

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
HEMOGLOBINAS DE
TRÊS ESPÉCIES DE AVES**

HUGO RIBEIRO DA SILVA

SÃO CARLOS – SP
2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE
HEMOGLOBINAS DE
TRÊS ESPÉCIES DE AVES**

HUGO RIBEIRO DA SILVA

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

**SÃO CARLOS – SP
2003**

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

S586ce

Silva, Hugo Ribeiro da.
Caracterização estrutural e funcional de hemoglobinas de
três espécies de aves / Hugo Ribeiro da Silva. -- São Carlos
: UFSCar, 2003.
87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2003.

1. Aves. 2. Hemoglobina. 3. Efeito Bohr. 4. Eletroforese.
5. Inositol pentafofato. 6. Equilíbrio de oxigenação. I. Título.

CDD: 598 (20^a)

Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes

*“Crêste, porque me viste. Felizes os
que crêem sem ter visto!”*

João 20, 29

Dedico Especialmente

À minha família, que tanto contribuiu com minha formação, estando presente em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes, meu orientador, pelo exemplo de vida e profissionalismo. Um grande amigo.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Arno Rudi Schwantes, meu orientador, pela oportunidade de trabalho, orientação, amizade e paciência durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Luiza Barcellos Schwantes, pela sincera amizade, pelo grande apoio e que muito enriqueceu este trabalho com seus conhecimentos.

Ao meu amigo Gustavo Fraga que em nenhum momento poupou esforços, para a concretização deste trabalho, obrigado por tudo.

À minha amiga Simoni Savazzi, que com dedicação me ajudou e apoiou durante a concretização deste trabalho, pela sincera amizade e sobretudo pela confiança, meus profundos agradecimentos.

À Prof. Dr. Elane de Fátima Taipeiro, pela grande contribuição na concretização deste trabalho.

À amiga Fabiana, pela grande ajuda e companheirismos.

Aos companheiros de laboratório, Flávia, Fernando, Marc, Alfredo, Dana, Huita, Regina e Marcelo (Jarrão), pelo auxílio, companheirismo e amizade.

Aos Técnicos Luis (Piau) e Toninho, que com muita disposição e companheirismo, muito me ajudaram.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação, pela colaboração e gentileza.

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

Ao amigo Odynei, pela ajuda prestada.

Ao meu grande amigo Cássio, pela convivência, paciência e ajuda.

Aos meus pais, minha avó e meu tio, pessoas muito especiais, que sempre me apoiaram e me deram muito amor.

Ao meu irmão Helder pela colaboração na realização deste trabalho.

À Elisa minha companheira e amiga, pela grande ajuda e paciência.

À todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Agradeço a Deus Todo Poderoso, que me deu a vida.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
Bis - Tris	Bis (dois hidroximetil) amino tris (hidroximetil) metano
°C	Graus centígrados
2,3 - BPG	2,3 - Bifosfoglicerato
EDTA	Etileno diamino tetracetato de sódio
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico
Hct	Hematócrito
IHP	Inositol hexafosfato
IP ₅	Inositol pentafosfato
IP ₄	Inositol tetrafosfato
KOH	Hidróxido de potássio
KCN	Cianeto de potássio
L	Litro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar

N_2	Nitrogênio molecular
NaCl	Cloreto de sódio
$Na_2S_2O_4$	Ditionito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
n	Coefficiente de Hill (cooperatividade)
nm	Nanômetro
O_2	Oxigênio molecular
P_{50}	Pressão de O_2 para saturar 50% da hemoglobina
RBC	Células vermelhas do sangue (eritrócitos)
Tris	Tris hidroximetil amino metano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Diagrama da estrutura da hemoglobina.....	3
Figura 1.2 - Representação da estrutura da hemoglobina, apresentando suas quatro cadeias (globinas), cada uma ligada a um grupo heme (Russell, 1996).....	4
Figura 1.3 - Grupo heme (Russell, 1996).....	5
Figura 1.4 - Efeito da afinidade da hemoglobina ao O ₂	8
Figura 1.5 - Exemplar adulto de <i>Athene cunicularia</i> - Coruja-buraqueira (Molina, 1782).....	19
Figura 1.6 - Exemplar adulto de <i>Coragyps atratus</i> - Urubu (Bechstein, 1793).....	22
Figura 1.7 - Exemplar adulto de <i>Mimus saturninus</i> - Sabiá-do-campo (Lichtenstein, 1823).....	25
Figura 4.1 - Fotografia do gel (1) e representação esquemática (2) dos padrões eletroforéticos das hemoglobinas das espécies de aves analisadas: <i>A. cunicularia</i> (A), <i>M. saturninus</i> (M), e <i>C. atratus</i> (C), comparativamente a humana (H).....	44

Figura 4.2 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.....	50
Figura 4.3 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>C. atratus</i> à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.....	51
Figura 4.4 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>M. saturninus</i> à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.....	52
Figura 4.5 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> à 40°C.....	53
Figura 4.6 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> à 21°C.....	54
Figura 4.7 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> à 4°C.....	55
Figura 4.8 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> na presença de inositol hexafosfato.....	56
Figura 4.9 - Comportamento funcional das hemoglobinas <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> na presença de 2,3 - BPG.....	57

Figura 4.10 - Comportamento funcional das hemoglobinas em sangue de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	58
Figura 4.11 - Valores obtidos de nucleotídeos para <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> , em mM de P/ml de RBC.....	61
Figura 4.12 - Padrão cromatográfico dos nucleotídeos (AMP, ADP, ATP, GDP e GTP). Coluna Q Sepharose <i>Fast Flow</i> , tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.....	62
Figura 4.13 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de <i>A. cunicularia</i> . Coluna Q Sepharose <i>Fast Flow</i> , tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.....	63
Figura 4.14 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de <i>C. atratus</i> . Coluna Q Sepharose <i>Fast Flow</i> , tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.....	64

Figura 4.15 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de *M. saturninus*. Coluna Q Sepharose *Fast Flow*, tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.....65

Figura 4.16 - Concentrações de inosítois (em $\mu\text{mol} / \text{ml}$ de RBC) para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Espécies estudadas segundo ordem, família, nomes vernáculos e número de exemplares utilizados (entre parênteses). Fonte Sick (1997).....	27
Tabela 3.2 - Tampões utilizados em experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina em sangue de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	30
Tabela 3.3 - Tampões utilizados em experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina <i>stripped</i> de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	35
Tabela 3.4 - Soluções para revelação de hemoglobinas.....	39
Tabela 3.5 - Solução de lavagem do gel de amido.....	39
Tabela 4.1 - Valores de Hct encontrados, para <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	45
Tabela 4.2 - Valores de efeito Bohr (ϕ), log de P ₅₀ , P ₅₀ e cooperatividade (n), para diferentes condições da Hb <i>stripped</i> em três temperaturas, efeito de IHP e 2,3 - BPG, e sangue não fracionado de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	49
Tabela 4.3 - Valores obtidos de nucleotídeos para <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i> , em mM de P/ml de RBC.....	60

Tabela 4.4 - Valores das concentrações de inositóis (em $\mu\text{mol} / \text{ml}$ de RBC) para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.....66

RESUMO

Foram analisados, o padrão eletroforético, a finidade das hemoglobinas (Hbs) em experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue, hemoglobinas *stripped* à 4°C, 21°C e 40°C, o efeito de fosfatos orgânicos inositol hexafosfato (IHP) e 2,3 - bifosfoglicerato (BPG), bem como a determinação qualitativa e quantitativa de fosfatos orgânicos em três espécies de Aves: *Athene cunicularia* – coruja-buraqueira (Ordem Strigiformes, Família Strigidae), *Coragyps atratus* - urubu (Ordem Ciconiformes, Família Cathartidae) e *Mimus saturninus* - sabiá-do-campo (Ordem Passariformes Família Mimidae). O padrão eletroforético em gel de amido (pH 8,6), para *A. cunicularia* e *C. atratus*, mostra a presença de um componente maior lento, e outro menor rápido, padrão típico de hemoglobinas de aves. Para *M. saturninus* o padrão eletroforético mostra dois componentes maiores, um rápido e outro lento. As hemoglobinas *stripped*, nas três temperaturas, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue mostraram efeito Bohr normal e valores de *n* (Hill) próximos de um, indicando cooperatividade muito baixa ou ausente. A afinidade das Hbs ao oxigênio mostrou - se maior a medida que se diminuiu a temperatura. O 2,3 - BPG praticamente não modulou as Hbs, já o IHP atuou como modulador negativo efetivo das Hbs. Não foi detectado concentrações de AMP, GDP, GTP e 2,3 - BPG. Foram detectados somente ADP, ATP e inositol nos eritrócitos das três espécies. O inositol pentafosfato (IP₅) foi o fosfato intraeritrocitário mais abundante nas três espécies. *A. cunicularia* mostrou também inositol tetrafosfato (IP₄) e *C. atratus* e *M. saturninus*, mostraram IHP. Apesar das três espécies estudadas pertencerem a ordens diferentes, com tipos de vôo e hábitos distintos, as propriedades funcionais de suas hemoglobinas são muito semelhantes. Já que as três espécies estudadas, com hábitos tão diferentes, apresentam características funcionais tão semelhantes, é possível que esses sistemas sejam tão eficientes que não necessitem modificações significativas para cumprir seu papel de fornecer oxigênio aos tecidos, numa gama grande de situações ecológicas.

ABSTRACT

Hemoglobin electrophoretic patterns, oxygen equilibrium experiments using unfractionated blood, stripped hemoglobin at 4°C, 21°C, 40°C, as well as the effect of inositol hexaphosphate (IHP) and 2,3-biphosphoglycerate (BPG), and the qualitative and quantitative determination of intraerythrocytic organic phosphate were done, in three species of Aves: *Athene cunicularia* – owl (Order Strigiformes, Family Strigidae), *Coragyps atratus* - vulture (Order Ciconiformes, Family Cathartidae) and *Mimus saturninus* - mocking bird (Order Passariformes Family Mimidae). On starch gel electrophoresis, pH 8.6, *A. cunicularia* and *C. atratus* showed one slow anodic major component and one fast minor components, a typical bird hemoglobin pattern. On the same electrophoretic conditions, *M. saturninus* showed two anodic major components, instead one major and one minor. Stripped hemoglobins at the three temperatures, in the presence of IHP, BPG, and blood showed normal Bohr effect and n values (Hill plots) were close to one, indicating very low or no cooperativity. Oxygen affinities were temperature-dependent (as lower the temperature higher is the affinity), BPG modulation was low, IHP was very effective as negative modulator. Vulture hemoglobin showed the highest P_{50} value, while the owl and the mocking bird presented lower and similar oxygen affinity to each other. No AMP, GTP and BPG were found, only ADP, ATP and inositols were detected in the erythrocytes of the three species. Inositol pentaphosphate (IP_5) was the most abundant intraerythrocytic organic phosphate in the 3 species. *A. cunicularia* showed also inositol tetraphosphate and *C. atratus* and *M. saturninus* showed IHP, besides IP_5 . Although the three species belong to different Orders, have different habit; the functional properties of their hemoglobins are very similar. One hypothesis to explain such similarity is that the avian system to deliver and discharge oxygen to the tissues are so efficient, that works properly in a wide range of situations.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hemoglobina.....	2
1.1.1. Diferenças estruturais entre oxiHb e desoxiHb.....	9
1.1.2. Metahemoglobina (metaHb).....	9
1.2. Aves.....	9
1.2.1. Hemoglobinas de aves.....	12
1.2.2. Características gerais das espécies estudadas.....	17
1.2.2.1. Ordem: Strigiformes Família: Strigidae.....	17
1.2.2.2. Ordem: Ciconiformes Família: Cathartidae.....	20
1.2.2.3. Ordem: Passeriformes Família Mimidae.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Sangue e solução de hemoglobina.....	26
3.2. Extratos de fosfatos orgânicos intraeritrocitários.....	28
3.3. Equilíbrio de oxigenação em sangue.....	28
3.4. Hemoglobina <i>stripped</i> e redução de metahemoglobina.....	31

3.5. Método Espectrofotométrico.....	32
3.5.1. Adição de fosfatos orgânicos.....	36
3.6. Eletroforese.....	36
3.6.1. Eletroforese em gel de amido.....	37
3.6.2. Transparentização.....	38
3.7. Cromatografia de fosfatos intraeritrocitários.....	40
3.7.1. Fosfatos orgânicos não inositolis (nucleotídeos).....	40
3.7.2. Inositolis.....	41
3.8. Determinação de BPG.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Eletroforeses.....	43
4.2. Hematócrito.....	45
4.3. Estudos funcionais.....	45
4.3.1. Equilíbrio de oxigenação.....	45
4.3.1.1. Método gasométrico e espectrofotométrico.....	46
4.3.1.1.1. <i>Athene cunicularia</i>	46
4.3.1.1.2. <i>Coragyps atratus</i>	47
4.3.1.1.3. <i>Mimus saturninus</i>	47

4.3.1.2. Comparação entre o comportamento funcional das 3 espécies estudas.....	48
4.4. Dosagem de fosfatos intraeritrocitários.....	59
4.4.1. Dosagem de nucleotídios.....	59
4.4.2. Dosagem de 2,3 – BPG.....	59
4.4.3. Concentração de Inositóis.....	66
5. DISCUSSÃO.....	68
5.1. Estudos eletroforéticos.....	68
5.2. Comportamento funcional das hemoglobinas de <i>A. cunicularia</i> , <i>C. atratus</i> e <i>M. saturninus</i>	69
5.2.1. Equilíbrio de oxigenação em sangue total e <i>stripped</i>	70
5.2.2. Equilíbrio de oxigenação com adição de fosfatos.....	72
5.2.3. Coeficiente de Hill (<i>n</i>).....	72
5.3. Dosagem de fosfato.....	73
5.3.1. Nucleotídeos.....	73
5.3.2. Inositóis.....	75
5.4. Observações finais.....	76

6. CONCLUSÕES.....76

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77

1. INTRODUÇÃO

A transição da vida anaeróbia para a aeróbia foi um grande passo na evolução porque possibilitou o maior aproveitamento de energia. Dezoito vezes mais energia é extraída da glicose na presença de O₂ do que na sua ausência.

Segundo HOCHACHKA e SOMERO (1984), para garantir um contínuo suprimento de O₂ para as células, a seleção teria favorecido adaptações em todos os níveis da organização bioquímica.

Em numerosas espécies, a capacidade de suprir com oxigênio o metabolismo celular é aumentada pela presença de pigmentos respiratórios que permitem a fixação, transporte e liberação desse, de forma mais eficiente, aumentando a velocidade de sua difusão, no interior das células.

Essas novas habilidades surgiram por mutações casuais no genoma; as mutações que levaram ao aumento na capacidade explorativa foram preservadas. Um fato interessante, quando se aborda o aspecto evolutivo, é a observação de que as reações bioquímicas dos grandes grupos de vertebrados são muito similares.

As adaptações ao ambiente refletem a habilidade que os organismos desenvolveram para se haverem com as flutuações ambientais. Essas adaptações podem ocorrer em todos os níveis da organização biológica, desde comportamentais, passando por morfológicas, anatômicas, fisiológicos e até atingir níveis moleculares (VAL, 1986).

Quando analisamos um organismo do ponto de vista adaptativo, devemos considerar que todas as interações que esse organismo deve manter com o ambiente afetam o metabolismo celular e, por conseguinte, o organismo como um todo (HOCHACHKA e SOMERO, 1984).

Nos vertebrados, a hemoglobina é a principal proteína situada na “interface” organismo-meio, por isso, o estudo funcional desta e do tecido no qual ocorre, o sangue, é muito interessante, uma vez que o complexo respiratório é um modelo excelente para estudo de estratégias de adaptação a mudanças ambientais (POWERS, 1980).

As observações sistemáticas e os grandes esforços que têm sido empreendidos no estudo de hemoglobinas animais nos permite relacionar diferenças estruturais com comportamentos bioquímicos, fisiológicos e evolutivos (FADEL, 2000).

1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é o principal pigmento respiratório responsável pelo transporte de O₂ em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (SCHWANTES, 1972). Sendo uma proteína respiratória encontrada nas células vermelhas do sangue, a Hb transporta o oxigênio dos órgãos respiratórios para os tecidos e o dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões (PERUTZ et al.,1987). Nos pulmões, onde a pressão de oxigênio é alta, cada molécula de hemoglobina se combina com quatro moléculas de O₂ (uma molécula de O₂ para cada grupo heme), formando a oxi-hemoglobina. Esta ligação é reversível e o oxigênio transportado pela hemoglobina é transferido para os tecidos, onde a pressão de O₂ é baixa.

A capacidade da hemoglobina de realizar uma reação reversível com O₂ molecular reside no fato dela conter um grupo heme (ferro-protoporfirina IX), como grupo prostético, ligado a cada uma das suas cadeias polipeptídicas. Esse grupo heme é constituído pela protoporfirina e por um átomo de Fe, sendo este mantido no estado ferroso (Fe⁺²) durante os processos de oxigenação e desoxigenação, para conservar suas propriedades funcionais (BRAUNITZER et al., 1961; LEE e SMITH, 1965; KARPLUS, 1982; PERUTZ, 1982; DICKERSON e GEIS, 1983; ACKERS e SMITH, 1987; LESK, 1991).

A molécula de hemoglobina é um tetrâmero composto por dois pares de cadeias distintas: duas cadeias α e duas cadeias β . A cada uma destas cadeias está ligado um grupo heme, de forma que, uma molécula de hemoglobina pode transportar até quatro moléculas de oxigênio (LESK, 1991).

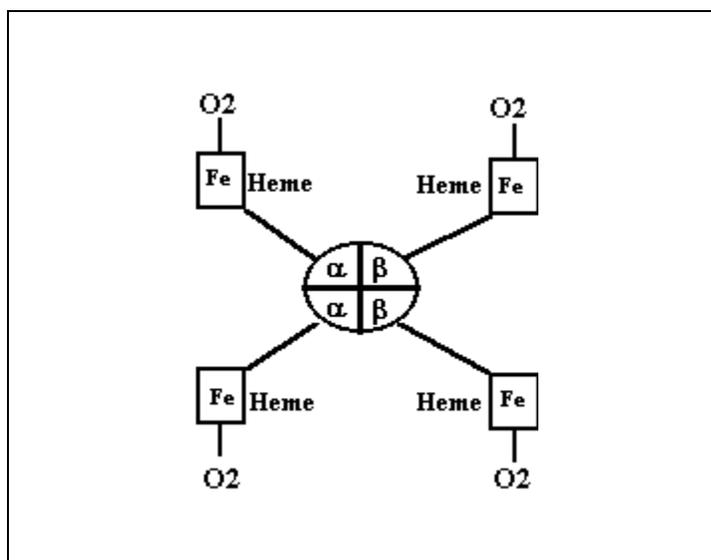


Figura 1.1 - Diagrama da estrutura da hemoglobina.

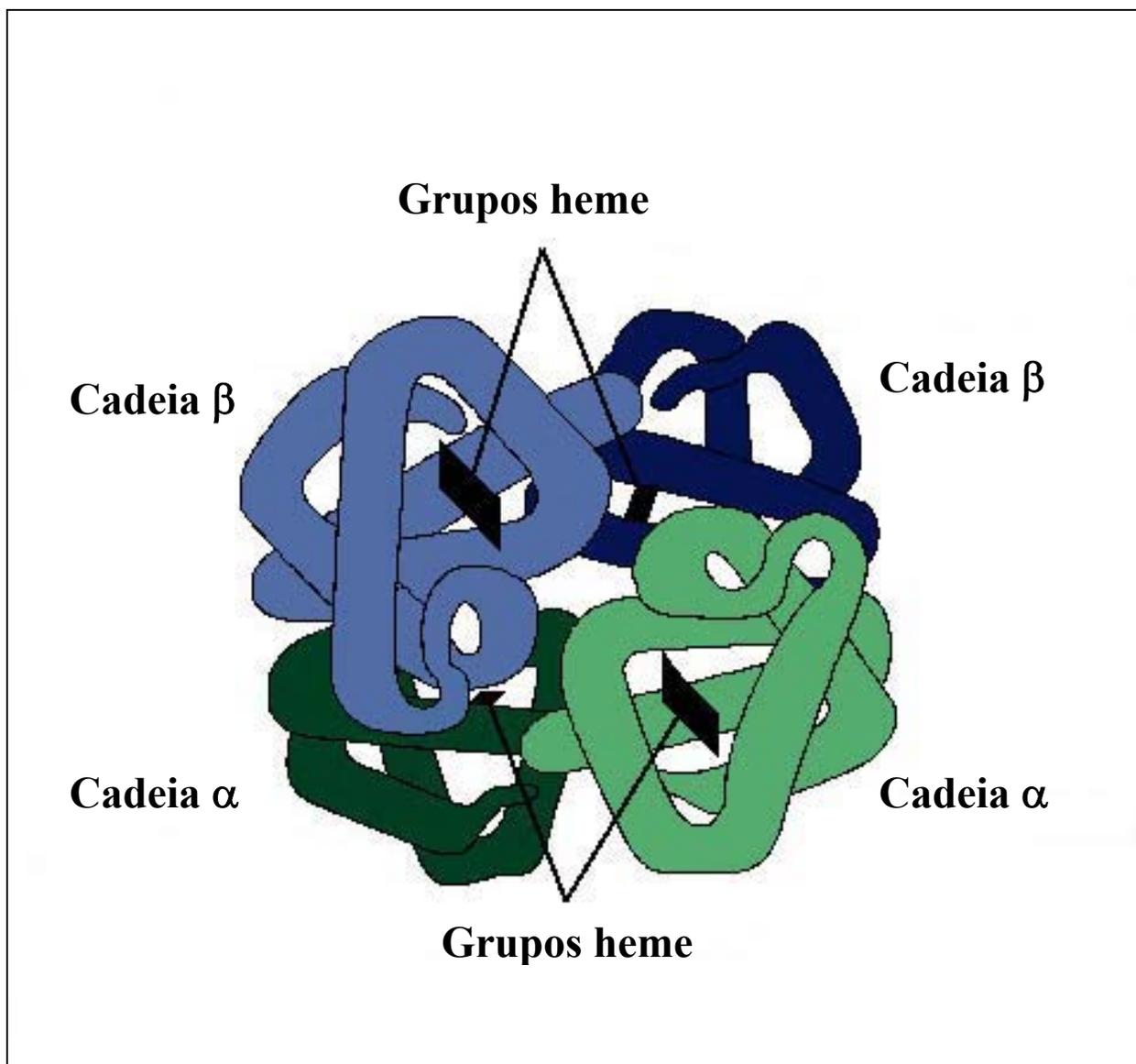


Figura 1.2 - Representação da estrutura da hemoglobina, apresentando suas quatro cadeias polipeptídicas (globinas), cada uma ligada a um grupo heme (Russell, 1996).

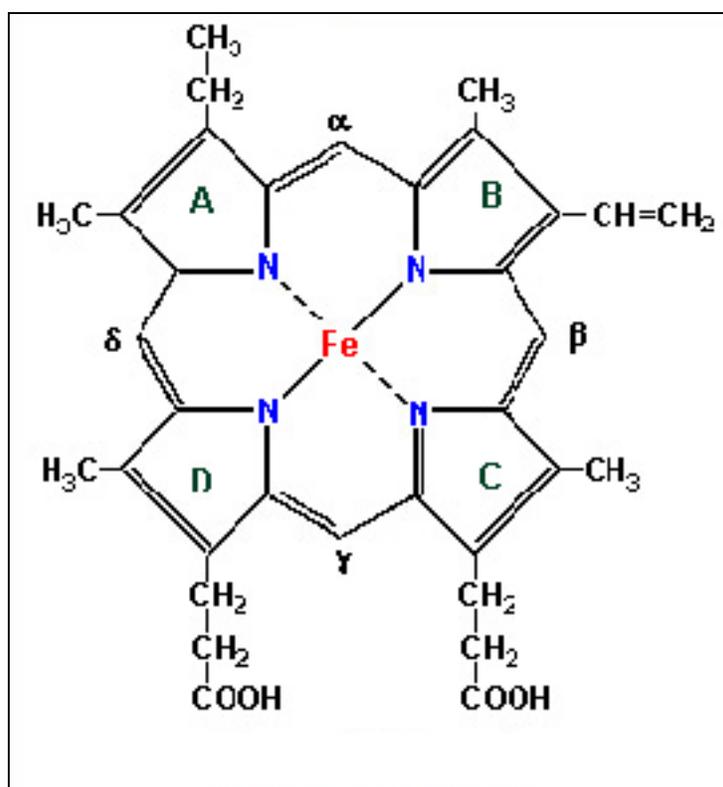


Figura 1.3 - Grupo heme (Russell, 1996).

A afinidade da hemoglobina ao oxigênio pode ser modulada por efetores alostéricos. A concentração de prótons (H^+) modula a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, de forma que, quanto menor o pH da solução de hemoglobina, menor será sua afinidade ao oxigênio. Esse efeito do pH sobre a afinidade Hb-O₂ é denominado efeito Bohr, descrito inicialmente por BOHR et al. (1904), como uma diminuição da afinidade Hb-O₂ devido ao aumento da pressão de CO₂. Uma elevação na temperatura também reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e uma diminuição, o contrário.

Durante a glicólise nos glóbulos vermelhos, há produção de efetores alostéricos como, por exemplo o trifosfato de adenosina (ATP) e o trifosfato de guanosina (GTP) nos peixes e serpentes, o 2,3 - bifosfoglicerato (2,3 - BPG) em mamíferos, fetos de aves antes de eclodir, anfíbios anuros e algumas espécies de peixes e, inosítois, em aves e alguns peixes. A ligação alostérica preferencial dos fosfatos orgânicos a desoxihemoglobina resulta na diminuição da sua afinidade ao oxigênio (BENESCH et al., 1968; ARNONE, 1972). Um aumento dessas substâncias, desencadeado por um decréscimo de oxigênio nos tecidos, provoca a liberação de oxigênio pela hemoglobina (STORER et al., 1991). Por outro lado, existem outros grupos de animais que apresentam hemoglobinas insensíveis aos fosfatos orgânicos, como ovinos, bovinos, gatos e peixes-bruxa (ciclóstomos).

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

Em condições físicas constantes e na ausência de moléculas moduladoras, a afinidade da hemoglobina ao oxigênio depende, primariamente, da natureza hidrofóbica dos

grupos heme e da função ou atividade específica dos resíduos de aminoácidos que, direta ou indiretamente, a afetam. Como a seqüência de aminoácidos é determinada pelos genes, a afinidade Hb-O₂ intrínseca também o é (POWERS, 1980).

Funcionalmente, a hemoglobina é caracterizada:

- pela sua afinidade ao oxigênio, através de seu P₅₀, que corresponde a pressão de oxigênio necessária para que 50% dessa molécula fique saturada com esse gás;
- pelo efeito Bohr;
- pela sua cooperatividade onde, modificações estruturais da molécula de hemoglobina quando esta se liga ao oxigênio, induzem pequenas alterações na conformação de suas subunidades, de forma que, a oxigenação de um grupo heme pode acelerar as dos demais, na mesma molécula. Essa interação entre as subunidades é expressa pelo coeficiente de Hill “*n*” (RIGGS, 1972).

Cooperatividade (*n*/pH) medida pelo coeficiente de Hill, onde:

$n > 1$ (cooperatividade positiva ou estabilização das interações heme-heme);

$n = 1$ (cooperatividade nula, os sítios ligantes de O₂ são independentes);

$n < 1$ (cooperatividade negativa ou interação heme-heme negativa).

A afinidade hemoglobina-oxigênio é melhor representada pela curva sigmóide (**Figura 1.4**) de dissociação Hb-O₂. Os fatores que aumentam a afinidade da hemoglobina ao oxigênio deslocarão a curva à esquerda e diminuirão o P₅₀, e os fatores que diminuem a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, deslocarão a curva à direita e aumentarão o P₅₀.

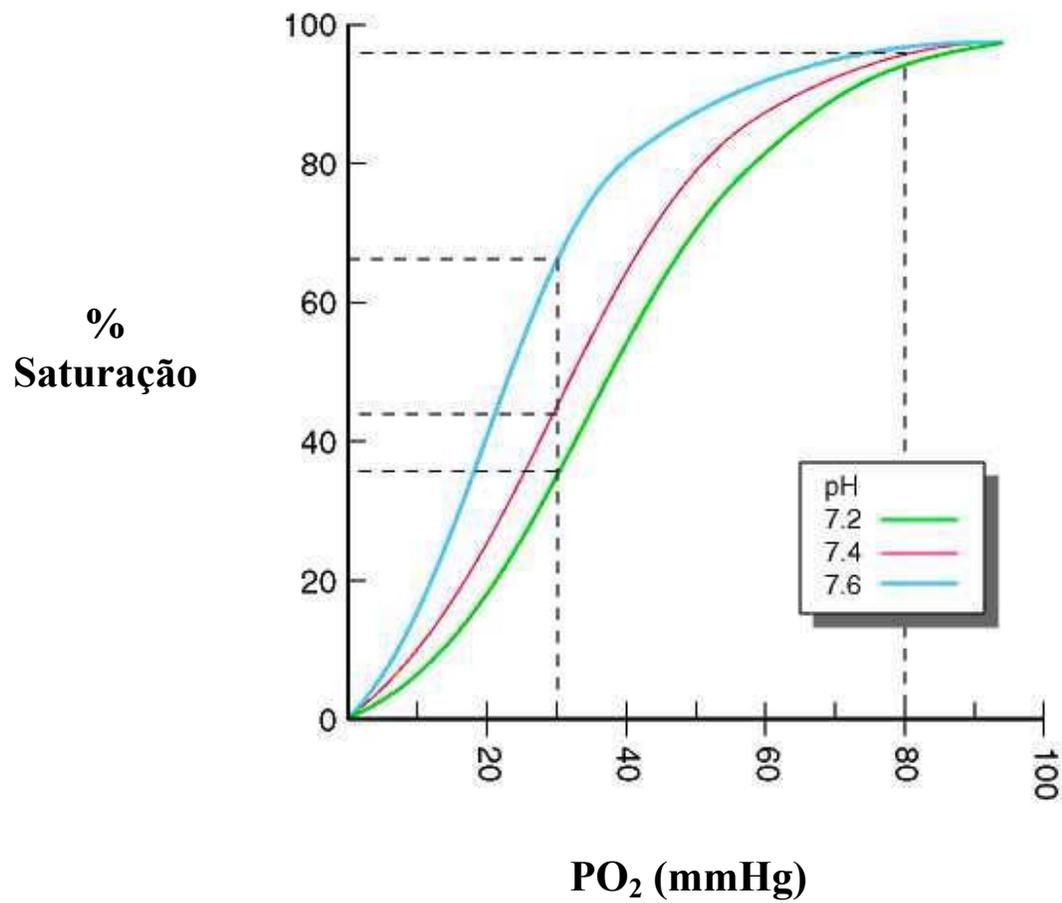


Figura 1.4 - Efeito da afinidade da hemoglobina ao O₂.

1.1.1. Diferenças estruturais entre oxiHb e desoxiHb

As estruturas da hemoglobina em diferentes estados de ligação têm sido intensivamente estudadas, parte por sua importância na medicina e na fisiologia, e parte por ser considerada a proteína modelo para estudos dos mecanismos de mudanças alostéricas e das relações estrutura/função nas macromoléculas biológicas (FADEL, 2000).

1.1.2. Metahemoglobina (metaHb)

Cerca de 1 a 2% das moléculas de hemoglobina encontradas no sangue são meta-hemoglobinas. Esta forma é produto da oxidação do Fe^{+2} (ferroso) em Fe^{+3} (férico). A metaHb pode ser gerada de diversas formas, como por exemplo, devido à baixa estabilidade da oxiHb, que em solução se auto-oxida. A estrutura quaternária da metaHb é igual à da oxiHb, exceto por moléculas de solvente, que presumivelmente ligam-se a cada um dos ferros do grupo heme (ANTONINI, 1971).

1.2. Aves

As aves constituem a maior classe de vertebrados terrestres. Isso pode ser explicado, através da evolução, pela seleção natural de um padrão estrutural muito bem adaptado. Apresentam os membros anteriores transformados em asas e subdivide-se em:

- Ratitas - não apresentam quilha ou carena no osso esterno, têm asas reduzidas e não voam. Exemplos: ordem Rheiformes - ema, ordem Struthioniformes - avestruz, ordem Apteryges - quivi.
- Carinatas - têm quilha ou carena no osso esterno e são capazes de voar, como a maioria das espécies. Exemplos: ordem Ciconiiformes - urubus, ordem Passeriformes - sabiás, ordem Strigiformes - corujas.

O aparecimento das aves deve ter ocorrido no Período Jurássico, de onde datam os primeiros fósseis. Seguramente, evoluíram a partir dos répteis, como demonstram certas semelhanças observadas entre os dois grupos. São endotermos, os sangues arterial e venoso são completamente separados no coração, o metabolismo é elevado, a visão é aperfeiçoada e cuidam da prole. A endotermia as tornam independentes da temperatura ambiental e permite a sua ampla distribuição na terra. O poder de vôo possibilitou às aves ocuparem alguns habitats negados a outros animais (YOUNG, 1971; STORER et al., 1991). Seu intenso metabolismo está adaptado à produção de grandes quantidades de energia num corpo de baixo peso.

A maioria das características anatômicas das aves pode estar relacionada, direta ou indiretamente, à sua endotermia e ao seu tipo de vôo. Segundo ROMER (1970, 1974); YOUNG (1971); VAN TYNE e BERGER (1976); ROMER e PARSONS (1985); SICK (1986); VILLEE et al. (1988) e STORER et al., (1991), tais características se resumem em:

1. Corpo coberto com penas.
2. Dois pares de extremidades, sendo o anterior transformado em asas para voar e o posterior, adaptado para empoleirar-se, andar ou nadar (com palmouras). Cada pé, geralmente, apresenta quatro dedos, sendo a canela e os dedos envolvidos por pele cornificada.
3. Esqueleto delicado, forte, totalmente ossificado; muitos ossos fundidos, dando rigidez. A boca é um bico que se projeta com bainhas córneas, sem dentes. O crânio apresenta um côndilo occipital; pescoço longo e flexível; pelve fundida a numerosas vértebras, mas aberta ventralmente; esterno grande, geralmente com quilha mediana; reduzido número de vértebras caudais forma o pigóstilo.

4. Os ossos do esqueleto são bem leves e quase sempre pneumáticos. Os apêndices peitorais são asas.
5. Separação completa da circulação venosa e arterial; o coração contendo quatro câmaras (dois átrios e dois ventrículos separados); persiste apenas o arco aórtico (sistêmico) direito; glóbulos vermelhos nucleados, ovais e biconvexos.
6. Glândulas cutâneas estão ausentes, com exceção da glândula de óleo uropígea.
7. Respiração por pulmões compactos, relativamente pequenos presos às costelas e ligados a sacos aéreos de paredes finas que se estendem entre os órgãos internos, produzindo uma passagem de ar unidirecional muito eficiente através das superfícies respiratórias; caixa vocal (siringe) na base da traquéia.
8. Doze pares de nervos cranianos.
9. Excreção por meio de rins metanéfricos, sendo o ácido úrico o principal produto de excreção nitrogenada; urina semi-sólida; sem bexiga urinária; um sistema porta-renal.
10. Fêmea, usualmente, apenas com um ovário e ovidutos esquerdos; fecundação interna; ovos com muito vitelo e envolvidos por uma casca calcária e depositados externamente para a incubação; segmentação meroblástica membranas embrionárias (âmnio, cório, saco-vitelino e alantóide) presentes durante o desenvolvimento dentro do ovo; cuidado especial com os filhotes.
11. Temperatura do corpo essencialmente constante, o que caracteriza sua homeotermia e alta taxa de metabolismo responsável pela sua endotermia.
12. Voz, audição e visão altamente desenvolvidas.
13. Capacidade de voar.

1.2.1. Hemoglobinas de aves

As hemoglobinas de muitas espécies de aves são heterogêneas quando analisadas eletroforéticamente ou cromatograficamente, entretanto essa heterogeneidade pode ser considerada baixa. DUNLAP et al. (1956) examinando hemoglobinas de aves em eletroforese em papel, pHs 8,6, detectaram para as ordens Passeriformes (14 espécies), Anseriformes (1 espécie), Galliformes (6 espécies) e Piciformes (2 espécies), dois componentes hemoglobínicos. Também para *Pipelle sp* (jacutinga) e *Penelope sp* (jacupeba), SCHWANTES e TONDO (1969), detectaram dois componentes, utilizando eletroforese horizontal em gel de amido.

Aplicando cromatografia de troca iônica a um grupo de hemoglobinas de aves SAHA (1959) detectou para *Phalacrocorax niger*, *Amaurornis phoeniceus* e *Oriolus xanthornus* a presença de três componentes, enquanto para *Gallus domesticus*, *Acridotheres tristis*, *Anas anas* e *Columba livia*, dois componentes.

Também em outros trabalhos, a baixa heterogeneidade hemoglobínica das aves foi confirmada: HIEBL et al. (1987 a, b, c) para *Aegypies monachos*, *Accipiter gentilis* e *Chloephaga melanoptera* (que apresentam 2 componentes: HbA e HbD); por GODOVAC-ZIMMERMANN (1988) para *Larus ridibundus* (HbA e HbD); por HUBER et al. (1988 a) para o pingüim *Eudyptes crestatus* (apenas um componente hemoglobínico HbA); por HIEBL et al. (1988) para *Gyps rueppellii* (HbA, HbA', HbD e HbD') onde as cadeias β são idênticas e as cadeias de α^A e α^D diferem por somente uma troca de resíduo de aminoácidos; por EGUCHY et al. (1993), para *Coturnix coturnix japonica* (um componente maior QII e um componente menor QI).

Segundo HIEBL et al. (1986), os dois componentes da hemoglobina das três espécies de aves analisadas diferem pelas suas cadeias α : o componente maior tem na sua composição cadeia α^A e o componente menor, α^D .

Em vertebrados, o equilíbrio de oxigênio das várias hemoglobinas é estreitamente adaptado aos requerimentos funcionais de cada espécie.

O desenvolvimento da ave até o momento de adquirir a habilidade de viver no ambiente externo ocorre sob condições de isolamento, dentro do ovo. Após viver em um ambiente isolado, a jovem ave torna-se, gradualmente, adaptada às novas condições de vida. Foram medidas as taxas de adaptação em *Coturnix coturnix pharaoh*, onde evidenciou-se o aumento da síntese de hemoglobina como o primeiro mecanismo adaptativo às novas condições ricas em oxigênio, fora do ovo. Em aves de duas semanas de vida, o aumento na função respiratória do sangue está associado a um aumento paralelo no número de eritrócitos e concentração de hemoglobina (KACZANOWSKA et al., 1987).

Em sangue, as hemoglobinas de aves, de um modo geral, possuem baixa afinidade ao oxigênio, com valores de P_{50} situando-se entre 40 a 50 mmHg (em pH fisiológico). Essa baixa afinidade promove uma descarga eficiente de O_2 nos tecidos, que é benéfico aos animais que possuem altas temperaturas corpóreas e intensa atividade metabólica (JOHANSEN e LENFANT, 1972).

Segundo HALL (1934), o desenvolvimento pós-natal em galinhas, semelhante dos mamíferos e outros vertebrados, é caracterizado pela redução gradual na afinidade de suas hemoglobinas ao oxigênio.

Ao mesmo tempo, os dados de BENESCH et al. (1968) e HALL (1934) com galinhas, mostraram que a ocorrência de mais do que o dobro no valor de P_{50} , entre 20 e

60 dias de desenvolvimento pós-natal é correlacionada com o marcante aumento na concentração de inositol pentafosfato (IP₅) nas suas células vermelhas.

Examinando a respiração pré e pós-natal em galinhas, BARTELS et al. (1966) relataram um grande aumento no valor de P₅₀ ao nascimento (aproximadamente 13 mmHg em 24 horas). Posteriores aumentos nos valores de P₅₀ continuam, gradualmente, até serem atingidos os valores observados no adulto, de 23 a 25 dias. Segundo NEEDHAM (1993), embora as pressões parciais de oxigênio nos tecidos embrionários de galinha sejam relativamente baixas, as afinidades de suas Hbs ao oxigênio são maiores do que as dos adultos.

As curvas de equilíbrio ao oxigênio de hemoglobinas de duas espécies de aves mergulhadoras *Oidemia deglandi* e *Aechmophorus occidentalis* descritas por MANWELL (1985) mostraram efeito Bohr marcadamente reduzido, o que pode ser uma adaptação que permite o transporte de oxigênio nos períodos de acidose, durante e após mergulho.

Animais sujeitos a grandes altitudes possuem maior afinidade do sangue ao oxigênio do que aqueles que embora, filogeneticamente relacionados, vivem em lugares de pequena altitude (BARTELS et al., 1963; BULLARD et al., 1966; CHIODI, 1971).

Em *Gallus gallus* dos Andes, vivendo a 4.000 metros de altitude, foram detectadas hemoglobinas com altas afinidades ao oxigênio. Mesmo após um ano de transferência desses indivíduos para o nível do mar, suas hemoglobinas mantinham altos níveis de afinidade ao oxigênio. Essa característica foi, também, transmitida aos seus descendentes, evidenciando uma resposta genética nessa adaptação e não somente uma modulação de fosfatos (VELARDE et al., 1991).

A um pH de 7,5 e 38°C, a HbA de *Trigonoceps occipitalis*, adaptado a voar em grandes altitudes, apresenta P₅₀ de 6,0 mmHg, enquanto a HbD, um valor de 4,8 mmHg.

Ambas apresentam efeito Bohr similares e uma sensibilidade pronunciada ao IP_5 , que eleva seus valores de P_{50} a 30 e 26 mmHg, respectivamente (HIEBL et al., 1989). Assim, também nessa espécie, as pressões seletivas favoreceram, na situação de hipóxia ambiental, a existência de hemoglobinas com alta afinidade ao oxigênio.

Uma interessante linha de investigação tem sido as estratégias usadas por aves que estariam sujeitas a pressões de oxigênio muito baixas por voarem a grandes altitudes, como nos casos de *Anser indicus* (HIEBL et al., 1987), *Gyps rueppellii* e *Aegyptius monachos* (WEBER et al., 1988), *Larus ridibundus* (GODOVAC-ZIMMERMANN et al., 1988), *Trigonoceps occipitalis* (HIEBL et al., 1989).

Para esses casos, a estratégia usada seria a de possuírem hemoglobinas com altas afinidades ao oxigênio através mudanças na seqüência de aminoácidos das suas cadeias α , em pontos de contato $\alpha_1 \beta_1$. Visto que as interações homo e heterotrópicas na ligação da hemoglobina ao oxigênio são relacionadas às estruturas primárias dos peptídeos constituintes das cadeias, essa alteração favoreceria a forma “relaxada”, ou seja, estrutura R, de alta afinidade (JESSEN et al. 1991).

Estudando diferentes espécies de gansos, PETSCHOW et al. (1977) mostraram que a maior afinidade da hemoglobina de *Anser indicus* (capaz de voar a grandes altitudes) quando comparada com a de *Branta canadensis* e *A. anser anser* (costumam voar de locais de pequena altitude) poderia ser explicada mais pela redução das interações de suas hemoglobinas com os fosfatos orgânicos, do que por diferenças na afinidade intrínseca de suas hemoglobinas ao oxigênio.

Basicamente, podem ser propostos três mecanismos pelos quais um aumento na afinidade do sangue ao oxigênio pode ser alcançado (PETSCHOW et al., 1977):

- a) a afinidade intrínseca da hemoglobina ao oxigênio é alta;

- b) a concentração de fosfatos orgânicos (ATP, BPG, IP₅) que diminuem a afinidade do sangue ao oxigênio, é baixa;
- c) A interação destes fosfatos orgânicos com a hemoglobina é reduzida.

Para *Gyps rueppellii* (falconiformes), HIEBL et al. (1988) relatam a presença de quatro hemoglobinas: HbA, HbA', HbD, HbD' e propõem um novo modelo molecular para sobrevivência das aves em grandes altitudes. As afinidades ao oxigênio medidas para os componentes hemoglobínicos dessa espécie isolados pelo sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) mostraram-se diferentes. Uma vantagem fisiológica resultaria do intercâmbio funcional dos quatro componentes que exibiriam três níveis de afinidade: baixa afinidade (HbA), afinidade intermediária (HbA') e alta afinidade (HbD/D'). Essa vantagem seria sustentada pelos mecanismos de duplicação do genoma- α (que criaria as diferentes hemoglobinas) e as trocas de nucleotídeos (criando diferentes propriedades funcionais), que seriam responsáveis pela marcante tolerância dessa espécie à hipóxia a que ela estaria sujeita voando a 11.300 metros de altitude (HIEBL et al., 1988).

Em outras situações, como no caso da coruja *Athene cunicularia*, medidas do P₅₀ e efeito Bohr do sangue, indicam que, aparentemente, não ocorre adaptação do seu sangue às condições de hipóxia e hipercapnia a que estaria sujeita quando entocada.

As aves adultas até hoje estudadas diferem de outros vertebrados por apresentarem inositol pentafofato (IP₅) como efetor alostérico de suas hemoglobinas (BARTLETT, 1980), que diminui a afinidade dessas ao O₂, em pHs fisiológicos. Em presença de concentração iguais de BPG e IP₅, o IP₅ é mais eficiente que o BPG na diminuição da afinidade da maioria das hemoglobinas ao oxigênio (JOHANSEN e LEFANT, 1972). RIERA et al. (1991) também demonstraram que o IP₅, em concentrações fisiológicas, é o modulador primário da hemoglobina de codorniz.

Estudando as hemoglobinas de nove espécies de aves TAIPEIRO (1999), observou a presença de IP₅ (inositol pentafosfato) em todas as espécies analisadas, a presença de IP₄ (inositol tetrafosfato), apenas em *Athene cunicularia* e IHP (inositol hexafosfato), em três espécies, *Coragyps atratus*, *Mimus saturninus* e *Eupetomena macroura*.

1.2.2. Características gerais das espécies estudadas

1.2.2.1. Ordem: Strigiformes Família: Strigidae

Dessa ordem, *Athene cunicularia* (coruja-buraqueira) possui cabeça redonda, sobranceiras brancas, olhos amarelos, e pernas longas. Ao contrário a maioria das corujas os machos são, ligeiramente, maiores do que as fêmeas e estas, são normalmente mais escuras que os machos. É uma ave tímida, por isso, vive em lugares calmos. Possui uma visão 100 vezes mais penetrante que a visão humana e uma ótima audição. Tem vôo suave e silencioso. Apesar de serem encontradas durante o dia, são aves principalmente crepusculares (ativo ao entardecer e amanhecer), mas poderão caçar, se preciso, ao longo de 24 horas. *A. cunicularia*, como outras aves raptorais, parece utilizar diferentes táticas de caça em diferentes situações, de modo a otimizar a relação custo-benefício durante o comportamento alimentar (MARTINS e EGLER, 1990).

É encontrada com frequência sobre cupinzeiros terrícolas, postes e telhados, vocalizando e movimentando a cabeça para frente e para trás. A posse de tarso-metatarsos longos está ligada aos hábitos terrícolas. Quando voa pode “pairar” no ar.

Alimenta-se de besouros e outros artrópodes; em menor proporção pequenos mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Por alimentar-se de insetos, é muito útil ao homem, beneficiando-o na agricultura. A reprodução da coruja-buraqueira começa entre março e abril. Com o auxílio dos pés e bico escavam um túnel no solo de 1,5 a 3m de profundidade

e aproximadamente 30cm de largura; a câmara de ovipostura é forrada de capim ou esterco secos. Podem também utilizar buracos abandonados de tatus. A fêmea põe de 4 a 8 ovos, a incubação dura de 28 a 30 dias e é executada pela fêmea. Enquanto a fêmea bota os ovos, o macho providencia a alimentação e a proteção para os futuros filhotes. Os cuidados da cria, enquanto ainda estão no ninho são tarefa do macho. Os filhotes ameaçam intrusos com um chocalhar que se assemelha bastante ao matraquear da cascavel, o que quando vem do interior de uma toca, pode amedrontar um eventual predador (SICK, 1997). Quando os filhotes estão com aproximadamente 2 semanas podem ser vistos empoleirados a entrada da cova esperando pelos adultos e pela comida. Os filhotes saem do ninho com aproximadamente 44 dias e começam a caçar insetos quando estão com 49 a 56 dias.

As aves adultas possuem, em média, 21,6 a 27,9cm de comprimento, 50,8 a 61,0cm de envergadura e peso de 170,1g.

A sua distribuição abrange desde o Canadá até a Terra do Fogo, no extremo sul da América do Sul. Vivem nos campos e cerrados de todo o Brasil (SICK, 1997).



Figura 1.5 - Exemplar adulto de *Athene cunicularia* - Coruja-buraqueira (Molina, 1782).

1.2.2.2. Ordem: Ciconiiformes Família: Cathartidae

Dentro dessa ordem, *Coragyps atratus* (urubu-de-cabeça-preta) é uma ave muito conhecida não só devido à sua grande distribuição geográfica como por ser avistada, freqüentemente, planando em bandos a uma altura do solo que pode chegar a 3.000m (SICK, 1997). Nesse vôo planado, aproveita as correntes ascendentes de ar quente para sustentar-se, sem grande gasto de energia metabólica.

Usa como fonte de alimento, animais mortos em decomposição ou, ocasionalmente, vivos, indefesos ou jovens. Podem alimentar-se de animais que morrem por qualquer tipo de infecção, da tuberculose ao botulismo, tudo isso graças à ação neutralizadora do seu suco gástrico e ao seu eficiente sistema imunológico. Alimenta-se também, de ovos, frutos maduros e vegetais em decomposição. Utiliza a visão para localizar o alimento. Os urubus têm importante papel sanitário, pois retiram material orgânico em decomposição de superfície do solo. Possui uma ampla variedade de sítios de nidificação, constroem o ninho no solo, entre vegetação densa ou espinhosa, podendo utilizar cavidades sob rochas ou árvores, raramente a mais de 50cm de altura (SKUTCH, 1969). Os ovos, que medem 67 x 50mm, são de cor cinza ou verde-pálida, com larga mancha marrom e listas negras num dos pólos e mancha marrom em forma de lágrima, no outro. O casal incuba os ovos, durante 32 a 39 dias, e quando nascem os filhotes regurgita-lhes o alimento liqüefeito, de odor desagradável. O filhote ao nascer apresenta uma penugem amarelada e o bico reto colorido de azul-escuro; após 3 semanas sua cor é branco-rosada, com uma estreita faixa negra circundando a cabeça, e as pernas são azuladas; um mês depois, com o tamanho de uma galinha, sua plumagem é castanho-clara, mostrando algumas penas negras. Aos 2 meses, já com a plumagem e o bico negros, tem a pele do pescoço lisa, sem as proeminências

transversais e rugosas da ave adulta. O primeiro vôo dá-se com cerca de 11 semanas de vida.

As aves adultas possuem, em média, 62cm de comprimento, 143cm de envergadura e peso de 1,6Kg, possuindo cabeça e pescoço nus para facilitar a higiene após a alimentação (SICK, 1997).

A sua distribuição abrange o sul dos Estados Unidos e América Central até a Argentina e o Chile (MEYER DE SCHAUENSEE, 1982). No Brasil, está amplamente distribuído, sendo encontrado em cidades, beira-mar, campos, faltando geralmente em largas regiões de floretas (SICK, 1997).



Figura 1.6 - Exemplar adulto de *Coragyps atratus* - Urubu (Bechstein, 1793).

1.2.2.3. Ordem: Passeriformes Família: Mimidae

Pertencendo a ordem Passeriformes, *Mimus saturninus* (sabiá-do-campo), possui uma coloração cinzenta no dorso, alto da cabeça, asas e cauda. O peito e o ventre são de um branco amarelado ou arroxeadado pela terra, íris às vezes amarela. É melhor identificado pela sobrancelha branca proeminente e cauda comprida com as pontas de cor branca (SICK, 1997).

É muito agressivo com espécies de tamanho maior ou igual ao seu que se aproximam dos ninhos ou filhotes e mesmo de árvores frutíferas, que defendem com fonte de alimento. Movimentam-se em largos saltos ou correm pelo chão, voam muito bem.

Alimenta-se de insetos, aranhas, minhocas, frutos silvestres, sementes e ocasionalmente predam ninhos com ovos de outros pássaros.

O ninho é uma tigela rasa, volumosa, em geral a 1,5m do solo e firmemente preso a um arbusto; confeccionado externamente com gramíneas e ramos às vezes espinhos e com gramíneas e raízes finas no interior. Na construção do ninho e na alimentação dos filhotes, colaboram os “ajudantes”, que são indivíduos geralmente pertencentes à mesma família, porém nascidos de posturas anteriores. Têm até quatro posturas por ano e cada uma delas com até 5 ovos azul-claros ou verde-claros, salpicados de castanho ou castanho-vináceo, medindo 25 x 21mm. É possível que apenas a fêmea se ocupe da incubação.

Espécie de ampla distribuição na América Latina, são campestres, vivendo em regiões semi-áridas e em geral prefere habitar campos abertos com árvores esparsas e vegetação arbustiva. É comum nas capoeiras, no cerrado ralo e nos campos de pastagens das fazendas. Pode ser observado também nas montanhas, buritizais e áreas urbanas (SICK, 1997).

As aves adultas possuem, em média, 26cm de comprimento, 29cm de envergadura e peso de 26g (SICK, 1997).

A sua distribuição abrange regiões campestres do baixo Amazonas, através do Brasil central, Nordeste, Leste e Sul até o Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia.



Figura 1.7 - Exemplar adulto de *Mimus saturninus* - Sabiá-do-campo (Lichtenstein 1823).

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar, estrutural e funcionalmente, as hemoglobinas de três espécies de aves, em relação a sua afinidade ao oxigênio, em sangue e em solução.

2. Estudar o efeito de efetores alostéricos, principalmente de inositóis, na modulação da afinidade da hemoglobina ao oxigênio.

3. Determinar os fosfatos orgânicos, principalmente inositóis, presentes nos eritrócitos das espécies estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados indivíduos adultos de três espécies diferentes de aves: 2 exemplares de *Athene cunicularia* - Coruja-buraqueira, 2 de *Coragyps atratus* - Urubu e 2 de *Mimus saturninus* - Sabiá-do-campo, coletados no Campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

3.1. Sangue e solução de hemoglobina

O sangue foi retirado de espécimes adultos, por punção, da veia braquial, com o auxílio de seringas heparinizadas. Posteriormente, foi colocado em tubo de ensaio e mantido a temperatura de 0°C, em gelo fundente, para extração de fosfato e equilíbrio de O₂ em sangue.

A amostra de sangue destinada ao estudo da função da hemoglobina em solução foi centrifugada a 4°C, em uma centrífuga refrigerada **SORVALL**, modelo **RC-5B**, a 1.085g, para separação do plasma. Os eritrócitos foram lavados três vezes consecutivas com solução salina 0,9% (NaCl 9g / 1.000mL H₂O). Após este procedimento, o precipitado (eritrócitos) foi mantido em congelador, a - 20°C, em tubos de ensaios para serem utilizados em experimentos posteriores.

Caracterização Estrutural e Funcional de Hemoglobinas de Três Espécies de Aves

Quando para uso imediato, após a última lavagem, a amostra foi hemolisada adicionando-se Tris HCl - 10 mM, EDTA alcalino - 50 mM, pH 8,0. Em seguida, a amostra foi congelada e descongelada por três vezes para uma hemólise mais efetiva, e centrifugada em centrífuga refrigerada **SORVALL**, modelo **RC-5B** durante 20 minutos a 20.200g.

A solução de hemoglobina assim obtida, foi utilizada em eletroforese em gel de amido, nos experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina *stripped* e de efeito dos fosfatos intraeritrocitários.

Ordens	Famílias	Espécie	Nomes vernáculos
STRIGIFORMES	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira (2)
CICONIIFORMES	Cathartidae	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu (2)
PASSERIFORMES	Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá - do - campo (2)

Tabela 3.1 - Espécies estudadas segundo ordem, família, nomes vernáculos e número de exemplares utilizados (entre parênteses). Fonte Sick (1997).

3.2. Extratos de fosfatos orgânicos intraeritrocitários

Para o cálculo da quantidade de fosfatos presentes nos eritrócitos foram determinados o volume e hematócrito das amostras. Cada amostra foi centrifugada em centrífuga refrigerada **SORVALL**, modelo **RC-5B**, durante 5 minutos a 1.085g a 4°C, para a separação do plasma a ser descartado. Às células empacotadas, foi adicionado ácido perclórico 7% para que ocorra a lise das células e liberação dos fosfatos intraeritrocitários. Novamente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio (plásticos). O precipitado foi lavado mais duas vezes com ácido perclórico 7% e o sobrenadante transferido para o mesmo tubo da primeira lavagem (BARTLETT, 1959).

Após a preparação, os extratos foram neutralizados com solução de KOH (hidróxido de potássio) 6M, usando como indicador *phenol red* e, a seguir, congelados a - 20°C. Para a extração dos fosfatos, é necessário que o sangue seja recém retirado do animal.

3.3. Equilíbrio de oxigenação em sangue

O método baseia-se na determinação contínua do O₂ dissolvido em solução tamponada, contendo sangue e fermento biológico. O fermento consome, inicialmente, todo o oxigênio dissolvido na solução, e na tentativa de manter equilíbrio da pressão parcial de O₂, o sangue cede o O₂ ligado à hemoglobina, ao meio. O pH pode influenciar a resposta do sangue quando este cede O₂ ao meio.

As curvas de dissociação da Hb-O₂ no sangue foram traçadas em diferentes pHs com tampões Bis - Tris / HCl (0,1M - pH 6,0 a 7,4) e Tris - HCl (0,1M - pH 7,6 a 9,0) e com auxílio de um monitor biológico **YSI** e um registrador **CG**, segundo metodologia descrita por MANGUN e KODON (1975) e JOHANSEN et al. (1978a).

Foram colocados 5mL de cada tampão, fermento e algumas gotas de sangue na cubeta do eletrodo polarográfico. Após vigorosa agitação dessa solução, o equipamento foi rapidamente ligado e a curva de consumo de O₂ foi detectado por um eletrodo polarográfico e registrada num registrador gráfico. O pH inicial e final foram anotados. As curvas obtidas assinalam a variação decorrente do consumo de O₂ do meio pelo fermento e da tentativa de manutenção de um equilíbrio pelo sangue.

As pressões parciais de oxigênio necessárias para uma saturação de 20, 40, 50, 60, e 80% de O₂ do sangue, foram então obtidas pela fórmula:

$$PO_2(n) = \frac{PB \times 0.2098 \times Ln}{4L_{100}}$$

Onde:

PB = pressão barométrica

Ln = leitura obtida para cada percentagem de saturação

L₁₀₀ = leitura em 100%

n = porcentagem de hemoglobina ligada ao O₂

Os valores de P₅₀ (pressão de oxigênio necessária, para saturar 50% da Hb) foram convertidos para a forma logarítmica e plotadas contra o pH final. As curvas de efeito Bohr ($\phi = P_{50} / \Delta pH$) foram traçadas a partir de regressão linear. Os resultados obtidos foram expressos em forma logarítmica, e foi construído o gráfico Y/1 - Y em função de log PO₂.

PH	Sal	Molaridade
6,0	Bis-Tris-HCl	0,1
6,2	Bis-Tris-HCl	0,1
6,4	Bis-Tris-HCl	0,1
6,6	Bis-Tris-HCl	0,1
6,8	Bis-Tris-HCl	0,1
7,0	Bis-Tris-HCl	0,1
7,2	Bis-Tris-HCl	0,1
7,4	Bis- Tris-HCl	0,1
7,6	Tris-HCl	0,1
7,8	Tris-HCl	0,1
8,2	Tris-HCl	0,1
8,7	Tris-HCl	0,1
9,0	Tris-HCl	0,1

Tabela 3.2 - Tampões utilizados em experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina em sangue de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

3.4. Hemoglobina *stripped* e redução de metahemoglobina

Para obtenção de uma solução de hemoglobina isenta de efetores alostéricos – *stripped*, e para a redução da metahemoglobina, geralmente presente, essa foi filtrada em coluna de **Sephadex G-25**, com presença de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Como a hemoglobina não se liga a resina, elui rapidamente pela coluna. Quando essa passa pelo ditionito de sódio (ligado a resina), reduz-se totalmente, passando a desoxihemoglobina. Ao sair da coluna, a hemoglobina entra em contato com o ar atmosférico, oxigenando-se por completo e conservando o ferro reduzido (valência 2). A resina foi empacotada em uma coluna de 35,0cm de comprimento por 1cm de diâmetro e equilibrada com solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Após estar a resina equilibrada, a coluna foi fechada, retirando-se o eluente que estava acima do topo da resina. A seguir, foi adicionado à coluna, aproximadamente, 1,0mL de solução de ditionito de sódio a 5%, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A coluna foi aberta e tão logo a solução de ditionito penetrou na resina, aplicamos de 2 a 3mL de solução de hemoglobina, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A seguir, a coluna foi ligada a um reservatório contendo Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

A primeira fração de hemoglobina a sair da coluna, foi descartada, devido a sua alta diluição. A segunda fração coletada em um tubo de ensaio foi a amostra de hemoglobina *stripped* utilizada nos experimentos de equilíbrio de oxigenação. Estes procedimentos foram realizados, no máximo 20 minutos antes do início dos experimentos.

3.5. Método espectrofotométrico

De acordo com o seu grau de oxigenação, a hemoglobina expõe diferentemente os átomos de ferro de seus grupos tetrapirrólicos (ANTONINI e BRUNORI, 1971; VILLELA, 1979). Hemoglobinas com taxas de oxigenação diferentes possuem diferentes conformações espaciais, com diferentes espectros de absorção medidos entre 500 e 600nm. Através da análise desses espectros diferenciais pode-se correlacionar pressão de oxigênio e taxa de oxigenação da hemoglobina.

A afinidade da Hb ao oxigênio foi determinada de acordo com o método descrito por RIGGS e WOLBACH (1956). Foram usados tonômetros cuja parte inferior é uma cubeta de vidro de 1,0cm de percurso.

Para determinação do volume da solução de hemoglobina no tonômetro usamos a seguinte fórmula:

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

Onde:

V = volume de hemoglobina para os tonômetros

0,85 = densidade ótica desejada em 580nm

3,0 = volume da cubeta dos tonômetros

L = leitura da concentração de hemoglobina em 580nm

60 = diluição

Ao volume da solução de Hb (determinada pela fórmula acima) foi adicionado 0,3 mL de tampão Tris ou Bis-Tris, 0,1 M (**Tabela 3.3**) e de água destilada para completar 3mL.

A partir daí, a amostra *stripped* de hemoglobina foi desoxigenada por meio de injeções de nitrogênio (N₂) e em seguida, submetida a vácuo, com subsequente agitação em

banho rotativo. Após a desoxigenação foi traçado um espectro de absorção de 500 a 600 nm em um espectrofotômetro **HP UV-VIS**, modelo **G 1107A** acoplado a um micro computador **IBM** compatível. Obtida a primeira curva, foram injetadas quantidades crescentes e conhecidas de ar, e traçados novos espectros.

Efetuada-se um mínimo de 4 injeções de ar, cada tonômetro foi aberto a pressão ambiente de O₂ sobre a amostra, sendo traçada a ultima curva que corresponde ao espectro de absorção da hemoglobina 100% oxigenada.

A partir dos espectros de absorção obtidos, as oxigenações parciais da hemoglobina foram calculadas, em três comprimentos de onda (540, 560 e 580nm) onde obtemos a média aritmética das oxigenações parciais de cada injeção de ar (Y).

Para cada oxigenação a pressão de O₂ foi calculada pela fórmula:

$$PO_2 = R \times V$$

Onde:

PO₂ = pressão de oxigênio no interior do tonômetro.

V = volume de ar injetado.

R = constante determinada pela seguinte fórmula:

$$R = \frac{T_b / T_a \{0,2098[PB_c - (P_v \times UR)]\}}{V_t - V_a}$$

Onde:

T_b = temperatura do banho em °K

T_a = temperatura ambiente em °K

PB_c = pressão barométrica corrigida

P_v = pressão de vapor da água

UR= umidade relativa do ar

V_t = volume interno do tonômetro

V_a = volume da amostra colocada no tonômetro

Para cada tonômetro foi traçado um gráfico de $\log PO_2$ x $\log Y/1-Y$ determinando-se o valor de P_{50} e o coeficiente de Hill (n) pela declividade da reta obtida.

O coeficiente de Hill (n) indicou a cooperatividade das interações heme-heme, correspondendo ao valor do coeficiente angular da reta de regressão obtida para $PO_2/\log Y/1-Y$.

A pressão de oxigênio necessária para saturar 50% de hemoglobina (P_{50}), corresponde ao valor zero de $\log PO_2/\log Y/1-Y$. Como as curvas foram feitas em diferentes pHs, foi traçada a curva final do efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50}/\Delta pH$).

PH	Sal	Molaridade
6,4	Bis-Tris-HCl	0,1
6,6	Bis-Tris-HCl	0,1
6,8	Bis-Tris-HCl	0,1
7,2	Bis-Tris-HCl	0,1
7,4	Bis-Tris-HCl	0,1
7,6	Tris-HCl	0,1
7,8	Tris-HCl	0,1
8,2	Tris-HCl	0,1
8,6	Tris-HCl	0,1
9,2	Tris-HCl	0,1

Tabela 3.3 - Tampões utilizados em experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina *stripped* e com adição de fosfatos de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

3.5.1. Adição de fosfatos orgânicos

Desenvolvendo a mesma metodologia descrita em 3.5, verificamos o efeito dos fosfatos orgânicos BPG e IHP, numa relação molar de 1:8 (Hb-fosfato orgânico), na afinidade da hemoglobina ao oxigênio.

O volume necessário de solução de fosfato para produzir essa relação molar, foi calculado pela fórmula:

$$-\frac{mM.N \frac{vol.N}{vol.amostra}}{[Hb]/4} = 8$$

Onde:

mM. N = molaridade da solução de fosfato

Vol. N = volume de solução de fosfato para gerar a relação 1: 8

4 = número de subunidades por tetrâmero de Hb

8 = relação modulador/tetrâmero de Hb desejada

[Hb] = Concentração de Hb lida em 577nm (0,85/14,6)

O volume de efetor, assim determinado, foi adicionado ao tonômetro juntamente com o tampão e a amostra de hemoglobina, mantendo o volume final igual a 3mL.

3.6. Eletroforese

É um método físico-químico de separação, utilizado no estudo da estrutura de compostos biológicos. Diferentes proteínas diferem em sua seqüência de aminoácidos e no conteúdo dos mesmos, bem como, na sua carga líquida a um dado pH. A eletroforese utiliza-se dessa diferença para, num campo elétrico, separar proteínas. Tal método foi

utilizado para verificar o padrão eletroforético das amostras, verificando a existência ou não de variação intraespecífica.

3.6.1. Eletroforese em gel de amido

O sistema de eletroforese em gel de amido utilizado foi o horizontal descrito por SMITHIES (1955, 1959). Na preparação do gel foi utilizado amido de milho, obtido segundo Val et al. (1981), a uma concentração de 13%. Nesse sistema, as proteínas são separadas segundo sua carga elétrica, e os poros do gel atuam como um filtro, separando as moléculas segundo seus tamanhos e formas.

Para confecção do gel, usamos o tampão Tris-Borato-EDTA ácido pH 8,6 (0,9M Tris; 0,5M ácido bórico; 0,02M EDTA ácido), diluído 40 vezes com molaridade final de 0,036M. Nesse pH, a concentração do amido 13% é suficiente para obter um gel com boas propriedades mecânicas e separativas. Nas cubas, foi utilizado o Borato pH 8,6 (0,35 M ácido bórico, pH acertado com NaOH 50%).

Ao término da cocção e deaeração, o gel foi despejado uniformemente em uma placa de acrílico, untada com óleo mineral para facilitar sua posterior retirada.

Após o resfriamento do gel até 4°C, as amostras foram aplicadas através de retângulos de papel **WHATMAN 3MM** (10 x 6mm) embebidos nas amostras de Hb e inseridos a uma distância de 7cm de distância da extremidade catódica do gel.

As migrações eletroforéticas foram feitas a 4°C, sendo aplicado ao gel, um potencial de 5V/cm e 1,25mA/cm durante 6 horas utilizando-se uma fonte de tensão **Permatron**. Ocorrida a migração, o gel foi cortado no sentido horizontal, sendo a metade superior corada com amido *black*, para proteínas totais, e a inferior, tratada com benzidina, para revelação pela atividade peroxidásica das hemoglobinas (**Tabela 3.4**). Na lavagem dos géis, foram utilizadas soluções descritas na **Tabela 3.5**.

Foi adicionado KCN às amostras e ao gel, já que a forma cianometahemoglobina é mais estável, permitindo a obtenção de uma melhor resolução.

3.6.2. Transparentização

Após a revelação das bandas em gel de amido, as eletroforeses foram “transparentizadas”, colocando-as entre duas folhas de papel celofane esticadas num bastidor e, submetidas à desidratação em temperatura ambiente.

Este procedimento permite a conservação dos géis, mantendo-os secos, o que facilita a posterior análise desses.

AMIDO BLACK 10B (proteína total)		BENZIDINA (proteínas com atividade peroxidásica)	
Solução saturada de amido black		Benzidina	1g
Metanol	1 volume	Nitroprussiato de Na	1 cristal
Água destilada	1 volume	Metanol (qsp)	75mL

Tabela 3.4 - Soluções para revelação de hemoglobinas.

AMIDO BLACK 10B		BENZIDINA	
Ácido acético	0,2 volumes	Éter	1 volume
Metanol	1 volume	Metanol	2 volumes
Água destilada	1 volume	Ácido acético (qsp) para baixar o pH a 4,0	
		Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) 20V- 0,5mL	

Tabela 3.5 - Solução de lavagem do gel de amido.

3.7. Cromatografia de fosfatos intraeritrocitários

A cromatografia de troca iônica baseia-se no aprisionamento eletrostático de moléculas com cargas contrárias à da resina. Fazendo-se um gradiente de tampão, obtém-se uma troca seletiva das moléculas aprisionadas.

3.7.1. Fosfatos orgânicos não inositolis (nucleotídeos)

Para a análise dos nucleotídeos, extraídos dos eritrócitos, foi utilizada uma coluna cromatográfica, 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 (DE VITTO 1994). 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, GDP e 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 espécie 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.

3.7.2. Inositóis

Foi determinado uma curva padrão em concentrações conhecidas e crescentes de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). À essas soluções foram adicionados 0,5mL de H_2SO_4 10N, 0,2mL de molibdato de amônio 5%, 0,2mL de reagente de *Fisk & Subbarow* a 0,25% (15g de NaHSO_3 ; 250mg de redutor de *Fisk & Subbarow* e 500mg de Na_2SO_3) e água deionizada. Os tubos foram agitados. A coloração azul obtida foi proporcional à concentração de fósforo. As densidades ópticas foram obtidas em 830nm e convertidas em molaridade. Os fosfatos foram cromatografados segundo a metodologia descrita por BARTLETT (1959).

Utilizamos a resina DOWEX 1 x 8 (400 *mesh*), empacotada numa coluna de 1,0 cm de diâmetro interno por 28,0cm de comprimento, que foi previamente tratada com água deionizada, Formiato de amônia / Ácido fórmico 5M e novamente água deionizada com a finalidade de eliminar os contaminantes.

O extrato de fosfato foi centrifugado a 3.000g durante 5 minutos e o sobrenadante aplicado a coluna. Com a finalidade de retirar os fosfatos que não sejam inositóis (NAD, AMP, ADP, ATP e DPG), foi aplicada à coluna uma solução de ácido fórmico 5M / formiato de amônia 5M, lavando-a posteriormente, com água deionizada.

A seguir, dois vasos comunicantes, um contendo 400mL de água deionizada e outro contendo 400mL de HCl 1N, foram conectados a coluna por intermédio de uma bomba peristáltica. Submetemos a coluna a um fluxo constante de 1,0mL/minuto e a um gradiente linear de 0 a 1N de HCl, para a separação dos inositóis. Utilizamos um coletor de frações **REDIRAC** para obtermos frações de 5mL de eluato.

A quantidade de cada inositol fosfatado foi determinada pelo seu conteúdo de fósforo. Para tanto, 0,5mL de cada fração obtida foi transferida para tubos de ensaio, aos quais adicionamos 0,5mL de H₂SO₄, 10N, colocando-os numa estufa **FANEN**, modelo **320 SG**, com circulação mecânica de ar, a 180°C durante 3 horas, para que ocorra a hidrólise dos fosfatos orgânicos. Duas gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram, então, adicionadas a cada tubo que foram mantidos por mais uma hora, na estufa.

Com o auxílio de dispensadores **Oxford**, adicionamos a cada um dos tubos já resfriados, 0,2mL de molibdato de amônio 5%, 0,2mL de reagente de *Fisk & Subbarow* a 0,25% e 4,6mL de água deionizada para obtermos o volume final de 5mL. A seguir, os tubos foram agitados e levados a banho-maria a 100°C, por mais 10 minutos quando obtivemos uma coloração azul, diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico da amostra. Sua densidade óptica foi determinada em 830nm. A concentração de fósforo foi calculada através da curva de calibração conforme descrita anteriormente.

3.8. Determinação de BPG

A determinação dos níveis de 2,3 - bifosfoglicerato (2,3 - BPG) intraeritrocitário foi realizada através de um Kit da **Sigma Diagnostics**. Este kit baseia-se na reação de conversão do 2,3 - BPG 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 2,3 - BPG originalmente presente.

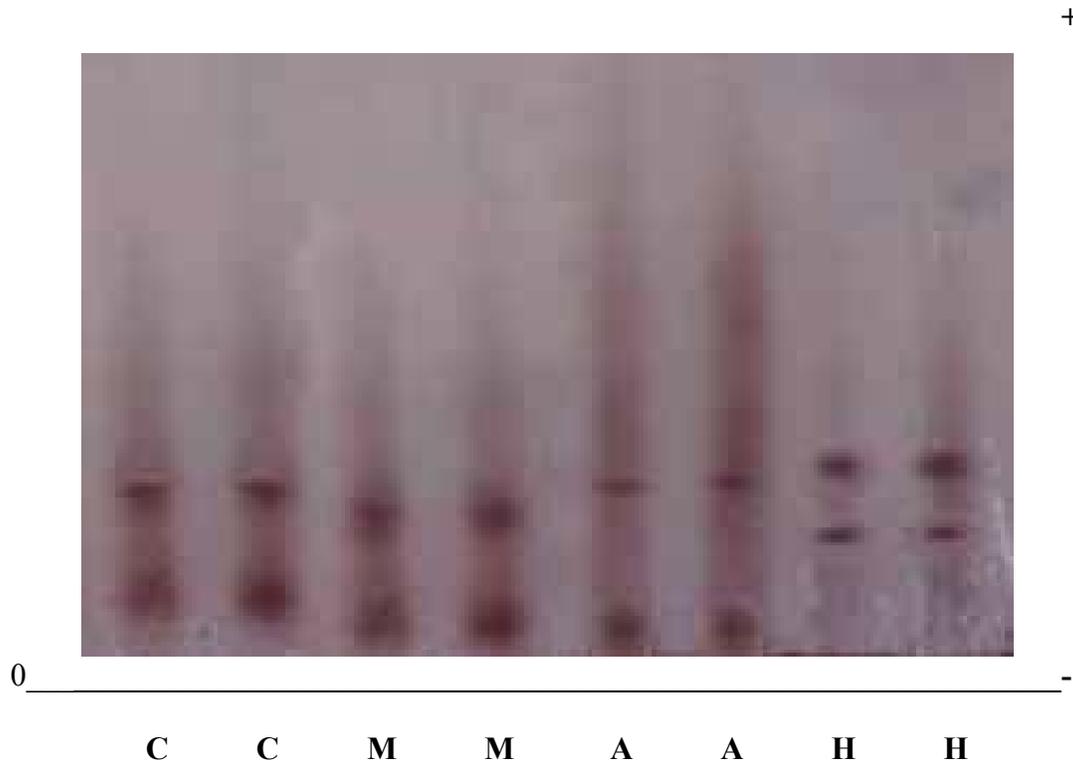
4. RESULTADOS

4.1. Eletroforeses

A fim de identificar os diferentes componentes hemoglobínicos, foram realizadas eletroforeses em gel de amido para as três espécies em estudo, onde visualizamos a presença de 2 componentes hemoglobínicos. *Athene cunicularia* e *Coragyps atratus* apresentaram um componente maior lento e um menor rápido, padrão típico de hemoglobina de aves. *Mimus saturninus* apresentou dois componentes maiores de mobilidade próxima ao das outras espécies aqui estudadas (**Fig. 4.1**).

Os padrões eletroforéticos não variaram entre indivíduos de uma mesma espécie.

(1)



(2)

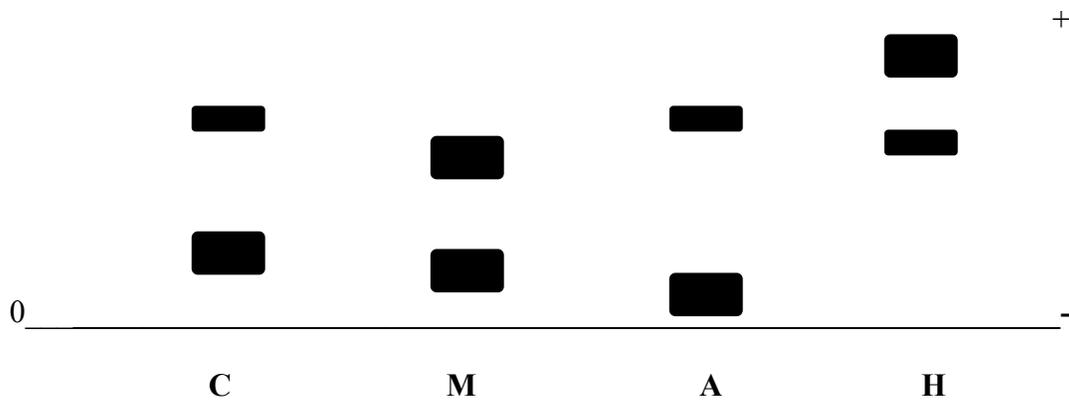


Figura 4.1 - Fotografia do gel (1) e representação esquemática (2) dos padrões eletroforéticos das hemoglobinas das espécies de aves analisadas: *A. cunicularia* (A), *M. saturninus* (M), e *C. atratus* (C), comparativamente a humana (H).

4.2. Hematócrito

Apesar dos poucos estudos quantitativos sobre os parâmetros hematológicos em aves, achamos importante o estabelecimento de suas variações normais para possíveis respostas adaptativas. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.1**.

Espécie	Hematócrito
<i>Athene cunicularia</i>	52 %
<i>Coragyps atratus</i>	56 %
<i>Mimus saturninus</i>	53 %

Tabela 4.1 - Valores de Hct encontrados, para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

4.3. Estudos funcionais

As afinidades das Hbs pelo O₂ em função do pH, das espécies aqui analisadas, encontram-se na **Tabela 4.2** e **Figuras 4.2, 4.3 e 4.4**.

As amplitudes do efeito Bohr ($\phi = \log P_{50} / \Delta\text{pH}$) foram obtidas por análises de regressão linear em todos os pHs estudados.

4.3.1. Equilíbrio de oxigenação

Estes experimentos foram realizados com o intuito de se descrever o comportamento funcional das hemoglobinas de *Athene cunicularia*, *Coragyps atratus* e *Mimus saturninus* em sangue, em solução (*stripped* e na presença de BPG e IHP).

4.3.1.1. Método gasométrico e espectrofotométrico

Os experimentos de equilíbrio de O₂ em sangue não fracionado (método gasométrico), foram realizados no sentido de podermos nos aproximar mais da situação *in vivo*, visto que temos no sangue, além de hemoglobina, outras moléculas, que podem estar atuando como moduladores da afinidade Hb-O₂.

4.3.1.1.1. *Athene cunicularia*

Os resultados obtidos para o comportamento funcional das hemoglobinas em sangue e *stripped* de *A. cunicularia*, mostram efeito Bohr normal, ou seja, valores mais elevados de P₅₀ a medida que o pH se acidificava, em todos os tratamentos. Os coeficientes de Hill (*n*) encontram-se próximos de 1,0, demonstrando baixa ou nenhuma cooperatividade.

Em sangue, obtivemos valores de P₅₀ = 15,84 mmHg, em pH próximo a 7,5, com amplitude de efeito Bohr de $\phi = - 0,26$. Tal valor quando comparado com os valores obtidos em Hb *stripped* à 40°C, 21°C e 4°C indica uma maior afinidade ao oxigênio pela hemoglobina na ausência de moduladores (**Tabela 4.2 e Figura 4.2**).

Sob a influência de inositol hexafosfato, o hemolisado apresentou um aumento da amplitude de efeito Bohr ($\phi = - 0,39$) e do P₅₀ = 17,78 mmHg, em pH 7,5, (**Tabela 4.2 e Figura 4.2**), sugerindo, ser o IHP um modulador muito efetivo na afinidade da Hb. Este efeito não foi observado com a adição de 2,3 - BPG, onde os valores de Bohr $\phi = - 0,23$ e P₅₀ = 6,60 mmHg, próximo dos valores obtidos com Hb *stripped* (**Tabela 4.2 e Figura 4.2**).

Em *Athene cunicularia* os valores de P₅₀ obtidos para os tratamentos *stripped* à 4°C, 21°C e 40°C foram de 2,88, 7,24 e 10,00 mmHg, em pH 7,5, respectivamente com

amplitudes de Bohr $\phi = - 0,25$, $- 0,27$ e $- 0,31$, demonstrando um aumento da afinidade da Hb ao oxigênio a medida que se diminui a temperatura.

4.3.1.1.2. *Coragyps atratus*

As hemoglobinas de *C. atratus* apresentaram um comportamento funcional semelhante ao de *A. cunicularia* com efeito Bohr normal em todos os tratamentos. Os coeficientes de Hill mostraram-se próximos à 1,0 (**Tabela 4.2 e Figura 4.3**) nos pHs estudados, indicando baixa ou cooperatividade ausente entre os grupos heme. Em sangue o hemolisado apresentou uma amplitude de efeito Bohr na ordem de $\phi = - 0,47$ e valor de $P_{50} = 13,18$ mmHg, em pH 7,5, (**Tabela 4.2 e Figura 4.3**), também demonstrando uma menor afinidade ao oxigênio pela hemoglobina, quando comparado com os valores obtidos em Hb *stripped* à 21 e 4°C e valor muito próximo ao obtido no tratamento Hb *stripped* à 40°C.

Na presença de fosfatos os valores de efeito Bohr foram de $\phi = - 0,67$ e $\phi = - 0,29$ e $P_{50} = 36,30$ e $9,54$ mmHg (pH 7,5) para IHP e 2,3 - BPG respectivamente (**Tabela 4.2 e Figura 4.3**), mostrando que o IHP também é o modulador mais efetivo para *C. atratus*.

Para *Coragyps atratus* também observamos uma diminuição da afinidade da Hb nos experimentos *stripped* realizados à 40°C com valor de $P_{50} = 13,8$ mmHg (pH 7,5) e amplitude Bohr $\phi = - 45$ comparados aos tratamentos realizados à 21 e 4°C que tiveram valores de $P_{50} = 10,47$ e $3,80$ mmHg (pH 7,5) respectivamente (**Tabela 4.2**).

4.3.1.1.3. *Mimus saturninus*

As hemoglobinas de *M. saturninus* também apresentam efeito Bohr normal em todos os tratamentos com valores de coeficientes de Hill (n) próximos a 1,5 indicando baixa cooperatividade entre os grupos heme (**Tabela 4.2 e Figura 4.4**). Em sangue total

obtivemos efeito Bohr com amplitude igual a $\phi = - 0,43$ e $P_{50} = 14,45$ mmHg (pH7,5) também demonstrando uma menor afinidade ao oxigênio pela hemoglobina em comparação aos valores obtidos na análise do hemolisado *stripped* à 40, 21 e 4°C (**Tabela 4.2 Figura 4.4**).

No estudo do comportamento funcional das Hb de *M. saturninus* na presença de fosfatos, IHP e 2,3 - BPG, obtivemos amplitudes de efeito Bohr na ordem de $\phi = - 0,48$ e $\phi = - 0,34$ respectivamente e valores de $P_{50} = 16,98$ e 6,60 mmHg, em pH próximo a 7,5 (**Tabela 4.2 Figura 4.4**). Mais uma vez evidenciamos o IHP como sendo o modulador mais efetivo.

No estudo das características funcionais das Hb de *M. saturninus* novamente ficou evidente o efeito da temperatura na afinidade das Hb ao oxigênio, com valores de $P_{50} = 13,18$ (pH 7,5) para o tratamento *stripped* à 40°C e $P_{50} = 9,54$ e 1,73 (pH 7,5) para os experimentos realizados a 21 e 4°C respectivamente (**Tabela 4.2**).

4.3.1.2. Comparação entre o comportamento funcional das 3 espécies estudadas

Com o propósito de mostrar as semelhanças de comportamento funcional entre as 3 espécies estudadas construímos gráficos mostrando o comportamento das três espécies em cada condição experimental estudada: *stripped* a 40°C, 21°C e 4°C, *stripped* + IHP e BPG, e sangue (**Figuras 4.5; 4.6; 4.7; 4.8; 4.9 e 4.10**).

	Bohr ϕ	Log P ₅₀ pH – próx. 7,5	P ₅₀ pH – próx. 7,5	Hill - n
<i>Athene cunicularia</i>				
<i>Stripped</i> 40°C	-0,31	1,00	10,00	1,5
<i>Stripped</i> 21°C	-0,27	0,86	7,24	1,5
<i>Stripped</i> 4°C	-0,25	0,46	2,88	1,4
<i>Stripped</i> + IHP	-0,39	1,25	17,78	1,0
<i>Stripped</i> + 2,3 - BPG	-0,23	0,82	6,60	1,3
Sangue	-0,26	1,20	15,84	1,1
<i>Coragyps atratus</i>				
<i>Stripped</i> 40°C	-0,45	1,14	13,80	1,3
<i>Stripped</i> 21°C	-0,42	1,02	10,47	1,1
<i>Stripped</i> 4°C	-0,39	0,58	3,80	1,6
<i>Stripped</i> + IHP	-0,67	1,56	36,30	1,5
<i>Stripped</i> + 2,3 - BPG	-0,29	0,98	9,54	1,5
Sangue	-0,47	1,12	13,18	1,4
<i>Mimus saturninus</i>				
<i>Stripped</i> 40°C	-0,44	1,14	13,18	1,0
<i>Stripped</i> 21°C	-0,53	0,98	9,54	1,5
<i>Stripped</i> 4°C	-0,19	0,24	1,73	1,5
<i>Stripped</i> + IHP	-0,48	1,23	16,98	1,2
<i>Stripped</i> + 2,3 - BPG	-0,34	0,82	6,60	1,3
Sangue	-0,43	1,16	14,45	1,8

Tabela 4.2 - Valores de efeito Bohr (ϕ), log de P₅₀, P₅₀ e cooperatividade (n), para diferentes condições da Hb *stripped* em três temperaturas, efeito de IHP e 2,3 - BPG, e sangue não fracionado de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

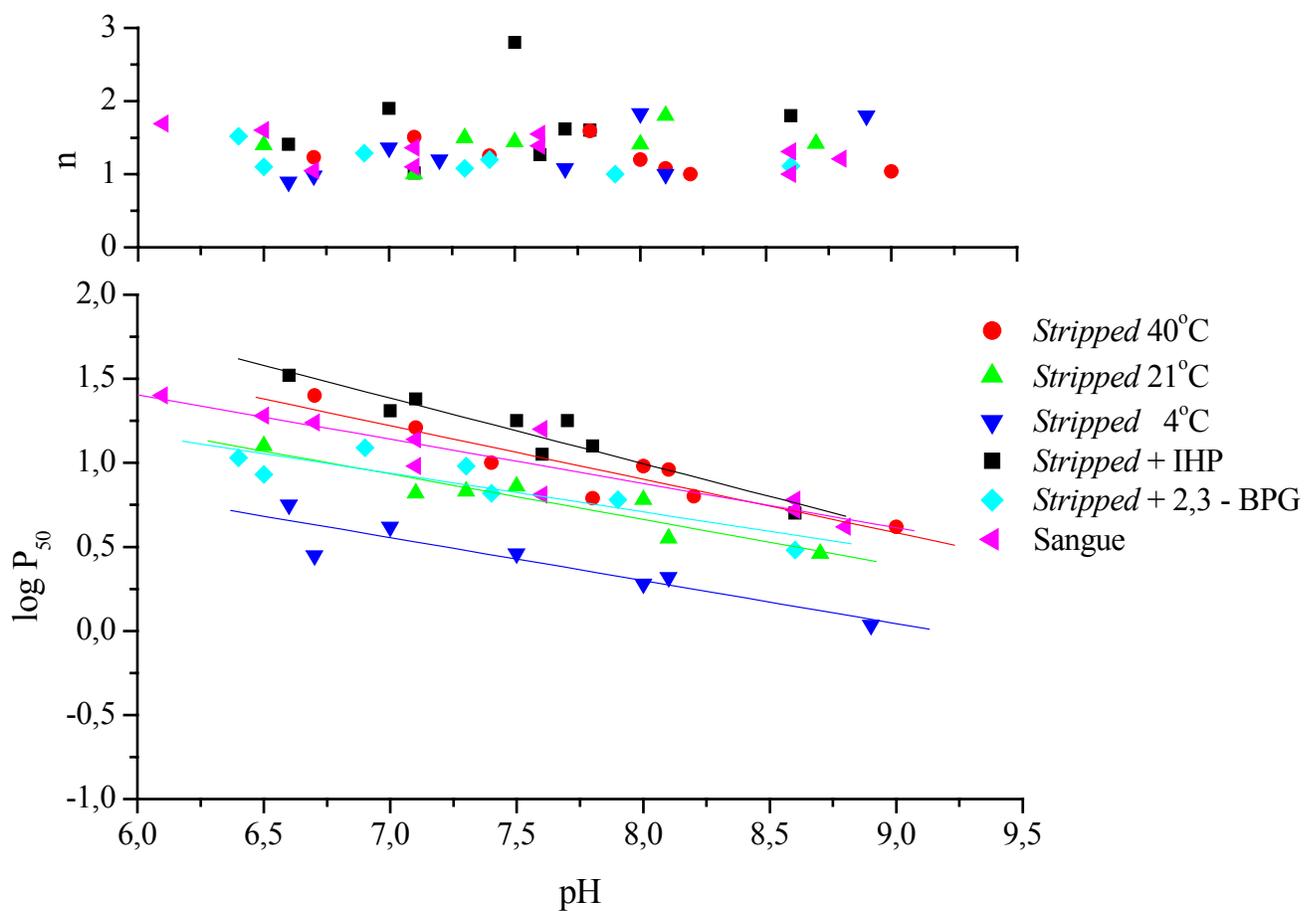


Figura 4.2 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia* à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.

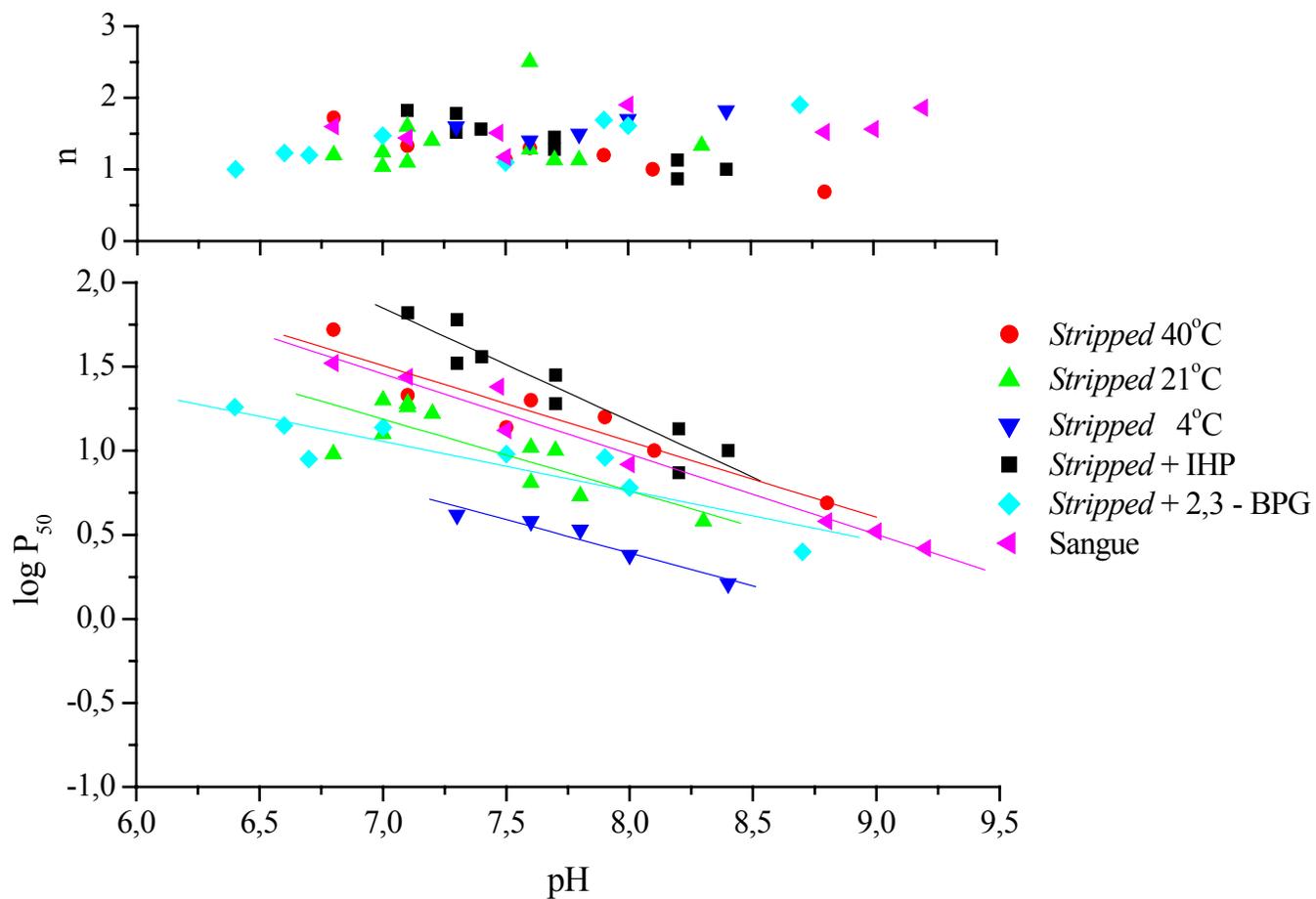


Figura 4.3 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *C. atratus* à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.

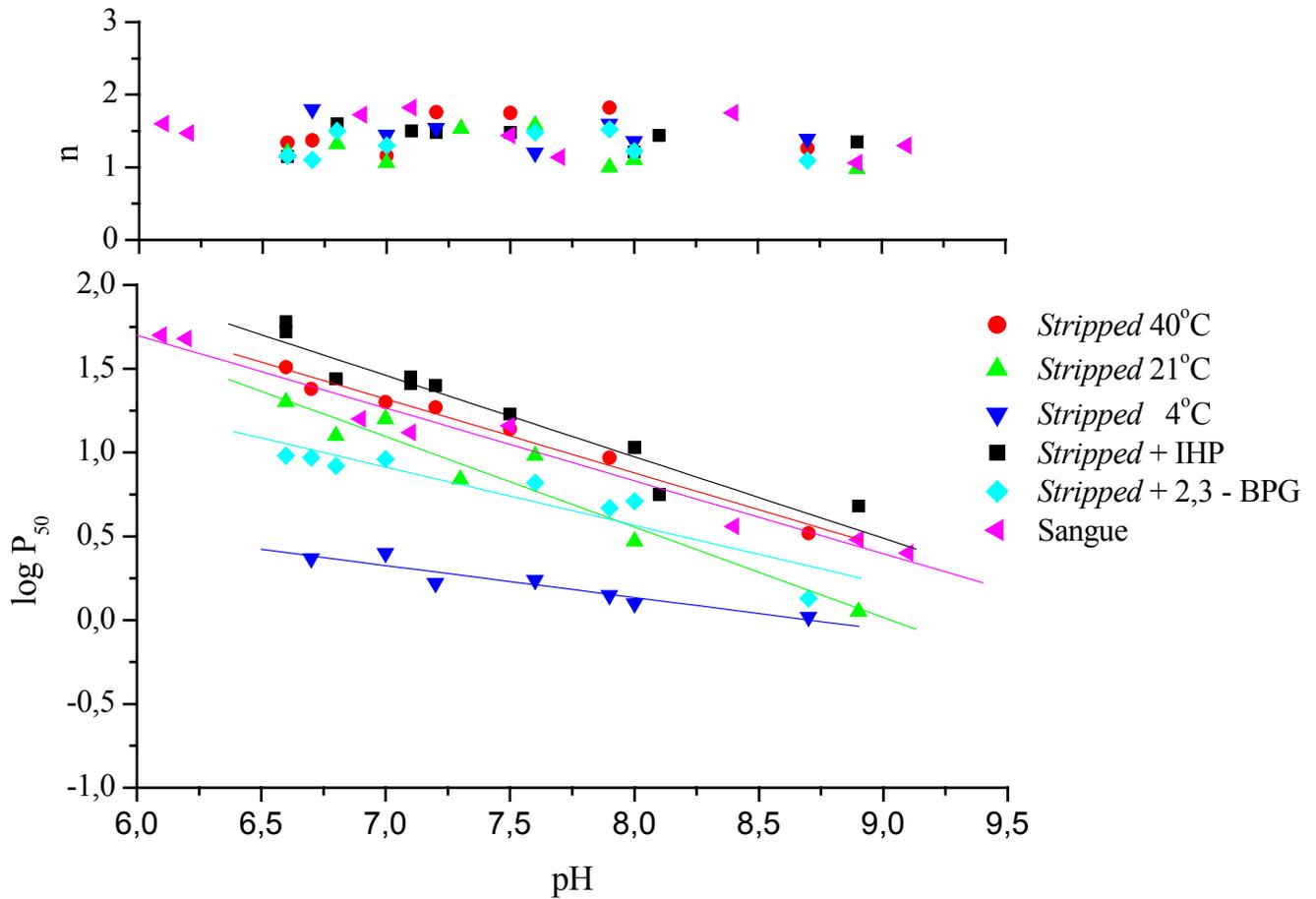


Figura 4.4 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *M. saturninus* à 40°C, 21°C, 4°C, na presença de IHP, 2,3 - BPG e em sangue.

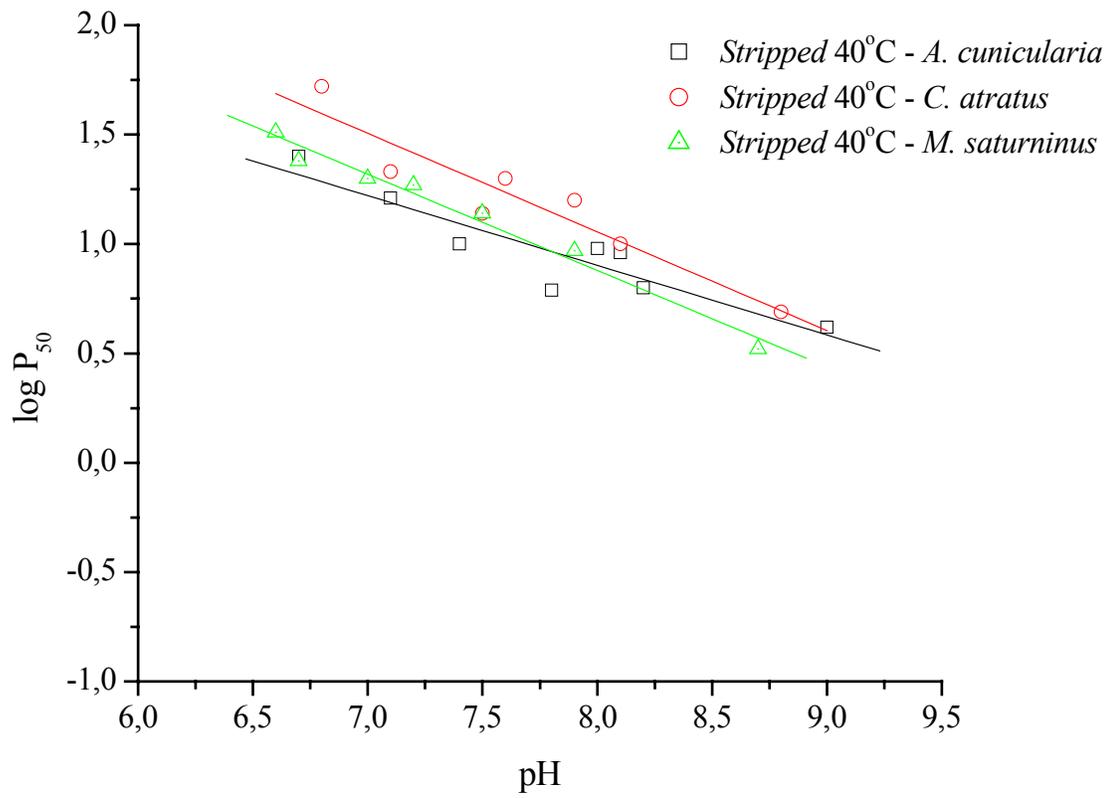


Figura 4.5 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus* à 40°C.

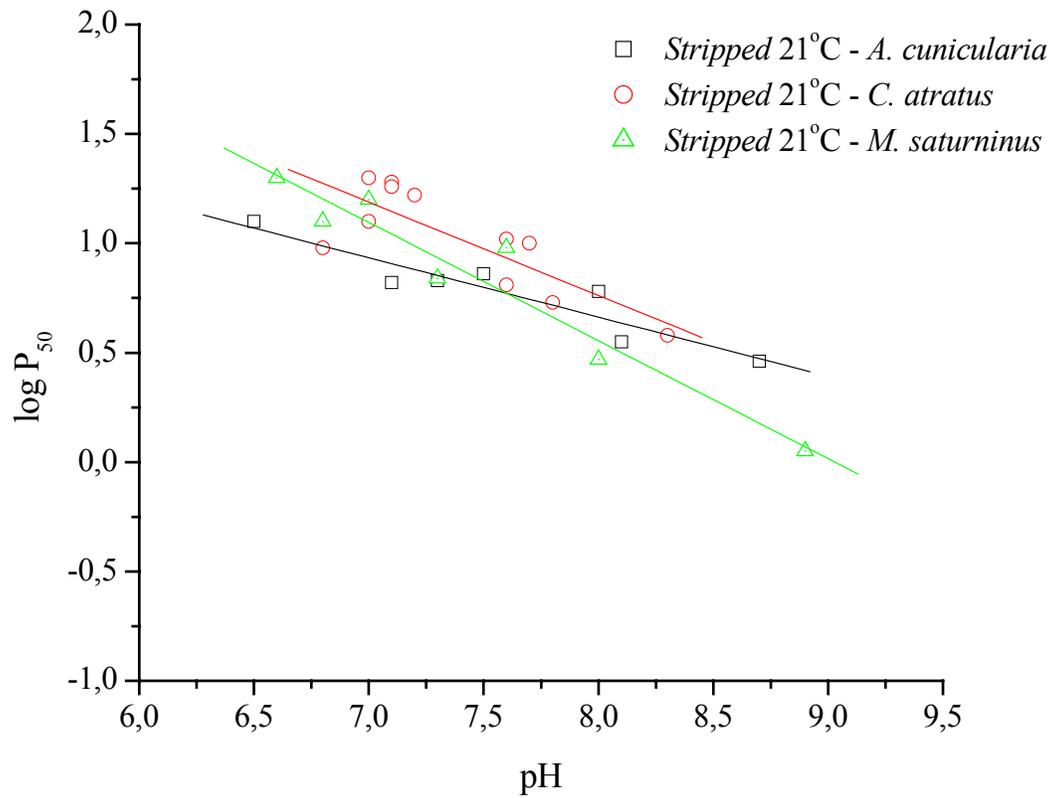


Figura 4.6 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus* à 21°C.

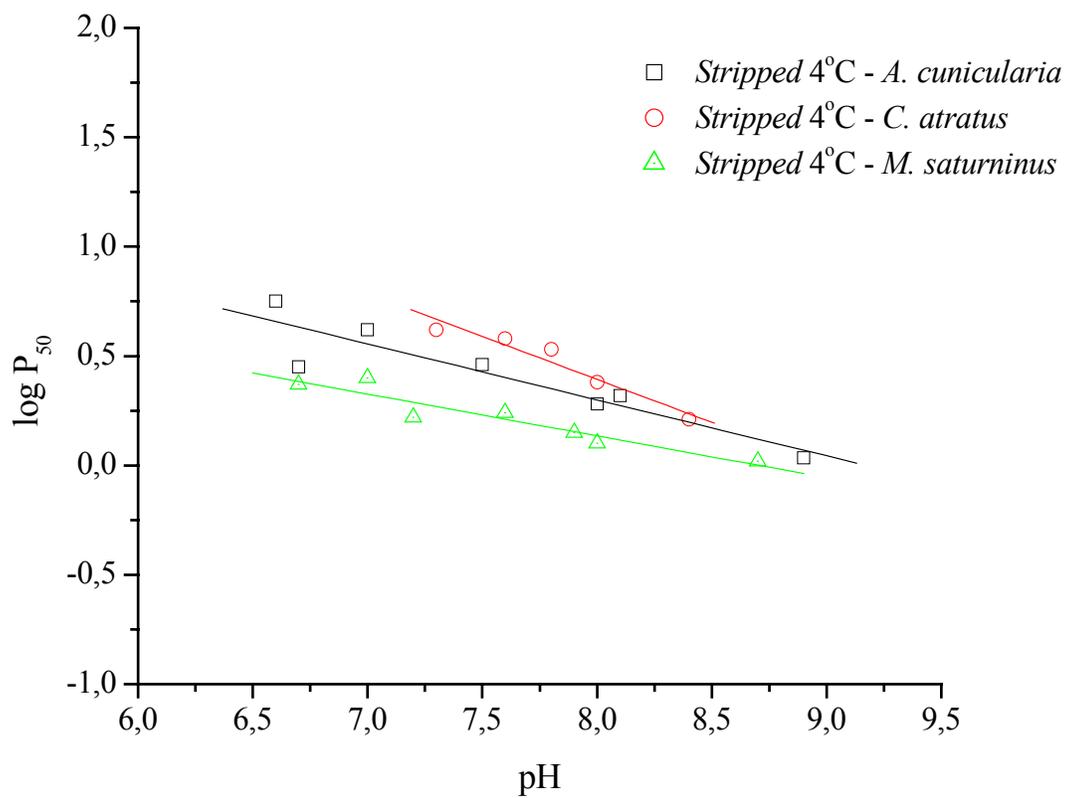


Figura 4.7 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus* à 4°C.

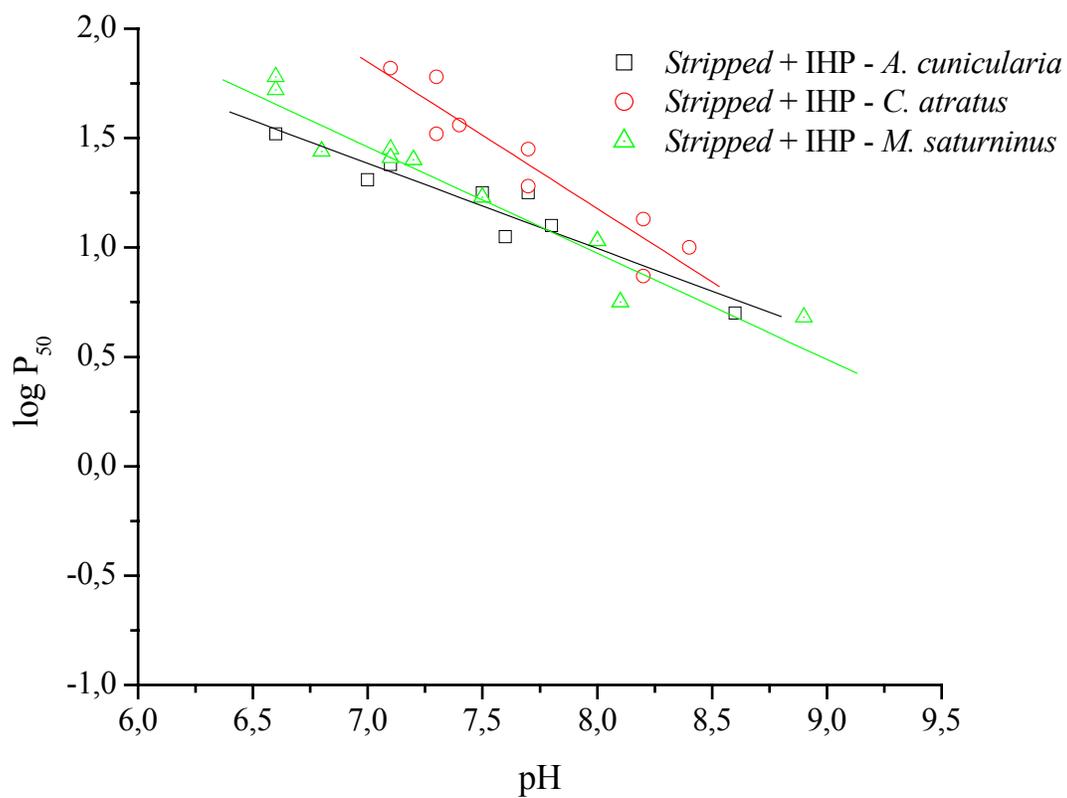


Figura 4.8 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus* na presença de inositol hexafosfato.

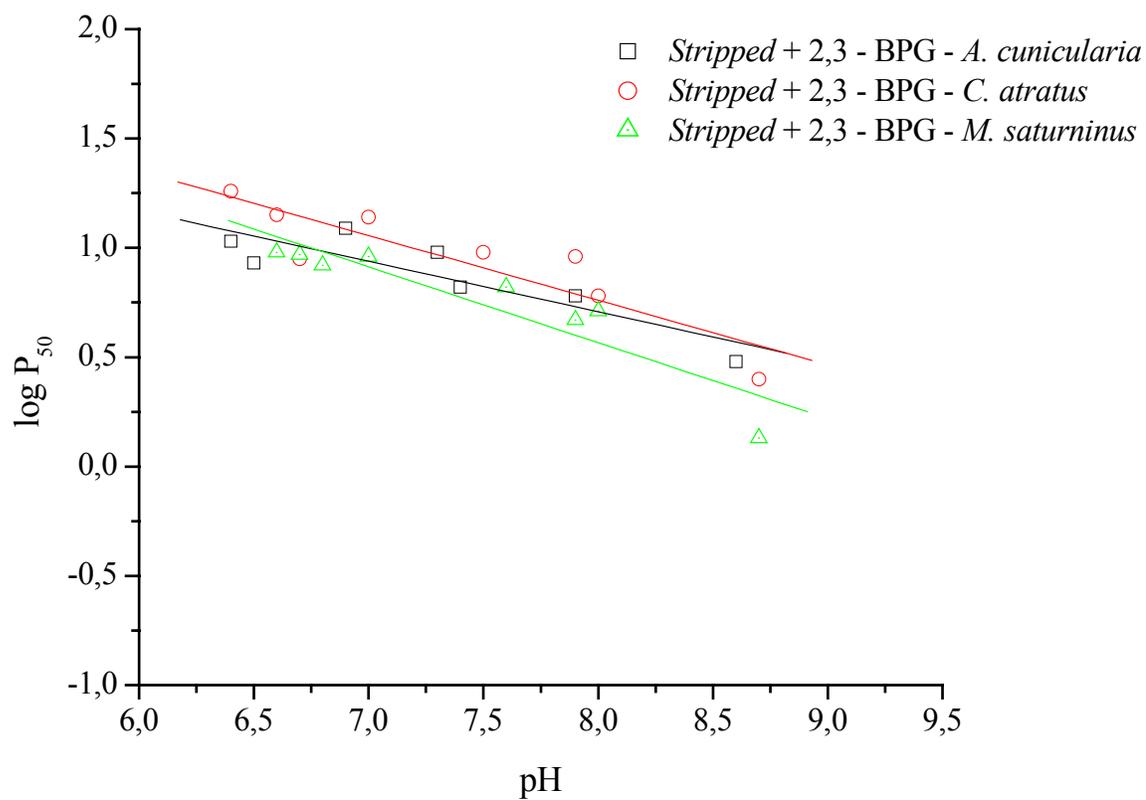


Figura 4.9 - Comportamento funcional das hemoglobinas *stripped* de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus* na presença de 2,3 - BPG.

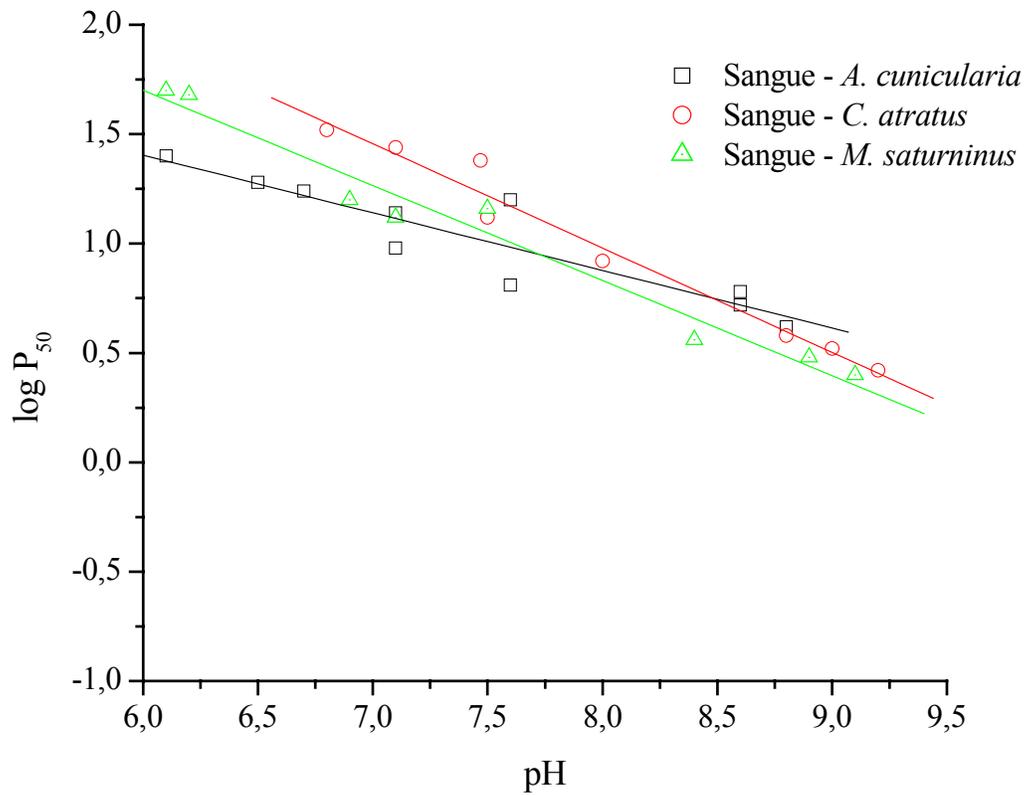


Figura 4.10 - Comportamento funcional das hemoglobinas em sangue de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

4.4. Dosagem de fosfatos intraeritrocitários

4.4.1. Dosagem de nucleotídeos

A **Figura 4.12** mostra o perfil cromatográfico da eluição padrão dos nucleotídeos (AMP, ADP, ATP, GDP e GTP), em gradiente de 0 a 1M de KCl.

Os perfis cromatográficos dos extratos, em tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl para as concentrações, em $\mu\text{mol/mL}$ de RBC de *Athene cunicularia*, *Coragyps atratus* e *Mimus saturninus*, são mostrados nas **Figuras 4.13, 4.14 e 4.15**.

Os cromatogramas das três espécies estudadas mostram a presença ADP e ATP em concentrações diferentes e a ausência de AMP, GDP e GTP (**Tabela 4.3 e Figura 4.11**).

4.4.2. Dosagem de 2,3 - BPG

Nos experimentos de determinação dos níveis de 2,3 - bifosfoglicerato (2,3 - BPG) intraeritrocitário realizados através do Kit da **Sigma Diagnostics**, não detectamos a presença de BPG em nenhuma das espécies estudadas (**Tabela 4.3 e Figura 4.11**).

	<i>Athene cunicularia</i>	<i>Coragyps atratus</i>	<i>Mimus saturninus</i>
AMP	0 (zero)	0 (zero)	0 (zero)
ADP	0,43	0,16	0,12
ATP	0,67	0,60	1,14
GDP	0 (zero)	0 (zero)	0 (zero)
GTP	0 (zero)	0 (zero)	0 (zero)
2,3 – BPG	0 (zero)	0 (zero)	0 (zero)
Σ Total	1,10	0,76	1,26

Tabela 4.3 - Valores obtidos de nucleotídeos para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*, em mM de P/mL de RBC.

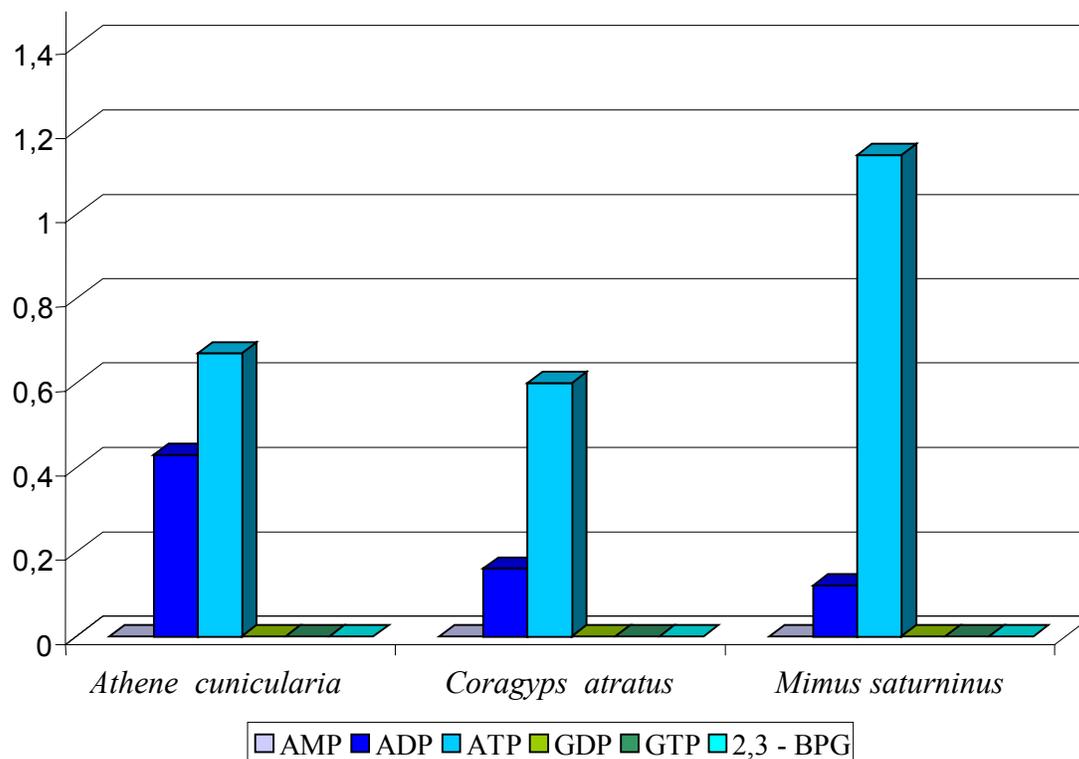


Figura 4.11 - Valores obtidos de nucleotídeos para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*, em mM de P/mL de RBC.

Figura 4.12 - Padrão cromatográfico dos nucleotídeos (AMP, ADP, ATP, GDP e GTP). Coluna Q Sepharose *Fast Flow*, tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.

Figura 4.13 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de *A. cunicularia*. Coluna Q Sepharose *Fast Flow*, tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.

Figura 4.14 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de *C. atratus*. Coluna Q Sepharose *Fast Flow*, tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.

Figura 4.15 - Perfil cromatográfico, dos nucleotídeos de *M. saturninus*. Coluna Q Sepharose *Fast Flow*, tampão trietanolamina 20mM pHs 8,0 a 7,5, gradiente de 0 a 1M de KCl (30% em 50 minutos, 70% em 55 minutos e 100% de 60 a 65 minutos). Leitura em 254nm.

4.4.3. Concentração de inositóis

As concentrações de inositóis em μmol de P / mL de RBC para as três espécies estudadas podem ser visualizadas na **Tabela 4.4 e Figura 4.16**.

	<i>Athene cunicularia</i>	<i>Coragyps atratus</i>	<i>Mimus saturninus</i>
IP4	0,62	0 (zero)	0 (zero)
IP5	2,70	3,01	3,20
IP6	0 (zero)	0,82	0,50
IP5/IP4	4,35	0 (zero)	0 (zero)
IP5/IP6	0 (zero)	3,67	6,4
Σ Total	3,32	3,83	3,7

Tabela 4.4 - Valores das concentrações de inositóis (em μmol / mL de RBC) para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

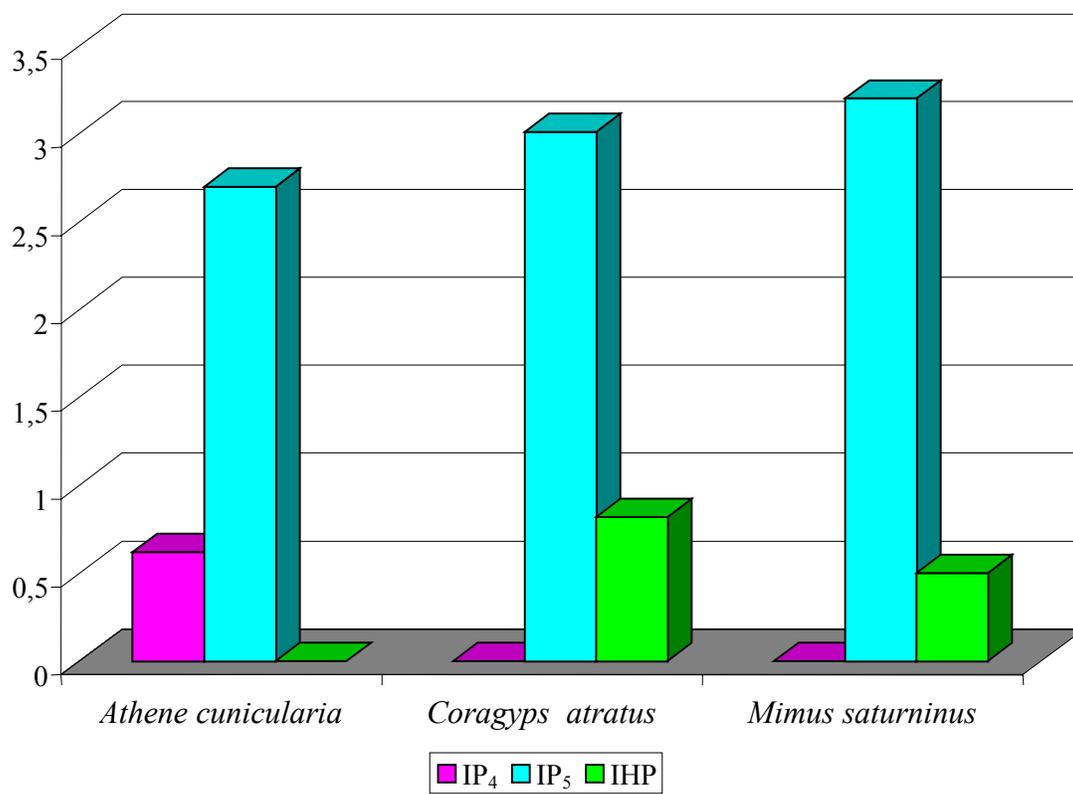


Figura 4.16 - Concentrações de inositóis (em $\mu\text{mol} / \text{mL}$ de RBC) para *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*.

5. DISCUSSÃO

A evolução no sentido dos animais maiores e metabolicamente mais ativos foi, invariavelmente, acompanhada com o desenvolvimento de estruturas mais especializadas na troca gasosa. Adaptações encontradas nas propriedades funcionais da hemoglobina no transporte de oxigênio, estão associadas com diferenças na estrutura molecular, e são encontradas em diferentes espécies (WEBER, 1996).

O aumento da temperatura corporal (41°C em média na aves) enfraquece a ligação entre a hemoglobina e o O₂, provocando maior dissociação de oxigênio e melhor oxigenação dos tecidos. Este fenômeno é particularmente importante, sobretudo no vôo das aves, quando há aumento no consumo de O₂.

5.1. Estudos eletroforéticos

Em nosso trabalho, detectamos a presença de dois componentes protéicos nos padrões eletroforéticos obtidos para *Coragyps atratus* bem como para *Athene cunicularia* e *Mimus saturninus*, não demonstrando variação em seus componentes. Entretanto o baixo número de exemplares estudados não nos permite afirmar que não existe variação intraespecífica nas espécies estudadas. Nossos resultados eletroforéticos confirmam a idéia de que as aves possuam hemoglobinas com baixa heterogeneidade (DUNLAP et al., 1956; SAHA, 1959; SCHWANTES e TONDO, 1969; HIEBL et. al., 1986; HIEBL et. al., 1987 a, b, c; GODOVAC – ZIMMERMANN, 1988; HUBER et. al., 1988 a; HIEBL et. al., 1988; EGUCHY et. al., 1993).

Em aves é comum encontrarmos dois componentes protéicos, sendo um componente mais concentrado lento e um componente menos concentrado mais rápido, fato este verificado em *A. cunicularia* e *C. atratus*. Entretanto os padrões eletroforéticos

obtidos para *M. saturninus*, mostram a presença de dois componentes de concentração semelhante (2 componentes maiores). DUNLAP et al. (1956) encontram resultado semelhante em *Meleagris gallopavo* (Galliforme), mas os Passeriformes por eles estudados mostraram padrão típico de aves – 1 componente maior lento e um menor rápido. Portanto, a presença de dois componentes maiores não é característica dos Passeriformes, mas de algumas espécies de Aves, independentemente da Ordem a que pertencem. Esse padrão de 2 componentes maiores poderia ser devido a modificações nos promotores dos genes codificadores da cadeia α^D ou do código de iniciação dessa cadeia, em *M. saturninus*, aumentando a concentração do componente rápido, geralmente um componente menor nas outras espécies.

MAGINNESS e KILGORE (1989), utilizando a técnica eletroforética de focalização isoelétrica, mostraram a presença de 4 isohemoglobinas, com uma razão molar de 9:1:1:1 para a coruja *Athene cunicularia*. A diferença desses resultados dos encontrados no presente trabalho podem ser devidos à (1) focalização isoelétrica ser uma técnica eletroforética muito sensível (de alta resolução), ou (2) devido ao fato de serem populações certamente isoladas uma da outra, dada a distância em que foram coletadas – Kansas (EUA) e São Paulo (Brasil), inclusive havendo a possibilidade de até serem espécies diferentes, uma vez que, aparentemente, essa ave não apresenta hábito migratório.

5.2. Comportamento funcional das hemoglobinas de *A. cunicularia*, *C. atratus* e *M. saturninus*

Efetores alostéricos como cloretos (Cl^-), íons hidrogênio (H^+), dióxido de carbono (CO_2) e vários tipos de fosfatos orgânicos, além do efeito da temperatura e salinidade regulam a afinidade Hb- O_2 da hemoglobina dos vertebrados (WEBER e JANSEN, 1988;

WEBER e WELLS, 1989). Em geral, o aumento de qualquer um desses fatores ou parâmetros físicos dentro do eritrócito provoca uma diminuição da afinidade Hb-O₂.

5.2.1. Equilíbrio de oxigenação em sangue total e *stripped*

Nos experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue, não foram encontradas diferenças significativas nos experimentos de afinidade para as três espécies estudadas. Estes dados demonstram, a princípio, que mesmo pertencendo as espécies e ordens diferentes, com hábitos e tipos de vôos particulares, existe uma alta similaridade entre as propriedades funcionais das Hbs destas espécies, não determinando modificações funcionais no nível de fosfatos orgânicos.

As análises funcionais das hemoglobinas das três espécies demonstraram que mesmo para coruja-buraqueira, ave que possivelmente está sujeita à hipóxia, por passar períodos em ambiente confinado, os valores foram também dentro da faixa dos obtidos para às outras espécies não moradoras de toca.

O sangue de *A. cunicularia* não mostrou nenhuma aparente adaptação para hipóxia com respeito à capacidade de transportar O₂. Possivelmente enquanto ocupam suas tocas, as corujas compensam as alterações na composição do gás inspirado através de um aumento da ventilação, característica adaptativa primária observada em animais moradores de toca. Além disso, as corujas de toca apresentam hipotermia suave quando expostas à hipóxia (MAGUINNESS e KILGORE, 1989). A diminuição da temperatura corporal aumenta a afinidade Hb-O₂ e portanto deve melhorar mais a saturação arterial das corujas quando estas estão em hipóxia. Essas últimas considerações não são únicas para *A. cunicularia*. Numerosas aves, não de toca, exibem similares formatos da curva de equilíbrio quando comparadas a coruja-buraqueira (JOHANSEN et al., 1987).

Dos valores obtidos em sangue total, a menor amplitude de efeito Bohr foi exibido por *A. cunicularia*, diferente dos obtidos por TAIPEIRO (1999). Vale ressaltar, que quando as Hbs são analisadas em sangue, deve-se levar em consideração o estresse sofrido pelo animal durante a captura, que pode interferir nos resultados, pois as análises em sangue, como já mencionado, aproximam-se da situação *in vivo*. Talvez fosse interessante, a realização de outros experimentos, onde os animais usados, sejam mantidos nas instalações do laboratório por um tempo determinado, possibilitando uma possível aclimatação. BOGGS et al. (1983), não observaram nenhum ajuste no hematócrito, nas Hbs e na contagem de eritrócitos para aves, associadas a cativeiro prolongado.

O comportamento do hemolisado *stripped*, na ausência de fosfatos, poderia ser explicado pelo modelo de MONOD et al. (1965). Em pH ácido, a alta concentração de íons H^+ estabiliza a hemoglobina no estado tenso (“T”) de baixa afinidade (conseqüentemente alto P_{50}) 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 P_{50}).

Os resultados obtidos referentes aos experimentos de hemoglobinas *stripped*, ou seja, sem adição de moduladores, realizados em três temperaturas diferentes também foram muito similares entre as três espécies. As Hbs mantidas a 40°C foram as que apresentaram uma menor afinidade ao oxigênio, seguida das hemoglobinas *stripped* à 21°C e 4°C. Fica evidente assim, a influência exercida pela temperatura. Os valores de log de P_{50} obtidos a 40°C foram os mais próximos dos encontrados em sangue, apesar desses últimos terem sido realizados a temperatura ambiente (25°C a 30°C). Esse fato é significativo uma vez que as aves são animais endotermos e a musculatura responsável pela grande movimentação das asas requerem temperaturas em torno de 38°C.

5.2.2. Equilíbrio de oxigenação com adição de fosfatos

Aves adultas diferem da maioria de outros vertebrados endotermos, por possuírem IP_5 ao invés de 2,3 - BPG como principal fosfato orgânico (BARTLET, 1980) modulador da afinidade da hemoglobina ao oxigênio. RIEIRA et al. (1991), demonstraram que o IP_5 , em concentrações fisiológicas, é o modulador primário de codorniz.

Na presença de IHP as hemoglobinas de todas as espécies analisadas neste trabalho diminuíram a afinidade de ligação Hb- O_2 , observada na Hb *stripped*, indicando que este fosfato atue negativamente na afinidade Hb- O_2 . Pelos experimentos de equilíbrio de oxigenação na presença de 2,3 - BPG, indica que esse efector alostérico é menos efetivo. Isso sugere que os inosítois polifosfatados são os moduladores da hemoglobinas nas aves aqui estudadas.

5.2.3. Coeficiente de Hill (n)

A estrutura tetramérica da hemoglobina é essencial para o transporte de oxigênio assim como os movimentos cooperativos das mesmas moléculas. A cooperatividade exibida pela hemoglobina proporciona uma resposta mais sensível a variações na concentração de oxigênio, adequando-se à sua função de transportar este gás nos vertebrados.

Os valores de coeficiente de Hill (n) encontrados para as espécies de aves aqui estudadas foram pouco maior que 1,0, indicando cooperatividade baixa ou nula. Entretanto, em algumas situações os valores obtidos foram altos, próximos de 3. Em seus estudos de caracterização de hemoglobinas de aves TAIPEIRO (1999) e LANDINI (2002), também encontraram alguns poucos valores de cooperatividade altos.

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 de que os altos valores de “*n*” (5 - 7), encontrados em aves, seriam devido a associações de tetrâmeros de hemoglobinas. Esses valores altos seriam adaptativos (maior eficiência na captação e descarga de O₂), levando em conta as particularidades e necessidades metabólicas das aves.

Os valores de cooperatividade, com a adição de fosfatos (IHP e 2,3 - BPG) das três espécies analisadas mantiveram-se inalterados. Estes valores condizem com os dados obtidos por LANDINI (2002), em seus estudos de caracterização de hemoglobinas de *Catharacta maccormicki* (skua) e são diferentes dos dados obtidos por KNAPP et al. (1999), que encontraram em hemoglobinas de galinha, aumentos consideráveis de valores de cooperatividade *in vitro* na presença de IHP.

5.3. Dosagem de fosfatos

A alta concentração de fosfatos orgânicos dentro da célula, influenciando direta ou indiretamente a afinidade Hb-O₂ é uma característica bastante observada nos eritrócitos da maioria dos vertebrados.

5.3.1. Nucleotídeos

Os resultados obtidos a partir dos cromatogramas revelam uma grande semelhança, tanto qualitativa quanto quantitativa entre os nucleotídeos eritrocitários cromatografados nas três espécies analisadas.

LANDINI (2002), estudando hemoglobinas de *Catharacta maccormicki* (skua) visualizou diferenças marcantes entre os fosfatos eritrocitários de aves coletadas no inverno e no verão Antártico. Foi detectado ATP somente em amostras de verão e GTP

exclusivamente em amostras de inverno. Como não foram detectadas diferenças nos experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue entre amostras coletadas no inverno e no verão, a concentração de inositolis polifosfatados é semelhante e a concentração desses nucleotídeos seja baixa, é possível que, tanto o ATP quanto o GTP, não atuem *in vivo* como efetores alostéricos da hemoglobina nessas aves.

Os valores obtidos para as concentrações, em $\mu\text{mol/mL}$ de RBC, dos fosfatos orgânicos das três espécies de aves mostram o ADP e o ATP, os 2 nucleotídeos encontrados. O ATP foi encontrado em maiores concentrações: 1,56 vezes superiores ao ADP em *Athene cunicularia*, 3,75 vezes em *Coragyps atratus* e 9,5 em *Mimus saturninus*, sendo o ATP, neste caso, o principal nucleotídeo intraeritrocitário para essas espécies.

É possível que o ATP predomine quantitativamente nos eritrócitos dessas espécies de aves devido ao seu papel na provisão da energia celular. É possível também que o ATP seja responsável pela modulação de enzimas que regulam o metabolismo destas espécies (SCHWANTES, comunicação pessoal).

Não foi detectada a presença de concentrações de AMP, GDP e GTP. Segundo BARTLETT (1980), parece não existir qualquer relação entre a presença ou ausência de ATP e/ou GTP em função da posição sistemática das espécies em que ocorre, nem com seu hábitat.

Os resultados referentes a presença de 2,3 - BPG nos eritrócitos das três espécies em questão estão de acordo com o encontrado na literatura. Durante o desenvolvimento embrionário, 2,3 - BPG aparece como principal modulador até a fase de eclosão, momento no qual sua concentração decresce até chegar a zero (BARTLETT, 1982).

5.3.2. Inositóis

Uma característica exclusiva em aves adultas é a alta concentração de inositol pentafosfato (IP₅), e de outros inositóis polifosfatados, porém em menor concentração (BARTLETT, 1982). Em nossas análises observamos a presença de IP₅ nos eritrócitos de todas as espécies estudadas. 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.

Para *A. cunicularia* detectamos pequena quantidade IP₄ e ausência de IP₆. Em *C. atratus* e *M. saturninus* não detectamos a presença de IP₄ e uma pequena quantidade de IP₆. Descobertas similares foram reportadas por TAIPEIRO (1999) em seus estudos com aves destas mesmas espécies. O fato de termos confirmado a presença IP₄ em *A. cunicularia*, abrem-se possibilidades para novas investigações quanto ao papel deste inositol como modulador.

No caso das aves, ainda não existem evidências de como a concentração de inositol nos eritrócitos seja regulada. Há, ainda, a possibilidade de que o dióxido de carbono (CO₂) exerça um papel importante na regulação da afinidade da hemoglobina ao oxigênio em aves (ISAACKS, 1985).

Uma outra idéia é que além de influenciar na afinidade da hemoglobina ao oxigênio, os inositóis possam desempenhar outras funções. RODRIGUEZ et al. (1998), por exemplo, encontraram evidências em eritrócitos de galinha, que o inositol seja um inibidor competitivo para o sítio de ligação do Mg⁺⁺ na hexoquinase, embora não o faça em relação à glicose e MgATP²⁻, abrindo possibilidades sobre as implicações que a presença dos metabólitos fosfatados (IP₅ e 2,3 - BPG) possam ter sobre o metabolismo dos carboidratos.

5.4. Observações finais

As espécies aqui estudadas apresentam hábitos bastante diferentes, além de pertencerem a ordens bem diferentes. A coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*) enfrenta hipóxia em sua toca, o sabiá do campo (*Mimus saturninus*) é um passeriforme que não atinge grandes altitudes e o urubú (*Coragyps atratus*) é capaz de voar até 3.000m. Apesar disso, as propriedades funcionais de suas hemoglobinas são muito semelhantes. É possível que o sistema de fornecimento de oxigênio, nas Aves, tenham chegado a um eficiência tão grande que não há mais necessidade de modificações maiores para enfrentar uma gama grande de situações, como ocorre usualmente para essa três espécies.

6. CONCLUSÕES

1. O padrão eletroforético em gel de amido do hemolisado de *Athene cunicularia* e *Coragyps atratus* mostrou um componente maior e lento e outro menor e rápido e *Mimus saturninus* apresentou dois componentes de igualmente alta concentração.
2. Embora pertencentes a três espécies diferentes, as hemoglobinas das aves analisadas apresentaram comportamento funcional similares, com efeito Bohr normal.
3. O IHP influenciou negativamente a afinidade das Hbs das três espécies analisadas.
4. O 2,3 - BPG praticamente não influenciou a afinidade das Hbs das três espécies.
5. Os valores de n (coeficiente de Hill) mantiveram-se próximos de 1,0 para as espécies analisadas, indicando cooperatividade baixa ou nula.
6. Foram detectados nos eritrócitos das três espécies de aves somente ADP e o ATP.
7. Não foram detectados nos eritrócitos das três espécies AMP, GDP e GTP.
8. Não foi detectado 2,3 - BPG nos eritrócitos das espécies estudadas.
9. Observamos a presença de IP_5 nos eritrócitos de todas as espécies estudadas

10. Em *A. cunicularia* foi detectado pequena quantidade IP_4 e ausência de IP_6 . Em *C. atratus* e *M. saturnins* não detectamos a presença de IP_4 , mas foi detectada uma pequena quantidade de IP_6 .
11. Apesar das três espécies estudadas pertencerem a ordens diferentes, com tipos de vôo e hábitos distintos, as propriedades funcionais de suas hemoglobinas são muito semelhantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERS, G.K., SMITH, F.R. The hemoglobin tetramer: a three-state molecular switch for control of ligand affinity. **Ann. Rev. Biophys. Chem.**, v.16, p.583-609, 1987.
- ANTONINI, E., BRUNORI, M. Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland Research Monographs. **Frontiers of Biology**. Amsterdam-London Publ. Co., 435p 1971.
- ARNONE, A. **Nature**, v.237, p. 146-149, 1972.
- BARTELS, H., HILBERT, P., BARBEY, K., BETKE, K., RIEGEL, K., LANG, E. M., METCALFE, J. Respiratory functions of blood of the yak, llama, Dybowski deer and African elephant. **Am. J. Physiol.**, 205: 331-336, 1963.
- BARTELS, H., HILLER, G., REINHARDT, W. Oxygen affinity of chicken blood before and after hatching. **Resp. Physiol.** 1: 345-356. 1966.
- BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **J. Bio. Chem.**, 254: 466-468, 1959.
- BARTLETT, G.R. Water-soluble phosphates of fish red cells. **Can. J. Zool.** 56, 870-877, 1978a.

- BARTLETT, G. R. Phosphates compounds in vertebrate red blood cells. **Amer. Zool.**, 20: 103 – 114, 1980.
- BARTLETT, G.R. Developmental changes of phosphates in red cells of the *Emu* and the *Rhea*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 73A (1): 129-134, 1982.
- BENESCH, R., BENESCH, R. E., YU, C. I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 59: 526-532, 1968.
- BERGER, M., HART, J.S. Physiology and energetics of flight. In: FARNER, D. S., KING, J.R. Avian biology. New York: **Academic Press**, V.4, p. 416-477, 1972.
- BOGGS, F. D., KILGORE, D. L. Jr., BIRCHARD, F. Blood characteristics, tracheal volume and heart mass of burrowing owls (*Athene cunicularia*) and bodwhite (*Colinus virginianus*). **Comp Biochem Physiol**, 74 (3): 693-3-696, 1983.
- BOHR, C., HASSELBALCH, K.A., KROGH, A. Uber einen in biologischer begiehung wichtigen Einfluss, den die kohlenaurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ubt. **Scand. Arch. Physiol.**, v.16, p.402- 412, 1904.
- BULLARD, R.W., BROUMAND, C. & MEYER, R.F. Blood characteristics and volume in two rodents native to high altitude. **J. Appl. Physiol.**, 21: 994-998, 1966.
- CHIODI, H. Comparative study of the blood gas transport in high altitude and sea level Camelidae and goats. **Respiration Physiol.**, 11: 84-93, 1971.

COBB, J. A., MANNING, D., KOLATKAR, P. R., COX, D. J., RIGGS, A.
Deoxygenation-linked association of a tetrameric component of chicken hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 267 (2): 1183-1189, 1992.

BRAUNITZER, G.R., GEHRING-MULLER, N., ILSHANN, K.; HISEN, G.,
HOBOM, V., RUDLOFF, N., WITHMANN-LIEBOLD, B. Die konstituion
des normalen adulten human hemoglobins. **Z. Physiol. Chem.**, v.323, p.283,
1961.

DICKERSON, R., GEIS, I. Hemoglobin: structure, function, evolution and
pathology. Massachusetts: **Benjamin / Cummings Publishing Co.**, 176p,
1983.

DE VITO, A., **Propriedades funcionais de hemoglobinas bovinas** (doutorado).
Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP. 82p, 1994.

DUNLAP, J. S., JOHNSON, VL., FARMER, D.S. Multiple hemoglobins in birds.
Experientia, 12: 352, 1956.

EGUCHY, Y., NAHASHIMA, Y., TAKEY, H. Amino-acid sequence of the alpha
D - and beta - polypeptide chains of the Japanese quail hemoglobin. **Biol.
Chem Hoppe Seyler.**, 374 (2):111- 116, 1993.

FADEL, V. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina isolada do Lobo Guará -
*Chrysocyon brachiurus*** (mestrado). Universidade Estadual Paulista. São José
do Rio Preto. SP. 42p, 2000.

GODOVAC - ZIMMERMANN, J., KOSTERS, J., BRAUNITZER, G.,
GOLTENBOTH, R. Structural adaptation of bird hemoglobins to high altitude
respiration and the primary sequences of black-headed gull (*Larus ridibundus*,
Charadriiformes) alpha A and beta / beta' – chains. **Biol. Chem Hoppe
Seller.**, 369 (5): 341-348, 1988.

HALL, F. G. Hemoglobin function in the developing chick. **J. Physiol.**, 83: 222, 1934.

HIEBL, I., SCHNEEGANSS, D., BRAUNITZER, G. The Primary Structures of the α^D – Chains of the Bar-headed Goose (*Anser indicus*), the Greylag Goose (*Anser anser*) and Canada Goose (*Branta canadensis*). **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**. Vol. 367, p. 591 – 599, 1996.

HIEBL, I., SCHNEEGANSS, D., GRIMM, F., KOSTERS, J., BRAUNITZER, G. 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 1987a.

HIEBL, I., KOSTERS, J., BRAUNITZER, G. High-altitude respiration of 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, 1987b.

HIEBL, I., BRAUNITZER, G., SCHNEEGANSS, D. The primary structures of the major and minor hemoglobin-components 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, 1987c.

HIEBL, I. , WEBER, R. E., SCHNEEGANSS, D., HOSTERS, J., BRAUNITZER, G. High-altitude respiration of birds. Structural adaptation in the major and minor hemoglobin components of the adult white-headed vulture (*Trigonoceps occipitalis*, Aegyptiinae). **Biol. Chem. Hoppe Seyler.**, 370 (7): 699-706, 1989.

HIEBL, I., WEBER, R. E., SCHNEEGANSS, D., BRAUNITZER, G. High-altitude respiration of Falconiformes. The primary structures and functional properties of the major and minor hemoglobin components of the adult white-headed vulture (*Trigonoceps occipitalis*, Aegyptiinae). **Biol. Chem. Hoppe Seyler.**, 370 (7): 699-706, 1989.

HOCHACHKA, P.W., SOMERO, G. N. **Biochemical Adaptation. Princeton Univ. Press. Princeton.** 537 p, 1984.

HUBER, K., BRAUNITZER, G., SCHNEEGANSS, D., KOSTERS, J., GRIMM, F. The primary structure of the hemoglobin of the Rock-Hoppe penguin (*Eudyptes creyatus*, Sphenisciformes). **Bio. Chem. Hoppe Seyler.**, 369 (6): 513-519, 1988a.

HUBER, K., BRAUNNITER, G., SCHNEEGANSS, D., KOSTERS, J., GRIMM, F. The primary structure of the hemoglobin of the Corcomorant (*Phalacrocorax carbo*, Pelecaniformes). **Biol. Chem. Hoppe Seyler.**, 369 (11): 1251-1258, 1988b.

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

JESSEN, T. H., WEBER, R. E., FERMI, G., TAME, J., BRAUNITZER, G. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: demonstration of molecular mechanism by protein engineering. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 88 (15): 6519-6522, 1991.

JOHANSEN, K., BERGER, M., BICUDO, J. E. P. W., RUSCHI, A. Respiratory properties of blood end myoglobin in hummingbirds. **Physiol Zool.**, 60 (2): 269 – 278, 1987.

- JOHANSEN, K., LENFANT, C. A. Comparative approach to the adaptability of Hb-O₂ affinity of hemoglobin and red cell acid-base status. In: ASTRUP, P., ROUTH, M. (eds.). **Oxygen Affinity of hemoglobin and Red Cell Acid-Base Status**. Acad. Press. Munksgaard, Copenhagen, Denmark, p 750-780, 1972.
- JOHANSEN, K., MANGUN, C. P., LIKKEBOE, G. Respiratory properties of the blood of Amazonian fishes. **Can. J. Zool.**, 56: 898-906, 1978a.
- KACZANOWSKA, E., GROMYSZ-KALKOWSKA, K., SZUBARTOWSKA, E. Changes in the blood and bone marrow picture of the Pharaoh Quail (*Coturnix coturnix pharaoh*) chicks as a manifestation of to postembryonal life. **Comp. Biochem. Physiol.**, 87 A: 497-501, 1987.
- KNAPP, J.E., OLIVEIRA, M. A., XIE, Q., ERNST, S. R., RIGGS, A., HACKERT, M. L. The structural and functional analysis of the hemoglobin D component from chicken. **J. Bio Chem.**, 274 (10): 6411-6420, 1999.
- KARPLUS, M. Heme-iron ligant binding. In: HO, C., EATON, W. A., COLLMAN, J.P., GIBSON, Q. H.; LEIGH Jr., J. S, MARGOLIASH, E., MOFFAT, K.; SCHEIDT, W.R. **Hemoglobin and oxygen binding**. New York: Elsevier North Holland, p.3 –11, 1982.
- LANDINI, G. F. **Caracterização estrutural e funcional de hemoglobinas de Skua - *Catharacta maccormicki*** (mestrado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - SP. 52p, 2002.
- LEE, D.L., SMITH, M.H. Hemoglobins of parasitic animals. **Exp. Parasit.**, v.16, p.392-424, 1985.
- LESK, A. M., Protein Architecture – **A practical approach**, IRL Press. 1991.

- MAGINNES, L. A., KILGORE, D. L. Jr. Blood oxygen binding properties for the burrowing owl, *Athene cunicularia*. **Respir. Physiol.**, 76 (2): 205 – 214, 1989.
- MANWELL, C. Respiratory properties of hemoglobin of the two species of diving bird. **Science**, 127: 705, 1985.
- MANGUN, C. P. , KONDON, M. The role of coelemic hemerythrin in sipunculid worm *Phascolopis gould*. **Comp. Biochen. Physiol.**, 50A: 777-785, 1975.
- MARTINS, M. , EGLER, S. Comportamento de caça de corujas-buraqueiras *Athene cunicularia* na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, 50(3):579-584, 1990.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R. **A guide to the birds of South America**. Wnewood, Pa.: Livingstone Publishing Co,1970. (Reprinted by International Council for Bird Preservation, with new addenda), 1982.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P. On the nature of allosteric transitions. A plausible model. **J. Mol. Biol.**, 12: 88 –118, 1965.
- NEEDHAM, J. *Chemical Embryology*. Cambridge University Press, 1993.
- PERUTZ, M.F., BRUNORI, M. Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian hemoglobins. **Nature**, v.299, p.421-426, 1982.
- PERUTZ, M.F., FERMI, G. LUISI, B., SHAANAN, B., LIDDINGTON, R.C. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. **Acc. Chem. Res.**, v.20, p.309-321, 1987.
- PETSCHOW, D., WURDINGER, I., BAUMANN, R., DUHM, J., BRAUNITZER, G., BAUER, C. Causes of high blood O₂ affinity of animal living at high altitude. **J. Appl. Physiol. Respirat.**, 42 (2): 139-143, 1977.

- POWERS, D. A. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. **Amer. Zool.**, 20: 139-162, 1980.
- RIERA, M., FUSTER, J. F., PALACIOS, L. Role of erythrocyte phosphates in blood oxygen transport in anemic quail. **Am. J. Physiol.**, 260: 798-803, 1991.
- RIGGS, A., WOLBACH, R. A. Sulphydryl groups and structure of the hemoglobin. **J. Gen. Physiol.**, 39: 585-605, 1956.
- RIGGS, A. Molecular control of hemoglobin function. In KUN, E.; GRISOLIA, S. **Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells**. New York: John Wiley & Sons. Inc., P.1-31, 1972.
- RIGGS, A. Factors in the evolution of hemoglobin function. **Fed. Proc Fedn. Am Socs Exp Biol.**, 35: 2115-2118, 1976.
- RODRIGUES, E., ROSA, R., CAMPOS, D., ROSA, C. D., Carbohydrate metabolism in antarctic birds erythrocytes: of IP₅ and 2,3 - DPG and their effect on chicken hexokinase activity. **Antarctic Record.**, 42 (1): 101-110, 1998.
- ROMER, A. S. The vertebrate body. Philadelphia: **W. B. Saunders Company**, 1970.
- ROMER, A. S. The vertebrate story. Chicago: **The University of Chicago Press**, 437p, 1974.
- ROMER, A. S., PARSONS, T. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 559p, 1985.
- RUSSELL, P. J., **Genetics Harper Collins**, NY, 1996.

- SAHA, A. Chromatographic behavior of haemoglobins. **Biochim. Biophys. Acta.**, 32: 258, 1959.
- SCHWANTES, A. R. **Hemoglobinas e haptoglobinas de serpentes (Squamata – Reptilia)** - Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 168p. 1972.
- SCHWANTES, A. R., TONDO, C. V. Preliminary data on haptoglobins in vertebrates. **Rev. Bras. de Pesquisas Méd. Biol.**, 2 (2): 105-108, 1969.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**, 2 ed. Rio de Janeiro Editora Nova Fronteira, 1997.
- SKUTCH, A. F. Notes on the possible migration and the nesting of the black vulture in Central America. **Auk**, v. 86, p. 726-731, 1969.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal adults. **Biochem. J.**, v.61, p.629-641, 1955.
- SMITHIES, O. An improved procedure for starch gel electrophoresis. **Biochem. J.**, v.71, p.585-587, 1959.
- STORER, I.; USINGER, R.L., STEBBINS, R.C., NYBAKKEN, J.W. **Zoologia geral**. 6^a ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 110-816 p, 1991.
- TAPEIRO, E.F. **Caracterização funcional de hemoglobinas de aves** - Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP. 66p. 1999.

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

VAL, A. L. **Aspectos estruturais e funcionais de hemoglobinas de espécies do gênero *Semaprochilodus* (Prochilodontidae), do Rio Negro, AM-Brasil.** Manaus, 196p. Dissertação (mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1983.

VAL, A. L. **Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characoidei, Pices): aspectos adaptativos (ilha da Marchantaria, Manaus, AM).** Tese(Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus –AM. 112p 1986.

VAN TYNE, J., BERGER, A.J. **Fundamentals of ornithology.** 2. ed. New York: **Wiley - Interscience**, 1976.

VELLARD, F. L., ESPINOZA, D., MONGE, C., MUIZON, C. A genetic response to high altitude hypoxia: high hemoglobin-oxygen Affinity in chicken (*Gallus gallus*) from the Peruvian Andes. *Acad. Sci.* 313 (9): 401-403, 1991.

VILLEE, C. A. WALKER Jr., W. F., BARNES, R. D. **Zoologia Geral.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 683p, 1988.

VILLELA, G. C. **Bioquímica para biólogos.** Ed. Interciência 1979.

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

WEBER, R.E. Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. In: **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Edited by A. L. Val, V.M.F. Almeida-Val and D.J. Randall. Chapter 7, 75-90. INPA, Brazil, 1996.

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

YOUNG, J.Z. **La vida de los vertebrados**. Barcelona: Ediciones Omega, 1971.