

Estudos funcionais dos componentes separados da hemoglobina de um bague de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock)*

Robert L. Garlick (1); H. Franklin Bunn (2); Hans Jorgen Fyha (3); Unni E. H. Fyhn (3); Joseph P. Martin (4); Robert W. Noble (5); Dennis A Powers (6)

Resumo

Foram isoladas as duas hemoglobinas, I e II do bague de respiração aérea obrigatória *Hoplosternum littorale*. A hemoglobina não fracionada apresenta alta atividade de oxigênio, efeito Bohr alcalino normal e efeito Root. Tanto o efeito Bohr quanto o efeito Root são aumentados por 1mM ATP. A hemoglobina I fracionada apresenta uma atividade relativamente alta de oxigênio, um efeito Bohr inverso entre pH 6,0 e 8,0 ($\Delta \log p50/\Delta pH > 0$), porém sem apresentar efeito Root. Adição de 1mM ATP à hemoglobina I causa uma redução acentuada na afinidade oxigênio, mudança a um efeito Bohr alcalino normal ($\Delta \log p50/\Delta pH > 0$) mas não no efeito Root. A hemoglobina II fracionada apresenta menor afinidade de oxigênio a pH baixo e maior afinidade de oxigênio a pH alto que a hemoglobina I. A hemoglobina II apresenta um efeito Bohr alcalino acentuado que só é ligeiramente aumentado por 1mM ATP e um efeito Root a pH baixo que é aumentado por 1mM ATP. As velocidades de dissociação de O₂ observadas e combinação de CO com os componentes I e II apresentam diferenças paralelas às observadas nas medições de equilíbrio de oxigênio.

INTRODUÇÃO

Águas doces tropicais de movimento lento são freqüentemente hipóxicas, quentes e podem apresentar altas concentrações de CO₂. Estes fatores dificultam a respiração aquática e órgãos especiais, sangue e padrões de comportamento têm evoluído em certos peixes tropicais permitindo-lhes respirar oxigênio atmosférico (Carter & Beadle, 1931; Johansen, 1970; Kramer & Graham, 1976). O bague *Hoplosternum littorale* respira oxigênio atmosférico por meio de uma secção do intestino de paredes delgadas altamente vascularizada lo-

calizada em seguida ao estômago. As paredes desta secção do intestino são aglandulares, não ciliadas e apresentam vasos sanguíneos grandes na parte externa e densas camadas capilares no interior. Esta parte respiratória ocupa a maior parte do intestino. Por dissecação tem-se mostrado desprovidas de alimentos e cheias de ar (Carter & Beadle, 1931). *H. littorale* vai à superfície para respirar a cada 10 minutos independente da concentração de CO₂ da água e seu sangue apresenta uma capacidade de oxigênio muito alta relativa aos sangues de outros peixes das mesmas águas (Willmer, 1934). Concluímos que esta espécie, se mantida úmida, podia sobreviver fora da água durante a noite na ponte do "Alpha Helix".

Eletroforese preliminar (Fyhn *et al.*, 1978) e experimentos de focalização, isoelétrica (Bunn & Riggs, 1978) indicam que a hemoglobina de *H. littorale* apresenta dois componentes principais, um dos quais apresenta um efeito Bohr alcalino e o outro com um efeito Bohr inverso. Neste trabalho, temos fracionado os dois componentes da hemoglobina de *H. littorale* e temos examinado os equilíbrios de oxigênio e cinética de reações com ligantes para cada componente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Hoplosternum littorale* foram obtidas em novembro e dezembro de 1976, durante a IV Expedição Amazônica do R/V "Alpha Helix", no rio Solimões, num local aproximadamente 30 km rio acima da união deste com

(*) — Versão original inglesa publicada em *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 62A (1). 1979.

(1) — Department of Zoology, University of Texas, Austin, Texas, 78712, E.U.A.

(2) — Department of Medicine, Peter Bent Brigham Hospital, Harvard Medical School, 721 Huntington, Avenue, Boston, Massachusetts, 02115, E.U.A.

(3) — Institute of Zoophysiology University of Oslo, Blindern, Oslo 3, Norway.

(4) — Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516, E.U.A.

(5) — Department of Medicine and Biochemistry, Veterans Administration Hospital, State University of New York, Buffalo, New York, 14215, E.U.A. Established Investigator of the American Heart Association.

(6) — Department of Biology, Johns Hopkins University Baltimore, Maryland, 21218, E.U.A.

o rio Negro para formar o Amazonas. Os animais (peso corporal de 84-308g) foram tirados de uma pequena lagoa hipóxica perto do Lago de Janauacá ou foram comprados de um pescador local. Os peixes foram sangrados por punção cardíaca com uma seringa de vidro fria heparinizada e as células foram lavadas três vezes, em 10 volumes de 1,7% NaCl, 1mM Tris pH 8,0. As células foram logo lisadas por uma hora sobre gelo em 3 volumes de 1mM Tris, pH 8,0. O lisado foi feito em 0,1 M NaCl e foi centrifugado a alta velocidade durante 15 minutos para remover estromas e resíduos celular.

Eletroforese em *gel* de disco de poliácridamida (pH 8,9), registro de *gel* e eletroforese de *gel* de poliácridamida de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram realizadas como em Fyhn *et al* (1978). A relação entre a distância de migração de um componente da hemoglobina e a distância de migração de albumina de soro bovino em geis de disco alcalinos foi calculada e usada para comparar a mobilidade relativa dos componentes da hemoglobina.

A natureza do efeito Bohr de cada componente foi examinada analiticamente por focalização elétrica em *gel* de disco de poliácridamida das deoxi e carbóxi hemoglobinas como descrito por Bunn & Riggs (1978).

As curvas de equilíbrio de oxigênio foram determinadas para sangue total usando o analisador de dissociação de Oxigênio Hem-O-Scan da Aminco (American Instrument Company, Silver Spring, Md) como descrito por Powers *et al.* (1978). Amostras de sangue total foram deoxigenadas com nitrogênio 99,999% puro ou com nitrogênio contendo 5,6% de CO₂ e foram reoxigenadas com ar contendo 21% de oxigênio ou com 69,4% N₂ 25% O₂ e 5,6% CO₂.

Os glóbulos vermelhos lisados foram destituídos de fosfatos orgânicos e outros ions passando o lisado primeiro através de Sephadex G-25 médio (coluna de 2x50 cm) em Tris 0,1mM, pH 8,5 e logo através de uma coluna de 1,5x30 cm formada pelas seguintes resinas de cima para baixo: 2cm de Dowex-1 (em acetato), 2cm Dowex-50w (forma de ion de amônio) e um leito de 20 cm de uma mistura intercambiadora de ions Bio Rad AG 501x8-D.

Os componentes da hemoglobina foram separados numa coluna de 3x20 cm de DEAE-Sephadex A-50 (Sigma Chem. Co.). Uma solução contendo 600 mg de oxihemoglobina fracionada foi concentrada a 20ml num saco de diálise colocado numa suspensão de glicol de polietileno de alto peso molecular (peso médio, 20.000) e foi dialisada com mudanças freqüentes de Tris 50mM, pH 8,5 e colocada na coluna de DEAE-Sephadex mantendo equilíbrio com o mesmo tampão Tris, 700ml do tampão inicial foram passados pela coluna antes de ser estabelecido um gradiente linear entre 600ml de tampão Bis-tris de pH 7,0. A taxa de fluxo foi de ca. 35ml/hora. Frações de 7,5 ml foram coletadas e monitoradas manualmente a 542 nm. As frações separadas de hemoglobina foram logo reunidas e separadas novamente através da coluna G-25 e a coluna de fracionamento de intercâmbio iônico. Os componentes de hemoglobina separados foram usados para medições de equilíbrio de oxigênio, medições cinéticas e re-eletroforese. Todos os passos de purificação foram realizados à temperatura de 0-10°C.

Componentes fracionados e hemoglobina foram diluídos com água destilada e tampões de força iônica de 0,2(I) até uma concentração final de hemoglobina de 50 μ M (em base a heme) e força iônica igual a uma constante 0,051. Os tampões foram preparados com Bis-tris a pH menores de 7,5 ou Tris a pH maiores que este valor. Os equilíbrios de oxigênio foram determinados espectrofotometricamente em tonômetros de vidro a 20°C (Riggs & Wolbach, 1956) a longitudes de onda de 558 e 576 nm. O valor do coeficiente de Hill, n, foi determinado a partir da inclinação média dos resultados de Hill obtidos entre saturações de 25 e 75%. Equilíbrios de oxigênio foram determinados para hemoglobina fracionada e para hemoglobina mais adição de 1 ImM de ATP. Para amostras a pH baixo nas quais a hemoglobina não podia ser saturada com o oxigênio atmosférico (dado o efeito Root) uma alíquota de Tris sólido foi introduzido no tonômetro para aumentar o pH, o suficiente para poder saturar a hemoglobina completamente com O₂. Este procedimento permitiu determinar o espectro da hemoglobina totalmente oxigenada.

As curvas de transição do efeito Root foram calculadas diretamente a partir das curvas de equilíbrio de oxigênio ou foram determinadas da seguinte maneira. A hemoglobina foi diluída com Tris ou Bis-tris até um volume final de 3,0ml e uma concentração final de hemoglobina de $48 \mu\text{M}$ (heme); registros de oxi e deoxihemoglobina foram determinados da mesma amostra. As amostras foram deoxigenadas com uns poucos cristais de ditionito de sódio. Se uma amostra de pH baixo não estiver totalmente oxigenada a tensões atmosféricas de oxigênio, então suficiente Tris sódio foi adicionado à amostra para levá-la a um pH ao qual a hemoglobina estivesse saturada com oxigênio atmosférico.

Todas as medições cinéticas foram realizadas com um aparelho "stopped-flow" do tipo originalmente descrito por Gibson & Milnes (1964). Em todos os casos a força iônica da solução final após misturar foi de 0,05. As constantes cinéticas apresentados são ajustados aos quadrados mínimos nos 65% iniciais de reação observada.

As cinéticas de dissociação de oxigênio foram medidas pelo processo de mudança de pH descrito por Noble et. al. (1970). Hemoglobina oxigenada em 1mM Tris de pH 8,0 foi misturada com uma solução de ditionito de sódio em um tampão do pH desejado de força iônica de 0,1. A concentração final de hemoglobina foi aproximadamente de $30 \mu\text{M}$ em hemoequivalentes e a reação foi seguida a 560 e 540nm.

As cinéticas de combinação de monóxido de carbono com a hemoglobina foram medidas misturando as soluções de hemoglobina deoxigenada em tampões do pH desejado de força iônica 0,1 com uma solução contendo uma concentração conhecida (aproximadamente $85 \mu\text{M}$) de monóxido de carbono dissolvido em água. Após misturar, a concentração de hemoglobina, foi de aproximadamente $3 \mu\text{M}$ em hemoequivalentes. A reação foi seguida a 420 e 435 nm.

RESULTADOS

Os hemolisados de *Hoplosternum littorale* apresentam duas bandas de hemoglobina em eletroforese de gel (Fig. 1). Os padrões foram idênticos para todos os hemolisados. O com-

ponente mais anodal inclui 69% da hemoglobina total e apresenta uma mobilidade relativa de $0,52 \pm 0,02$ (Media + D.P.; N=5) comparada com albumina de soro de bovino. A hemoglobina humana A apresentou mobilidade relativa de $0,66 \pm 0,01$ (N=5). A hemoglobina menos anódica é referida aqui como hemoglobina I.

A focalização analítica isoeétrica do disco de gel de poliacrilamida indica que existem dois componentes de hemoglobina na conformação carboxi. Ab-I e Ab II apresentam pontos isoeletricos respectivamente reduzidos ou aumentados ao serem deoxigenadas. Isto indica

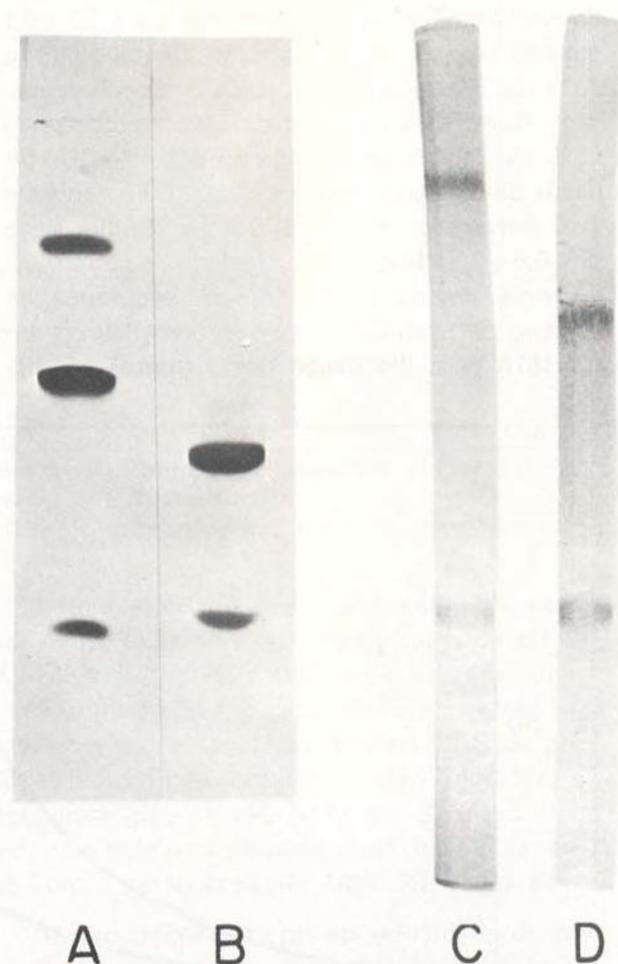


Fig. 1 — Eletroforese em gel de disco a pH 8,9 como no texto. A, electroforese de hemolisado de *H. littorale*. O anodo está na parte inferior. A banda mais anódica corresponde, em todo os geis, a albumina de soro bovino. B, hemolisado humano. C. e D., eletroforesis de Hb I e Hb II de *H. littorale* respectivamente, seguindo a separação cromatográfica em DEAE-Sephadex.

que HbI deve ter um efeito Bohr inverso e HbII um efeito Bohr normal (ver Bunn & Riggs, 1978). Não foram observados tetrâmeros assimétricos híbridos de hemoglobina em *geis* de carboxihemoglobina ou de deoxihemoglobina.

O peso molecular das cadeias da hemoglobina de *H. littorale* foi de aproximadamente 14.000 em eletroforese de gel SDS. Este valor é similar ao valor de 14.500 obtido pelo mesmo método para cadeias de hemoglobina humana.

Os experimentos de equilíbrio de oxigênio no sangue total de *H. littorale* indicam que a pressão parcial de oxigênio à saturação média (P_{50}) a 30°C (temperatura aproximada da água do rio Solimões) é de 7,8mm Hg a pH 7,7+0,1 quando uma mistura de 21% de oxigênio e 79% de nitrogênio é utilizada para reoxigenação. Quando uma mistura gasosa contendo 25% O₂, 69,4% de nitrogênio e 5,6% CO₂ foi usada para reoxigenar as células, o P_{50} aparente (ver Powers *et al.*, 1978) foi de 17,8mm Hg a pH 6,6+0,1 (Fig. 2). Usamos o termo P_{50} aparente devido a não termos segurança da posição da assíntota superior (ver Powers *et al.*, 1978 para discussão deste ponto). A he-

moglobina podia estar incompletamente saturada com oxigênio devido ao efeito Root.

A cromatografia em *gel* de DEAE Sphadex separa a hemoglobina de *H. littorale* em dois componentes (Fig. 3). Eletroforese de cada fração separada (Fig. 1) indica que cada uma é um componente puro. Dos 600 mg de oxi-hemoglobina colocados na coluna, 180 mg foram recuperados na primeira fração (HbI) e 310 mg foram recuperados na segunda (HbII). Estes valores correspondem bem às proporções encontradas por eletroforese de *gel* de disco, 31 a 69% respectivamente.

A hemoglobina não fracionada tem um valor P_{50} de 3,8mm Hg a pH 7,0 e 20°C. O valor P_{50} aumenta a 11,0 mmHg na presença de 1mM ATP a pH 7,0. Apresentando efeito Bohr alcalino normal: $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ parece máximo perto de pH 7,0. A adição de 1mM ATP causa o máximo de efeito a pH de aproximadamente 7,2 (Fig. 4).

A hemoglobina não fracionada também apresenta efeito Root; porém a presença deste efeito não é tão forte quanto no componente II purificado. O ATP aumenta o efeito Root em hemoglobina não fracionada.

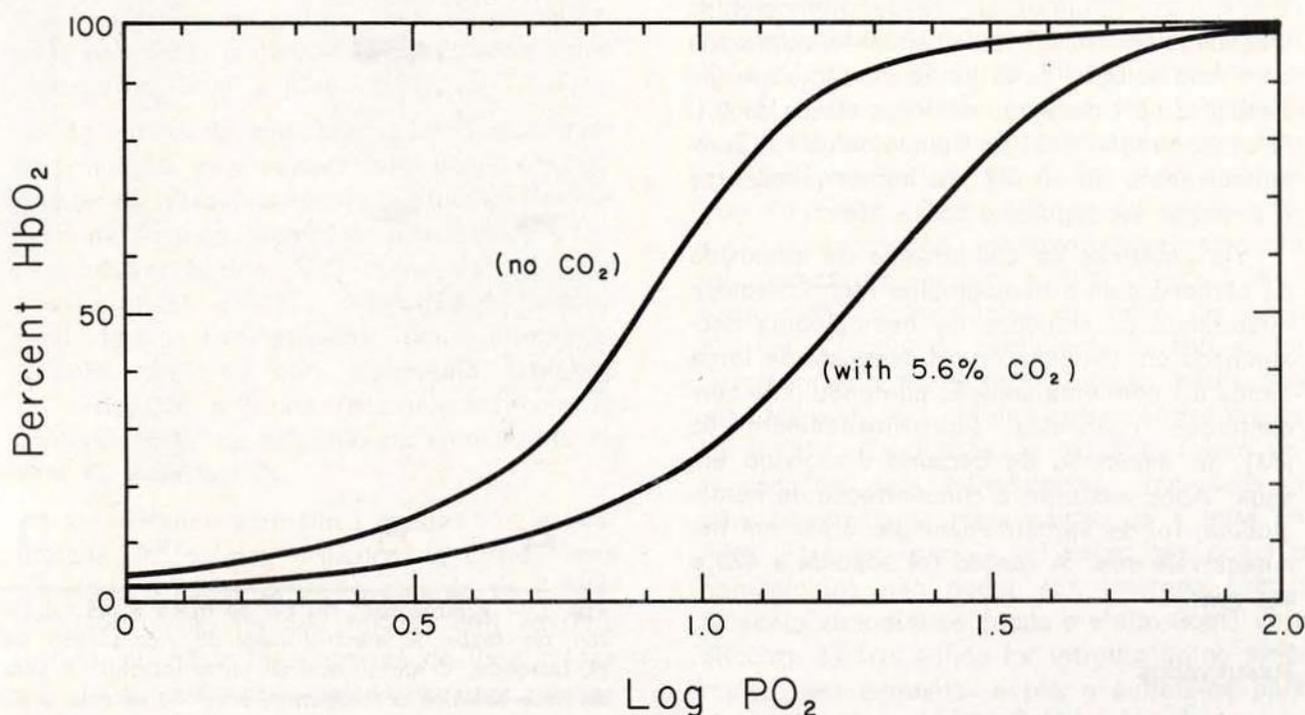


Fig. 2 — Curvas de equilíbrio de oxigênio para o sangue total de *H. littorale*. As curvas representam a oxigenação em ausência (pH 7,7) e presença (pH 6,6) de 3,6% CO₂. Ver texto por precaução em relação à interpretação dos dados em presença de CO₂.

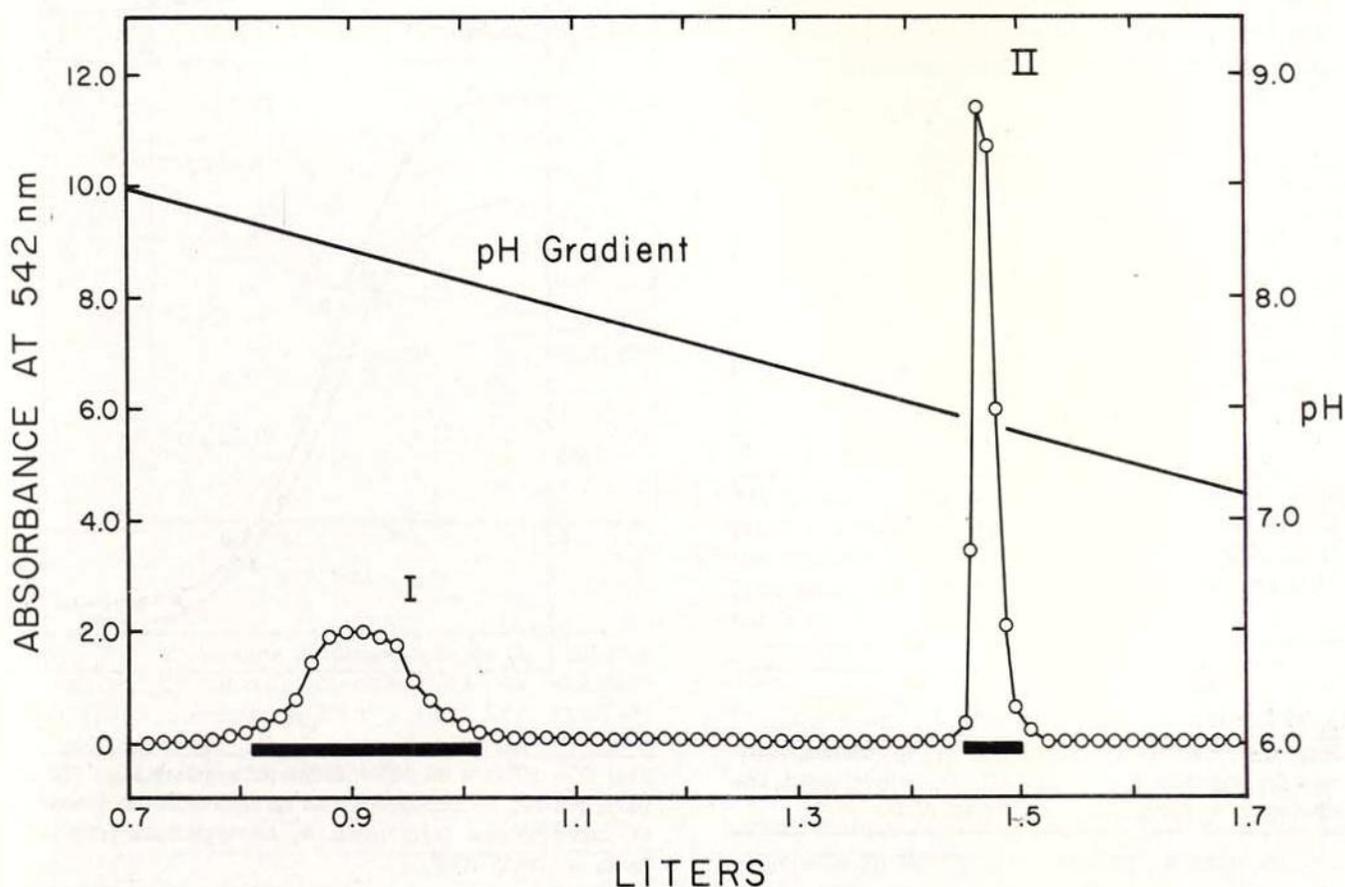


Fig. 3 — Cromatografia de DEAE-Sephadex da oxiemoglobina de *H. littorale*. As condições são as descritas no texto. As barras abaixo dos picos I e II indicam as frações que foram unidas.

Os equilíbrios de oxigênio das hemoglobinas I e II são notavelmente diferentes (Figs. 5,6). A pH 7,0 (20°C) os valores de P_{50} das duas hemoglobinas são 1,3 mm Hg (fracionadas) e 6,3mm Hg (fracionadas+1mM ATP) para Hb-I e correspondendo ao valor de P_{50} de 8mm Hg e de 13mm Hg (1mM ATP) para Hb-II fracionada a pH 7,0 e 20°C. Hb-I fracionada mostra um efeito Bohr inverso ou ácido na faixa de pH 6,0 a 8,0 ($\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} \cong +0,26$) e um ligeiro efeito Bohr alcalino entre pH 8,0 e 9,0 ($\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} \cong -0,12$).

Hb-I não apresenta efeito Root, nem na condição fracionada, nem na presença 1mM ATP. Na presença de 1mM, HB-I apresenta uma diminuição de 6 vezes na afinidade de oxigênio a pH 6,0 e mostra um efeito Bohr alcalino normal entre pH 7,0 e 8,0: $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} = -0,22$ (Fig. 5).

A hemoglobina II, por outro lado, apresenta um efeito Bohr normal forte na faixa de pH de 6,0 a 8,0: $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} = -0,53$ para hemoglobina fracionada; o valor diminui a $-0,66$ em presença de 1mM ATP na mesma faixa de pH. A pH baixo Hb-II apresenta efeito Root, isto é, esta hemoglobina não pode ser saturada com oxigênio pelo ar à pressão atmosférica. O efeito Root é aumentado por 1mM ATP (Fig. 6).

A dependência de pH na velocidade de dissociação de oxigênio dos componentes I e II em presença e ausência de 1mM ATP é apresentada na Fig. 7. As hemoglobinas são notoriamente diferentes em seu comportamento. A constante de velocidade "off" de oxigênio para o componente I é quase independente do pH. Na ausência do ATP, a velocidade aumenta ligeiramente com um aumento de pH. A adição de 1mM de ATP aumenta a velocidade nos

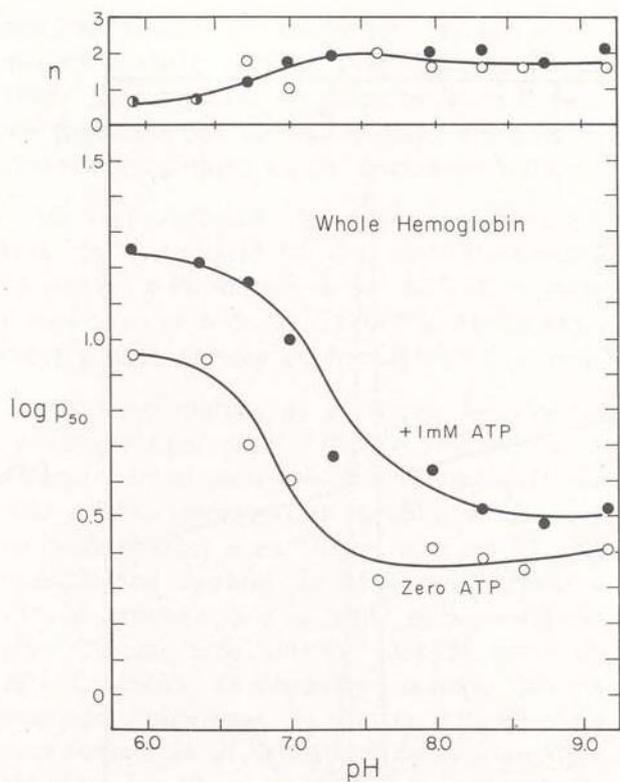


Fig. 4 — Valores de Log P_{50} e "n" de hemoglobina não fracionada a diversos pH. O, hemoglobina fracionada. ●, hemoglobina + 1 m ATP.

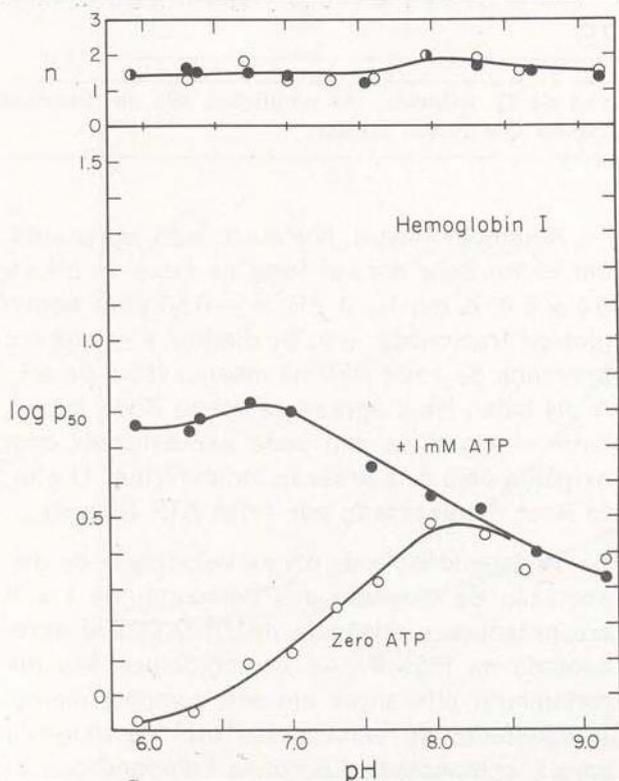


Fig. 5 — Efeito de pH e ATP sobre os valores de Log P_{50} e "n" para Hb-I. As condições são as do texto. O, hemoglobina fracionada. ●, hemoglobina

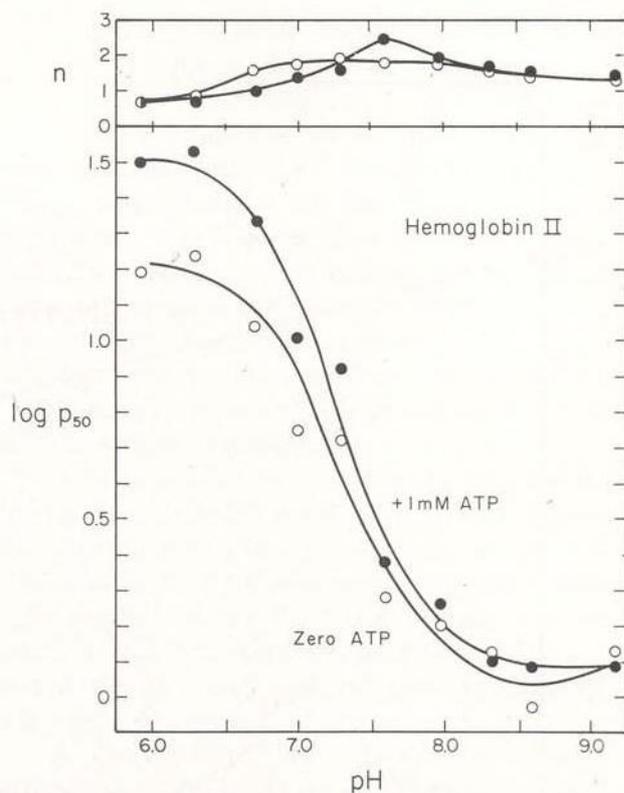


Fig. 6 — Efeitos de pH e ATP sobre o Log P_{50} e "n" para Hb-II. As condições são as descritas no texto. O, hemoglobina fracionada. ●, hemoglobina fracionada + 1mM ATP.

valores de pH baixos, mas não tem efeito a pH 8,3, de maneira que a dependência global de pH é inversa do normal, além de pequena. Em contraste, a constante de velocidade "off" de O_2 para o componente II é fortemente dependente do pH e aumenta umas 25 vezes quando o pH é diminuído de 8,0 a 5,7 na ausência de ATP. O ATP altera esta taxa, porém, sendo muito menos efetivo que os prótons. A adição de 1mM ATP aumenta a constante de velocidade em todos os valores de pH abaixo de 7,5 e aumenta a mudança com pH até umas 240 vezes.

A dependência da constante de velocidade de segunda ordem (l') para a reação de monóxido de carbono com o componente de hemoglobina é apresentado na Fig. 8.

Na ausência de ATP l' diminui de $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a pH 5,4 até aproximadamente $3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a pH 8,0. A adição de 1mM ATP diminui o valor de l' a aproximadamente $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ entre pH 6 e 8 e elimina a dependência de pH.

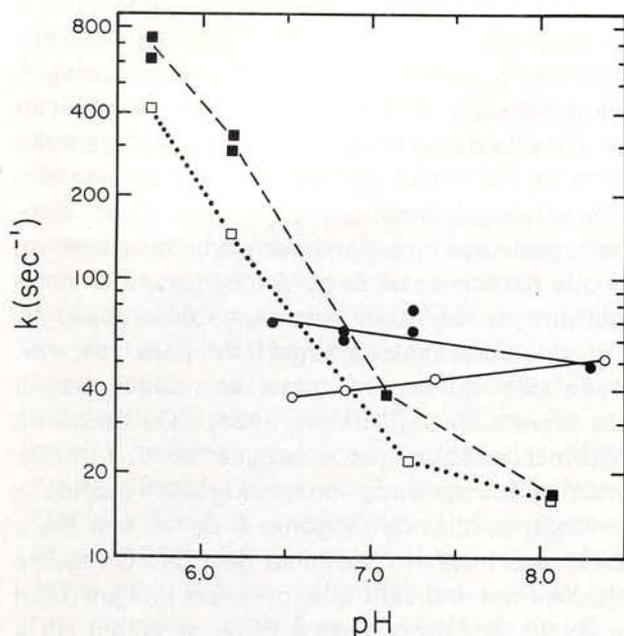


Fig. 7 — Velocidade de dissociação de O_2 a diferentes pH. "K" é a constante de velocidade. O, Hb-I fracionado. ●, Hb-I + 1mM ATP. □, Hb-II fracionado. ■, Hb-II + 1mM ATP. As condições são as indicadas no texto.

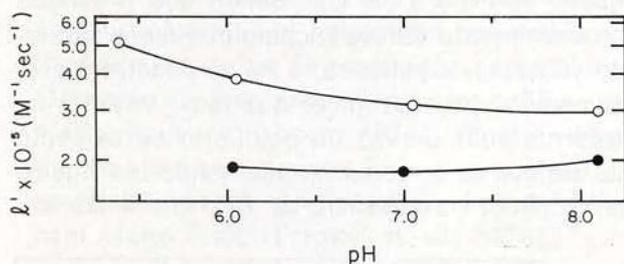


Fig. 8 — Velocidade de combinação de CO com Hb I a diversos pH. ℓ' é a constante da velocidade de combinação. O, Hb-I fracionada. ●, Hb-I fracionada + 1mM ATP. As condições são indicadas no texto.

A dependência de pH de ℓ' para o componente II da hemoglobina está expresso na Fig. 9. Tanto na presença quanto na ausência de 1mM ATP, a velocidade de reação tem uma dependência de pH bem diferente daquela apresentada pela hemoglobina I, aumentando mais de duas vezes a medida que o pH é aumentado de 6,0 a 8,0. Parece que o ATP tem pouco efeito. Expressado como porcentagem do efeito total de pH, o efeito é provavelmente semelhante ao do ATP na velocidade de dissociação

de O_2 para esta proteína, mas dada a dependência de pH tão reduzida na reação de combinação de CO, o efeito de ATP é tão reduzido que se aproxima dos limites de confiança das medidas.

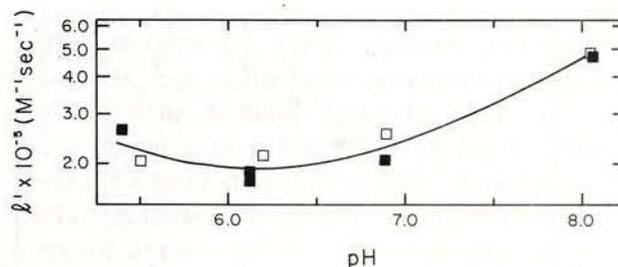


Fig. 9 — Velocidade de combinação de CO com Hb-II a diversos pH. ℓ' é a constante de velocidade de combinação. □, Hb-II fracionado. ■, Hb-II fracionado + 1mM ATP. As condições são as indicadas no texto.

As propriedades cinéticas do componente I da hemoglobina em ausência de ATP são tais que indicam que sua atividade de ligação diminui com o aumento de pH. A velocidade de dissociação de O_2 aumenta com o aumento no pH, sendo que a velocidade de combinação de CO diminui. Assim se poderia prever um efeito Bohr inverso ou negativo em base a estes resultados. A adição de 1mM ATP inverte a dependência de pH da velocidade de combinação de CO (efeito Bohr positivo).

As propriedades cinéticas do componente II da hemoglobina são totalmente diferentes. As duas constantes de velocidade variam com o pH de uma maneira indicativa de um efeito Bohr normal. A extrema dependência da taxa de dissociação de O_2 sugere que este efeito Bohr é, de fato, um efeito Root, isto é, que resulta em atividade tão baixa na faixa baixa de pH que impede a saturação da hemoglobina com oxigênio quando equilibrada com o ar. Sabe-se que este é o caso. Hemoglobina não fracionada e componente II apresentam efeito Root. Hb-1 não apresenta efeito Root. O efeito Root é incrementado com adição de 1mM ATP à hemoglobina fracionada completa ou hemoglobina II. A Fig. 10 indica que a p H7,0 a hemoglobina livre não fracionada e a hemoglobina com 1mM ATP estão ambas saturadas

100% com oxigênio ao PO_2 do ar. A pH 6,7 a hemoglobina fracionada é completamente saturada mais com 1mM ATP está só 88% saturada. A pH 5,9 a hemoglobina livre não fracionada está 73% saturada como oxigênio e a hemoglobina com 1mM ATP está 69% saturada.

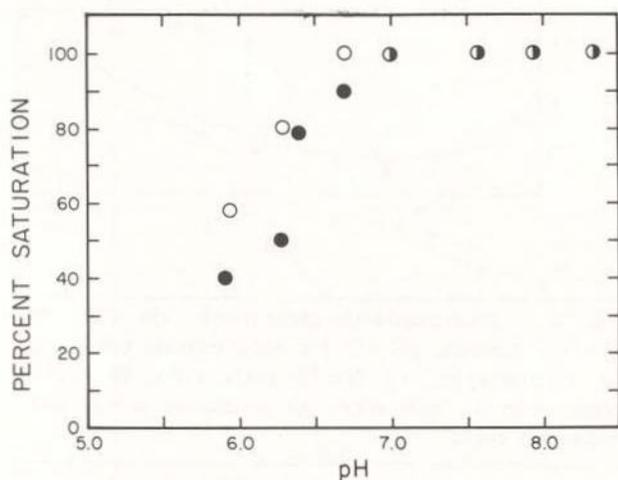


Fig. 10 — Curva de transição do efeito Root para hemoglobina não fracionada. A percentagem de saturação com oxigênio atmosférico está dada a diversos pH. O, hemoglobina fracionado. ●, hemoglobina fracionado + 1mM ATP.

A hemoglobina II apresenta uma curva de transição do efeito Root muito semelhante à da hemoglobina completa em que a percentagem de saturação começa a diminuir a valores de pH abaixo de 7,0, mas o declive é maior para Hb-II que para hemoglobina completa (Fig. 11). A pH 5,9, a hemoglobina II fracionada está 58% saturada com oxigênio a pressão atmosférica, sendo que só está 40% saturada nas mesmas condições em presença de 1mM ATP.

DISCUSSÃO

O bagre *Hoplosternum littorale* tem-se adaptado à vida em águas hipóxicas evoluindo um intestino altamente vascularizado, com o qual respira oxigênio atmosférico (Carter & Beadle, 1931). Este peixe é um respirador obrigatório de ar cujas guelras são consideradas atualmente como auxiliares na eliminação de dióxido de carbono em vez de na procura de oxigênio (Willmer, 1934). Willmer, (1934)

usando o método de van Slyke concluiu que o sangue total de *H. littorale* apresenta uma afinidade de oxigênio moderadamente baixa e apresenta um efeito Bohr em resposta à adição de dióxido de carbono pequeno em comparação com os de outros peixes examinados por ele. Em adição, observou que o sangue de *H. littorale* tem uma grande capacidade de oxigênio, o que parece estar correlacionado com o comportamento de respiração aérea do animal. *H. littorale* deve sair à superfície para respirar cada 10 minutos, sem importar a concentração de CO_2 da água (Willmer, 1934). Os dados de Willmer indicam que o sangue de *H. littorale* está meio saturado com oxigênio quando a pressão parcial de oxigênio é de 10 mm Hg a $28^\circ C$ e pH 6,8 em ausência de CO_2 . Os dados de Willmer indicam que o P_{50} do sangue total é de 20 mm Hg quando o $PCO_2 = 25$ mm Hg a pH 5,8 ($28^\circ C$). Nossos dados, obtidos usando o analisador de dissociação de oxigênio Hemo-Scan indicam que a $30^\circ C$ o P_{50} para o sangue total de *H. littorale* é de 7,8 mm Hg na ausência de CO_2 e a pH 7,7 a $30^\circ C$ o P_{50} aparente é de 17,8 mm Hg quando 42 mm Hg de CO_2 são agregados (pH 6,6 a $30^\circ C$). Sendo que o sangue provavelmente estava incompletamente saturado sob estas condições, o P_{50} verdadeiro é presumivelmente algo maior que isto. Willmer interpreta suas curvas de equilíbrio de oxigênio de sangue total como apresentando um ligeiro efeito Root na ausência de CO_2 que é aumen-

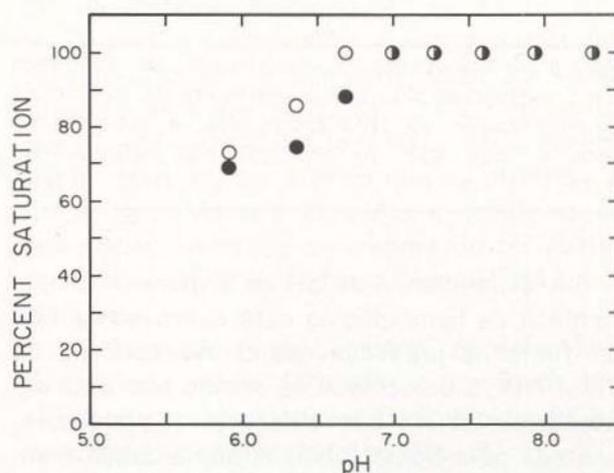


Fig. 11 — Curva de transição do efeito Root para Hb-II fracionada. A percentagem de saturação com oxigênio atmosférico está dada a diversos pH. O, Hb-II fracionada. ●, Hb-II fracionada + 1mM ATP.

tado com adição de CO₂. Esta conclusão depende de uma extrapolação relativamente grande de pressões entre mais ou menos 35 mm Hg a 150 mm Hg. Nossos dados indicam que a hemoglobina diluída e não fracionada de *H. littorale* apresenta um pequeno efeito Root e que um componente da hemoglobina (Hb-II) porém não os outros, apresenta um efeito Root considerável. O efeito Root em Hb-II de *H. littorale* é comparável àqueles encontrados em certas outras hemoglobinas de peixes. A hemoglobina da carpa (*Cyprinus carpio*) só está meio saturada a pH 5,5 e 20°C na presença de fosfatos orgânicos endógenos (Noble *et al.*, 1970). Certos componentes das hemoglobinas das duas trutas *Salmo irideus* (Brunori *et al.*, 1973) e *S. gairdneri* (Lan *et al.*, 1975) estão só uns 20% saturados com o oxigênio nas mesmas condições. A perda de oxigênio por certas hemoglobinas de peixe equilibradas a pH baixo com oxigênio atmosférico (efeito Root) tem sido tida como parte do mecanismo pelo qual o oxigênio é secretado na bexiga natatória para manter ou controlar a quantidade de flutuação neutra. Não é sabido se a hemoglobina com efeito Root de *H. littorale* cumpre este propósito. Até agora não havia sido encontrado um peixe de respiração aérea obrigatória que apresentasse uma hemoglobina com efeito Root (Johansen, 1970). Porém, atualmente, tem-se encontrado outros peixes de respiração aérea que possuem hemoglobinas com efeito Root (Farmer *et al.*, 1978).

O componente II da hemoglobina de *H. littorale* aparentemente liga o O₂ de maneira não cooperativa a pH baixo. Este componente é similar à da hemoglobina de carpa (Tan *et al.*, 1973) e da fração 3 da hemoglobina de truta (Lan *et al.*, 1975). Ainda se um valor de $n=1$ pode refletir ausência de cooperatividade nos dados de *H. littorale*, podia também resultar da ligação de oxigênio a subunidades funcionalmente diferentes subunidades α e β . A queda de n a pH baixo é aumentada por ATP em medições feitas com Hb-II de *H. littorale*. A falta aparente de cooperatividade à afinidade mínima de ligação em pH suficientemente baixo está associado com o efeito Root e pode ser descrita qualitativamente pelo menos no "estado T" do modelo alostérico de Monod *et al.* (1965).

A adição de 1mM ATP à Hb-I de *H. littorale* muda o efeito Bohr inverso a um efeito Bohr, alcalino normal. Em Hb A humana e em certas outras hemoglobinas de mamíferos, o efeito Bohr inverso ou ácido, presente a pH baixo, é aumentado com adição de fosfatos orgânicos (Bailey *et al.*, 1970; De Bruin *et al.*, 1971; Riggs & Imamura, 1972). A hemoglobina II fracionada, por outro lado, apresenta um grande efeito Bohr alcalino ($\Delta \log P_{50}/\Delta pH = -0,8$) que aumenta com 1mM ATP ($\Delta \log P_{50}/\Delta pH = -1,0$ na faixa de pH 7,0—7,5). A hemoglobina não fracionada apresenta um efeito Bohr muito menor entre $-0,4$ e $-0,5$ como era de se esperar.

Os hemolisados de certos peixes apresentam componentes múltiplos de hemoglobina, nos quais as propriedades de cada componente são notoriamente diferentes umas das outras (Binotti *et al.*, 1971; Powers & Edmundson, 1972; Gillen & Riggs, 1973; Weber *et al.*, 1976). As hemoglobinas são geralmente de dois tipos (discutido em Weber *et al.*, 1976); uma apresenta afinidade de oxigênio relativamente alta e é relativamente inalterada pelo pH. O outro tipo de hemoglobina tem uma afinidade de oxigênio menor, mostra o efeito Bohr alcalino normal e apresenta efeito Root. Concomitante com a evolução do efeito Root, há um efeito potencialmente indesejável. Uma perda grande de oxigênio do sangue da bexiga natatória pode trazer um grau perigoso de hipoxia intolerável para o peixe. Certos peixes parecem solucionar este problema sintetizando duas hemoglobinas funcionalmente diferentes; uma possuindo um efeito Root, sendo que a outra liga o oxigênio independente do pH (Riggs, 1976). Powers & Edmundson (1972) sugerem que as hemoglobinas de efeito Bohr nulo podem ser úteis em evitar a anóxia resultante da perda da ligação de oxigênio pela hemoglobina de efeito Root que pode seguir a produção de ácido láctico após de exercícios violentos de emergência. É concebível que a hemoglobina I de *H. littorale* com seu forte efeito Bohr inverso pode efetivamente cumprir tal propósito. Além disto, a hemoglobina I pode atuar como um depósito parcial de oxigênio durante os 10 minutos que o peixe permanece submerso. A presença de uma hemoglobina de efeito Bohr inverso neste peixe

pode servir para modular a hemoglobina de efeito Root numa situação de pH baixo tal como durante uma imersão onde há acúmulo de CO₂. Bonaventura *et al.*, (1977) sugerem que a hemoglobina de efeito Bohr inverso do anfíbio *Amphiuma means* pode ser especialmente útil durante a Invernação ou estivação. Não é sabido se *H. littorale* pode estar, mas achamos que certas pequenas lagoas contendo este peixe estavam no processo de secamento sendo que outras lagoas semelhantes já haviam secado. Restos de várias espécies de peixes, incluindo *H. littorale* encontrados nestas lagoas secas sugerem que esta espécie morre nessas condições. Johansen, (1970) cita a estivação como uma maneira na qual os peixes tropicais podem combater a anóxia e dissecação. Ele anota que o peixe pulmonado estava quando as lagoas ou os igarapés secam na África. Se *Hoplosternum* estava o meio ambiente pode virar hipóxico e ácido por acúmulo de CO₂. Sob estas condições, uma diminuição no conteúdo de fosfato orgânico dos glóbulos vermelhos (ver Wood & Johansen, 1972) podem auxiliar à Hb-I a atuar como um reservatório mais eficiente de oxigênio. De qualquer maneira, a presença de duas hemoglobinas distintas afetadas de diferentes maneiras por fosfatos orgânicos presumivelmente permitem a *H. littorale* um controle mais amplo para enfrentar a mudança de disponibilidade de oxigênio durante épocas secas e úmidas alternas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela bolsa PCM-06451 da National Science Foundation para estudos a bordo do R/V "Alpha Helix". Agradecemos aos brasileiros a colaboração e ao terem possibilitado que o R/V "Alpha Helix" entrasse no rio Solimões. Queremos agradecer ao Capitão Clarke e a tripulação pela cooperação. Apoio adicional foi dado pelo Conselho de Pesquisas para Ciências e Humanidades da Noruega (H.J. e U.E.H.F.), bolsa NSF DEB-76-79877 (D.A.P.), a National Geographic Society (D.A.P.), bolsa NIH HL-15460 (A J. Bonaventura para apoio de J.P.M.), bolsa NSF PCM — 76-06719 (A. Riggs), bolsa NIH GM-21314 (A. Riggs) e pela Fundação Nehemias Gorin (a H.F. Bonn).

SUMMARY

The two hemoglobins, I and II of the obligate air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* have been isolated. The unfractionated stripped hemoglobin has a high oxygen affinity, a normal alkaline Bohr effect, and a Root effect. Both the Bohr and Root effects are enhanced by 1 mM ATP. Stripped hemoglobin I has a relatively high oxygen affinity a reversed Bohr effect between pH 6.0 and 8.0 ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} > 0$) but no Root effect. Addition of 1 mM ATP to Hb I causes a marked reduction in the oxygen affinity, a change to a normal alkaline Bohr effect ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} > 0$), but no Root effect. Stripped hemoglobin II has a lower oxygen affinity at low pH and a higher oxygen affinity at high pH than does hemoglobin I. Hemoglobin II shows a large alkaline Bohr effect which is only slightly increased by 1 mM ATP and a Root effect at low pH which is enhanced by 1 mM ATP. The observed rates of O₂ dissociation and of CO combination with components I and II show differences which parallel those observed in the oxygen equilibrium measurements.

BIBLIOGRAFIA

- BAILEY, J. E.; BEETLESTONE, J. G. & IRVINE, D. H.
1970 — Reactivity differences between hemoglobins. Part XVII. The variability of the Bohr effect between species and the effects of 2,3-diphosphoglyceric acid. *J. Chem. Soc. London (A)*: 756-762.
- BINOTTI, I.; GIOVENCO, S. GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M. & WYMAN, J.
1971 — Studies on the functional properties of fish hemoglobins. II. The oxygen equilibrium of the isolated hemoglobin components from trout blood. *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 274-280.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J. & BOURNE, S.
1977 — Anion modulation of the negative Bohr effect of hemoglobin from a primitive amphibian. *Nature*, 265, 474-476.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. GIARDINA, B.; BOSSA, F. & ANTONINI, E.
1973 — Hemoglobin from the trout: structural and functional properties. *Molec. cell. Biochem.*, 1: 189-196.
- BUNN, H. F. & RIGGS, A.
1978 — A medida do efeito Bohr em hemoglobinas de peixe por focalização elétrica em gel. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- CARTER, G. S. & BEADLE, L. C.
1931 — The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linnean Soc. (London)*, 37: 327-366.

- DE BRUIN, S. H.; JANSSEN, L. H. M. & VAN OS, G. A. J.
1971 — Effect of 2,3-diphosphoglycerate on the Bohr effect of human adult hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45: 544-550.
- FARMER, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H. & NOBLE, R. W.
1978 — Ocorrência de hemoglobinas de efeito Root em peixes amazônicos. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- FYHN, U. E. H.; FYHN, H. J.; DAVIS, B. J.; POWERS, D. A.; FINK, W. L. & GARLICK, R. L.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobina nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- GIBSON, Q. H. & MILNES, L.
1964 — Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem. J.*, 91: 161-171.
- GILLEN, R. G. & RIGGS, A.
1973 — Structure and function of the isolated hemoglobins of the America eel, *Anquila rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 248: 1961-1969.
- JOHANSEN, K.
1970 — Air breathing in fishes. In: *Fish Physiology*, v. 4, New York, Academic Press, pp. 361-411.
- KRAMER, D. L. & GRAHAM, J. B.
1976 — Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. *Copeia*, 689-697.
- LAU, H. K. F.; WALLACH, D. E.; PENNELLY, R. R. & NOBLE, R. W.
1975 — Ligand binding properties of hemoglobin 3 of the trout *Salmo gairdneri*: The occurrence of an acid Bohr effect in the absence of heme-heme interactions. *J. Biol. Chem.* 250: 1400-1404.
- MONOD, J.; WYMAN, J. & CHANGEUX, J.
1965 — On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12: 88-118.
- NOBLE, R. W.; PARKHURST, L. J. & GIBSON, Q. H.
1970 — The effect of pH on the reaction of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 245: 6628-6633.
- POWERS, D. A. & EDMUNDSON, A. B.
1972 — Multiple hemoglobins from catostomid fish. I. Isolation and characterization of the isohemoglobins of *Catostomus clarkii*. *J. Biol. Chem.*, 247: 6686-6693.
- POWERS, D. A.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; MARTIN, J. P.; GARLICK, R. L. & WOOD, S. C.
1978 — Estudo comparativo de equilíbrio de oxigênio no sangue de 40 gêneros de peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- RIGGS, A.
1976 — Factors in the evolution of hemoglobin function. *Fed. Proc.*, 35: 2115-2118.
- RIGGS, A. & IMAMURA, T.
1972 — Enhancement of the acid and alk line Bohr effects of hemoglobin by organic phosphates. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 28: 55-63.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R. A.
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39: 585-605.
- TAN, A. L.; NOBLE, R. W. & GIBSON, Q. H.
1973 — Conditions restricting allosteric transitions in carp hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 248: 2880-2888.
- WEBER, R. E.; LYKKEBOE, G. & JOHANSEN, K.
1976 — Physiological properties of eel hemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects, and multiplicity. *J. Exp. Biol.*, 64: 75-88.
- WILLMER, E. M.
1934 — Some observations on the respiration of certain tropical fresh-water fishes. *J. Exp. Biol.*, 11: 283-306.
- WOOD, S. C. & JOHANSEN, K.
1972 — Adaptation to hypoxia by increased HbO₂ affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature New Biology*, 237: 278-279.