

# Transição da respiração aquática para a aérea: efeitos do CO<sub>2</sub> sobre a função de hemoglobina (\*)

Martha Farmer (1)

## Resumo

A dependência de pH do efeito específico ao CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub> = 30 torr) sobre os equilíbrios de oxigênio foi medida nas hemoglobinas de quatro espécies de peixe e um anfíbio: *Leiostomus xanthurus* (teleosteo marinho), *Brachyplatystoma* sp. (bagre da Amazônia), *Hoplosternum littorale* (cascudo, de respiração aérea), *Lepidosiren paradoxa* (pirambóia, peixe pulmonado de respiração aérea) e *Typhlonectes compressicauda* (um Ceciliídeo). O conteúdo de CO<sub>2</sub> no sangue de peixe de respiração aérea e anfíbios é consideravelmente mais alto que os de respiração aquática, contudo, as hemoglobinas examinadas dos de respiração aérea não apresentaram adaptação especial à carga aumentada de CO<sub>2</sub>. Embora o efeito do pH sobre os equilíbrios de oxigênio das diferentes hemoglobinas tenha variado grandemente, do efeito de Root para o efeito de Bohr invertido, o efeito de CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do oxigênio foi muito semelhante para todos, exceto para o bagre *Brachyplatystoma* sp., que foi um pouco maior. A queda na afinidade do oxigênio, efetuada pelo CO<sub>2</sub>, aumentou incrementando o pH para cada hemoglobina examinada. A mudança no efeito de Bohr,  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  medida em pH 7.5 foi semelhante para todas as cinco hemoglobinas, cerca da metade da produzida pelo CO<sub>2</sub> para a Hb A humana. Isto sugere que metade das cadeias de cada hemoglobina pode ter bloqueado os grupos aminos terminais.

## INTRODUÇÃO

As hemoglobinas dos vertebrados apresentam notável homologia estrutural (Dayhoff, 1972), no entanto, suas propriedades funcionais mostram grande diversidade. Frequentemente, as propriedades de união do oxigênio com as hemoglobinas têm demonstrado correlacionar-se com as variadas exigências respiratórias dos animais (recentemente revisado por Riggs (1970), Prosser (1973) e Bonaventura *et al.* (1975). Estudos comparativos da hemoglobina têm focalizado as propriedades de união do oxigênio das hemoglobinas e os

efeitos modificadores de agentes alostéricos fisiologicamente importantes como íons hidrogênio e vários ânions, especialmente fosfatos orgânicos. Mas a respiração não é limitada à captação e liberação de oxigênio; a remoção do dióxido de carbono é igualmente essencial. Do mesmo modo, a hemoglobina não é limitada ao transporte de O<sub>2</sub>, mas desempenha um papel significativo no transporte de CO<sub>2</sub> e no equilíbrio ácido-base. Surpreendentemente, aspectos comparativos do transporte de CO<sub>2</sub> pela hemoglobina têm sido pouco estudados, especialmente para as hemoglobinas de vertebrados inferiores como peixes e anfíbios.

Na transição da respiração aquática para a aérea, muitas adaptações respiratórias anatômicas evoluíram (revisado por Carter, 1957; Johansen, 1970). Pode-se ficar na expectativa de encontrar mudanças nas hemoglobinas que refletiriam tais adaptações e, de fato, poucas tendências têm sido propostas. Contudo, o número pequeno de espécies experimentadas resultou em conclusões inadvertidamente induzidas. Carter (1931), primeiro hipotetizou que peixes de respiração aérea não teriam hemoglobinas com efeito Root, porque a alta tensão de CO<sub>2</sub> que encontraram em seus órgãos respiratórios aéreos diminuiria drasticamente sua capacidade de O<sub>2</sub> de tais hemoglobinas. Pesquisa subsequente sustentou a hipótese de Carter. Recentemente, todavia, foram encontrados vários exemplos de peixes de respiração aérea com hemoglobinas de efeito de Root (Farmer *et al.*, 1978). Pensava-se que a afinidade do oxigênio dos sangues dos de respiração aérea era geralmente mais baixa e o efeito de Bohr mais alto do que para as hemoglobinas dos de respiração aquática (Johansen, 1970). Um estudo comparativo recente, entretanto, do sangue de 45 espécies

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

(1) — Duke University Laboratory, Beaufort, N.C., and the Department of Physiology, Duke University Medical Center, Durham, N.C.

de peixes amazônicos não apoia esta conclusão (Powers *et al.*, 1978). Uma das diferenças mais significativas entre os de respiração aquática e aérea é a tensão mais elevada do CO<sub>2</sub> no sangue dos de respiração aérea. Em ambos os espécimens de respiração aérea e aquática, a diferença venoso-arterial na tensão de CO<sub>2</sub> é semelhante, em torno de 5-6 torr. Mas a tensão arterial do CO<sub>2</sub> dos de respiração aquática é, em geral, abaixo de 5 torr (Rahn, 1966), enquanto que a dos de respiração aérea varia de 15 a 43 torr, dependendo, em parte, do grau em que a pele ou as guelras funcionam na eliminação de CO<sub>2</sub> (Rahn & Garey, 1973). Com a evolução da respiração aérea, adaptações ao nível molecular podem ter sido indispensáveis para a função eficiente da hemoglobina na presença da carga de CO<sub>2</sub> aumentada. Se existe qualquer propriedade funcional que separaria as hemoglobinas dos respiradores aéreos e aquáticos, essa seria o efeito de CO<sub>2</sub> sobre elas.

Bohr, Hasselbalch e Krogh estabeleceram em 1904 que o dióxido de carbono induz as propriedades de combinação do oxigênio do sangue, o efeito de Bohr. Em 1914, Christiansen, Douglas e Haldane demonstraram que o efeito de Bohr possuía uma conversão: a oxigenação do sangue influencia sua capacidade combinatória de CO<sub>2</sub>. A um dado pCO<sub>2</sub>, o conteúdo total de sangue oxigenado e a diferença, o CO<sub>2</sub> oxilável, é chamado efeito de Haldane.

O efeito de Bohr foi posteriormente reconhecido como um efeito de prótons sobre a afinidade de O<sub>2</sub> da hemoglobina e era desse modo indireto, em vez de um efeito específico de CO<sub>2</sub>. A conversão do efeito de Bohr, assim definida, é que a oxigenação induz a afinidade do íon hidrogênio da hemoglobina. Por esta razão, a oxigenação produz uma queda de pH no sangue quando são liberados prótons previamente ligados à desoxiemoglobina (Wyman, 1948) e  $H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$ . O CO<sub>2</sub> oxilável foi inicialmente atribuído apenas ao decréscimo resultante da concentração de bicarbonato (Christiansen *et al.*, 1914; Henderson, 1920), i. e., e o efeito de Haldane era visto como uma consequência direta do efeito de Bohr. Há, porém, um segundo fator contribuindo para o efeito de Haldane. A combinação do CO<sub>2</sub> com os grupos aminos terminais de

ambas as cadeias da hemoglobina para formar compostos carbanatos:  $HbNH_2 + CO_2 \rightleftharpoons HbNHCOOH^- \rightleftharpoons HbNHCOO^- + H^+$  (Ferguson & Roughton, 1934a). Em virtude de esses compostos serem formados, de preferência, com hemoglobina desoxigenada, ao invés de oxigenada, eles contribuem substancialmente para o CO<sub>2</sub> oxilável do sangue (Ferguson & Roughton, 1934b).

Embora a presença do efeito de Haldane resulte da presença do efeito de Bohr (Wyman, 1948), necessariamente não implica a presença de CO<sub>2</sub> carbamino. Os efeitos de Haldane tem sido mencionados para os sangues ou hemoglobinas de muitos vertebrados (e. g., Lenfant *et al.*, 1967; Johansen, 1970; Dejourn, 1975; Root & Irving, 1941; Tomita & Riggs, 1971; Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1969a; Baumann *et al.*, 1975; Baumann & Haller, 1975). A falta do efeito de Haldane foi notadamente demonstrada em sangues de poucas espécies de elasmobrânquios, os quais também distintamente carecem do efeito de Bohr (Lenfant & Johansen, 1966; Albers & Pleschka, 1967), sugerindo que a hemoglobina carbamino provavelmente não é formada nessas espécies.

O papel do CO<sub>2</sub> carbamino como um agente alostérico da afinidade do O<sub>2</sub> da hemoglobina tem sido objeto de constante pesquisa, embora limitada quase que inteiramente às hemoglobinas dos mamíferos (revisado por Roughton, 1970, e Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1973). Supunha-se que o CO<sub>2</sub> carbamino baixava a afinidade do O<sub>2</sub> e diminuía o efeito de Bohr da hemoglobina dos mamíferos. Mas, justamente quando as propriedades de ligação do O<sub>2</sub> das hemoglobinas dos mamíferos diferem, as propriedades de ligação do CO<sub>2</sub> também (Bauer & Schroder, 1972; Bursaux *et al.*, 1974; Ferguson & Roughton, 1934b; Bauer *et al.*, 1975; Baumann & Haller, 1975; Tomita & Riggs, 1971).

As propriedades de ligação do O<sub>2</sub> das hemoglobinas dos não mamíferos, contudo, são muito mais variáveis do que as das hemoglobinas dos mamíferos, talvez refletindo as exigências respiratórias mais variáveis. Por exemplo, a sensibilidade do pH das hemoglobinas dos peixes e anfíbios podem variar de um extremo a outro do efeito de Root, onde até mesmo a capacidade de O<sub>2</sub> é diminuída em pH baixo, para uma insensibilidade completa do pH

ou mesmo para o efeito de Bohr invertido. As propriedades de união do CO<sub>2</sub> de tais hemoglobinas não são conhecidas.

O presente estudo colima a três indagações principais: Primeira, até onde as propriedades de ligação de O<sub>2</sub> das hemoglobinas dos não mamíferos estão influenciadas pelo CO<sub>2</sub>, independente do pH? Segunda, as hemoglobinas de respiração aquática diferem das hemoglobinas de respiração aérea em relação à magnitude do efeito do CO<sub>2</sub> carbamino sobre a afinidade do O<sub>2</sub>? E terceira, existe correlação entre o efeito de Bohr e o efeito do CO<sub>2</sub> carbamino sobre a afinidade do O<sub>2</sub> das hemoglobinas?

As informações incluídas aqui são para um anfíbio e quatro espécies de peixes, dois dos quais, são de respiração aérea. Suas hemoglobinas demonstram um aspecto de sensibilidade de pH, do efeito de Root para o efeito de Bohr invertido.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue foram obtidas de três peixes sul-americanos, *Lepidosiren paradoxa*, *Brachyplatystona* sp. e *Hoplosternum littorale*, e de um anfíbio, *Typhlonectes compressicaudus*, todos nativos das águas da bacia do rio Amazonas. Os espécimes foram colhidos próximo de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil, durante uma expedição do navio-laboratório R/V "Alpha Helix" em novembro-dezembro de 1976. A quarta espécie de peixe foi capturada nas proximidades de Beaufort, Carolina do Norte, EE.UU.

As hemoglobinas foram obtidas e purificadas de amostras do sangue de peixes e uma caecília amazônicas, conforme descrito em detalhe por Fyhn *et al.* (1978) e Garlick *et al.* (1978a,b) respectivamente e de *Leiostomus*, de acordo com a descrição feita por Bonaventura *et al.* (1976). As hemoglobinas foram extraídas dos fosfatos orgânicos naturais e outros íons residuais, passando por uma coluna de resina de troca iônica do tipo "Mixed bed". Se fossem exigidas amostras do sangue de mais de um espécime de peixe, era usado apenas o do peixe que tivesse o mesmo padrão eletroforético de hemoglobina. (Veja Fyhn *et al.*, 1978).

O efeito do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do O<sub>2</sub> e o efeito de várias hemoglobinas foram determinados pelo método de equilíbrio tonométrico do oxigênio, de Riggs & Wolbach (1956). Foram empregados todo tempo, tampões de hidrócloro Tris e hidrócloro bis-Tris a uma força iônica constante ( $I=0.05$ ). Os equilíbrios do O<sub>2</sub> foram medidos a 20°C. Após desoxigenação, foi injetado no tonômetros CO<sub>2</sub> de alta pureza, nos experimentos com o mesmo. Como o CO<sub>2</sub> é altamente solúvel na água e baixa o pH, dada a formação de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o pH inicial do tampão foi calculado a partir da equação de Henderson-Hasselbach, de modo que fossem alcançados o pH final desejado e o pCO<sub>2</sub> de 30 torr. Os experimentos foram executados em pares, com CO<sub>2</sub> ou sem ele em cada pH. O pH da solução de hemoglobina no tonômetro foi verificado com um medidor "Radiometer" de pH empregando um eletrodo capilar e o pCO<sub>2</sub> da fase de gás foi medido com o uso de um analisador de CO<sub>2</sub>, infravermelho 215, modelo Beckman. Foi obtida, de maneira uniforme, boa concordância com os valores calculados.

#### RESULTADOS

O efeito de Bohr na presença e ausência de CO<sub>2</sub> (30 torr) é apresentado na Fig. 1 para as hemoglobinas de quatro peixes e para a hemoglobina de um anfíbio. Dados da Hb A humana estão incluídos para comparação, embora a tensão de CO<sub>2</sub> seja 40 torr neste caso. Dois dos peixes são de respiração aérea e dois não; o anfíbio é também de respiração aérea. Para fins comparativos, os experimentos sobre as hemoglobinas de ambos respiradores aéreos e aquáticos foram realizados a uma tensão fisiológica de CO<sub>2</sub> aproximada dos de respiração aérea. A curva de dissociação do CO<sub>2</sub> do sangue (volumes por cento, CO<sub>2</sub> vs. pCO<sub>2</sub>) é hiperbólica, geralmente com uma leve inclinação em tensão de CO<sub>2</sub> acima de 10 torr, aproximadamente a tensão venosa do CO<sub>2</sub> dos peixes de respiração aérea (Ferguson & Black, 1941). Desse modo, o efeito da tensão de CO<sub>2</sub> de 30 torr sobre as hemoglobinas dos respiradores aéreos será um pouco mais alto que o encontrado em tensões de CO<sub>2</sub> fisiológicas, mas não três vezes mais elevado.

As cinco hemoglobinas examinadas foram escolhidas porque também demonstram um

espectro de sensibilidades de pH. Dos dois respiradores aéreos, o *Leiostomus* tem apenas uma hemoglobina com o efeito Root (Bonaventura *et al.*, 1976) e o *Brachyplatystoma* uma única hemoglobina com o efeito de Bohr (Martin *et al.*, 1978). *Hoplosternum*, de respiração aérea tem duas hemoglobinas, componente II com um efeito Root e componente I, aqui examinado, com um efeito de Bohr invertido (Garlick *et al.*, 1978b). *Lepidosiren*, o peixe pulmonado, tem uma só hemoglobina com o efeito Bohr (Phelps *et al.*, 1978). *Typhlonectes*, uma caecília, possui uma única hemoglobina que é essencialmente insensível ao pH acima de pH 6. (Garlick *et al.*, 1978a).

É evidente, na Fig. 1, que as hemoglobinas são muito diferentes em termos de afinidade de O<sub>2</sub> e sensibilidade de pH. Em vista de tal diversidade de união do CO<sub>2</sub>. De fato, as diferenças são muito pequenas. Conforme pode ser visto na Fig. 1, o CO<sub>2</sub> baixa a afinidade do O<sub>2</sub> da hemoglobina em cada caso, o efeito cresce com o aumento do pH. Para as hemoglobinas de *Leiostomus*, *Brachyplatystoma* e *Lepidosiren* o efeito de Bohr é diminuído pelo CO<sub>2</sub> exatamente como nas hemoglobinas dos mamíferos. Normalmente, insensíveis ao pH, a hemoglobina de *Typhlonectes* tem um efeito de Bohr invertido na presença de CO<sub>2</sub>. O efeito de Bohr, comumente invertido, do componente I do *Hoplosternum*, é intensificado pelo CO<sub>2</sub>. A diferença em valores  $\Delta \log P_{50}$ , com CO<sub>2</sub> ou sem ele, em pH 7,5, é aproximadamente 0,2 para todos, exceto o *Brachyplatystoma* e a Hb A, para os quais o  $\Delta \log P_{50}$  é quase o dobro.

O bicarbonato está sempre presente nos experimentos com CO<sub>2</sub>, e, como um anion, poderia estar contribuindo para o efeito atribuído ao CO<sub>2</sub>. É impossível examinar o efeito de HCO<sub>3</sub> em presença de CO<sub>2</sub> sob condições de equilíbrio. Usando um aparelho de reação rápida e um inibidor de anidrase carbônica, Kreuzer *et al.* (1971) demonstraram que há apenas um efeito muito pequeno do bicarbonato sobre a afinidade do O<sub>2</sub> na hemoglobina humana em concentrações fisiológicas. Entretanto, para investigar a possibilidade de que o efeito do CO<sub>2</sub> era somente um efeito do anion em virtude do bicarbonato, uma concentração equivalente de acetato (sal de Na) foi substituída

por bicarbonato (conforme calculado da equação de Henderson-Hasselbalch). O acetato tem apenas um efeito muito pequeno sobre a Hb A nessas concentrações (Antonini *et al.*, 1971), mas sua grandeza e distribuição de carga são semelhantes às do bicarbonato, tornando-o um substituto coerente. Os equilíbrios do oxigênio da hemoglobina do *Lepidosiren* foram medidos na ausência de CO<sub>2</sub> em dois dos pH com acetato substituído por bicarbonato. A afinidade do oxigênio da hemoglobina do *Lepidosiren*, em presença do acetato 0.025 M (em pH 7.35) e do acetato 0.035 M (em pH 7.65) não é diferente da afinidade do oxigênio na ausência desse ânions (Fig. 1, E), indicando que o efeito do CO<sub>2</sub> é quase certo não ser devido ao HCO<sub>3</sub>, mas ao CO<sub>2</sub> carbamino.

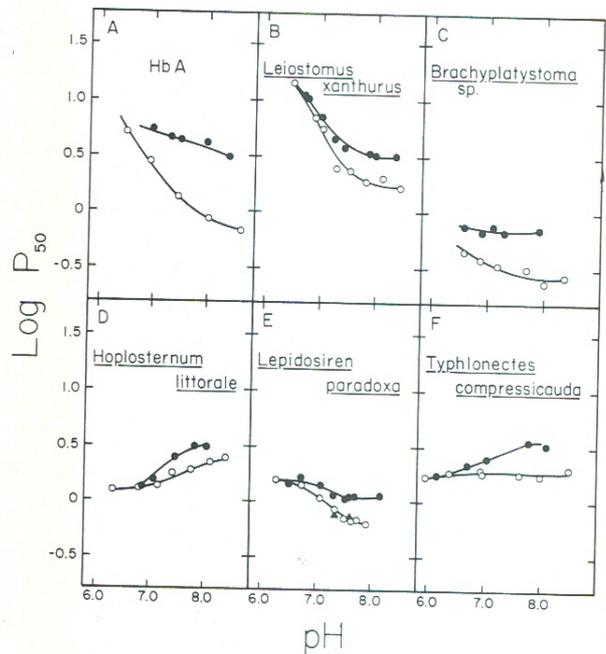


Fig. 1 — O efeito do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do O<sub>2</sub> e o efeito de Bohr das hemoglobinas humanas (A), dois peixes de respiração aquática (B, C), dois peixes de respiração aérea (D, E) e um anfíbio (F). Os círculos cheios (●) indicam a hemoglobina fracionada na presença do CO<sub>2</sub> (30 torr para os peixes e o anfíbio, e 40 torr para a Hb A). Os círculos vazios (○) mostram a hemoglobina fracionada na ausência do CO<sub>2</sub>. Os triângulos cheios (▲) indicam a presença do acetato substituído pelo bicarbonato para mostrar que o efeito do CO<sub>2</sub> não é meramente um efeito de ânion (veja o texto). Foram realizados experimentos a 20°C, =0,05 (CI-), usando tampões Tris ou bis-Tris/HCl.

## DISCUSSÃO

Embora a amostra das espécies seja pequena, não há provas para sustentar a hipótese de que as hemoglobinas de respiração aérea tenham propriedades de união do CO<sub>2</sub> diferentes das hemoglobinas de respiração aquática. As propriedades de união do CO<sub>2</sub> das hemoglobinas diferem mesmo, mas tais correlatos fisiológicos simples não são prontamente manifestos. Isto é verdade, ainda que as hemoglobinas dos mamíferos sejam levadas em conta, duplicando a amostra disponível da espécie. Um método comparativo diferente, todavia, pode ser levado ao estudo do efeito específico do CO<sub>2</sub> como um agente alostérico de hemoglobina, pois há evidências de que certas propriedades estruturais delas podem estar correlacionadas com o efeito do CO<sub>2</sub>.

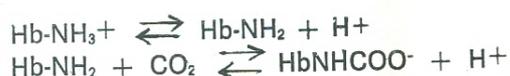
Diversas hemoglobinas de peixes são conhecidas por terem bloqueado os terminais aminos da cadeia  $\alpha$  (Riggs, 1970). As hemoglobinas humanas A<sub>1c</sub> e F<sub>1</sub><sup>acetil</sup> têm bloqueado os terminais aminos sobre as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, e as afinidades do CO<sub>2</sub> de ambas essas hemoglobinas são muito menos afetadas pelo CO<sub>2</sub> do que a Hb A ou Hb F (Bauer *et al.*, 1975). A hemoglobina B do gato é bloqueada de maneira semelhante e forma a metade do carbanato tanto quanto a hemoglobina A desse animal, que não é bloqueada (Baumann and Haller, 1975). A única hemoglobina de peixe previamente examinada para o efeito específico do CO<sub>2</sub> é o componente S da enguia, *Anguilla rostrata* (Gillen & Riggs, 1973). Os terminais aminos da cadeia  $\alpha$  aparentemente são bloqueados nesta hemoglobina também. O componente S da *Anguilla* e o *Hoplosternum*, os quais possuem efeitos de Bohr invertidos semelhantes, são similarmente afetados pelo ATP (Garlick *et al.*, 1978b) e pelo CO<sub>2</sub>, sugerindo que o componente I do *Hoplosternum* da cadeia  $\alpha$  também pode ser bloqueado. Os terminais aminos de cadeia  $\alpha$  da hemoglobina do *Leiostomus* também parecem ser bloqueados (Bonaventura *et al.*, 1976). O efeito do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do O<sub>2</sub> da hemoglobina do *Brachyplatystoma*, medido em pH 7,5, é maior para as outras hemoglobinas, salvo a Hb A. Neste pH, entretanto, o valor da inclinação da curva do efeito de Bohr,  $\Delta \log P_{50}/\Delta pH$ , induzido pelo CO<sub>2</sub> é similar para todas as he-

moglobinas de peixes e anfíbios, e apenas cerca da metade para o da Hb A. Por causa da natureza hiperbólica da curva de dissociação do CO<sub>2</sub> das hemoglobinas, a diferença na pCO<sub>2</sub> (40 torr para Hb A vs. 30 torr para todas outras) é improvavelmente dar a razão de tão grande diferença. Parece, igualmente, que metade das cadeias de todas cinco hemoglobinas podem ter bloqueados os grupos aminos terminais.

Pode ser notado que o relacionamento entre o efeito carbamino do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do O<sub>2</sub> da hemoglobina e a quantidade de carbanato formado em uma dada tensão de CO<sub>2</sub>, não é igual para todas as hemoglobinas. A afinidade do O<sub>2</sub> da Hb F humana é um pouco menos susceptível ao CO<sub>2</sub> do que a Hb A, contudo, em qualquer pH e tensão de CO<sub>2</sub>, uma solução da Hb F conterà ligeiramente mais carbanato do que uma solução equinolar da Hb A (Bursaux *et al.*, 1974; Bauer & Schroder, 1972). Dessa maneira, o efeito menor de CO<sub>2</sub> não pode estar devido à formação diminuída de carbanatos, mas às diferenças estruturais que conduzem às diferenças das interações moleculares (Bursaux *et al.*, 1974). É também verdade que o efeito do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do oxigênio das hemoglobinas, quando medido em saturação de oxigênio a 50%, é consideravelmente menos do que o efeito medido em saturação a 25% (Poyart, C., comunicação pessoal). Potencialmente, o efeito do CO<sub>2</sub> sobre P<sub>25</sub> pode ser melhor correlacionado com a formação de carbanato do que o efeito sobre P<sub>50</sub>. Meus dados limitados sugerem, todavia, que pequenas diferenças entre hemoglobinas relacionadas com o efeito do CO<sub>2</sub> sobre a afinidade do O<sub>2</sub> e o efeito de Bohr, tenderão a ser exagerados se medidas em P<sub>25</sub>, em vez de minimizados.

Além de serem sítios importantes de ligação do CO<sub>2</sub> carbamino, os terminais aminos da cadeia  $\alpha$  são sítios importantes de união de prótons Bohr, contribuindo em 25% ao efeito Bohr alcalino da Hb A humana (Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1969b). Os sítios de ligação de prótons, responsáveis pelo efeito Bohr ácido (reverso) da Hb A, ainda estão em discussão (Perutz *et al.*, 1969) e são até agora desconhecidos para as hemoglobinas de peixe com efeito de Bohr reverso.

A intensificação do efeito Bohr reverso, pelo CO<sub>2</sub>, em uma hemoglobina como o componente 1 do *Hoplosternum* pode ter uma explicação simples. O efeito de Bohr reverso significa que a forma *oxi* liga mais prótons do que a forma *desoxi*. A ligação do CO<sub>2</sub> ocorre, de preferência, na desoxiemoglobina e aumentará o número de prótons ligados. Isto acontece porque o CO<sub>2</sub> se une somente a grupos de NH<sub>2</sub> descarregados e resulta numa liberação adicional de prótons :



Assim, pelo menos um próton é liberado para cada CO<sub>2</sub> unido ao pH fisiológico. Como o CO<sub>2</sub> diminui o número de prótons ligados à desoxiemoglobina e os prótons são preferencialmente unidos pela oxiemoglobina, a diferença no número de prótons ligados pela oxi e desoxi hemoglobina é aumentada. Isto quer dizer que o efeito Bohr reverso pode ser intensificado. As interações moleculares de H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub> com partes adjacentes da molécula de hemoglobina podem ser muito diferentes nas hemoglobinas com os efeitos de Bohr reversos. A importância de tais interações moleculares está enfatizada pelo fato de que a ligação de cianato (Kilmartin and Rossi-Bernardi, 1969a) e certos derivados piridoxais (Benesch *et al.*, 1973) aos terminais aminos das subunidades  $\alpha$  da Hb A, realmente leva a um aumento na afinidade do O<sub>2</sub>, enquanto que a ligação do CO<sub>2</sub> no mesmo sítio conduz a um decréscimo.

Existem outras propriedades funcionais compartilhadas por estas hemoglobinas que podem estar relacionadas às propriedades de ligação do CO<sub>2</sub> semelhantes. Todas as hemoglobinas examinadas neste estudo são fortemente afetadas pela adenosina trifosfato (ATP) (*Leiostomus*, Bonaventura *et al.*, 1976; *Brachyplatystoma*, Martin *et al.* 1978; *Hoplosternum*, Garlick *et al.* 1978a; *Lepidosiren*, Phelps *et al.*, 1978; *Typhlonectes*, Garlick *et al.*, 1978b). Até à descoberta de que os efeitos do 2,3-difosfoglicerato (DPG) e o CO<sub>2</sub> são competitivos (Bauer, 1969), pensava-se que os carbanatos oxiláveis explicavam aproximadamente 25-30% do CO<sub>2</sub> permutado pelo sangue. O DPG liga-se apenas aos terminais aminos da  $\beta$  cadeia (Ar-

nône, 1972) e o CO<sub>2</sub> une-se mais vigorosamente à cadeia  $\alpha$  (Arnone, 1974; Perella *et al.*, 1975). Fosfatos orgânicos têm sido demonstrados competir com o CO<sub>2</sub> para os terminais aminos da cadeia  $\alpha$  da Hb A humana (Bunn & Briehl, 1970). Novas estimativas atribuem somente 10-12% da troca de CO<sub>2</sub> aos carbanatos oxiláveis no sangue todo do ser humano adulto (Rossi-Bernardi & Roughton, 1970; Bauer & Schroder, 1972). Entretanto, nem todas as hemoglobinas são sensíveis aos fosfatos orgânicos e o desempenho dos carbanatos oxiláveis pode ser maior para muitas espécies. As hemoglobinas de bovino e carneiro, que não são afetados pelos fosfatos orgânicos, de fato formam compostos carbanatos oxiláveis, embora em menor extensão do que a Hb A na ausência do DPG (Ferguson & Roughton, 1934b; Bauer *et al.*, 1975). A Hb F é também menos afetada por ambos DPG e CO<sub>2</sub> do que a Hb A (Bursaux *et al.*, 1974). Por outro lado, a hemoglobina do rato é excepcionalmente sensível ao DPG e ao CO<sub>2</sub> (Tomita & Riggs, 1971). Certas hemoglobinas de peixe são em grande parte não afetadas pelos fosfatos orgânicos (Brunori *et al.*, 1973, 1978; Bonaventura *et al.*, 1974), mas o efeito do CO<sub>2</sub> carbamino sobre elas ainda não foi determinado. Em hemoglobinas de peixe, onde o lugar de ligação da cadeia  $\alpha$  é bloqueado, o efeito do CO<sub>2</sub> pode bem ser correlacionado com o efeito dos anions de fosfatos orgânicos.

As hemoglobinas diferem claramente em suas sensibilidades ao CO<sub>2</sub> carbamino, mas especulação acerca do significado adaptativo de tais diferenças é até o momento prematura. Não há prova de que os de respiração aérea tenham hemoglobinas com propriedades de ligação do CO<sub>2</sub> diferentes das dos de respiração aquática. O exame para as diferenças de hemoglobina observando a transição da respiração aquática para a aérea pode ter sido dificultado pela limitação às formas de transição. Os grupos vertebrados que escaparam da vida aquática com êxito, reptéis, pássaros e mamíferos, podem apresentar, de modo expressivo, propriedades da hemoglobina diferentes das dos peixes, e anfíbios. Por exemplo, do número limitado de hemoglobinas até aqui examinado, acetilação dos terminais aminos da cadeia é geralmente limitada às hemoglobinas

dos peixes e em menor escala às dos anfíbios (Riggs, 1970; Sullivan, 1974; Dayhoff, 1972). Além disso, os fosfatos orgânicos intraeritrocíticos são diferentes para grupos vertebrados diferentes (Bartlett, 1976). O grau das interações competitivas entre o CO<sub>2</sub> e os fosfatos orgânicos dependerá da afinidade das hemoglobinas com os fosfatos orgânicos naturais bem como com o CO<sub>2</sub>. É possível que as hemoglobinas tenham evoluído de tal maneira que a competição entre o CO<sub>2</sub> e um fosfato orgânico, cuja concentração intraeritrocítica pode ser regulada, permitiria a função eficiente da hemoglobina sob uma variedade de condições. Talvez investigações suplementares com hemoglobinas de propriedades funcionais diferentes produzirão um padrão que se correlaciona com os parâmetros fisiológicos.

#### AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Drs. Robert Noble e Claude Poyart pelas discussões estimuladoras e aos Drs. J. Bolling Sullivan e Thomas R. Fisher por suas críticas valiosas ao manuscrito. Este trabalho foi amparado pela bolsa PCM-06451 do National Science Foundation para pesquisar a bordo do navio-laboratório R/V "Alpha Helix". Suporte complementar foi fornecido pela bolsa NIH HI-15.460.

#### SUMMARY

The pH dependence of specific effect of CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub> = 30 torr) on oxygen equilibria has been measured for the hemoglobins of four species of fish and one amphibian: *Leiostomus xanthurus* (marine teleost), *Brachyplatystoma* sp. (Amazonian catfish), *Hoplosternum littorale* (air-breathing catfish), *Lepidosiren paradoxa* (air-breathing lungfish), and *Typhlonectes compressicauda* (a Caecilian). The blood CO<sub>2</sub> content of air-breathing fish and amphibians is considerably higher than that of water breathers, yet the hemoglobins examined from the air breathers showed no special adaptation to the increased CO<sub>2</sub> load. Although the effect of pH on the oxygen equilibria of the different hemoglobins varied greatly from Root effect to reverse Bohr effect, the effect of CO<sub>2</sub> on the oxygen affinity was very similar for all but that of the catfish, *Brachyplatystoma* sp., for which the effect was somewhat larger. The drop in oxygen affinity brought about by CO<sub>2</sub> increased with increasing pH for each hemoglobin examined. The change in

the Bohr effect,  $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$  measured at pH 7.5 was similar for all five hemoglobins, about half that produced by CO<sub>2</sub> for human Hb A. This suggests that half the chains of each hemoglobin may have blocked grupos terminais aminos.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, C. & PLESCHKA, K.  
1967 — The effect of temperature on CO<sub>2</sub> transport in elasmobranch blood. *Resp. Physiol.*, 2:261-273.
- ANTONINI, E.; AMICONI, G. & BRUNORI, M.  
1971 — The effect of anions and cations on the oxygen equilibrium of human hemoglobin. In: *Oxygen Affinity of hemoglobin and red cell Acid-base states: Alfred Benzon Symp.*, IV pp. 121-130.
- ARNOME, A.  
1972 — X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature*, 237:147-149.  
1974 — X-ray studies of the interaction of CO<sub>2</sub> with human deoxyhaemoglobin. *Nature*, 247:143-145.
- BARTLETT, G.R.  
1976 — Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 55:211-215.
- BAUER, C.  
1969 — Antagonistic influence of CO<sub>2</sub> and 2,3-diphosphoglycerate on the Bohr effect of human hemoglobin. *Life Sci.*, 8:1041-1046.
- BAUER, C.; BAUMANN, R.; ENGELS, U. & PACYNA, B.  
1975 — The carbon dioxide affinity of various human hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, 250:2173-2176.
- BAUER, C. & SCHRODER, E.  
1972 — Carbamino compounds of hemoglobin in human adult and fetal blood. *J. Physiol.* (London), 227:457-471.
- BAUMANN, R.; BAUER, C. & HALLER, E.A.  
1975 — Oxygen-Linked CO<sub>2</sub> transport in sheep blood. *Amer. J. Physiol.*, 229:334-339.
- BAUMANN, R. & HALLER, E.A.  
1975 — Cat hemoglobins A and B: differences in the interaction with Cl<sup>-</sup>, phosphate and CO<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65:220-227.
- BENESCH, R.E.; YUNG, S.; SUZUKI, T.; BAUER, C. & BENESCH, E.  
1973 — Pyridoxal compounds as specific reagents for the  $\alpha$  and  $\beta$  N-termini of hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:2595-2599.

- BOHR, C. HASSELBALCH, K.A. & KROGH, A.  
1904 — Ueber einen in biologischer Begiehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensauer-  
spannung des Blutes auf dessen  
Sauerstoffbindung ubt. *Skand. Arch.  
Physiol.*, 16 : 402-412.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J.  
1976 — Spot hemoglobin: studies on the Root  
effect of a marine teleost. *J. Biol. Chem.*,  
251 : 1871-1876.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.  
1974 — Hemoglobin of the electric Atlantic  
torpedo, *Torpedo nobiliana*: a cooper-  
ative hemoglobin without Bohr effects.  
*Biochem. Biophys. Act.*, 371 : 147-154.  
1975 — Hemoglobins and hemocyanins: com-  
parative aspects of structure and  
function. *J. Exp. Zool.*, 104 : 155-174.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.;  
GIARDINA, B.; BOSSA, F. & ANTONINI, E.  
1973 — Hemoglobins from trout: structural  
and functional properties. *Mol. Cell.  
Biochem.*, 1 : 189-196.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI, JR., A.;  
GALDAMES-PORTUS, M.I. & WILSON, M.T.  
1978 — Separação e caracterização dos compo-  
nentes de hemoglobina de *Pterygo-  
plichthys pardalis*, o acaribodó. *Acta  
Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este nú-  
mero).
- BUNN, H.F. & BRIEHL, R.W.  
1970 — The interaction of 2,3-diphosphoglycera-  
te with various human hemoglobins. *J.  
Clin. Invest.*, 49 : 1088-1095.
- BURSAUX, E.; FREMINET, A. & POYART, C.  
1974 — Effects of CO<sub>2</sub> and diphosphoglycerate  
on foetal blood affinity for oxygen.  
*Resp. Physiol.*, 20 : 181-189.
- CARTER, G.S.  
1931 — Aquatic and aerial respiration in ani-  
mals. *Biol. Rev.*, 6 : 1-35.  
1957 — Air breathing. In: *The Physiology of  
Fishes*, New York, Academic Press. v.  
1 : 65-80.
- CHRISTIANSEN, J.; DOUGLAS, C.C. & HALDANE, J.S.  
1914 — The adsorption and dissociation of  
carbon dioxide by human blood. *J.  
Physiol.*, 48 : 244-277.
- DAYHOFF, M.O.  
1972 — *Atlas of protein sequence and structure*.  
Marylabd, Natl. Biomedical Res. Foun-  
dation, Silver Springs. v. 5.
- DEJOURS, P.  
1975 — *Principles of Comparative Respiratory  
Physiology*, Amsterdam, North Holland  
Publishing. 253 p.
- FARMER, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H. & NOBLE, R.W.  
1978 — Ocorrência de hemoglobinas de efeito  
Root em peixes amazônicos. *Acta Ama-  
zonica* 8(4) : Suplemento. (Este núme-  
ro).
- FERGUSON, J.K.W. & BLACK, E.C.  
1941 — The transport of CO<sub>2</sub> in the blood of  
certain freshwater fishes. *Biol. Bull.*,  
80 : 139-152.
- FERGUSON, J.K.W. & ROUGHTON, F.J.W.  
1934a — The chemical relationships and physio-  
logical importance of carbamino com-  
pounds of CO<sub>2</sub> with haemoglobin. *J.  
Physiol.*, 82:87-102.  
1934b — The direct chemical estimation of  
carbamino compounds of CO<sub>2</sub> with  
haemoglobin. *J. Physiol.*, 83 : 68-86.
- FYHN, U.E.H.; FYHN, H.J.; DAVIS, B.J.; POWERS,  
D.A.; FINK, W.L. & GARLICK, R.L.  
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos  
peixes da Amazônia. *Acta Amazonica*  
8(4) : Suplemento. (Este número).
- GARLICK, R.L.; BUNN, H.F.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.;  
MARTIN, J.P.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A.  
1978 — Estudos funcionais na hemoglobina de  
componentes separados de um bague de  
respiração aérea, *Haplosternum littora-  
le* (Hancock). *Acta Amazonica* 8(4) :  
Suplemento. (Este número).
- GARLICK, R.L.; DAVIS, B.J.; FARMER, M.; FYHN, H.J.;  
FYHN, U.E.H.; NOBLE, R.W.; POWERS, D.A.; RIGGS, A.  
& WEBER, R.E.  
1978 — Uma troca materno-fetal no equilíbrio  
de oxigênio das hemoglobinas dos *Ty-  
phlonectes compressicauda*. *Acta Ama-  
zonica* 8(4) : Suplemento. (Este núme-  
ro).
- GILLEN, R.G. & RIGGS, A.  
1973 — Structure and function of the isolated  
hemoglobins of the American eel, *An-  
guilla rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 248 :  
1961-1969.
- HENDERSON, L.J.  
1920 — The equilibrium between oxygen and  
carbonic acid in blood. *J. Biol. Chem.*,  
41 : 401-430.
- JOHANSEN, K.  
1970 — Air breathing in fishes. In: *Fish  
Physiology*. New York, Academic Press.  
vol. 6 : 361-411.
- KILMARTIN, J.V. & ROSSI-BERNARDI, L.  
1969a — Inhibition of CO<sub>2</sub> combination and  
reduction of the Bohr effect in haemo-  
globin chemically modified at the  
α-amino groups. *Nature*, 222:1243-1246.

- 1969b — Some properties of horse hemoglobin specifically modified at the  $\alpha$ -amino groups. In: **CO<sub>2</sub> — Chemical Biochemical and Physiological Aspects**. Washington, U.S. Govt. Printing Office, Nasa, pp. 7381.
- 1973 — Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphate. **Physiological Reviews**, 53: 836-890
- KREUZER, F. ROUGHTON, F.J.W.; ROSSI-BERNARDI, L. & KERNOHAN, J.C.  
1971 — Specific effect of CO<sub>2</sub> and bicarbonate on the affinity of hemoglobin for oxygen. In: **Oxygen Affinity of hemoglobin and Red Cell Acid-base states: Alfred Benyon Symp.**, IV, Copenhagen, Munksgaard, p. 208-215.
- LENFANT, C. & JOHANSEN, K.  
1966 — Respiratory function in the elasmobranch *Squalus suckleyi*. **Resp. Physiol.**, 1:13-29.
- LENFANT, C.; JOHANSEN, K. & GRIGG, G.C.  
1967 — Respiratory properties of the blood and pattern of gas exchange in the lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Kreffl). **Resp. Physiol.**, 2: 1-21.
- MARTIN, J.P.; BRUNORI, M.; GARLICK, R.L. & POWERS, D.A.  
1978 — Isolamento e caracterização da hemoglobina de *Brachyplatystoma* sp.: um bagre tropical. **Acta Amazonica** 8(4): Suplemento. (Este número).
- PERELLA, M.; BRESCIANI, D. & ROSSI-BERNARDI, L.  
1975 — The binding of CO<sub>2</sub> to human hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 250: 5413-5418.
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; MAZZARELLA, L. CROWTHER, R.A.; GREER, J. & KILMARTIN, J.V.  
1969 — Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin. **Nature**, 222:1240-1246.
- PHELPS, C.; FARMER, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A.  
1978 — Equilíbrio e cinética de união de oxigênio e monóxido de carbono à hemoglobina do peixe pulmonado sul americano. *Lepidosiren paradoxa*. **Acta Amazonica** 8(4): Suplemento. (Este número).
- 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 número).
- PROSSER, C.L.  
1973 — Respiratory functions of blood. In: **Comparative Animal Physiology** (Prosser, C.L.) 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 317-361.
- RAHN, H.  
1966 — Aquatic gas exchange: theory. **Resp. Physiol.**, 1: 1-12.
- RAHN, H. & GAREY, W.F.  
1973 — Arterial CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, pH and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> values of ectotherms living in the Amazon. **Amer. J. Physiol.**, 225: 735-738.
- RIGGS, A.  
1970 — Properties of fish hemoglobins. In: **Fish Physiology** (eds. HOAR, W.S. & RANDALL, D.J.) New York, Academic Press. vol. 4, pp. 209-251.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R.  
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. **J. Gen. Physiol.**, 39:585-605.
- ROOT, R.W. & IRVING, L.  
1941 — The equilibrium between hemoglobin and oxygen in whole and hemolyzed blood of the tautog, with a theory of the Haldane effect. **Biol. Bull.**, 18: 307-323.
- ROSSI-BERNARDI, L. & ROUGHTON, F.J.W.  
1970 — The role of oxygen linked carbamate in the transport of CO<sub>2</sub> by human erythrocytes under physiological conditions. **J. Physiol. (London)**, 209: pp. 25.
- ROUGHTON, F.J.W.  
1970 — Some recent work on the interactions oxygen, carbon dioxide and haemoglobin. **Biochem. J.**, 117: 801-812.
- SULLIVAN, B.  
1974 — Amphibian hemoglobins. In: **Amphibia and Reptilia: Chemical Zoology** (Eds. FLORKIN, M. & SCHEER, B.T.) New York, Academic Press. vol. 9:77-122.
- TOMITA, S. & RIGGS, A.  
1971 — Studies of the interaction of 2,3-diphosphoglycerate and carbon dioxide with hemoglobins from mouse, man, and elephant. **J. Biol. Chem.**, 246: 547-554.
- WYMAN, J.  
1948 — Heme proteins. **Adv. Protein Chem.**, 4: 407-531.