

## PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HEMOGLOBINAS DE PEIXES MARINHOS. I — AFINIDADE PELO OXIGÊNIO<sup>(1)</sup>

Hélio Frota Vieira<sup>(2)</sup>

Maria do Socorro F. Silva Silveira<sup>(3)</sup>

Aila Maria S. Fontenele Duarte<sup>(3)</sup>

Maria Laise Chaves Vieira<sup>(2)</sup>

Laboratório de Ciências do Mar  
Universidade Federal do Ceará  
Fortaleza — Ceará — Brasil

A capacidade de adaptação dos seres vivos ao seu ambiente tem sido objeto de estudos há muito tempo e, dentro desse contexto, a adaptação dos peixes às baixas tensões do oxigênio existente na água onde vivem tem sido estudada sob vários pontos de vista. Assim, o volume de ventilação e pulsação cardíaca (Prosser, 1973), o aumento do hematócrito (De Wilde & Houston, 1967; Cameron, 1970; Powers, 1974; Houston & Cry, 1974; Powers & Powers, 1975), alteração da temperatura (Denton & Yousef, 1975; Greaney & Powers, 1977; Powers *et al.*, 1978), a ação de substâncias que produzem alterações conformacionais na molécula de hemoglobina (Benesch *et al.*, 1968; Binotti *et al.*, 1971), alteração na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio quando altera o pH do sangue (Bohr, 1904), são propriedades apontadas como controladoras da atividade respiratória desses animais, quando em baixas tensões de oxigênio. De todos esses aspectos, parece ser a hemoglobina o elemento controlador

dessas adaptações, respondendo através de sua concentração, de sua afinidade em função da temperatura, do pH, da presença de moduladores ou mesmo da simples capacidade de ter maior ou menor afinidade pelo ligante oxigênio.

Apesar de as hemoglobinas dos diferentes animais mostrarem uma grande homologia estrutural (Dayoff, 1972), suas propriedades funcionais apresentam uma diversidade bastante acentuada, principalmente no que se refere à sua afinidade.

Nesse trabalho avaliamos a afinidade das hemoglobinas de alguns peixes marinhos pelo oxigênio, bem como o grau de cooperatividade dessas moléculas. Outros estudos estão sendo feitos quanto aos fatores que possam alterar essa afinidade, como é o caso do efeito Bohr, efeito de polifosfatos e efeito de temperatura.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado neste trabalho foi hemolisado de eritrócitos dos seguintes peixes marinhos: *Scomberomorus cavalla*, *Scomberomorus brasiliensis*, *Bagre bagre*, *Ginglymostoma cirratum*, *Euthynnus alletteratus*, *Caranx hippos* e *Lutjanus synagris*.

(1) Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(2) Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

(3) Bolsista de Aperfeiçoamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Os exemplares utilizados foram animais adultos capturados em águas litorâneas do Estado do Ceará, e sangrados por punção cardíaca, logo após a captura. O sangue colhido foi colocado em frasco contendo solução de cloreto de sódio e citrato de sódio, de modo a se obter no final uma concentração de 0,2 M e 0,35 M, respectivamente. Esse material foi transportado para o laboratório em banho de gelo.

Para obtenção da solução de hemoglobina as hemácias foram lavadas 3-4 vezes com solução de NaCl 0,2 M contendo EDTA  $10^{-3}$  M e, em seguida hemolisadas por choque osmótico em água contendo EDTA  $10^{-3}$  M; a separação do estroma foi feita por centrifugação a 3.000 rpm, durante 20-30 minutos.

Após a obtenção do hemolisado de eritrócitos obteve-se solução de hemoglobina isenta de íons (cloretos, fosfatos, etc.), pela passagem desse hemolisado através de 4 colunas cromatográficas de 10 cm de altura por 1-1,5 cm de diâmetro, contendo resinas de exclusão molecular e de troca iônica, isto é, Sephadex G - 25, Dowex 1 X 8 - 50 ( $H_3COO^-$ ), Dowex 50 X 8 - 50 ( $NH_4^+$ ) e Amberlite Mixed Bed (AG 501 - X 8 (D)), usando sempre água desionizada como eluente.

A determinação da curva de associação da hemoglobina com oxigênio foi feita pelo método tonométrico associado ao método espectrofotométrico (Rossi - Fanelli & Antonini, 1958), colocando-se em um tonômetro de vidro 2 ml de solução de hemoglobina isenta de íons diluída em tampão tris-acetato 0,05 M, pH 7,5, de modo a se obter uma concentração da ordem de  $10^{-5}$  M. Pela passagem de nitrogênio obteve-se a desoxihemoglobina, que foi lida em espectrofotômetro, por varredura, de 500 a 600 nm. Em seguida, adicionou-se um volume conhecido de ar atmosférico deixando-se o tonômetro com agitação constante por 10 minutos, à temperatura de 25°C. Após esse equilíbrio térmico, procedeu-se à leitura nas mesmas condi-

ções da desoxihemoglobina. Novas adições de ar foram feitas e registradas no espectrofotômetro até se obter a saturação completa da amostra (figura 1).

Os registros obtidos foram lidos nos comprimentos de onda de 542, 555 e 577 nm e a somatória das diferenças entre as formas desoxi e oxihemoglobina foi considerada como 100% de saturação, e daí calcularam-se as percentagens de saturação ( $\bar{y}$ ) em cada diferente adição de ar (tabela I). Com os dados de  $\bar{y}$  calculou-se  $\log \frac{\bar{y}}{100 - \bar{y}}$ , que foi lançado como ordenada, enquanto que  $\log pO_2$  (logaritmo da pressão de oxigênio) foi lançado na abscissa (figura 2).

A pressão de ar em cada adição foi calculada em função da lei de Boyle-Mariot, sabendo-se o volume gasoso do tonômetro. Nesse gráfico determinou-se o  $\log \frac{\bar{y}}{100 - \bar{y}} = 0$ . Esse valor corres-

ponde a  $\log P_{50}$ , isto é, ao logaritmo da pressão de oxigênio suficiente para saturar 50% das moléculas de hemoglobina. A tangente do ângulo obtido corresponde ao valor  $n$  ( $\rho$ plot de Hill) que avalia a cooperatividade da molécula (Wyman, 1964). Os valores  $\log P_{50}$  e  $n$  foram também calculados em calculadora previamente programada para esse fim. Assim, forneceu-se à calculadora os dados das absorvâncias em 542, 555 e 577 nm das formas oxi, desoxi e de cada adição de ar bem como o volume de ar adicionado e a constante tonométrica. Foi processado, então, o cálculo de  $\bar{y}$  e  $pO_2$ , e com os valores  $\log \frac{\bar{y}}{100 - \bar{y}}$  e  $\log pO_2$  determinou-se a regressão linear. O coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a) foram calculados e os valores de  $n$  e  $\log P_{50}$  foram registrados, sendo  $n = b$  e  $\log P_{50} = -a/b$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de  $P_{50}$  obtidos nos hemolisados de eritrócitos isentos de íons em

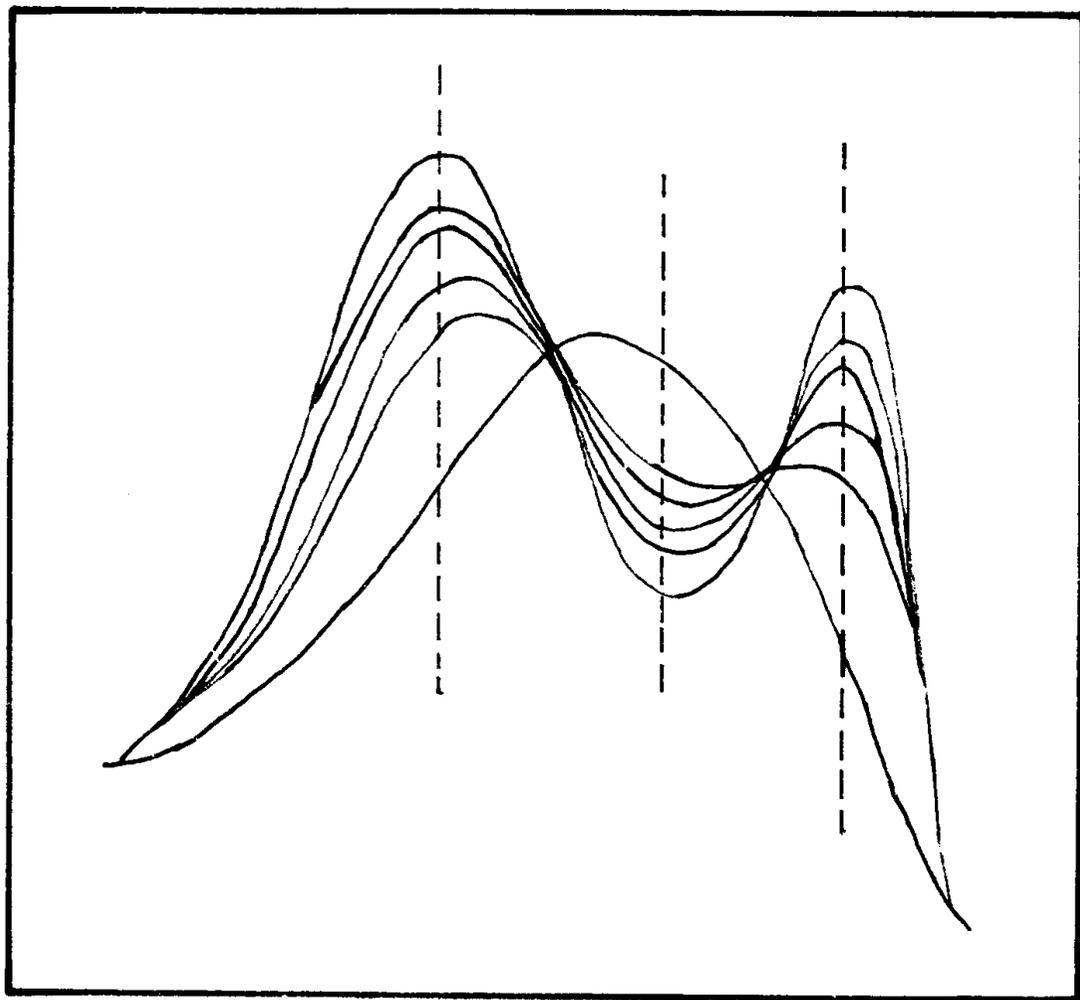


Figura 1 — Espectro do processo de oxigenação da hemoglobina de *Euthynnus alletteratus* pelo ligante, no intervalo de 600 a 500 nm.

TABELA I

Cálculos efetuados para a obtenção dos valores de  $\bar{y}$  (percentagem de saturação) em uma amostra de hemoglobina, a partir das absorvâncias em 542, 555 e 577 nm.

Hb	Volume do ar (ml)	A <sub>542</sub>	A <sub>555</sub>	A <sub>577</sub>	$\Delta A_{542}$	$\Delta A_{555}$	$\Delta A_{577}$	$\Sigma \Delta$	$\bar{y}$
Desoxi	—	0,370	0,466	0,424	—	—	—	—	—
1. <sup>a</sup>	3	0,428	0,429	0,478	0,058	0,037	0,054	0,149	46,27
2. <sup>a</sup>	3	0,448	0,419	0,495	0,078	0,047	0,071	0,196	60,86
3. <sup>a</sup>	5	0,464	0,409	0,512	0,094	0,057	0,088	0,239	74,22
4. <sup>a</sup>	5	0,475	0,399	0,520	0,105	0,067	0,096	0,268	83,22
Oxi	—	0,494	0,384	0,540	0,124	0,082	0,116	0,322	100,00

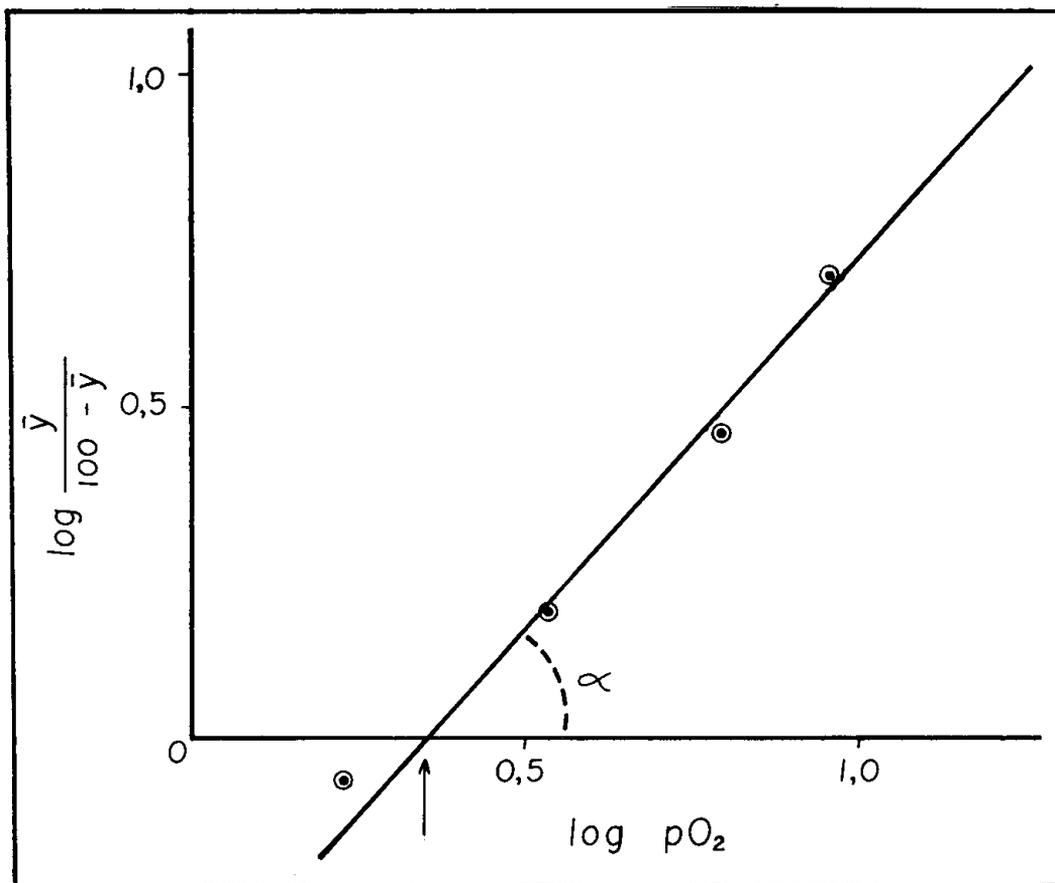


Figura 2 — Gráfico mostrando o processo de saturação da hemoglobina de *Euthynnus alletteratus* pelo oxigênio. A seta indica o valor interpolado para  $\log P_{50}$ , e a tangente do ângulo  $\alpha$  corresponde ao valor de  $n$ .

TABELA II

Valores de  $P_{50}$  (pressão de oxigênio suficiente para saturar 50% das moléculas) e de  $n$  (plot de Hill) de hemoglobinas de diferentes espécies de peixes, em tampão tris-acetato 0,05 M, pH 7,5.

Espécie	$P_{50}$ (mm de Hg)	$n$
<i>Scomberomorus cavalla</i>	4,89	0,94
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	8,31	1,43
<i>Bagre bagre</i>	0,50	0,61
<i>Euthynnus alletteratus</i>	2,34	1,19
<i>Caranx hippos</i>	1,62	0,96
<i>Lutjanus synagris</i>	2,34	0,71
<i>Ginglymostoma cirratum</i>	1,15	0,98

tampão tris-acetato 0,05 M, pH 7,5 e os valores de  $n$  estão expressos na tabela II.

A afinidade das hemoglobinas pelo oxigênio foi determinada em tampão tris-acetato 0,05 M, uma vez que essa

solução tem boa ação tamponante em faixas de pH alcalino, e não possui em sua composição nenhuma substância capaz de interferir no processo de oxigenação da hemoglobina, alterando sua afinidade, como acontece quando se utiliza tampão contendo os íons fosfato e cloreto. A escolha do pH 7,5 foi feita em função de ser esse um pH tido como fisiológico, pois o sangue dos peixes, via de regra, tem um pH variável desde 7,3 até 7,6, dependendo das atividades fisiológicas do animal.

Nessas condições, o estudo do equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio mostrou, através do valor  $P_{50}$ , diferenças dentre as espécies estudadas. Estas são bastante grandes se considerarmos que todas as espécies pertencem ao mesmo habitat, como é o caso de S.

*brasiliensis*, que apresenta  $P_{50}$  de 8,31 mm de Hg, e *B. bagre*, que apresenta 0,5 mm de Hg como valor de  $P_{50}$ . Esses dados mostram uma afinidade das hemoglobinas de *S. brasiliensis* 15 vezes menor que as de *B. bagre*, devido talvez à sua necessidade de adaptação a diferentes teores de oxigênio dissolvido, uma vez que essa espécie apresenta capacidade de sobreviver em diferentes profundidades. Os valores de  $P_{50}$  encontrados para as espécies *S. cavalla*, *E. alletteratus*, *C. hippos*, *G. cirratum* e *L. synagris* mostram afinidades intermediárias entre *S. cavalla* e *B. bagre*. Outros fatores devem contribuir para controlar a afinidade dessas moléculas pelo oxigênio, como é o caso dos fosfatos orgânicos e do pH, e estão sendo objeto de estudos em nossos laboratórios.

Quando aos valores de  $n$  (plot de Hill), podemos observar que em todos os experimentos mostraram-se próximos à unidade. Esse parâmetro apresenta sempre valores acima da unidade, o que indica a cooperatividade positiva da molécula (Brunori *et al.*, 1968). A oxigenação da primeira cadeia peptídica, através de seu grupo pirrólico, é mais difícil, exigindo para isso a existência de uma maior pressão do ligante, enquanto que para as demais cadeias a pressão necessária é menor, uma vez que alterações heterotrópicas ocorridas em consequência da oxigenação da primeira cadeia facilitam a reação do ligante com os demais sítios de ligação (Perutz *et al.*, 1969). Esse fenômeno da cooperatividade das moléculas de hemoglobina, já bastante estudado, mostra ainda alguns aspectos pouco elucidados como é o caso da menor cooperatividade registrada nas hemoglobinas isentas de íons. Esse fato é também observado em nossos experimentos, onde obtivemos valores de  $n$  menores que a unidade em alguns casos.

Outro aspecto interessante no processo de oxigenação das hemoglobinas, é a inexistência de interações entre algumas cadeias nas hemoglobinas que apresentam efeito Root (Root, 1931).

Nesses casos, a não interação impede a oxigenação de alguns sítios de 1-2 cadeias peptídicas, permitindo somente a oxigenação de 25-50% da molécula, o que se traduz por valores de  $n$  menores que a unidade. Os baixos valores de  $n$  encontrados fazem-nos supor, também, a existência de efeito Root nessas moléculas estudadas, o que é bastante aceitável, uma vez que hemoglobinas de peixes geralmente apresentam esse efeito que é evidenciado nos pHs mais baixos (de 6,5 a 7,5), como é o caso de nossos experimentos.

## SUMMARY

*English title:* Functional properties of hemoglobins of marine fishes. I — Affinity for oxygen.

In this paper the affinity of hemoglobins for oxygen has been studied in a number of marine fishes of northeastern Brazil. The studies have been performed with the use of a trisacetate 0.05 M, pH 7.5 buffer and the affinity has been evaluated through the value of  $P_{50}$ . The results have shown that, despite the small difference, the hemoglobin of *S. brasiliensis* showed an affinity for oxygen 10 times lower than that shown by *B. bagre*. Those values, in mm Hg were — *S. cavalla*: 4.89; *S. brasiliensis*: 8.35; *E. alletteratus*: 2.34; *B. bagre*: 0.50; *C. hippos*: 1.62; *L. synagris*: 2.34; and *G. cirratum*: 1.15.

The values of  $n$  (Hill plot) have also been determined in those experiments, being found to be always near unity, suggesting a low cooperativity of the molecule. This has been discussed as a consequence of a probable existence of Root effect, in the studied hemoglobins, which is known to be common in fish hemoglobins.

## BIBLIOGRAFIA

Benesch, R.; R. E. Benesch & C. I. Yu — 1968 — Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin.

*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, Washington, 59 : 526-532.

Binotti, I. S.; B. Giovenco; E. Giardina; E. Antonini; M. Brunori & J. Wyman — 1971 — Studies on the functional properties of the fish hemoglobin. II. The oxygen equilibrium of the isolated hemoglobin components from trout blood. *Arch. Bioch. Biophys.*, New York, 142 : 274-280.

Bohr, C. — 1904 — Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Arch. Physiol.*, 16 : 402-408.

Brunori, M.; A. Alfsen; U. Saggese; E. Antonini & J. Wyman — 1968 — Studies on the oxidation — reduction potentials of heme proteins. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 243 : 2950-2954.

Cameron, J. N. — 1970 — The influence of environmental variables on haematology of the pinfish (*Lagodon rhomboides*) and striped mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Bioch. Physiol.*, London, 32 : 175-192.

Dayoff, M. O. — 1972 — *Atlas of protein sequence and structure*. Natural Biomedical Research Foundation, Silver Springs.

De Wilde, M. A. & A. H. Houston — 1967 — Haematological aspects of the thermoacclimatory process in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 24 : 2267-2281.

Denton, J. E. & M. F. Yousef — 1975 — Seasonal changes in hematology of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Bioch. Physiol.*, London, 51 : 151-153.

Greaney, C. S. & D. A. Powers — 1977 — Cellular regulation of an allosteric modifier of fish hemoglobin. *Nature*, London, 270 : 73-74.

Houston, A. H. & D. Cry — 1974 — Thermoacclimatory variation in the hemoglobin system of gold fish (*Carassius auratus*) and rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, London, 61 : 455-461.

Perutz, M. F.; H. Muihead; L. Mazzarella; R. A. Crowther; J. Greer and J. V. Kilmartin — 1969 — Identification of residues responsible for alkaline Bohr effect in haemoglobin. *Nature*, London, 222 : 1240-1243.

Powers, D. A. — 1974 — Structure function and molecular ecology of fish in hemoglobins: comparative molecular biology models for the study of disease. *Ann. New York Acad. Sci.*, New York, 241 : 472-490.

Powers, D. A.; H. J. Fyhn; U. E. H. Fyhn; J. P. Martin; R. L. Garlick & S. C. Wood — 1978 — O efeito da temperatura sobre o equilíbrio de oxigênio das hemoglobinas de peixe em relação a variabilidade térmica ambiental. *Acta Amazonica*, Manaus, 4 : 113-123.

Powers, D. A. & D. Powers — 1975 — Predicting gene frequencies in natural population: a testable hypothesis in isozymes. In : C. Market (Ed.), *Genetics and Evolution*, Academic Press, New York.

Prosser, C. L. — 1973 — *Comparative animal physiology*. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

Root, R. W. — 1931 — The respiratory function of the blood of marine fishes. *Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 61 : 427-431.

Rossi-Fanelli, A. & E. Antonini — 1958 — Studies of the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. *Arch. Bioch. Biophys.*, New York, 77 : 478-492.

Wyman, J. — 1964 — Linked functions and reciprocal effects in hemoglobins: a second look, pp. 223-286. In *Advances in Protein Chemistry*, Vol. XIX, Academic Press, New York.