

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE HEMOGLOBINAS DE PEIXES MARINHOS. II – EFEITO BOHR⁽¹⁾

Maria do Socorro F. Silva Silveira⁽²⁾

Aila Maria S. Fontenele Duarte⁽²⁾

Maria Laise Chaves Vieira⁽³⁾

Hélio Frota Vieira⁽³⁾

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

O efeito Bohr, apresentado pelas hemoproteínas, é descrito como sendo a alteração da afinidade da molécula pelos ligantes quando há alteração do pH. De acordo com sua orientação, podemos ter efeito Bohr alcalino, que mostra o aumento da afinidade quando há aumento do pH, ou ácido, que mostra o aumento da afinidade quando há decréscimo do pH.

O efeito Bohr alcalino, também chamado *normal*, é apresentado em hemoglobinas de diferentes espécies animais (Antonini & Brunori, 1971) bem como na hemoglobina humana A₁ (Amiconi *et al.*, 1975), enquanto que o efeito Bohr ácido, ou *reverso*, é apresentado em algumas hemoglobinas de anfíbios (Manwell, 1960) e de alguns peixes (Riggs, 1970).

Do ponto de vista da fisiologia animal, o efeito Bohr é discutido como sendo um mecanismo que permite a manutenção de um certo nível de oxigênio no sangue, mesmo que haja grande anoxia tecidual, pois com a diminuição do pH do tecido, pelo aumento de CO₂,

ácido láctico, etc., haverá diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, facilitando a liberação do mesmo. Esse mecanismo garante um eficiente transporte do oxigênio para todas as regiões (tecidos) do organismo, o que não seria tão eficiente com as hemoglobinas que não apresentam efeito Bohr (Riggs, 1976).

Do ponto de vista molecular, o efeito Bohr, apesar de bastante estudado, continua ainda sendo objeto de discussão e estudos. Por um lado, ele é apresentado como consequência da liberação de prótons durante a desoxigenação da molécula (Wyman, 1948), avaliada em 0,25 prótons/heme no *reverso* e 0,6 prótons/heme no *normal* (Wyman, 1964), porém o grupo ou os grupos que são ionizáveis nesse processo ainda não estão identificados. O mecanismo proposto por Perutz (1970) explica que no processo de oxigenação ocorrem alterações conformacionais na molécula e, conseqüentemente, quebra de pontes salinas, o que implica na alteração do pK de alguns grupos devido às mudanças de interações eletrostáticas, promovendo a captação de prótons. Em outras palavras, tanto a oxihemoglobina como a desoxihemoglobina apresentam afinidade por íons, fenômeno esse denominado interações heterotrópicas (Benesch *et al.*, 1968), mas em pH fisiológico, a desoxi-

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

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

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

hemoglobina apresenta maior afinidade por esses íons, o que explica a protonação de grupos quando a hemoglobina perde o oxigênio.

A existência, ou não, do efeito Bohr nas hemoglobinas de um determinado animal é um dado que contribui para avaliar a sua atividade fisiológica (Riggs, 1970). Além disso, o conhecimento do efeito Bohr, bem como da afinidade da molécula pelo ligante, sua cooperatividade e a ação de moduladores alostéricos, são dados que colaboram para a melhor elucidação das necessidades respiratórias do animal, e para o estudo da correlação das propriedades funcionais com as propriedades estruturais da molécula.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas soluções de hemoglobinas das seguintes espécies de peixes marinhos: *Scomberomorus cavalla*, *Scomberomorus brasiliensis*, *Lutjanus synagris*, *Euthynnus alletteratus*, *Caranx hippos* e *Ginglymostoma cirratum*, todos adultos e oriundos do litoral cearense, adjacências de Fortaleza. O sangue dos animais foi colhido e colocado em frascos contendo solução de cloreto de sódio e citrato de sódio, para uma concentração final de 0,2 M e 0,35 M, respectivamente. As hemácias foram lavadas 3-4 vezes com solução de cloreto

de sódio 0,2 M contendo EDTA 10^{-3} M, e hemolisadas com solução de EDTA 10^{-3} M. A separação do estroma celular foi feita por centrifugação a 3.000 rpm, por 20-30 minutos. A solução de hemoglobina obtida foi submetida a cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica (Vieira *et al.*, 1983), a fim de se obter uma solução isenta de moduladores alostéricos.

Os estudos da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foram feitos usando-se solução de hemoglobina 10^{-5} M isenta de cofatores, diluída em tampão tris-acetato 0,05 M, com o pH variando de 6,9 a 8,0, e utilizando-se técnica espectrofotométrica associada a técnica tonométrica (Rossi-Fanelli & Antonini, 1958).

O efeito Bohr foi determinado através do gráfico onde foram colocados, na abscissa, os valores de pH e, na ordenada, os valores de $\log P_{50}$, observando-se o aspecto da curva, isto é, a orientação do efeito Bohr (normal ou reverso), e o seu valor foi calculado por:

$$H^+ = \frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \text{pH}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes do equilíbrio de oxigênio em função do pH nos hemolisados de eritrócitos das diferentes espécies em

TABELA I

Valores de P_{50} (pressão de oxigênio suficiente para saturar 50% das moléculas) dos hemolisados de eritrócitos isentos de íons, de diferentes espécies de peixes marinhos, usando tampão tris-acetato 0,05 M em diferentes pHs.

Espécie	P_{50} (mm de Hg)		
	pH 6,9	pH 7,5	pH 8,0
<i>Scomberomorus cavalla</i>	7,22	4,89	3,63
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	13,80	8,31	4,47
<i>Euthynnus alletteratus</i>	8,51	2,34	0,83
<i>Caranx hippos</i>	3,16	1,62	1,20
<i>Ginglymostoma cirratum</i>	3,23	1,15	0,46
<i>Lutjanus synagris</i>	2,69	2,34	2,04

TABELA II

Valores do efeito Bohr (H^+) dos hemolisados de eritrócitos de peixes marinhos, isentos de íons em tampão tris-acetato 0,05 M, entre os pHs 6,9 e 8,0.

Espécie	H^+
<i>Scomberomorus cavalla</i>	-0,27
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	-0,44
<i>Euthynnus alletteratus</i>	-0,92
<i>Caranx hippos</i>	-0,38
<i>Gynglymostoma cirratum</i>	-0,78
<i>Lutjanus synagris</i>	-0,11

estudo revelaram distintos valores de P_{50} , expressos em mm de Hg, nos diferentes pHs testados, os quais estão apresentados na tabela I. O aspecto da curva dada pelos valores $\log P_{50}$, em função dos valores de pH, está apresentado na figura 1. A avaliação do efeito Bohr dessas hemoglobinas em tampão tris-acetato 0,05 M, na faixa de pH entre 6,9 e 8,0, apresentou sempre resultados de efeito Bohr normal, isto é, valores negativos, que estão expressos na tabela II. Assim, podemos observar que as hemoglobinas de *E. alletteratus* e de

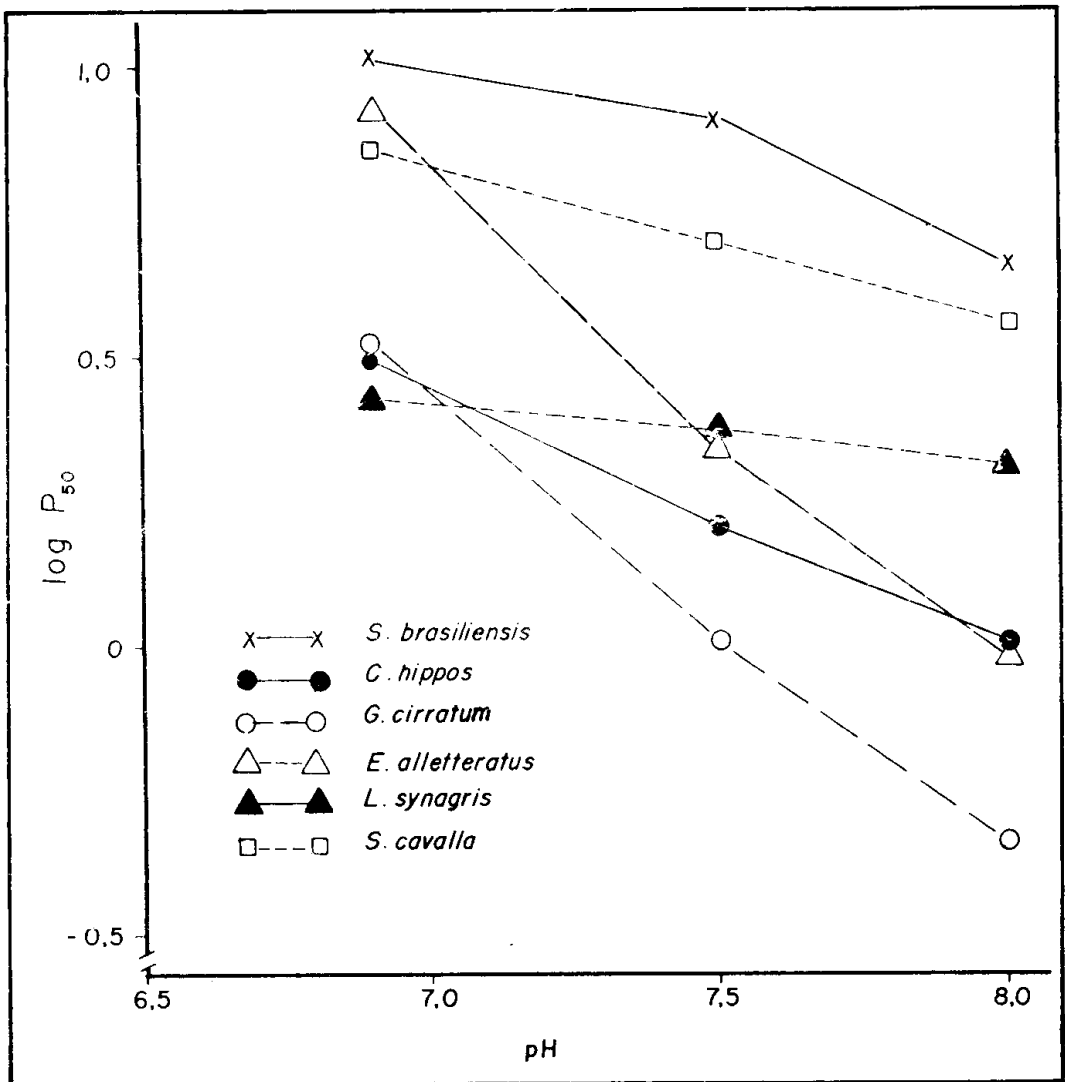


Figura 1 — Efeito Bohr das hemoglobinas estudadas em tampão bis-trisactato 0,05 M, pH variando de 7,0 a 8,0.

BRIGM

G. cirratum são as que apresentam maior efeito Bohr dentro da faixa de pH estudada, enquanto que as hemoglobinas de *L. synagris* mostraram a existência de um efeito Bohr 7-9 vezes menor. Esses resultados nos fazem supor que os indivíduos das espécies *E. alletteratus* e *G. cirratum* possuem uma atividade fisiológica bem maior que os indivíduos da espécie *L. synagris*, baseados na afirmação de Riggs (1970), que correlaciona diretamente a atividade do animal com o efeito Bohr.

É, também, interessante observar que para essas hemoglobinas atingirem 50% de saturação nas condições estudadas, a pressão de oxigênio varia grandemente entre os pHs 7,0 e 7,5, isto é, dentro da faixa considerada como fisiológica. Nessas condições, a pressão de oxigênio necessária para saturar 50% das moléculas de hemoglobina varia 4 vezes, no caso das hemoglobinas de *E. alletteratus* por exemplo.

As necessidades de oxigênio são, então, grandemente alteradas quando o animal está em *stress* e, conseqüentemente, em acidose tecidual. A demanda de oxigênio para os tecidos é, nessas condições, mais fácil uma vez que a afinidade da hemoglobina é menor e, conseqüentemente, a liberação do oxigênio por ela transportado é mais viável, facilitando a oxigenação dos tecidos e restabelecendo o pH normal pela eliminação do CO₂ (que se faz melhor na presença da desoxihemoglobina) e degradação do ácido láctico.

O pequeno efeito Bohr observado nas hemoglobinas de *L. synagris* nos faz supor ser essa espécie de menor atividade fisiológica dentre as estudadas, deixando-nos, contudo, com algumas dúvidas quanto à possibilidade de existir outros mecanismos que possam também controlar o transporte do oxigênio, como é o caso dos polifosfatos (Benesch & Benesch, 1969), que em algumas hemoglobinas, têm a capacidade de induzir a diminuição de sua afinidade pelo ligante em pH ácido. Experiências

nesse sentido estão sendo realizadas, bem como estudos a respeito do efeito Root das hemoglobinas dessas espécies.

SUMMARY

English title: Functional properties of hemoglobins of marine fishes. II — Bohr effect.

The study of the affinity of hemoglobins of erythrocytes, in a few marine fishes, for oxygen at different pH values has shown the existence of *normal* Bohr effect in all studied species, which live off northeastern Brazil.

The estimation of P₅₀ and log P₅₀ has been carried out in trisacetate 0.05 M buffer, pH from 6.9 to 8.0, always making use of hemoglobin solution 10⁻⁵ M free of ions. All studied hemoglobins showed P₅₀ variation when the pH was made to vary.

The calculation of Bohr effect values was performed through the formula:

$$H^+ = \frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \text{pH}}$$

Bohr effect values ranged from - 0.11 to - 0.92, the lowest one being observed in hemolytic solution of erythrocytes of *L. synagris*, while the highest one was observed in hemolytic solution of *E. alletteratus*.

Those results have been explained as a probable outcome of a greater physiological activity performed by *E. alletteratus*.

The other species — *S. cavalla*, *S. brasiliensis*, *G. cirratum* and *C. hippos* — presented an intermediate Bohr effect.

BIBLIOGRAFIA

Amiconi, G.; E. Antonini; M. Brunori & B. Giardina — 1975 — *Emoglobina. Struttura, funzione e ruolo fisiopatologico*. Tamburini Editore, X + 169 pp., Milano.

Antonini, E. & M. Brunori — 1971 — *Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands*. North Holland, XX + 436 pp., Amsterdam.

Benesch, R. & R. E. Benesch — 1969 — Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature*, London, 221 : 618-622.

Benesch, R.; R. E. Benesch & C. I. Yu — 1968 — Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, New York, 59 : 526-532.

Manwell, C. — 1960 — Comparative physiology: blood pigments. *Ann. Rev. Physiol.*, 22 : 191-244.

Perutz, M. F. — 1970 — Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Haem-haem interaction and the problem of allostery. The Bohr effect and combination with organic phosphate. *Nature*, London, 228 : 726-739.

Riggs, A. — 1970 — Properties of fish hemoglobins. In W. S. Hoar & D. J. Randall

(Eds.), *Fish Physiology*, 1st edition, Academic Press, New York.

Riggs, A. — 1976 — Factors in the evolution of hemoglobin function. *Fedn. Proc.*, 35 : 2115-2118.

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

Vieira, H.F.; M.S.F.S. Silveira; A.M.S.F. Duarte & M. L. C. Vieira — 1983 — Propriedades funcionais de hemoglobinas de peixes marinhos. I. Afinidade pelo oxigênio. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 23 : 25-30.

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.

Wyman, J. — 1968 — Heme proteins, pp. 410-531. In *Advances in Protein Chemistry*, Vol. IV, Academic Press, New York.