Estudo da estrutura e função das hemoglobinas isoladas das arraias da Amazônia do gênero Potamotrygon (*)

Joseph P. Martin (1); Joseph Bonaventura (2); Hans J. Fyhn (3); Unni E. H. Fyhn (3); Robert L. Garlick (4) Dennis A. Powers (5)

Resumo

Os hemolisados isolados das arraias da Amazônia, **Potamotrygon** sp., são heterogêneos. Seus pesos moleculares aparentes, determinados pela filtração em **gel**, variam de 54.000 - 58.000. Os experimentos de filtração em **gel** do ferro e ferrilhemoglobina mostram que todos os hemolisados são tetrámeros, os quais não se polimerizam sob oxidação. Um efeito Bohr é evidente em experimentos de equilíbrio de oxigênio de sangue total e de hemolizados. O $P_{1/2}$ dos hemolisados fracionado diminui 33 vezes entre pH 5,95 — 9,0. Nem NaCl nem uréia em concentrações até 4 M afetam significativamente a afinidade de oxigênio do hemolisado fracionado. A hemoglobina mostra um comportamento cooperativo. Os valores "n", determinados pela equação de Hill, caem dentro da faixa de 1,0 — 1,6 entre pH 6,0 — 9,0. As cinéticas de dissociação de O_2 e combinação de CO foram medidas pelo espectrofotómetro **"stopped flow"** e de **"flash photolysis"** respectivamente. A velocidade de dissociação de oxigênio diminui e a velocidade de combinação com monóxido de carbono aumenta com o aumento de pH, mudando aproximadamente em quatro vezes entre pH 6,3 — 8,8. A velocidade de dissociação de oxigênio é também sensível ao fosfato, aumentando cerca de 22% na presença de ATP 1 mM a pH 6,3. Os experimentos de desnaturação de uréia indicam que a hemoglobina de **Potamotrigonide** é mais estável em concentrações elevadas de uréia do que as de outros elasmobrânquios e teleósteos, sendo apenas 50% desnaturados em concentrações de uréia maiores que 9 M. A afinidade de oxigênio do sangue é mais elevada do que as previamente registradas para muitas espécies de arraias marinhas (P_{50} = 12 mm Hg a 30°C na ausência de CO_2).

Introdução

Hemoglobinas de elasmobrânquios exibem muitas propriedades diferentes das dos vertebrados superiores. Fyhn & Sullivan (1975) demonstraram que muitas hemoglobinas de elasmobrânquios polimerizam-se rapidamente sob condições de oxidação, para formar tetrâmeros associados, uma característica compartida pelas hemoglobinas de répteis e anfíbios (Sullivan, 1974a, 1974b), porém não geralmente pelas hemoglobinas dos mamíferos e teleósteos. As interações heme-heme não evoluíram nas hemoglobinas de elasmobrânquios da mesma forma como em pigmentos respiratórios de mamíferos e teleósteos (Manwell, 1958, 1963; Riggs, 1970; Bonaventura *et al.*, 1974a, 1974b). As hemoglobinas de elasmobrânquios também diferem das hemoglobinas de mamíferos e teleósteos em resposta ao sal. A afinidade de oxigênio de várias hemoglobinas de arraias aumenta em concentrações salinas elevadas enquanto a afinidade de oxigênio de hemoglobinas humanas e de teleósteos se reduz em condições semelhantes (Bonaventura *et al*, 1974a, 1974b; Brunori *et al.*, 1974; Weber *et al.*, 1975). Além disso, o sangue dos elasmobrânquios contém uréia, uma proteína desnaturante, e se tem proposto (Bonaventura *et al.*, 1974) que as hemoglobinas dos elasmobrânquios evoluíram a uma estabilidade estrutural em conseqüência de sua exposição à uréia, muito embora esta hipótese tenha sido debatida (Edelstein *et al.*, 1976). De forma clara, as hemoglobinas dos elasmobrânquios posteriormente demonstraram os limites da flexibilidade funcional da molécula de hemoglobina já exibida em outros organismos vertebrados.

Registramos aqui as formas estruturais e funcionais evidenciadas pelas hemoglobinas isoladas de arraias-lisas de água doce do gênero *Potamotrygon*. Este grupo é um dos pou-

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

(1) — Department of Zoology, Duke University Marine Laboratory, Beaufort, N.C. 28516.
(2) — Department of Biochemistry, Duke University Marine Laboratory, and Duke University Medical Center, Beaufort, N.C. 28516.
(3) — Institute of Zophysiology, University of Oslo, P.O. Box 1051, Blindern, Oslo 3, Norway.
(4) — Department of Zoology, University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712.
(5) — Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218.

cos tributos dos elasmobrânquios que evoluíram secundariamente num *habitat* de água doce. (Nelson, 1976). Duas considerações sugeriram de nossa investigação destas hemoglobinas. Primeiro: as arraias desta família residem nas águas relativamente hipóxicas do alto rio Amazonas e seus afluentes. Por isso, as adaptações nas hemoglobinas destes animais a baixas concentrações de oxigênio do meio ambiente podem ter ocorrido. Segundo: a vida na água doce torna óbvia a exigência de altas concentrações de uréia no sangue como não há muito exigido para osmoregulação (Smith, 1931; Goldstein & Foster, 1971; Griffith *et. al.*, 1973). Conseqüentemente, o sangue de *Potamotrygon* tem um baixo conteúdo de uréia (Thorsen *et. al.*, 1967) e suas hemoglobinas podem ter perdido a estabilidade de uréia atribuída às hemoglobinas de elasmobrânquios. A evidência de semelhantes alterações moleculares, na função, deveriam fortalecer a idéia de que as diferenças entre hemoglobinas de várias espécies representam adaptações às exigências dos respectivos meios ambientes.

MATERIAL E MÉTODOS

ISOLAMENTO

Espécimes de *Potamotrygon* foram colhidos em novembro e dezembro de 1976 durante uma expedição do R/V "Alpha Helix" no rio Amazonas, cerca de 50 km acima da confluência com o rio Negro, no rio Solimões. As arraias foram capturadas com tarrafa e transportadas para o "Alpha Helix" para estudo. O sangue foi obtido por punção cardíaca e aspirado para dentro de seringas de vidro heparinizadas a 40°C (100 μl de heparina sódica (5000 I.U./ml) em 1,7% NaCl por 5 ml de sangue). Pequenas amostras foram colocadas em tubos capilares de 50 μl e centrifugado durante três minutos numa centrififuga de soro para avaliações de hematócrito. As células de glóbulo vermelho foram lavadas três vezes em dez volumes de Tris de 1mM a 4°C, pH 8,0, 1,7% NaCl e então lisada em três volumes de Tris 1mM, pH 8,0 por uma hora a 0°C. Um décimo de volume de 1 M NaCl foi adicionado ao hemolizado e a mistura foi centrifugada a 28.000 X g durante 15 minutos para remover os detritos celulares. O supernadante foi então destituído do sal e fosfatos orgânicos pela passagem por uma coluna de resina Sephadex G-25 de 2,5 X 50 cm equilibrada em Tris de 1mM, pH 8,5 seguida pelo tratamento numa coluna deionizante com as seguintes resinas da superfície até o fundo: Dowex-50W em forma de amônia (2cm), Dowex-1 em forma de acetato (2 cm) e Bio, em leito misturado de resina (20 cm.) Rad AG 501-X8(D). A hemoglobina purificada foi guardada a 5°C até o seu uso. Amostras de hemolisados de arraia foram congeladas a —70°C, transportadas em gelo seco a Beaufort, Carolina do Norte e guardadas a —20°C por dois meses. Em Beaufort, os hemolisados foram descongelados e usados em experimentos de filtração a *gel* e estudos de cinética rápida.

1 Abreviações: Bis-Tris, bis (2-hidroxietil) iminotris (hidroximetil) metano; Tris, tris (hidroximetila) aminometano; ATP, trifosfato de adesonina; EDTA, ácido etilenodiaminotetraacetico; 1, constante de velocidade de combinação de monóxido de carbono de segunda ordem; K, constante de velocidade de dissociação de oxigênio de primeira ordem; $P_{1/2}$, pressão parcial de oxigênio, em que em metade dos sítios bem disponíveis tem oxigênio ligado.

ELETROFORESE

Eletroforese vertical em *gel* da poliacrilamida (pH 8,9, 7,5% de gels) foi feita em temperatura ambiente de acordo com Ornstein (1974) e Davis (1964). Amostras de hemoglobina (1mg/ml) foram postas no tampão superior contendo 0,1M β —mercaptoetanol e uma pequena parte ditionito, borbulhada com monóxido de carbono e aplicada aos *gels*. A albumina de soro bovino foi usada com um padrão de mobilidade. Os *gels* foram corados por três horas em R Azul Brilhante Coomassie a 0,25% em ácido acético, metanol, solução aquosa (1:2:4) e descorados por difusão. Os *geis* foram corridos em 560nm usando um registrador de *gel* Gilford ligado a um monocromator Beckman DU. Os hemolisados individuais foram identificados e os fenótipos comuns foram formados. Para evitar dificuldades na interpretação dos resultados de ligação apenas um fenó-

tipo (d da Fig. 1) que corresponde à espécie IV, fenótipo 2, de Fyhn *et al.* (1978), foi empregado nos experimentos de equilíbrio e cinética.

DETERMINAÇÕES DE URÉIA

As concentrações de soro, uréia e hemolisado foram medidas em triplicatas usando "Kits" de uréia e nitrogênio (Clay Adams, Inc.). As concentrações de uréia intracelular foram avaliadas pela determinação do conteúdo de uréia dos hemolisados tratados com ácido tricloroacético a 10% e corrigido por diluição.

ESTUDOS DE PESO MOLECULAR

Os experimentos de filtração de *gel* de soluções de hemoglobina oxidada e reduzida de três arraias foram executadas segundo Martin *et al.* (1978).

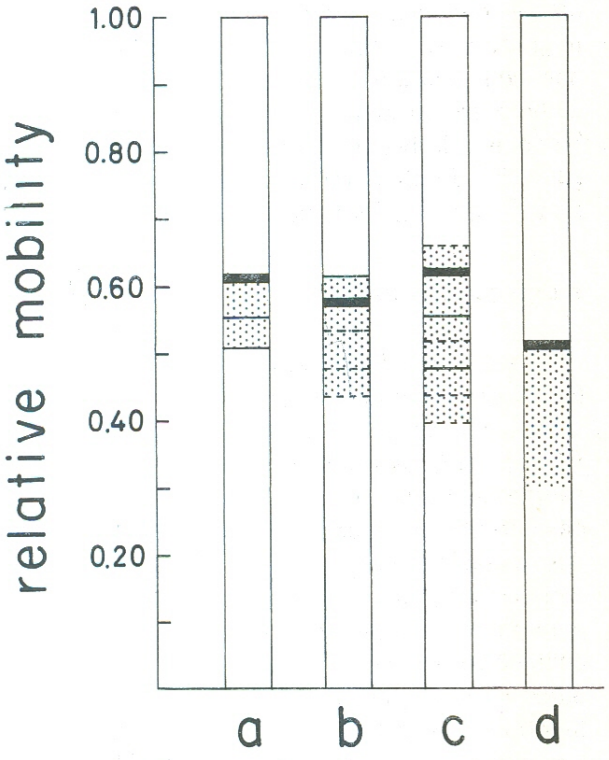

Fig. 1 — Padrões de gel-disco de hemolisados representativos de **Potamotrygon**. Áreas pontilhadas representam faixas obscurecidas (indistintas). A ordenada dá a mobilidade da hemoglobina, relativa à albumina de soro bovino.

ESTUDOS DE EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO

Os equilíbrios do oxigênio do sangue integral foram realizados a 30°C pelo método de Powers *et. al.* (1978) usando um analisador de dissociação de oxigênio Hem-o-scan. (American Instrument Co.).

Os equilíbrios de oxigênio dos hemolisados fracionados foram realizados a 20°C como descritos por Riggs e Wolbach (1956). As soluções de hemoglobina (60 uM) foram levadas à força iônica de 0,05 em tampão Tris ou Bis-tris. Os valores de $P_{1/2}$ foram determinados em condições variáveis de pH, NaCl e concentração de uréia. A uréia usada nestes experimentos foi desionizada com Bio Resina de camada mista. Rad AG 501-X8(D). Os experimentos de dependência do pH foram executados na presença e na ausência de ATP 1 mM.

EXPERIMENTOS DE CINÉTICA RÁPIDA

As velocidades de dissociação de oxigênio de hemoglobina de arraia em soluções tamponadas contendo ditionito foram determinadas usando um espectrofotômetro "stopped flow" Gibson-Durrum equipado com uma direção pneumática e uma câmara de observação de 2 cm por um método previamente descrito (Bonaventura *et al.*, 1974b). As soluções de hemoglobina equilibradas com ar foram rapidamente misturadas com soluções tampões sem gás contendo ditionito em excesso e a velocidade de mudança de absorvência da solução de hemoglobina foi seguida a 437,5 nm. As velocidades de dissociação foram medidas como uma função de pH, uréia e concentração de fosfato orgânico.

As velocidades de combinação de CO da hemoglobina de *Potamotrygon* foram examinadas pela "flash photolysis" usando o método e aparelho de Bonaventura *et. al.* (1974c) e a influência de uréia, ATP e pH nas taxas de combinação foram acertadas. A reação foi estudada numa concentração de CO e analisada com um pseudo-processo de primeira ordem. A análise dos dados foi facilitada pelo emprego de um computador PDP 11/E (Digital Equipment Corporation) e um aparelho de armazenagem e recuperação de dados (DASAR, American

Instruments Corporation). Todos os experimentos foram realizados no tampão Tris ou Bis-tris, força iônica de 0,05 após mistura. A concentração de heme após mistura foi de 4 μM.

ESTUDOS DE DESNATURAÇÃO

Os experimentos que testaram os efeitos de desnaturação de uréia sobre a hemoglobina de *Potamotrygon* sp. e outras espécies de peixe foram realizadas essencialmente segundo Herskovits *et al.* (1970). O efeito de desnaturação de uréia em várias concentrações foi determinado pela observação da diminuição em absorbância na faixa de Soret da oxiemoglobina depois de duas horas de incubação a 23°C em soluções de uréia. Nenhuma mudança posterior no grau de desnaturação foi observada após duas horas. A hemoglobina foi misturada em soluções tamponadas de uréia (Tris 0,05 M, pH 7,8) para dar uma concentração final de 8 μM de heme em 1 ml. Condições inteiramente de desnaturação foram obtidas pela incubação da hemoglobina em cloridrato de guanidina 6 M tamponado, leituras de absorbância foram feitas no comprimento de onda de absorbância de proteína máxima para cada espécie. Os dados foram traçados segundo a seguinte equação:

$$n_\mu = \frac{A_\mu - A_g}{A_o - A_g} \times 100$$

n_μ = % de estrutura nativa de hemoglobina que permanece após uma incubação de duas horas numa solução com μ concentração de uréia.

A_μ = a absorbância da solução de hemoglobina após a incubação numa solução de μ concentração de uréia.

A_g = a absorbância da solução de hemoglobina em cloridrato de guanidina 6 M.

A_o = a absorção da solução de hemoglobina após incubação em Tris 0,05 pH 7,8 sem uréia ou cloridrato de guanidina.

Nas soluções de hemoglobina foram utilizadas amostras frescas, neste estudo foram obtidas da arraia de nariz claro, *Raja eglanteria;* pintada, *Leiostomus xanthurus;* e do peixe pacamão *Opsamus tau*. As amostras que foram armazenadas como hemolisados congelados a —20°C foram os do cação-jaguara, *Galeocerdo* sp.; da truta, *Salmo irideus;* do cascudo, *Hypostomus* sp. e da arraia-lixa, *Potamotrygon* sp.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DO SANGUE DE POTAMOTRYGON SP.

Leituras de hematócrito tiradas do sangue de seis indivíduos revelaram uma proporção de eritrócito de 24 ± 5% do sangue total. As determinações de uréia do plasma e de eritrócitos deram valores de 0,83 e 0,81 mM de uréia respectivamente. Os hemolisados de quatro arraias, cinco réplicas por indivíduo, foram submetidas a eletroforese em *gel* de disco. Exemplos representativos de *gel* aparecem na Fig. 1. Todos os fenótipos de hemoglobina são complexos com duas ou três faixas anodalmente migrantes em cada caso. A lista persistente nos *geis* corados complica a interpretação. Embora esteja claro que as diferenças na mobilidade relativa das faixas existem entre os *geis*, foi difícil obterem-se diferenças consistentes entre os fenótipos.

FILTRAÇÃO EM GEL

As hemoglobinas eluíram com pesos moleculares aparentes entre 54.000 e 58.000. Tanto as formas oxidadas (tratadas com $K_3Fe(CN)_6$) como as reduzidas (incubadas em mercaptoetenol) de três fenótipos foram examinadas. Dentro dos fenótipos, tanto os hemolisados oxidados como os reduzidos eluíram na mesma posição. A hemoglobina do peixe pintado foi notada ser tetrâmera sob as mesmas condições por centrifugação ($s_{20,w}$ = 4,46S) eluíram numa posição idêntica e de um dos fenótipos de arraia. Tantos os hemolisados tratados com mercaptano como com $K_3Fe(CN)_6$ eluíram como picos simétricos únicos entre todos os fenótipos (Fig. 2). Nem a polimerização de tetrâmeros nem a dissociação de tetrâmeros em dímeros ocorreu nestes experimentos.

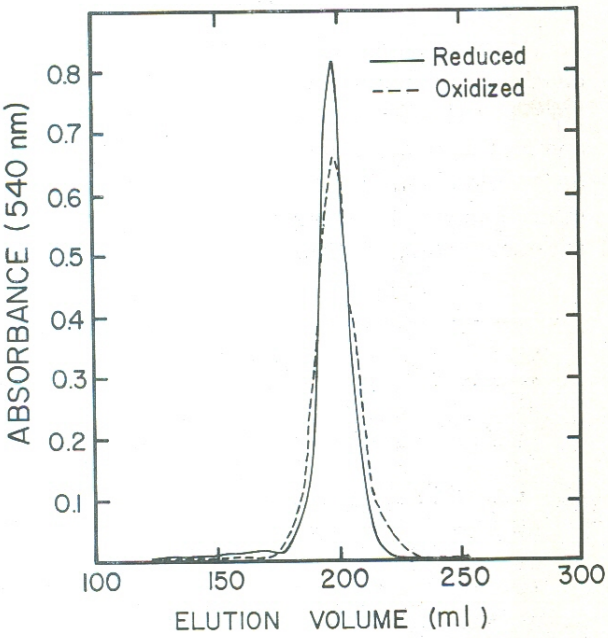

Fig. 2 — Cromatografia gel de hemolisados oxidados (——) e reduzidos (- - -) de **Potamotrygon sp.**

ESTUDOS DO EQUILÍBRIO DO OXIGÊNIO

Curvas da oxigenação do sangue total na presença e ausência de 5,6% de CO_2, estão representadas na Fig. 3. O sangue possui um efeito Bohr e há interações homotrópicas entre subunidades. O $P_{1/2}$ é 12,3 mm Hg a 30°C e pH 7,7 e 17,0 mm Hg na presença de 5,6% de CO_2.

Os ploteados de log $p_{1/2}$ vc. pH do hemolisado fracionado de arraia e hemolisado fracionado +1 mm ATP estão ilustrados na Fig. 4. $P_{1/2}$ e o valor de *n* foram obtidos por um ajuste dos quadrados mínimos dos dados de oxigenação à equação de Hill. As avaliações de $P_{1/2}$ do hemolisado fracionado de arraia e contendo o ATP diminuem aproximadamente 33-vezes entre pH 5,95 e 9,0. O efeito Bohr calculado como Δ log $P_{1/2}$ ΔpH é cerca de —0,4 na hemoglobina fracionada de arraia. O $P_{1/2}$ da hemoglobina fracionada de arraia a 20°C e pH 7,6 é cerca de 1 mm Hg enquanto o da hemoglobina + 1 mm ATP é aproximadamente de 3 mm Hg.

Com pH 6,0 no tampão bis-Tris 0,05 M, obtivemos uma depressão no grau de saturação das hemoglobinas de *Potamotrygon* de cerca de 4%. Farmer *et al.* (1978) observaram uma depressão perto de 10% em experimentos feitos em tampão citrato 0,05 M, pH 5,5. A diferença entre estes valores é pequena e indubitavelmente subira por causa das diferenças em condições experimentais. A extrapolação dos dados de $p_{1/2}$ da figura 4 para o pH 5,5 e

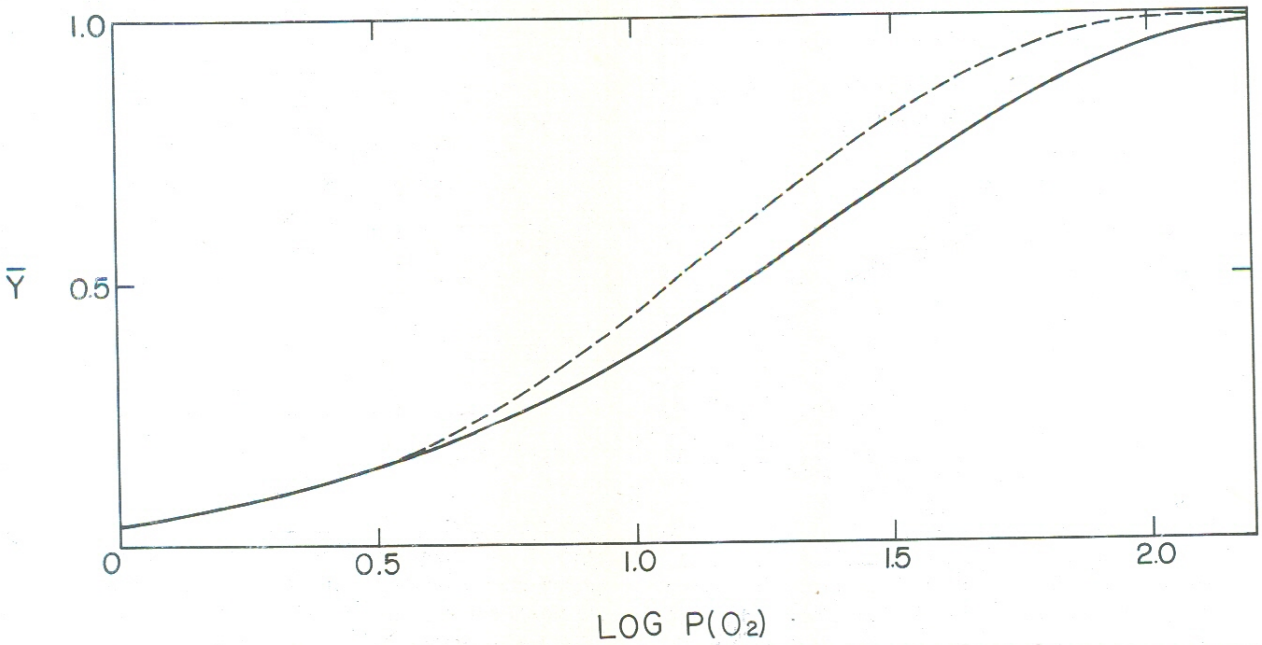

Fig. 3 — Curvas de saturação do oxigênio do sangue integral de **Potamotrygon** sp. sem CO_2 (- - - -) e com 5,6% de CO_2 (—) nos gases em equilíbrio a 30°C. A ordenada y é a saturação fracionária e a abscissa o logarítmo da pressão parcial do oxigênio em Hg mm.

usando um valor *n* de 1 e fixando os valores da equação de Hill produz um nível de saturação aproximadamente igual ao de Farmer *et. al.* (1978).

Os valores *n* variam de 1 a 1,6 entre pH 5,95 e 9,0. Os dados de equilíbrio da hemoglobina fracionada e fracionada + 1mM foram analisados pela análise de regressão linear. Os coeficientes de correlação para cada um dos tratamentos experimentais foram r = — 0,948, p< 0,001 e r = — 0,968, p< 0,001 respectivamente. O bom ajuste dos dados de equilíbrio a um modelo linear é consistente com as observações de Mumm *et. al.* (1978) na hemoglobina da arraia-lixa *Dasyatis sabina*. Esta hemoglobina exerce uma relação quase linear entre seu log $p_{1/2}$ e pH.

A afinidade de oxigênio dos hemolisados fracionados foram examinado a pH 7,6 e a 20°C como uma função das concentrações de NaCl e uréia (Fig. 5a, b). Nenhum dos compostos parece exercer um efeito significativo até 4 M; o $p_{1/2}$ variou pouco mais que 1,5 mm Hg sobre os níveis totais de concentrações em cada caso.

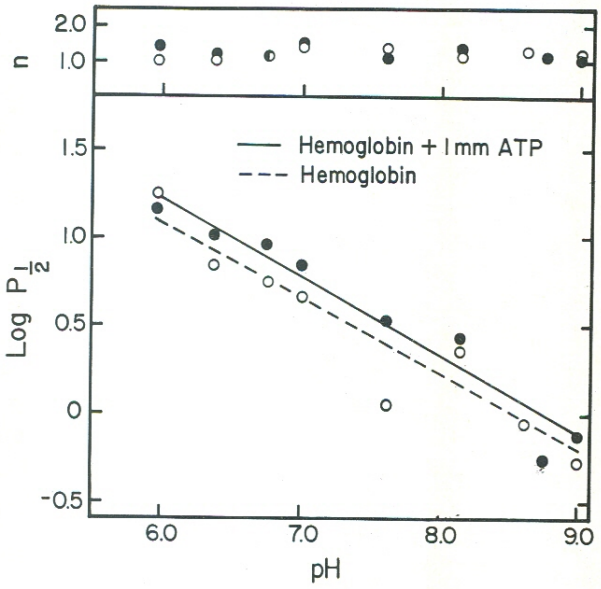

Fig. 4 — O ploteado do log $P_{1/2}$, a pressão parcial do oxigênio na qual a hemoglobina é saturada pela metade e n vs. pH para hemolisados fracionados (O) e fracionados + ATP 1 mM (●), tirados de um único espécime de **Potamotrygon** sp. As condições estão descritas no texto.

CINÉTICA DE DISSOCIAÇÃO DE OXIGÊNIO

As constantes de velocidade para a dissociação de oxigênio dos hemolisados de arraia, com 1 mM ATP e sem ele são apresentados como uma função de pH (Fig. 6). As soluções de hemoglobina, 8 μM, equilibradas com ar foram rapidamente misturadas com soluções-tampões contendo ditionito; a cinética de dis-

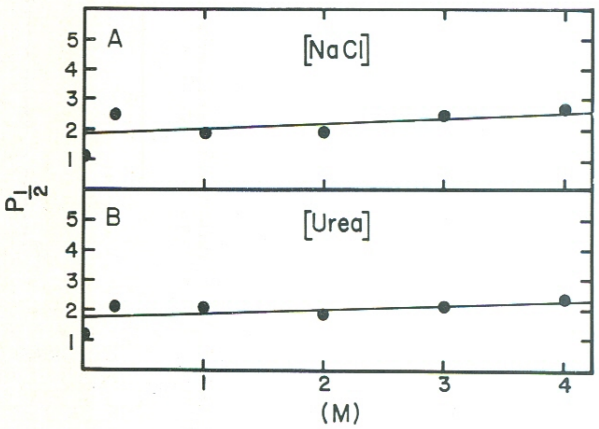

Fig. 5a, b — Dependência $P_{1/2}$ do hemolisado fracionado de **Potamotrygon** sp. no concentração de cloreto (A) e uréia (B) em pH 7.5. As condições estão descritas no texto. As ordenadas são expressas em Hg mm.

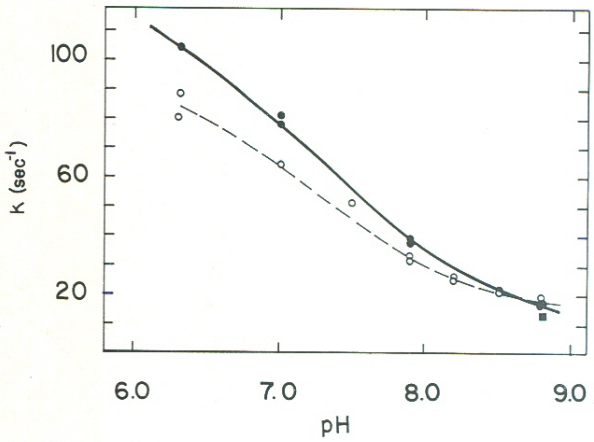

Fig. 6 — Dependência em pH da constante de dissociação de primeira ordem do hemolisado de **Potamotrygon** sp. para o oxigênio (K) tirado dos dados da velocidade inicial. As condições estão descritas no texto. Hemolisado fracionado (O), hemolisado fracionado + ATP 1 mM (●) e hemolisado fracionado + ATP 1 mM + uréia 5M (■).

sociação foi heterogênea a todos os valores estudados. O processo de dissociação foi analisado em termos de cinética de primeira ordem e apenas as velocidades iniciais de dissociação foram traçadas vs. pH. A constante de $O_{2\ off}$ varia aproximadamente 43 vezes na ausência de ATP e 52 vezes na presença de 1 mM ATP dentro da faixa de pH 6,3 — 8,8. A pH 6,3, $O_{2\ off}$ é aproximadamente igual a 85 seg^{-1} e $O_{2\ off}$ (1 mM ATP) igual a 104 seg^{-1}. Na presença de ATP 1 mM aumenta a velocidade de $O_{2\ off}$ aproximadamente 22% em pH 6,3. As velocidades de dissociação dos hemolisados + ATP a 1 mM e uréia 5 M foram examinados em pH 8,8. Nenhum efeito significativo de uréia pôde ser discernido na velocidade $O_{2\ off}$.

COMBINAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO PELA "FLASH PHOTOLYSIS"

As soluções tamponadas de hemoglobinas heme (8-10 μM da mistura) que continham ditionito foram examinadas na ausência e presença de uréia sob várias condições. O processo de combinação de CO foi multifásico sob todas condições. As constantes de velocidade de segunda ordem calculadas a partir das velocidades de reação inicial, observadas sob várias condições, aparecem na Tabela I. Pouco efeito da uréia a 5 M é visto na velocidade CO_{on} em pH baixo ou alto. Entretanto, a constante CO_{on} é atingida pelos aumentos de pH aproximadamente 4,4 vezes entre pH 6,2 e pH 8,8. Não se observa efeito algum de ATP em pH alto.

TABELA I — Constantes de velocidade para a combinação da hemoglobina de Potamotrygon com Monóxido de Carbono (*)

Condições	$l' \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ pH 6,2	pH 8,8
Fracionada	2,44	10,4
	2,22	10,3
Uréia 3 M	2,44	10,6
	2,48	10,3
ATP 1 mM	---	10,3
	---	10,3

(*) — Os valores são da constante de velocidade de segunda ordem para combinação de CO calculada a partir dos dados da velocidade inicial. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As condições estão descritas no texto.

EFEITOS DA URÉIA SOBRE AS HEMOGLOBINAS DE PEIXE NO ESPECTRO DE SORET

Os efeitos da desnaturação pela uréia sobre os espectros na região de Soret das oxihemoglobinas de sete espécies de peixes são mostrados na Fig. 7. A concentração de uréia em que o valor $n\mu$ de cada uma das hemoglobinas é 50% difere consideravelmente entre as espécies. É evidente que baixas concentrações de uréia < 3 M tem pouco efeito sobre o meio ambiente molecular de heme na maioria das hemoglobinas examinadas. Nas concentrações mais elevadas de uréia, a proteína presumivelmente se desdobra, a cavidade do heme das globinas abre-se e as difrenças nos graus d desdobramento entre as espécies tornam-se pronunciadas; as hemoglobinas de teleósteo desnaturam mais rapidamente do que as hemoglobinas do elasmobrânquios testado neste estudo. Entretanto, a hemoglobina de *Potamotrygon* sp., uma espécie de água doce com pouca uréia em seu sangue, possui a estabilidade maior em soluções de uréia, seu valor *n* sendo apenas 50% em concentrações de uréia maiores que 9M.

DISCUSSÃO

Potamotrygon sp. vive em águas que são relativamente hipóxicas em comparação aos *habitats* das arraias marinhas. Embora os hematócritos das arraias de água doce não difiram significativamente do que foi registrado numa espécie marinha, *Raia oscillata* (Dill *et. al.*, 1932), a afinidade de oxigênio de sua hemoglobina é substancialmente mais elevada do que as registradas para várias espécies de rajiformes marinhas, Tabela 2. Admissivelmente, as condições experimentais registradas na Tabela 2 diferem de um estudo a outro e estas diferenças podem acentuar diferenças menores na afinidade de oxigênio da hemoglobina. Contudo, a magnitude da diferença entre $p_{1/2}$ da hemoglobina de *Potamotrygon* e as registradas para as hemoglobinas de outras espécies são aparentes. Assim, a hemoglobina de *Potamotrygon* pode ter desenvolvido uma afinidade mais elevada de oxigênio em resposta à tensão hipóxica.

TABELA II — Resumo dos dados de $P_{1/2}$ para as hemoglobinas e sangues de várias arraias.

Espécies	Ensaio temperatura	pH	$P_{1/2}$	Condições	Eritrócitos	Solução de hemoglobina diluída	Fonte
Gymnura micrura arraia-borboleta, arraia-manteiga	25°C	7,4	Hg 14,5mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Rhinoptera bonasus arraia ticonha	25°C	7,4	Hg 14 mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Dasyatis say arraia-amarela, arraia-manteiga	25°C	7,4	Hg 14,5mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Dasyatis Centura arraia-lixa	25°C	7,4	Hg 15 mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Dasyatis americana arraia-lixa	25°C	7,4	Hg 15 mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Dasyatis sabina arraia-lixa	25°C	7,4	Hg 15 mm	Tampão de fosfato ,033 M	—	+	McCutcheon 1947
Raja clavata arraia-chita	15°C	7,7	Hg 30,2mm	Sangue integral	+	—	Hughes & Wood 1974
Raja binoculata arraia-chita	10°C	7,5	Hg 20 mm	Com ringers	+	—	Manwell 1958
Torpedo nobiliana torpedo do Atlântico	20°C	7,5	Hg 16 mm	Tris ,05 M NaCl ,1 M ATP ,001 M	—	+	Bonaventura, et al., 1974a
Raja eglanteria arraia de focinho claro	20°C	7,4	Hg 19,9mm	Tris ,05 M ATP ,1 M	+	—	Bonaventura, et al., 1974b
Raja oscillata arraia de inverno	20°C	7,6	Hg 30 mm	Sangue integral	+	—	Dill, et al., 1932
Raja oscillata arraia de inverno	30°C	7,6	Hg 50 mm	Sangue integral	+	—	Dill, et al., 1932
Potamotrygon sp. arraia amazônica	20°C	7,5	Hg 3,4mm	Tris ,05 I ATP ,001 M	—	+	Martin, et al., este trabalho
Potamotrygon sp. arraia amazônica	30°C	—	Hg 12,2mm	Sangue integral Tris ,2 M	+	—	Martin, et al., este trabalho

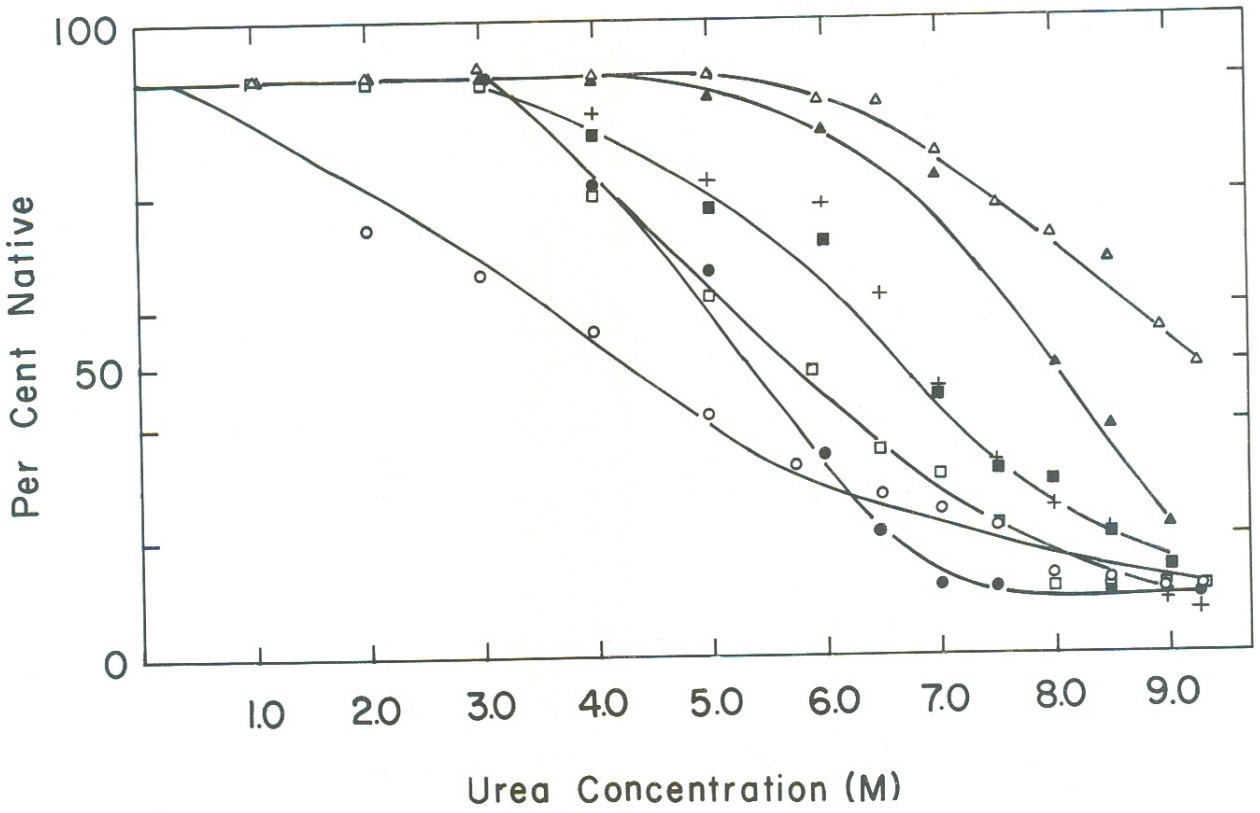

Fig. 7 — Porcentagem da estrutura pura (n) da hemoglobina que fica após incubações de duas horas a 23°C em 0,05 M Tris, pH 7,8 vs. concentração de uréia. **Hypostomus** sp. (acari, acari-bodó) (O). **Leiostomus xanthrurus** (pintado) (●); Truta I. **Salmo irideus** (□); **Opsanus tau** (peixe-sapo) (+); **Galeocerdo** sp. (tintureira) (■); **Raja eglanteria** (arraia do focinho claro) (▲); **Potamotrygon** sp. (arraia amazônica) (Δ). As condições estão descritas no texto

Os dados deste estudo indicam que uma diferença considerável existe na afinidade de oxigênio medida em sangue integral e a afinidade de oxigênio da hemoglobina medida na presença de ATP de 1 mM. Esta discrepância pode ter várias fontes. As afinidades do sangue total foram medidas a 30°C em vez de a 20°C como no caso dos hemolisados; aumentos na temperatura geralmente reduzem a afinidade de oxigênio da hemoglobina. Também o pH intracelular do sangue integral não foi determinado e pode ter sido abaixo do pH 7. O exame da Fig 4 mostra que os hemolisados fracionados + ATP 1 mM fazem aproximar-se ao estado mais baixo da afinidade vista no sangue total quando os experimentos são realizados nos índices mais baixos de pH. Também os moduladores potentes tais como trifosfato de guanosina ou inositol pentafosfato, cujos efeitos sobre os hemolisados não foram examinados, podem influenciar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio dentro da célula.

A resposta aparentemente linear do log $p_{1/2}$ ao pH é uma característica interessante da hemoglobina de *Potamotrygon*. Ao menos, duas interpretações deste fenômeno são possíveis. A molécula pode possuir muitos grupos Bohr, cada um com pequeno efeito. Alternativamente, e mais provável, que o hemolisado pode consistir numa mistura de hemoglobinas com diferentes afinidades de oxigênio e diferentes respostas ao pH (Antonini & Brunori, 1971). Esta observação é sustentada pela ligação multifásica e pela velocidade de dissociação dos ligantes observados nos experimentos de cinética.

A hemoglobina de *Potamotrygon* é insensível às mudanças de concentração salina, um comportamento muito diferente do evidenciado pelas hemoglobinas de teleósteos e mamíferos, cujas afinidades diminuem com o aumento da concentração salina, e das observadas nas hemoglobinas de muitos rajiformes marinhos, onde as afinidades de oxigênio aumentam com um aumento na concentração salina. É de interesse que Mumm *et al.*, 1978 tenham recentemente registrado que a afinidade de oxigênio da hemoglobina isolada da arraia-lixa, *Dasyatis sabina* é também insensível a NaCl. Bonaventura, *et al.*, (1974b) sugerem que a dissociação dos tetrâmeros a dímeros mais reativos pode ser responsável pela afinidade aumentada da hemoglobina da arraia e "skate" em concentrações salinas elevadas. Conclui-se, deste fenômeno, que as interações eletrostáticas podem ser responsáveis pela grande estabilidade destas hemoglobinas. Se for assim, outros mecanismos devem ser sugeridos como responsáveis pela extraordinária estabilidade observada pela hemoglobina de *Potamotrygon*.

A hemoglobina de *Potamotrygon* também difere da maioria das hemoglobinas de elasmobrânquios em sua incapacidade para polimerização. Provavelmente, os resíduos de sulfidrilos não estão disponíveis na superfície destas proteínas pela formação de pontes de dissulfeto intermolecular.

A hemoglobina de *Potamotrygon* lembra as hemoglobinas de outros elasmobrânquios e dos teleósteos pelo seu comportamento cinético em que o efeito do fosfato orgânico é manifestado em sua influência sob a constante $O_{2\ off}$. Também esta hemoglobina possui um efeito Bohr como acontece na maioria das hemoglobinas de peixe. Entretanto, a contribuição relativa da constante CO_{on} ao efeito de pH parece maior do que a característica de outras espécies de peixe. O $p_{1/2}$ da hemoglobina fracionada de *Potamotrygon* diminui aproximadamente 33 vezes entre pH 5,95 — 9,0. Sobre os valores de pH 6,3 — 8,8 a constante CO_{on} aumenta 4,4 vezes e a constante $O_{2\ off}$ diminui 4,2 vezes. Tanto a direção como a magnitude das mudanças nas constantes *"on"* e *"off"* estão em concordância qualitativa com os resultados de equilíbrio.

A dissociação da subunidade, medida pelo aumento em proporção do material de reação rápida após a *flash photolysis*, parece insignificante em concentrações de uréia até 5 M. Estes resultados são posteriormente confirmados pelo resultado do equilíbrio de oxigênio e pelos experimentos de dissociação de oxigênio realizados em uréia. Assim, enquanto as espécies de *Potamotrygon* não mantém concentrações elevadas de uréia no sangue, suas hemoglobinas, entretanto, retém uma estabilidade notável em uréia. Prova posterior desta estabilidade vem dos estudos de desnaturação de uréia. Embora, as concentrações de uréia nestes experimentos excedessem de muito as concentrações encontradas em elasmobrânquios marinhos, uma direção definida é discernível. Parece que as hemoglobinas de teleósteos foram mais facilmente desnaturadas do que as hemoglobinas de elasmobrânquios. É obscuro que vantagem fisiológica va derivar-se desta estabilidade adicional. Parece em vez de ter perdido a estabilidade extra geralmente exibida pelas hemoglobinas do elamosbrânquios, a de *Potamotrygon* tem mantido certa estabilidade, que seus ancestrais filogenéticos marinhos podem ter possuído.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Dra. Célia Bonaventura por sua assistência na realização dos experimentos de cinética, à Dra. Emília Pandolfelli por seus conselhos e sugestões, à tripulação do "Alpha Helix" e ao governo brasileiro pela permissão de nós trabalharmos em águas da Amazônia, a Hans J. Fyhn e Unni E.H. Fyhn por concederem ajuda pelo Conselho de Pesquisa da Noruega para Ciência e Humanidades.

Summary

The hemolysates isolated from Amazonian stingrays, **Potamotrygon** sp. are heterogeneous. Their apparent molecular weights, determined by gel filtration, vary from 54,000 - 58,000. Gel filtration experiments of ferro and ferrihemoglobin show that all of the hemolysates are tetramers which do not polymerize upon oxidation. A Bohr effect is evident in oxygen equilibrium experiments of whole blood and of hemolysates. The $p_{1/2}$ of stripped hemolysates decreases 33-fold between pH

5.95 — 9.0. Neither NaCl nor urea in concentrations up to 4 M significantly affect the oxygen affinity of the stripped hemolysate. The hemoglobin shows cooperative behavior. The n values, determined by the Hill equation, fall within the range 1.0 — 1.6 between pH 6.0 — 9.0. The O_2 dissociation and CO combination kinetics were measured by stopped flow spectrophotometry and flash photolysis respectively. The oxygen dissociation rate decreases and carbon monoxide combination rate increases with increasing pH both changing over four-fold between pH 6.3 — 8.8. The oxygen dissociation rate is also phosphate sensitive, increasing approximately 22% in the presence of 1 mM ATP at pH 6.3. Urea denaturation experiments indicate that Potamotrygonid hemoglobin is more stable at high urea concentrations than those of other elasmobranchs and teleosts, being only 50% denatured at urea concentrations greater than 9 M. The oxygen affinity of the blood is higher than those previously reported for many species of marine rays and skates p_{50} = 12 mm Hg at 30°C in the absence of CO_2).

BIBLIOGRAFIA

ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1971 — **Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands**. North Holland, Amsterdam. 436 p.

BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J.
1974c — The effects of pH and anions on functional properties of hemoglobin from **Lemur fulvus fulvus. J. Biol. Chem.**, 249:3768-3775.

BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.
1974a — Hemoglobin of the electric Atlantic torpedo, **Torpedo** Nobiliana: A cooperative hemoglobin without Bohr effects. **Biochim. Biophys. Acta**, 371:147-154.

BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.
1974b — Urea tolerance as a molecular adaptation of elasmobranch hemoglobins. **Science**, 186:57-59.

BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; GIARDINA, B.; BOSSA, F. & ANTONINI, E.
1974 — Hemoglobin from trout structural and functional properties. **Molec. and Cell Biochem.**, 1:189-196.

DAVIS, B.J.
1964 — Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 121:404-427.

DILL, D.B.; EDWARDS, H.T. & FLORKIN, M.A.
1932 — Properties of the blood of skate **(Raja oscillata). Biol. Bull.**, 62:23-36.

EDELSTEIN, S.J.; MCEWEN, B. & GIBSON, Q.H.
1976 — Subunit dissociation in fish hemoglobins. **J. Biol. Chem.** 251:7632-7637.

FARMER, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H. & NOBLE, R.
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. & GARLINK, R.L.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos peixes da Amazônia. **Acta Amazonica** 8(4) : Suplemento. (Este volume).

FYHN, U.E.H. & SULLIVAN, B.
1975 — Elasmobranch hemoglobins: Dimerization and polymerization in various species. **Comp. Biochem. Physiol.** 50B, 119-129.

GOLDSTEIN, L. & FOSTER, R.P.
1971 — Urea biosynthesis and excretion in freshwater and marine elasmobranchs. **Comp. Biochem. Physiol.**, 39B:415-421.

GRIFFITH, R.W.; PANG, P.; SRIVASTAVA, A. & PICKFORD, G.
1973 — Serum composition of fresh water stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and dilute seawater. **Biol. Bull.**, 144:304-320.

HERSKOVIIS, T.T.; JAILLET, H. & GADEGBKU, B.
1970 — On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by ureas. **J. Biol. Chem.**, 245 : 4544-4560.

HUGHES, G.M. & WOOD, S.C.
1974 — Respiratory properties of the blood of the thornback ray **(Raia clavata) Experientia** 30/2, 167-168.

MCCUTCHEON, F.
1947 — Specific oxygen affinity of hemoglobin in elasmobranchs and turtles. **J. Cell. Comp. Physiol.**, 29:333-338.

MANWELL, C.
1958 — Ontogeny of hemoglobin in the skate **Raja binoculata. Science**, 128:419-420.

MANWELL, C.
1963 — Fetal and adult hemoglobins of the spiny dogfish **Squalis suckleyi. Arch. Biochem. Biophys.**, 101:504-511.

MARTIN, J.P.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L.; POWERS, D.A. & WILSON, M.T.
1978 — Isolamento e caracterização dos componentes de hemoglobina de **Mylossoma** sp., um teleósteo da Amazônia. **Acta Amazonica** 8(4) : Suplemento. (Este volume).

MUMM, D.P.; ATHA, D.H. & RIGGS, A.
1978 — The hemoglobin of the common sting ray, **Dasyatis sabina:** structural and functional properties. **Comp. Biochem. Physiol.**, (No prelo).

NELSON, J.S.
1976 — **Fishes of the World.** John Wiley and Sons, New York, 415 p.

ORNSTEIN, L.
1964 — Disc electrophoresis — I. Background and theory. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 121: 321-349.

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.
1970 — Properties of fish hemoglobins in **Fish Physiology.** (Hoar, W. S. & Randall, D.J., eds.). New York, Academic Press, Vol. 4:209-251.

RIGGS, A. & WOLBACH, R.A.
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. **J. Gen. Physiol.**, 39:585-605.

SMITH, H.W.
1931 — The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes — I. Freswater elasmobranches. **Am. J. Physiol.**, 98:279-295.

SULLIVAN, B.
1974a — Amphibian hemoglobins, In: **Chemical Zoology,** (Florkin, M. & Scheer, B.T. ed.). Academic Press, 9:77-118.

SULLIVAN, B.
1974b — Reptilian hemoglobins, In: **Chemical Zoology,** (Florkin, M. & Scheer, B.T. ed.). Academic Press, 9:353-374.

THORSON, T.V.; COWAN, C.M. & WATSON, D.E.
1967 — **Potamotrygon** sp.: elasmobranchs with low urea content. **Science,** 158:375-377.

WEBER, R.E.; JOHANSEN, K.; LYKKEBOE, G. & MALOIY, G.O.
1977 — The oxygen binding properties of hemoglobins from aestivating and active African lungfish. **J. Exp. Zool.**, 199 : 85-99.