levemente diferentes entre si. Porém, quando somamos a quantidade total de inositóis, verificamos que os valores são muito próximos. Portanto, podemos sugerir que a migração não possa alterar os níveis totais de inositóis. Entretanto, no inverno temos três vezes mais IP5 do que IP6, enquanto que no verão temos 3,5 vezes mais IP5 do que IP6.

Posto isso, e a partir da idéia que o IP6 seja mais efetivo na modulação da hemoglobina ao oxigênio do que o IP5, podemos postular a idéia de que o ato migratório exija uma maior quantidade de IP6, ou então, que este seja posteriormente convertido em IP5, pois os valores obtidos da somatória entre inverno e verão são muito semelhantes entre si.

É possível também que, devido à debilidade fisiológica da ave no retorno à Antártida (5540 km de vôo), os níveis de IP6 se mantenham com a finalidade de facilitar a descarga do oxigênio nos músculos do vôo.

Segundo ISAACKS (1985), apesar da presença de IP5 nas células vermelhas e de sua capacidade de modular a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, o seu verdadeiro papel na regulação da afinidade do sangue permanece obscura. No caso das aves, ainda não existem evidências concretas de que a concentração de inositol nos eritrócitos seja regulada pelo metabolismo, e há a possibilidade de que o dióxido de carbono (CO_2) e a concentração de íons hidrogênio (H^+) exerçam um papel importante na regulação da afinidade da hemoglobina ao oxigênio em aves.

Uma característica exclusiva em eritrócitos de aves adultas é a alta concentração de inositol pentafosfato (IP5), e de outros inositóis polifosfatados, porém em menor concentração. Durante o desenvolvimento embrionário, 2,3DPG aparece como principal modulador até a fase de eclosão, momento no qual sua concentração decresce vigorosamente (BARTLETT, 1982).

Nossos dados em relação ao 2,3DPG intraeritrocitário estão de acordo com a literatura, onde ainda não foi relatada a sua presença em eritrócitos de aves adultas.

6. CONCLUSÕES

- (1) O padrão eletroforético em gel de amido do hemolisado total de *C. maccormicki*, apresentou dois componentes, com ausência de variações entre os indivíduos analisados.
- (2) O comportamento funcional do hemolisado total de *C. maccormicki* mostrou efeito Bohr normal no lado alcalino e reverso no lado ácido, característica de hemoglobinas de aves.
- (3) É intensa a influência de fosfatos na afinidade do hemolisado, principalmente o IP6. Porém a influência de 2,3DPG é ligeiramente inferior.
- (4) Os valores de cooperatividade obtidos em todos os casos permaneceram próximos a 1,0 indicando ausência de cooperatividade.
- (5) Em ambas as condições, inverno e verão, encontramos ADP em concentrações diferentes, sendo o do verão, 3,12 vezes superior ao inverno. Além disso, podemos notar a presença de ATP no verão e sua ausência no inverno, e o GTP presente no inverno e ausente no verão.
- (6) Encontramos IP5 e IP6 conjuntamente e em quantidades relativamente semelhantes. A soma dos valores de inverno e verão, nos dá um valor muito próximo.
- (7) Não encontramos 2,3DPG intraeritrocitário em nossas amostras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONINI, E., & BRUNORI, M. (1971) Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. *North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.*
- BARTELS, H.; HILBERT, P.; BARBEY, K.; BETKE, K.; RIEGEL, K.; LANG, E.M. & METCALFE, J. (1963) Respiratory functions of blood of the yak, llama, Dybowski deer and African elephant. *Am. J. Physiol.*, **205**: 331-336.
- BARTLETT, G.R. (1982) Developmental changes of phosphates in red cells of the *Emu* and the *Rhea*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **73A (1)**: 129-134.
- BARTLETT, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468.
- BARTLETT, G.R. (1978a) Water-soluble phosphates of fish red cells. *Can. J. Zool.* **56**, 870-877.
- BICUDO, J.E., ZERBINATTI, C.V. (1995) Physiological constraints in the aerobic performance of hummingbirds. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, **28(11-12)**: 1139-1145.
- BOHR, C., HASSELBALCH, K.A., KROGH, A. (1904) Uber einen in biologischer beziehung wichtigen einfluss, den die kohlenaurespannung des blutes auf dessen saurestoffbindung ubt. *Skand. Arch. Physiol.*, v.16, p. 402-412.
- BULLARD, R.W.; BROUMAND, C. & MEYER, R.F. (1966) Blood characteristics and volume in two rodents native to high altitude. *J. Appl. Physiol.*, **21**: 994-998.
- CHIODI, H. (1971) Comparative study of the blood gas transport in high altitude and sea level Camelidae and goats. *Respiration Physiol.*, **11**: 84-93.

DUNLAP, J.S., JOHNSON, V.L., FARMER, D.S. (1956). Multiple hemoglobins in birds. *Experientia*. **12**: 352.

FRONTICELLI, C. (1990) A possible new mechanism of oxygen affinity modulation in mammalian hemoglobins. *Biophysical Chemistry*, **v.37**, p. 141-146.

GIARDINA, B; CORDA, M; PELLEGRINI, M.G.; SANNA, M.T.; BRIX,O.; CLEMENTE , M.E. & CONDO, M.G. (1990) Flight and heat dissipation in Birds – A possible molecular mechanism; *FEBS Letters* **270 (1-2)**: 173-176.

GRATZER, W.B. & ALLISON, A.C. (1960). Multiple hemoglobins. *Biol. Rev.*, **35**: 459-506.

GREANEY, G.S. & POWERS, D.A. (1978) Allosteric modifiers of fish hemoglobins: “*in vitro*” an “*in vivo*” studies of effect of ambient oxygen and pH on the erythrocyte ATP concentrations. *J. Exp. Zool.*, v.203, p. 339-350.

HIEBL, I., SCHNEEGANSS, D., GRIMM, F., KOSTERS, J., BRAUNITZER, G. (1987 a). High altitude respiration of the birds. The primary structures of the major and minor hemoglobin component of adult European black vulture (*Aegypius monachus*, Aegyptiinae). *Bio. Chem. Hoppe Seyler.*, **368 (1)**: 11-18.

HIEBL, I., KOSTERS, J., BRAUNITZER, G.(1987b). High altitude respiration of the birds. The primary structures of the major and minor hemoglobin component of adult goshawk (*Accipiter gentilis*, Accipitrinas). *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, **368 (4)**: 333-342.

HIEBL, I., BRAUNITZER, G., SCHNEEGANSS, D. (1987c) The primary structures of the major and minor hemoglobin component of adult Andean goose (*Chloephaga melanoptera*, Anatidae): the mutation Leu-Ser in position 55 of the beta chains. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, **368 (12)**: 1559-1569.

HUBER, K., BRAUNITZER, G., SCHNEEGANSS, D., KOSTERS, J., GRIMM, F.

(1988) The primary structure of the hemoglobin of the Rock-Hopper penguin (*Eudyptes crestatus*, Sphenisciformes). *Bio. Chem. Hoppe Seyler.*, **369 (6)**: 513-519.

ISAACKS, R.E. (1985) The relationship between erythrocyte phosphate metabolism, carbon dioxide and pH on blood oxygen affinity in birds. In: *Circulation, respiration and metabolism*. GILLES, R. (ed). Springer-Verlag, p301-311.

JOHANSEN, K. & LENFANT, C.A. (1972) Comparative approach to the adaptability of Hb-O₂ affinity of hemoglobin and red cell acid-base status. In: ASTRUP, P., ROUTH, M.(ens.). *Acad. Press. Munksgaard, Copenhagen, Denmark*, p. 750-780.

MAHLER, H. & KORDES, E. H. (1971) **Biological Chemistry**, 2^a ed. 150-154, Harper and Row, New York.

MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J. Mol. Biol.*, **12**: 88 -118.

PERUTZ, M.F., FERMI, G. (1993) A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and the origin of the chloride-liked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v.233, p. 536-545.

PETERSEN, C.G., SCHWANTES, A.R., DE LUCA, P.H. and SCHWANTES, M.L.B. (1989) Functional properties of the two major hemoglobin components from *Leporinus friderici* (Pisces). *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**: 823-827.

- RAYNER, J.M. (1982) Avian flight energetics. *Annu. Ver. Physiol.*, **44**: 109-119.
- RIEIRA, M., FUSTER, J.F., PALACIOS, L. (1991) Role of erythrocyte phosphates in blood oxygen transport in anemic quail. *Am. J. Physiol.*, **260**: 798-803.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R.A. (1956) Sulphydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, v. 39, p. 585-605.
- RIGGS, A. (1976) Factors in the evolutions of hemoglobin function. *Fedn. proc.*, v. 35, p. 2115-2118.
- SMITHIES, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, v. 61, p. 629-641.
- SMITHIES, O. (1959) An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem. J.*, v. 71, p.585-587.
- SMITHIES, O; CONNELL, G.E.; DIXON, G.H. (1966) Gene action in human haptoglobins. I. Dissociation into constituent polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* **21(2)**: 213-214.
- SUAREZ, R.K., LIGHTON, J.R., MOYES, C.D., BROWN, G.S., GASS, C.L., & HOCHACHKA, P.W. (1990) Fuel selection in rufous hummingbirds: ecological implications of metabolic biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87 (23)**: 9207-9210.
- TAIPEIRO, E.F. Caracterização funcional de hemoglobinas de aves com diferentes tipos de vôo. Tese de Doutorado, 1999, Universidade Federal de São Carlos, SP.
- VAL, A. L.; SCHWANTES, A. R.; SCHWANTES, M. L. B.; DE LUCA, P. H. (1981) Amido hidrolizado de milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 992-996,.
- VILLELA, G.C. (1979) Bioquímica para biólogos. Rio de Janeiro, Ed. Interciência.

VITO NETO, A; SANTOS, M. & SCHWANTES, A.R. (1998) Aves antárticas submetidas ao estresse migratório. Relatório de atividades enviado ao CNPq.

WEBER, R.E. , WELLS, R.M.G. (1989) Hemoglobin structure and function. In: WOOD, S. C. **Comparative Pulmonary Physiology: currents concepts.** New York, Marcel Dekker, p. 279-310.

WEBER, R.E. & JENSEN, F.B. (1988). Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Ver. Physiol.*, **50**: 161-179.

WINTROBE, M.M. (1974) *Clinical Hematology*, 17^a ed., v. 1, Lea and Febriger, Philadelphia, pp. 1896.