



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

JOÃO PEDRO FERNANDES QUEIROZ

**HEMOGLOBINAS DE *LEPTODACTYLUS VASTUS*: UM MODELO PARA
ENTENDER A BASE MOLECULAR DE ADAPTAÇÕES FUNCIONAIS EM
HEMOGLOBINAS DE ANFÍBIOS**

FORTALEZA

2018

JOÃO PEDRO FERNANDES QUEIROZ

HEMOGLOBINAS DE *LEPTODACTYLUS VASTUS*: UM MODELO PARA ENTENDER A
BASE MOLECULAR DE ADAPTAÇÕES FUNCIONAIS EM HEMOGLOBINAS DE
ANFÍBIOS

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Q44h Queiroz, João Pedro Fernandes.
Hemoglobinas de *Leptodactylus vastus* : Um modelo para entender a base molecular de adaptações funcionais em hemoglobinas de anfíbios / João Pedro Fernandes Queiroz. – 2018.
112 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

1. Dicroísmo circular. 2. Anfíbios. 3. Isoformas. I. Título.

CDD 661

JOÃO PEDRO FERNANDES QUEIROZ

HEMOGLOBINAS DE *LEPTODACTYLUS VASTUS*: UM MODELO PARA ENTENDER A
BASE MOLECULAR DE ADAPTAÇÕES FUNCIONAIS EM HEMOGLOBINAS DE
ANFÍBIOS

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioquímica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Valderi e Avani.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento às instituições ecoa até à época do Iluminismo e daqueles que utilizaram razão e ciência em prol de melhorar a condição humana. Especificamente, aqui irei primeiro agradecer àquelas instituições e invenções que melhoraram minha própria condição e me permitiram cursar uma graduação.

Agradeço ao Programa de Residência Universitária da UFC, que foi uma consequência de duas medidas bem-sucedidas do governo Lula – REUNI e ENEM – em face do primeiro princípio enunciado no Artigo 206 da Constituição Federal, em que o ensino será ministrado com base na “Igualdade de condições para o acesso e permanência na escola”.

Agradeço à CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio através de bolsas de iniciação científica ou tecnológica.

Sou especialmente grato ao prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biocrystalografia e por me encarregar de continuar a recente linha de pesquisa sobre hemoglobinas de vertebrados ectotérmicos, cuja literatura me contagiou cooperativamente. Também sou grato ao prof. Dr. André Coelho da Silva pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biotecnologia Molecular. Sou grato a ambos pela orientação e acolhimento no Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural.

Agradeço ao Dr. Mário Cabral por ter coletado os espécimes de *Leptodactylus vastus* e por ter me ajudado durante grande parte do trabalho de purificar as hemoglobinas a partir do sangue das rãs.

Agradeço ao prof. Dr. Eduardo Sousa por ter disponibilizado seu laboratório e seu tempo para realizar os experimentos de saturação de oxigênio.

Agradeço ao prof. Dr. Rômulo Farias por realizar os experimentos de dicroísmo circular.

Agradeço ao Dr. Eduardo Salviano por ter orientado muitos aspectos desse trabalho e por ser humildão.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pelo apoio.

E agradeço especialmente à Jéssica Costa, por fazer a ilustração naturalista de *Leptodactylus vastus* e pela companhia nos últimos meses.

“A tempestade chegou cobrindo a orla da floresta. De um borriço de algumas gotas dispersas transformou-se em torrentes de água impelidas por rajadas de vento, obrigando-me a ir buscar refúgio no telhado de zinco dos dormitórios sem paredes. Lá fiquei sentado, esperando, junto com os mateiros. Os homens tiraram a roupa e saíram para debaixo da chuva, ensaboando-se e lavando-se naquele jorro de água, dando risadas e cantando. Num contraponto bizarro, rãs leptodactilídeas começaram uma alta e monótona cantoria no chão da floresta ali perto. Estavam em todo lugar à nossa volta. Mas onde teriam ficado durante o dia? Jamais encontrei uma única rã ao caminhar pela mata nos dias de sol, abrindo caminho pela vegetação e pelos detritos em decomposição, habitats que seriam supostamente os preferidos delas.” (WILSON, 1994).

RESUMO

A rã pimenta nordestina *Leptodactylus vastus* é um anfíbio de hábitos semiaquáticos endêmico do nordeste brasileiro. Descobrimos que as células vermelhas do sangue dessa espécie possuem três isoformas de hemoglobina com diferentes pontos isoelétricos e que formam pontes dissulfeto *in vitro*. As cadeias separadas por SDS-PAGE exibem massa molecular relativa de 13,5 e 14,6 kDa, aproximadamente. A curva de dissociação de oxigênio das três isoformas isentas de íons e efetores alostéricos apresenta alta afinidade intrínseca ($K_d = 4,5 \mu M$) e baixa cooperatividade ($n_H = 1,24$). Observamos a predominância de hélices α e elevada termoestabilidade ($T_m = 75 ^\circ C$) pelo método de dicroísmo circular, o que pode ser uma consequência da formação de pontes dissulfeto *in vitro*. Examinando a literatura sobre hemoglobinas de anfíbios, propomos que as hemoglobinas de *L. vastus* podem ser usadas como modelos para investigações estruturais, que poderiam contribuir para o entendimento da base molecular de adaptações funcionais em hemoglobinas de vertebrados ectotérmicos.

Palavras-chave: Dicroísmo circular. Anfíbios. Isoformas.

ABSTRACT

The northwestern pepper-frog *Leptodactylus vastus* is an amphibian of semiaquatic habits endemic from the Brazilian northwest. We found that the red blood cells from this species possess three isoforms of hemoglobin with different isoelectric points, which form disulfide bounds *in vitro*. SDS-PAGE shown two chains of relative molecular mass of 13.5 and 14.6 kDa, approximately. The oxygen dissociation curve for the pool of hemoglobins stripped of ions and allosteric effectors present high affinity ($K_d = 4.5 \mu M$) and low cooperativity ($n_H = 1.24$). We observed the predominance of α -helices and elevated thermostability ($T_m = 75 ^\circ C$) by circular dichroism, that may be a consequence of disulfide bound formation *in vitro*. Revising the literature about amphibian hemoglobins, we propose that use *L. vastus* like a model for structural investigations may contribute to the understanding about how works the functional adaptations of this protein family in ectothermic vertebrates.

Keywords: Circular dichroism. Amphibian. Isoforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Solubilidade do O ₂ em água	18
Figura 2	– Heme	20
Figura 3	– Globina	22
Figura 4	– Hemoglobina	23
Figura 5	– Árvore filogenética de mioglobinas de vertebrados	25
Figura 6	– Curva de dissociação de oxigênio	27
Figura 7	– Curva de Hill	29
Figura 8	– Ligação do BPG à Hb humana	33
Figura 9	– <i>Leptodactylus vastus</i> , fotografia e ilustração naturalista	65
Figura 10	– Cromatografia de troca iônica (CM-Sepharose)	73
Figura 11	– SDS-PAGE	74
Figura 12	– Espectro eletrônico: oxiHb, desoxiHb, metHb	79
Figura 13	– Curva de dissociação de oxigênio: Hbs <i>stripped</i>	80
Figura 14	– Espectro de dicroísmo circular no UV distante	81
Figura 15	– Dicroísmo circular em função da temperatura	82
Figura 16	– Gota da placa de cristalização	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adgb	Androglobina
BPG	2,3-bifosfoglicerato
CD	Dicroísmo circular
CDO	Curva de dissociação de oxigênio
CNmetHb	Cianometemoglobina
COHb	Hemoglobina ligada a monóxido de carbono
CRG	Gerador de ritmo central
Cygb	Citoglobina
desoxiHb	Hemoglobina desoxigenada
GbE	Globina E
GbX	Globina X
GbY	Globina Y
Hb(s)	Hemoglobina(s)
kcal	Quilocaloria
Mb	Mioglobina
methHb	Metemoglobina
Ngb	Neuroglobina
oxiHb	Hemoglobina oxigenada
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
trHb	Hemoglobina truncada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	HEMOGLOBINAS	16
2.1	Oxigênio	17
2.2	Heme	19
2.3	Estrutura e função de hemoglobinas	20
2.3.1	<i>Estrutura e estados conformacionais das hemoglobinas de vertebrados</i>	21
2.3.2	<i>Genômica, epigenômica e evolução molecular de hemoglobinas</i>	24
2.3.3	<i>Hemoglobinas e suas reações com ligantes</i>	26
2.3.3.1	<i>Ligaçao de O₂ a hemoglobinas</i>	27
2.3.3.1.1	Podemos descrever quantitativamente o equilíbrio de O₂	28
2.3.3.1.2	A natureza das transições alostéricas	30
2.3.3.2	<i>Mecanismo estereoquímico dos efeitos cooperativos em hemoglobinas</i>	31
2.3.3.3	<i>Efetores heterotrópicos</i>	32
2.3.4	<i>Quantificação de proteínas totais e hemoglobinometria</i>	35
2.3.5	<i>Dicroísmo circular de hemoglobinas</i>	36
2.3.6	<i>Diversidade de globinas de vertebrados e suas múltiplas funções</i>	37
2.3.7	<i>Adaptações funcionais de hemoglobinas de vertebrados</i>	37
3	HEMOGLOBINAS, ANFÍBIOS E BIOTECNOLOGIA	41
3.1	Anfíbios	41
3.2	Hemoglobinas de anfíbios	43
3.3	Biotecnologia	62
3.3.1	<i>Proteínas de anfíbios como recursos naturais para a biotecnologia</i>	63
3.3.2	<i>Biotecnologia de hemoglobinas</i>	63
3.4	<i>Leptodactylus vastus</i>	64
4	OBJETIVOS	66
4.1	Gerais	66
4.2	Específicos	66
5	MATERIAIS E MÉTODOS	67
5.1	Coleta e sacrifício dos animais, reaproveitamento do sangue e armazenamento	67

5.2	Extrato bruto de células vermelhas do sangue	67
5.3	Cromatografia de troca iônica	68
5.4	Eletroforese	68
5.5	Espectrofotometria	69
5.5.1	<i>Espectro de absorção da hemoglobina de L. vastus</i>	69
5.5.2	<i>Determinação de proteínas</i>	69
5.5.3	<i>Equilíbrio com O₂</i>	70
5.6	Dicroísmo circular	71
5.7	Cristalização: testes iniciais	71
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE A – CONSTANTES DE HENRY	112

1 INTRODUÇÃO

“A evolução é um tear encantado repleto de códigos de DNAs recombinantes cujos padrões evanescentes tecem, à medida que bailam com seus parceiros através de profundos tempos geológicos, um banco de dados volumoso de sabedoria ancestral, uma descrição digitalmente codificada de mundos ancestrais e das condições necessárias para habitá-los.” (DAWKINS, 1998).

Todos os amniotas (mamíferos, aves e répteis) possuem um ancestral comum com os anfíbios modernos. Na grande história da evolução, encontramos o ancestral comum entre amniotas e anfíbios modernos no início do período Carbonífero, há 340 milhões de anos. Antes disso, aconteceu uma das maiores transições evolutivas: o movimento da água para a terra. Seus protagonistas, os primeiros tetrápodes, emergiram e diversificaram-se no período Devoniano. Embora os anfíbios modernos e os amniotas sejam os dois principais ramos da filogenia dos tetrápodes, somente os primeiros continuam transitando da água para a terra durante sua ontogenia (DAWKINS, 2009a, 2009b; HICKMAN *et al.*, 2008).

O movimento da água para a terra foi um evento drástico na evolução animal. Dentre as principais diferenças entre os ambientes aquáticos e terrestres às quais os seres vivos precisam adaptar-se, temos: (1) disponibilidade de oxigênio; (2) densidade; (3) variação de temperatura; (4) diversidade de habitat¹ (HICKMAN *et al.*, 2008). As três primeiras restringem fisicamente a maneira pela qual um ser vivo realiza trocas gasosas com o ambiente. Outrossim, diferentes grupos de animais podem respirar de maneiras diferentes. Portanto, entender a função respiratória dos animais requer não apenas uma compreensão do mecanismo (como o animal respira), ou das origens evolutivas (por que o animal possui tal mecanismo respiratório); requer uma análise comparativa, de forma que possamos contemplar o quadro geral de soluções para o problema da sobrevivência em diferentes habitat (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; SCHMIDT-NIELSEN, 2013).

Como colocou Theodosius Dobzhansky, “nada faz sentido em biologia exceto à luz da evolução” (DOBZHANSKY, 1964, tradução nossa). Evolução significa mudança em seres

¹ Segundo a versão on-line do Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa (VOLP), que incorporou as alterações do *Novo Acordo Ortográfico*, a anteriormente aportuguesada “habitat” volta a ser uma palavra estrangeira, e por isso não deve ser acentuada ou flexionada em número (ACADEMIA BRASILEIRA DE LETRAS).

vivos por descendência com modificação (RIDLEY, 2006). A causa da variação na mudança evolutiva que é adaptativa é a seleção natural² (DARWIN, 1859; MAYR, 1998, 2009). Seleção natural comprehende a sobrevivência ou reprodução diferencial – não aleatória – de entidades autorreplicantes. Genes são entidades autorreplicantes. Eles constroem veículos de replicação – organismos individuais – que podem possuir *fitness* em um dado ambiente. Se possuírem *fitness*, os organismos individuais tenderão a ser representados na geração futura. Mas não exatamente como eram. Em um universo regido pela *segunda lei da termodinâmica*, um sistema complexo como um organismo vivo tende ao aumento de *entropia* devido a erros em seu metabolismo. Apenas a *informação* – os genes – irá compor uma nova geração de veículos de replicação semelhantes, mas não exatamente iguais, a seus progenitores. Como apenas mudanças suficientemente pequenas têm chance razoável de resultarem em aumento no *fitness* de organismos individuais, a evolução por seleção natural é um processo gradual (DAWKINS, 1998, 2000, 2001, 2005, 2007, 2016, 2018; EIGEN, 1997; FUTUYMA, 1992). Podemos inferir a existência de seleção natural a partir de fatos simples, e a lógica por trás dela é a mesma de um processo algorítmico, tal qual um programa de computador (DENNETT, 1995; RIDLEY, 2006). O zoólogo Richard Dawkins capturou metaforicamente essa natureza digital da vida com a imagem de um rio de pura informação fluindo através do tempo geológico (DAWKINS, 1996).

Afinal, que tipo de adaptações permitiram aos ancestrais dos primeiros tetrápodes ocupar o ambiente terrestre? Como isto ocorreu? Qual o valor adaptativo de estar em terra firme? Respondendo de forma retrospectiva, sabemos que duas vantagens do ambiente terrestre são: (1) maior variedade de habitat; (2) maior facilidade em encontrar abrigo seguro para jovens e ovos (HICKMAN *et al.*, 2008). Segundo uma das hipóteses sobre *por que*, entre o grupo dos peixes de nadadeiras lobadas (sarcopterígeos), evoluiu um conjunto de características que os pré-adaptou³ à vida terrestre, proposta pelo paleontólogo A. S. Romer e defendida em anos recentes por Dawkins, diz que, nas palavras do próprio Dawkins: “nossos ancestrais não vieram para terra firme no sentido exato do termo, e sim a usaram como uma ponte temporária a fim de escapar de volta para a água” (DAWKINS, 2009b).

² Para um histórico do desenvolvimento do pensamento biológico e aceitação da teoria da seleção natural de Darwin, assim como a redescoberta das leis de Mendel, a genética, a Síntese Evolutiva Moderna e biografias de alguns de seus principais nomes, ver: Futuyma (1992); Henig (2001); Mayr (1998); Ridley (2006); Souza (2009); Watson e Berry (2005).

³ Pré-adaptar, nesse caso, não significa que a evolução antecipou os meios para desenvolver uma nova função. Significa apenas que algumas características, por mudanças nas pressões de seleção, foram cooptadas para novas funções.

Análises filogenéticas baseadas em dados moleculares de organismos atuais funcionam como uma linha de base para paleontólogos que pretendem classificar os primeiros tetrápodes e os ancestrais dos anfíbios modernos a partir de análise cladística, em conjunto com evidências morfológicas do estudo de fósseis (MEYER, 1995; ROELANTS *et al.*, 2007). Recentemente, a descoberta do fóssil do *Tiktaalik roseae*, um intermediário entre sarcopterígeos e tetrápodes, foi um caso interessante na transição evolucionária das bombas faríngeas e operculares empregadas pelos peixes, para mecanismos de bombeamento bucal e costal dos tetrápodes (DAESCHLER; SHUBIN; JENKINS JR, 2006). A análise comparada da fisiologia dos anfíbios modernos também pode gerar informação filogenética, embora não existam modelos ideais para inferir as relações evolutivas dos primeiros tetrápodes (CHRISTENSEN *et al.*, 2016). Associando grandes bancos de dados filogenéticos com bancos de dados sobre a ecologia de um determinado clado, podemos testar hipóteses fundamentais sobre a evolução da especialização em um nicho ecológico específico (BONETTI; WIENS, 2014). Cada vez sabemos mais sobre a diversidade e paleoecologia dos tetrápodes do Devoniano; portanto, estamos cada vez mais aptos a testar hipóteses sobre a evolução do modo de vida terrestre, incluindo a respiração aérea (CLACK, 2006; LAURIN; GIRONDOT; DE RICQLÈS, 2000).

Características que evoluíram para desempenhar uma dada função podem ser cooptadas para realizar novas funções, *como se fossem pré-adaptações*. O paleontólogo Stephen Jay Gould introduziu o termo *exaptação* para tentar resolver o problema terminológico de “pré-adaptações” (GOULD; VRBA, 1982). Porém, existe uma compreensão equivocada de que esse fenômeno é não-adaptativo; de que ele não é produzido pela seleção natural. Podemos atribuir esse erro, em parte, ao que Dawkins chamou de “arrogância da interpretação *a posteriori*” – desconsiderar que a característica antiga possuía algum valor adaptativo além de prenunciar a nova função para a qual ela foi exaptada (DAWKINS, 2009a). A outra parte do erro é negligenciar o que estava realizando a cooptação – a seleção natural pode reajustar a característica para um novo fim. Como o cientista cognitivo Steven Pinker acertadamente explicou: “[m]udança na pressão de seleção não é sinônimo de *nenhuma* pressão de seleção” (PINKER, 1998). A fim de evitar o engano, irei cooptar o termo *exaptação* para um novo significado, referindo-se a adaptações que foram selecionadas a partir de características prévias, funcionais ou não, para realizar uma nova função.

Temos dois notáveis exemplos de exaptações durante a evolução do sistema respiratório dos tetrápodes. Os ancestrais dos primeiros tetrápodes apresentavam duas estruturas conectadas à faringe: (1) uma cavidade repleta de ar que funcionava como bexiga

natatória; (2) narinas internas pareadas que funcionavam para quimiorrecepção. Em terra, elas permitiram que o ar fosse puxado através das narinas para a cavidade, possibilitando que trocas gasosas com fluídos corporais acontecessem (HICKMAN *et al.*, 2008). Porém, respirar o ar requer mais do que apenas um pulmão. Deve existir também um gerador de ritmo central (CRG, do inglês *Central Rhythm Generator*) no tronco cerebral, que ative os músculos respiratórios para ventilar os pulmões, assim como populações de quimiorreceptores sensíveis à dióxido de carbono (CO_2) ou pH, que modulem a atividade do CRG. Sabemos que o CRG para a respiração áerea é anatômica e funcionalmente diferente do CRG para a ventilação de guelras e, por isso, o primeiro deve ter evoluído a partir de outra estrutura presente nos ancestrais dos primeiros tetrápodes. Experimentos com larvas de lampreias (ammocoetes) revelaram a presença de dois CRGs, anatomicamente e funcionalmente distintos. Um deles é sensível à CO_2/pH , que provavelmente foi o progenitor do CRG exaptado para a respiração áerea dos tetrápodes (HOFFMAN; TAYLOR; HARRIS, 2016).

Conforme novas adaptações permitiam aos ancestrais dos primeiros tetrápodes aproveitar as benesses da vida terrestre, a seleção natural poderia ajustar as demais características desses animais para o novo habitat, incluindo as propriedades estruturais e funcionais das proteínas responsáveis pelas trocas gasosas.

2 HEMOGLOBINAS

“A evolução é um químico brilhante.” (PERUTZ, 1989, tradução nossa).

A superfamília das hemoglobinas (Hbs) distribui-se através dos três domínios da vida – Bacteria, Archaea⁴ e Eukarya. A análise filogenética revelou que todas as famílias de Hbs surgiram de uma bactéria ancestral. Podemos inferir que as funções das Hbs em bactérias atuais refletem possíveis funções da Hb ancestral, a saber: limpeza enzimática de O₂ e NO tóxicos; metabolismo de enxofre; sensor e sinalização em resposta a O₂, NO ou CO. Estruturalmente, podemos dividir as Hbs em duas subclasses. A subclasse 3/3 possui duas famílias: (1) Hbs do tipo globina são as mais conhecidas (como veremos mais adiante); (2) Hbs sensores. E a subclasse 2/2 constitui a família das Hbs *truncadas* (trHbs). Algumas Hbs funcionam como monômeros, outras como dímeros ou tetrâmeros (Hbs das células vermelhas do sangue de vertebrados), até dezenas ou centenas de subunidades de globina (como na eritrocruorina de invertebrados). Complexos de múltiplas subunidades surgiram inúmeras vezes durante a evolução para resolver o problema do transporte de O₂ (GELL, 2018).⁵

Iremos focar nas Hbs de células vermelhas do sangue. Mas antes, olharemos mais a fundo para o problema do transporte de O₂.

⁴ Hemoglobinas em *Archeae*: Freitas *et al.* (2004).

⁵ Para fornecer um contexto diante dos avanços atuais na pesquisa com Hbs, algumas referências a trabalhos clássicos e historiográficos podem ajudar o leitor. Em especial, considero o trabalho de Edsall (1972) uma boa introdução ao desenvolvimento do conhecimento sobre as adaptações funcionais em Hbs. O trabalho clássico de Stokes (1864), baseado nas observações pioneiras de Hoppe (1862) a respeito do espectro de absorção do sangue e seu cromóforo na região do visível, demonstrou que o material colorido semi-purificado do sangue estava relacionado com sua oxidação e redução. Então ele propôs que a *cruorina* poderia transportar oxigênio no sangue. A *cruorina* de Stokes é o que conhecemos hoje como hemoglobina. Quase sessenta anos após o trabalho de Stokes, Conant (1923) mostrou que a combinação do O₂ com a Hb não é uma oxidação no sentido que entendemos o termo hoje, mas uma *oxigenação*. Antes disso, uma literatura crescente mostrava que Hbs distribuíam-se amplamente em tecidos animais (LANKESTER, 1873). Para uma biografia de George Gabriel Stokes, 1819-1903, ver: Ribeiro (2014). Em 1910, Joseph Barcroft e Archibald Vivian Hill, o primeiro realizando experimentos e o segundo desenvolvendo as equações, mostraram evidências adicionais da união química da Hb com O₂ – a velocidade de dissociação do O₂ obedecia a uma equação derivada a partir da lei de ação das massas – e deduziram pela termodinâmica o peso molecular da Hb (na verdade, apenas um quarto dela) como sendo 16.669 (BARCROFT; HILL, 1910). No mesmo ano, Hill ofereceu evidências do agrupamento de moléculas de Hb em solução, assim como o modelo matemático que é usado até hoje como abordagem geral para a interação de ligantes com proteínas multiméricas (HILL, 1910). Em seguida, Hill deduziu a característica essencial da cooperatividade: a ligação de um primeiro ligante torna mais fácil a ligação dos ligantes seguintes (HILL, 1913). Para o centenário da equação de Hill e detalhes biográficos do mesmo, ver: Engel (2013).

2.1 Oxigênio

O universo surgiu há 13,72 bilhões de anos. A cosmologia prevê que nenhum núcleo maior do que o do átomo de lítio surgiu no início da inflação cósmica. Núcleos mais pesados, como carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro, e assim por diante, foram gerados 1 bilhão de anos mais tarde, no núcleo de estrelas que, ao explodirem, espalharam seus elementos pelo cosmos (HAWKING, 2009; KRAUSS, 2013).

A Terra se formou por volta de 4,6 bilhões de anos atrás, a partir da condensação da poeira estelar em nossa galáxia. As primeiras formas de vida surgiram cerca de 1 bilhão de anos depois. Provavelmente obtinham energia de combustíveis inorgânicos. A atmosfera inicial da Terra era neutra ou redutora; a quantidade de O₂ era muito baixa (~0,01% do volume atual da atmosfera), e as primeiras células eram anaeróbias. Cianobactérias fotossintéticas produziram O₂ até atingir um nível crítico (o ponto de Pasteur), onde os organismos mudaram da fermentação para a respiração, e uma parte do oxigênio na forma da molécula de ozônio (O₃) impediu a penetração de raios ultravioleta letais para os metazoários. Surgiram os primeiros eucariotos, há 1,5 bilhão de anos, e então as algas eucarióticas, há cerca de 1 bilhão de anos. A concentração de O₂ atingiu 20% da atmosfera, permitindo a diversificação de organismos eucariontes. Formas multicelulares apareceram por volta de 600 milhões de anos atrás, durante a *explosão Cambriana*. Período onde a vida se diversificou exponencialmente, nivelando-se em seguida, como numa curva sigmoidal. (BERKNER; MARSHALL, 1964; GOULD, 1999; LAHR, 2016; NELSON; COX, 2014; SAGAN, 1984). O que teria gerado tal *natureza cooperativa* na evolução da vida na Terra? Pelo menos alguns trabalhos recentes apontam para um evento transformador, que veremos mais adiante: a *metamorfose* (RYAN, 2011).

Como os seres vivos evoluíram em ambientes aquáticos, e mesmo os que vivem em terra firme dependem da água para sobreviver, devemos considerar as propriedades de solubilidade dos gases em água.⁶ A solubilidade de um gás na água depende: (1) da natureza do gás; (2) da pressão do gás na fase gasosa; (3) da temperatura; (4) da presença de outros solutos (SCHMIDT-NIELSEN, 2013).

⁶ Para uma introdução acessível às propriedades da água e sua importância para os organismos vivos, ver: Atkins (1997). Para uma introdução sobre as propriedades da água para os sistemas bioquímicos, ver: Nelson e Cox (2014).

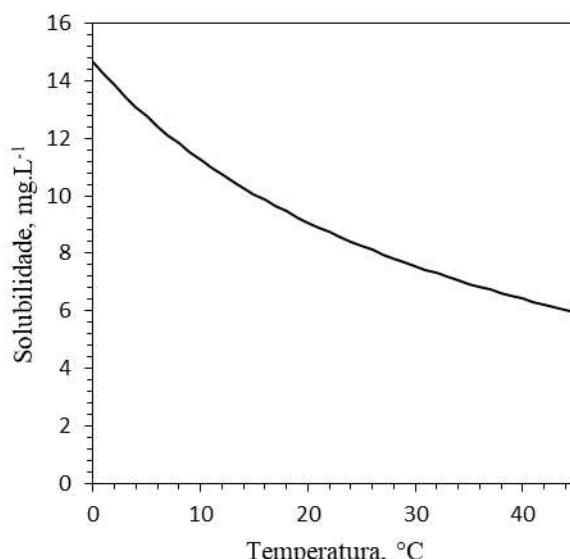
A solubilidade não é a mesma para todos os gases. O CO₂, por exemplo, é cerca de 30 vezes mais solúvel em água do que o O₂. A pressão parcial de um gás na fase gasosa é proporcional à concentração do gás em solução. A *lei de Henry* relaciona os fatores que afetam a solubilidade dos gases da seguinte maneira:

$$S_G = K_H \cdot P_G \quad (1)$$

onde S_G é a solubilidade do gás. K_H é a constante de Henry. E P_G é a pressão parcial do gás na fase gasosa. Podemos determinar a pressão parcial de um gás através da *lei de Dalton*, que é aplicável às condições de pressão em que os fisiologistas normalmente trabalham. Assim, a pressão parcial dos gases é a contribuição de cada gás para a pressão atmosférica total. Por exemplo, o O₂ compõe 20,95% do ar atmosférico e sua pressão parcial é de 21,22 kPa. (SCHMIDT-NIELSEN, 2013; SILVA *et al.*, 2018; SPRINGER, 2009). Como os fisiologistas costumam utilizar, por tradição, mmHg como unidades de pressão, é útil ter uma maneira prática de converter os valores de pressão parcial utilizados por muitos autores na literatura nos seus correspondentes em *concentração micromolar* do gás em solução. Pensando nisso, deduzi uma tabela que dá a K_H para o oxigênio em unidades de $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ na faixa de temperatura de 0-40 °C (ver Apêndice A).

A temperatura é o fator mais importante na solubilidade do O₂ na água (FIORUCCI; BENEDETTI FILHO, 2005). A Fig. 1 ilustra esse fato.

Figura 1 – Solubilidade do O₂ em água.



Fonte: elaborada pelo autor a partir de dados consultados em: Springer (2009). 1 atm (760 mmHg).

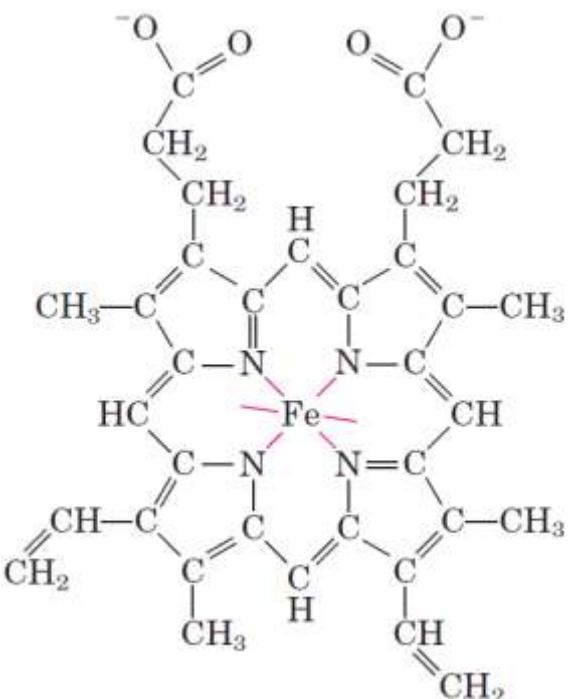
A temperatura desempenha também um papel importante no funcionamento das Hbs, como veremos mais adiante.

Enquanto organismos muito pequenos ou com taxas metabólicas muito baixas não precisam de sistemas de transporte de O₂ além da difusão, os organismos maiores precisam enfrentar esse problema. Outro problema relacionado é a necessidade de liberar o CO₂ produzido na respiração. Durante a evolução, os animais desenvolveram órgãos especiais, com grande área superficial, aptos a captar o O₂ do meio. As guelras dos peixes, que funcionam bem na água e os pulmões dos vertebrados terrestres, que ajudam a captar o oxigênio do ar, são os melhores exemplos. O O₂ deve ser em seguida transportado na corrente sanguínea para os tecidos a fim de suprir o metabolismo aeróbico. Porém, a solubilidade do O₂ no plasma sanguíneo em condições fisiológicas é baixa ($\sim 10^{-4} M$). Isto seria um problema para os vertebrados, que precisam de quantidades apreciáveis desse gás para sustentar a respiração. A solução para esse problema são proteínas, expressas em grande quantidade, que conseguem ligar reversivelmente o O₂, aumentar a capacidade desse gás no sangue, e transportá-lo para os órgãos de forma eficiente. Nenhuma cadeia lateral nos resíduos de aminoácidos encontrados em proteínas pode ligar reversivelmente o O₂. As proteínas transportadoras utilizam algum metal para essa tarefa. Comumente ferro ou cobre. As mais amplamente distribuídas são as Hbs e as *hemocianinas* (estas últimas contendo cobre). As *clorocruorinas* e a *hemeritrinas*, ambas contendo ferro, são outros exemplos de pigmentos respiratórios. No caso da Hb, o ferro está coordenado através de um grupo prostético – o *heme* (BROUWER, 1992; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; LIPPARD; BERG, 1994; NELSON; COX, 2014; SCHMIDT-NIELSEN, 2013; SEGAL, 1960).

2.2 Heme

Hemoproteínas são proteínas que contêm o grupo prostético heme. A Hb é uma delas. O grupo heme é um composto orgânico chamado protoporfirina IX, que no seu centro coordena um átomo de ferro no estado ferroso, Fe(II). Como podemos ver na Fig. 2, a protoporfirina IX consiste em quatro anéis pirrólicos ligados por pontes de meteno. Em adição, o anel tetrapirrólico possui quatro cadeias laterais de metil, duas de propionato e duas de vinil (BERT; TYMOCZKO; STRYER, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010; NELSON; COX, 2014; PERUTZ, 1978, 1979; ROSSI-FANELLI; ANTONINI; CAPUTO, 1964; VOET; VOET, 2013).

Figura 2 – Heme.



Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2014).

As duas cadeias de propionato na parte superior da Fig. 2 possuem carga negativa. O restante da molécula é hidrofóbico. Dessa maneira, o grupo heme é uma molécula anfipática (GELL, 2018). O espectro óptico dessa molécula é dominado por intensas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel porfirínico na região de 400-600 nm, conhecidas como bandas de Soret, α e β (LIPPARD; BERG, 1994). É uma propriedade útil para investigações através de métodos espectroscópicos.⁷

2.3 Estrutura e função de hemoglobinas⁸

Na década de 1950, Max Ferdinand Perutz, inspirado por John Desmond Bernal, buscava resolver a estrutura tridimensional da Hb (PERUTZ, 1978). Ele propôs o método de substituição isomórfica para solucionar o problema de fase nos estudos de difração de raios x de cristais de proteínas.⁹ No final daquela década, John Cowdery Kendrew aplicou o método

⁷ Sobre métodos espectroscópicos em Bioquímica, ver: Sauer (1995).

⁸ Daqui em diante, irei me referir às Hbs das células vermelhas do sangue simplesmente como Hbs.

⁹ Cristais de hemoglobina são relatados na literatura pela primeira vez no livro do médico Friedrich Ludwig Hünefeld; ver: HÜNEFELD (1840).

de Perutz para resolver a estrutura da Hb do músculo esquelético de cachalote, que chamamos de mioglobina (Mb) (KENDREW *et al.*, 1958, 1960, 1961). A Mb era cerca de quatro vezes menor do que a Hb. Kendrew conseguiu. Pouco tempo depois Perutz fez o mesmo com a Hb de cavalo (PERUTZ, 1960).¹⁰ Revisaremos nas seções seguintes muito do que foi gerado a partir desses estudos.

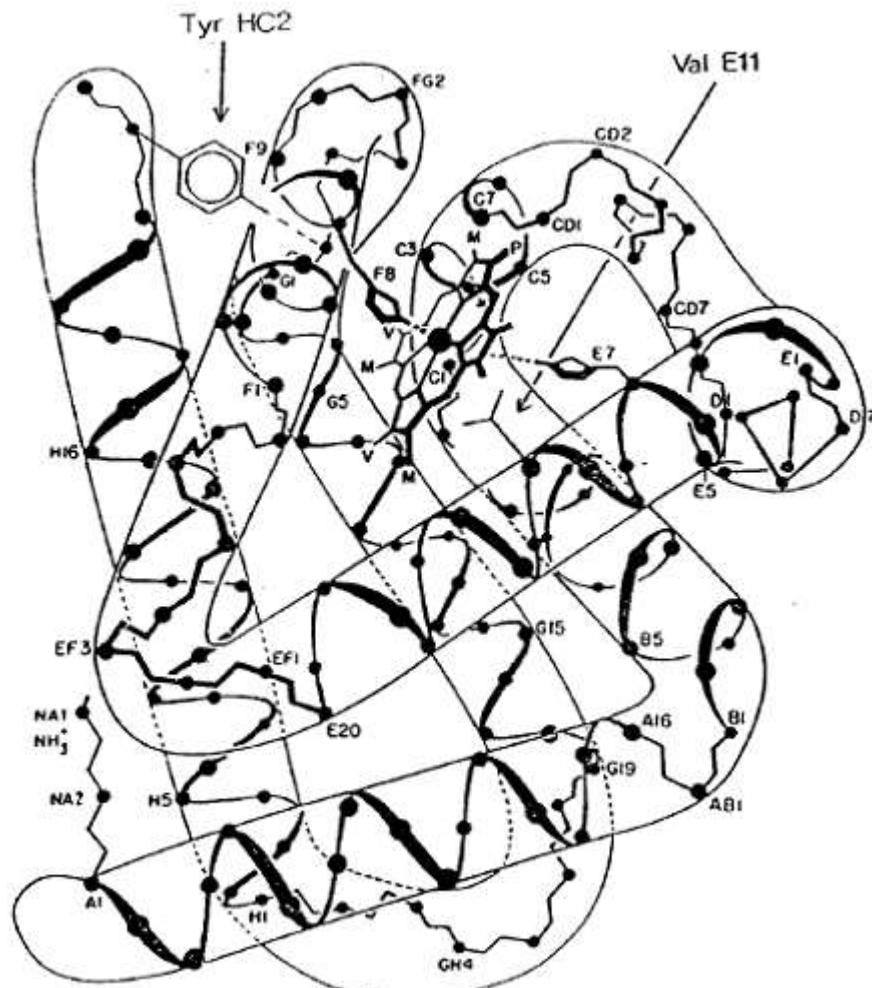
2.3.1 Estrutura e estados conformacionais das hemoglobinas de vertebrados

As Hbs de vertebrados ocorrem geralmente na forma de tetrâmeros. A exceção é a classe Agnatha (peixes-bruxa e lampreias), cujas Hbs ocorrem como monômeros quando oxigenadas e como dímeros ou tetrâmeros quando desoxigenadas (ROYER, 1992; WEBER; FAGO, 2004). A unidade monomérica das hemoglobinas é uma subunidade de globina. A subunidade de globina típica é uma cadeia polipeptídica, contendo em sua estrutura secundária 6-8 hélices α nomeadas de A-H, arranjadas em uma estrutura globular (Fig. 3). Entre as hélices existem regiões não helicoidais designadas pela combinação das letras das hélices α adjacentes (AB, CD, EF, FG). As regiões terminais são denominadas NA e HC. Cada resíduo na sequência de aminoácidos pode ser nomeado de acordo com a abreviação do resíduo, seguido do número na cadeia polipeptídica. Porém, identificamos mais comumente os resíduos de aminoácidos através da terminologia estrutural. Aqui, resíduos estão localizados em regiões helicoidais ou não, e recebem o nome de cada região seguido de um número representando sua posição nela. Por exemplo, a histidina proximal é o resíduo de aminoácido presente em todas as Hbs. Ela coordena o átomo de ferro do grupo heme. Na Mb ela ocupa o 93º resíduo a contar da extremidade aminoterminal e pode ser chamada de His 93. Na terminologia estrutural, chamamos de His F8 (o oitavo resíduo da hélice α F). Quando compararmos globinas diferentes na mesma espécie ou entre espécies, é útil utilizarmos uma combinação das duas: His F8(93). Na Fig. 3 vemos o grupo heme no bolsão entre as hélices E, F e G, e pela volta CD (JENSEN; FAGO; WEBER, 1998; NELSON; COX, 2014; PERUTZ, 1970, 1979, 1983, 1987, 1998).

A estrutura da maioria das Hbs de vertebrados consiste de quatro subunidades, cada

¹⁰ Para um histórico da descoberta dos raios X à estrutura biomolecular, ver: Gonçalves-Maia (2013). Para uma revisão sobre estrutura de Hbs até os primeiros estudos cristalográficos, abrangendo os estudos químicos e físicos-químicos antes deles, ver: Braunitzer *et al.* (1964). Sobre os princípios do método de análise de raios X aplicado a proteínas e o método de substituição isomórfica, ver: Perutz (1963). Sobre a primeira estrutura proteica: Goodsell (2000). Estruturas pioneiras do *Protein Data Bank* (PDB): Goodsell (2011).

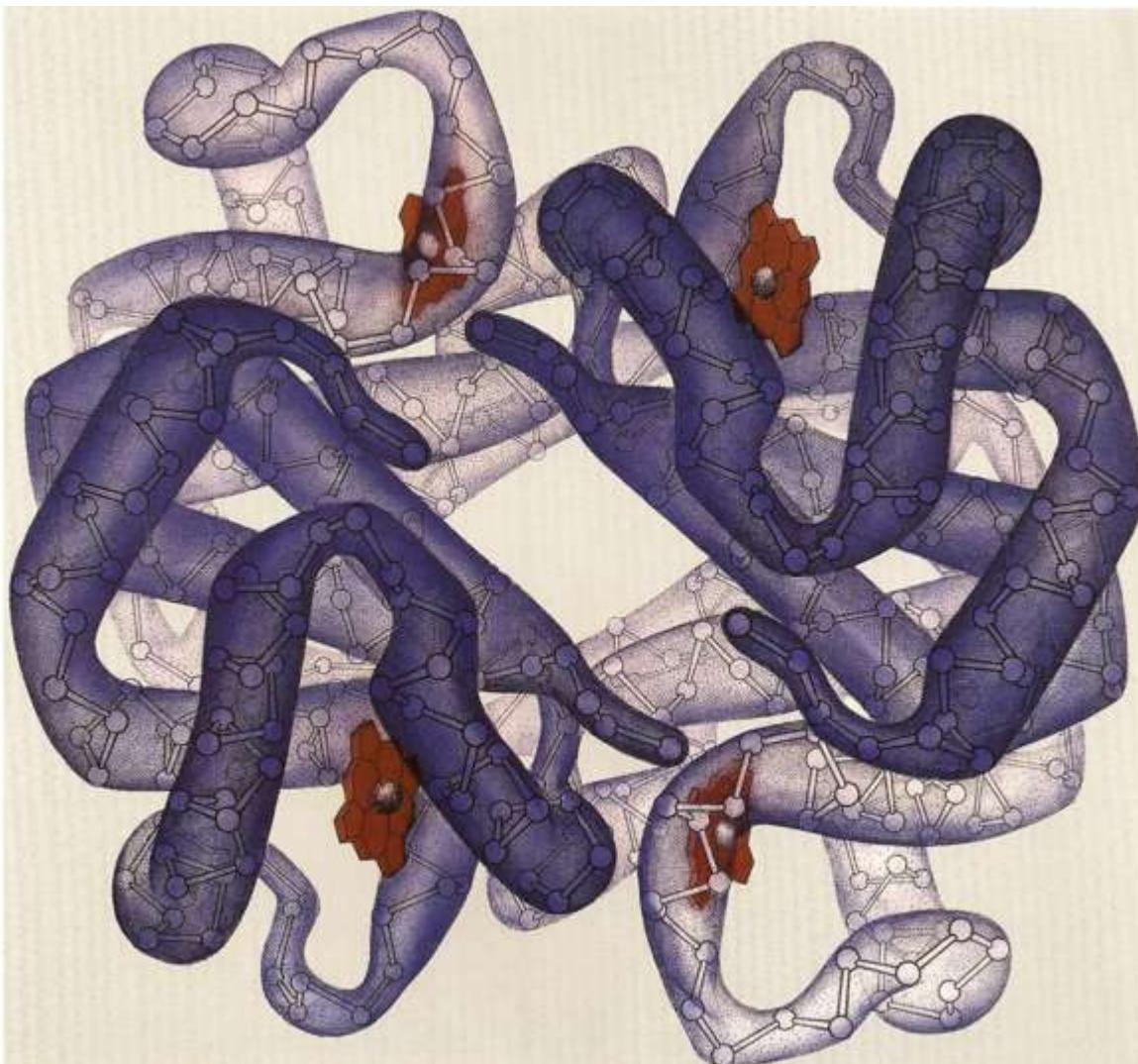
Figura 3 – Globina.



Fonte: adaptado de Pertuz (1998).

uma semelhante à Mb, dispostas em um arranjo tetraédrico, onde os grupos hemes residem em bolsões separados dentro de cada subunidade (Fig. 4). Existem dois tipos de subunidades: α , com 141 resíduos de aminoácidos; β com 146 resíduos de aminoácidos (no caso da Hb humana, pois em outras espécies o número de resíduos pode variar um pouco). Podemos descrever a estrutura quaternária da Hb como um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ ou como um dímero de protômeros $\alpha\beta$. As subunidades α e β são globinas, com 7 e 8 hélices α , respectivamente. A análise estrutural dos resíduos de aminoácidos na Mb e na Hb imediatamente revelaram algumas características gerais das estruturas de proteínas globulares. Os resíduos de aminoácidos na parte interna das proteínas são geralmente apolares, formando um núcleo hidrofóbico. Na parte externa predominam resíduos de aminoácidos polares, que interagem com a água através de ligações de hidrogênio. Os resíduos de prolina (Pro) estão confinados no final das hélices ou em regiões não helicoidais (KENDREW, 1960, 1961; PERUTZ, 1960, 1962; PERUTZ; KENDREW; WATSON, 1965; ROSSI-FANELLI; ANTONINI; CAPUTO; 1964).

Figura 4 – Hemoglobina.



Fonte: Ilustração adaptada de Irving Geis. Usada com permissão do Howard Hughes Medical Institute (www.hhmi.org). Todos os direitos reservados.

As regiões de contato em cada protômero $\alpha\beta$ na Hb envolvem interações entre 34 resíduos localizados nas hélices G e H, e na volta BC. Os contatos entre protômeros ($\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$) envolvem 19 resíduos nas hélices C e G e na volta FG (ANTONINI; BRUNORI, 1970; MAIRBÄURL; WEBER, 2012). Os quatro grupos heme da Hb estão separados e não interagem diretamente uns com os outros. Logo que as primeiras estruturas foram elucidadas, ficou claro que de fato existiam diferentes estados conformacionais devido à ligação com ligantes (MUIRHEAD; PERUTZ, 1963). Voltaremos ao significado das mudanças no estado conformacional global das Hbs posteriormente. Agora desviaremos nossa atenção para a complexidade das proteínas.

A Mb é um exemplo da complexidade proteica. Ela pode existir em inúmeros sub-estados conformacionais, antes chamados de isômeros. Podemos visualizar os sub-estados

conformacionais na forma de uma paisagem energética de conformação. A paisagem energética se organiza hierarquicamente e a função das proteínas envolve movimentos que correspondem a transições entre sub-estados conformacionais. As barreiras entre vales determinam os coeficientes de variação para os movimentos conformacionais. As flutuações entre os sub-estados conformacionais são controladas externamente; originadas no solvente ou na camada de solvatação. Assim, a proteína não é um sistema isolado. (FRAUENFELDER, 2010). A lição de que as proteínas não são estruturas estáticas – *periódicas* – como quando olhamos para sua estrutura resolvida pela cristalografia de raios X, ecoa desde a época em que o físico Erwin Schrödinger resolveu ministrar a série de palestras que deram origem ao seu influente livro *What is life?*. O livro tratou de dois temas das ciências biológicas: (1) hereditariedade; (2) termodinâmica dos seres vivos. Schrödinger desenvolveu o primeiro tema como *ordem a partir da ordem* e é considerado profético pela previsão da estrutura do DNA. O sucesso da biologia molecular e da *biotecnologia* nos 50 anos seguintes giraram em torno do primeiro tema. Contudo, o segundo tema está ganhando destaque à medida em que estudos sobre a termodinâmica de sistemas afastados do equilíbrio e das estruturas dissipativas estão sendo aplicados a sistemas vivos. Isto inclui, como podemos imaginar, o funcionamento interno das proteínas (MURPHY; O’NEILL, 1997; SCHNEIDER; KAY, 1997; SCHRÖDINGER, 1997).

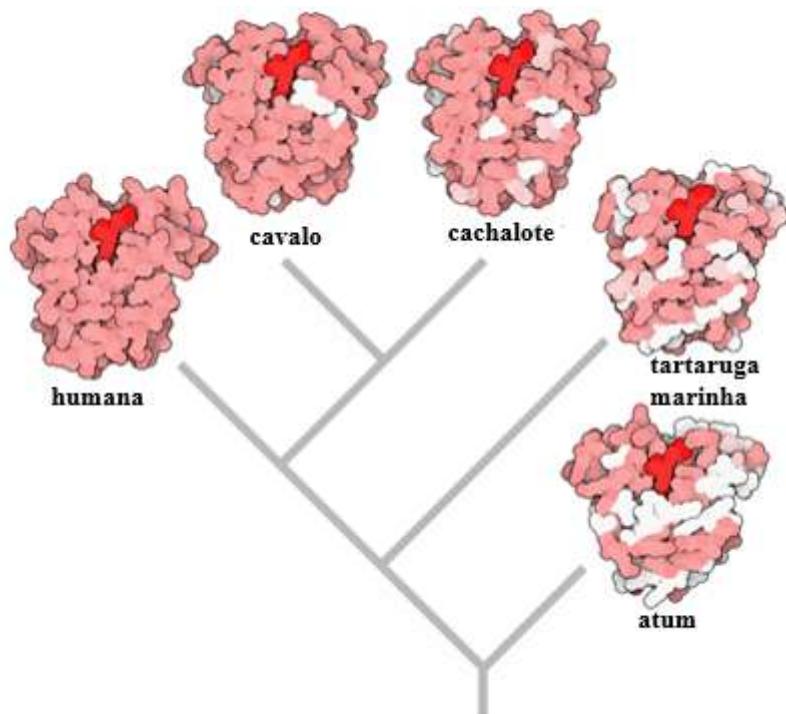
Embora as estruturas cristalográficas das Hbs costumem mostrar (mas nem sempre) apenas dois estados quaternários – o equivalente de dois vales energéticos separados por um morro na nossa paisagem conformacional – estudos de Hbs em solução com *Ressonância Magnética Nuclear* (RMN) e *Espalhamento de Raios X em Amplo Ângulo* (WAXS, do inglês *wide-angle x-ray scattering*), indicam a improbabilidade das estruturas em solução e no cristal serem idênticas. Recentemente, determinaram a estrutura da Hb ligada a CO à resolução de 2,3 Å pelo método de *Cryo-EM*, e o quadro que está emergindo é que o estado conformacional da Hb corresponde mais a uma paisagem energética relativamente achatada do que a dois profundos vales separados por um morro (GELL, 2018; KHOSHOUEI *et al.*, 2017a, 2017b). Ironicamente, apesar dos cristais de proteínas serem estruturas periódicas, ou seja, são compostos por unidades que se repetem, as estruturas de proteínas mostram-se cada vez mais parecidas com a imagem do *cristal aperiódico* de Schrödinger. Precisamos iluminar a questão da *ordem a partir da desordem* em proteínas.

2.3.2 Genômica, epigenômica e evolução molecular de hemoglobinas

Durante a ontogenia dos vertebrados, cada espécie produz múltiplas formas de Hbs nos eritrócitos, no tempo certo e na quantidade apropriada. Dois agrupamentos de genes de globinas são responsáveis por codificar estas múltiplas Hbs em quase todas as espécies. Um deles, ligado ao gene NPLR3, é preservado em todos os vertebrados. Mais interessante é que a conservação na *sintenia* no gene NPLR3 pode refletir a presença de um poderoso *potenciador* de transcrição de genes de globina. Além disso, várias características epigenéticas das regiões regulatórias dos genes de globinas também são preservadas entre os vertebrados. Os genes de globinas possuem sequências promotoras canônicas, que são os sítios de regulação proximal. Os *potenciadores* são sítios de regulação distais e são necessários para o alto nível de expressão dos genes de globinas. Outrossim, proteínas repressoras orquestram as mudanças de expressão de genes de globinas embrionários/adultos (PHILIPSEN; HARDISON, 2018).

As Hbs apresentam estruturas terciárias muito semelhantes, embora existam algumas diferenças em suas estruturas primárias. Os mecanismos da evolução molecular são revelados na sequência e estrutura de globinas, como podemos notar na Fig. 5.

Figura 5 – Árvore filogenética de mioglobinas de vertebrados.



Fonte: adaptado de Goodsell (2017).

Comparamos as Mbs em relação à Mb humana. Rosa: aminoácidos idênticos; rosa claro: aminoácidos similares; branco: aminoácidos completamente diferentes. O grupo heme está em vermelho. Entradas no PDB: 3rgk, 1ymb, 1mbo, 1lhs, 2nrl.

2.3.3 Hemoglobinas e suas reações com ligantes

O Fe(II) do grupo heme coordena ligações covalentes com ligantes gasosos e não gasosos tais como O₂, CO, NO, HNO, NO₂⁻, H₂S, isocianetos de alquila e nitrosocompostos. O Fe(II) pode sofrer oxidação a Fe(III), formando metemoglobina (metHb), que não é capaz de ligar O₂, mas pode se ligar a outros íons, como: cianeto, cianato, tiocianato e azida. Enquanto isso, a globina fornece o ambiente adequado para fazer a ligação dos ligantes reversível e seletiva. Também existem ligantes que não se ligam ao grupo heme, mas que são capazes de modular a afinidade da Hb por O₂. Eles são conhecidos como efetores alostéricos heterotrópicos. Temos H⁺ e CO₂ (responsáveis pelo efeito Bohr como veremos mais adiante), íons cloreto, e fosfatos orgânicos tais como 2,3 bifosfoglicerato (BPG) em mamíferos, inositol pentafosfato (IPP) em aves, adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) em vertebrados ectotérmicos e peixes. Em répteis crocodilianos temos os íons HCO₃⁻ ao invés de fosfatos orgânicos. Íons lactato, CO, NO e H₂O também podem modular a afinidade do Fe(II) por O₂ na Hb (ANTONINI, 1967; GELL, 2018; MAIRBÄURL; WEBER, 2012).

Hbs também reagem com outros metabólitos. Glicose pode reagir através da clássica reação de Maillard com a extremidade N-terminal ou com outros sítios da proteína formando Hb glicada. Foi uma descoberta através de serendipidade que acabou revelando aplicações clínicas úteis no acompanhamento dos níveis de glicose no diabetes. A ureia também reage da mesma forma formando Hb carbamilada (NELSON; COX, 2014; WEYKAMP; JOHN; MOSCA, 2009). A haptoglobina (Hp), uma proteína plasmática, liga-se à Hb quando esta é liberada no plasma. A Hp impede que a Hb cause danos oxidativos a lipídios e proteínas (ANTONINI, 1967; WICHER; FRIES, 2006). As *chaperonas* AHSP e hsp90 se associam com a parte apoptoteica de globinas distintas, auxiliando nas reações de inserção do grupo heme e maturação dos tetrâmeros no ambiente celular (GHOSH *et al.*, 2018; VOET; VOET, 2013). Muitas Hbs possuem o N-terminal das cadeias α acetilados. Os grupos tióis reativos também podem participar de outras reações, inclusive polimerização de Hbs por pontes dissulfeto. Como as subunidades estão em equilíbrio tetrâmero/dímero, em alguns casos podemos ver tetrâmeros assimétricos devido à mistura de tetrâmeros simetricamente distintos (INGERMANN, 2010; REISCHL *et al.*, 2007). Como o tema do presente trabalho se concentra nas propriedades de ligação de O₂ das Hbs de anfíbios, precisamos conhecer melhor esse fenômeno.

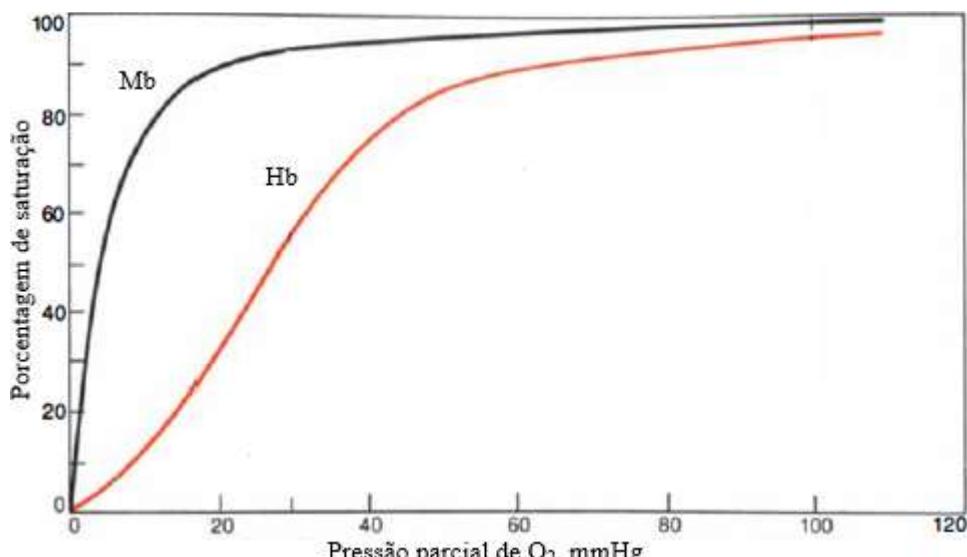
2.3.3.1 Ligação de O₂ a hemoglobinas

A ligação da Hb com o O₂ está associada a grandes mudanças espectrais, que são proporcionais à quantidade do ligante ligado ao ferro hemínico (ANTONINI, 1967). Dessa maneira, podemos estudar o equilíbrio da Hb com o O₂ adicionando gradualmente o ligante à Hb desoxigenada e medindo a saturação fracionária (Y). A saturação fracionária corresponde à fração dos sítios de interação ocupados com o ligante. Espectrofotometricamente, podemos obtê-la a partir da seguinte relação:

$$Y_i = \frac{A_i - A_0}{A_1 - A_0} \quad (2)$$

Onde Y_i é a saturação fracionária equivalente a uma dada quantidade de ligante adicionado observada em um comprimento de onda definido. A_0 , A_1 e A_i são, respectivamente, as absorbâncias da Hb completamente desoxigenada, completamente oxigenada e em um determinado ponto de oxigenação. Outra forma de fazer isso é começar com a Hb oxigenada e retirar o ligante gradualmente. O gráfico que coloque Y em função de [O₂] é conhecido como curva de dissociação de oxigênio (CDO) (Fig. 6). Alternativamente, podemos plotar a porcentagem de saturação ($Y\%$) no lugar de Y . E outra maneira de representar o ligante é como a pressão parcial do gás sobre a solução. Também podemos analisar a interação da Hb com o O₂ medindo a cinética de ligação. Existem várias metodologias disponíveis na literatura para

Figura 6 – Curva de dissociação de oxigênio.



Fonte: adaptado de Pertuz (1998).

estudos de equilíbrio e cinética de Hb com seus ligantes.¹¹

Conforme observamos na Fig. 6, a CDO para a Mb é diferente para a Hb. A CDO da Mb é hiperbólica. A CDO da Hb é sigmoide. O que isto significa?

A Hb transporta O₂ dos pulmões para os tecidos. Na pressão parcial de oxigênio (pO₂) dos pulmões ela está cerca de 96% saturada. Nos tecidos, a pO₂ é menor (pO₂ = 35 mmHg), fazendo parte do O₂ ligado à Hb dissociar-se. Agora, imaginemos o que aconteceria se a Hb tivesse a mesma CDO da Mb. Ela estaria saturada na pO₂ dos pulmões, mas não liberaria O₂ quando chegasse aos tecidos. A curva sigmoide permite o transporte eficaz de O₂ no gradiente estreito de pO₂ entre os órgãos de captação de O₂ e os tecidos onde ele deve ser liberado para a respiração (INGERMANN, 2010; PERUTZ, 1978). Chamamos de cooperatividade o efeito que causa a CDO sigmoide.

O equilíbrio químico entre uma proteína de ligação a O₂ com *n* sítios de ligação pode ser descrito através da seguinte equação:

$$\frac{[O_2]^n}{[O_2]^n + K_d} \quad (3)$$

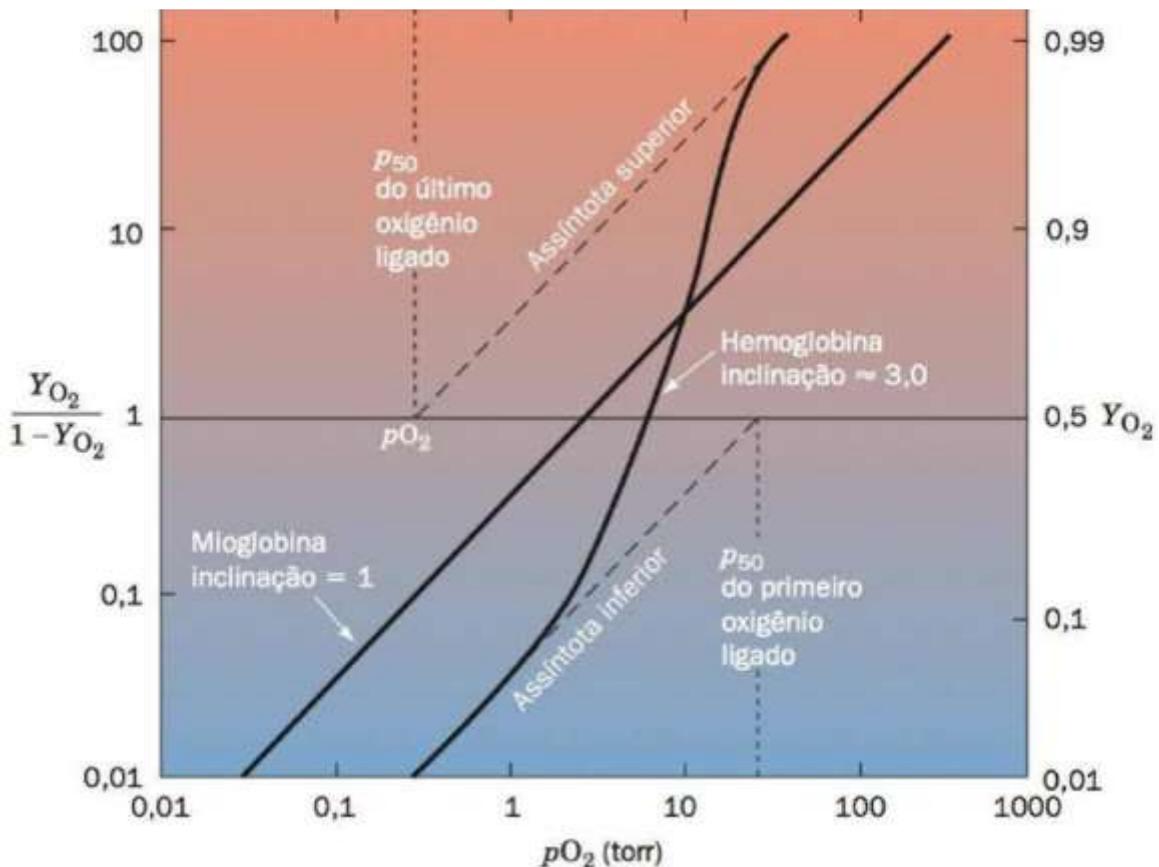
Rearranjando os termos e aplicando o log em ambos os lados na equação acima obtemos a equação de Hill:

$$\log \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = n \cdot \log [O_2] - \log K_d \quad (4)$$

Basta plotar $\log(Y/1-Y)$ versus $\log [O_2]$ para obter a curva de Hill (Fig. 7). Contudo, empiricamente sabemos que *n* não equivale ao número de sítios de interação, mas a uma medida do grau de cooperatividade da proteína. Ele passa a ser o coeficiente de Hill (*n_H*) e pode ser determinando a partir da inclinação da parte central da curva de Hill. Quando *n_H* é igual a 1, temos uma proteína não cooperativa. É o caso da Mb. Quando o valor de *n_H* está acima de 1, existe cooperatividade positiva. Se for menor, a cooperatividade é negativa. Caso seja superior

¹¹ Algumas metodologias para estudar equilíbrio e cinética da Hb com seus ligantes: Giardina e Amiconi (1981); Gill (1981); Gilles-Gonzalez *et al.* (2008); Hellmann, Weber e Decker (2008); Hofrichter *et al.* (1994); Imai (1981a, 1981b, 1994); Lappennas, Colacino e Bonaventura (1981); Olson (1981); Powers, Hobish e Greaney (1981); Ronda *et al.* (2008); Rossi-Fanelli, Antonini e Caputo (1964); Vandegriff e Shrager (1994); Winslow, Murray e Gibson (1994).

Figura 7 – Curva de Hill.



Fonte: adaptado de Voet e Voet (2013).

ao limite teórico (o número de sítios de ligação), há supercooperação. Notem que a extrapolação da assíntota inferior para o eixo horizontal indica a pO_2 para a ligação do primeiro O_2 à Hb. Fazendo o mesmo para a assíntota superior obtemos a pO_2 para a ligação do último O_2 à Hb. (NELSON; COX, 2014; RIGGS, 1998; VOET; VOET, 2013). Como muitos autores adaptam a eq. 4 para experimentos onde medem a variação da pO_2 em vez da $[O_2]$ numa dada temperatura substituindo pO_2 por $[O_2]$ e p_{50}^n (a pO_2 na qual metade dos sítios de interação estão ocupados) por K_d , podemos simplesmente converter o valor de P_{50} (p_{50}^n , em unidades de mmHg, Pa ou Torr) multiplicando-o pela K_H apropriada de acordo com a temperatura em que o experimento foi realizado (ver Apêndice A), para obtermos uma estimativa do K_d (μM) naquelas condições.

Se medimos a CDO sob uma ampla faixa de saturação de O_2 , podemos determinar as constantes de associação intrínsecas para cada uma das quatro moléculas de oxigênio (as constantes de Adair, A_1 , A_2 , A_3 , A_4). Podemos determinar Y usando as constantes de Adair quando $[O_2]$ é mantida constante durante a oxigenação:

$$Y = \frac{A_1[O_2] + 2A_2[O_2]^2 + 3A_3[O_2]^3 + 4A_4[O_2]^4}{4(1 + A_1[O_2] + A_2[O_2]^2 + A_3[O_2]^3 + A_4[O_2]^4)} \quad (5)$$

A_1 e A_4 são as assíntotas inferior e superior da curva de Hill, respectivamente. Podemos determinar as outras duas constantes ajustando a eq. 5 à curva de Hill (ADAIR, 1925; MAIRBÄURL; WEBER, 2012; VOET; VOET, 2013). Embora a equação de Adair descreva de maneira geral a ligação de O_2 à Hb, ela carece de um critério físico para justificar a diferença entre as várias constantes. Precisamos de modelos que expliquem como isto acontece. Explicar a cooperatividade na Hb é explicar a natureza das transições alostéricas.

2.3.3.1.2 A natureza das transições alostéricas

Em 1965, Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux apresentaram um modelo alostérico para a Hb. O modelo, que ficou conhecido como *modelo combinado* ou *modelo de simetria*, ou simplesmente modelo MWC, propõe que a proteína alostérica é um oligômero, cujas subunidades simétricas podem existir no equilíbrio entre (pelo menos) dois estados conformacionais – T e R – que estão relacionados na população de moléculas com o nível de saturação. O ligante pode interagir com quaisquer dos estados conformacionais, mas, ao fazê-lo, pode mudar a conformação do oligômero, favorecendo o equilíbrio entre um dos estados conformacionais. Podemos olhar para a CDO da Hb como o produto de uma proteína que apresenta dois estados conformacionais com afinidades diferentes por O_2 . O estado T da Hb possui baixa afinidade. O estado R possui alta afinidade. A sobreposição das curvas hiperbólicas desses estados produz uma curva sigmoidal. As constantes de dissociação para a interação do O_2 com os dois estados, K_T e K_R , são as assíntotas inferior e superior da curva de Hill, respectivamente. O equilíbrio entre os dois estados é descrito pela equação $L = [T]/[R]$ na ausência de ligantes. Definindo a concentração normalizada do ligante (α) como sendo igual à razão entre $[O_2]$ e K_T , e c a razão K_R/K_T , podemos estabelecer a equação para a saturação fracionária como:

$$Y = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + L\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n} \quad (6)$$

Anteriormente vimos alguns exemplos de efeitos heterotrópicos. Eles podem alterar a afinidade da Hb por O₂ influenciando o equilíbrio entre os estados T/R. Assim, o modelo oferece uma explicação plausível para a cooperatividade sem evocar interações diretas entre os ligantes (BROUWER, 1992; BRUNORI, 2014; MONOD; WYMAN; CHANGEUX, 1965; VOET; VOET, 2013). Vejamos a base física da alosteria.

2.3.3.2 Mecanismo estereoquímico dos efeitos cooperativos em hemoglobinas

Baseado na análise de raios X da Hb em suas formas desoxigenada e oxidada à metHb, assim como estudos sobre a interação de ligantes na conformação do grupo heme, Perutz propôs um mecanismo estereoquímico para a cooperatividade que era compatível com o modelo MWC. Ele postulou que a oxigenação da Hb é acompanhada por mudanças estruturais nas subunidades que são desencadeadas por mudanças na posição do átomo de ferro, que se move ~0,4 Å em direção ao plano do grupo heme. Para se mover, o Fe, que está ligado à histidina proximal, desloca a hélice F. Ao fazer isso, os protômeros αβ deslizam 15° um sobre o outro, estreitando a cavidade entre as subunidades β e desfazendo pontes salinas que estabilizam o estado T. (PERUTZ, 1970, 1978, 1979, 1987, 1998). Mas qual seria o papel da histidina distal? Perutz sugere que ela funciona como uma armadilha de prótons, dificultando a reação de auto-oxidação do ferro hemínico (PERUTZ, 1989). Além disso, ela é responsável por esteticamente diminuir a afinidade por outros ligantes, como CO e NO, produtos do metabolismo que atrapalhariam o transporte de O₂. Apesar de tudo, ainda não entendemos completamente de onde vem a energia livre para a cooperatividade em Hbs (GELL, 2018).

Como falei anteriormente, existem estudos de RMN, WAXS, *Cryo-EM*, além da própria cristalografia de raios x e estudos termodinâmicos etc., que desafiam a noção estrita do modelo MWC na qual existem apenas dois estados conformativos com diferentes afinidades por O₂, e que eles são os principais responsáveis pela cooperatividade. Recentemente, um ponto ainda não suficientemente estudado lançou nova luz ao assunto. As subunidades α e β possuem diferentes papéis no efeito cooperativo. A ligação Fe-His nas subunidades β diminui a afinidade por O₂ nas subunidades α da Hb nativa, que relaxa durante a sucessiva ligação de O₂ (evento crítico para o efeito cooperativo). Por outro lado, a ligação Fe-His das subunidades α na Hb nativa é essencial para aumentar a afinidade por O₂ nas subunidades β. Em outras palavras, a ligação de ligantes às subunidades α controlam, concomitantemente, a afinidade por O₂ nas

subunidades β através de mudanças na estrutura quaternária, enquanto que as subunidades β controlam a afinidade por O₂ das subunidades α pela mudança na região C-terminal através da ligação Fe-His (NAGATOMO *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2015).

Físicos desenvolveram um entendimento verdadeiramente mais profundo da função da Hb do que obteve Perutz através de modelos estruturais estáticos e análise qualitativa. Inicialmente, os estudos com Hb imobilizada em cristal ou em nanoporos de sílica gel, onde a proteína perde a liberdade de alternar entre as diferentes estruturas quaternárias, forneceram evidências experimentais convincentes em favor do modelo MWC e do mecanismo de Perutz. Em adição, espectroscopia resolvida no tempo em regime de picosegundos a milissegundos, juntamente com o entendimento melhorado da física de proteínas a partir de estudos sobre Mb, levaram a uma interpretação cinética complexa em favor do modelo MWC (EATON *et al.*, 1999).

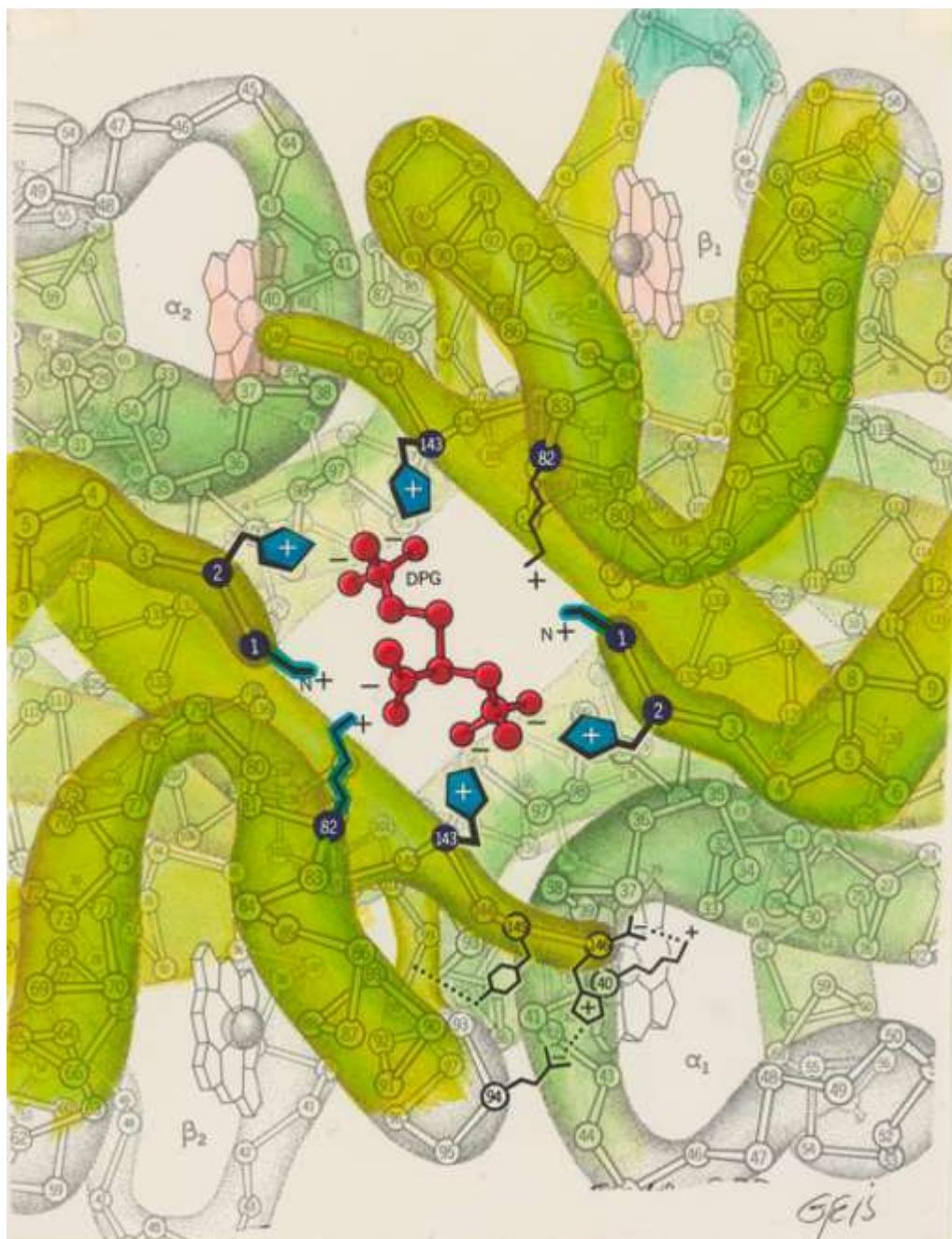
Entretanto, os experimentos de equilíbrio e cinética de ligação de ligantes à Hb em cristais ou em sílica gel mostraram que mudanças conformacionais terciárias desempenham um papel principal na regulação da afinidade da Hb, mesmo dentro de um único estado quaternário. Isto é inconsistente com o modelo MWC clássico. Mas os experimentos parecem ser consistentes com o modelo *Terciário Dois Estados* (TTS, do inglês *Tertiary Two State*), proposto por Eaton e colaboradores. Esse modelo preserva o postulado fundamental do modelo MWC, de que a cooperatividade na ligação de oxigênio surge de uma alteração na conformação quaternária. Mas o modelo TTS coloca que a estrutura quaternária (T/R) não afeta a reatividade dos estados terciários (t/r). Em vez disso, a conformação quaternária afeta a população relativa de estados terciários. A característica que distingue o modelo TTS é que as duas conformações terciárias das subunidades, t e r, existem em equilíbrio dentro de ambos os estados quaternários, T e R (BETTATI; VIAPPANI; MOZZARELLI, 2009; EATON *et al.*, 2007; GELL, 2018).

2.3.3.3 Efetores heterotrópicos

BPG, ATP, GTP etc. são exemplos de fosfatos orgânicos presentes nos eritrócitos e que diminuem a afinidade da Hb por O₂ entre diferentes espécies de vertebrados. Todos eles possuem apenas um sítio de ligação à Hb, que está localizado entre as subunidades β no estado T (o sítio some com o movimento dos protômeros em direção ao estado R). Favorecendo o

equilíbrio em favor do estado T, eles deslocam a CDO para a direita. Nos eritrócitos humanos, o BPG está presente em quantidade equimolar à Hb (~5 mM). Na Fig. 8 podemos observar a ligação do BPG, onde resíduos positivamente carregados interagem com os fosfatos carregados negativamente. O princípio de ligação é o mesmo para os outros fosfatos orgânicos que modulam a afinidade da Hb em outras espécies. Nos crocodilianos, contudo, dois bicarbonatos se ligam no mesmo local e desempenham o mesmo papel dos fosfatos orgânicos (ARNONE, 1972, 1974; BENESCH; BENESCH, 1969; INGERMANN, 2010).

Figura 8 – Ligação do BPG à Hb humana.



Fonte: Ilustração adaptada de Irving Geis. Usada com permissão do Howard Hughes Medical Institute (www.hhmi.org). Todos os direitos reservados.

Íons cloreto (Cl^-) também diminuem a afinidade da Hb por O_2 . Porém, o mecanismo estrutural da interação de Cl^- permanece misterioso. Existem duas hipóteses principais que pretendem explicá-lo. A primeira diz que a interação ocorre em sítios *localizados* entre a Val 1 da extremidade aminoterminal e Ser 131 das cadeias α , e outro sítio entre os resíduos Val 1 e Lys 82 das cadeias β . A segunda hipótese sustenta que *não existe* um sítio localizado. Os Cl^- difundem-se na cavidade repleta de água entre as cadeias β e estabilizam a repulsão das cargas positivas lá existentes – que desestabilizam o estado T – dessa forma reduzindo sua energia livre (PERUTZ; SHIH; WILLIAMSON, 1994; WEBER *et al.*, 2002; WEBER; FAGO, 2004). É importante lembrar que na literatura, uma solução de Hb desprovida de moléculas ou íons que possam atuar como efetores alostéricos é chamada *stripped*.

A afinidade da Hb por O_2 diminui quando o pH diminui. Esse fenômeno é conhecido como *efeito Bohr* (BOHR; HASSELBALCH; KROGH, 1904). As bases estruturais do efeito Bohr são bem conhecidas. H^+ se dissocia quando ácido carbônico é produzido nos eritrócitos pela ação da anidrase carbônica no CO_2 liberado na respiração. H^+ também é liberado quando o próprio CO_2 reage com o grupo α -amino da extremidade aminoterminal das cadeias da Hb, formando carbaminoglobina. Por sinal, a Hb também transporta 15-20% do CO_2 produzido para os pulmões, que é então liberado na expiração. O excesso de H^+ protona a His 146 das subunidades β , que por sua vez forma pares iônicos com Asp 94, estabilizando o estado T. Também existem evidências de que a Val 1 das cadeias α participam do efeito Bohr dependente de Cl^- (GELL, 2018; GIARDINA; MOSCA; DE ROSA, 2004; RIGGS, 1988).

Ainda relacionados às reações da Hb com H^+ e CO_2 , temos dois efeitos. O *efeito Haldane* é recíproco ao efeito Bohr, e consiste na influência da saturação de O_2 da Hb sobre a ligação de H^+ e CO_2 . Além disso, novas evidências sugerem que o efeito Bohr/Haldane exerce um impacto maior na afinidade por O_2 do que se imaginava, de forma que a medida do efeito Bohr (o fator Bohr) não é independente da K_d do oxigênio na Hb, mas diretamente relacionada a ela (MAIRBÄURL; WEBER, 2012; MALTE; LYKKEBOE, 2018). E temos então o *efeito Root*. Ele foi descoberto por Root e colaboradores na década de 1930. O efeito Root consiste numa forma de efeito Bohr extremo, onde o estado T da Hb é tão estável num baixo pH que ela não satura completamente mesmo na pO_2 atmosférica. Ele é observado em Hbs de peixes e, curiosamente, em anfíbios. A base estrutural do efeito Root ainda não é bem compreendida, mas a His HC3(147) da cadeia β das Hbs de peixes parece estar envolvida (BRITTAINE, 1987, 2005; PERUTZ, 1983, 1996; ROOT, 1931). Embora a função do efeito Root tenha sido relacionada a papéis especializados na oxigenação da retina e no mecanismo de inflar a bexiga

natatória, evidências recentes sugerem que ele melhora a entrega geral de O₂ aos tecidos durante estresse acidótico (RUMMER *et al.*, 2013).

2.3.4 Quantificação de proteínas totais e hemoglobinometria

Stadie (1920) iniciou o método de CNmetHb para determinar a concentração de metHb no sangue, que na época era relatado que estava associada a infecções pneumocócicas. Drabkin e Austin (1932, 1935) avançaram o método e a matemática. CNmetHb (ou HiCN) possui um espectro de absorção no qual todos os outros derivativos de Hb podem ser convertidos, com exceção de sulfemoglobina (VAN KAMPEN; ZIJLSTRA, 1983; ZIJLSTRA, 1997). Determinar o coeficiente de extinção molar ($\epsilon^{540}_{\text{HiCN}}$) desse derivativo permite que configuremos todos os demais espectros da Hb em relação a ele.

O valor de $\epsilon^{540}_{\text{HiCN}}$ aceito internacionalmente para a Hb humana é 11,0 L.mmol⁻¹.cm⁻¹ (VERWILGHEN, 1987; ZIJLSTRA; VAN KAMPEN, 1960; ZWART *et al.*, 1996). Para calcular esse valor, algum outro método deve fornecer a concentração de Hb. Comumente, determinar o conteúdo de ferro serve como referência para calibrar o método (SALVATI; TENTORI; VIVALDI, 1965; ZIJLSTRA; VAN KAMPEN, 1960). Determinar o conteúdo de nitrogênio e carbono também demonstra uma boa concordância com o valor obtido com o ferro como referência (ITANO; FORGARTY JR; ALFORD, 1971; TENTORI; VIVALDI; SALVATI, 1966). Isto é possível por que a Hb e seus derivativos comuns, pelo menos na região do espectro visível, seguem a lei de Lambert-Beer (VAN KAMPEN; ZIJLSTRA, 1983). Assim, utilizando o reagente de Drabkin, convertemos toda a Hb em solução ao derivativo CNmetHb e determinamos sua concentração (TENTORI; SALVATI, 1981). Isto nos permite ancorar os coeficientes de extinção da maioria dos derivativos de Hb com precisão (VAN ASSENDELFT; ZIJLSTRA, 1975). Recentemente, determinaram novos e mais precisos coeficientes de extinção para a Hb humana utilizando Hbs altamente purificadas e em diferentes e bem caracterizados estados redox (MENG; ALAYASH, 2017).

Embora os coeficientes de extinção tenham sido determinados de forma acurada para Hbs humanas de diferentes maneiras, Riggs (1981) relatou na época que medidas correspondentes para Hbs de outros animais eram quase inexistentes. Ele apontava ainda que medições da quantidade de Hb em outros animais simplesmente assumiam que os coeficientes

de extinção determinados para a Hb humana eram apropriados. A isto ele chamou de espectrofotometria antropomórfica. Dez anos após a avaliação de Riggs, Zijlstra e colaboradores encontraram diferenças significativas na absorvidade entre as Hbs humanas adulta e fetal (ZIJLSTRA; BUURSMA; MEEUWSEN-VAN DER ROEST, 1991). Então determinaram também os coeficientes de extinção dos derivativos de Hb de rato e da Hb bovina (ZIJLSTRA *et al.*, 1994; ZIJLSTRA; BUURSMA, 1997).

2.3.5 Dicroísmo circular de hemoglobinas

Podemos visualizar a luz plano-polarizada como sendo composta de dois componentes circularmente polarizados em sentido horário e anti-horário. O dicroísmo circular (CD) é a absorção diferencial dos dois componentes. Podemos obter valiosas informações sobre proteínas utilizando CD (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Estimar o conteúdo de estruturas secundárias é uma delas (GREENFIELD, 2006a). Alguns algoritmos, junto com conjuntos de dados sobre estruturas secundárias são necessários para estimar o conteúdo de estrutura secundária de uma proteína desconhecida (SREERAMA; WOODY, 2000). Também podemos utilizar o CD em função da temperatura para analisar a termodinâmica do desenovelamento das proteínas e suas interações de ligação (GREENFIELD, 2006b). As medições do espectro de CD são vantajosas para estudar Hbs, pois, além da parte apoptoteica, há o grupo heme, cujas transições eletrônicas são intensas, variadas e muito sensíveis ao ambiente circundante e à ligação de ligantes. Tal situação oferece três regiões distintas de investigação, cada uma delas oferecendo informações únicas sobre partes da organização estrutural da molécula: (1) UV distante, 190-240 nm; (2) UV próximo, 240-300 nm; (3) região acima de 300 nm, incluindo o visível (GERACI; PARKHURST, 1981). Outra possibilidade surge diante dos avanços em CD estacionário e resolvido no tempo (ZENTZ; PIN; ALPERT, 1994). Embora o espectro de CD seja idêntico para várias Hbs testadas, Hbs de sapo e galinha exibem diferenças em relação à Hb humana na região de Soret, exibindo vales negativos maiores (SUJITA; NAGAI; YONEYAMA, 1971). É possível que a banda positiva na região de Soret ocorra devido a interações entre o grupo heme e a apoglobina (NAGAI *et al.*, 2014). CD também oferece informações sobre a interação do grupo heme com reguladores alostéricos sintéticos (CHEN *et al.*, 2005).

2.3.6 Diversidade de globinas de vertebrados e suas múltiplas funções

Existem pelo menos oito membros na família de globinas de vertebrados, cada um com características distintas. Além da Hb e Mb, começando próximo da virada do milênio ou já no seu início (dependendo da cronometria que o leitor adotar¹²), seis outros tipos de globinas foram identificados: neuroglobina (Ngb), citoglobina (Cygb), globina X (GbX), globina Y (GbY), globina E (GbE) e androglobina (Adgb). A Hb, como já sabemos, transporta O₂ no sangue. Hb, Mb, e Ngb atuam no processo de produção endógena de tiossulfato. Além disso, a Hb interage com o domínio citoplasmático da banda 3 de proteínas de membrana eritrocítica, modulando a glicólise no eritrócito. Mb, GbE, e possivelmente também Ngb, possibilitam o suprimento de O₂ intracelular para a mitocôndria. Hb, Mb, Ngb e Cygb podem converter NO a NO₃⁻ quando estão oxigenadas, e NO₂⁻ a NO quando estão desoxigenadas. Elas também podem desintoxicar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. A GbX pode ser um componente de uma cadeia de transdução de sinal mediada por membrana. Cygb pode desencadear uma cascata de sinalização de lipídeo; também possui papéis na fibrogênese e carcinogênese, e sua presença no núcleo sugere possíveis papéis na transcrição. Ngb pode impedir apoptose induzida por hipóxia via redução do citocromo c ou agindo como uma proteína sinalizadora. Além disso, a Hb possui a função distinta de catalisar a degradação de coenzima A e adição do produto panteteinato a flavonóides da dieta. Ainda não localizaram o sítio catalítico na Hb, mas encontraram evidências de que não é o grupo heme. Excluindo o grupo heme, a hipótese mais parcimoniosa seria o sítio de interação com fosfatos orgânicos entre as cadeias β. E, por sinal, metade da coenzima A é ADP¹³ (BILSKA-WILKOSZ *et al.*, 2017; BURMESTER; HANKELN, 2014; GEUENS *et al.*, 2004; HANKELN *et al.*, 2005; HELMS; KIM-SHAPIRO, 2013; NAGAKUBO *et al.*, 2018; PESCE *et al.*, 2002; REISCHL, E. *et al.*, 2007; RIGGS; GORR, 2006; WEBER *et al.*, 2004). A Hb também possui afinidade por uma endotoxina da membrana de bactérias Gram-negativas, de forma que libera espécies reativas de O₂ quando se liga a elas e, por isso, faz parte de uma resposta imune (ANDERSON; BRODSKY; MANGALMURTI, 2018).

2.3.7 Adaptações funcionais em hemoglobinas de vertebrados

¹² O milênio em questão: Gould, 1999.

¹³ Estrutura da coenzima A: Baddiley e Thain (1953).

Irei apenas destacar algumas adaptações funcionais em Hbs de vertebrados que servirão de base para o assunto seguinte e o foco dessa revisão: as Hbs de anfíbios. O leitor pode olhar para as seguintes revisões sobre o tema em busca de obter mais detalhes: Brittain (1991); Fago (2017); Ingermann (1992, 2010); Jensen, Fago e Weber (1998); Mairbäurl e Weber (2012); Perutz (1983); Weber (2007); Weber e Campbell (2011); Weber e Fago (2004); Weber e Jensen (1988).

A equação de Fick descreve a relação entre fluxo sanguíneo e transporte de O₂:

$$\dot{V}_{O_2} = \dot{Q}_h \cdot \beta_{O_2} \cdot \Delta p_{O_2} \quad (7)$$

Onde \dot{V}_{O_2} se refere ao consumo de O₂; \dot{Q}_h é a vazão cardíaca requerida para uma dada transferência convectiva de oxigênio; e β_{O_2} é o coeficiente de capacitância, que quantifica a quantidade de O₂ descarregado para uma dada diferença de pO₂ arteriovenosa. As Hbs de vertebrados aumentam a capacidade de transporte de O₂ ao mesmo tempo que aumentam o coeficiente de capacitância de O₂ sanguíneo. Isto permite reduzir a vazão cardíaca requerida para uma dada transferência convectiva de O₂. De forma geral, podemos dizer que as adaptações para aumentar o transporte de O₂ no sangue através da Hb são de dois tipos: (1) quantitativas – aumentar [Hb] no sangue; (2) qualitativas – controlar os níveis de efetores alostéricos como meios de adaptar rapidamente a Hb a mudanças na demanda de O₂. (MAIRBÄURL; WEBER, 2012; WEBER; JENSEN, 1988).

As espécies de vertebrados experimentam variações na pO₂ e pCO₂ durante sua história de vida. Quando os animais despendem considerável tempo em ambientes subterrâneos, precisam adaptar-se ao limitado acesso à atmosfera ou à água. Muitos vertebrados ectotérmicos se escondem dentro do substrato para escapar de pressões ambientais, tais como secas sazonais ou temperaturas extremas. Como as atividades metabólicas desses animais podem ultrapassar a renovação de gases em seu microambiente, o resultado é *hipoxia* ou *hipercarbia*. Adaptações a tais circunstâncias incluem: aumento na densidade de capilares sanguíneos, na afinidade por O₂ da Hb e na quantidade de Mb, ou até mesmo diminuição na atividade metabólica através de certos comportamentos, como a *estivação* (BOUTILIER, 1990; SCHMIDT-NIELSEN, 2013). Vertebrados ectotérmicos são excelentes modelos para se estudar os papéis funcionais das globinas contra tolerância à hipoxia (FAGO, 2017).

Há outro aspecto da história de vida dos vertebrados que influencia no transporte de O₂. Todos os que possuem Hbs expressam diferentes formas durante diferentes estágios de vida. Um exemplo são as Hbs fetais e embrionárias, que diferem na sua afinidade por O₂ das Hbs de adultos. O mecanismo que produz as diferentes afinidades funciona como um *efeito alostérico reverso*, onde o equilíbrio de associação e dissociação das subunidades é alterado devido ao enfraquecimento das interfaces dímero/monômero. Outro exemplo são as Hbs de organismos que realizam metamorfose, que podem apresentar diferentes Hbs entre os estágios larvais e adultos (MAIRBÄURL; WEBER, 2012; MANNING *et al.*, 2017).

Além disso, nos vertebrados ectotérmicos, é mais a regra do que a exceção a presença de múltiplas Hbs no mesmo indivíduo. Apesar de existirem algumas relações ecológicas, ainda não se sabe ao certo se as diferentes isoformas de Hb (isoHbs) nos vertebrados ectotérmicos apresentam alguma vantagem adaptativa. Uma hipótese é de que elas são variantes neutras. Porém, existem algumas possíveis vantagens adaptativas: aumentar a solubilidade de Hbs ou interagir com enzimas e proteínas de membrana, além de outros metabólitos dentro das células vermelhas do sangue. (GRATZER; ALLISON, 1960; INGERMANN, 1992, 2010).

O metabolismo é inversamente relacionado ao tamanho corporal. Plotar o logaritmo do consumo de O₂ versus o logaritmo da massa corporal de várias espécies de vertebrados, endotérmicos e ectotérmicos, produz uma linha de regressão direta, com inclinação de 0,75. Faça o mesmo com a P_{50} ou o fator Bohr no lugar do logaritmo do consumo de O₂ e o resultado será semelhante (INGERMANN, 2010; MAIRBÄURL; WEBER, 2012; SCHMIDT-NIELSEN, 2013).

A natureza da oxigenação da Hb é exotérmica, o que faz com que a afinidade por O₂ diminua com o aumento da temperatura. Esse efeito da temperatura favorece o descarregamento do O₂ nos músculos aquecidos durante o exercício. Porém, é desvantajoso em animais *heterotérmicos*, onde pode perturbar o balanço entre descarga e demanda de O₂ em órgãos com temperaturas diferentes. Adaptações funcionais que surgem diante de tais circunstâncias são, por exemplo, mecanismos de reduzir a dependência da temperatura na afinidade da Hb com seus ligantes. Uma estratégia para diminuir a dependência da temperatura na afinidade por O₂ é o acoplamento do processo endotérmico de liberação dos efetores alostéricos ligados à Hb (INGERMANN, 2010; MAIRBÄURL; WEBER, 2012; WEBER; CAMPBELL, 2011).

Comparado com o ar, o conteúdo de O₂ da água é cerca de 30 vezes menor, e a taxa de difusão do O₂ é cerca de 250.000 vezes menor. Isto torna os ambientes aquáticos definitivamente hipóxicos. Peixes precisam de adaptações anatômicas e fisiológicas especiais para satisfazer sua demanda de O₂. Mecanismos para movimentar a água pela superfície respiratória das guelras é um deles, pois caso a água permanecesse parada, logo o O₂ circundante esgotaria. Um segundo mecanismo possibilita captar o máximo de O₂ da água. Nele, a água que flui através das brânquias encontra o sangue circulando na direção oposta. Chamamos esse engenhoso mecanismo de *fluxo contracorrente*. Animais mergulhadores, por outro lado, não possuem as adaptações dos peixes para viver no ambiente aquático. Dependendo do tempo de mergulho e da profundidade que alcancem – e da vantagem reprodutiva do mergulho – devem ocorrer mudanças nas pressões de seleção que desencadeiem a preservação de variações favoráveis nas propriedades funcionais de suas Hbs, assim como nos níveis de efetores alostéricos. Anfíbios, tartarugas e crocodilos, pinguins e mamíferos mergulhadores, como as focas, oferecem uma maneira de estudar as diferentes soluções para o problema do mergulho pela fisiologia animal comparada, assim como podem iluminar as variações estruturais e funcionais nas Hbs que são adaptativas nesse sentido (INGERMANN, 2010; SCHMIDT-NIELSEN, 2013; WEBER; FAGO, 2004).

Ao nível do mar, a pO₂ é de 155 mmHg. Nos Andes, a 4.000 m de altitude, espécies de camelídeos e rãs inalam o ar numa pO₂ de 92 mmHg. Algumas aves conseguem sobreviver a voos acima de 11.000 m de altitude, onde a pO₂ está abaixo de 40 mmHg. Adaptações de curto prazo à hipoxia nas altas altitudes envolvem ajustes nas interações com efetores alostéricos. Adaptações de longo prazo, porém, envolvem adaptações geneticamente codificadas, que alteram a afinidade intrínseca, a interação com ligantes e os contatos entre as subunidades que favorecem o equilíbrio a favor de algum dos estados quaternários T/R. Ainda temos a heterogeneidade molecular, expressa na forma de isoHbs, com diferentes propriedades funcionais, que podem ampliar a faixa de altitudes em que uma determinada espécie consegue captar e transportar os gases respiratórios de forma eficiente para os tecidos (WEBER, 2007; WEBER; FAGO, 2004; WELLS, 1989).

3 HEMOGLOBINAS, ANFÍBIOS E BIOTECNOLOGIA

“Raramente planeio a minha investigação; ela é que me planeia a mim.” (Max Perutz)¹⁴

Entender a base molecular de adaptações funcionais em Hbs de vertebrados ectotérmicos é uma das mais recentes linhas de pesquisa do Laboratório de Biocristalografia, coordenado pelo prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha. O primeiro trabalho foi aceito para publicação esse ano, e tratou de alguns aspectos estruturais das Hbs de *Iguana iguana* e suas implicações fisiológicas (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Por ser uma pesquisa multidisciplinar, precisamos da colaboração de outros departamentos. Em especial, do Laboratório de Química Bioinorgânica, coordenado pelo prof. Dr. Eduardo H. S. Sousa, que desenvolve pesquisas com hemeproteínas sensores e possui equipamentos analíticos para realizar os ensaios funcionais com Hbs.

Entretanto, obter amostras de espécimes de iguana é um trabalho relativamente difícil. A rã pimenta nordestina, *Leptodactylus vastus* (LUTZ, 1930) surge como uma alternativa. Antes de dirigirmos nossa atenção a essa espécie, precisamos ter uma visão geral sobre anfíbios e suas Hbs. Revisei todos os principais trabalhos relacionados a Hbs de anfíbios. Muitos são antigos. Muitos utilizam métodos analíticos de outros tempos. Alguns baseiam-se em conceitos que estão ultrapassados. Mas em cada um deles existem antigas verdades. Tentarei resumir e conectar todas elas. Meu objetivo é apontar uma luz à literatura científica sobre Hbs de anfíbios, adaptando-a à linguagem e conceitos do século XXI. Assim, quando contemplarmos o quadro geral sobre os estudos com Hbs de anfíbios no século passado, teremos uma impressão mais vívida do estado da arte nessa linha de pesquisa e saberemos como devemos contribuir através dos métodos modernos da química de proteínas.

3.1 Anfíbios

A classe Amphibia compreende 7.935 espécies, divididas em três ordens: (1) Anura, cujos representantes são os sapos e rãs, é a mais diversificada (7.003 espécies); (2) Urodela ou

¹⁴ Citado em: Gonçalves-Maia (2013).

Caudata, representada pelas salamandras e tritões (723 espécies); (3) Gymnophiona ou Apoda, a menos diversificada e menos conhecida (209 espécies). Em resumo, anfíbios são vertebrados ectotérmicos que possuem um estilo de vida bifásico: começam como larvas aquáticas, então se metamorfoseiam na forma adulta terrestre. Embora possuam adaptações para a vida terrestre, ainda precisam do ambiente aquático para depositar os ovos. As larvas dependem do ambiente aquoso para se desenvolver. Em geral, os Amphibia usam três superfícies para trocas gasosas com o ar: pele (respiração cutânea), boca (respiração bucal) e pulmões. Existem poucas informações sobre a fisiologia das trocas gasosas e da circulação nos Gymnophiona. Salamandras, por outro lado, exibem uma diversidade de mecanismos respiratórios. Os Anura utilizam a pele principalmente para liberar CO₂ e os pulmões primariamente para captar O₂. O sistema circulatório dos anfíbios é fechado, mas a partição do coração é apenas parcial, de forma que ainda não está completamente claro o mecanismo e precisão da separação do sangue oxigenado e desoxigenado (FROST, 2018; HICKMAN *et al.*, 2008).¹⁵

O comportamento social dos anfíbios anuros com relação à reprodução pode ser dividido em dois tipos: cruzamento prolongado e cruzamento explosivo. Cruzamento explosivo geralmente está relacionado com a agressão entre machos. Cruzamentos prolongados estão relacionados com machos emitindo chamados para atrair fêmeas e mantendo distância de outros machos. Em alguns casos, machos podem defender o território contra outros machos invasores, uma vez que o território seja atrativo para as fêmeas. Em algumas espécies existe cuidado parental; algumas tendências na evolução do comportamento social de anfíbios são o resultado de coadaptações à transição da existência aquática para a terrestre (WELLS, 1977; WILSON, 2000).

Diferente dos mamíferos, anfíbios possuem eritrócitos nucleados. Eles exibem diferenças com relação a eritropoiese entre os estágios de desenvolvimento. O local primário da eritropoiese em anfíbios juvenis ocorre no fígado e nos rins, enquanto nos adultos ocorre no baço e no fígado, além da medula óssea em rãs e sapos (ALLENDER; FRY, 2008; BROYLES; FRIEDEN, 1973; MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b). Eritrócitos nucleados e metabolicamente ativos sugerem que a regulação alostérica das Hbs de anfíbios deve ser mais complexa do que a de vertebrados que apresentam eritrócitos anucleados (WEBER; JENSEN, 1988). Tenhamos em mente essa distinção enquanto examinamos a literatura.

¹⁵ Scott (2015) explica o impacto de dois trabalhos clássicos a respeito da fisiologia da respiração e circulação em vertebrados: as contribuições de Kjell Johansen e Claude Lenfant. Sobre o trabalho de Boutilier sobre a fonte de O₂ durante o mergulho em *Xenopus laevis*, ver: Tattersall e Burggren (2017).

3.2 Hemoglobinas de anfíbios

Que tipos de métodos os pesquisadores utilizavam para estudar as Hbs de anfíbios inicialmente? Gratzer e Allison (1960), em sua revisão sobre múltiplas Hbs, descrevem os parâmetros físico-químicos, assim como os principais métodos para caracterizar Hbs até à época: (1) eletroforese; (2) cromatografia; (3) solubilidade; (4) estrutura cristalina; (5) espectro de absorção; (6) peso molecular; (7) composição de aminoácidos; (8) desnaturação alcalina; (9) reações de oxidação e redução; (10) dissociação de O₂; (11) derivativos de metHb. A maior parte deles não é estranha aos iniciantes em bioquímica de hoje. Porém, já dispomos de métodos melhores para determinar alguns deles. Outros se tornaram obsoletos. Numa época em que podemos determinar com exatidão a sequência de aminoácidos de proteínas diretamente, ou indiretamente pelo DNA ou RNA, a composição destes é irrelevante.

Logo que The Svedberg desenvolveu a ultracentrífuga, o *teste drive* desse equipamento, por assim dizer, foi um estudo sistemático das constantes de sedimentação dos pigmentos respiratórios (hemoglobinas, hemocianinas, hemeritrinas e eritrocruorinas) de espécies representantes de cada grupo do reino animal. Observaram que os pigmentos respiratórios dissolvidos no plasma apresentavam alta constante de sedimentação (possivelmente formando complexos supramoleculares), enquanto que os pigmentos inclusos dentro de células sanguíneas apresentavam baixa constante de sedimentação (próxima do valor de 4,29 S para a Hb humana). O grupo dos agnatas apresentava metade da constante de sedimentação da Hb humana. Anfíbios e répteis, por sua vez, apresentaram constantes de sedimentação que indicavam a *agregação de tetrâmeros* para formar octâmeros e dodecâmeros (SVEDBERG; HEDENIUS, 1934).

O nosso ponto inicial é o trabalho de McCutcheon (1936). Ele estudou as propriedades funcionais da Hb de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*, anteriormente conhecido como *Rana catesbeiana*) durante toda a história de vida da espécie. As principais conclusões foram: (1) durante a história de vida da rã-touro, a CDO de sua Hb sofre mudanças entre os estágios larvais e adultos, passando de hiperbólica à esquerda para sigmoide à direita; (2) há indícios de efeito do pH na afinidade por O₂ em ambos os estágios; (3) tais mudanças na Hb da rã-touro parecem estar relacionadas com três fatores no desenvolvimento da rã (a) o ambiente, (b) a condição fisiológica do animal e (c) o lócus da eritropoiese; (4) a capacidade de O₂ do

sangue é maior nos adultos do que nos girinos, e atinge o máximo nos adultos de tamanho intermediário, presumivelmente durante a demanda máxima sobre o pigmento respiratório no pico de desenvolvimento sexual; (5) os eritrócitos dos adultos são menores e menos numerosos do que os eritrócitos de girinos, embora sejam mais alongados; (6) a Hb sofreu mudanças filogenéticas, assim como outras estruturas na ontogenia dos vertebrados. Muitos dos trabalhos seguintes irão aprofundar e ampliar esses temas. Em geral, podemos dizer que os trabalhos com Hbs de anfíbios ocorreram em duas principais linhas de pesquisa: (I) adaptações funcionais nas Hbs de anfíbios; (II) síntese de Hbs durante a metamorfose.

A CDO de várias espécies de anfíbios em tampão fosfato e pH acima de 7,3 mostrava uma tendência decrescente na afinidade por O₂ quando olhamos para as espécies aquáticas em direção às semiaquáticas, e destas às terrestres (MCCUTCHEON; HALL, 1937). Remover o baço de rãs-touro acarretava em menor afinidade por O₂ no sangue (MCCUTCHEON, 1938). Seria o primeiro indício de que o baço expressava isoHbs com menor afinidade por O₂? Uma Guerra Mundial e então Riggs (1951) publica o artigo clássico que demonstrou um dos fatos mais interessantes a respeito das adaptações funcionais em Hbs de anfíbios: existem mudanças no efeito Bohr durante a ontogenia. Ele mostrou que as Hbs de girinos e adultos de *L. catesbeianus*, embora possuam o mesmo peso molecular (cerca de 68.000) e o mesmo coeficiente de Hill ($n_H = 2,8$), diferem no fato de que a afinidade da Hb de girinos não é afetada pelo pH, enquanto que a de adultos apresenta efeito Bohr normal e reverso, da mesma maneira que a Hb de mamíferos. Ainda não é possível afirmar, contudo, que tais mudanças sejam universais em anfíbios.

Na falta de melhores métodos analíticos, Dessauer, Fox e Ramírez (1957) tentaram correlacionar a migração das Hbs de anfíbios e répteis por eletroforese em papel com sua filogenia. Mas o ponto interessante nesse estudo é observarmos a heterogeneidade de Hbs das 83 espécies que eles utilizaram. De forma similar, Bertini e Rathe (1962) investigaram os padrões eletroforéticos de Hbs de várias espécies de anuros sul-americanos – inclusive o de cinco espécies do gênero *Leptodactylus* – através do método de eletroforese em papel. A frequência de cada polimorfismo eletroforético em Hbs de indivíduos pertencentes a diferentes populações de *Lithobates pipiens* serviu para estudar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (GILLESPIE; CRENSHAW, 1966). Herner e Frieden (1961) caracterizaram os componentes proteicos solúveis das células vermelhas do sangue de *Lithobates grylio*, *L. catesbeianus*, *R. heckscheri* e *Xenopus laevis* durante a metamorfose por eletroforese em papel. Em *L. grylio*, observaram um componente com alta mobilidade eletroforética nos estágios iniciais do

desenvolvimento, enquanto que um componente adicional de mobilidade mais lenta aparece nos animais nos últimos estágios e se torna predominante nos eritrócitos da rã adulta. Padrão similar ocorre nas demais espécies estudadas. Então resumem quatro diferenças observadas entre Hbs de girinos quando comparadas com as de outros vertebrados: (1) falta de efeito Bohr; (2) alta mobilidade eletroforética em papel; (3) um menor número de grupos tióis acessíveis; (4) alta resistência à desnaturação alcalina, juntamente com forte afinidade por O₂.

Mudanças bioquímicas no metabolismo dos anfíbios anuros parecem ter valores adaptativos, que direta ou indiretamente facilitam na transição da água para a terra. As mais importantes mudanças adaptativas nesse sentido são: (1) amoniotelismo para ureotelismo; (2) aumento em albumina sérica e outras proteínas do soro; (3) alteração nas propriedades e biossíntese da Hb, (4) desenvolvimento de certas enzimas digestivas; (5) incremento na respiração. Desenvolvimentos químicos adicionais e importantes incluem: (i) alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e nitrogênio; (ii) maiores modificações no balanço de água, pigmentos visuais, pigmentação e metabolismo da cauda; (iii) mobilização da maquinaria enzimática para promover o processo metamórfico (FRIENDEN, 1961).

Correlacionar as constantes de sedimentação dos experimentos de ultracentrifugação de Hbs de anfíbios e seus pesos moleculares com a metamorfose em anuros permitiu constatar que dois tipos de Hbs existiam em adultos de *Lithobates grylio* (antes *Rana grylio*), mas apenas um nos girinos (TRADER; WORTHAM; FRIEDEN, 1963). Por um avanço analítico (eletroforese em gel de amido), foi possível ver que girinos de *L. catesbeianus* possuíam três isoHbs, enquanto o número de isoHbs em adultos era quatro. Além disso, girinos em metamorfose apresentavam uma mistura desses componentes. Adicionando ureia ao gel de amido, dessa forma oferecendo condições suficientemente desnaturantes, foi possível observar que existiam dois tipos de cadeias polipeptídicas nestas isoHbs. Todas tinham peso molecular de 65.000, exceto uma que foi separada por centrifugação em gradiente de densidade e apresentou peso molecular de 130.000 (BAGLIONI; SPARKS, 1963). Cromatografia de troca iônica revelou que os extratos de células vermelhas do sangue de girinos e adultos apresentavam três componentes cada. Hbs de girinos não apresentaram grupos tióis reativos (enquanto rãstouro continham quatro por Hb), eram mais resistentes à desnaturação por ureia e benzoato, tinham maior afinidade por O₂ e não exibiam efeito Bohr, em comparação com as Hbs das rãstouros adultas (HAMADA *et al.*, 1964). Posteriormente, adicionando ácido fórmico em pH 2,4 para separar as cadeias das Hbs por troca iônica, observaram que a cadeia β da Hb da rã possuía 2 mols de sulfidrilas reativas. Rãs e girinos possuíam a mesma sequência N-terminal (Gly-Leu)

e o mesmo grupo C-terminal nas cadeias α . Diferiam nas cadeias β : girinos apresentavam Val-Ala e Val; adultos, Gly-Ser e Glu (HAMADA; SHUKUYA, 1966). Além disso, o principal componente das Hbs de rãs-touro e de girinos da espécie possui cadeias com o N-terminal acetilado (DE WITT; INGRAM, 1967).

Em *Pelophylax kl. esculentus* (antigamente conhecido como *Rana esculenta*)¹⁶, todos os resíduos N-terminais são Gly. As sequências C-terminais são Tyr-Arg, análogo à cadeia α da Hb humana, e Tyr-His, análogo às cadeias β das Hbs humanas adulta e fetal. Por cromatografia analítica, separaram três componentes do pool de Hbs nessa espécie (TENTORI *et al.*, 1965, 1967). Somente depois foi que determinaram a sequência completa da cadeia β do componente principal de *P. esculentus*, com 140 resíduos de aminoácidos, e confirmaram a presença das acetilações, o que parece ser uma característica comum em Hbs de anfíbios, embora pouco comum em mamíferos. Observaram uma deleção de seis resíduos na extremidade N-terminal quando comparada com a cadeia β da Hb humana (CHAUVER; ACHER, 1970, 1971, 1972). A mesma deleção acontece em *L. catesbeianus* (BALDWIN; RIGGS, 1974). Acetilação na extremidade N-terminal também foi observada numa Hb do sapo *Bufo bufo* (CAFFIN; CHAUDET; ACHER, 1969).

Moss e Ingram (1965) demonstraram a capacidade dos eritrócitos de girino de sintetizar Hb *in vitro*. Viram que a taxa de síntese de Hb diminui durante a fase inicial do tratamento dos girinos com o hormônio L-tiroxina. Subsequentemente, a síntese de Hbs de rãs adultas é especificamente induzida. Manwell (1966) observou polimorfismos nos padrões eletroforéticos de algumas proteínas solúveis de girinos, mas não de adultos, e postulou que a metamorfose suprimia genes de girinos enquanto ativava os genes expressos nas rãs. Moss e Ingram (1968a), agora através do refinamento que foi a introdução do gel de poliacrilamida e o processo de degradação de Edman, analisaram as Hbs de girinos e rãs adultas da espécie *L. catesbeianus*. Observaram cinco componentes no hemolisado de girinos por eletroforese. O principal componente continha duas cadeias com o resíduo Val no N-terminal, e não possuía cadeias em comum com o principal componente de adultos. Adultos tinham, no componente principal, duas cadeias começando com Gly, e duas cadeias que, como em girinos, pareciam ter o N-terminal bloqueado. Eles também mostraram que os eritrócitos de girinos tratados com tiroxina sintetizam Hb idêntica à Hb adulta de acordo com os seguintes critérios: (1) filtração

¹⁶ Vale notar que *R. esculenta*, a rã comum europeia, tecnicamente, não é uma espécie. O que chamamos (ou chamávamos) de *R. esculenta* são um conjunto de híbridos, dois diploides e dois triploides, entre as espécies *Pelophylax ridibundus* (antiga *Rana ridibunda*) e *Pelophylax lessonae* (antiga *R. lessonae*) (DAWKINS, 2016).

em gel Sephadex; (2) eletroforese em gel de poliacrilamida – PAGE; (3) PAGE de cadeias peptídicas das globinas aminoetiladas; (4) *fingerprinting* de fragmentos trípticos (MOSS; INGRAM, 1968b). Em seguida, evidências citológicas e imunoquímicas apontavam para o fígado como o sítio de maturação dos eritrócitos durante a metamorfose. Em adultos, esse é o papel da medula óssea (MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b).

Maniatis e Ingram (1971c) também analisaram imunoquimicamente eritrócitos isolados quanto aos componentes dos hemolisados de girinos e adultos de *L. catesbeianus*. Eles observaram que os componentes estavam em células diferentes. Propuseram que a mudança das Hbs durante a metamorfose se deve ao aparecimento de uma nova população de eritrócitos contendo exclusivamente Hbs típicas de adultos. Broyles e Frieden (1973) sugeriram que os rins são os sítios primários da eritropoiese em girinos e que o fígado pode servir como um sítio para posterior diferenciação das células vermelhas. Chegaram a essa conclusão observando diferentes proporções dos componentes de Hb entre rins e fígado de girinos. Posteriormente testaram a hipótese cultivando pedaços de tecido e células vermelhas periféricas *in vitro* junto com precursores do grupo heme marcados com isótopos radioativos. Analisando os perfis eletroforéticos de eritrócitos de *L. catesbeianus* cultivados *in vitro*, obtidos em diferentes fases do desenvolvimento, Benbassat (1974a) sugere a seguinte sequência de eventos levando à substituição da Hb de girino pela da rã adulta durante a metamorfose natural do anfíbio: (I) durante o período pré-metamórfico, há um declínio gradual na capacidade das células vermelhas de sintetizarem a Hb de girino; (II) um íngreme aumento na síntese de Hb ocorre durante o clímax da metamorfose – as células vermelhas do girino produzem principalmente a Hb da rã e relativamente pequenas quantidades de Hb de girino; (III) gradual declínio na síntese de Hb pelos eritrócitos no curso da maturação da rã juvenil. Utilizando um método de imunoflorescência mais sensível do que aquele empregado por Maniatis e Ingram (1971c), o autor consegue detectar em algumas células vermelhas de girinos em metamorfose ambas as Hbs (de girinos e de adultos) na mesma célula (BENBASSAT, 1971b).

Broyles (1981) discutiu as questões centrais pertinentes à transição de Hbs e eritrócitos: (1) Hbs adultas e larvais compartilham alguma cadeia de globina? (2) Hbs adultas e larvais podem estar contidas no mesmo eritrócito durante a metamorfose? (3) as transições de Hbs e eritrócitos são mediadas por uma mudança no sítio da eritropoiese? (4) o período de vida das células vermelhas do sangue muda durante a metamorfose? (5) os hormônios da tireoide têm um efeito direto na troca da expressão de genes de globinas larvais para adultas? (6) qual é a origem das células tronco que dão origem às células vermelhas do sangue fetais e adultas?

Dorn e Broyles (1982) separaram eritrócitos do sangue de girinos em diferenciação ao longo de diferentes fases da metamorfose e usaram eletroforese para separar as diferentes Hbs com radiomarcação específica para a Hb de adultos recém-sintetizada. As vantagens dessa abordagem são: (1) as diferentes populações celulares foram purificadas antes da análise; (2) todas as Hbs presentes foram identificadas e quantificadas; (3) determinaram a síntese de Hb, ao invés da presença de Hbs apenas. Concluíram que a troca de Hb metamórfica é efetuada através da diferenciação de uma nova população de eritrócitos que sintetiza somente Hb de adultos e da remoção seletiva de eritrócitos contendo Hb de girinos da circulação.

Retardando o desenvolvimento de girinos de *X. laevis*, mantendo-os em água contendo 0,01% de propiltiouracil (um antagonista dos principais hormônios da tireoide), vemos que o perfil eletroforético observado nos girinos gigantes é típico de Hbs de adultos. Esse resultado sugere que a mudança da Hb de girinos para a de adultos não é controlada por hormônios. Possivelmente, o efeito da tiroxina observado por Moss e Ingram (1968b) deveria apenas inibir a síntese das Hbs de girinos (MACLEAN; TURNER, 1976). Just, Schwager e Weber (1977) estudaram as Hbs de *Xenopus* em estágios larvais e adultos, com espécimes normais e com isogênicos, através de PAGE. Temos duas conclusões a partir desses resultados: (1) existem diferenças nos padrões eletroforéticos em estágios larvais e na fase adulta. No estágio larval, o componente principal apresentou maior polimorfismo (devido a diferenças de carga). Adultos apresentaram um padrão simples e uniforme. (2) há evidências de que a síntese de Hbs dos adultos acontece logo no começo do clímax da metamorfose. Eles contestam a interpretação de Maclean e Turner (1976), na qual a transição da Hb independe dos hormônios da tireoide. Em vez disso, concluem que a transição da Hb é responsiva aos hormônios da tireoide e sugerem a hipótese de que a resposta da síntese de Hb requer concentrações diferentes de hormônio da tireoide daquelas necessárias para que ocorram as transições morfológicas. Quanto a variações no mesmo gênero, Muir (1981) compara os perfis eletroforéticos entre diferentes espécies e subespécies do gênero *Xenopus*.

As transições de Hbs e eritrócitos do estágio larval para o estágio adulto durante a metamorfose da salamandra *Hynobius retardatus* colocam evidências de que a mudança nas Hbs larvais para adultas ocorrem numa única população de células e que os órgãos da eritropoiese são fígado e baço nos estágios larvais iniciais, limitando-se depois ao baço nas larvas em metamorfose e adultos metamorfoeados (YAMAGUCHI; WAKAHARA, 1997). Segundo um modelo para a eritropoiese em anuros sustentado pelos dados de *northern blotting* e pela análise histológica em *X. laevis*, existe uma linhagem de células-tronco que se auto

perpetuam e das quais se originam os eritrócitos larvais e adultos. O comprometimento da diferenciação dessas células é imposto pelo sítio da eritropoiese (WEBER; BLUM; MULLER, 1991). Girinos de *L. catesbeianus* apresentam proporções heterogêneas das quatro principais Hbs do sangue, assim como nas quantidades relativas dos dois tipos de células vermelhas no sangue periférico. Girinos submetidos à anemia induzida por fenil-hidrazina apresentam o mesmo perfil de Hbs antes e após se recuperarem da anemia. Esses achados, como o de trabalhos anteriores, sugerem que o mecanismo para regular o padrão de expressão de Hbs *in vivo* é firmemente determinado no sistema eritropoiético durante os primeiros estágios do desenvolvimento larval (MAPLES; PALMER; BROYLES, 1988).

A cronologia das mudanças de Hbs durante a ontogenia varia entre as espécies de anuros. *Hyla arborea*, uma rã arborícola que retorna para a água apenas para se reproduzir, exibe mudanças no perfil eletroforético durante a metamorfose. No estágio larval ela apresenta três bandas que não mudam durante a metamorfose. Dez dias após a metamorfose, duas bandas aparecem, enquanto que as Hbs larvais diminuem progressivamente e desaparecem dentro de duas semanas. Nessa espécie, a mudança é total, mas começa tarde e se desenvolve mais rápido do que em outras espécies de anfíbios (CARDELLINI; SALA, 1978). Em *Bufo viridis*, um sapo de hábitos terrestres que volta para a água apenas para se reproduzir, uma moderada síntese da única Hb de adultos ocorre precocemente, no começo da prometamorfose. No estágio larval, podemos observar quatro bandas, incluindo a mesma observada em adultos. Uma semana após a metamorfose, ocorre a substituição rápida da Hb larval pela de adulto. (CARDELLINI; SALA, 1979a). A mudança no perfil eletroforético, durante a metamorfose, das Hbs de *Bombina variegata* – um pequeno sapo de hábitos predominantemente aquáticos quando adulto – ocorre um pouco mais cedo. Existe apenas uma banda até o final da fase pré-metamorfose. Aparecem em seguida três novas bandas, que substituem a larval dentro de 15-18 dias a partir da metamorfose (CARDELLINI; SALA, 1979b). Em *Boombina orientalis*, o perfil eletroforético mostra duas bandas no estágio larval, que gradualmente são substituídas pelas quatro bandas observadas em adultos (15-16 dias após a metamorfose). A mudança é total, como em muitos anuros, mas ela começa mais cedo e se desenvolve mais lentamente do que em outras espécies estudadas (CARDELLINI; SALA, 1983). Em *Pelodytes punctatus*, os girinos apresentam cinco componentes, enquanto que os adultos apresentam dois, completamente distintos, que substituem gradualmente os componentes dos girinos. A transição começa cedo e ocorre lentamente, terminando quatro semanas após a metamorfose (CARDELLINI; SALA, 1987).

Mudanças nos fosfatos orgânicos eritrocíticos durante a metamorfose também são importantes. Em *L. catesbeianus*, nucleosídeos trifosfatos (NTPs) diminuem simultaneamente com a transição de girinos para adultos. BPG declina paralelamente ao pH durante o clímax da metamorfose. Os níveis de polifosfatos de inositol, por outro lado, não estão correlacionados com as mudanças do sistema respiratório durante o desenvolvimento. Podemos dizer que diminuição dos níveis de fosfatos orgânicos é um ajuste adaptativo à respiração aérea em rãs-touro em metamorfose. Em anfíbios, geralmente vemos que razões de fosfatos orgânicos eritrocíticos/Hb iguais ou maiores que 1 estão correlacionadas com dependência do metabolismo aeróbico; razões menores que 1 correlacionam-se com dependência de atividades metabólicas anaeróbicas (HAZARD; HUTCHISON, 1978, 1982).

Nessa época já sabiam do efeito alostérico dos fosfatos orgânicos em mamíferos. Mas qual o efeito alostérico dos fosfatos orgânicos nas Hbs de anfíbios? Em *L. catesbeianus*, as CDO das Hbs *stripped* de girinos e adultos são deslocadas para a esquerda em relação aos hemolisados. IHP, seguido de ATP, são os efetores que mais sensivelmente diminuem a afinidade da Hb *stripped* do girino por O₂. BPG teve um efeito pequeno. Na Hb stripped das rãs-touro adultas, BPG e ATP diminuem sensivelmente a afinidade por O₂, enquanto que IHP não exibiu esse efeito. Vale notar que o ATP é o principal fosfato orgânico nos eritrócitos de girinos e adultos (60-70%), portanto, deve ser o principal modulador alostérico da Hb em anfíbios. Diferente do que ocorre em humanos, a afinidade da Hb por fosfatos orgânicos diminui durante a ontogenia nos anfíbios (ARAKI; KAJITA; SHUKUYA, 1971). Outrossim, rãs-touro e a salamandra *Ambystoma tigrinum* apresentam elevada concentração de BPG, mas não IPP, durante as fases em que possuem guelras ou pulmões (BARTLETT, 1976).

As Hbs isoladas de girinos de *L. catesbeianus* foram caracterizadas estruturalmente e funcionalmente. Os componentes I e II predominam em girinos jovens, enquanto III e IV predominam nos mais velhos. O componente I e (provavelmente) também o II, surgem nos rins. Componentes III e IV surgem no fígado. Dessa forma, parece que durante a ontogenia, os sítios da eritropoiese mudam sucessivamente entre rins, fígado, e medula óssea (adultos). As mudanças estão associadas com uma diminuição progressiva na afinidade da Hb por oxigênio. Além disso, ocorre um efeito Bohr reverso no hemolisado na presença de Cl⁻ e a magnitude do efeito alostérico dos fosfatos orgânicos é a seguinte: IHP > ATP > BPG (WATT; RIGGS, 1975).

Modificando a equação de Hill para incluir o efeito da pCO₂, a CDO para *L. catesbeianus* e *Pelophylax porosus brevipoda* (antes *Rana brevipoda*) indica que a relação entre tamanho corporal e afinidade por O₂ relatada na literatura parece ser válida para anfíbios

(TAZAWA; MOCHIZUKI; PIPER, 1979). Um caso extremo de adaptação funcional, dessa vez relacionada à temperatura, é o caso de *Chiromantis petersi*, uma rã que habita ambientes áridos na África Oriental, que prefere temperaturas corporais próximas de 40 °C e exposição solar direta. A afinidade por oxigênio do sangue foi insensível à temperatura na faixa de 25-40 °C (JOHANSEN, 1980). Mas não se sabe ao certo o que causa a insensibilidade no caso dessa rã. Rãs adaptadas a ambientes secos, tais como *Phylomedusa sauvagei* e *Chiromantis xerampelina* precisam reduzir a perda de água. Isto, por sua vez, ocasiona uma reduzida troca de gases cutânea (STINNER; SHOEMAKER, 1987).

Adaptações a diferenças na disponibilidade de O₂ entre os ambientes aquático e aéreo, assim como maior concentração interna de CO₂ na transição da respiração aquática para a respiração aérea, foram comparadas experimentalmente em três espécies de anfíbios: (1) *Necturus maculosus*, de hábitos aquáticos, guelras externas e pulmões pouco desenvolvidos; (2) *Amphiuma tridactylum*, que não tem guelras, mas possui hábitos aquáticos e depende da respiração pulmonar; e (3) *L. catesbeianus*, de hábitos mais terrestres. As P₅₀ para as três espécies em pCO₂ fisiológica são 14,5, 27 e 39 mmHg, respectivamente. Mais interessante, experimentos *in vivo* para observar a dinâmica de trocas gasosas quando cada espécie é impedida de realizar seu meio primário de respiração mostrou algumas diferenças fisiológicas. Quando *Necturus* foi removido da água, a troca de gases foi grandemente prejudicada, apesar da frequente respiração aérea. Quando *Amphiuma* foi impedido de respirar o ar, as mudanças nas trocas gasosas ocorreram lentamente, sugerindo que o animal usa sua pele para troca de gases com a água relativamente bem. O mesmo não aconteceu com *L. catesbeianus*, cuja pO₂ sanguínea diminuiu, enquanto que a pCO₂ aumentou rapidamente, sugerindo ausência de uma respiração cutânea eficiente (LENFANT; JOHANSEN, 1967). No caso de um anfíbio cecílio, *Typhlonectes compressicauda*, o conteúdo de CO₂ sanguíneo se mostrou superior ao de peixes de respiração aquática (FARMER, 1979).

Amiconi *et al.* (1970) estudaram as propriedades funcionais das Hbs dos caudata *Ambystoma tigrinum tigrinum* e do axolote mexicano, *A. mexicanum* (formas neotênicas e metamorfoseadas). A afinidade por O₂ da Hb do axolote metamorfoseado é levemente maior do que as demais, que, por outro lado, têm a mesma afinidade. A forma da CDO é heterogênea – n_H aumenta conforme a saturação fracionária de O₂ aumenta. O efeito Bohr é muito menor do que o característico em Hbs de mamíferos. Observaram que a cinética de dissociação de O₂ é uma função do pH e a constante de velocidade para a dissociação de CO é similar à de mamíferos (0,072 s⁻¹ em pH 9). As propriedades respiratórias do sangue de espécimes de *A.*

mexicanum, na forma neotênica e na forma com pulmões (metamorfoseadas artificialmente após a injeção de hormônios) apresentam algumas diferenças: (1) massa corporal diminuiu de 44 para 26 g; (2) consumo de O₂ aumentou em cerca de quatro vezes; (3) a afinidade por O₂ diminuiu, ao mesmo tempo que a CDO se tornou mais sigmoide na forma pulmonar – coeficiente de Hill subiu de 2 para 3,4. O fator Bohr quase que dobrou, ao passo que a influência da temperatura na afinidade por O₂ diminuiu. Concentração de Hb, concentração corpuscular média de Hb e hematócitos não mudaram significativamente, embora o perfil eletroforético de Hbs tenha alterado (GAHLENBECK; BARTELS, 1970). As duas Hbs de girinos de *A. mexicanum*, que geralmente alcança a maturidade sem concluir a metamorfose (forma neotênica)¹⁷, são distinguíveis das duas Hbs presentes nos adultos. A mudança é gradual e ocorre logo após o aparecimento das quatro pernas (MACLEAN; JURD, 1971a). As proporções relativas das diferentes isoHbs durante a metamorfose em axolote conferem diferentes propriedades funcionais. Contudo, notamos que nem a forma neotênica nem a forma pulmonar exibem um efeito Bohr significativo (HATTINGH; BARTELS, 1973). *Xenopus laevis*, por outro lado, sintetiza uma das Hbs presentes em girinos quando está com anemia. Isso ocorre em muitas ou na maioria das células vermelhas circulantes, ou seja, não é confinado a uma pequena população de células. Durante a recuperação da anemia, os indivíduos aumentam a produção do componente minoritário do hemolisado, HbA2 (MACLEAN; JURD, 1971b). Modelagem computacional da HbA1 de *X. laevis* utilizando a Hb de pombo como modelo, revelou resíduos incapazes de formar interações essenciais para estabilizar o estado T, sugerindo que ela possui maior afinidade por O₂ (ALI *et al.*, 2013).

Conforme os métodos de sequenciamento foram evoluindo, Hbs de anfíbios foram sendo sequenciadas. A cadeia α do principal componente de axolote contém 142 resíduos e foi totalmente sequenciada (BOISSEL; WAJCMAN; LABIE, 1980). Também foram sequenciadas as cadeias α e β da HbIII de girinos de *L. catesbeianus*, apresentando 141 e 146 resíduos de aminoácidos, respectivamente (WATT; MARUYAMA; RIGGS, 1980; MARUYAMA; WATT; RIGGS, 1980). As sequências das duas Hbs isoladas de axolotes adultos, tanto a partir dos peptídeos purificados quanto a partir do RNA mostram que as cadeias β dos dois componentes são iguais, enquanto que as cadeias α diferem. A cadeia α do componente majoritário apresenta

¹⁷ Neotenia em *Ambystoma mexicanum* é causada pela homozigose de um único gene recessivo. Como eles realizam uma série dos processos ocultos da metamorfose, incluindo a mudança na expressão de Hbs – neotênico expressa o perfil de Hbs de adultos – o eixo hipotálamo/hipófise/tireoíde parece funcional, enquanto que existe uma diferença na sensibilidade à concentração de tiroxina entre eventos metamórficos externos e ocultos (TOMPKINS, 1978).

141 resíduos, a do componente minoritário 143; a cadeia β apresenta 146 resíduos (SHISHIKURA; TAKEUCHI; NAGAI, 2005).

As propriedades funcionais das Hbs fetais e adultas da salamandra *Dicamptodon ensatus* não diferem significativamente, embora seus perfis eletroforéticos contenham múltiplas Hbs em padrões diferentes. Parece ser a concentração de ATP que modula a afinidade por O₂ nessa espécie (WOOD, 1971). Em *Typhlonectes compressicauda*, um ceciliano aquático e vivíparo, ocorre um componente minoritário e um componente principal eletroforeticamente idênticos no sangue fetal e no adulto. No entanto, a afinidade por O₂ no sangue fetal é maior do que a afinidade no sangue adulto. Hbs stripped possuem alta afinidade por oxigênio e nenhum efeito Bohr na faixa de pH entre 6,5-10. Abaixo de pH 6,5 observa-se um efeito Bohr reverso. Adição de 1 mM de ATP reduz marcadamente a afinidade por oxigênio e produz um efeito Bohr normal. Como a concentração de ATP é três vezes maior nos eritrócitos do sangue adulto em relação ao fetal, podemos concluir que a diferença de afinidade é inteiramente mediada pelo conteúdo de ATP das células vermelhas maternais e fetais (GARLICK *et al.*, 1979).

As salamandas *Cryptobranchus alleganiensis bishopi* e *Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis* apresentaram apenas um componente por eletroforese em gel de amido e um único pico (4,8 S) por ultracentrifugação. Não apresentaram efeito Bohr, e o calor de oxigenação (-5,6 kcal) foi intermediário entre o de peixes ósseos e mamíferos terrestres. As Hbs *stripped* possuem uma maior afinidade por O₂. IHP foi o efetor alostérico que mais deslocou a CDO para a direita. BPG deslocou a curva para a direita menos sensivelmente, seguido de perto pelo ATP. As sensibilidades diferenciais aos efetores lembram aquelas observadas para a Hb de girinos de *L. catesbeianus*. Comparando as salamandas com *Necturus maculosus* e *Hynobius tsuensis* por eletroforese em gel de amido e mapeamento de peptídeos, as duas últimas apresentaram de fato múltiplas Hbs. Enquanto que *Cryptobranchidae* exibe uma relativamente baixa afinidade por oxigênio, n_H de 2,7 e ausência de efeito Bohr, *N. maculosus* exibiu uma maior afinidade por oxigênio, n_H de 1,7 e efeito Bohr. (TAKETA; NICKERSON, 1973a, 1973b). O tritão *Triturus cristatus* apresenta um curioso efeito Bohr negativo em seu sangue quando os indivíduos são aclimatados à 30 °C, mas não é observado quando são aclimatados à 4 °C. Porém, o hemolisado *stripped* dos últimos voltava a apresentar um efeito Bohr negativo, sugerindo que alguma molécula no plasma modula o sinal do efeito Bohr (MORPURGO; BATTAGLIA; LEGGIO, 1970). De fato, na presença de 0,2 M de fosfatos inorgânicos, o efeito Bohr negativo se torna menos pronunciado, que por sua vez se revela notavelmente positivo na presença de mio-inositol hexafosfato (CONDÒ *et al.*, 1981). As Hbs

de três espécies de tritão, *Triturus cristatus carnifex*, *Triturus vulgaris meridionalis* e *Triturus alpestris apuanus* não exibem diferenças em comportamento funcional através de estudos cinéticos pelo método de *flash fotólise*. Mas as Hbs da forma neotênica de *T. alpestris* possuem maior dependência do pH e maior taxa de combinação com CO, o que sugere alguma adaptação funcional à vida aquática (CONDÒ *et al.*, 1983). A enguia do Congo, *Amphiuma means*, é uma salamandra primitiva que respira por pulmões e guelras, e cujo hemolisado aparenta ter somente um componente. Sua Hb *stripped* apresenta efeito Bohr negativo, que sofre modulação por ânions. Mesmo assim, a cooperatividade não é afetada. O fato de que as interações homotrópicas e heterotrópicas podem variar independentemente uma da outra ganha um tom mais vívido quando olhamos para as propriedades funcionais de *A. means* (BONAVENTURA *et al.*, 1977).

As propriedades respiratórias do sangue da salamandra *Desmognathus fuscus*, uma espécie que não possui nem guelras nem pulmões – dependendo de trocas gasosas cutâneas para satisfazer seus requerimentos metabólicos – exibem uma característica especial. Ela é capaz de saturar o sangue com 70% de O₂ mesmo em um sistema circulatório onde ocorre a completa mistura de sangue oxigenado e não oxigenado. Dessa forma, a respiração cutânea pode ser vista como uma adaptação que liberta as salamandras das limitações da ventilação, adequando-as para trocas gasosas tanto no ar quanto na água (GATZ; CRAWFORD JR; PIIPER, 1974).

O que acontece com as propriedades respiratórias do sangue – hematócrito, contagem de eritrócitos, concentração de Hb, concentração de Hb corpuscular média, capacidade de O₂, CDO, efeito Bohr, *n_H* e concentração intraeritrocítica de NTPs e BPG – em girinos e adultos submetidos a condições de hipóxia e hiperóxia? Girinos de *L. catesbeianus* têm maior afinidade por O₂, menor concentração de Hb, menor hematócrito, menor capacidade de oxigênio e maior concentração de fosfatos orgânicos nos eritrócitos do que têm os adultos. Portanto, as diferenças de afinidade por O₂ provavelmente se devem a diferenças na afinidade das próprias Hbs. Hipóxia não alterou as propriedades do sangue de girinos. Por outro lado, adultos apresentaram maior afinidade por O₂ e maior capacidade de O₂ (aumento do número de eritrócitos). Hiperóxia não produziu mudanças hematológicas nem em girinos nem em adultos. Em outras palavras, adultos reagem à hipóxia com ajustes no sangue, girinos com ajustes morfológicos (BURGGREN; MWALUKOMA, 1983; PINDER; BURGGREN, 1983).

O consumo de O₂ a partir do ar e da água em quatro níveis de O₂ dissolvido, por *Ambystoma tigrinum* (estágios larvais, pedomorfos e adultos), mostrou que os pedomorfos e

adultos exibiram regulação metabólica do total de O₂ consumido aumentando a porcentagem de O₂ captado do ar. Larvas exibiram apenas regulação parcial (HEATH, 1976). A forma neotênica da salamandra *Necturus maculosus* exibe maior afinidade por O₂ do que outros anfíbios, e ainda possui uma afinidade intrínseca muito alta, que é deprimida pelo ATP, o principal modulador alostérico nessa espécie. Sem dúvida, a alta afinidade está correlacionada com o habitat aquático. Ela também exibe efeito Bohr normal em pHs intermediários. O aumento da temperatura reduz o efeito Bohr e desloca a faixa de pH onde ele se manifesta para valores mais baixos. ATP produz um efeito oposto ao da temperatura (WEBER; WELLS; ROSSETTI, 1985).

O sapo-cururu, *Rhinella marina* (antes *Bufo marinus*), utiliza BPG como principal modulador alostérico, enquanto que no lagarto *Trachydosaurus rugosus* esse papel é do ATP, e possivelmente também do ADP (COATES, 1975). Interessante notar que o ADP é um efetor alostérico para a Hb de iguana, como sugerem Teixeira *et al.* (2018). Os urodelos *Salamander salamander* (duas isoHbs) e *Hydromantes genei* (uma única Hb) possuem diferenças em suas propriedades de ligação com ligantes. O efeito Bohr é ausente (na presença de fosfatos orgânicos) ou reverso (em Hbs *stripped*) em *S. salamander*. *H. genei* possui um efeito Bohr normal (similar ao de anuros), embora pequeno (CONDÒ *et al.*, 1989). A afinidade da Hb *stripped* de *Rhinella marina* por O₂ é sensível aos efetores alostéricos ATP e BPG. Íons inorgânicos, como Cl⁻, não afetaram apreciavelmente as constantes de afinidade nas faixas de concentração de provável significância biológica (WELLS; TREVENEN; BRITTAINE, 1989). A cinética de ligação de CO à Hb de *R. marina* é cooperativa e o modelo de MWC se ajusta bem ao seu comportamento (BRITTAINE *et al.*, 1982).

Um dos aspectos interessantes de vertebrados ectotérmicos diz respeito aos possíveis comportamentos que os animais apresentam em busca de uma temperatura adequada às suas condições metabólicas. Indivíduos de *R. marina*, submetidos à hipoxia e em um gradiente de temperatura, selecionariam uma temperatura mais baixa do que o normal (hipotermia comportamental), que seria supostamente benéfica para otimizar as trocas gasosas em tais condições. Isso acontece? Em normoxia, os sapos preferiram temperaturas em torno de 25 °C. Em hipoxia, preferiram 15 °C. No último caso, a saturação de O₂ arterial aumentou e o consumo de O₂ diminuiu. Trocas respiratórias, hematocrito e [Hb] aumentaram significativamente a 25 °C, mas não a 15 °C. Outrossim, a alcalose respiratória é significativa em sapos em condições de hipoxia a 25 °C, mas não a 15 °C. Então, sim, hipotermia comportamental é uma resposta benéfica que o sapo *R. marina* possui diante de hipoxia

(WOOD; MALVIN, 1991). Outras propriedades funcionais do sangue dessa espécie são: P_{50} do sangue total = 44 mmHg (medido pelo método tonométrico), pH 7,4, 25 °C; fator Bohr = -0,25 (pH 7,2-7,6, 25 °C) (HALL, 1966).

Podemos então comparar as propriedades funcionais das Hbs de *Bufo bufo* e *Bufo viridis*. *B. bufo*, o sapo comum, está presente em prados úmidos e florestas. Já *B. viridis* prefere ambientes secos, tolerando mais desidratação, salinidade e altas temperaturas. Olhando para as propriedades de ligação de O₂ das Hbs dos dois sapos (apenas um componente principal aparece em cada um deles) como uma função de pH, íons Cl⁻, fosfatos orgânicos e temperatura, notamos que a 20 °C a Hb de *B. bufo* exibe um leve efeito Bohr, que tende a aumentar na presença de diferentes efetores alostéricos. O efeito de prótons é abolido a 37 °C. *B. viridis* apresenta um efeito Bohr levemente mais pronunciado (o dobro de *B. bufo*) que aumenta somente na presença simultânea de íons Cl⁻ e fosfatos orgânicos, tanto a 20 quanto a 37 °C. Além disso, o calor geral de oxigenação (expresso como variação de entalpia) resulta em duas Hbs de anfíbios muito menos exotérmicas do que a Hb humana e, no caso de *B. viridis*, completamente independente do fosfato orgânico BPG (CLEMENTI *et al.*, 2007).

Pipa pipae é um anfíbio de habitat aquático. *Rhinella schineideri* (antigo *Bufo paracnemis*) possui habitat terrestre. Através de eletroforese em gel de amido, o sangue de *P. pipae* exibiu quatro componentes, ao passo que dois foi o número de componentes do sangue de *R. schineideri*. Os componentes podem ser separados por cromatografia de troca iônica em CM-celulose com gradiente de pH. Comparando as propriedades funcionais das Hbs das duas espécies, vemos que as Hbs *stripped* na presença de ATP e no mesmo pH, a espécie aquática têm apenas aproximadamente metade da P_{50} da espécie terrestre (VIEIRA *et al.*, 1982). Outro anfíbio de hábitos aquáticos do nordeste do Brasil, *Pipa carvalhoi*, exibiu quatro componentes em seu hemolisado. As propriedades funcionais das Hbs de adultos dessa espécie são semelhantes às de girinos de *L. catesbeianus* – alta afinidade por O₂ e ausência de efeito Bohr na Hb *stripped*, que voltou ao normal com 1 mM de ATP (MEIRELLES *et al.*, 1979).

As propriedades de equilíbrio de O₂ do sangue total e da Hb purificada de *X. laevis*, em 10 e 25 °C, inclusive em indivíduos aclimatados previamente nessas temperaturas, assim como do sangue de indivíduos em estivação, e aqueles aclimatados em solução salina, sugeriu que o ambiente em que os animais foram aclimatados aumentou a afinidade da Hb por O₂. Ureia aumentou a afinidade da Hb purificada, o que está relacionado com o aumento concomitante dos níveis sanguíneos de ureia durante a aclimatação (JOKUMSEN; WEBER, 1980).

Um fenômeno intrigante é o aparente efeito Root na Hb de *X. laevis*. Essa espécie se refugia na lama durante o verão para evitar o dessecamento e exibe o comportamento de estivação. O efeito Root deve compensar a escassez de O₂ nesse ambiente ao permitir que uma maior fração de O₂ estocado no sangue seja utilizada nos tecidos (PERUTZ; BRUNORI, 1982). As Hbs do hemolisado de eritrócitos de girinos, em comparação, analisadas através da cinética de ligação a CO pelo método de *flash* fotólise em pH 6,0 e 7,5, indicou não haver efeito Root. Isto é compatível com o modelo estereoquímico, no qual a substituição His HC3(146) β → Phe aboliu ou possivelmente reverteu o efeito Bohr; e a substituição Ser 93 β → Ala, que não pode formar qualquer ligação de hidrogênio, também inibiu o efeito Root. (BRUNORI *et al.*, 1985) Porém, Bridges, Pelster e Scheid (1985) utilizaram o método de capacidade de O₂ (que é diferente do método espectrofotométrico) para ver se a Hb de *X. laevis* realmente apresenta o efeito Root que é observado em peixes. A conclusão deles foi de que ela não apresentou efeito Root. Brunori *et al.* (1987) investigaram novamente a reação da Hb de *X. laevis* com O₂ e CO na faixa de pH 8,5-6,0 na ausência e presença de fosfatos orgânicos (BPG e IHP). Os dados de equilíbrio e cinética indicaram que a Hb de *Xenopus* exibiu o efeito Root – propriamente definido como a estabilização do estado quaternário T por prótons e polifosfatos. E conciliam os resultados de Bridges, Pelster e Scheid (1985), que não observaram o efeito Root medindo a capacidade de O₂ do sangue devido à baixa concentração de fosfatos orgânicos *in vivo*. Adicionando quantidade suficiente de fosfatos orgânicos à Hb *stripped*, em pH ácido, observa-se o efeito Root: uma forma extrema de efeito Bohr, onde os efetores inibem a transição do estado quaternário T para o R, o que implica em ausência de cooperatividade.

Experimentos com *Rana temporaria* iluminaram algumas propriedades que ainda não haviam sido propriamente descritas para anfíbios: (a) fatores Bohr do sangue em resposta à acidez fixa e mudança do pH induzida por CO₂; (b) fatores Bohr relacionados aos pHs do sangue e intraeritrocítico; (c) dependência do efeito Bohr sob a saturação; (d) mudanças dependentes de pH na forma da CDO. Observaram que: o *n_H* aumentou com o aumento da saturação de O₂; os fatores Bohr (quanto ao CO₂ e acidez fixos) não diferiram significativamente; não encontraram evidência de efeito Root. Ao que parece, as múltiplas Hbs são responsáveis pela dependência do *n_H* sob a saturação, ao invés do fenômeno de agregação de tetrâmeros ligado a desoxigenação. Mais uma vez, parâmetros como fator Bohr, *n_H*, P₅₀, mostraram-se inadequados para descrever o comportamento de sistemas com múltiplas Hbs (WELLS; WEBER, 1985).

Olhando para as propriedades respiratórias em adultos de duas espécies de tritões, *Taricha granulosa* (espécie mais aquática) e *Taricha rivularis* (espécie mais terrestre), observamos que a primeira apresenta menor capacidade de O₂ e maior afinidade por O₂ do que a segunda. Tais características são consideradas adaptações evolutivas (relativamente recentes) a um ambiente menos aquático por parte de *T. rivularis* (COATES; METCALFE, 1970).

Às vezes devemos olhar para o micro-habitat, ao invés dos ambientes onde ocorrem as trocas gasosas, para explicar as adaptações funcionais das trocas gasosas de anfíbios. *Cryptobranchus alleganiensis* é um urodelo estritamente aquático e um dos maiores vertebrados sem guelras em que a maior parte das trocas gasosas respiratórias ocorrem através da pele. Eis algumas propriedades do sangue dessa espécie: $P_{50} = 23,6$ mmHg (em pH e pressão de CO₂ arterial); $n_H = 2,9$; fator Bohr = -0,24. Mistura de considerável quantidade de sangue arterial e venoso antes de ejetar o sangue a partir do coração provavelmente é responsável pela baixa saturação de O₂ arterial (BOUTILIER; TOEWS, 1981).

Desmognathus quadramaculatus é uma salamandra aquática que não possui pulmões nem guelras. Presumivelmente, ela efetua trocas gasosas respiratórias através da pele e das superfícies bucofaringeanas. Hipóxia prolongada não afetou significativamente a afinidade da Hb por O₂, de forma tal que as propriedades do sangue da salamandra parecem idealmente adequadas para trocar O₂ durante episódios de atividade em normoxia. Durante períodos de inatividade em hipóxia, os requerimentos de O₂ da salamandra são mínimos (MAGINNIS; BOOTH, 1995).

Interessante são as propriedades respiratórias do sangue e do hemolisado *stripped* de um anfíbio ceciliano de hábitos fossoriais, *Boulengerula taitanus*. A taxa de captação de O₂ lembra a de outros anfíbios de tamanho similar. O sangue possui alta capacidade de O₂ (14 vol%), ao mesmo tempo que os eritrócitos são menores e mais numerosos do que em outros anfíbios. A afinidade por O₂ do sangue total foi alta ($P_{50} = 28$ mmHg, 25 °C e pH 7,6). A CDO é sigmoide ($n_H = 1,79$) e o fator Bohr é pequeno (-0,21). Nas soluções de Hb *stripped*, a afinidade por O₂ subiu fortemente ($P_{50} = 3,3$ mmHg, 25 °C, pH 7,6) e a sensibilidade à temperatura foi alta. Como a influência do pH e ATP (em concentrações maiores do que a presente nos eritrócitos da espécie) foi muito pequena, e dado à grande diferença nas afinidades do sangue total e do hemolisado *stripped* por O₂, podemos inferir que outro efetor alostérico deve modular a afinidade por O₂ nessa espécie (WOOD *et al.*, 1975). As propriedades respiratórias do sangue de outro anfíbio ceciliano, *Typhlonectes compressicauda*, são interessantes pelo fato desses animais tolerarem a natureza hipóxica e hipercarpínica de seu

habitat. Eles o fazem por meio de grandes volumes de sangue (25% do peso corporal), altos níveis de Hb (11,25 g/100 mL de sangue) e baixa P_{50} (22,2 mmHg). A CDO foi sigmoide e o valor do n_H foi de 2,15. O efeito Bohr é negligenciável. Os animais apresentam boa separação entre sangue oxigenado e desoxigenado no ventrículo (TOEWS; MACINTYRE, 1978).

As adaptações respiratórias em um anfíbio de modo de vida aquático que vive somente nas altas altitudes do lago Titicaca, *Telmatobius culeus*, são bastante peculiares. Essa rã é única quanto à combinação de habitat e adaptações respiratórias. Vive em águas geladas (10 °C) saturadas com O₂ (100 mmHg) em alta altitude (3.812 m). A área superficial da pele é aumentada por dobras pronunciadas e os capilares cutâneos penetram às camadas exteriores da pele. O volume eritrocítico é o menor relatado para anfíbios até à época em que foi estudada. $P_{50} = 15,6$ mmHg (pH 7,65, 10 °C) e a CDO é sigmoide ($n_H = 2,0$). O fator Bohr é pequeno (-0,30). A contagem de eritrócitos foi a maior observada para um anuro. A taxa metabólica dessa espécie foi a menor relatada para rãs. Entre os anfíbios, apenas algumas salamandras gigantes possuem taxas metabólicas menores (HUTCHISON; HAINES; ENGBRETSON, 1976). Na rã andina *Telmatobius peruvianus*, observaram um novo mecanismo molecular para a adaptação a altas altitudes que envolve perda de sítios de ligação de Cl⁻ específicos nas cadeias α, enquanto que ainda existe modulação por fosfato (WEBER *et al.*, 2002). Comparando os efeitos entálpicos de íons Cl⁻ e ATP nas Hbs de *T. peruvianus* e *X. laevis*, vemos que a alta sensibilidade à temperatura associada com a diminuição da ligação de Cl⁻ e baixa sensibilidade a fosfato da Hb de *Telmatobius* deve promover a captação cutânea de O₂ em seu habitat aquático nas altas altitudes dos Andes (WEBER, 2014).

Rana temporaria é uma rã terrestre com respiração predominantemente pulmonar, mas que durante o inverno fica em dormência no fundo de lagos e depende apenas da pele para as trocas gasosas. O hemolisado apresenta um componente principal (80-90%) e três componentes minoritários que provavelmente diferem nas cadeias α. As propriedades funcionais da Hb de *R. temporaria* foram fortemente moduladas por pH e [Hb], íons Cl⁻ não exibiram efeito significativo na afinidade por O₂; níveis saturantes de ATP apenas modestamente diminuíram a afinidade por O₂. Como em outros anfíbios, as interações intramoleculares e intermoleculares deram origem a uma CDO polifásica. A agregação da Hb diminui a afinidade por O₂ e aumenta a cooperatividade. O n_H máximo observado foi de 2,63 (quando os dados são devidamente ajustados para obter 100% de saturação pela extrapolação da assíntota superior). As duas constantes do modelo MWC variaram com o pH e a [Hb]. O termo para o número de sítios de ligação da equação do modelo MWC foi de 9,2, obtido a partir

do hemolisado concentrado, indicando que se formaram agregados maiores do que octâmeros (BÅRDGARD *et al.*, 1997).

A rã-touro gigante africana, *Pyxicephalus adspersus*, exibe três isoHbs por focalização isoelétrica, uma delas representando mais de 95% do hemolisado total. As propriedades funcionais durante repouso, exercício e dormência mostram as seguintes características: afinidade por O₂ do sangue total foi maior nas rãs dormentes (após seis meses de dormência) do que em rãs não dormentes em repouso [P₅₀: 33 mmHg (pH 7,63) e 44,9 mmHg (pH 7,76), 25 °C, respectivamente]. Após a dormência houve redução na massa corporal e aumento na pressão osmótica, hematócrito e concentração de Hb e metHb. A Hb stripped se mostrou insensível a íons Cl⁻, enquanto que ATP e BPG tiveram um efeito pequeno. O efeito Bohr foi alto (-0,42). A afinidade da Hb aumentou na presença de concentrações crescentes de ureia. Dado que a concentração de ureia aumenta durante a dormência, esse (além da maior concentração de metHb) são, provavelmente, os fatores responsáveis pelo aumento da afinidade no sangue total após a dormência (VAN AARDT; WEBER, 2010).

O sangue mantém o metabolismo de O₂ em *P. esculentus* sob apneia, porém, o estoque de O₂ (incluindo a contribuição do sangue) pouco contribui para o metabolismo em apneia e parece ser reabastecido imediatamente após cessar a ventilação pulmonar (JONES, 1972). Essa conclusão é curiosa, dado que anfíbios não possuem genes de Mb. De fato, usaram *Rana temporaria* como organismo modelo para estudar a difusividade de Mb exógena, injetando-a no sarcoplasma das fibras do músculo esquelético. A vantagem de utilizar a rã como modelo é o fato dela não possuir genes para Mb, o que permite detectar a Mb exógena espectrofotometricamente, sem interferência de uma proteína endógena equivalente (BAYLOR; PAPE, 1988). Uma Hb monomérica foi purificada a partir do músculo cardíaco de *L. catesbeianus*. Ela é composta por apenas 132 resíduos de aminoácidos e possui algumas mudanças inéditas em sua sequência. A análise filogenética revelou que o evento de duplicação que originou essa Hb ocorreu próximo ao evento de duplicação que deu origem aos genes α e β. Enquanto os resíduos em contato com o grupo heme foram bastante conservados, os resíduos na interface de contato das subunidades foram significativamente substituídos, frequentemente revertendo a um resíduo que aparece em Mbs. Essa proteína possui maior similaridade com a cadeia α do girino da mesma espécie (62 resíduos em comum) do que com qualquer outra globina à qual foi comparada. Ausência de Mb no músculo do coração sugere que essa proteína funcione como uma Mb (MAEDA; FITCH, 1982).

Os genes de globina em anfíbios foram estudados no âmbito genômico em *X. laevis*. Sua família gênica compreende doze genes, arranjados em dois agrupamentos. Os genes que codificam as cadeias α e β diferem no nível de expressão e provavelmente também apresentam diferenças no controle preciso de sua expressão durante o desenvolvimento (BANVILLE; WILLIAMS, 1985; HOSBACH; WYLER; WEBER, 1983). O rascunho do genoma de *Xenopus tropicalis* revelou que a expressão de Cygb e Ngb é semelhante à de mamíferos. Comparando a identidade da GbX da rã com a de peixes, vemos que a da rã está possivelmente presente como duas cópias parálogas, uma delas em estado de transição para um gene não funcional (pseudogene). Foi em *Xenopus* que identificaram a GbY, até então não descrita. Por fim, a análise genômica também confirmou a ausência dos genes de Mb e Hp em *X. tropicalis* (FUCHS; BURMESTER; HANKELN, 2006; WICHER; FRIES, 2006). A partir da expressão única de Cygb no músculo esquelético e cardíaco de *Xenopus laevis* – e a falta do gene para Mb nessa espécie – é provável que a Cygb compense a falta de Mb (XI *et al.*, 2007).

Os parâmetros hematológicos em cinco espécies de anuros: três terrestres (*Pseudepidalea viridis*, *Hyla arborea*, *Pelobates syriacus*), um semiaquático (*Rana dalmatina*) e um aquático (*Pelophylax ridibundus*), indicam que a contagem de células vermelhas do sangue foi maior em espécies terrestres do que nas demais (GÜL *et al.*, 2011). O conteúdo de Hbs de quatro espécies de anuros também mostrou estar relacionado com mudanças ontogenéticas, sazonais, no habitat e causadas por fatores antrópicos (VERSHININ; VERSHININA, 2013). Por sinal, concentrações ambientalmente relevantes do hormônio 17 α -etinilestradiol podem afetar o metabolismo do grupo heme em adultos de *X. laevis* (GARMSHAUSEN; KLOAS; HOFFMANN, 2015).

Vimos que anfíbios possuem múltiplas Hbs nos eritrócitos. Mas elas não são as únicas proteínas ali presentes. A anidrase carbônica está presente nos eritrócitos e pode ser purificada. O peso molecular da anidrase carbônica de aves e de anfíbios, assim como de mamíferos, é cerca de 30.000. É provável que o encurtamento da cadeia polipeptídica tenha ocorrido antes da divergência dos anfíbios. Também foi observado que a atividade enzimática de girinos é cerca de vinte vezes menor do que a de adultos de *L. catesbeianus*. Sugeriu-se que o papel primário da anidrase carbônica eritrocítica é utilizar de maneira mais eficiente o efeito Bohr no descarregamento de O₂ pela Hb. Uma vez que o girino não exibe um efeito Bohr significativo, a anidrase carbônica seria de pouco valor em facilitar o descarregamento de O₂ no estágio larval. Rãs adultas, pelo contrário, exibem um acentuado efeito Bohr, e por isso a anidrase carbônica poderia significativamente facilitar o descarregamento de O₂ durante o curto

tempo em que o sangue permanece nos capilares. Sobre a distribuição de anidrase carbônica em tecidos de anfíbios, temos três conclusões importantes: (1) a atividade de anidrase carbônica é encontrada em uma ampla variedade de tecidos de anfíbios; (2) em *Ambystoma tigrinum* e *L. catesbeianus*, os níveis de anidrase carbônica de indivíduos adultos são maiores do que os de indivíduos em estágio larval; (3) anfíbios aquáticos têm menores níveis de anidrase carbônica do que nas formas mais terrestres. Especula-se que durante a evolução dos anfíbios para um hábito mais terrestre, foi necessário um aumento concomitante dos níveis de anidrase carbônica em certos tecidos a fim de facilitar o transporte e remoção de CO₂ (BUNDY, 1977; BUNDY; CHENG, 1976; TOEWS *et al.*, 1978).

Apesar da quantidade massiva de informação sobre as propriedades funcionais de Hbs de anfíbios, o número de estruturas tridimensionais depositados no PDB é zero.

3.3 Biotecnologia

Tooby, Cosmides e Barrett (2003) escreveram um célebre artigo intitulado: “A segunda lei da termodinâmica é a primeira lei da psicologia” (tradução nossa). Uma das afirmações centrais dessa tese é a de que a seleção natural constrói mecanismos anti-entrópicos. Eles permitem aos seres vivos manter sua organização ao mesmo tempo que aumentam a desordem do ambiente com o qual interagem. Existe uma aparente dualidade nos mecanismos de auto-organização, como Schrödinger antecipou no século passado. Um deles é a ordem a partir da ordem; o outro é a ordem a partir da desordem. A biotecnologia surgiu quando aprendemos a manipular racionalmente o primeiro mecanismo. Mas a natureza dual da auto-organização é ilusória. A evolução eliminou todas as formas que não eram organizadas o suficiente para sobreviver. Genes que eram bons em conviver com outros genes conseguiram se replicar. Uma biotecnologia *iluminada* não poderia violar tais regras de sobrevivência. Saber *como* a informação biológica pode ser usada como mecanismo anti-entrópico é, ainda que muitas vezes não de forma explícita, a principal tarefa da biotecnologia. Entender quais mecanismos biológicos tornam os organismos que sobrevivem em ambientes áridos resistentes à seca pode nos permitir aprimorar nossos cultivares suscetíveis. Cultivares mais resistentes à seca aumentariam a densidade da produção em ambientes áridos. Aumentar a densidade de produção aumenta a prosperidade humana e torna a agricultura mais sustentável. Transferir a informação biológica de uma espécie para outra é o que a biotecnologia faz. Em última

instância, o que queremos na verdade é uma maneira de dotar nossos cultivares favoritos com mecanismos anti-entrópicos diante da condição de seca. A segunda lei da termodinâmica é a *primeira lei da biotecnologia*.

3.3.1 Proteínas de anfíbios como recursos naturais para a biotecnologia

A biotecnologia de recursos naturais é uma forma de aproveitar o potencial da informação biológica presente na biodiversidade de uma dada região para gerar produtos biotecnológicos. Quando olhamos para os anfíbios como fontes de produtos naturais, à primeira vista, lembrarmos das toxinas que algumas espécies apresentam. Existem várias aplicações de toxinas de anfíbios no campo da farmacologia (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010). Um olhar mais atento pode perceber que existem várias outras classes de macromoléculas e propriedades funcionais que seriam de interesse biotecnológico. Um exemplo disso são as proteínas presentes em ninhos de rãs, que são verdadeiros surfactantes naturais. Possuem aplicações biomédicas e biotecnológicas. Por exemplo, elas podem ser usadas para formar uma interface com componentes e dispositivos nanotecnológicos baseados em grafeno, nanotubos ou nanopartículas (COOPER *et al.*, 2017). Linhagens de anfíbios transgênicos, que expressam proteínas fluorescentes, podem agir como biomarcadores de contaminantes ambientais (DOVE, 2000).

3.3.2 Biotecnologia de hemoglobinas

O sangue é o tecido mais transplantado no mundo. Por isso muitos pesquisadores estão tentando produzir um sangue artificial – geralmente desenhando racionalmente transportadores de O₂ baseados em Hb (ALAYASH, 1999, 2004; CHANG, 2009; CHEN; SCERBO; KRAMER, 2009; INAYAT, 2006; JIA; DUAN; LI, 2016; KODER *et al.*, 2009). A metHb pode ser usada como marcador do linfonodo sentinela (PINHEIRO *et al.*, 2009). Cygb pode funcionar como um biomarcador para câncer e auxiliar no tratamento de melanoma (BHOLAH *et al.*, 2015; DE BACKER *et al.*, 2018). Reações de transferência de elétrons catalisadas por Hbs podem ser úteis para criar biosensores ou células de combustíveis (CAI; CHEN, 2004). A expressão heteróloga em vários hospedeiros da Hb de *Vitreoscilla sp.* (VHb) aumentou o crescimento e a produtividade, tornando essa proteína atraente para a biotecnologia

industrial (FREY; KALLIO, 2003). Muitas outras aplicações (nano)biotecnológicas de Hbs estão surgindo na literatura.

3.4 *Leptodactylus vastus*

O anuro *Leptodactylus vastus* é uma rã de hábitos semiaquáticos endêmica do nordeste brasileiro (LUTZ, 1930). Habita regiões ao norte do Cerrado e a Caatinga, do Maranhão até Sergipe, sendo inclusive encontrado em cavernas de Sergipe e no bioma conhecido como brejo de altitude do Parque Nacional de Ubajara, no Ceará. Podendo medir até 18 cm de comprimento, sua dieta é generalista-oportunista (predando inclusive outras espécies de anuros) e se reproduz nas margens de corpos d'água (CASCON; BRITO; ROBERTO, 2014; CASTRO *et al.*, 2018; FERREIRA; DANTAS; DONATO, 2009; SANTANA *et al.*, 2012). Vieira, Santana e Vieira (2007) descreveram os girinos dessa espécie. Castro *et al.* (2017) descreve o comportamento defensivo das rãs adultas diante da ameaça de predadores. Teles *et al.* (2014) descreve os helmintos presentes em *L. vastus*. Vemos na Fig. 9a um espécime de *L. vastus* e logo abaixo (Fig. 9b) uma ilustração naturalista dessa espécie.

Que tipos de moléculas biológicas com potencial biotecnológico podemos encontrar em *L. vastus*? Cabral *et al.* (2013) relata que a gordura corporal nessa espécie possui atividade antimicrobiana. Hissa *et al.* (2008, 2012, 2014, 2016) descreve a caracterização estrutural e funcional da proteína surfactante presente nos ninhos de espuma de *L. vastus*. As Hbs de *L. vastus* ainda não foram estudadas. Porém, a hidrólise da Hb de uma rã do gênero *Leptodactylus* da fauna de Brasília originou peptídeos com possíveis atividades biológicas (BEMQUERER *et al.*, 2012).

Figura 9 – *Leptodactylus vastus*, fotografia e ilustração naturalista.



Fonte: dados do autor.

4 OBJETIVOS

4.1 Gerais

Avaliar a estabilidade estrutural relacionada às adaptações funcionais para a interação de ligantes da hemoglobina dos eritrócitos de *Leptodactylus vastus*.

4.2 Específicos

- Isolar e purificar a Hb do sangue de *L. vastus*.
- Obter o espectro eletrônico da Hb e de seus derivativos comuns.
- Quantificar a afinidade da Hb de *L. vastus* por O₂.
- Estimar a massa molecular relativa da Hb do sangue de *L. vastus*.
- Analisar a estrutura secundária da Hb do sangue de *L. vastus*.
- Determinar a termoestabilidade estrutural da Hb do sangue de *L. vastus*.
- Obter cristais de Hb do sangue de *L. vastus* para difração de raios X.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta e sacrifício dos animais, reaproveitamento do sangue e armazenamento

Os animais foram coletados na mata do Campus do Pici depois da emissão da autorização de coleta SISBIO, n. 48107-1. O cadastro de acesso ao patrimônio genético é A4AF192. Anestesiamos dois espécimes com 0,6 mL de Ketamina® e Xilazina® (1:6) cada. Coletamos o sangue por punção cardíaca em frascos heparinizados. Nenhum dos animais foi sacrificado como objetivo apenas dessa pesquisa. A pele dos animais possui proteínas com atividades biológicas que seriam caracterizadas por outros pesquisadores do mesmo grupo de pesquisa. Os músculos esqueléticos, olhos, cérebro e coração foram armazenados em refrigeradores para prospecção de outras Hbs futuramente.

5.2 Extrato bruto de células vermelhas do sangue¹⁸

Inicialmente, centrifugamos 8 mL de sangue ($1.500 \times g$) por 20 minutos em tubo do tipo *falcon*. Retiramos o sobrenadante, adicionamos solução de NaCl 0,15 M gelada, suspendemos os eritrócitos e centrifugamos novamente. Repetimos seis vezes esse ciclo de lavagem. Ao final, retiramos o sobrenadante, medimos o volume de papa (eritrócitos precipitados) e provocamos hemólise adicionando três volumes de água destilada. Centrifugamos novamente ($5.000 \times g$, 4 °C) por uma hora. Coletamos o sobrenadante vermelho e o submetemos à diálise (*cut-off* de 10 kDa) por 24 horas contra tampão fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,4, realizando a primeira troca de tampão após a primeira hora, e mais duas trocas na manhã seguinte. Adicionar EDTA evita a auto-oxidação da Hb à metHb, que ocorre principalmente quando ela está em soluções com pH abaixo de 7 (RIGGS, 1981). Aliquotamos o extrato bruto (9 mL) em microtubos de 500 µL. Congelamos as alíquotas com nitrogênio líquido e as armazenamos em refrigerador comum.

¹⁸ O protocolo geral para obter o extrato bruto foi o de Riggs (1981). As etapas de centrifugação foram baseadas em Sundaresan *et al.* (2008).

5.3 Cromatografia de troca iônica¹⁹

Para purificar as Hbs do extrato bruto, utilizamos uma coluna trocadora catiônica (CM-Sepharose), contendo aproximadamente 4 mL de gel. Equilibraremos as colunas com o mesmo tampão da amostra antes de aplicá-la (tampão fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,4). Para eluir a proteína, aumentamos o pH de forma descontínua trocando o pH do tampão de eluição. Partindo do pH 6,4, aumentamos em unidades de 0,1 o pH. Quando atingimos o pH 7,5, aumentamos para 8,5 utilizando outro tampão (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5). Durante as cromatografias piloto coletamos as frações manualmente. Após estabelecermos o protocolo mais adequado utilizamos um coletor de frações, programado para coletar 1-2 mL por tubo. Após conhecermos o pH onde cada isoforma de Hb era eluída, passamos a purificar as proteínas aumentando o pH do tampão de eluição diretamente para o ponto onde as proteínas são eluídas (que deve ser próximo do ponto isoelétrico de cada isoforma).

5.4 Eletroforese

Avaliamos o conteúdo proteico do extrato bruto e a pureza das frações da cromatografia por SDS-PAGE (15%) em condições redutoras (com 2-mercaptopetanol) e não redutoras.²⁰ Também estimamos a massa molecular relativa (M_r) das cadeias comparando sua migração a de marcadores de peso molecular.²¹ Composição do *gel de separação*: acrilamida-bisacrilamida 15% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 na presença de SDS 10%, TEMED e persulfato de amônio (APS). Composição do *gel de empilhamento*: acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 1%, TEMED e APS. Composição do *tampão de amostra*: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% e SDS 1%. O tampão em condições redutoras contém, adicionalmente, β-mercaptopetanol 5%. Evitamos a etapa de aquecimento e aplicamos 10-20 μL da amostra previamente diluída no tampão de amostra em cada poço. Utilizamos o sistema BIO-RAD (Mini-PROTEAN® Tetra System). O tampão na cuba é Tris-HCl 0,25 M, glicina 0,192 M, SDS 1%. As condições da corrida são: corrente elétrica (200 mA), tensão (60 V) e potência (6 W). Coramos o gel com o corante Coomassie

¹⁹ Baseamo-nos nos protocolos de Riggs (1981) e Lima (1979) para definir o método de purificação.

²⁰ Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio: Laemmli, 1970.

²¹ Como estimar a massa molecular de proteínas em géis de poliacrilamida: Shapiro, Viñuela e Maizel Jr., 1967.

Brilliant Blue R-250, 0,1%. Os marcadores de peso molecular (*GE Healthcare*) incluem: fosforilase b (97,0 kDa); albumina (66,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa).

5.5 Espectrofotometria

Espectrofotometria é um método de detecção e quantificação de proteínas (quando estas seguem a lei de Lambert-Beer). Podemos usar a espectrofotometria para avaliar o conteúdo proteico nas frações cromatográficas, pois as proteínas possuem resíduos de aminoácidos com grupos laterais aromáticos (tirosina, triptofano, fenilalanina) que exibem um pico de absorbância na região do ultravioleta próximo (280 nm). Hb possui o grupo heme, que apresenta absorbâncias noutra faixa de comprimentos de onda, como a região de Soret (por volta de 415 nm) e os picos ao redor da região de 540 nm, que variam de acordo com o estado de oxidação do ferro do grupo heme.²²

5.5.1 Espectro de absorção da hemoglobina de *L. vastus*

Medimos o espectro de absorção da Hb no espectrofotômetro UV-Vis-NIR (Varian 5000). Inicialmente medimos o espectro da oxiHb em condições normais de temperatura e pressão. Medimos o espectro da desoxiHb após reduzir a proteína (100 μ L) com ditionito na proporção 1:10 (observamos a cor da solução de Hbs ficar mais próxima do púrpura) e retirá-lo por filtração em gel numa coluna Sephadex G-25 dentro de uma câmara anaeróbica. Preparamos os derivativos COHb (Hb ligada a CO), metHb e CNmetHb de acordo com os protocolos descritos em Di Iorio (1981).

5.5.2 Determinação de proteínas

²² Alguns exemplos de espectros de absorção de Hbs: Waterman (1978); Zijlstra, Buursma e Meeuwsen-Van der Roest (1991); Zijlstra *et al.* (1994); Zijlstra e Buursma (1997).

A fim de obter informações mais precisas a respeito dos derivativos da Hb de *L. vastus*, comparamos a concentração de Hb solúvel utilizando o $\epsilon_{\text{HiCN}}^{540}$ da Hb humana com o valor obtido pelos métodos de determinação de proteínas totais descritos na literatura (ZAIA; ZAIA; LECHTIG, 1998). Alguns deles, como o método do Biureto, não são adequados para Hb. Outros, como o método de Bradford, apresentam variação considerável (BRADFORD, 1976). Dentre eles, o método de Smith, também conhecido como método do ácido bicinchonímico (BCA), permite quantificar de forma acurada a concentração de proteínas (SMITH *et al.*, 1985). Ele pode ser usado para determinar hemoproteínas a fim de comparações com o conteúdo hemínico, utilizando albumina sérica bovina como padrão para a parte apoproteica (GILLES-GONZALEZ *et al.*, 2008).

Determinamos a concentração de proteínas solúveis pelo método do BCA utilizando um *kit* comercial (SIGMA-ALDRICH) e convertemos seu valor à concentração milimolar utilizando a M_r da Hb de *Leptodactylus labyrinthicus* (64.500) (LIMA, 1979). Também determinamos a concentração de Hb utilizando a absorbância do derivativo CNmetHb, que obtivemos reagindo a proteína com o reagente de Drabkin (50 mg de KCN, 200 mg de K₃Fe(CN)₆, 140 mg de KH₂PO₄ dissolvidos em 1 L de água destilada, pH 7,2-7,4), medimos a absorbância em 540 nm e aplicamos a equação seguinte:

$$\epsilon_{\text{HiCN}}^{540} = A_{540} / (C_{\text{Hb}} \cdot l \cdot 4) \quad (8)$$

Onde l é o caminho óptico em cm e o fator 4 se deve ao fato do coeficiente de extinção corresponder à concentração milimolar de heme, não de moléculas de Hb. A molécula de Hb possui quatro grupos heme.

5.5.3 Equilíbrio com O₂

Obtivemos a curva de dissociação de oxigênio (CDO) pelo método de Gilles-Gonzalez *et al.* (2008). Primeiro fizemos uma CDO piloto. No procedimento, coletamos o espectro da oxiHb. Depois de reagir a solução de Hbs (100 µL) com ditionito na proporção 1:10 e remover o excesso do reagente utilizando a coluna Sephadex G-50 em câmara anaeróbica, medimos o espectro da desoxiHb. Adicionamos quantidades conhecidas de tampão (contendo O₂) à solução de Hb, com cuidado para não ultrapassar 5% do volume da solução. Após

estimarmos o K_d , fizemos uma CDO um pouco mais extensa. Analisamos os dados com o auxílio da equação de Hill através do método de regressão não linear por redução dos mínimos quadrados no *software Excel* (KEMMER; KELLER, 2010).

5.6 Dicroísmo circular

O primeiro passo para caracterizar a Hb de *L. vastus* é obter o espectro de CD na região do UV distante, a fim de estimarmos o conteúdo de estruturas secundárias. Coletamos o espectro do *pool* de Hbs purificadas na região de 190-250 nm utilizando uma cubeta retangular de 0,5 mm em spectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tokyo, Japan). A proteína estava em tampão fosfato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5. Também medimos o CD no comprimento de 222 nm em função da temperatura (25-90 °C) utilizando um *peltier* acoplado ao spectropolarímetro com temperatura controlada para determinar a T_m da proteína. Uma vez que a T_m é a temperatura na qual a razão entre as concentrações da proteína enovelada e desenovelada (α) é 1,0, e uma vez que podemos correlacionar esses estados com as elipticidades do espectro de dicroísmo circular em função da temperatura, podemos utilizar a seguinte equação para encontrar o valor de elipticidade equivalente à T_m :

$$[\theta] = \alpha([\theta_F] - [\theta_U]) + [\theta_U] \quad (9)$$

Onde $[\theta_F]$ e $[\theta_U]$ representa as elipticidades da proteína nativa (totalmente enovelada) e desnaturada (totalmente desenovelada), respectivamente. Ajustamos a equação aos dados experimentais utilizando regressão não linear por quadrados mínimos no *software Excel* (KEMMER; KELLER, 2010).

5.7 Cristalização: *screens* iniciais

A cristalografia macromolecular é uma das principais aplicações dos raios X às ciências da vida (SAYERS *et al.*, 2017). Ela ainda é o principal método para resolver estruturas

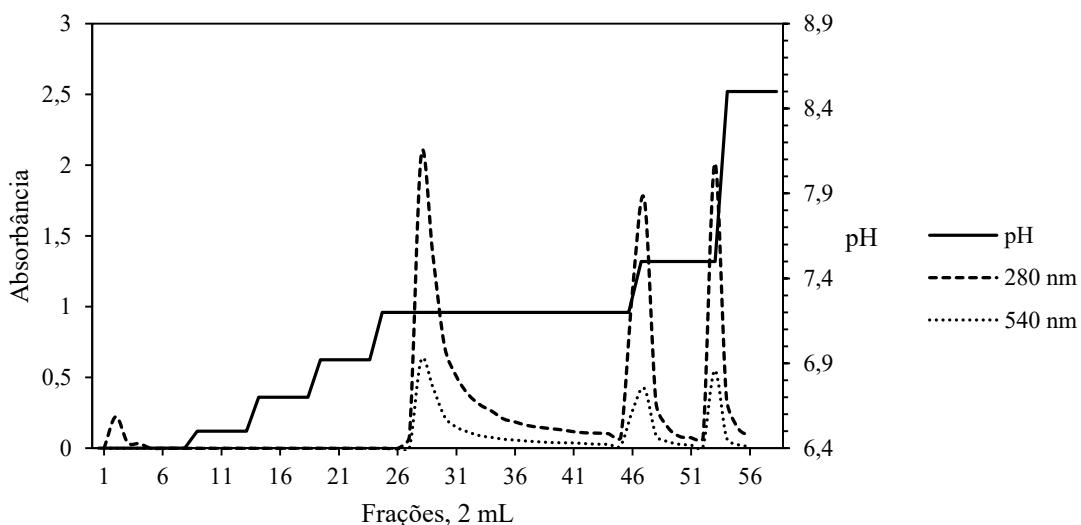
de proteínas. Perutz (1968) descreve várias condições de crescimento para cristais de Hb. Algumas Hbs podem cristalizar em água com baixa concentração de sal, ou em tampões com elevadas concentrações de sais (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2009). Sato-Tomita e Shibayama (2017) descrevem métodos para cristalizar Hbs para experimentos de cristalografia de raios X, cristalografia de nêutrons e holografia de fluorescência de raios X. Como nenhuma estrutura cristalográfica de Hbs de anfíbios foi, até o momento, depositada no *Protein Data Bank*, resolver a estrutura cristalográfica da Hb de *L. vastus* poderia trazer informações que complementem e esclareça problemas ainda não resolvidos na vasta literatura sobre adaptações funcionais de Hbs de anfíbios.

Fizemos *screens* de cristalização em placas de vinte e quatro poços através do método da matriz esparsa e da técnica de gota suspensa utilizando os *kits Crystal Screen 1 e 2* (HamptonTM). Em cada poço colocamos 250 µL de solução tampão e as gotas continham 1 µL de solução de proteína e 1µL do tampão de cristalização.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 10 exibe o cromatograma do extrato bruto dos eritrócitos de *L. vastus*. Observamos três isoformas que eluíram em diferentes pHs do tampão de eluição. A Fig. 11 confirma a pureza das frações.

Figura 10 – Cromatografia de troca iônica (CM-Sepharose)

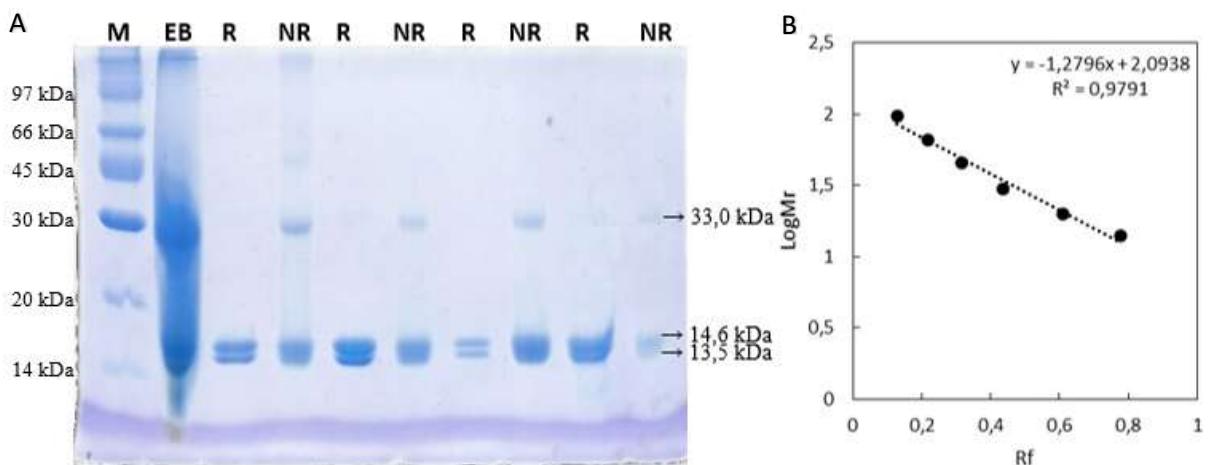


Fonte: dados do autor.

A cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose mostra que existem três picos com absorbâncias proporcionais em 280 e 540 nm. Cada pico é eluído em um pH específico. Portanto, cada um deles corresponde a uma provável isoHb. Esse resultado é similar ao encontrado por Lima *et al.* (1983), que reporta três isoformas no sangue de *Leptodactylus labyrinthicus*. De fato, inicialmente tentamos eluir as Hbs com os valores de pH que eram reportados por essa autora. Ela eluía a primeira isoforma no pH 6,5. Isto não ocorria em *L. vastus*. Como podemos ver na Fig. 10, a primeira isoHb é eluída em pH 7,2. Aumentávamos o pH para 7,5, que era o valor onde a última isoforma era eluída no trabalho citado acima, e mais uma isoforma de *L.vastus* era eluída. Porém, a matriz da coluna (que normalmente é branca) permanecia vermelho escuro. Lima *et al.* (1983) utilizou tampão fosfato para eluir a amostra. Para continuarmos aumentando o pH, deveríamos escolher outro tampão. Escolhemos o tampão Tris-HCl, que possui uma região de tamponamento mais adequada. Assim, depois de eluir a

segunda isoforma em pH 7,5, eluimos a terceira em pH 8,5. Observamos que a coluna ficou branca novamente.

Figura 11 – SDS-PAGE.



Fonte: dados do autor.

A. Gel (15%) corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*. Marcadores de peso molecular (M); extrato bruto (EB); fração em condições redutoras (R); fração em condições não redutoras (NR). B. Reta de regressão com o logaritmo da M_r dos marcadores em função da migração relativa (Rf). Através dele determinamos a M_r das bandas presentes nas frações.

Quando purificamos as Hbs por troca iônica, inicialmente notamos uma banda em SDS-PAGE (em condições não redutoras) próxima ao marcador referente à anidrase carbônica e imaginamos que fosse a própria anidrase carbônica eritrocítica. Entretanto, em condições redutoras podemos observar (Fig. 11) que a banda some. As Hbs de *L. vastus* formam pontes dissulfeto *in vitro*. Esse é um indicativo de que as Hbs de *L. vastus* possuem grupos tióis reativos, cujas possíveis funções vêm sendo estudadas recentemente em outras Hbs de vertebrados. (REISCHL *et al.*, 2007). Ainda não sabemos se as diferentes isoformas compartilham alguma subunidade, como ocorre em outras espécies de anfíbios. Devemos sequenciar futuramente cada uma das isoformas de Hb de *L. vastus*.

Um fenômeno que chama atenção é a capacidade de polimerização de Hbs de anfíbios e tartarugas, já relatada por Svedberg. Hbs da tartaruga *Chelydra serpentina* e de *L. catesbeianus* polimerizavam em duplas, com a constante de sedimentação no valor de 7 S. Até o momento, os resultados sugeriam que a polimerização era desencadeada pela hemólise. Contudo, agentes redutores revertiam a polimerização, diferente do que afirmara Trader *et al.* (1963). Ainda havia dúvida se as causas da polimerização eram as pontes dissulfeto (RIGGS; SULLIVAN; AGEE, 1964). Adicionalmente, evidências obtidas a partir de experimentos de ultracentrifugação, onde os eritrócitos dos anfíbios eram hemolisados diretamente na ultracentrífuga, sugeriam que a agregação de tetrâmeros não ocorria *in vivo*. No modelo para o

fenômeno de agregação, os grupos tióis reativos nas cadeias β faziam duas pontes dissulfeto entre os tetrâmeros (TRADER; FRIEDEN, 1966).

A Hb de *P. esculentus*, diferente de *L. catesbeianus*, não exibiu na ultracentrifugação qualquer componente acima de tetrâmeros. Curiosamente, o efeito do pH na CDO da Hb de *P. esculentus* é similar ao de invertebrados, o que pode estar relacionado à presença de diferentes componentes funcionalmente distintos. De fato, frações isoladas possuem a mesma afinidade em pH 9, mas são diferentes quanto ao efeito Bohr. Dois pontos emergem dos estudos cinéticos nessa espécie: (1) inversão do efeito do pH sobre a constante de velocidade para a dissociação do O₂; (2) o efeito da digestão por carbóxi-peptidase é bastante diferente entre Hbs da rã e humanas, apesar de possuírem o mesmo grupo terminal (BRUNORI *et al.*, 1968).

A ultracentrifugação permitiu visualizar o equilíbrio de associação e dissociação dos derivativos oxiHb (Hb oxigenada) e desoxiHb (Hb desoxigenada) de três espécies de anfíbios, dois com respiração pulmonar (*R. esculenta* e *Triturus cristatus*) e um com respiração branquial (*Ambystoma mexicanum*, conhecido como axolote). As principais conclusões foram: (1) a oxiHb de axolote permanece tetramérica em função do pH, enquanto parte da desoxiHb sofre polimerização dependente de concentração a octâmeros abaixo do pH 6; (2) a oxiHb da rã não polimeriza em função do pH, mas sua desoxiHb parcialmente polimeriza a octâmeros na faixa de pH 5-8; (3) ambas as polimerizações são reversíveis quando as soluções são oxigenadas; (4) os derivativos oxi e desoxi da Hb de *T. cristatus* não polimerizam na faixa de pH 5-8. Dessa forma, a polimerização não parecia realmente estar ligada à formação de pontes dissulfeto, desde que era prontamente reversível com a reoxigenação ou com mudanças no pH das soluções (ELLI *et al.*, 1970).

A composição de aminoácidos e o equilíbrio de O₂ dos componentes de *L. catesbeianus* purificados por troca iônica mostraram que: (1) o hemolisado do sangue de indivíduos adultos apresentou quatro componentes; (2) o componente C foi heterogêneo em ultracentrifugação, apresentando polimerização em octâmeros ou mesmo além, enquanto que o componente B não apresentou polimerização; (3) a afinidade por O₂ é dependente da concentração; (4) o componente C tem maior afinidade por O₂ do que o componente B; (5) BPG não reverte completamente o aumento da afinidade da Hb obtido com a Hb stripped; (6) calculando o equilíbrio de O₂ para uma mistura dos componentes B e C, concluiu-se que estes devem interagir; (7) existem pelo menos seis componentes no hemolisado dos girinos e CM-celulose é capaz de separar subunidades da Hb eletroforeticamente distintas; (8) os

componentes de Hb de girinos não apresentaram efeito Bohr (AGGARWAL; RIGGS, 1969). Qual seria o valor adaptativo da falta de efeito Bohr em girinos, sendo que durante a metamorfose ocorre apenas uma leve diminuição do pH eritrocítico? (JUST; GATZ; CRAWFORD JR, 1973).

As CDO das Hbs de *L. catesbeianus* e *Rana temporaria* apresentam um resultado aparentemente paradoxal: n_H acima de 4 (LYKKEBOE; JOHANSEN, 1978). O equilíbrio tetrâmero/dímero da oxiHb e desoxiHb em girinos de *L. catesbeianus* associa-se com a liberação de dois prótons na oxiHb e quatro prótons na desoxiHb. Dissociação a monômeros ocorre em elevado pH (ATHA *et al.*, 1979). De fato, o equilíbrio de O₂ no sangue de vertebrados ectotérmicos parece seguir uma relação mais complexa do que os modelos matemáticos, junto dos parâmetros descritivos para soluções com uma única Hb, podem iluminar. Por exemplo, as CDO do sangue total de *L. catesbeianus* e da tartaruga aquática *Pseudemys scripta*, na faixa de temperatura de 5-35 °C e em pH fisiológico, mostram que a elevação da temperatura reduz a afinidade por O₂ em ambas as espécies, como era esperado. Porém, as curvas não seguem o padrão da curva do sangue humano. As curvas dos vertebrados ectotérmicos subiram de forma mais íngreme e então se tornaram mais achatadas acima da P₅₀; o efeito Bohr do CO₂ variou significativamente em função da saturação e ambas as espécies não exibiram linearidade na relação de Hill (MAGINNIS; SONG; REEVES, 1980).

Os principais componentes do hemolisado de *L. catesbeianus* formam agregados quando desoxigenados. Tal agregação de tetrâmeros desencadeada por desoxigenação é diferente da que ocorre por pontes dissulfeto após a hemólise. Os agregados são constituídos pelos componentes B e C do hemolisado na proporção 1:2. O agregado apresenta uma menor afinidade por O₂. Além disso, a agregação é dependente da concentração dos componentes e do pH (o pH onde ocorre maior agregação é 7,0). A dissociação dos agregados durante a oxigenação dá origem a uma cooperatividade exacerbada (n_H máximo é 4,1 na faixa de saturação entre 75-80%). Esse fenômeno pode ocorrer de forma generalizada em anfíbios e outros vertebrados não mamíferos. Suas implicações fisiológicas incluem desde a entrega de O₂ em altas pressões, efeito Bohr melhorado na rã-touro e axolote (mas não em *P. esculentus*, cuja agregação não é dependente de pH), até diminuição na pressão osmótica dos eritrócitos por um fator de 3, caso não ocorram processos compensatórios (TAM; RIGGS, 1984). Dados de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das cadeias separadas de cada componente sugerem que as cadeias β dos componentes B e C do hemolisado são bastante similares ou provavelmente idênticas (a cadeia β do componente C foi sequenciada), enquanto que as cadeias

α são diferentes. Portanto, o fenômeno de auto associação dos tetrâmeros ligado à desoxigenação deve ocorrer entre as cadeias α de diferentes tetrâmeros. Isso explica o fato de fosfatos orgânicos não afetarem ou não serem significativamente afetados pela formação do complexo, uma vez que o sítio de fosfatos orgânicos é a cavidade entre as cadeias β . Também há a possibilidade de tetrâmeros híbridos se formarem, uma vez que ambos os tetrâmeros B e C se dissociam em dímeros $\alpha\beta$. Ao contrário do que se pensava, a agregação por pontes dissulfeto ocorre entre cadeias α (TAM; GRAY; RIGGS, 1986).

Determinaram as sequências de transcritos de cDNA das cadeias α da HbB e da HbC de adultos de *L. catesbeianus*, que provavelmente estão envolvidas na associação dos tetrâmeros B e C formando trímeros BC₂ sob desoxigenação. Modelagem molecular sugeriu sítios de contatos nas interfaces $\alpha_B\alpha_C$ e contatos $\alpha_C\alpha_C$ adicionais, formando um anel fechado de seis cadeias α . A análise filogenética da cadeia α da HbB sugere que ela se originou da cadeia de uma Hb do girino que teve sua expressão temporal alterada do estágio larval para o adulto (heterocronia) (SMITH *et al.*, 1993). O equilíbrio entre os tetrâmeros B e C e o trímero BC₂ (com baixa afinidade por O₂) explica a cooperatividade aumentada da ligação de O₂, com n_H maior do que o dos componentes isolados (TAM *et al.*, 1993).

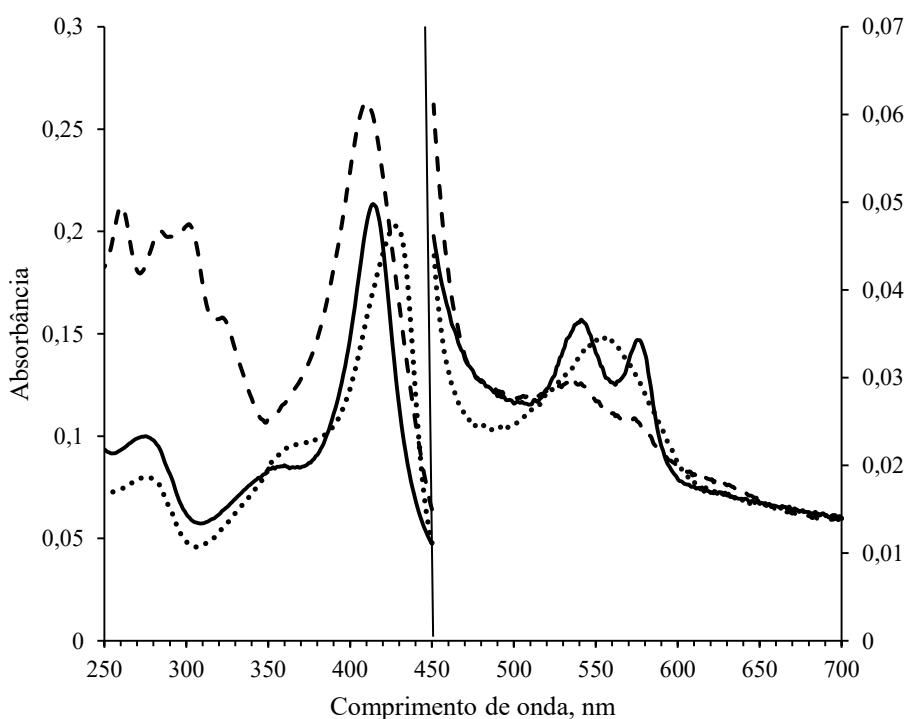
O tritão *Triturus cristatus* apresenta quatro componentes distintos em cromatografia de troca iônica, designados HbI-IV, do menos para o mais aniónico. HbII é o componente mais abundante, seguido de HbIII e HbIV. HbI nunca representa mais do que 3-5% do hemolisado. Como nem a separação por troca iônica nem a migração eletroforética são afetadas pela conversão do hemolisado ao derivativo CNmetHb²³, a heterogeneidade observada não deve ser um artefato de diferentes estados oxidativos do grupo heme. O peso molecular estimado por ultracentrifugação foi de 67.182. Interessante foi o fato de que agentes redutores (0,01-0,2 M 2-mercaptopetanol e 0,01-0,02 M DTT) usados para prevenir contra a polimerização por pontes dissulfeto resultaram numa degradação extensiva da Hb do tritão através de um processo similar à oxidação acoplada por ascorbato (GRASSO; CASALE; CHROMEY, 1979). Porém, através do método de focalização isoelétrica com vários anfólitos comerciais de diferentes composições químicas e diferentes faixas de pH (um novo avanço analítico para a química de proteínas), nada menos que oito bandas individuais de Hbs foram observadas em *T. cristatus*. Otimizando o método de eletroforese, as mesmas oito bandas foram obtidas. Uma observação importante a respeito desses achados é que existem limitações ao se afirmar a existência de polimorfismo

²³ Cianometemoglobina: metHb ligada a cianeto (CN⁻).

genético a partir da eletroforese de hemolisados, pois existem vários fatores que podem gerar artefatos, como a polimerização através de pontes dissulfeto. Sabendo disso, o uso de agentes redutores em eletroforese de Hbs é recomendável (KOUSSOULAKOS; KAPAROS; STATHAKOS, 1986).

Ainda não quantificamos o percentual de cada isoforma presente no extrato bruto de *L. vastus*, mas pelo menos sabemos qualitativamente que a primeira isoforma é o componente principal e as duas seguintes são componentes minoritários. Também não sabemos o ponto isoelétrico exato de cada isoforma. Podemos recomendar em trabalhos futuros utilizar focalização isoelétrica. Saber o ponto isoelétrico de cada isoforma antes da cromatografia pouparia tempo e reagentes. Além disso, a focalização isoelétrica revelaria a diversidade de componentes no extrato. Realizamos os experimentos seguintes antes de conseguirmos separar as diferentes isoformas. Portanto, devemos ter em mente que os dados de espectrofotometria, equilíbrio com O₂ e dicroísmo circular (e até mesmo de cristalização) dizem respeito a uma mistura das três isoformas de *L. vastus*. Na Fig. 12 vemos os espectros de absorção da oxiHb, desoxiHb e metHb.

Figura 12 – Espectro eletrônico: oxiHb, desoxiHb, metHb.



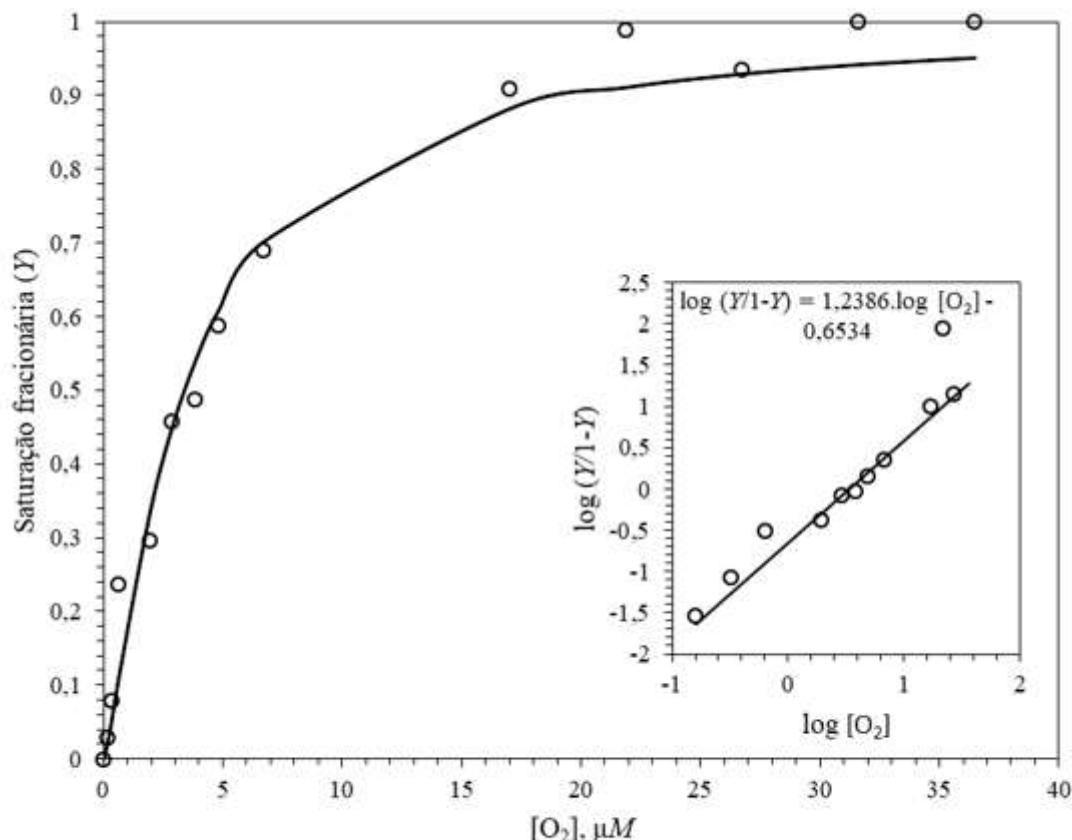
Fonte: dados do autor.

oxiHb _____; desoxiHb; metHb -----.

Caracterizar apropriadamente o espectro dos derivativos mais comuns (Fig. 12) é essencial para os estudos funcionais de Hbs. Na oxiHb temos dois picos na região do visível (541 e 546 nm) e um pico na região de Soret (414 nm). A desoxiHb apresenta um pico na região do visível (555 nm) e um na região de Soret (428 nm). A metHb apresentou a protuberância característica por volta de 630 nm e, abaixo de 350 nm, os picos que vemos ocorreram devido à interferência causada por excesso de ferricianeto. Futuramente devemos caracterizar o espectro de cada isoforma, inclusive nas formas CNmetHb e COHb. A razão entre a concentração milimolar de Hb (após purificar por troca iônica) medida através do método de CNmetHb usando o coeficiente de extinção para a Hb humana e a concentração de proteínas totais obtida pelo método do BCA foi de 0,87.

A Fig. 13 exibe a CDO da solução contendo as três isoformas de Hb de *L. vastus* (realizamos esse experimento antes de conseguirmos separar as três isoformas). A análise da equação de Hill por regressão não linear pelo método de redução dos quadrados indica um valor de K_d de $4,5 \mu M$ e as Hbs exibem pouca cooperatividade ($n_H = 1,24$).

Figura 13 – Curva de dissociação de oxigênio: Hbs stripped.



Fonte: dados do autor.

Inset: curva de Hill. $K_d = 4,5 \mu M$; $n_H = 1,24$. Condições: 4 μM em heme; tampão tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, pH 8,5.

As Hbs *stripped* de *L. vastus* apresentaram uma elevada afinidade por O₂ e pequena cooperatividade, como podemos ver na Fig. 13. Trabalhos futuros podem buscar caracterizar as propriedades de ligação de O₂ de cada isoforma, correlacionando suas funções com a estrutura primária ou, se possível, com a estrutura terciária e quaternária da proteína. *Leptodactylus labyrinthicus*, uma rã de hábitos semiaquáticos, apresentou três componentes por troca iônica em matriz CM-celulose – resultado idêntico ao que obtivemos para *L. vastus* – cada um migrando de forma diferente por eletroforese em gel de amido. A análise dos componentes separadamente por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes mostrou que os componentes HbII e HbIII compartilham uma cadeia O peso molecular estimado por exclusão molecular foi de 64.450. Como a Hb foi eluída em apenas um pico, não ocorreu dissociação nem polimerização. Os componentes HbII e HbIII diferiram quanto ao efeito Bohr e à regulação por fosfatos orgânicos, que podem permitir ao animal se adaptar à escassez de O₂ durante o mergulho, ao mesmo tempo que não perde sua eficiência em transportar O₂ na superfície (LIMA *et al.*, 1983). Na rã *Leptodactylus fallax*, a capacidade de O₂ do sangue não estava relacionada com o peso corporal (GATTEN JR; BROOKS, 1969). Comparando algumas propriedades funcionais das Hbs de *Leptodactylus labyrinthicus* e *Pipa carvalhoi*, vemos que HbIII e HbIV *stripped* de *P. carvalhoi* e Hb II de *L. labyrinthicus* exibiram um pequeno efeito Bohr (-0,06 e -0,05, respectivamente). Na presença de 1 mM de ATP o efeito Bohr aumentou (-0,46 e -0,15, respectivamente) (LIMA *et al.*, 1985).

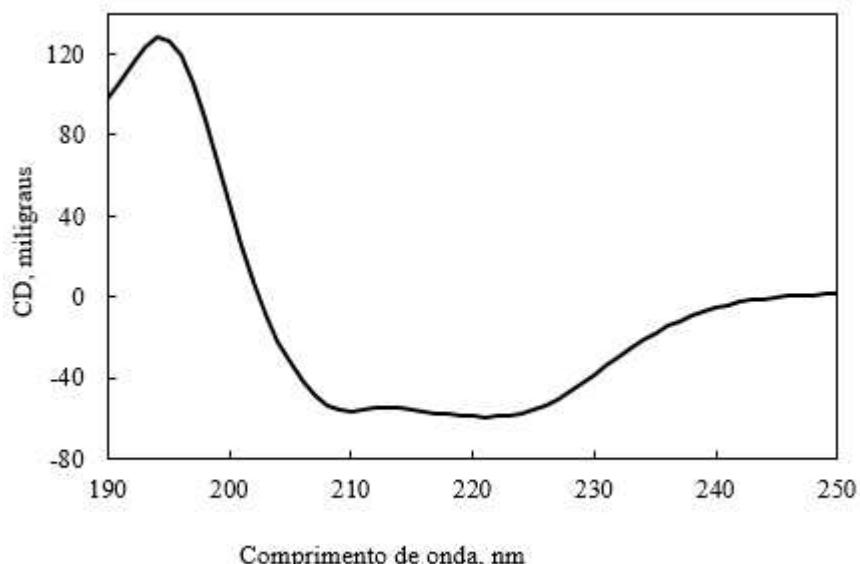
Ainda não investigamos o papel de efetores alostéricos nas isoformas da Hb de *L. vastus*, mas observamos que a CDO piloto, na qual utilizamos tampão contendo Cl⁻, a afinidade por O₂ foi quase três vezes menor (os trabalhos citados anteriormente não consideraram o efeito dos íons Cl⁻). A fim de verificar mais acuradamente o efeito desse efetor alostérico, recomendamos utilizar em experimentos futuros o tampão HEPES, sugerido por Weber (1992). Pois o tampão tris-HCl consegue sequestrar um pouco do Cl⁻ em solução, de forma que não sabemos precisamente a concentração desse íon disponível para modular a afinidade da Hb. Ainda não investigamos o efeito Bohr, ou a presença de efeito Root, ou o efeito da temperatura na afinidade por O₂. Experimentos futuros também podem lidar com o equilíbrio tetrâmero/dímero/monômero e o seu efeito na afinidade de cada isoforma. Caberia também investigar a cinética da Hb com O₂ e CO, assim como verificar se há formação de agregados de tetrâmeros ligada à desoxigenação, como relatado na literatura para *Lithobates catesbeianus*.

Futuras caracterizações se beneficiariam com o conhecimento do ambiente eritrocítico das Hbs de *L. vastus*. Saber a composição de fosfatos eritrocíticos seria crucial para

relacionar as propriedades funcionais das Hbs com o seu papel fisiológico. Outrossim, parâmetros hematológicos devem ser levados em conta, tais como hematócrito e concentração corpuscular média de Hb. Devemos futuramente buscar prospectar possíveis Hbs presentes no coração de *L. vastus* e, se possível, suas Ngbs e Cygb.

O espectro de CD no UV distante das frações da cromatografia de troca iônica cuja pureza verificamos por SDS-PAGE (realizamos esse experimento antes de separar as isoformas) indica o padrão de hélices α , no caso, os picos negativos em 208 e 222 nm, como era esperado para Hbs. Porém, a análise do espectro não ofereceu estimativas confiáveis do conteúdo de estruturas secundárias quando analisamos no *Dichroweb*.

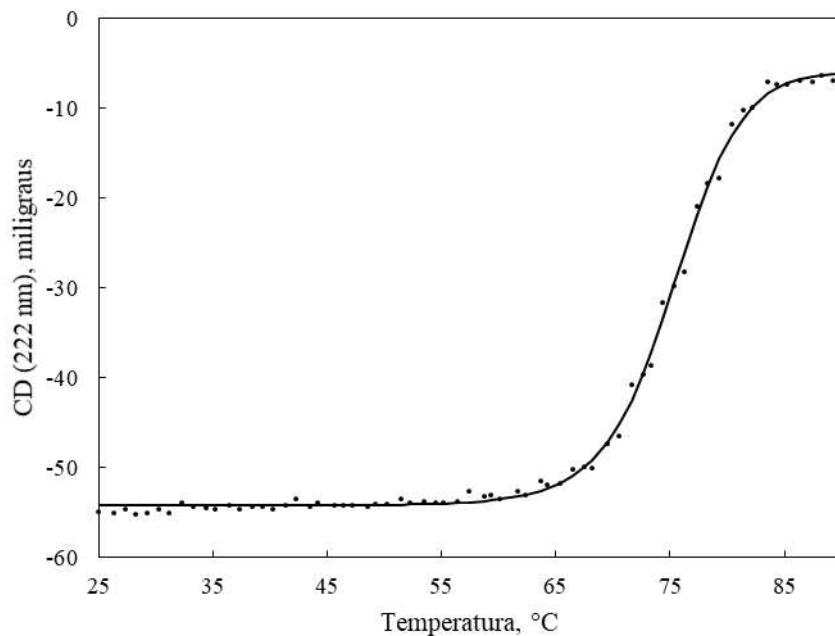
Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular no UV distante.



Fonte: dados do autor.

A Fig. 15 mostra a desnaturação térmica da proteína acompanhada pelo CD no pico negativo de 222 nm. A T_m foi de 75 °C. O CD em função da temperatura revelou que as Hbs de *L. vastus* exibem uma elevada termoestabilidade. Até o momento não encontramos na literatura outra Hb eritrocítica de vertebrado com essa termoestabilidade. A T_m da Hb de *I. iguana* foi de aproximadamente 60 °C (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Para mais valores de T_m a fim de comparações, ver Olsen (1994). É possível que a formação de pontes dissulfeto *in vitro* tenha afetado a termoestabilidade, estabilizando a proteína e dificultando seu desenovelamento. Uma sugestão para as investigações seguintes seria utilizar agentes redutores ao medir o CD em função da temperatura.

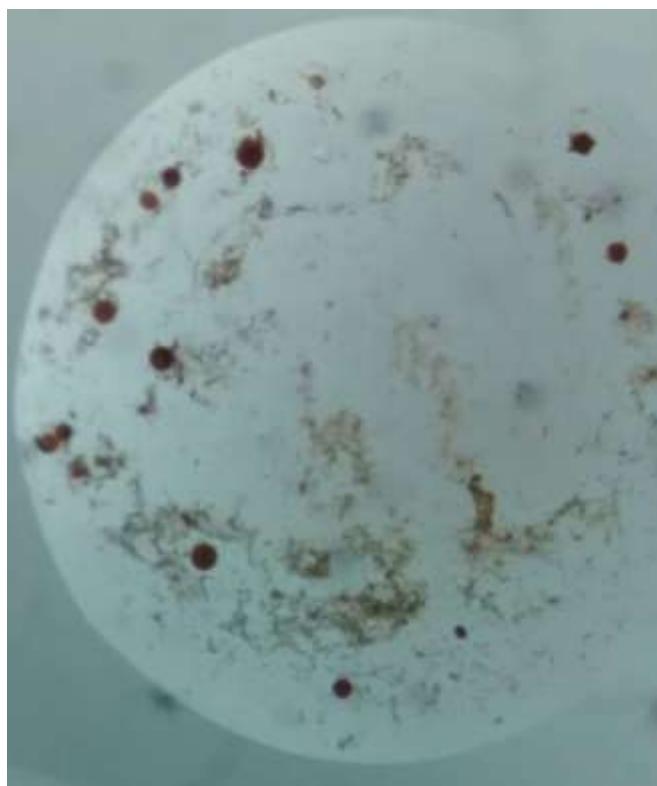
Figura 15 – Dicroísmo circular em função da temperatura.



Fonte: dados do autor.

Até o momento, não obtivemos sucesso em cristalizar as Hbs de *L. vastus*. Contudo, como podemos ver em uma das gotas do *Screen* de cristalização (Fig. 16), surgiram vários esferulites (pequenos círculos vermelhos), acompanhados de precipitados amorfos. Tais esferulites podem ser os primeiros sinais de que a proteína estava em condição parcialmente adequada para cristalizar. De fato, só obtivemos os esferulites quando aumentamos a concentração de proteína na gota. Porém, nesse momento não havíamos estabelecido um protocolo para quantificar a proteína. Devido à quantidade de material, seria inviável quantificar através do método de BCA (o método exige a mesma quantidade de proteína que usamos no *screen*). Uma alternativa seria estimar o conteúdo do grupo heme através dos coeficientes de extinção disponíveis na literatura, de forma que não perdemos amostra nesse processo. Quando fizemos os primeiros *screens* de cristalização utilizamos o *pool* de Hbs e não apenas uma isoforma isolada. Devemos utilizar apenas uma isoforma nos próximos *screens*. Outros dois problemas relacionados com a dificuldade de obter cristais são a polimerização por pontes dissulfeto e a agregação dos tetrâmeros ligada à desoxigenação. De fato, polietilenoglicol induz a desoxigenação de Hbs por um mecanismo ainda desconhecido (LIDDINGTON, 1994). Podemos resolver esses problemas utilizando agentes redutores, como DTT, e convertendo a proteína ao derivativo CNmetHb, respectivamente. Realizaremos *screens* em tais condições futuramente, uma vez que foram bem-sucedidas com as Hbs de *Crocodylus siamensis* (J ANDARUANG *et al.*, 2014).

Figura 16 – Gota da placa de cristalização.



Fonte: dados do autor.

Observe os esferulites (pequenos pontos vermelhos), que podem ser indícios de que as condições de cristalização estão perto das condições adequadas para a proteína cristalizar.

7 CONCLUSÃO

A rã pimenta nordestina *Leptodactylus vastus* apresenta três isoformas de Hb em seus eritrócitos, que podem ser separadas por cromatografia de troca iônica. As Hbs *stripped* possuem alta afinidade intrínseca por O₂ e baixa cooperatividade. A existência de pontes dissulfeto *in vitro* aparenta ser o fator responsável por sua elevada termoestabilidade ($T_m = 75^\circ\text{C}$). Portanto, temos que a presença de um sistema com múltiplas Hbs e a presença de grupos tióis reativos, assim como a facilidade de coleta de animais no Campus do Pici, fazem desse anfíbio um excelente modelo para futuras investigações estruturais de suas Hbs, que podem iluminar a base molecular de adaptações funcionais nas Hbs de vertebrados ectotérmicos, em especial os anfíbios. Existe uma extensa literatura sobre adaptações funcionais que não é acompanhada por estudos estruturais. Esclarecer a relação estereoquímica responsável pelas propriedades funcionais de Hbs de anfíbios é um capítulo ainda a ser escrito na vasta literatura sobre Hbs.

REFERÊNCIAS

ACADEMIA BRASILEIRA DE LETRAS. VOLP: Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. Disponível em: <<http://www.academia.org.br/nossa-lingua/busca-no-vocabulario>>. Acesso em: 19 out. 2018.

ADAIR, G. S. The hemoglobin system VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 529-545, 1925.

AGGARWAL, S. J.; RIGGS, A. The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana* I. Purification, amino acid composition, and oxygen equilibria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 9, p. 2372-2383, 1969.

ALAYASH, A. I. Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants?. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 545-549, 1999.

ALAYASH, A. I. Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 152-159, 2004.

ALI, R. *et al.* Analysis of oxygen affinity in aquatic amphibian; homology modelling of the major haemoglobin component HbA1 from the African clawed frog (*Xenopus laevis*, Anura). **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, v. 9, n. 5, p. 449-461, 2013.

ALLENDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 463-480, 2008.

AMICONI, G. *et al.* The haemoglobin of amphibia IX. Functional properties of haemoglobin from *Ambystoma tigrinum tigrinum* and Mexican axolotl. **International Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 5, p. 582-588, 1970.

ANDERSON, H. L.; BRODSKY, I. E.; MANGALMURTI, N. S. The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity. **The Journal of Immunology**, v. 201, p. 1343-1351, 2018.

ANTONINI, E. Hemoglobin and its reaction with ligands. **Science**, v. 158, n. 3807, p. 1417-1425, 1967.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 977-1042, 1970.

ARAKI, T.; KAJITA, A.; SHUKUYA, R. The effect of organic phosphates on the allosteric property of *Rana catesbeiana* hemoglobins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 5, p. 1179-1185, 1971.

ARNONE, A. Mechanism of action of hemoglobin. **Annual Review of Medicine**, v. 25, n. 1, p. 123-130, 1974.

- ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature*, v. 237, n. 5351, p. 146-149, 1972.
- ATHA, D. H. *et al.* Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. pH dependence of ligand binding and subunit dissociation equilibria and kinetics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 9, p. 3393-3400, 1979.
- ATKINS, P. W. O fascínio da água. In: BROCKMAN, J.; MATSON, K. (Org.). **As coisas são assim**: pequeno repertório científico do mundo que nos cerca. São Paulo: Companhia das Letras, 1997. p. 51-56.
- BADDILEY, J.; THAIN, E. M. Structure of coenzyme A. *Nature*, v. 171, p. 76, 1953.
- BAGLIONI, C.; SPARKS, C. E. A study of hemoglobin differentiation in *Rana catesbeiana*. **Developmental Biology**, v. 8, n. 3, p. 272-285, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, M. *et al.* Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of low oxygen-affinity haemoglobin from cat (*Felis silvestris catus*) in two different crystal forms. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 3, p. 313-316, 2009.
- BALDWIN, T. O.; RIGGS, A. The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana*: partial amino acid sequence of the β chain of the major adult component. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 19, p. 6110-6118, 1974.
- BANVILLE, D.; WILLIAMS, J. G. The pattern of expression of the *Xenopus laevis* tadpole α -globin genes and the amino acid sequence of the three major tadpole α -globin polypeptides. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 15, p. 5407-5421, 1985.
- BARCROFT, J.; HILL, A. V. The nature of oxyhaemoglobin, with a note on its molecular weight. **The Journal of Physiology**, v. 39, n. 6, p. 411-428, 1910.
- BÅRDGARD, A. *et al.* Oxygen binding and aggregation of hemoglobin from the common European frog, *Rana temporaria*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 2, p. 225-231, 1997.
- BARTLETT, G. R. Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology**, v. 55, n. 3, p. 211-214, 1976.
- BAYLOR, S. M.; PAPE, P. C. Measurement of myoglobin diffusivity in the myoplasm of frog skeletal muscle fibres. **The Journal of Physiology**, v. 406, n. 1, p. 247-275, 1988.
- BEMQUERER, M. P. *et al.* Partial characterization of a novel amphibian hemoglobin as a model for graduate student investigation on peptide chemistry, mass spectrometry, and atomic force microscopy. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, n. 2, p. 121-129, 2012.

BENBASSAT, J. The transition from tadpole to frog haemoglobin during natural amphibian metamorphosis: I. Protein synthesis by peripheral blood cells in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 15, n. 2, p. 347-357, 1974a.

BENBASSAT, J. The transition from tadpole to frog haemoglobin during natural amphibian metamorphosis: II. Immunofluorescence studies. **Journal of Cell Science**, v. 16, n. 1, p. 143-156, 1974b.

BENESCH, R.; BENESCH, R. E. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. **Nature**, v. 221, n. 5181, p. 618-622, 1969.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Hemoglobina: retrato de uma proteína em ação. In: _____. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 7, p. 187-209.

BERKNER, L. V.; MARSHALL, L. C. The history of oxygenic concentration in the earth's atmosphere. **Discussions of the Faraday Society**, v. 37, p. 122-141, 1964.

BERTINI, F.; RATHE, G. Electrophoretic analysis of the hemoglobin of various species of anurans. **Copeia**, p. 181-185, 1962.

BETTATTI, S.; VIAPPIANI, C.; MOZZARELLI, A. Hemoglobin, an "evergreen" red protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 9, p. 1317-1324, 2009.

BHOLAH, T. C. *et al.* Cytoglobin as a biomarker in cancer: potential perspective for diagnosis and management. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

BILSKA-WILKOSZ, A. *et al.* The role of hemoproteins: hemoglobin, myoglobin and neuroglobin in endogenous thiosulfate production processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1315, 2017.

BOHR, C.; HASSELBALCH, K.; KROGH, A. Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. **Skandinavisches Archiv für Physiologie**, v. 16, n. 2, p. 402-412, 1904.

BOISSEL, J. P.; WAJCMAN, H.; LABIE, D. Hemoglobins of an amphibia, the neotenous *Ambystoma mexicanum*: Complete amino-acid sequence of the α chain of the major component using automatic solid-phase Edman degradation. **European Journal of Biochemistry**, v. 103, n. 3, p. 613-621, 1980.

BONAVENTURA, C. *et al.* Anion modulation of the negative Bohr effect of haemoglobin from a primitive amphibian. **Nature**, v. 265, n. 5593, p. 474-476, 1977.

BONETTI, M. F.; WIENS, J. J. Evolution of climatic niche specialization: a phylogenetic analysis in amphibians. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1795, p. 20133229, 2014.

BOUTILIER, R. G. Respiratory gas tensions in the environment. In: **Vertebrate Gas Exchange**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1990. Cap. 1, p. 1-13.

BOUTILIER, R. G.; TOEWS, D. P. Respiratory properties of blood in a strictly aquatic and predominantly skin-breathing urodele, *Cryptobranchus alleganiensis*. **Respiration Physiology**, v. 46, n. 2, p. 161-176, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUNITZER, G. *et al.* The hemoglobins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 19, p. 1-71, 1964.

BRIDGES, C. R.; PELSTER, B.; SCHEID, P. Oxygen binding in blood of *Xenopus laevis* (Amphibia) and evidence against Root effect. **Respiration Physiology**, v. 61, n. 2, p. 125-136, 1985.

BRITTAINE, T. Cooperativity and allosteric regulation in non-mammalian vertebrate haemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 99, n. 4, p. 731-740, 1991.

BRITTAINE, T. *et al.* An investigation of the allosteric functioning of the haemoglobin of the cane toad, *Bufo marinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 991-995, 1982.

BRITTAINE, T. Root effect hemoglobins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 120-129, 2005.

BRITTAINE, T. The root effect. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 3, p. 473-481, 1987.

BROUWER, M. Oxygen carriers as molecular models of allosteric behavior. *In: Blood and Tissue Oxygen Carriers*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. Cap. 1, p. 1-21.

BROYLES, R. H. Changes in the blood during amphibian metamorphosis. *In: GILBERT L. I.; FRIEDEN, E. Metamorphosis: a problem in developmental biology*, 2nd ed. Plenum Press: New York, 1981. Cap. 14, p. 461-490.

BROYLES, R. H.; FRIEDEN, E. Sites of haemoglobin synthesis in amphibian tadpoles. **Nature New Biology**, v. 241, n. 111, p. 207-209, 1973.

BRUNORI, M. *et al.* Is there a Root effect in *Xenopus* hemoglobin?. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 161-166, 1987.

BRUNORI, M. *et al.* Tadpole *Xenopus laevis* hemoglobin correlation between structure and functional properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 181, n. 2, p. 327-329, 1985.

BRUNORI, M. *et al.* The hemoglobin of amphibia—VII. Equilibria and kinetics of the reduction of frog hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 24, n. 2, p. 519-526, 1968.

BRUNORI, M. Variations on the theme: allosteric control in hemoglobin. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 2, p. 633-643, 2014.

BUNDY, H. F. Carbonic anhydrase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 1977.

BUNDY, H. F.; CHENG, B. Amphibian carbonic anhydrase: purification and partial characterization of the enzyme from erythrocytes of *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 2, p. 265-268, 1976.

BURGGREN, W.; MWALUKOMA, A. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Morphological responses of lungs, skin and gills. **Journal of Experimental Biology**, v. 105, n. 1, p. 191-203, 1983.

BURMESTER, T.; HANKELN, T. Function and evolution of vertebrate globins. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 3, p. 501-514, 2014.

CABRAL, M. E. S. *et al.* Evaluations of the antimicrobial activities and chemical compositions of body fat from the amphibians *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro (1926) and *Leptodactylus vastus* Adolf Lutz (1930) in Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CAFFIN, J. P.; CHAUDET, J. P.; ACHER, R. Les hemoglobines des amphibiens: separation et caractérisation préliminaire des chaînes d'une hemoglobine du crapaud *Bufo bufo*. **FEBS Letters**, v. 5, n. 3, p. 196-198, 1969.

CAI, C.; CHEN, J. Direct electron transfer and bioelectrocatalysis of hemoglobin at a carbon nanotube electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 325, n. 2, p. 285-292, 2004.

CARDELLINI, P.; SALA, M. Developmental time of the hemoglobin transition in the anuran *Bombina orientalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 259-262, 1983.

CARDELLINI, P.; SALA, M. Hemoglobin transition in the anuran *Pelodytes punctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology**, v. 86, n. 1, p. 85-89, 1987.

CARDELLINI, P.; SALA, M. Hemoglobin transition in the toad *Bufo viridis* Laurenti during development. **Italian Journal of Zoology**, v. 46, n. 1-2, p. 51-56, 1979a.

CARDELLINI, P.; SALA, M. Metamorphic variations in the hemoglobins of *Bombina variegata* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 113-116, 1979b.

CARDELLINI, P.; SALA, M. Metamorphic variations in the hemoglobins of *Hyla arborea* L. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 21-24, 1978.

- CASCON, P.; BRITO, L. B. M.; ROBERTO, I. J. Anfibios. In: BOTERO, J. I. S. *et al.* **Anfíbios e peixes do Parque Nacional de Ubajara e entorno**. Fortaleza: Expressão Gráfica, 2014. Cap. 3, p. 31-76.
- CASTRO, D. P. *et al.* Composition and diversity of anurans from rock outcrops in the Caatinga Biome, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 11, p. 189-195, 2018.
- CASTRO, D. P. *et al.* Defensive behavior in *Leptodactylus vastus* A. LUTZ, 1930, in northeastern Brazil. **Herpetozoa**, v. 29, p. 214-218, 2017.
- CHANG, T. M. S. Nanobiotechnology for hemoglobin-based blood substitutes. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 2, p. 373-382, 2009.
- CHAUVET, J. P.; ACHER, R. Isolation of a frog hemoglobin (*Rana esculenta*): purification, amino acid composition, and terminal sequences of the α and β chains. **International Journal of Protein Research**, v. 3, n. 1-4, p. 261-269, 1971.
- CHAUVET, J. P.; ACHER, R. Phylogeny of hemoglobins. β chain of frog (*Rana esculenta*) hemoglobin. **Biochemistry**, v. 11, n. 5, p. 916-927, 1972.
- CHAUVET, J. P.; ACHER, R. The β -chain of frog hemoglobin (*Rana esculenta*): The complete amino acid sequence. **FEBS Letters**, v. 10, n. 3, p. 136-138, 1970.
- CHEN, Q. *et al.* Liganded hemoglobin structural perturbations by the allosteric effector L35. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 3, p. 2057-2067, 2005.
- CHEN, J.-Y.; SCERBO, M.; KRAMER, G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. **Clinics**, v. 64, n. 8, p. 803-813, 2009.
- CHRISTENSEN, C. B. *et al.* In defence of comparative physiology: ideal models for early tetrapods do not exist. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 283, n. 1832, p. 20160716, 2016.
- CLACK, J. A. The emergence of early tetrapods. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 232, p. 167–189, 2006.
- CLEMENTI, M. E. *et al.* Oxygen transport in Amphibia: the functional properties of hemoglobins from *Bufo bufo* and *Bufo viridis*. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 786-790, 2007.
- COATES, M. L.; METCALFE, J. Evolution of blood oxygen transport in the newt, *Taricha*. **Respiration Physiology**, v. 11, n. 1, p. 94-103, 1970.
- COATES, M. Studies on the interaction of organic phosphates with haemoglobin in an amphibian (*Bufo marinus*), a reptile (*Trachydosaurus rugosus*) and man. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 367-378, 1975.
- CONANT, J. B. An electrochemical study of hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 57, p. 401-414, 1923.

CONDÒ, S. G. *et al.* Comparative studies of hemoglobins from newts (*Triturus cristatus*, *Triturus vulgaris*, *Triturus alpestris*): a kinetic approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 74, n. 3, p. 545-548, 1983.

CONDÒ, S. G. *et al.* Functional properties of hemoglobins from *Triturus cristatus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 323-327, 1981.

CONDÒ, S. G. *et al.* The functional properties of amphibian hemoglobin: the case of *Salamander salamander* and *Hydromantes genei*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 93, n. 2, p. 319-325, 1989.

COOPER, A. *et al.* Frog foams and natural protein surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 534, p. 120-129, 2017.

DAESCHLER, E. B.; SHUBIN, N. H.; JENKINS JR, F. A. A Devonian tetrapod-like fish and the evolution of the tetrapod body plan. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 757-763, 2006.

DARWIN, C. **On the origin of species**. 1st. ed. 1859. Disponível em: <<http://www.public-library.uk/pdfs/8/620.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2018.

DAWKINS, R. **A escalada do monte improvável**. São Paulo: Companhia das Letras, 1998.

DAWKINS, R. **A grande história da evolução**: na trilha dos nossos ancestrais. São Paulo: Companhia das Letras, 2009a.

DAWKINS, R. **Ciência na alma**: escritos de um racionalista fervoroso. São Paulo: Companhia das Letras, 2018.

DAWKINS, R. **Desvendando o arco-íris**: ciência, ilusão e encantamento. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.

DAWKINS, R. **O capelão do diabo**: ensaios escolhidos. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

DAWKINS, R. **O gene egoísta**. 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2007.

DAWKINS, R. **O maior espetáculo da Terra**: as evidências da evolução. São Paulo: Companhia das Letras, 2009b.

DAWKINS, R. **O relojoeiro cego**: a teoria da evolução contra o desígnio divino. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.

DAWKINS, R. **River out of Eden**: a darwinian view of life. London: Phoenix, 1996.

DAWKINS, R. **The extended phenotype**: the long reach of the gene. New York: Oxford University Press, 2016.

DE BACKER, J. *et al.* The role of cytoglobin in the plasma-treatment of melanoma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 9, p. 14, 2018.

DE WITT, W.; INGRAM, V. M. Acetylated peptide chains in bullfrog hemoglobins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 236-241, 1967.

DENNETT, D. C. **Darwin's dangerous idea**: evolution and the meanings of life. New York: Simon & Schuster Paperbacks, 1995.

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

DI IORIO, E. E. [4] Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 57-72, 1981.

DOBZHANSKY, T. Biology, molecular and organismic. **American Zoologist**, p. 443-452, 1964.

DORN, A. R.; BROYLES, R. H. Erythrocyte differentiation during the metamorphic hemoglobin switch of *Rana catesbeiana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 18, p. 5592-5596, 1982.

DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. G. B.; RENNER, M. F. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. **Ciência em Movimento**, v. 12, n. 24, p. 103-113, 2010.

DOVE, A. Illuminating applications for transgenic frogs. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 9-10, 2000.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 719-733, 1932.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 51-65, 1935.

DUTTA, S.; GOODSELL, D. Hemoglobin. **PDB-101 – Molecule of the Month**, 2003. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/41>>. Acesso em: 7 nov. 2018.

EATON, W. A. *et al.* Evolution of allosteric models for hemoglobin. **IUBMB Life**, v. 59, n. 8-9, p. 586-599, 2007.

EATON, W. A. *et al.* Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 6, n. 4, p. 351-358, 1999.

EDSALL, J. T. Blood and hemoglobin: the evolution of knowledge of functional adaptation in a biochemical system. **Journal of the History of Biology**, v. 5, n. 2, p. 205-257, 1972.

EIGEN, M. O que restará da biologia do século XX? In: MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. J. (Org.). "O que é vida?" 50 anos depois: especulações sobre o futuro da biologia. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1997. Cap. 2, p. 13-33.

ELLI, R. et al. The hemoglobin of amphibia—X. Sedimentation behaviour of frog, triton and axolotl hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 36, n. 1, p. 163-171, 1970.

ENGEL, P. C. A hundred years of the Hill equation. **Biochemical Journal Classic**, v. 1, p. 40-43, 2013.

FAGO, A. Functional roles of globin proteins in hypoxia-tolerant ectothermic vertebrates. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 4, p. 926-934, 2017.

FARMER, M. The transition from water to air breathing: effects of CO₂ on hemoglobin function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 62, p. 109-114, 1979.

FERREIRA, A. S.; DANTAS, M. A. T.; DONATO, C. R. Ocorrência de *Leptodactylus vastus* Lutz, 1930 (AMPHIBIA-ANURA: LEPTODACTYLIDAE) na caverna Toca da Raposa, Simão Dias, Sergipe. In: **Proceedings of the 30 Congresso Brasileiro de Espeleologia, Minas Gerais**. 2009.

FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, v. 22, p. 10-16, 2005.

FRAUENFELDER, H. Myoglobin as an example of protein complexity. **Chemical Physics**, v. 375, n. 2-3, p. 612-615, 2010.

FREITAS, T. A. K. et al. Ancestral hemoglobins in Archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 17, p. 6675-6680, 2004.

FREY, A. D.; KALLIO, P. T. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 525-545, 2003.

FRIEDEN, E. Biochemical adaptation and anuran metamorphosis. **American Zoologist**, p. 115-149, 1961.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. **American Museum of Natural History, New York, USA**, 2018. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

FUCHS, C.; BURMESTER, T.; HANKELN, T. The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, n. 3-4, p. 296-306, 2006.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992.

- GAHLENBECK, H.; BARTELS, H. Blood gas transport properties in gill and lung forms of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). **Respiration Physiology**, v. 9, n. 2, p. 175-182, 1970.
- GARLICK, R. L. *et al.* A fetal-maternal shift in the oxygen equilibrium of hemoglobin from the viviparous caecilian, *Typhlonectes compressicauda*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 62, n. 1, p. 239-244, 1979.
- GARMSHAUSEN, J.; KLOAS, W.; HOFFMANN, F. 17 α -ethinylestradiol can disrupt hemoglobin catabolism in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 171, p. 34-40, 2015.
- GATTEN JR, R. E.; BROOKS, G. R. Blood physiology of a tropical frog, *Leptodactylus fallax*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 30, n. 6, p. 1019-1028, 1969.
- GATZ, R. N.; CRAWFORD JR, E. C.; PIIPER, J. Respiratory properties of the blood of a lungless and gill-less salamander, *Desmognathus fuscus*. **Respiration Physiology**, v. 20, n. 1, p. 33-41, 1974.
- GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 13-42, 2018.
- GERACI, G.; PARKHURST, L. J. [17] Circular dichroism spectra of hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 262-275, 1981.
- GEUENS, E. *et al.* A globin in the nucleus!. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.
- GHOSH, A. *et al.* Hsp90 chaperones hemoglobin maturation in erythroid and nonerythroid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 6, p. E1117-E1126, 2018.
- GIARDINA, B.; AMICONI, G. [23] Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobins by conventional spectrophotometric procedures. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 417-427, 1981.
- GIARDINA, B.; MOSCA, D.; DE ROSA, M. C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, n. 3, p. 229-244, 2004.
- GILL, S. J. [24] Measurement of oxygen binding by means of a thin-layer optical cell. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 427-438, 1981.
- GILLES-GONZALEZ, M. A. *et al.* Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. **Methods in Enzymology**, v. 437, p. 173-189, 2008.
- GILLESPIE, J. H.; CRENSHAW, J. W. Hemoglobin variation in *Rana pipiens* (Amphibia: Anura). **Copeia**, v. 1966, n. 4, p. 889-893, 1966.
- GONÇALVES-MAIA, R. **Dos raios X à estrutura biomolecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2013.

GOODSELL, D. Globin evolution. **PDB-101 – Molecule of the Month**, 2017. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/206>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

GOODSELL, D. Myoglobin. **PDB-101 – Molecule of the Month**, 2000. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/1>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

GOODSELL, D. PDB pioneers. **PDB-101 – Molecule of the Month**, 2011. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/142>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

GOULD, S. J. **Darwin e os grandes enigmas da vida**. 2. ed. São Paulo: Martins Fontes, 1999.

GOULD, S. J. **O milênio em questão**: um guia racionalista para uma contagem precisamente arbitrária. São Paulo: Companhia das Letras, 1999.

GOULD, S. J.; VRBA, E. S. Exaptation—a missing term in the science of form. **Paleobiology**, v. 8, n. 1, p. 4-15, 1982.

GRASSO, J. A.; CASALE, G. P.; CHROMEY, N. C. Multiple hemoglobins in *Triturus cristatus*: their degradation by sulphydryl compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 93-101, 1979.

GRATZER, W. B.; ALLISON, A. C. Multiple haemoglobins. **Biological Reviews**, v. 35, n. 4, p. 459-503, 1960.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527-2535, 2006b.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006a.

GÜL, Ç. *et al.* Changes in the blood composition of some anurans. **Acta Herpetologica**, v. 6, n. 2, p. 137-147, 2011.

HALL, F. G. Hemoglobin functions in the blood of *Bufo marinus*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 68, n. 1, p. 69-73, 1966.

HAMADA, K. *et al.* Biochemical metamorphosis of hemoglobin in *Rana catesbeiana*: I. Purification procedures and properties of hemoglobins from bullfrog and tadpole erythrocytes. **The Journal of Biochemistry**, v. 55, n. 6, p. 636-642, 1964.

HAMADA, K.; SHUKUYA, R. Biochemical metamorphosis of hemoglobin in *Rana catesbeiana*: II. Further studies on the structure and properties of tadpole and frog hemoglobins. **The Journal of Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 397-403, 1966.

HANKELN, T. *et al.* Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 110-119, 2005.

HATTINGH, J.; BARTELS, H. The oxygen affinity of axolotl blood and haemoglobin before and after metamorphosis. **Respiration Physiology**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 1973.

HAWKING, S. **O universo numa casca de noz**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2009.

HAZARD, E. S.; HUTCHISON, V. H. Distribution of acid-soluble phosphates in the erythrocytes of selected species of amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 73, n. 1, p. 111-124, 1982.

HAZARD, E. S.; HUTCHISON, V. H. Ontogenetic changes in erythrocytic organic phosphates in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 206, n. 1, p. 109-117, 1978.

HEATH, A. G. Respiratory responses to hypoxia by *Ambystoma tigrinum* larvae, paedomorphs, and metamorphosed adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 55, n. 1, p. 45-49, 1976.

HELLMANN, N.; WEBER, R. E.; DECKER, H. Linked analysis of large cooperative, allosteric systems: the case of the giant HBL hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 436, p. 463-485, (2008).

HELMS, C.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 464-472, 2013.

HENIG, R. M. **O monge no jardim: o gênio esquecido e redescoberto de Gregor Mendel, o pai da genética**. Rio de Janeiro: Rocco, 2001.

HERNER, A. E.; FRIEDEN, E. Biochemical changes during anuran metamorphosis: VIII. Changes in the nature of red cell proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 1, p. 25-35, 1961.

HICKMAN, C. P. *et al.* Early tetrapods and modern amphibians. In: _____. **Integrated principles of zoology**. 14th. ed. New York: McGraw-Hill, 2008. Cap. 25, p. 543-562.

HILL, A. V. The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I. **Biochemical Journal**, v. 7, n. 5, p. 471-480, 1913.

HILL, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **The Journal of Physiology**, v. 40, p. 4-7, 1910.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HISSA, D. C. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the surfactant protein Lv-ranaspumin from the frog *Leptodactylus vastus*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. 3, p. 321-323, 2012.

HISSA, D. C. *et al.* Frog foam nest protein diversity and synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425-433, 2016.

- HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707-2711, 2008.
- HISSA, D. C. *et al.* Unique crystal structure of a novel surfactant protein from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 393-398, 2014.
- HOFFMAN, M.; TAYLOR, B. E.; HARRIS, M. B. Evolution of lung breathing from a lungless primitive vertebrate. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 224, p. 11-16, 2016.
- HOFRICHTER *et al.* [18] Ligand binding and conformational changes measured by time-resolved absorption spectroscopy. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 387-415, 1994.
- HOPPE, F. Ueber das verhalten des blutfarbstoffes im spectrum des sonnenlichtes. **Virchows Archiv**, v. 23, n. 3-4, p. 446-449, 1862.
- HOSBACH, H. A.; WYLER, T.; WEBER, R. The *Xenopus laevis* globin gene family: chromosomal arrangement and gene structure. **Cell**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1983.
- HÜNEFELD, F. L. **Der Chemismus in der thierischen Organisation: Physiologisch-chemische Untersuchungen der materiellen Veränderungen, oder des Bildungslebens im thierischen Organismus; insbesondere des Blutbildungsprocesses, der Natur der Blutkörperchen und ihrer Kernchen**. Ein Beitrag zur Physiologie und Heilmittellehre. Brockhaus, 1840.
- HUTCHISON, V. H.; HAINES, H. B.; ENGBRETSON, G. Aquatic life at high altitude: respiratory adaptations in the Lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. **Respiration Physiology**, v. 27, n. 1, p. 115-129, 1976.
- IMAI, K. [25] Measurement of accurate oxygen equilibrium curves by an automatic oxygenation apparatus. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 438-449, 1981a.
- IMAI, K. [26] Adair fitting to oxygen equilibrium curves of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 559-576, 1994.
- IMAI, K. [27] Analysis of ligand binding equilibria. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 470-486, 1981b.
- INAYAT, Mohammed S. *et al.* Oxygen carriers: a selected review. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 34, n. 1, p. 25-32, 2006.
- INGERMANN, R. L. Structure-function relationships of the ectothermic vertebrate hemoglobins. In: **Blood and Tissue Oxygen Carriers**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. Cap. 14, p. 411-431.
- INGERMANN, R. L. Vertebrate hemoglobins. **Comprehensive Physiology**, p. 357-408, 2010.

- ITANO, H. A.; FOGARTY JR, W. M.; ALFORD, W. C. The molar extinction coefficient of cyanmethemoglobin as determined by carbon analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 2, p. 135-140, 1971.
- JANDARUANG, J. *et al.* Purification, characterization, and crystallization of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. **The Protein Journal**, v. 33, n. 4, p. 377-385, 2014.
- JENSEN, F. B.; FAGO, A.; WEBER, R. E. Hemoglobin structure and function. **Fish Physiology**, v. 17, p. 1-40, 1998.
- JIA, Y.; DUAN, L.; LI, J. Hemoglobin-based nanoarchitectonic assemblies as oxygen carriers. **Advanced Materials**, v. 28, n. 6, p. 1312-1318, 2016.
- JOHANSEN, K. *et al.* Temperature insensitive O₂ in blood of the tree frog *Chiromantis petersi*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 136, n. 1, p. 71-76, 1980.
- JOKUMSEN, A.; WEBER, R. E. Haemoglobin-oxygen binding properties in the blood of *Xenopus laevis*, with special reference to the influences of aestivation and of temperature and salinity acclimation. **Journal of Experimental Biology**, v. 86, n. 1, p. 19-37, 1980.
- JONES, D. R. Anaerobiosis and the oxygen debt in an anuran amphibian, *Rana esculenta* (L.). **Journal of Comparative Physiology**, v. 77, n. 4, p. 356-382, 1972.
- JUST, J. J.; GATZ, R. N.; CRAWFORD JR, E. C. Changes in respiratory functions during metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Respiration Physiology**, v. 17, n. 3, p. 276-282, 1973.
- JUST, J. J.; SCHWAGER, J.; WEBER, R. Hemoglobin transition in relation to metamorphosis in normal and isogenic *Xenopus*. **Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 183, n. 4, p. 307-323, 1977.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.
- KEMMER, G.; KELLER, S. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 267-281, 2010.
- KENDREW, J. C. *et al.* A partial determination by X-ray methods, and its correlation with chemical data. **Nature**, v. 190, n. 4777, p. 666-670, 1961.
- KENDREW, J. C. *et al.* A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**, v. 181, p. 662-666, 1958.
- KENDREW, J. C. *et al.* Structure of myoglobin. **Nature**, v. 185, n. 422, p. 427-1960, 1960.
- KHOSHOUEI, M. *et al.* Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. **Nature Communications**, v. 8, n. 16099, p. 1-6, 2017a.

- KHOSHOUEI, M. *et al.* Revisiting the structure of hemoglobin and myoglobin with cryo-electron microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 17, p. 2611-2618, 2017b.
- KODER, R. L. *et al.* Design and engineering of an O₂ transport protein. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 305-309, 2009.
- KOUSSOULAKOS, S.; KAPAROS, G.; STATHAKOS, D. Multiple hemoglobins in *Triturus cristatus*: their study by analytical electrofocusing. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 2, p. 475-481, 1986.
- KRAUSS, L. M. **Um universo que veio do nada**: porque há criação sem Criador. São Paulo: Paz e Terra, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAHR, D. J. G. A evolução da vida em um planeta em constante mudança. In: GALANTE et al. (Org.). Astrobiologia: uma ciência emergente. São Paulo: Tikinet Edição (IAG/USP), 2016. Cap. 7, p. 137-153. Disponível em: <<http://www.iag.usp.br/astronomia/sites/default/files/astrobiologia.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2018.
- LANKESTER, E. R. I. A contribution to the knowledge of hæmoglobin. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 21, p. 70-81, 1873.
- LAPPENAS, G. N.; COLACINO, J. M.; BONAVENTURA, J. [26] Thin-layer methods for determination of oxygen binding curves of hemoglobin solutions and blood. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 449-470, 1981.
- LAURIN, M.; GIRONDOT, M.; DE RICQLÈS, A. Early tetrapod evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 3, p. 118-123, 2000.
- LENFANT, C.; JOHANSEN, K. Respiratory adaptations in selected amphibians. **Respiration Physiology**, v. 2, n. 3, p. 247-260, 1967.
- LIDDINGTON, R. [2] X-ray crystallography of partially liganded structures. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 15-26, 1994.
- LIMA, A. A. B. *et al.* Allosteric effect of protons and adenosine triphosphate on hemoglobins from aquatic amphibia. **Journal of Comparative Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 155, n. 3, p. 353-355, 1985.
- LIMA, A. A. B. *et al.* Separation and functional characterization of *Leptodactylus labyrinthicus* hemoglobin components. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 76, n. 1, p. 123-125, 1983.
- LIMA, A. A. B. **Propriedades funcionais de hemoglobina de Leptodactylus labyrinthicus**. 1979. 82 f. Tese - Instituto de Biologia da Universidade Federal de Campinas, 1979.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. **Principles of bioinorganic chemistry**. United States of America: University Science Books, 1994.

LUEANGSAKULTHAI, J. *et al.* Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) hemoglobin hydrolysate. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2017.

LUTZ, A. Segunda memoria sobre especies brasileiras do genero *Leptodactylus*, incluindo outras aliadas Second paper on brasilian and some closely related species of the genus *Leptodactylus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 23, n. 1, p. 1-34, 1930.

LYKKEBOE, G.; JOHANSEN, K. An O₂-Hb ‘paradox’ in frog blood?: (n-values exceeding 4.0). **Respiration Physiology**, v. 35, n. 2, p. 119-127, 1978.

MACLEAN, N.; JURD, R. D. Electrophoretic analysis of the haemoglobins of *Ambystoma mexicanum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 751-755, 1971a.

MACLEAN, N.; JURD, R. D. The haemoglobins of healthy and anaemic *Xenopus laevis*. **Journal of Cell Science**, v. 9, n. 2, p. 509-528, 1971b.

MACLEAN, N.; TURNER, S. Adult haemoglobin in developmentally retarded tadpoles of *Xenopus laevis*. **Development**, v. 35, n. 2, p. 261-266, 1976.

MAEDA, N.; FITCH, W. M. Isolation and amino acid sequence of a monomeric hemoglobin in heart muscle of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 6, p. 2806-2815, 1982.

MAGINNIS, L. A.; BOOTH, D. T. Hemoglobin function in a skin-breathing aquatic salamander, *Desmognathus quadramaculatus*. **Respiration Physiology**, v. 99, n. 2, p. 233-240, 1995.

MAGINNIS, L. A.; SONG, Y. K.; REEVES, R. B. Oxygen equilibria of ectotherm blood containing multiple hemoglobins. **Respiration Physiology**, v. 42, n. 3, p. 329-343, 1980.

MAIRBÄURL, H.; WEBER, R. E. Oxygen transport by hemoglobin. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1463-1489, 2012.

MALTE, H.; LYKKEBOE, G. The Bohr/Haldane effect: a model based uncovering of the full extent of its impact on O₂ delivery to and CO₂ removal from tissues. **Journal of Applied Physiology**, (Bethesda, Md.: 1985), 2018.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: I. Site of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 2, p. 372-379, 1971a.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins of *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 2, p. 380-389, 1971b.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: III. Immunochemical detection of tadpole and frog hemoglobins (*Rana catesbeiana*) in single erythrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 2, p. 390-404, 1971c.

MANNING, L. R. *et al.* Gel filtration of dilute human embryonic hemoglobins reveals basis for their increased oxygen binding. **Analytical Biochemistry**, v. 519, p. 38-41, 2017.

MANWELL, C. Metamorphosis and gene action—I. Electrophoresis of dehydrogenases, esterases, phosphatases, hemoglobins and other soluble proteins of tadpole and adult bullfrogs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 17, n. 3, p. 805-823, 1966.

MAPLES, P. B.; PALMER, J. C.; BROYLES, R. H. Determination of hemoglobin expression patterns in erythroid cells of *Rana catesbeiana* tadpoles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 91, n. 4, p. 755-762, 1988.

MARUYAMA, T.; WATT, K. W.; RIGGS, A. Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*: amino acid sequence of the α chain of a major component. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 8, p. 3285-3293, 1980.

MAYR, E. **O desenvolvimento do pensamento biológico**: diversidade, evolução e herança. Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília, 1998.

MAYR, E. **O que é a evolução**. Rio de Janeiro: Rocco, 2009.

MCCUTCHEON, F. H. Hemoglobin function during the life history of the bullfrog. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 8, n. 1, p. 63-81, 1936.

MCCUTCHEON, F. H. The oxygen affinity of haemoglobin in splenectomized bullfrogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 15, n. 3, p. 431-436, 1938.

MCCUTCHEON, F. H.; HALL, F. G. Hemoglobin in the amphibia. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 9, n. 2, p. 191-197, 1937.

MEIRELLES, N. C. *et al.* Some larval properties of *Pipa carvalhoi* adult hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 62, n. 4, p. 859-862, 1979.

MENG, F.; ALAYASH, A. I. Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. **Analytical Biochemistry**, v. 251, p. 11-19, 2017.

MEYER, A. Molecular evidence on the origin of tetrapods and the relationships of the coelacanth. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 3, p. 111-116, 1995.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 88-118, 1965.

MOREIRA, L. M. *et al.* Hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoproteico. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1-12, 2010.

- MORPURGO, G.; BATTAGLIA, P. A.; LEGGIO, T. Negative Bohr effect in newt haemolysates and its regulation. *Nature*, v. 225, n. 5227, p. 76-77, 1970.
- MOSS, B.; INGRAM, V. M. Hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis: I. Chemical studies on the hemoglobins from the larval and adult stages of *Rana catesbeiana*. *Journal of Molecular Biology*, v. 32, n. 3, p. 481-492, 1968a.
- MOSS, B.; INGRAM, V. M. Hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis: II. Synthesis of adult hemoglobin following thyroxine administration. *Journal of Molecular Biology*, v. 32, n. 3, p. 493-502, 1968b.
- MOSS, B.; INGRAM, V. M. The repression and induction by thyroxin of hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 54, n. 3, p. 967-974, 1965.
- MUIR, A. V. Comparison of hemoglobins from the genus *Xenopus* (Amphibia Salientia). *Journal of Experimental Zoology*, v. 218, n. 3, p. 327-333, 1981.
- MUIRHEAD, H.; PERUTZ, M. F. Structure of haemoglobin: a three-dimensional fourier synthesis of reduced human haemoglobin at 5.5 Å resolution. *Nature*, v. 199, n. 4894, p. 633-638, 1963.
- MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. J. "O que é vida?" Uma introdução sobre os próximos 50 anos. In: _____. "O que é vida?" 50 anos depois: especulações sobre o futuro da biologia. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1997. Cap. 1, p. 9-12.
- NAGAI, M. *et al.* Circular dichroism of hemoglobin and myoglobin. *Chirality*, v. 26, n. 9, p. 438-442, 2014.
- NAGAKUBO, T. *et al.* Hemoglobin catalyzes CoA degradation and thiol addition to flavonoids. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1282, 2018.
- NAGATOMO, S. *et al.* An origin of cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin: Different roles of the α and β subunits in the $\alpha_2\beta_2$ tetramer. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0135080, 2015.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OLSEN, K. W. [33] Thermal denaturation procedures for hemoglobin. *Methods in Enzymology*, v. 231, p. 514-524, 1994.
- OLSON, J. S. [38] Stopped-flow, rapid mixing measurements of ligand binding to hemoglobin and red cells. *Methods in Enzymology*, v. 76, p. 631-651, 1981.
- PERUTZ, M. F. Cause of the Root effect in fish haemoglobins. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 3, n. 3, p. 211, 1996.
- PERUTZ, M. F. *et al.* Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Accounts of Chemical Research*, v. 20, n. 9, p. 309-321, 1987.

- PERUTZ, M. F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5- \AA . resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 416-422, 1960.
- PERUTZ, M. F. *et al.* The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, n. 1, p. 1-34, 1998.
- PERUTZ, M. F. Hemoglobin structure and respiratory transport. **Scientific American**, v. 239, n. 6, p. 92-125, 1978.
- PERUTZ, M. F. Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 42-44, 1989.
- PERUTZ, M. F. Preparation of haemoglobin crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 2, n. 1, p. 54-56, 1968.
- PERUTZ, M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 327-386, 1979.
- PERUTZ, M. F. Relation between structure and sequence of haemoglobin. **Nature**, v. 194, n. 4832, p. 914-917, 1962.
- PERUTZ, M. F. Species adaptation in a protein molecule. **Molecular Biology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 1-28, 1983.
- PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem-haem interaction and the problem of allostery. **Nature**, v. 228, n. 5273, p. 726, 1970.
- PERUTZ, M. F. X-ray analysis of hemoglobin. **Science**, v. 140, n. 3569, p. 863-869, 1963.
- PERUTZ, M. F.; BRUNORI, M. Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian haemoglobins. **Nature**, v. 299, n. 5882, p. 421-426, 1982.
- PERUTZ, M. F.; KENDREW, J. C.; WATSON, H. C. Structure and function of haemoglobin: II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 3, p. 669-678, 1965.
- PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T.-b; WILLIAMSON, D. The chloride effect in human haemoglobin: a new kind of allosteric mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, n. 4, p. 555-560, 1994.
- PESCE, A. *et al.* Neuroglobin and cytoglobin: fresh blood for the vertebrate globin family. **EMBO Reports**, v. 3, n. 12, p. 1146-1151, 2002.
- PHILIPSEN, S.; HARDISON, R. C. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 2-12, 2018.

- PINDER, A.; BURGGREN, W. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). II. Changes in respiratory properties of whole blood. **Journal of Experimental Biology**, v. 105, n. 1, p. 205-213, 1983.
- PINHEIRO, L. G. P. *et al.* Hemosiderin. A new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 432-436, 2009.
- PINKER, S. **Como a mente funciona**. São Paulo: Companhia das Letras, 1998.
- POWERS, D. A.; HOBISH, M. K.; GREANEY, G. S. [34] Rapid-rate equilibrium analysis of the interactions between organic phosphates and hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 559-577, 1981.
- REISCHL, E. *et al.* Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 22-53, 2007.
- RIBEIRO, D. George Gabriel Stokes. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 4, p. 307, 2014. Disponível em: <<https://rce.casadasciencias.org/rceapp/art/2014/307/>>. Acesso em: 19 out. 2018.
- RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- RIGGS, A. [1] Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 5-29, 1981.
- RIGGS, A. F. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1073-1084, 1998.
- RIGGS, A. F. The Bohr effect. **Annual Review of Physiology**, v. 50, n. 1, p. 181-204, 1988.
- RIGGS, A. F.; GORR, T. A. A globin in every cell?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2469-2470, 2006.
- RIGGS, A. The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog. **The Journal of General Physiology**, v. 35, n. 1, p. 23-40, 1951.
- RIGGS, A.; SULLIVAN, B.; AGEE, J. R. Polymerization of frog and turtle hemoglobins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 51, n. 6, p. 1127-1134, 1964.
- ROELANTS, K. *et al.* Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 887-892, 2007.
- RONDA, L. *et al.* Oxygen binding to heme proteins in solution, encapsulated in silica gels, and in the crystalline state. **Methods in Enzymology**, v 437, p. 311-328, 2008.
- ROOT, R. W. The respiratory function of the blood of marine fishes. **The Biological Bulletin**, v. 61, n. 3, p. 427-456, 1931.

- ROSSI-FANELLI, A.; ANTONINI, E.; CAPUTO, A. Hemoglobin and myoglobin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 19, p. 73-222, 1964.
- ROYER, W. E. Structures of red blood cell hemoglobins. In: **Blood and Tissue Oxygen Carriers**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. cap. 4, p. 87-116.
- RUMMER, J. L. *et al.* Root effect hemoglobin may have evolved to enhance general tissue oxygen delivery. **Science**, v. 340, n. 6138, p. 1327-1329, 2013.
- RYAN, F. Nature's most transformative process may also be an unsung force for evolution, says Frank Ryan. **New Scientist**, v. 211, n. 2831, p. 56-59, 2011.
- SAGAN, C. **Cosmos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1984.
- SALVATI, A. M.; TENTORI, L.; VIVALDI, G. The extinction coefficient of human hemoglobincyanide. **Clinica Chimica Acta**, v. 11, n. 5, p. 477-479, 1965.
- SANTANA, D. O. *et al.* Predation of *Leptodactylus latrans* (Anura, *Leptodactylidae*) and *Hypsiboas albomarginatus* (Anura, *Hylidae*) by *Leptodactylus vastus* (Anura, *Leptodactylidae*) in north-eastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 5, p. 449-450, 2012.
- SATO-TOMITA, A.; SHIBAYAMA, N. Size and shape controlled crystallization of hemoglobin for advanced crystallography. **Crystals**, v. 7, n. 9, p. 282, 2017.
- SAUER, K. [1] Why Spectroscopy? Which Spectroscopy?. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 1-10, 1995.
- SAYERS, Z. *et al.* Application of advanced X-ray methods in life sciences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3671-3685, 2017.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**: adaptação e meio ambiente. 5. ed. São Paulo: Santos, 2013.
- SCHNEIDER, E. D.; KAY, J. J. Ordem a partir da desordem: a termodinâmica da complexidade biológica. In: MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. J. (Org.). **"O que é vida?" 50 anos depois**: especulações sobre o futuro da biologia. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1997. Cap. 12, p. 187-201.
- SCHRÖDINGER, E. **O que é vida?**: o aspecto físico da célula vida seguido de *Mente e Matéria e Fragmentos Autobiográficos*. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1997.
- SCOTT, G. R. Early insights into the evolution of respiratory and cardiovascular physiology in vertebrates. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2818-2820, 2015.
- SEGAL, J. **Globular protein molecules**: their structure and dynamic properties. Deutscher Verlag der Wissenschaften;[label: Oxford, New York, Pergamon Press], 1960.
- SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL JR, J. V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 815-820, 1967.

- SHISHIKURA, F.; TAKEUCHI, H.; NAGAI, T. Axolotl hemoglobin: cDNA-derived amino acid sequences of two α globins and a β globin from an adult *Ambystoma mexicanum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, n. 3, p. 258-268, 2005.
- SILVA, L. A. *et al.* Solubilidade e reatividade de gases. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 824-832, 2018.
- SMITH, D. J. *et al.* The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. The cDNA-derived amino acid sequences of the α chains of adult hemoglobins B and C: their roles in deoxygenation-induced aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26961-26971, 1993.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.
- SOUZA, S. **A goleada de Darwin**: sobre o debate criacionismo/darwinismo. Rio de Janeiro: Record, 2009.
- SPRINGER, E. K. **O₂ measurement guide**. Hamilton, 2009. Disponível em: <<https://craft-sensors.s3.amazonaws.com/File-Uploads/O2-Measurement-Guide.pdf?mtime=20180907130233>>. Acesso em 21 out. 2018.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.
- STADIE, W. C. A method for the determination of methaemoglobin in the blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 237-241, 1920.
- STINNER, J. N.; SHOEMAKER, V. H. Cutaneous gas exchange and low evaporative water loss in the frogs *Phylomedusa sauvagei* and *Chiromantis xerampelina*. **Journal of Comparative Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 157, p. 423-427, 1987.
- STOKES, G. G. On the reduction and oxidation of the colouring matter of the blood. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 13, p. 355-364, 1864.
- SUGITA, Y.; NAGAI, M.; YONEYAMA, Y. Circular dichroism of hemoglobin in relation to the structure surrounding the heme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 2, p. 383-388, 1971.
- SUNDARESAN, S. *et al.* Purification, crystallization and preliminary analysis of hemoglobin from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Protein & Peptide Letters**, v. 15, p. 318-319, 2008.
- SVEDBERG, T.; HEDENIUS, A. The sedimentation constants of the respiratory proteins. **The Biological Bulletin**, v. 66, n. 2, p. 191-223, 1934.
- TAKETA, F.; NICKERSON, M. A. Comparative studies on the hemoglobins of representative salamanders of the families *Cryptobranchidae*, *Proteidae* and *Hynobiidae*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 45, n. 3, p. 549-556, 1973a.

TAKETA, F.; NICKERSON, M. A. Hemoglobin of the aquatic salamander, *Cryptobranchus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 46, p. 583-591, 1973b.

TAM, L. T. *et al.* The hemoglobins of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Deoxygenation-linked association of tetrameric components B and C to form the trimer BC₂: sedimentation analysis and oxygen equilibria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26972-26977, 1993.

TAM, L. T.; GRAY, G. P.; RIGGS, A. F. The hemoglobins of the bullfrog *Rana catesbeiana*. The structure of the β chain of component C and the role of the α chain in the formation of intermolecular disulfide bonds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 18, p. 8290-8294, 1986.

TAM, L. T.; RIGGS, A. F. Oxygen binding and aggregation of bullfrog hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 4, p. 2610-2616, 1984.

TATTERSALL, G. J.; BURGGREN, W. W. *Xenopus* and the art of oxygen maintenance. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 4084-4087, 2017.

TAZAWA, H.; MOCHIZUKI, M.; PIIPER, J. Blood oxygen dissociation curve of the frogs *Rana catesbeiana* and *Rana brevipoda*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 129, n. 2, p. 111-114, 1979.

TEIXEIRA, C. S. *et al.* Structural aspects and physiological implications of the hemoglobin of green iguana (*Iguana iguana*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1275-1285, 2018.

TELES, D. A. *et al.* Helminths of *Leptodactylus vastus* (Anura: *Leptodactylidae*) in an area of Caatinga, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 7, p. 355-356, 2014.

TENTORI, L. *et al.* The hemoglobin of amphibia II. Characterization of the hemoglobin of *Rana esculenta* L. Pysicochemical properties and amino acid composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 108, p. 404-414, 1965.

TENTORI, L. *et al.* The hemoglobin of amphibia: V. The amino-terminal residues and the carboxyl-terminal sequences of the hemoglobin of *Rana esculenta* L. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 133, n. 1, p. 177-180, 1967.

TENTORI, L.; SALVATI, A. M. Hemoglobinometry in human blood. **Methods in Enzymology**, v. 76, p. 707-715, 1981.

TENTORI, L.; VIVALDI, G.; SALVATI, A. M. The extinction coefficient of human hemiglobincyanide as determined by nitrogen analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 14, n. 2, p. 276-277, 1966.

TOEWS, D. *et al.* Carbonic anhydrase in the amphibia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 59, n. 2, p. 211-213, 1978.

TOEWS, D.; MACINTYRE, D. Respiration and circulation in an apodan amphibian. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 4, p. 998-1004, 1978.

TOMPKINS, R. Genie control of axolotl metamorphosis. **American Zoologist**, v. 18, n. 2, p. 313-319, 1978.

TOOBY, J.; COSMIDES, L.; BARRETT, H. C. The second law of thermodynamics is the first law of psychology: evolutionary developmental psychology and the theory of tandem, coordinated inheritances: comment on lickliter and honeycutt (2003). **Psychological Bulletin**, v. 129, n. 6, p. 858-865, 2003.

TRADER, C. D.; FRIEDEN, E. Dimerization and other chemical changes in amphibian hemoglobins during metamorphosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 2, p. 357-366, 1966.

TRADER, C. D.; WORTHAM, J. S.; FRIEDEN, E. Hemoglobin: molecular changes during anuran metamorphosis. **Science**, v. 139, n. 3558, p. 918-919, 1963.

VAN AARDT, W. J.; WEBER, R. E. Respiration and hemoglobin function in the giant African bullfrog *Pyxicephalus adspersus* Tschudi (Anura: Pyxicephalidae) during rest, exercise and dormancy. **African Journal of Herpetology**, v. 59, n. 2, p. 173-190, 2010.

VAN ASSENDELFT, O. W.; ZIJLSTRA, W. G. Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures. **Analytical Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 43-48, 1975.

VAN KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 23, p. 199-257, 1983.

VANDEGRIFF, K. D.; SHRAGER, R. I. [22] Hemoglobin-oxygen equilibrium binding: Rapid-scanning spectrophotometry and singular value decomposition. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 460-485, 1994.

VERSHININ, V. L.; VERSHININA, S. D. Comparative analysis of hemoglobin content in four species of anurans from the Ural uplands. **Doklady Biological Sciences**, v. 450, p. 155-157, 2013.

VERWILGHEN, R. L. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1986) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 9, n. 1, p. 73-79, 1987.

VIEIRA, H. F. *et al.* Some functional and structural properties of *Bufo paracnemis* and *Pipa pipae* hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 73, n. 2, p. 197-200, 1982.

VIEIRA, W. L. S.; SANTANA, G. G.; VIEIRA, K. S. Description of the tadpole of *Leptodactylus vastus* (Anura: Leptodactylidae). **Zootaxa**, v. 1529, n. 1, p. 61-68, 2007.

VOET, D.; VOET, J. D. Hemoglobina: função proteica no microcosmo. In: _____. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 10, p. 323-358.

WATERMAN, M. R. [48] Spectral characterization of human hemoglobin and its derivatives. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 456-463, 1978.

WATSON, J. D.; BERRY, A. **DNA**: o segredo da vida. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

WATT, K. W.; MARUYAMA, T.; RIGGS, A. Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*: amino acid sequence of the β chain of a major component. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 8, p. 3294-3301, 1980.

WATT, K. W.; RIGGS, A. Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Structure and function of isolated components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 15, p. 5934-5944, 1975.

WEBER, R. E. Enthalpic consequences of reduced chloride binding in Andean frog (*Telmatobius peruvianus*) hemoglobin. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 184, n. 5, p. 613-621, 2014.

WEBER, R. E. et al. Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 2, p. R454-R464, 2004.

WEBER, R. E. et al. Novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of the Andean frog *Telmatobius peruvianus*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 5, p. R1052-R1060, 2002.

WEBER, R. E. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 158, n. 2-3, p. 132-142, 2007.

WEBER, R. E. Use of ionic and zwitterionic (Tris/BisTris and HEPES) buffers in studies on hemoglobin function. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 4, p. 1611-1615, 1992.

WEBER, R. E.; CAMPBELL, K. L. Temperature dependence of haemoglobin-oxygen affinity in heterothermic vertebrates: mechanisms and biological significance. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 549-562, 2011.

WEBER, R. E.; FAGO, A. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 144, n. 2-3, p. 141-159, 2004.

WEBER, R. E.; JENSEN, F. B. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. **Annual Review of Physiology**, v. 50, n. 1, p. 161-179, 1988.

WEBER, R. E.; WELLS, R. M. G.; ROSSETTI, J. E. Adaptations to neoteny in the salamander, *Necturus maculosus*. Blood respiratory properties and interactive effects of pH,

temperature and ATP on the hemoglobin oxygenation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 4, p. 495-501, 1985.

WEBER, R.; BLUM, B.; MULLER, P. R. The switch from larval to adult globin gene expression in *Xenopus laevis* is mediated by erythroid cells from distinct compartments. **Development**, v. 112, n. 4, p. 1021-1029, 1991.

WELLS, K. D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, n. 3, p. 666-693, 1977.

WELLS, R. M. G. The control of hemoglobin-oxygen binding in vertebrate animals. **Physiology**, v. 4, n. 6, p. 242-245, 1989.

WELLS, R. M. G.; TREVENEN, B. J.; BRITTAINE, T. Organic phosphate-hemoglobin interactions appear non-adaptive in the hypoxic toad, *Bufo marinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 92, n. 3, p. 587-593, 1989.

WELLS, R. M. G.; WEBER, R. E. Fixed acid and carbon dioxide bohr effects as functions of hemoglobin-oxygen saturation and erythrocyte pH in the blood of the frog, *Rana temporaria*. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 403, n. 1, p. 7-12, 1985.

WEYKAMP, C.; JOHN, W. G.; MOSCA, A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 3 (3), p. 439-445, 2009.

WICHER, K. B.; FRIES, E. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 11, p. 4168-4173, 2006.

WILSON, E. O. **Diversidade da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 1994.

WILSON, E. O. **Sociobiology**: the new synthesis (25th birthday edition). Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 2000.

WINSLOW, R. M.; MURRAY, A.; GIBSON, C. C. [23] Oxygen equilibrium curve of concentrated hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 486-495, 1994.

WOOD, S. C. Effects of metamorphosis on blood respiratory properties and erythrocyte adenosine triphosphate level of the salamander *Dicamptodon ensatus* (Eschscholtz). **Respiration Physiology**, v. 12, n. 1, p. 53-65, 1971.

WOOD, S. C. et al. Oxygen uptake and blood respiratory properties of the caecilian *Boulengerula taitanus*. **Respiration Physiology**, v. 24, n. 3, p. 355-363, 1975.

WOOD, S. C.; MALVIN, G. M. Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 159, n. 1, p. 203-215, 1991.

XI, Y. *et al.* Gene expression and tissue distribution of cytoglobin and myoglobin in the Amphibia and Reptilia: possible compensation of myoglobin with cytoglobin in skeletal muscle cells of anurans that lack the myoglobin gene. **Gene**, v. 398, n. 1, p. 94-102, 2007.

YAMAGUCHI, M.; WAKAHARA, M. Hemoglobin transition from larval to adult types occurs within a single erythroid cell population during metamorphosis of the salamander *Hynobius retardatus*. **International Journal of Developmental Biology**, v. 41, n. 4, p. 581-589, 1997.

YUAN, Y. *et al.* New look at hemoglobin allostery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1702-1724, 2015.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZENTZ, C.; PIN, S.; ALPERT, B. [13] Stationary and time-resolved circular dichroism of hemoglobins. **Methods in Enzymology**, v. 232, p. 247-266, 1994.

ZIJLSTRA, W. G. *et al.* Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of rat oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 161-166, 1994.

ZIJLSTRA, W. G. Standardisation of haemoglobinometry: history and new challenges. **Comparative Haematology International**, v. 7, n. 3, p. 125-132, 1997.

ZIJLSTRA, W. G.; BUURSMA, A. Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4, p. 743-749, 1997.

ZIJLSTRA, W. G.; BUURSMA, A.; MEEUWSEN-VAN DER ROEST, W. P. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 9, p. 1633-1638, 1991.

ZIJLSTRA, W. G.; VAN KAMPEN, E. J. Standardization of hemoglobinometry: I. the extinction coefficient of hemoglobincyanide at $\lambda = 540 \text{ m}\mu$: $\epsilon_{540}^{\text{HiCN}}$. **Clinica Chimica Acta**, v. 5, n. 5, p. 719-726, 1960.

ZWART, A. *et al.* Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemiglobinocyanide standard. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 4, p. 271-274, 1996.

ZIJLSTRA, W. G. *et al.* Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of rat oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 161-166, 1994.

APÊNDICE A – CONSTANTES DE HENRY, 0-40 °C

Temperatura, °C	Coeficiente de absorção	Solubilidade de O ₂ , mg.L ⁻¹	K _H , μmol.L ⁻¹ .mmHg ⁻¹
0	50,12116	14,64	2,942308207
1	48,71749	14,23	2,859907499
2	47,34806	13,83	2,779516564
3	46,0471	13,45	2,703145176
4	44,81462	13,09	2,630793335
5	43,6506	12,75	2,562461041
6	42,52082	12,42	2,49613852
7	41,45951	12,11	2,433835545
8	40,43244	11,81	2,373542344
9	39,47384	11,53	2,31726869
10	38,51524	11,25	2,260995036
11	37,62511	10,99	2,208740928
12	36,80345	10,75	2,160506368
13	35,98179	10,51	2,112271807
14	35,19437	10,28	2,066047019
15	34,44118	10,06	2,021832005
16	33,72223	9,85	1,979626765
17	33,00328	9,64	1,937421524
18	32,3528	9,45	1,89923583
19	31,70232	9,26	1,861050136
20	31,08608	9,08	1,824874216
21	30,46983	8,9	1,788698295
22	29,88782	8,73	1,754532148
23	29,34005	8,57	1,722375774
24	28,79228	8,41	1,6902194
25	28,24451	8,25	1,658063026
26	27,76521	8,11	1,629926199
27	27,25167	7,96	1,599779599
28	26,77237	7,82	1,571642772
29	26,3273	7,69	1,545515718
30	25,848	7,55	1,517378891
31	25,40294	7,42	1,491251837
32	24,99211	7,3	1,467134557
33	24,58128	7,18	1,443017276
34	24,17045	7,06	1,418899996
35	23,75962	6,94	1,394782715
36	23,38303	6,83	1,372675208
37	23,00643	6,72	1,350567701
38	22,62984	6,61	1,328460194
39	22,28748	6,51	1,308362461
40	21,94513	6,41	1,288264727

Fonte: dados adaptados de Springer (2009).