

Curso de Pós-Graduação
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

"ESTUDOS COMPARATIVOS DE EFEITO BOHR EM HEMOGLOBINAS DE
Osteoglossum bicirrhosum e Pterygoplichthys pardalis"

MARÍA ISABEL GALDAMES PORTUS

Tese de Mestrado do Departamento
Bioquímica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas

Orientador

Prof.Dr. ALDO FOCESI JÚNIOR

1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, irmãos,
esposo e filha.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof.Dr.Aldo Focesi Jr. orientador desta tese, por sua orientação científica, estímulo e solidariedade humana; e ao Dr.Warwick E.Kerr, Diretor do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia pelo grande incentivo dado à pesquisa na Amazônia e que tornou possível a realização desta tese.

Ao Dr.Austen Riggs, chefe da quarta etapa da Excursão "Alpha Helix" 1976, e a todos pesquisadores participantes pelo estímulo que nos proporcionaram durante a pesquisa da hemoglobina de peixes.

Ao Prof.Dr.Zeferino Vaz, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo excepcional apoio no desenvolvimento da pesquisa e ensino pós-graduado.

Ao Prof.Dr.Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo interesse no desenvolvimento das atividades do Departamento de Bioquímica.

A Comissão Coordenadora e professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos professores: Dra.Nilce C.Meirelles, Dra.Lucia P.S. Airoidi, pelas sugestões e críticas construtivas durante a realização deste trabalho.

A Srta Maria Luiza de Souza pelo serviço esmerado de dactilografia e a todos meus colegas do Departamento de Bioquímica, que de alguma maneira colaboraram na realização da presente tese.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	40
5. BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUÇÃO

O estabelecimento da relação estrutura-função nas moléculas de proteína tem sido uma problemática fundamental a elucidar em Bioquímica. A hemoglobina graças ao acúmulo de estudos e aos amplos conhecimentos de suas propriedades tem se comportado como um modelo excepcional para o esclarecimento desta relação. As ideias modernas de alosterismo enzimático, por exemplo, foram largamente desenvolvidas baseadas nos estudos da relação estrutura-função da hemoglobina, possibilitando um grande avanço no conhecimento das proteínas em geral (BRIEHL, 1963).

A hemoglobina, hemoproteína transportadora de oxigênio do meio ambiente até os tecidos nos seres vivos, desempenha sua função em condições extremamente variáveis, dependendo das necessidades do organismo e do meio ambiente em que eles se desenvolvem. Um estudo comparativo considerando estes aspectos nos possibilita a identificação dos mecanismos adaptativos a nível molecular segundo os quais os diferentes organismos adaptam-se às condições ambientais.

A hemoglobina de vertebrados, em geral, apresenta-se como uma hemoproteína de peso molecular 64.500 daltons, com a capacidade de interagir com oxigênio, dióxido de carbono e íons, e transportá-los fisiologicamente. Quimicamente é formada por qua-

tro subunidades de peso molecular aproximado de 16.000 daltons con-
tendo cada uma delas uma cadeia polipeptídica geralmente do tipo
 α com 141 resíduos de aminoácidos ou do tipo β com 146 aminoáci-
dos, ambas com 80% de conformação helicoidal, associadas a um gru-
po prostético, heme, que consiste em anel de protoporfirina IX con-
tendo no centro um átomo de ferro no estado ferroso, formando li-
gações de coordenação com os átomos de nitrogênio dos quatros
anéis pirrólicos da protoporfirina. A associação entre a cadeia po-
lipeptídica e o grupo heme ocorre através de ligações de coordena-
ção do ferro com o nitrogênio imidazólico da histidina proximal,
deixando a sexta posição de coordenação acessível para combinação
com oxigênio molecular. A cadeia polipeptídica que rodeia o grupo
heme localizado na superfície da subunidade origina um micro am-
biente de baixa constante dielétrica impedindo a oxidação do fer-
ro. A união reversível deste com o oxigênio depende de interações
específicas do grupo heme com a proteína, sendo de grande impor-
tância o caráter hidrofóbico e outras propriedades dos aminoácidos
participantes (ANTONINI e BRUNORI, 1971).

A propriedade fundamental da hemoglobina, que consiste
na oxigenação, acarreta na molécula da proteína alterações estru-
turais profundas. Mediante cristalografia e difração de raios X
observaram-se mudanças estruturais durante a oxigenação (PERUTZ,
1969). Com a união do ligante na hemoglobina, inicia-se uma mudan-
ça no estado de spin do metal de um valor alto para um valor mais

baixo, resultando um movimento na posição do ferro em relação ao plano da portirina de aproximadamente 0,75 a 0,95 Å deslocando-se em direção à histídina proximal. Este movimento do ferro de saída e entrada no plano da porfirina durante a oxigenação é crítico nas mudanças terciárias e quaternárias das subunidades. No lado distal da cavidade hidrofóbica não são observadas mudanças na cadeia α mas somente na cadeia β onde o grupo metil da Val_{E11} parece impedir a união do oxigênio sendo o grupo metil desalojado pela união com o mesmo. O contacto $\alpha_1\beta_2$ também muda com a oxigenação, a ponte de hidrogênio que une AspG1(199) β com TyrC₇(42) α na desoxihemoglobina é deslocada para AsnG₄(102) α . As regiões C-terminal das cadeias α e β , na desoxihemoglobina formam pontes salinas entre vários aminoácidos terminais. Na desoxihemoglobina o penúltimo aminoácido, C-terminal, tirosina de ambas as cadeias ocupam o locus hidrofóbico entre as hélices F e H, estabilizada por pontes de hidrogênio com o grupo carbonila da ValFG₅, e a mudança conformacional ocorrida durante a oxigenação promove o deslocamento da tirosina e a ruptura das quatro pontes salinas dos resíduos C-terminal das cadeias α e β (BRUNORI, 1975).

Os contactos entre as subunidades da hemoglobina são poucos e estão limitados principalmente às interações eletrostáticas entre os resíduos C-terminal e outro aminoácido da cadeia, por pontes salinas ou de hidrogênio entre peptídeos ou radicais aminoáci

dos, sendo de grande importância a carga dos grupos envolvidos na associação e dissociação da hemoglobina, de acordo com WYMAN (1964) estando as moléculas oxigenadas completamente dissociadas, enquanto que as desoxigenadas se encontram na forma tetramérica. Estudos de mudanças de estado de agregação em ultracentrífuga analítica corroboram estas afirmações. Numerosas evidências atestam que a oxigenação está acompanhada de mudanças estruturais na proteína e variação no equilíbrio de associação-dissociação das subunidades. A variação do coeficiente de Hill e o efeito Bohr são consequências deste fenômeno.

A quantidade de oxigênio ligado por uma dada quantidade de hemoglobina é função da pressão parcial do oxigênio e é expressa através da curva de equilíbrio de oxigênio. A forma da curva indica a interação heme-heme, descrita pela equação de HILL (1910), $\bar{Y} / 1 - \bar{Y} = Kp^n$ onde (\bar{Y}) é a fração de hemoglobina combinada com o ligante, (K) a constante de afinidade, (p) a pressão parcial do ligante na fase gasosa e (n) um parâmetro empírico que indica o tipo de interação entre os sítios de união do ligante. A saturação de hemoglobina pelo gás é o resultado de interações homotrópicas e heterotrópicas. As interações homotrópicas foram descritas como mudanças conformacionais dentro de uma cadeia polipeptídica originadas pela interação entre os grupos heme, nas quais a reatividade de um sítio na molécula é afetada pela presença do mesmo ligante em outro sítio da mesma molécula. As interações heterotrópicas cor

respondem por sua vez às modificações nos sítios de união de um dado ligante por efeito de outros ligantes diferentes, interação que pode envolver outras cadeias vizinhas com a união do ligante. O efeito dos fosfatos orgânicos que afetam a curva de equilíbrio de oxigênio de forma análoga aos prótons, é um exemplo interação heterotrópica.

O efeito Bohr pode ser descrito como a variação da afinidade da hemoglobina pela variação do pH. De acordo com a orientação deste efeito podemos ter efeito Bohr normal ou efeito Bohr alcalino quando a afinidade aumenta com o pH ou ainda efeito Bohr ácido ou efeito Bohr reverso quando esta diminui com o aumento do pH (ANTONINI e BRUNORI, 1971; WYMAN, 1948).

Este fenômeno tem dois aspectos com a mesma resposta. Por um lado, expressa que o número de prótons unidos a proteína a um pH constante é dependente do grau de oxigenação, e por outro lado, mostra a influência de pH na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Esta relação foi descrita por WYMAN (1948) que assumia a presença de dois grupos ionizáveis; um primeiro que torna-se fortemente ácido pela união de oxigênio, descrito como responsável pelo efeito Bohr alcalino e o outro levemente ácido responsável pelo efeito Bohr ácido ou reverso. O grupo imidazol da histidina(146) é um dos aminoácidos envolvidos no efeito Bohr alcalino de acordo com determinações de espectroscopia de ressonância nuclear magnética (KILMARTIN, BREEN, ROBERTS e HO, 1973). O resíduo C-terminal

da cadeia β His HC₃(146) _{β} e N-terminal da Lis(127) _{α} ValNA₁(1) _{α} e HisHC₅(122) _{α} da cadeia α , estão também envolvidos no Efeito Bohr, os pK destes grupos tem valores normais na oxihemoglobina onde os resíduos estão livres, porém na desoxihemoglobina os pK tornam-se mais elevados devido a estabilização das pontes salinas(BRUNORI, 1975).

Outro dos efeitos heterotrôpicos que podemos citar é o efeito de CO₂ na curva de dissociação da hemoglobina que pode ser originado por uma pseudo-ligação dependente da mudança na concentração de prótons no meio devido ao ácido carbônico ou ainda por um efeito direto através da formação de compostos carbamínicos a qual depende, a pH constante, do grau de oxigenação da molécula, os grupos provavelmente envolvidos são os grupos N-terminal das cadeias α e β , (KILMARTIN e ROSSI, 1969).

Quanto aos fosfatos orgânicos, o grande efeito que exercem no equilíbrio de oxigênio com a hemoglobina foi descrito por BENESCH e BENESCH (1967); CHANUTIN e CURNISH (1967); BENESCH e BENESCH (1974). Assim, a afinidade da hemoglobina humana pelo oxigênio na presença de DPG (difosfoglicerato), ATP (adenosina-trifosfato), IHP (inosina-hexafosfato) e outros fosfatos orgânicos, se apresenta diminuída. Os grupos envolvidos na união de fosfatos são os dois grupos α amino das cadeias β , e a explicação para o caso do DPG, por exemplo, é baseada no fato de ele ser fortemente protonado, sendo sua carga complementada pelos resíduos centrais da

cavidade hidrofóbica, formando pontes salinas com Val(1), His(2) e His(143) de ambas cadeias β e Lis(82) de uma das cadeias β . A estrutura destes sítios de união são destruídos com a oxigenação, havendo perda da carga complementária, sendo reduzida a afinidade da oxihemoglobina pelo DPG (BRUNORI, 1975).

A presença simultânea das interações homotrópicas e heterotrópicas apresenta vantagem para a hemoglobina, uma vez que ela pode realizar o transporte de oxigênio em condições de metabolismo celular adverso, sendo de grande significado a ação dos fosfatos orgânicos e sua concentração nos eritrócitos. Assim, com metabolismo elevado, onde as concentrações de ATP também o são, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminui e maior quantidade de gás pode ficar disponível aos tecidos.

A função da hemoglobina frequentemente parece adaptada às necessidades metabólicas do animal e ao meio ambiente (RIGGS, 1976). O peso do corpo e a taxa metabólica estão inversamente relacionados (SCHMIDT-NIELSEN e LARIMES, 1958). Esta adaptação dependente da hemoglobina, inclui mudanças intrínsecas da afinidade pelo oxigênio, mudanças no conteúdo e efetores alostéricos e variação na cooperatividade de interação pelas uniões sucessivas das moléculas de oxigênio (RIGGS, 1976).

Em peixes tem-se observado que existem várias maneiras de suprir as diferentes necessidades de oxigênio, entre estas a presença de brânquias com diferente área efetiva de troca de oxigênio,

a variação do pulso cardíaco, o número de glóbulos vermelhos, a concentração de hemoglobina e a presença de uma hemoglobina especial parecem constituir as mais importantes (RIGGS, 1970). Em diferentes espécies de teleosteos, por exemplo, observa-se que a quantidade de eritrócitos e a concentração de hemoglobina do sangue dependem da quantidade de oxigênio disponível e da temperatura do metabolismo do animal (DUBE e MUNSHI, 1973). Em grande número de teleosteos marinhos, a área superficial das brânquias por grama de peso em peixes ativos é duas vezes maior que em peixes lentos (GRAY, 1954; HUGHES, 1966; HUGHES e MORGAN, 1970).

Encontram-se ainda certas adaptações no mecanismo de transporte do oxigênio pela hemoglobina de peixes com relação a suas necessidades metabólicas e o meio ambiente. Um exemplo é o peixe da família Chaenichlyidae, do Ártico, que chega ao extremo de não apresentar hemoglobina como pigmento transportador de oxigênio, sendo este transportado em solução física graças a sua solubilidade a baixa temperatura, desta forma a quantidade de oxigênio transportado é suficiente para satisfazer as necessidades metabólicas do animal (RIGGS, 1970). As propriedades funcionais da hemoglobina parecem estar pois adaptadas às necessidades respiratórias de cada espécie. Os fatores que regulam a sua afinidade pelo oxigênio bem como outras propriedades funcionais podem estar relacionados com a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água e atividade metabólica característica de cada peixe (GRIGG, 1974).

Alta afinidade pelo oxigênio é vantajosa para o peixe que vive em água sujeita a uma baixa pressão parcial do gás. Por outro lado uma baixa afinidade pelo oxigênio, em peixes de grande atividade, que vivem em águas bastante oxigenadas apresenta também vantagens. Para os mesmos tendo sido descrito, por exemplo, que uma diminuição na afinidade por oxigênio é acompanhada de um incremento da respiração aérea, existindo uma série de órgãos acessórios de respiração aérea nos peixes que vivem em águas deficientes de oxigênio (LENFANT e JOHANSEN, 1967; JOHANSEN, 1970).

A adaptação da afinidade da hemoglobina por oxigênio conforme as necessidades respiratórias de cada espécie tem sido na verdade amplamente reconhecida (REDFIELD, 1933; FRY, 1957; WOLVEKAMP 1961; PROSSER e BROWN, 1961). Existem numerosas formas adaptativas da hemoglobina relacionadas com os diversos parâmetros ambientais (POWERS, 1972).

O hemolisado de eritrócitos de peixe contém múltiplas hemoglobinas com considerável variação em número e proporção (YAMANAKA, YAMAGUCHI e MATSUURA, 1965), sendo difícil encontrar hemolisados que apresentem um único componente. Esta multiplicidade pode ser alcançada por diferentes mecanismos: (i) uma cadeia polipeptídica pode se combinar com outra de maneira a formar híbridos diferentes; (ii) adição de outras moléculas; (iii) mudanças conformacionais ou (iv) modificações no grau de polimerização das subunidades (RIGGS, 1970). Da classe dos vertebrados, as hemoglobinas de

peixes parece ser a mais heterogêneas e diversificadas, sugerindo-se que estas, em termos de sua função respiratória, estejam adaptadas às condições variáveis de oxigênio do meio ambiente ou a um sistema de interação individual na molécula para produzir um equilíbrio com o oxigênio específico no sangue (GRIGG, 1974).

Tendo-se como objetivo verificar as adaptações da hemoglobina em relação a sua função fisiológica ao meio ambiente foram escolhidos dois peixes bastante característicos quanto a seu tipo de respiração, atividade e meio ecológico, Osteoglossum bicirrhosum, "ARUANÃ" e Pterygoplichthys pardalis, "ACARI-BODO". O primeiro caracteriza-se por ser um peixe bastante ativo, de respiração branquial encontrado comumente em águas superficiais, pouco resistente a conteúdos baixos de oxigênio, e o segundo, um peixe lento, de águas profundas, de respiração aérea facultativa, de grande resistência podendo permanecer por longos períodos fora da água. Estes peixes, encontrados em água doce de zonas tropicais, especificamente na Amazônia, possuem adaptações fisiológicas conhecidas, constituindo, portanto, material biológico bastante interessante para estudar os diferentes mecanismos adaptativos que se desenvolvem nos diferentes organismos para satisfazer suas necessidades metabólicas em relação ao seu meio ecológico. Estes estudos, embora preliminares, constituem o objetivo da presente tese.

MATERIAL E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DE HEMOGLOBINA ISENTA E ÍONS - Exemplos de duas espécies de peixe: aruanã (Figura 1) e acari-bodo (Figura 2) utilizados no presente trabalho foram coletados no Rio Solimões, na região de Januacá, no período vazante de novembro de 1976 e janeiro de 1977.

Animais de pesos e tamanhos homogêneos entre 500-600 g. e 40-50 cm foram sangrados por punção cardíaca mediante seringa heparinizada com 5000 unidades de heparina por mililitro. O material recolhido era mantido cuidadosamente a 4°C, evitando-se coagulação. Após a coleta, as hemácias eram lavadas 3 a 4 vezes com solução de NaCl 1,7% contendo Tris 1mM, pH 8,0 a 4°C, por centrifugações sucessivas a 5000 rpm, durante 10 minutos. As demais operações eram efetuadas a 4°C.

Para obtenção do hemolisado, as células eram lisadas com solução de Tris 1mM pH 8,0 na proporção de 2 a 3 volumes por volume de sangue e a hemólise mantida durante 1 a 3 horas a 4°C. Após este tempo era adicionado ao hemolisado NaCl 1M até uma concentração final de 0,1M; a solução de hemoglobina era finalmente obtida após centrifugação a 15000 rpm, durante 10 minutos, com finalidade de retirar impurezas constituídas principalmente por estromas celulares.

Para a preparação de solução de hemoglobina "stripped"

isenta de moléculas menores como íons orgânicos e sais era utilizado método descrito por NOBLE e RIGGS (1976), através do qual o hemolisado é passado por duas colunas cromatográficas. No início, 15 a 20ml de solução de hemoglobina eram aplicados a uma coluna de Sephadex G-25 (40x2,5cm), previamente equilibrada com Tris 1mM pH 8,0 e eluidos com o mesmo tampão. O eluato obtido era então submetido a uma segunda coluna de troca iônica (35x2,5cm), tipo "mixed bed" AG 501 x 8(D), até uma altura de 25cm, Dowex-50W (NH_4^+) até 5cm e Dowex-1 (AC^-) até completar 35cm, equilibrada previamente com água destilada. O eluato era constituído de hemoglobina livre de íons, em concentração de 10 a 20mg/ml.

SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - A técnica de análise dos componentes da hemoglobina por eletroforese é descrita por ORSTEIN (1964) e DAVIS (1964), utilizando gel de poliacrilamida 7,5% pH 8,9. Os peixes foram analisados individualmente.

Os geles utilizados na eletroforese da hemoglobina dos peixes foram chamados: gel de resolução e gel de contraste, preparados na hora do uso misturando-se soluções estoques, com as seguintes composições, mantidas a 4°C: Solução "A" 30% de Acrilamida e 0,8% de bisacrilamida. Solução "B" 8,5% de Tris, 0,4% de TEMED (tetrametil-etileno diamina) e 24ml de HCl 1N. Solução "C" 0,1% persulfato de amônio. Solução "D" 5% acrilamida e 1,25% bisacrilamida.

mida. E solução "E" 12,9ml ácido fosfórico 1M, 2,9% de Tris e 0,1% de TEMED em um volume final de 100ml. O gel de resolução foi preparado misturando-se as soluções "A", "B" e "C" na proporção de 1:1:2, e o gel de contraste, misturando-se as soluções "D" "E" "C", na proporção 2:1:2.

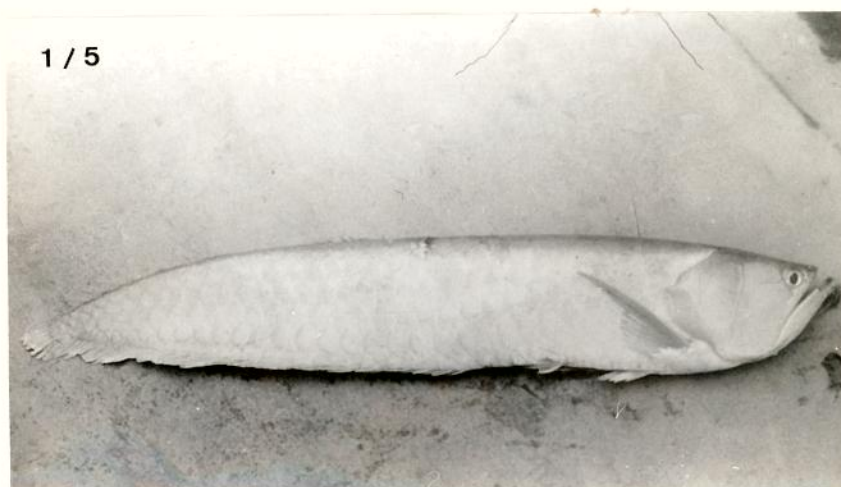


Figura 1. - Osteoglossum bicirrhosum, aruanã

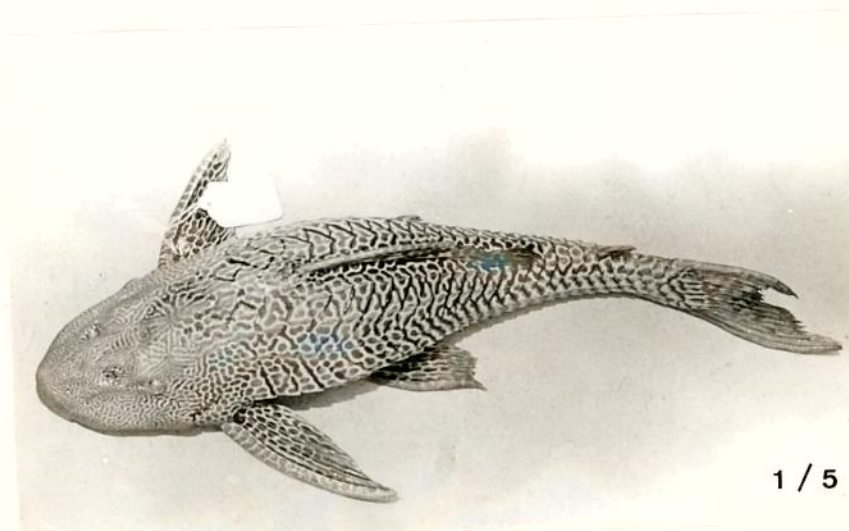


Figura 2. - Pterygoplichthys pardalis, acari-bodo

Os sistemas de tampões utilizados nas cubas eletroforéticas foram: Tris-Glicina 0,05M pH 8,9 na cuba superior e tris-Cl 0,1M pH 8,1 na cuba inferior.

As amostras para a migração eletroforéticas foram recentemente preparadas misturando-se 0,1ml de solução de hemoglobina 1mg/ml, 0,2ml a 0,4ml de glicerol e 1 gota de β -mercaptoetanol 0,01M em tampão Tris-Glicina 0,05M pH 8,9, na forma de carboxihemoglobina.

Para coloração do gel era utilizada uma solução contendo 0,5% de "Comassie blue" em 250ml de metanol 95%, 250ml de água e 46ml de ácido acético 18N, como descorante era utilizado uma solução contendo 1,4% de metanol e 7% de ácido acético.

Na preparação dos suportes de gel para a análise de migração eletroforética eram utilizados tubos de vidro de dimensões 10x0,5cm, devidamente lavados e secos, colocados em posição vertical e cobertos cuidadosamente na sua parte inferior com uma membrana de "parafilm" para evitar vazamento do gel. Nestes tubos era adicionado o gel de resolução até uma altura aproximada de 6 a 7cm cobrindo-se imediatamente o gel com 0,5ml de água destilada para facilitar a polimerização que ocorre após 30 a 40 minutos. A camada de água era retirada e o gel de contraste era adicionado sobre o gel de resolução, a uma altura de 1,5cm a 2,0cm, cobrindo-se novamente com uma camada de água; a polimerização deste segundo gel era obtida em 40 a 60 minutos, após os quais os tubos eram inseri

dos em orifícios existentes na cuba superior de eletroforese e o conjunto montado submerso na cuba inferior contendo Tris-HCl pH 8,1. Em cada tubo era adicionado 10 a 20 microlitros de amostra, depois, cuidadosamente 10µl de soroalbumina (0,02g/ml) e finalmente tampão Tris-glicina 0,05M pH 8,9 contendo cerca de 0,2ml de solução contendo (azul de bromofenol 0,05% e azida de sódio 0,02% em tampão fosfato de sódio 0,1M). Finalmente após conexão com a fonte de corrente contínua, a eletroforese era mantida durante 2 a 3 horas com uma intensidade de corrente da ordem de 2mA por tubo. Terminada a eletroforese os geles eram removidos cuidadosamente dos tubos e imediatamente colocados na solução de coloração durante 2 a 3 horas e após eram feitas lavagens sucessivas com solução descolorante durante 24 a 36 horas, tempo necessário para visualizar nitidamente as bandas de proteína .

SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA - Para a separação dos componentes de hemoglobina de acari-bodo, identificados por eletroforese de poliacrilamida, utilizou-se coluna de troca iônica (40x2,0cm) DEAE-Sephadex A-50, pré-equilibrada com tampão Tris 0,05M pH 9,0. O volume total era de 15ml a 20ml de hemolisado na forma "stripped". A amostra era eluída por aplicação de um gradiente linear de pH utilizando-se tampão Tris-Cl 0,05M pH 9,0 e Tris-Acetato 0,05M pH 6,0. Frações de 5ml eram coletadas em um Coletor de Frações modelo Buchler.

EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM O LIGANTE OXIGÊNIO - A

curva de equilíbrio, também chamada curva de dissociação da hemoglobina, foi expressa de acordo com equação de Hill. Esta descrita para uma curva de equilíbrio de hemoglobina 50% saturada pelo oxigênio (P_{50}), avalia a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e o valor de "n" é proporcional à energia livre envolvida na interação heme-heme.

O equilíbrio da hemoglobina com oxigênio neste trabalho foi estudado expressando-se a fração dos grupos heme oxigenados como $\log \bar{Y} / 1 - \bar{Y}$, em função do logaritmo da pressão parcial de oxigênio ($\log PO_2$).

O método empregado para a determinação da curva de equilíbrio com oxigênio foi espectrofotométrico, utilizando-se nas determinações, tonômetro especial (Figura 3), aparelho que se mostrou adequado para estas análises. O tonômetro consiste num tubo de Thumberg modificado provido de uma cubeta óptica de vidro pirex de volume de 4ml, com 1cm de caminho ótico soldado a uma câmara de vidro dupla com capacidade gasosa aproximada de 250 ml, possuindo ainda uma entrada na câmara menor e uma torneira de três saídas na câmara superior.

Os tonômetros utilizados eram previamente calibrados pela medida da capacidade gasosa dos mesmos, e suas constantes tonométricas eram determinadas.

Experimentalmente eram utilizadas soluções de hemoglobina desionizada a uma concentração final de 0,8mg/ml em tampão Tris

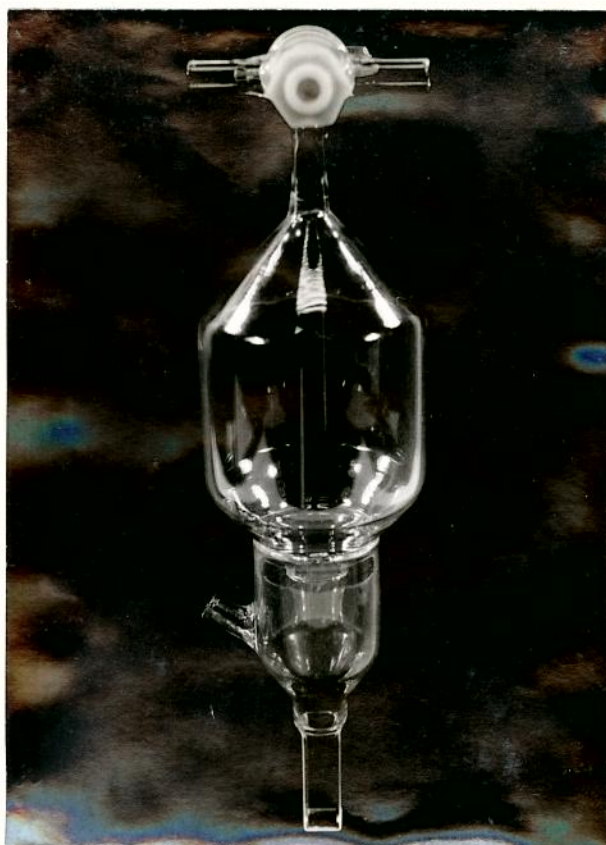


Figura 3. - TONÔMETRO UTILIZADO NA ANÁLISE EXPERIMENTAL DO EQUILÍBRIO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO.

ou Bis-Tris I = 0,05 em pH adequado, para um volume final de 4ml. A solução era desoxigenada por um fluxo de nitrogênio conectado a câmara superior do tonômetro com saída na câmara inferior. O fluxo de gás era mantido até a completa desoxigenação da hemoglobina que era constatado espectrofotometricamente. Em seguida o tonômetro era submerso 10 minutos em banho maria a 20°C, com agitação constante e o espectro de absorção da desoxihemoglobina era registrado entre 500 e 600nm. A amostra era então oxigenada gradualmente através de seringas de capacidade variada, novamente submetida as condições descritas, e as curvas espectrais traçadas após cada adição (Figura 4).

Os cálculos experimentais da curva de equilíbrio de oxigênio com hemoglobina foram baseados nas diferentes curvas obtidas entre as formas desoxi e oxi da hemoglobina tendo a primeira um máximo de absorbância a 555nm e a oxihemoglobina dois máximos a 576nm e 541nm respectivamente.

A Tabela I mostra um exemplo do tratamento dos valores obtidos em uma das experiências, \bar{Y} representa a porcentagem de hemoglobina na forma oxigenada quando submetida a diferentes pressões parciais de oxigênio.

As pressões parciais de oxigênio foram calculadas a partir da equação clássica de Boyle-Mariotti: $PO_2 = V_1/V_2 \times P_2$ onde P_2 é a pressão parcial do oxigênio no ar atmosférico V_2 é o volume gasoso do tonômetro, V_1 o volume do ar injetado.

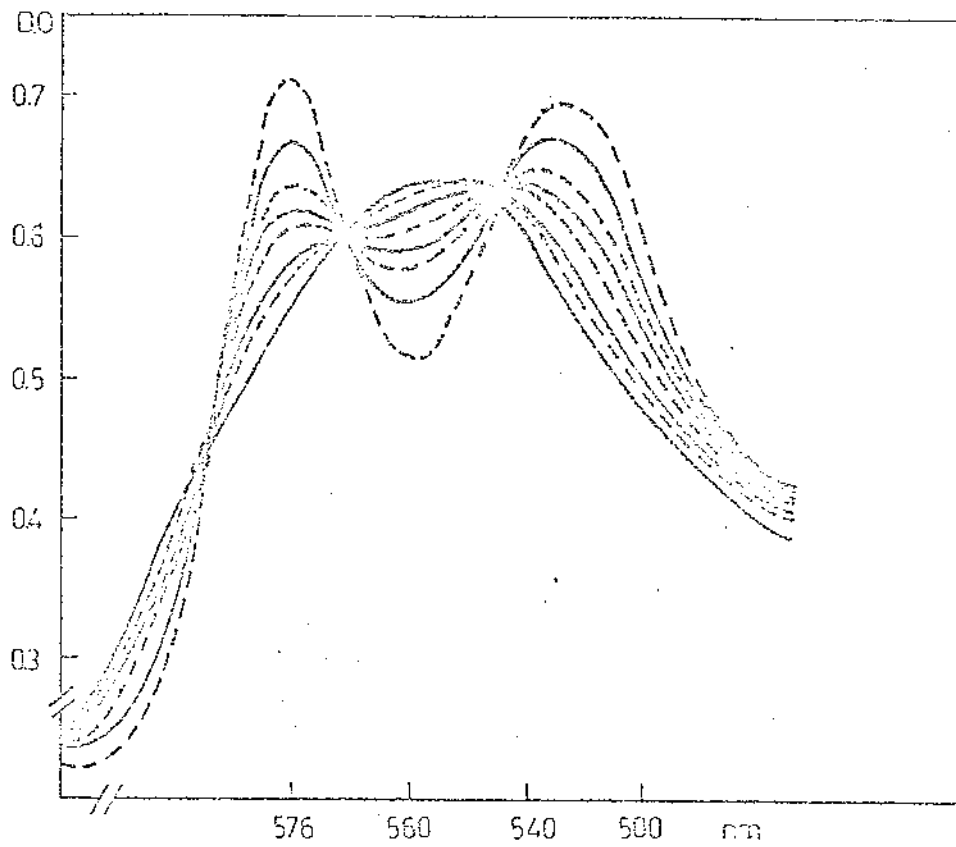


Figura 4. - DIAGRAMA EXPERIMENTAL DE EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO, TENDO-SE COMO INÍCIO DEOXIHEMOGLOBINA, EM DIFERENTES GRAUS DE OXIGENAÇÃO.

deoxi: D.O.MAX. 555nm

oxi: D.O.MAX. 576nm e 541nm

Tabela I.- VALORES EXPERIMENTAIS DO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO DE HEMOGLOBINA

HEMOGLOBINA	DO		Δ DO	DEOXY	\bar{Y} (a)	$\text{Log } \bar{Y}/1-\bar{Y}$	Log PO_2 (b)
	576nm	560nm					
Deoxi	0,55	0,64	-9,0				
Oxi	0,71	0,52	19,0				
V.ar*							
1ml	0,570	0,630	-6,0	3,0	0,107	-0,889	-0,250
2ml	0,585	0,620	-3,5	5,5	0,196	-0,610	0,047
3ml	0,608	0,610	-0,2	8,8	0,314	-0,330	0,223
4ml	0,620	0,590	3,0	12,0	0,428	-0,126	0,348
5ml	0,640	0,580	6,0	15,0	0,535	0,061	0,445
6ml	0,670	0,555	11,5	20,5	0,732	0,436	0,524
7ml	0,710	0,520	19,0	28,0			

(a) \bar{Y} = porcentagem de hemoglobina oxigenada

(b) Log PO_2 = pressões parciais de oxigênio

* = volume de ar adicionado à deoxihemoglobina (1ml a 7ml)

Os valores obtidos de $\log \bar{Y} / 1 - \bar{Y}$ e $\log PO_2$ foram expressos respectivamente em ordenada e abcissa obtendo-se uma reta cuja inclinação corresponde ao valor de "n" (Figura 5).

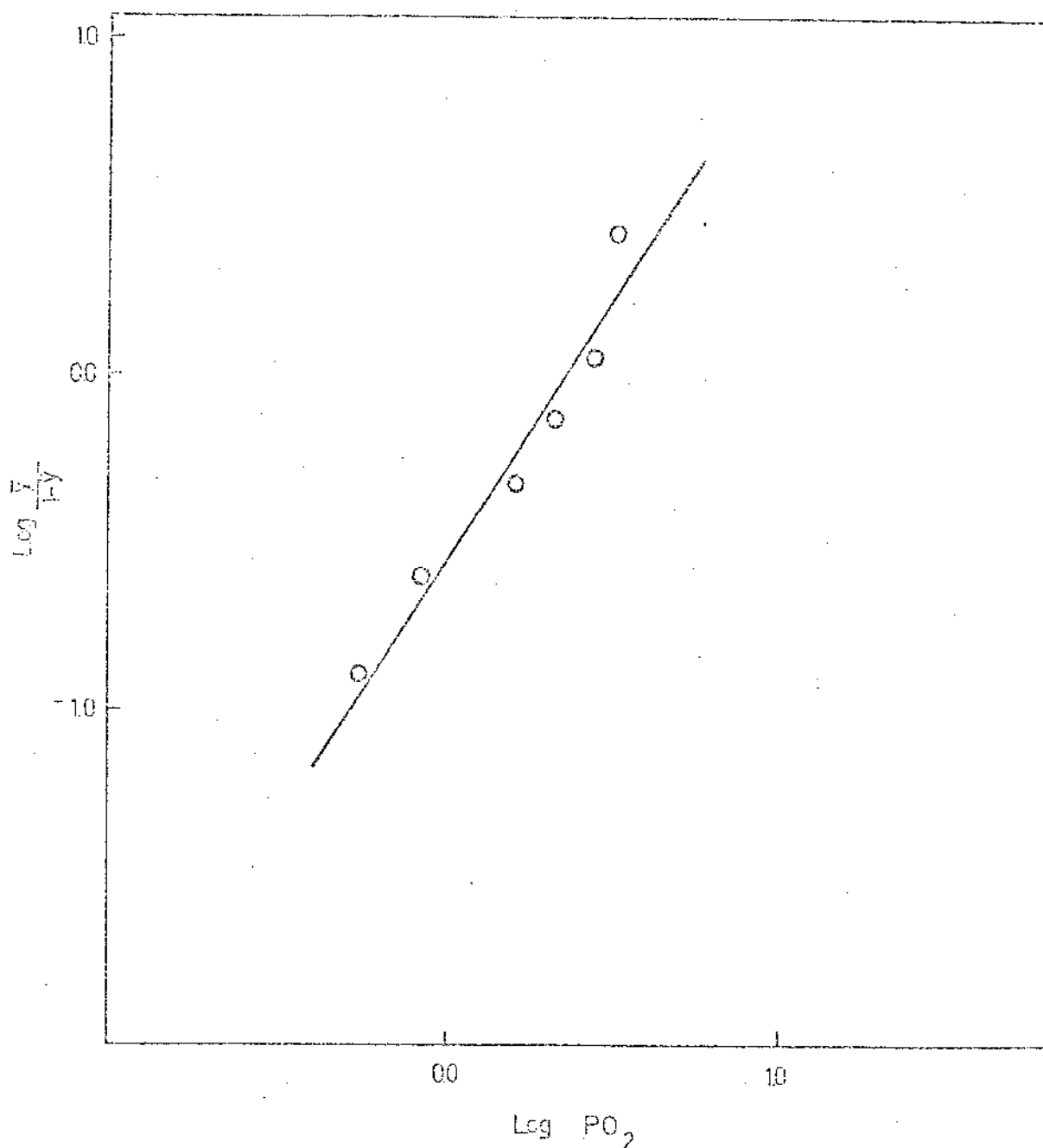


Figura 5.- EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA EXPRESSO EM FUNÇÃO DE : $\log \bar{Y} / 1 - \bar{Y}$ e $\log de PO_2$

ANÁLISE GRÁFICA DO EFEITO BOHR - O efeito do pH na curva de equilíbrio de oxigênio foi analisado de acordo com método descrito utilizando-se sistema de tampões Tris ou Bis-Tris com valor de força iônica $I = 0,05$ mantido constante nos diferentes pH em que foram realizados os ensaios entre valores de 6,0 a 9,0.

ANÁLISE EXPERIMENTAL DE EFEITOS ALOSTÉRICOS NA CURVA DE EQUILÍBRIO COM OXIGÊNIO - O efeito alostérico de ligante foi estudado através de determinação das curvas de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio, na presença de ATP 10^{-3} M em tampão Tris ou Bis Tris $I = 0,05$ entre valores de pH 6,0 a 9,0.

EQUIPAMENTOS E REAGENTES - Os principais equipamentos utilizados foram: Fonte elétrica FANEN 500 volts, Coletor de frações modelo BUCHLER, Centrífuga refrigerada da SORVALL mod.RC-2B, Espectrofotômetro ZEISS modelo MR-21 ou BECKMAN D.B., Registrador BECKMAN 10".

Os reagentes utilizados foram: Bis-Acrilamida, Comassie blue, DEAE-Sephadex, Dowex-1, Dowex-50W, Mixed Bed AG501 x 8D, Sephadex G-25, TEMED. Todos os outros foram produtos P.A. de procedência Sigma, Merck, Fisher e Biorad ou equivalentes.

RESULTADOS

SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA - Submetida à eletroforese em poliacrilamida 7,5% pH 8,9 a hemoglobina de aruanã apresentou-se em numerosas análises como um componente único com pequena migração anódica enquanto que a hemoglobina de acari-bodo, apresentou quatro componentes com mobilidades eletroforéticas relativas diferentes que foram denominados HbI, HbII, HbIII e HbIV, em função das mobilidades anódicas decrescentes. O componente HbI estava presente em maior concentração, cêrca de 50 a 60% do hemolisado total (Figura 6) Eletroforeses realizadas individualmente não revelaram variações apreciáveis em seus perfis, sugerindo-se a inexistência, nas condições descritas, de polimorfismo nas espécies examinadas

SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA - O hemolisado de acari-bodo desionizado foi eluido em gradiente linear de pH com Tris-Cl 0,05M pH 9,0 e Tris-Acetato 0,05M pH 6,0 numa coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 e foram obtidos quatro frações, a primeira eluída a pH 9,0 correspondente ao primeiro componente eletroforético, HbI e outras três frações menores correspondentes a HbII, HbIII e HbIV eluidas em pH decrescente (Figura 7).

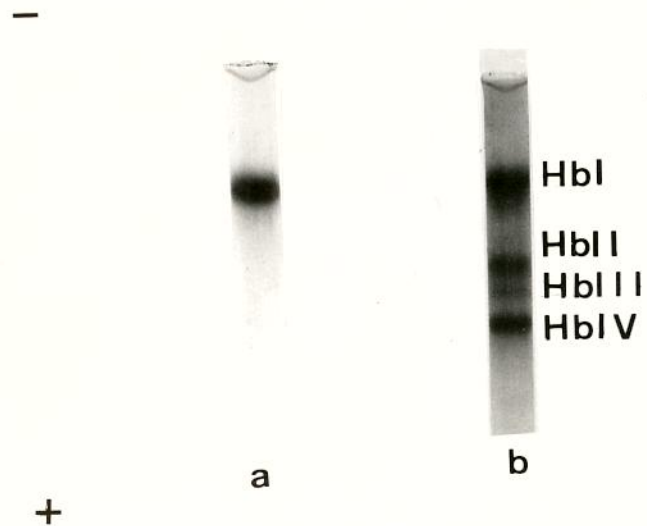


Figura 6. - COMPONENTES DE HEMOGLOBINA POR ELETROFORESE EM POLI-
ACRILAMIDA. a) EM ARUANÃ, b) EM ACARI-BODO.

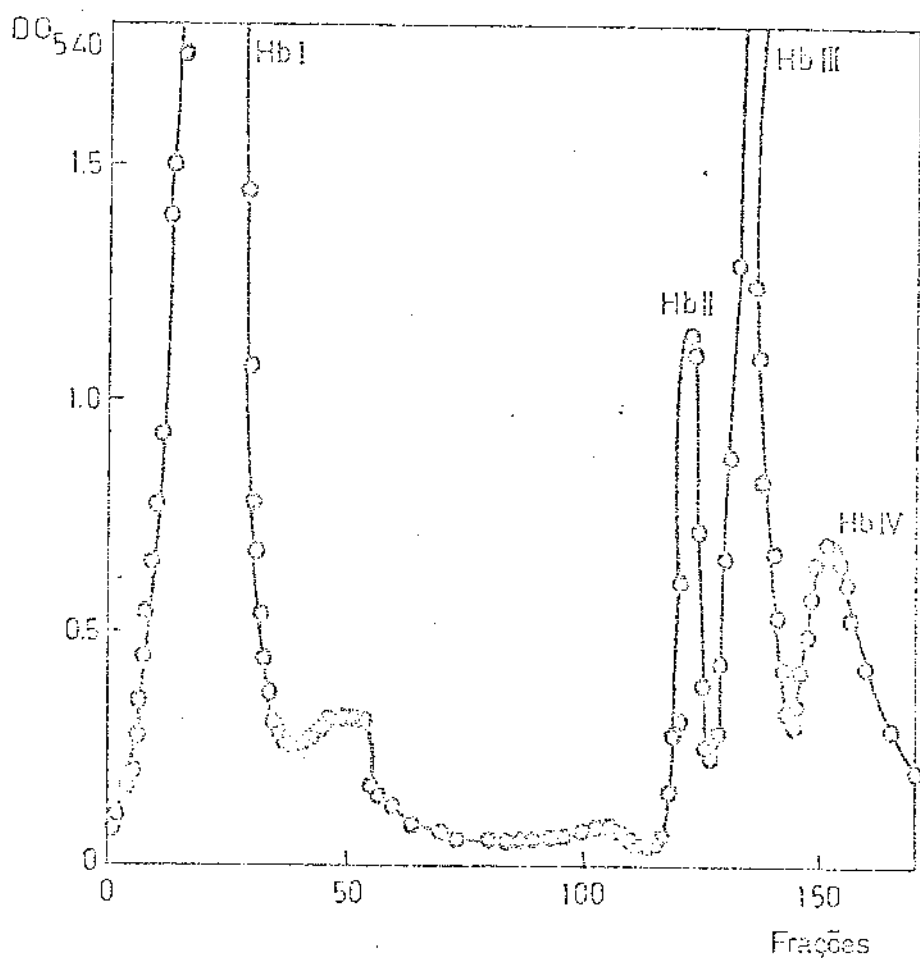


Figura 7. - SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE HEMOGLOBINA DE ACARI-BO-DO, POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA, DEAE-SEPHADEX-A50 EM GRADIENTE DE pH.

EFEITO BOHR NA HEMOGLOBINA DE ARUANÃ - O efeito Bohr ou efeito do pH nas curvas de equilíbrio de oxigênio de aruanã foi analisado em hemoglobina desionizada utilizando-se o método espectrofotométrico descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram expressos em forma logarítmica, e foi construído o gráfico $\log \bar{Y} / 1 - \bar{Y}$ em função de $\log PO_2$. A Figura 8 e a Tabela II mostram uma grande dependência do pH da curva de saturação da hemoglobina com oxigênio, obtendo-se no intervalo de pH 5,5 a 6,5 uma saturação com o ligante, menor que 50% e um valor de "n" menor que 1, indicando uma cooperatividade negativa entre os sítios de interação nestes pH. No intervalo de pH 6,5 a 7,0 observou-se uma maior sensibilidade de hemoglobina pelo oxigênio, pois com uma pequena mudança de pH obteve-se grande variação da afinidade da mesma pelo gás e o valor de "n" neste intervalo de pH tornou-se maior que 1, indicando pois uma interação favorável, cooperativa, entre os sítios. Já em intervalo de pH superior entre 7,6 e 9,2, uma pequena influência do pH no equilíbrio de oxigênio pode ser evidenciada, enquanto que o valor de "n" foi igual a 1 indicando uma independência de interação entre os sítios heme nesta faixa de pH. É importante notar que a maior afinidade de hemoglobina por oxigênio reflete-se na pressão de oxigênio necessária para se obter uma maior porcentagem de sítios oxigenados.

De acordo com a Figura 8, e a Tabela II, os valores de "n" encontrados em pH entre 5,5 e 6,1 foram menores que 1, indican-

do interação negativa entre os hemes na molécula de hemoglobina. Assim há uma marcada resistência na molécula de ser saturada com oxigênio uma vez que não se conseguiu saturação da ordem de 50% em pH 6,1. (Efeito Root) (Figura 9).

Tabela II - EFEITO DO pH NO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO EM FUNÇÃO DE LOG P₅₀ E NA COOPERATIVIDADE, VALOR DE "n" NA HEMOGLOBINA DE ARUANÃ.

pH	Log P ₅₀	n
5,7	1,96	0,55
6,1	1,92	0,48
6,4	1,60	0,30
6,7	1,04	1,20
6,9	0,64	1,83
7,6	-0,16	1,00
8,2	-0,24	0,87
8,7	-0,32	0,85
9,2	-0,36	1,09

No estudo do efeito de ATP na curva de equilíbrio de oxigênio de hemoglobina de aruanã (Figura 10) foi observado que nos

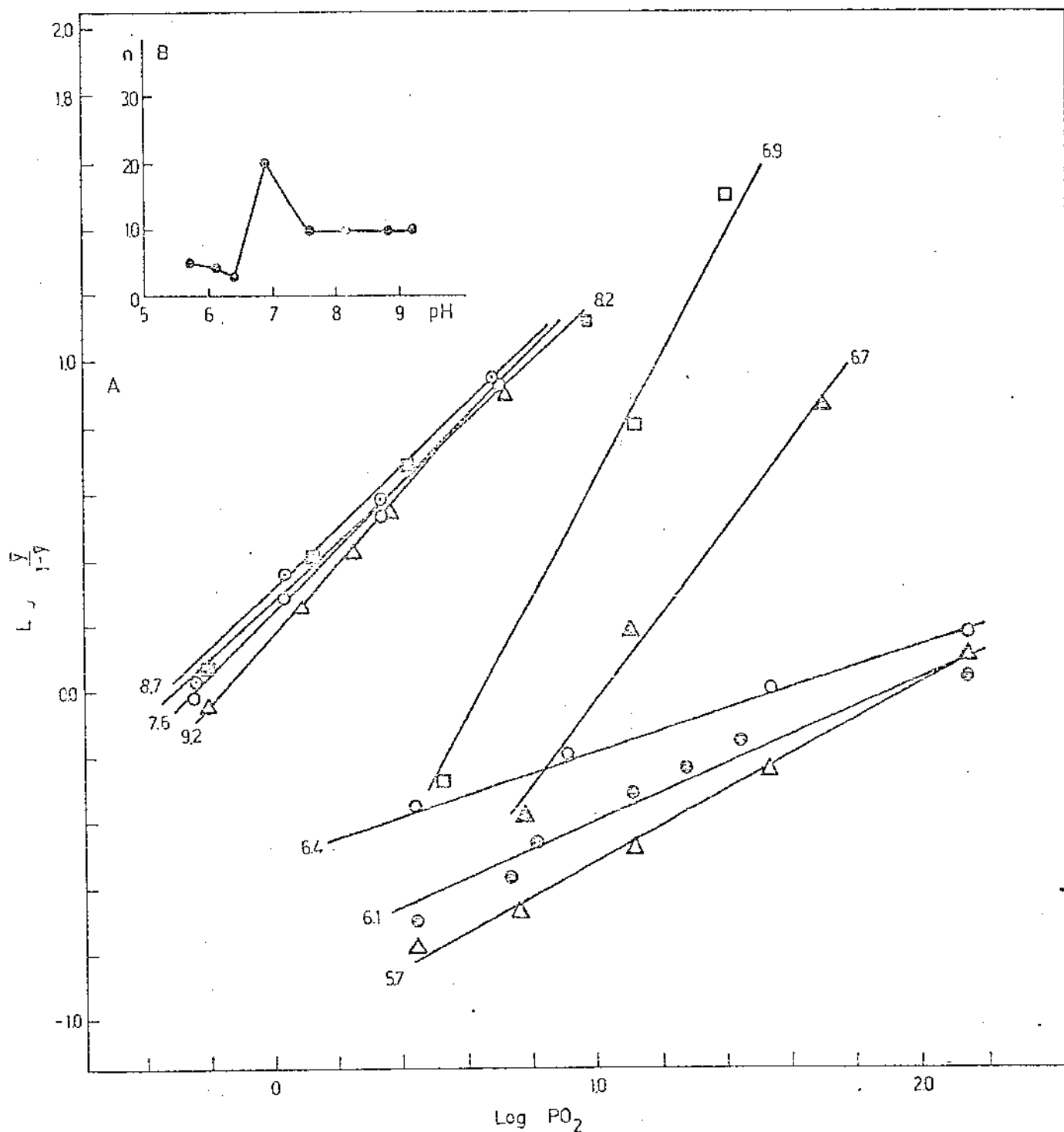


Figura 8. - EFEITO DO pH. A)- NA CURVA DE EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO, B)- NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO COM HEMOGLOBINA, DE ARUANÃ.

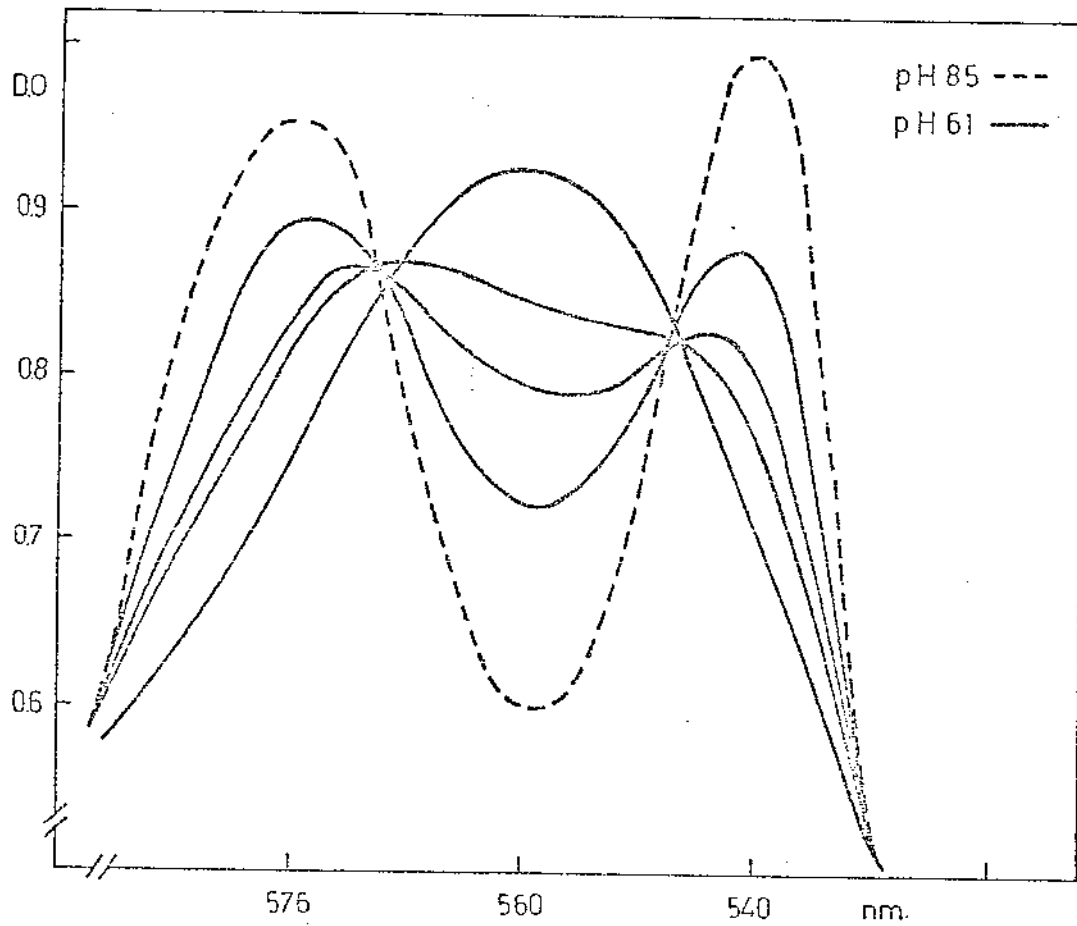


Figura 9. - EFEITO ROOT EM ARUANÃ, INSATURAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO A pH 6,1 (LINHA CONTÍNUA). SATURAÇÃO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO A pH 8,5 (LINHA PONTILHADA).

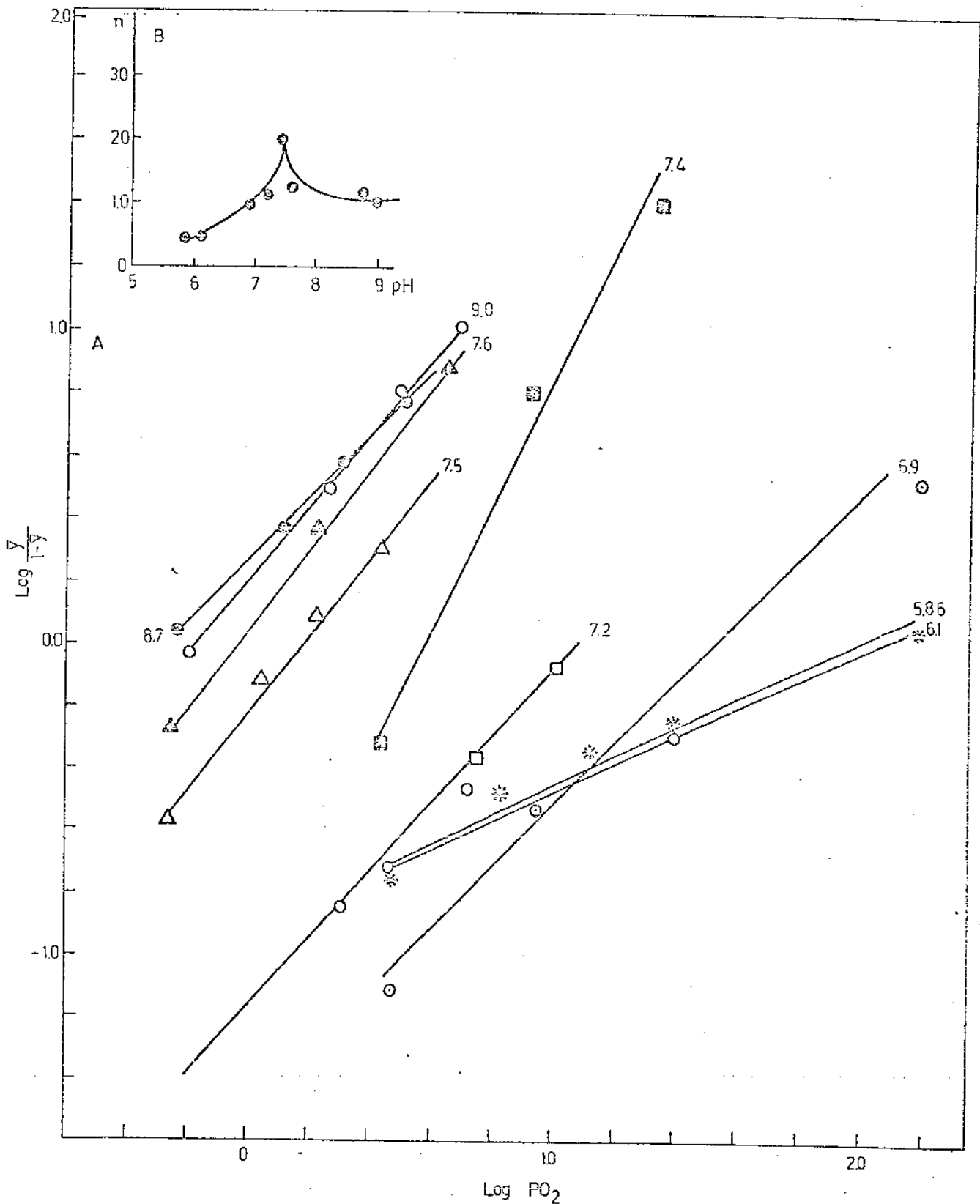


Figura 10. - EFEITO DO pH E ATP. A) - NA CURVA DE EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO, B) - NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO COM HEMOGLOBINA, EM ARUANA.

pH descritos entre 5,8 - 7,2 há menos de 50% de saturação dos grupos heme na presença de ATP 10^{-3} M e uma grande variabilidade do valor "n" em torno de 0,5 a 2,0. A maior dependência do pH observada entre os valores de 6,5 a 7,0 na ausência de ATP comparada aos valores obtidos na sua presença em torno de pH 7,2 a 7,5, mostra um deslocamento na curva de equilíbrio de oxigênio para a direita, correspondente a um efeito alostérico negativo. Nos pH 7,6 a 9,0 visualizamos um efeito menor do ATP 10^{-3} M e um valor inalterado de "n".

A afinidade de hemoglobina de aruanã expressa em termos de $\log P_{50}$ em função do pH, na Figura 11 confirma o grande efeito Bohr com um valor $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -1,44$ encontrado nesta hemoglobina demonstrado por uma pronunciada dependência da curva de afinidade da hemoglobina pelos valores de pH. Esta curva, na presença de ATP 10^{-3} M revela valores mais altos de $\log P_{50}$ indicando um efeito alostérico negativo pronunciado, e máximo a pH 7,0. A observação da curva em pH acima de 7,6 e abaixo de 6,5 revela pequeno efeito de ATP. E efeitos menores ainda são encontrados em pH 8,7 e 5,7.

Os resultados do equilíbrio de oxigênio na hemoglobina na presença de ATP expressos em termos de P_{50} e "n" estão resumidos na Tabela III. Os valores de P_{50} mostram nitidamente sua dependência em função do pH com valores máximos a pH 5,7, enquanto que os valores de "n" apresentam grande variabilidade de cooperatividade existente entre os sítios de união de oxigênio em diferentes pH.

Tabela III - EFEITO DO pH E ATP NO EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO EM FUNÇÃO DE LOG P₅₀ E NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO COM HEMOGLOBINA, VALOR DE "n", DE ARUANÃ.

ATP 10⁻³M

pH	LogP ₅₀	n	pH	LogP ₅₀	n
5,7	1,96	0,55	5,8	1,96	0,45
6,1	1,92	0,48	6,1	2,04	0,44
6,4	1,60	0,30	6,9	1,52	1,00
6,7	1,04	1,20	7,2	1,08	1,12
6,9	0,64	1,83	7,4	0,56	2,00
7,6	-0,16	1,00	7,5	0,18	1,28
8,2	-0,24	0,87	7,6	0,04	1,30
8,7	-0,32	0,85	8,7	-0,28	1,20
9,2	-0,36	1,09	9,0	-0,16	1,00

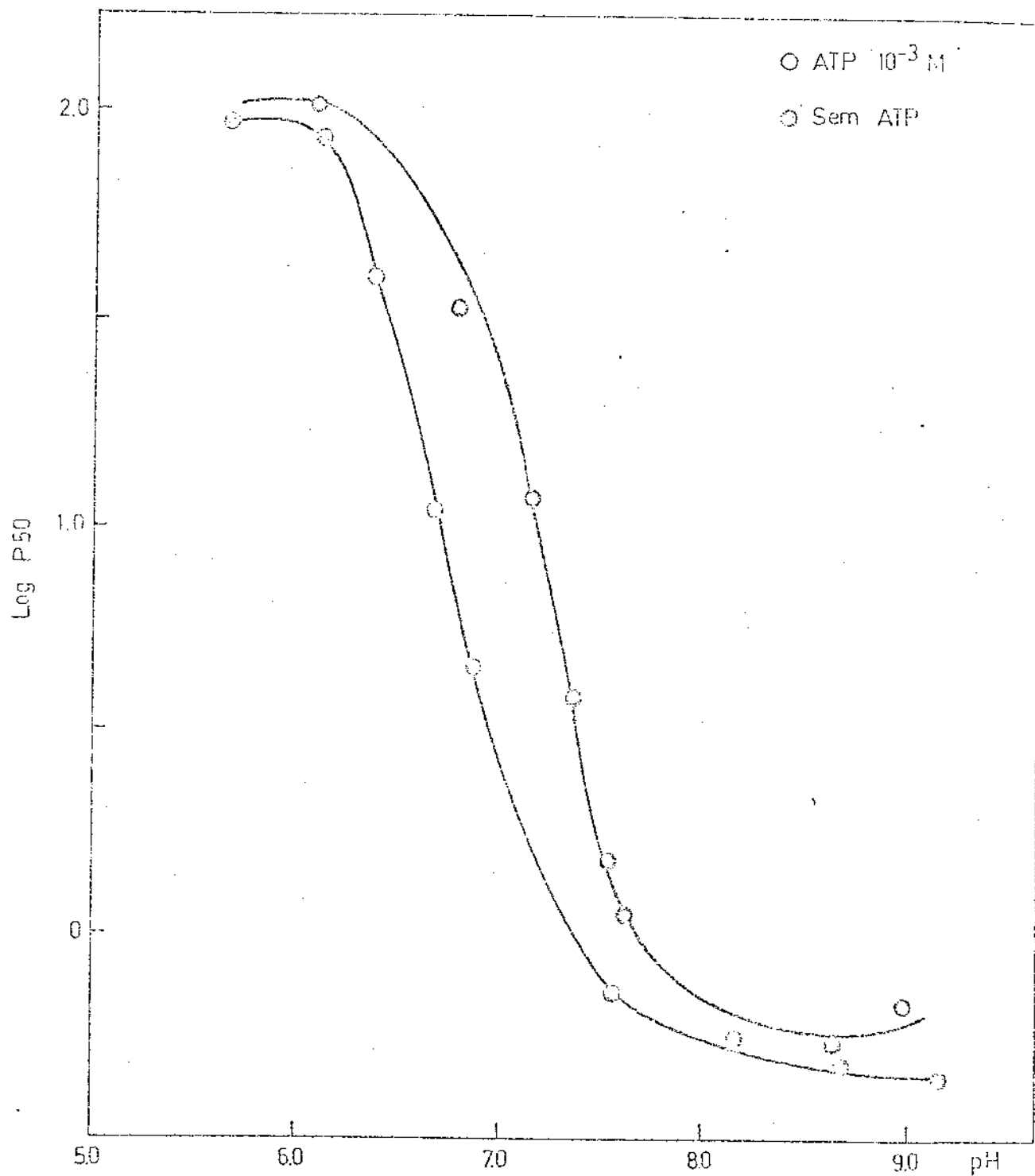


Figura 11. - AFINIDADE DE HEMOGLOBINA DE ARUANÃ EM TERMOS DE LOG P₅₀ E pH, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ATP.

EFEITO BOHR EM HEMOGLOBINA DE ACARI-BODO - A análise do equilíbrio de oxigênio em função do pH no hemolisado total de hemoglobina da outra espécie, acari-bodo, expressos no gráfico de $\log \bar{Y}/1 - \bar{Y}$ em função de $\log PO_2$, na Figura 12, Tabela IV revelou pequena influência do pH. A variação máxima de 0,2 unidades na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e um valor de "n" próximo de 1 indicam a independência do pH do grau de interação entre os grupos heme.

Tabela IV - EFEITO DO pH NO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO E NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO NOS COMPONENTES TOTAIS DE HEMOGLOBINA DE ACARI-BODO.

pH	Log P ₅₀	n
6,6	0,04	1,3
7,0	-0,12	1,3
7,8	-0,20	1,3
8,3	-0,16	1,0

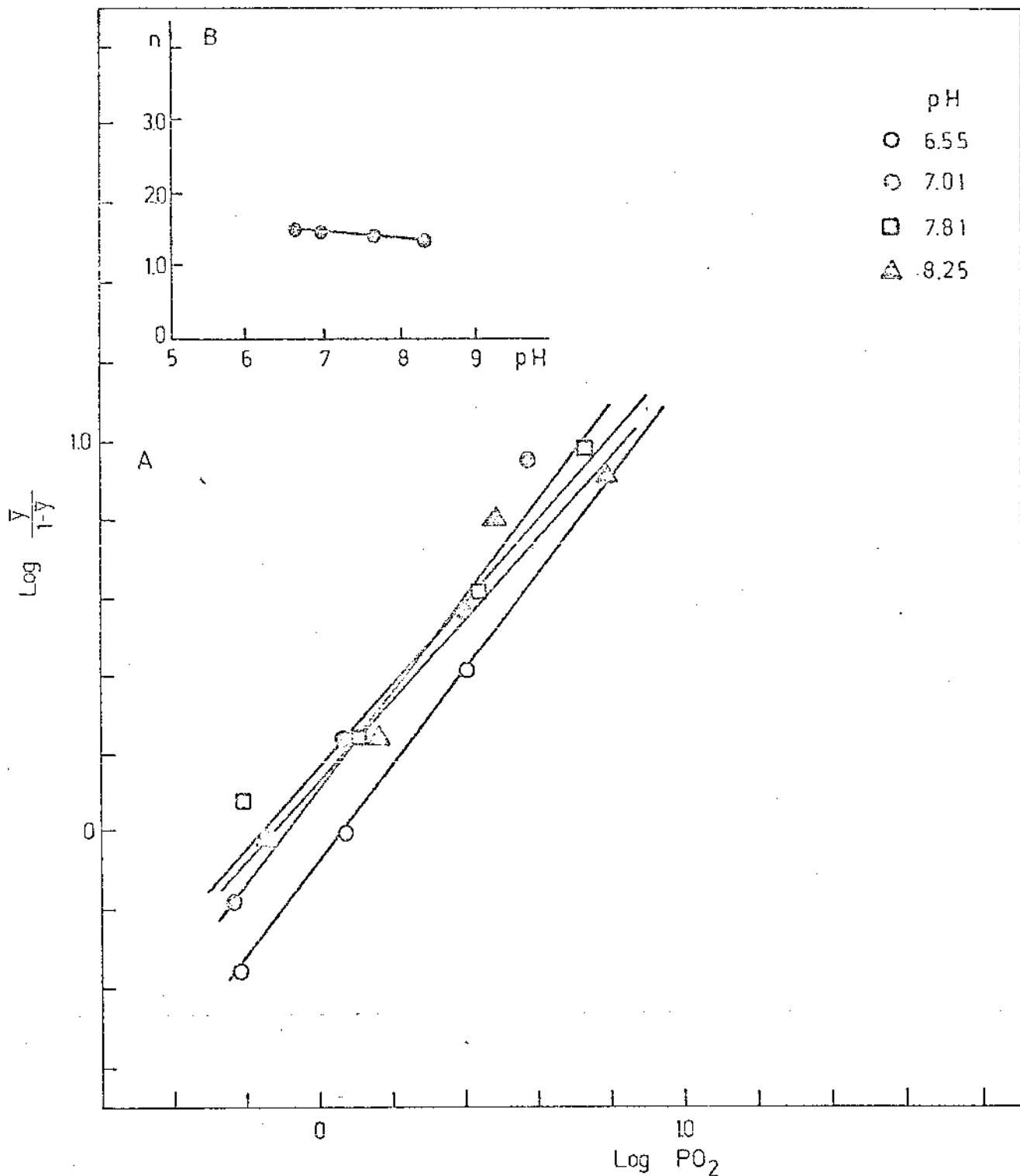


Figura 12. - EFEITO DO pH, A)- NA CURVA DE EQUILÍBRIO DE HEMOGLOBINA COM OXIGÊNIO, B)-NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO COM HEMOGLOBINA, DE ACARI-BODO.

O exame da curva de oxigênio nos componentes isolados de hemoglobina de acari-bodo, nos levou a diferentes resultados, assim o componente HbI, aquele que apresentou a menor mobilidade anódica e o primeiro a ser eluído da coluna de DEAE-Sephadex A-50, o mais concentrado dos componentes, mostrou, na curva de equilíbrio de oxigênio onde são expressos valores de $\log P_{50}$ em função de pH, (Figura 13 e Tabela V) um pequeno efeito Bohr reverso, com um valor máximo de $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = 0,22$ entre valores de pH 7,4 a 8,3, indicando uma maior afinidade de oxigênio por hemoglobina em pH baixo. Na presença de ATP $10^{-3}M$ um efeito oposto pode ser observado obtendo-se efeito Bohr normal de valor $-0,18$ entre os pH 7,4 e 8,3. Este efeito tende a desaparecer em pH acima de 8,0. Nos valores obtidos de afinidade de oxigênio no componente HbI, em função de $\log P_{50}$ e "n" indicados na Tabela V observou-se que a pressão de oxigênio necessária para atingir maior saturação de grupos heme foi muito pequena indicando uma afinidade alta em pH baixo. Estes valores se invertem na presença de ATP $10^{-3}M$. Os valores de "n" mostraram-se maior que 1, indicando uma pequena interação cooperativa entre os grupos heme. O ATP $10^{-3}M$, neste caso não apresentou nenhum efeito evidente.

Tabela V - EFEITO DO pH E DE ATP NO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO E NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO DO COMPONENTE HbI DE ACARI BODO.

			ATP 10^{-3} M		
pH	LogP ₅₀	n	pH	LogP ₅₀	n
6,7	0,15	1,87	6,7	0,70	1,4
7,4	0,22	1,40	7,4	0,51	1,6
7,8	0,25	1,54	7,8	0,40	1,5
8,3	0,42	1,56	8,3	0,34	1,6
8,8	0,39	1,40	8,8	0,36	1,5

No componente HbIV, correspondente ao componente de maior migração eletroforética anódica, por outro lado, a curva de equilíbrio de oxigênio expressa em valores de $\log P_{50}$ em função de pH (Figura 13 Tabela VI) mostrou um efeito Bohr considerado normal, com um valor de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,66$ entre os pH 6,2 e 8,2. O mesmo componente HbIV na presença de ATP 10^{-3} M não apresentou diferença apreciável comparado com a curva e sua ausência pelos valores obtidos de $\log P_{50}$ e "n", dados na Tabela VI pode-se observar uma pequena variação na cooperatividade com um valor de "n" = 1,9 a pH 7,5 e na presença de ATP 10^{-3} M um valor máximo em pH 7,1.

O valor de $\log P_{50} = -0,11$ indica a afinidade máxima por oxigênio que ocorre em pH 8,2 mantendo-se na presença de ATP 10^{-3} M.

Tabela VI - EFEITO DO pH E DE ATP NO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO E NA COOPERATIVIDADE DE OXIGÊNIO DO COMPONENTE HbIV DE HEMOGLOBINA DE ACARI-BODO.

pH	Log P ₅₀	n	pH	Log P ₅₀	n
6,2	1,20	1,3	6,2	1,00	1,0
6,5	0,50	1,3	7,1	0,00	1,7
7,5	-0,08	1,9	7,6	-0,04	1,5
8,2	-0,11	1,1	8,4	-0,26	1,2

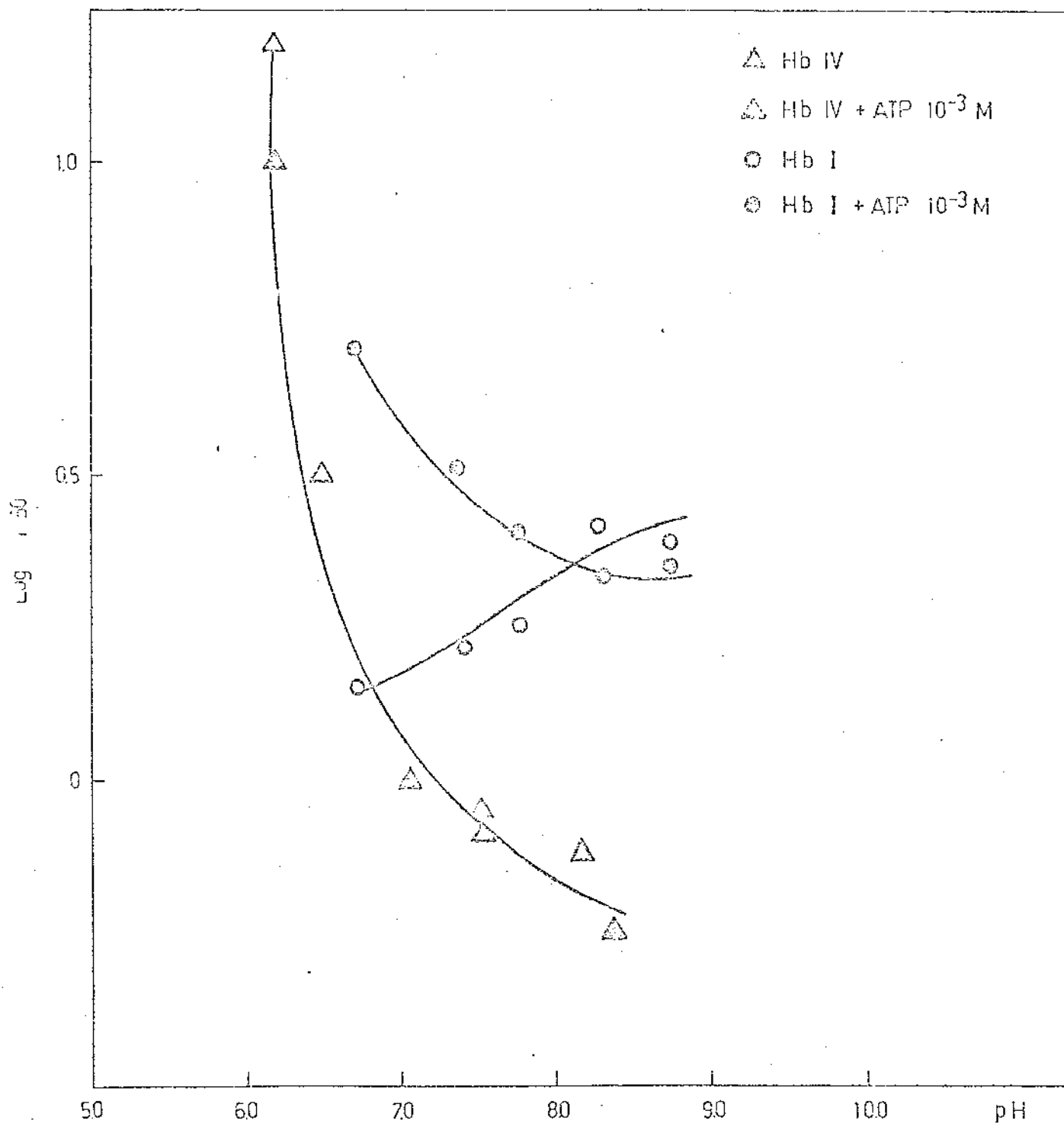


Figura 13. - AFINIDADE DE HEMOGLOBINA DE ACARI-BODO, EM TERMOS DE LOG P₅₀ E pH NOS COMPONENTES Hb I E Hb IV, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ATP.

DISCUSSÃO

Evidências anteriores estabelecem que a multiplicidade de componentes observados por diferentes métodos nas hemoglobinas de diferentes espécies podem estar correlacionadas tanto com as suas propriedades fisiológicas como com as variações ambientais em que vivem os animais. Assim, peixes vivendo em regiões de grande variabilidade térmica apresentam hemoglobinas adaptadas para suportar estas condições e conseqüentemente temos populações de maior polimorfismo enquanto que padrões de hemoglobina menos complexos com um ou dois componentes são encontrados em peixes marinhos de profundidade, meio ambiente de pequena variação térmica (BONAVENTURA, BONAVENTURA e SULLIVAN, 1975).

Estas assertivas, contudo, parecem difíceis de serem aplicadas ao nosso caso, pois o aruanã, peixe que vive em águas superficiais muito mais sujeitas às variações de temperatura nas condições climáticas da região apresenta uma única hemoglobina de acordo com critérios eletroforéticos e cromatográficos e o acari-bodo, animal que vive em águas de maior profundidade, com menor variação de temperatura, apresenta quatro componentes eletroforéticos sendo o de maior proporção, catódico, e os três outros componentes, anódicos. Evidentemente, de acordo com nossos resultados, outros fatores que não a temperatura estão participando para a multiplicidade dos componentes encontrados no acari-bodo.

Mais que a multiplicidade de componentes, a afinidade destes pelo oxigênio em peixes parece estar relacionada com as condições ambientais, assim os valores de P_{50} são proporcionais à quantidade de oxigênio presente no meio, encontrando-se geralmente valores baixos para 50% de saturação de hemoglobina, naqueles que vivem em águas pouco oxigenadas indicando sua alta afinidade pelo ligante. Nossos resultados e outros anteriores corroboram estas afirmativas já que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio encontrada no acari-bodo é alta e conseqüentemente os valores de P_{50} em pH em torno de 7,0 são baixos da ordem de 0,69mm de Hg. No aruanã, por outro lado, sendo peixe que vive em águas superficiais muito oxigenada os valores de P_{50} encontrados nas mesmas condições são mais alto da ordem de 4,36mm de Hg indicando uma menor afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

O efeito Root (ROOT, 1931), isto é, a não saturação da hemoglobina pelo oxigênio pe pH baixo, observado no aruanã e cujo mecanismo não tem sido bem compreendido do ponto de vista molecular (NOBRE, PARKURST e GIBSON, 1970; BONAVENTURA, SULLIVAN e BONAVENTURA, 1976) pode ser explicado pela presença da bexiga natatória nestes peixes. De fato a presença deste órgão hidrostático bastante especializado, controlador da flutuabilidade do peixe, pode sobrecarregar o organismo com quantidade extra de oxigênio que poderia causar distúrbios metabólicos, uma vez que as descargas de oxigênio aos tecidos estaria prejudicada. O efeito Root aliado a

relativamente baixa afinidade de hemoglobina pelo oxigênio encontrado no aruanã proporcionam condições para a eficiente oxigenação tecidual mesmo em pressões parciais elevadas de gás. É interessante observar que hemoglobinas amplamente estudadas como a de carpa, Ciprinus carpio (NOBLE, PARKURST e GIBSON, 1970) e HbIV de truta, Salmo irideus (BRUNORI, BONAVENTURA, GIARDINA, BOSSA e ANTONINI, 1973) possuem esta característica. Por outro lado, no acari-bodo, peixe sem bexiga natatória, o efeito Root não é observado.

Um outro fenômeno que sofre variações de acordo com as necessidades dos animais é o efeito Bohr cuja grandeza tem se mostrado em muitas espécies ser diretamente proporcional ao grau de atividade dos indivíduos (RIGGS, 1970). Nossos achados com relação ao hemolisado total atestam esta correlação. Assim, o aruanã, peixe de grande atividade motora possui alto efeito Bohr com um valor de $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ de -1,44 enquanto que no acari-bodo, lento, este valor diminui para -0,66. Evidentemente, no caso do aruanã, que apresenta uma única hemoglobina o valor de efeito Bohr encontrado deverá corresponder àquele do hemolisado, no acari-bodo entretanto, graças aos seus quatro componentes, este efeito representa no hemolisado na verdade uma média dos efeitos de cada componente separado.

De acordo com vários autores (RIGGS, 1976; BRUNORI, 1975; POWERS, 1974), os vários componentes de hemoglobina no hemolisado corresponde a proteínas com propriedades funcionais diferentes, fi

siologicamente econômicas para o organismo. Assim, o acari-bodo se mostrou em nossos resultados como constituído de duas famílias de hemoglobina, uma que representa cerca de 50% do hemolisado total com propriedades funcionais diferentes das três outras cujas propriedades se apresentam muito semelhantes entre eles mas profundamente diferentes do primeiro componente. De fato o componente denominado HbI apresentou pequeno efeito Bohr reverso da ordem de +0,22 que tende a normalidade na presença de efeitos heterotrópicos, ATP com um valor de -0,18, enquanto que HbIV apresenta efeito Bohr chamado normal com um valor de -0,66, este é, semelhante a da hemoglobina humana e nenhum efeito de ATP. Baseados nos autores citados poderíamos assumir que o acari-bodo apresenta uma hemoglobina HbI capaz de suprir uma oxigenação adequada em caso de exercícios mais intensos onde os níveis de ácido láctico e de ATP são elevados. A presença de ácido láctico deslocaria a curva do efeito Bohr para regiões de pH mais baixo e afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminuiria mas somente em condições de conteúdo de ATP alto o que parece ser o caso em animais sujeitos a exercícios muito intenso como o acari-bodo. Já os outros componentes funcionariam em condições mais amenas. Enfim, a HbI seria a proteína utilizada somente em caso de emergência auxiliando os outros componentes no seu papel transportador de oxigênio.

Se podemos comparar nossos resultados com aqueles encontrados em hemoglobinas de truta e carpa alguma correlação entre

estrutura e função poderiam ser alcançadas. Assim a truta apresenta quatro hemoglobinas com componentes funcionalmente diferentes entre eles, sendo HbI isenta de efeito Bohr e HbIV com efeito Bohr bastante elevado além de efeito Root e a carpa possui vários componentes bastante semelhantes em funcionalmente entre si.

No caso da truta as cadeias polipeptídicas α e β , diferem profundamente em sua estrutura primária (BARRA, BOSSA, BONAVENTURA e BRUNORI, 1973) enquanto que na carpa as cadeias α são idênticas diferindo exclusivamente na cadeia β (HILSE e BRAUNITZER, 1968). Estes resultados poderiam pois ser generalizados para o caso tanto de acari-bodo como de aruanã. Estudos estruturais mais minuciosos contudo estão ainda por fazer.

Do exposto pode-se inferir que no caso de acari-bodo suas diversas hemoglobinas exercem diferentes funções como tem sido postulado pelos autores (BRUNORI, 1975; RIGGS, 1976) mas no caso do aruanã que apresenta um único componente este está preparado para exercer diferentes funções de acordo com as necessidades fisiológicas e ambientais do peixe. Desta forma tanto a estrutura primária como mudanças conformacionais ocorridas por ligantes, responderiam pela multiplicidade de funções da hemoglobina.

Na verdade o estudo do coeficiente de Hill (valor de n) em diferentes pH, como o que foi feito na presente tese, dão idéias mais ou menos reais a respeito de mudanças conformacionais induzidas pelos efetores alostéricos. Assim os valores de " n " encontra-

dos para o aruanã variáveis entre 0,9 a 0,18 a pH 6,0 a 7,0 são coincidentes com o alto efeito Bohr encontrado nestes peixes. Já no hemolisado total de acari-bodo onde os valores de "n" são praticamente constantes o efeito Bohr é bem menor. De acordo com nos resultados as hemoglobinas de acari-bodo que parecem ser funcionalmente diferentes, os valores de "n" não variam de maneira considerável indicando que as interações homotrópicas não são tão importantes como as heterotrópicas. Por outro lado uma variação ponderável no valor de "n" parece ser encontrado em hemoglobinas funcionalmente semelhantes entre elas ou naquele que se apresenta com um único componente como o caso de aruanã. O efeito Root encontrado tanto no aruanã como na carpa (NOBLE, PARKURST e GIBSON 1970; GILLEN e RIGGS, 1972) estaria de alguma forma associado a esta variação nos valores de "n".

Finalmente, podemos concluir com os estudos destas duas espécies de peixes do rio Amazonas que muitas regras gerais estabelecidas para peixes de outras regiões, marinhos ou de água doce são aqui confirmadas, outras contudo, como o caso da multiplicidade de componentes em relação a temperatura em que vive o animal não o foram. Na verdade do rio Amazonas apresenta-se com características próprias diversas de outros rios graças ao seu enorme volume de água, impondo ambiente de grande variabilidade à vida dos peixes e estes por sua vez devem apresentar características vitais das mais variáveis para suportar aquela variabilidade e isto evi-

dentemente se estende à hemoglobina. A presente tese se limitou exclusivamente a estas duas espécies e cabe-nos informar que outros estudos principalmente cinéticos com aruanã e acari-bodo confirmam nossos resultados (PORTUS, FARMER, NOBLE, RIGGS, BRUNORI, BUN, BONAVENTURA, PHELPS e DAVIS, 1977; BRUNORI, BONAVENTURA, FOCESI, PORTUS, WILSON, 1977) e que para o futuro tanto estas como outras espécies de peixes do rio Amazonas deverão ser estudadas com mais pormenores, sempre com objetivo de conhecer melhor um ponto crítico da natureza ou a relação que existe entre a estrutura das biomoléculas e suas funções.

BIBLIOGRAFIA

ANTONINI,E. and BRUNORI,M. Hemoglobin and myoglobin in their reations with ligands. Amsterdan, North Holland, 1971.

BARRA,D.;BOSSA,F.,BONAVENTURA,J. and BRUNORI,M. Hemoglobin components from trout (Salmo iredeus): determination of the carboxyl and amino terminal sequences and their functional implications. FEBS Letters, 35: 151-154, 1973.

BENESCH,R. and BENESCH,R.E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem.Biophys.Res.Commun, 26:162-167, 1967.

BENESCH,R.E. and BENESCH,R. The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. Adv.Prot.Chem,28: 211-237, 1974.

BONAVENTURA,J.;BONAVENTURA,C. and SULLIVAN,B. Hemoglobins and hemocyanins: Comparative aspects of structure and function. J.Exp.Zool, 194: 155-174, 1975.

BONAVENTURA,C.;SULLIVAN,B. and BONAVENTURA,J. Spot hemoglobin studies on the Root effect hemoglobin of a marine teleosts. J.Biol.Chem, 251: 1871-1876, 1976.

- BRIEHL, R. The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. J. Biol. Chem., 238: 2361-2666, 1963.
- BRUNORI, M. Molecular adaptation to Physiological requirements: The hemoglobin Systems of trout. In: current topics in cellular regulation, 9: 1-38, 1975.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; GIARDINA, B.; BOSSA, F. and ANTONINI, E. Hemoglobins from trout: Structural and functional properties. Molec. Cell. Biochem., 1: 189-196, 1973.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI, Jr. A.; PORTUS, M. I. G. and WILSON, M. T. Separation and characterization of the hemoglobin components of acari bodo. In press, Comp. Biochem. Physiol., 1977.
- CHANUTIN, A. and CURNISH, R. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes Arch. Biochem. Biophys., 121: 96-102, 1967.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Method and applications to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404-427, 1964.
- DUBE, S. C. and MUSHI, J. S. A quantitative study of the erythrocytes and hemoglobin in the blood of an Air-breathing fish, Anabas testudineus in relation to its body size. Folia Haematol., Leipzig, 100: 436-446, 1973.

RESUMO

Alguns aspectos comparativos entre hemoglobinas de duas espécies de peixes do rio Amazonas foram analisados com a finalidade de estabelecer as bases moleculares de suas propriedades funcionais, bem como as interações entre estas proteínas com outras moléculas e íons. As espécies estudadas possuíam diferentes características fisiológicas de respiração, atividade metabólica e meio ecológico.

A hemoglobina de Osteoglossum bicirrhosum por eletroforese em poliacrilamida apresentou-se como um componente único com pronunciado efeito Bohr e efeito Root. Os valores de "n" na equação de Hill, mostraram variações apreciáveis com o pH, tanto na presença como na ausência de ATP 10^{-3} M, com a menor afinidade a pH 7,4. As hemoglobinas de Pterygoplichthys pardalis no hemolisado total não apresentaram efeito Bohr, contudo os quatro componentes separados mostraram propriedades funcionais diferentes. O primeiro HbI, isolado por coluna DEAE-SEPHADEX mostrou pequeno efeito Bohr reverso e uma acentuada influencia de ATP 10^{-3} M em pH baixo sobre este efeito tornando-o normal, enquanto que os três outros componentes apresentaram efeito Bohr normal e nenhuma influencia de ATP sobre ele.

Dos achados foi possível estabelecer que o Osteoglossum bicirrhosum, peixe muito ativo, de águas superficiais, com respi-

ração branquial, apresenta uma única hemoglobina com alto efeito Bohr e Root enquanto que Pterygoplichthys pardalis, peixe lento, de águas profundas, com respiração branquial e aérea facultativa, possui duas famílias de hemoglobinas bastante diferentes em suas propriedades funcionais.

Nossos resultados mostraram claramente a capacidade de adaptação molecular das hemoglobinas de peixe às condições fisiológicas e ambientais que eles estão sujeitos.

SUMMARY

Two species of fish hemoglobin from Amazon river were analyzed in order to establish the relationship between their molecular and physiological properties as well as their interactions with others molecules and ions. The species were different regarding respiration, metabolic activity and habitat.

The polyacrylamide electrophoresis pattern of Osteoglossum bicirrhosum hemoglobin showed only one component and pronounced Bohr and Root effect and the Hill coefficient showed significant variation with the pH in the presence or not of 10^{-3} M ATP, with the lowest affinity at pH 7.4.

The total hemolysate of Pterygoplichthys pardalis presented no Bohr effect nevertheless the four isolated components showed different functional properties thus the HbI component, isolated by DEAE-SEPHADEX showed small reverse Bohr effect that becomes normal in the presence of 10^{-3} ATP at low pH. The other three components presented normal Bohr effect and ATP does not change this effect.

From these findings was possible to establish that the Osteoglossum bicirrhosum, a very active fish that lives in stream with water-breathing type of respiration exhibits only one

hemoglobin with high Bohr and Root effect while Pterygoplicthys pardalis a bottom fish both air and water breathing types of respiration have two family of hemoglobins with different functional properties.

These results clearly show the capacity of molecular adaptation of fish hemoglobin to adapt to both the metabolic requirements and environment variations of the animals.

- FRY, F.E. The aquatic respiration of fish. Physiol. Fisches, 1: 1-63, 1957.
- GRAY, E.I. Comparative study of the gill area of marine fishes. Biol. Bull., 107: 219-225, 1954.
- GILLEN, R.G. and RIGGS, A. Structure and function of the hemoglobin of the carp, Cyprinus carpio. J. Biol. Chem., 247: 6039-6046, 1972.
- GRIGG, G.C. Respiration function of blood in fishes. Chem. Zool., 8: 331-368, 1974.
- HILL, A.V. 1910, Apud. Antonini, E. and Brunori, M, 1971. Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands.
- HILSE, K. and BRAUNITZER, G. Die aminosäuresequenz der α ketten der beiden hauptkomponenten des karpfenhämoglobins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 433-450, 1968.
- HUGHES, G.M. The dimensions of fish gills in relation to their function. J. Exp. Biol., 45: 177-195, 1966.
- HUGHES, G.M. and MORGAN, M. 1970, Apud: Kjell Johansen. Comparative Physiology: Gas exchange and circulation in fishes. Ann. Rev. Physiol., 33: 569-612, 1971.
- JOHANSEN, K. Air breathing in fishes. Fish Physiology, New York, Vol. IV, 1970.

- KILMARTIN, J.V. and ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO₂ combination and reduction of the Bohr effect in hemoglobin chemically modified at its αamino groups. Nature, 222:1243-1246, 1969
- KILMARTIN, J.V.; BREEN, G.C.; ROBERTS, K and HO, C. Direct measurement of the pK values of an alkaline Bohr group in human hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci., 70: 1246-1249, 1973.
- LENFANT, C. and JOHANSEN, K. Respiratory adaptations in selected amphibians. Resp. Physiol. 2: 247-260, 1967.
- NOBLE, B. and RIGGS, A. In: Alpha Helix IV, Expedition, "Comunicaçãõ pessoal", 1976.
- NOBLE, R.W.; PARKURST, L. and GIBSON, Q.H. The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, Cyprinus carpio. J. Biol. Chem., 245:6628-6633, 1970
- ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 321-349, 1964.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; MAZZARELLA, L.; CROWTHER, R.A.; GREER, J. and KILMARTIN, J.V. Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in hemoglobin. Nature, 222: 1240-1243. 1969.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

- PORTUS, M. I. G.; FARMER, M.; NOBLE, R. W.; RIGGS, A.; BRUNORI, M.; BUN, F.;
BONAVENTURA, J.; PHELPS, C. and DAVIS, J. Studies of the reactions
of the hemoglobins of Osteoglossum bicirrhosum and Arapaima
gigas with ligands. In press: Comp. Biochem. Physiol., 1977
- PROSSER, C. L. and BROWN, F. A. Comparative Animal Physiology 2ed.
Saunders, Philadelphia, 1961.
- POWERS, D. A. and EDMUNSON, A. B. Multiples hemoglobins of Catastomid
fish. I. Isolation and characterization of the isohemoglobins
from Catostomus clarkii. J. Biol. Chem. 247 :6686-6693, 1972.
- REDFIELD, A. C. The evolution of the respiratory function of the
blood. Quart. Rev. Biol., 8:31-57, 1933.
- RIGGS, A. The relation between structure and function in hemoglobins.
Cand. J. Biochem., 42: 763-765, 1964.
- RIGGS, A. Properties of fish hemoglobins. In: Fish Physiology .
Hoar W. S. & Randall D. J. New York Acad. Press, 4:209-251, 1970.
- RIGGS, A. Factors in the evolutions of hemoglobin function. Fedn.
Proc., 35: 2115-2118, 1976.
- ROOT, R. W. The respiratory function of the blood of marine fishes-
Biol. Bull., 61: 427-456, 1931.

SCHMIDT-NIELSEN, K. and LARIMES, J. L. Oxygen dissociation curves of mammalian blood on relation to body size. J. Physiol., 195, 424-428, 1958.

WYMAN, J. Heme proteins. Adv. Protein Chem., 4:407-531, 1948.

WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin. A second look. Adv. Protein Chem., 19:223-286, 1964.

WOLVEKAMP, H. P. In: Macfarlane, R. G. and Robb-Smith, A. H. T. eds. Functions of the Blood. Academic Press, New York, 1-72, 1961.

YAMANAKA, H.; YAMAGUCHI, K. and MATSUURA, F. Starch gel electrophoresis of fish hemoglobins. I. Usefulness of cyanmethemoglobin for the electrophoresis. Bull. Jap. Sci. Fisheries, 31:827-832, 1965.