

# Estudo das propriedades funcionais das hemoglobinas de *Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas* (\*)

Maria Isabel Galdames Portus (1); Robert W. Noble (2); Martha Farmer (3); Dennis A. Powers (4); Austen Riggs (5); Maurizio Brunori (6); Hans J. Fyhn (7); Unni E. H. Fyhn (7)

## Resumo

Têm sido estudados os efeitos de pH e fosfatos orgânicos no equilíbrio e propriedades cinéticas na união de ligantes das hemoglobinas de dois peixes relacionados à Amazônia, *Osteoglossum bicirrhosum* de respiração branquial obrigatória e *Arapaima gigas*, de respiração aérea obrigatória. As hemoglobinas de ambos os peixes exibem, um efeito Root, a mínima afinidade pelo oxigênio esta associada com a completa perda da cooperatividade na união do ligante. Nesta baixa afinidade, estado T, há uma grande heterogeneidade das unidades de ambas as hemoglobinas como é evidenciado pelo coeficiente de Hill menor a, unidade e a cinética bifásica na combinação de monóxido de carbono. A maior diferença nas propriedades das hemoglobinas destes dois peixes é encontrada a pH altos (acima de pH 8) onde ambas as hemoglobinas exibem sua mais alta afinidade pelo ligante. Aqui ambas as hemoglobinas diferem em sua afinidade e cooperatividade com a qual elas se unem a seus ligantes, tendo a hemoglobina de *Arapaima* a menor afinidade porém a mais alta cooperatividade.

## INTRODUÇÃO

*Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas* são membros dos Osteoglossides, os quais são encontrados, em grande quantidade, nas águas do sistema de rios da Amazônia. As hemoglobinas destes peixes são consideravelmente interessantes. Primeiro, nenhuma das hemoglobinas desta família primitiva de peixes tem sido estudada funcionalmente e pormenorizadamente. Segundo, estes peixes, estritamente relacionados, obtêm oxigênio de maneir

ras diferentes. *Osteoglossum* é de respiração branquial com brânquias bem desenvolvidas. *Arapaima*, por outro lado, é de respiração aérea obrigatória. Esta comparação das propriedades das hemoglobinas destas duas espécies poderia revelar alguma adaptação molecular de seus diferentes mecanismos respiratórios. Finalmente, as hemoglobinas destes peixes são particularmente convenientes de estudar porque estas são pouco numerosas. *Osteoglossum* possui uma hemoglobina simples enquanto o fenótipo prevalente de *Arapaima* tem dois, os quais parecem ter propriedades funcionais muito similares.

O equilíbrio e cinética de reação de hemoglobinas de *Osteoglossum* e *Arapaima* foram examinados com vários ligantes. As hemoglobinas de ambas as espécies apresentam efeito Root i.e., suas afinidades pelo oxigênio são tão baixas a valores de pH abaixo 6,5, que eles diminuem sua capacidade de saturação com oxigênio ainda quando equilibradas com ar. Nesta faixa de pH, as hemoglobinas têm propriedades muito similares. Particularmente, nota-se a marcada heterogeneidade que ela exhibe, especialmente na cinética e sua reação com monóxido de carbono.

## MATERIAIS

Espécimes de *Osteoglossum bicirrhosum* foram coletados em novembro e dezembro de 1976, durante a expedição com R/V "Alpha Helix" numa área ao redor de 30 milhas acima da foz do rio Amazonas (rio Solimões) com o

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

(1) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, 69000 Manaus, Amazonas, Brasil.

(2) — Departments of Medicine and Biochemistry, SUNY at Buffalo, Veterans Administration Hospital, Buffalo, New York 14215, Established Investigator of the American Heart Association.

(3) — Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516.

(4) — Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218.

(5) — Department of Zoology, University of Texas, Austin, Texas 78712.

(6) — CNR Centre for Molecular Biology, Institutes of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Rome, Rome, Italy.

(7) — Institute of Zoophysiology University of Oslo, P.O. Box 1051, Blindern, Oslo 3, Norway.

rio Negro. Os animais (peso 147-2500 g) foram procurados por arrastão e malhadeiras na saída do lago de Janauacá, e num ponto isolado que foi localizado 1,5 milhas acima num riacho entre o rio Solimões e o lago de Janauacá e aproximadamente a 500 m ao oeste deste riacho. O período de coleta foi no final do período da seca quando atinge o ponto mais baixo o nível da água nos lagos e rios. Na saída do lago de Janauacá, havia um fluxo lento de águas preta do lago em declive. A temperatura da água era de 28-30°C e o pH varia entre 6,5 e 7,0 (Fisher, 1975). O depósito onde foram aglomerados os peixes era de tamanho aproximado 40 x 60 m com uma profundidade de 20-40 cm. Este foi parcialmente coberto por plantas aquáticas, e o fundo era extremamente brando e lamacento. A água preta estagnada tinha uma temperatura aproximadamente de 30°C e quase anóxica. Os animais foram usualmente mantidos em água corrente só por poucas horas antes de ser sangrados.

Espécimes de *Arapaima gigas* foram obtidos de pescadores locais durante a mesma expedição. Estes animais, com peso que variava de 1,5 a 3,0 kg, foram mantidos em água corrente por tempo variado (de poucas horas a vários dias) antes de sangrados.

#### MÉTODOS

O sangue destes peixes foi obtido por punção cardíaca ou da veia caudal, retirado com seringa de vidro heparinizada (100 µm de heparina sódica 5000U.I./ml) em 1,7% NaCl por 5 ml de sangue). A preparação do hemolisado, a regular eletroforese em gel de disco pH 8,9) e com doedecil sulfato de sódio (SDS) foram levadas conforme o descrito por Fyhn *et al.*, (1978). O hematócrito foi medido com material fresco, misturando o sangue cuidadosamente através de um tubo de micro hematócrito. No gel normal de disco foi calculada a razão entre a distância de migração de um componente de hemoglobina e a distância de migração da albumina de soro de bovino no mesmo gel, usado para comparar a mobilidade dos componentes de hemoglobinas em diferentes corridas de gel. Estas razões são reportadas como uma mobilidade relativa.

A afinidade pelo oxigênio do sangue total foi determinada com um aparelho "Aminco

Hem-O-Scan". O conteúdo de CO<sub>2</sub> em fase gasosa foi diversificada no sentido da variação do pH da amostra. Estas medidas foram tomadas imediatamente após obtida a amostra do sangue a fim de diminuir a alteração metabólica e níveis de fosfato orgânicos nas células. Os pH's das amostras de sangue equilibradas a diferentes pressões de CO<sub>2</sub> foram determinados como foi descrito por Powers *et al.*, (1978).

Antes da hemólise, os eritrócitos foram levados três vezes em dez volumes de solução salina isotônica. Foram lisados por adição de aproximadamente quatro volumes de 1 mM Tris pH 8,0. O processo de lisis foi permitido por 30 minutos e 4°C. O hemolisado foi levado a 0.1 M em NaCl e centrifugado a 28.000 x g por 15mt e 4°C. A hemoglobina foi liberada dos fosfatos orgânicos por passagens prévias através de uma coluna Sephadex G-25 equilibrada com 1 MM Tris pH 8,0 e através de coluna deionizadora tipo "Dintzis" conforme o descrito por Garlick *et al.* (1978).

Em todos os experimentos de soluções de hemoglobina foram usados tampões, bis-tris e tris de força iônica 0,05. O efeito do ATP foi avaliado levando as soluções até um 1 mM neste reagente.

O equilíbrio de oxigênio foi medido pelo método de Allen *et al.* (1950) e Riggs & Wolbach (1956). A desoxigenação foi realizada equilibrando a solução de hemoglobina com argon livre de oxigênio num tonômetro anexado a uma cubeta de caminho óptico de 1 cm. Quando as afinidades são tão baixas, que uma completa oxigenação não poderia ser alcançada com o oxigênio atmosférico, o espectro da hemoglobina completamente oxigenada foi obtida por adição de Tris sólido até que a solução atingisse o pH. Em todos estes experimentos, foi adicionado 1 mM EDTA com a finalidade de controlar a formação de metaemoglobina no curso das medições.

Todas as medições de cinética foram executadas com um aparelho "stopped-flow" do tipo original descrito por Gibson e Milnes (1964). Em todos os casos, a força iônica final das soluções antes da mistura foi 0,05 e, quando foi usado ATP, esta concentração após

mistura foi 1 mM. As constantes cinéticas apresentadas são das reações observadas nos primeiros 65% ajustados aos mínimos quadrados.

Os números de processos cinéticos examinados foram bifásicos. Quando a velocidade das duas fases diferia por um fator de 10 ou mais, os dois processos puderam ser separados graficamente sem dificuldade e as duas constantes calculadas separadamente. Como a magnitude da diferença de velocidade diminui e este procedimento começa a ser mais dificultado e incerto, foi usada a técnica de computação, tornando-se a curva ajustada uma rotina. Além disso, quando os resultados do processo gráfico foram testados pelo computador, curva ajustada, foram encontradas variabilidades insignificantes.

As cinéticas de dissociação de oxigênio foram medidas por um processo de variações de pH descrito por Noble *et al.*, (1970). A hemoglobina oxigenada em Tris 1 mM, pH 8,0 foi misturada com igual volume de solução de ditonito de sódio em tampão de força iônica 0,1, no pH desejado. A concentração final de hemoglobina foi aproximadamente de 30  $\mu$ M em equivalentes a heme e a reação foi seguida a 560 e 540 nm.

A cinética de combinação de monóxido de carbono à hemoglobina desoxigenada foi medida misturando soluções de hemoglobina desoxigenada em tampão de força iônica 0,1 no pH desejado com uma solução contendo uma concentração conhecida, aproximadamente 85  $\mu$ M de CO dissolvido em água. Após a mistura, a concentração de hemoglobina foi aproximadamente 3  $\mu$ M em equivalente heme. A reação foi seguida a 420 e 435 nm.

O "flash photolysis" do derivado de CO destas hemoglobinas foi acompanhado com uma unidade de "flash Ascorlight 444" capaz de dissipar 200 "joules" em aproximadamente 0,5 m seg. A solução de hemoglobina anaeróbica, aproximadamente 20  $\mu$ M equivalentes a heme e contendo uma concentração conhecida de CO, foi colocada num receptáculo cilíndrico de caminho óptico de 1 cm, revestida de uma camada de água a 20°C circulando constantemente. A luz monitorada foi ajustada e

passada através da amostra antes de entrar no monocromador. O tubo do "flash" foi imerso numa solução concentrada de nitrito de sódio, e então a reação registrada a 365 nm, um comprimento de onda, no qual é fortemente absorvido o nitrito. A fotocélula foi efetivamente protegida da potência desenvolvida pelo tubo de "flash"; os 200 "joules" do "flash" foram capazes de alcançar a dissociação completa de CO da amostra de hemoglobina no sistema. A fotólise parcial foi alcançada baixando a energia do "flash" e parcializando a proteção do tubo do "flash" com uma folha de alumínio.

## RESULTADOS

A eletroforese em *gel* de disco normal, mostrou que o hemolisado de *Osteoglossum* contém um componente único de hemoglobina (Fig. 1), não se encontrando diferenças entre os animais de duas localidades. A mobilidade relativa deste componente foi de 0,28 comparada com a albumina de soro bovino. A hemoglobina humana HbA tem uma mobilidade relativa de 0,66. Após 6 semanas de manter-se a 5°C o padrão eletroforético de hemolisado de *Osteoglossum* não se altera. Um componente simples também foi observado por focalização isoelétrica (ver Bunn & Riggs, 1978).

Por eletroforese em SDS o peso molecular das cadeias de hemoglobinas desnaturadas foi notado ser similar ao peso molecular das cadeias de hemoglobina humana desnaturada (14.900 versus 14.600). O hematócrito de *Osteoglossum* foi  $27 \pm 6\%$  [desviação estandar significativa,  $n = 4$ ].

A eletroforese normal em *gel* de disco mostrou que o hemolisado de *Arapaima* contém um componente com uma mobilidade relativa de 0,14 e um menor, mais anódico de mobilidade relativa 0,59, (Fig. 1). O componente maior e menor estão representados por 65% e 35% respectivamente na hemoglobina total. Um dos hemolisados apresentou um só componente maior quando foi testado por *gel* electroforesis imediatamente após a preparação do hemolisado, porém quando testado após 24 horas, estava presente o componente menor que compreende 37% da hemoglobina.

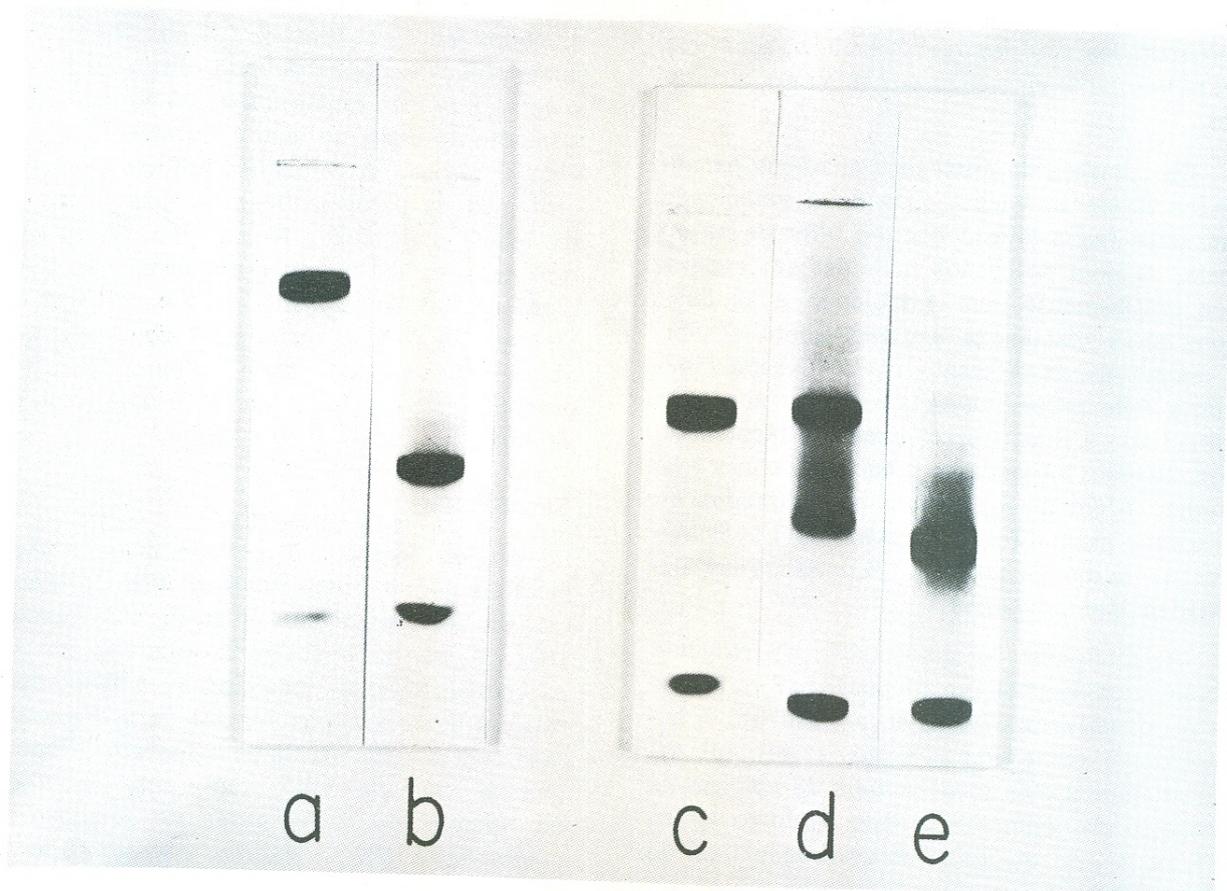


Fig. 1 — Padrões de eletroforese em gel de disco de poliacrilamida para hemoglobina de *Osteoglossum* e *Arapaima*. A banda guia em cada gel é albumina de soro de bovino que é adicionada como um padrão. As amostras separadas nos gels foram as seguintes: (a) hemolisado de glóbulos vermelhos de *Osteoglossum*, (b) hemolisado humano, (c) padrão obtido de um hemolisado de sangue de *Arapaima* que foi imediatamente eletroforesado (ver texto), (d) padrão comum observado no hemolisado de *Arapaima* (e) hemolisado humano.

O componente menor não aumentou mais sua porcentagem quando o hemolisado foi retestado 3 semanas após. Os outros hemolisados foram primeiramente testados cerca de 24 horas após a preparação; e ambos os hemolisados contém o componente menor. O segundo fenótipo foi encontrado num componente individual por Fyhn *et al.* (1978) porém não foi usado no presente estudo.

Por eletroforese em gel SDS, o peso molecular das cadeias de hemoglobina desnaturada de *Arapaima*, foi calculado em 14.500. O valor de hematócrito de 3 espécies de *Arapaima* foram 25%, 34% e 45%.

#### UNIÃO DO OXIGÊNIO NO SANGUE TOTAL

A união do oxigênio no sangue total de *Osteoglossum* e *Arapaima* foi medida a 30°C, como uma função do pH, controlada pela pressão parcial de CO<sub>2</sub> (ver figura 2). Os resultados aparecem na figura 3, onde o log P<sub>50</sub> é registrado em gráfico como uma função do pH. A afinidade para ambos os sangues é fortemente dependentemente do pH:

$\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,6$  entre pH 6,9 e pH 7,8. Medidas sob pH 6,9 para *Osteoglossum* e pH 7,3 para *Arapaima* não são descritas, visto que eles foram diferentes em completar a oxigenação nas altas pressões de oxigênio disponíveis.

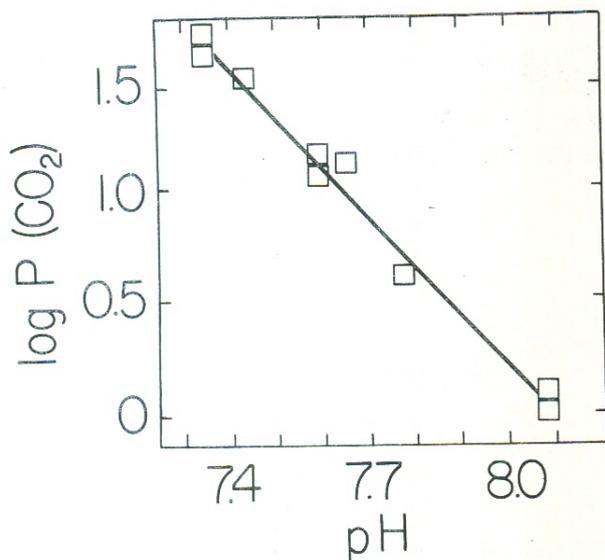


Fig. 2 — Efeito da pressão parcial de  $\text{CO}_2$  no pH do sangue de Arapaima a  $30^\circ\text{C}$ . O logaritmo da pressão de  $\text{CO}_2$  é apresentada em gráfico versus pH.

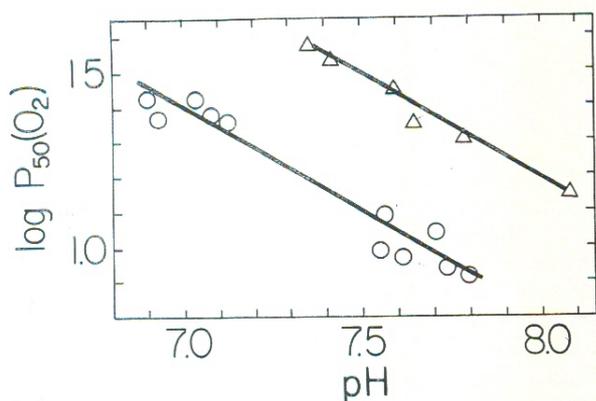


Fig. 3 — Efeito do pH na afinidade de oxigênio no sangue de *Osteoglossum*,  $\circ$ , e *Arapaima*,  $\Delta$ , a  $30^\circ\text{C}$ . O logaritmo da pressão de oxigênio requerida para obter a metade da saturação,  $\log P_{50}(\text{O}_2)$ , é representado no gráfico versus pH. O pH foi controlado pela pressão parcial de  $\text{CO}_2$ .

#### EQUILÍBRIO DAS SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINA NA UNIÃO COM OXIGÊNIO

A afinidade de oxigênio na hemoglobina de *Osteoglossum* foi medida como uma função do pH na presença e ausência de 1 mM de ATP. Os resultados aparecem na Fig. 4. Na abscissa do gráfico, é o pH, na ordenada, parte inferior da figura, é  $\log P_{50}(\text{O}_2)$  enquanto, que a parte superior é o coeficiente de Hill  $n$ . A afinidade é fortemente dependente do pH. Na ausência de ATP o  $\log P_{50}(\text{O}_2)$  varia desde um

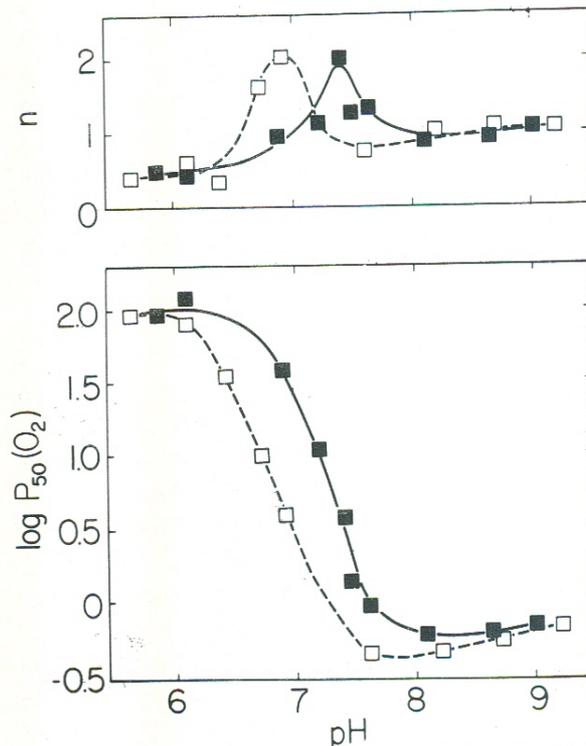


Fig. 4 — Efeito de pH na afinidade da hemoglobina de *Osteoglossum* na presença,  $\blacksquare$ , e ausência,  $\square$ , de ATP a  $20^\circ\text{C}$ . Na parte inferior da figura, o logaritmo da pressão de oxigênio requerida para a saturação média é registrada em gráfico como função de Hill é registrada em gráfico como uma função do pH.

valor abaixo de 0,5 mm e pH 7,6 a um valor alto de cerca de 90 mm a pH baixo 6,0. Na primeira avaliação da adição de 1 mM ATP, há uma mudança desta curva à direita aumentando o pH, da afinidade meia na transição de 6,8 a 7,3. Esta mudança para a direita de 0,5 unidades de pH produzido por 1 mM ATP é exatamente o mesmo que o encontrado por Gillen & Riggs (1977) em seu estudo de 5 outros teleosteos de respiração branquial, e menores que a mudança similar observada anteriormente por Gillen e Riggs (1972) e Tan *et al.* (1973) para hemoglobina da carpa. O ATP tem um pequeno ou não efeito a pH baixo de 6,0 ou acima de pH 8,0. Na faixa média de pH, este efeito diminui com um aumento do pH, resultando um aumento na transição de pH. Acima de pH 7,6, a hemoglobina fracionada de *Osteoglossum* apresenta um pequeno mas claro e definido efeito Bohr reverso. Em muitas hemoglobinas, tem-se observado agora que tem um

**efeito Bohr reverso, similar a pH alcalino, e** provocando indagações se isto poderia envolver o mesmo mecanismo de efeito Bohr reverso, mostrado por hemoglobina de anguila ou girino (Gillen & Riggs, 1973; Watt & Riggs, 1975). Ela é naturalmente mais evidente, nestas últimas hemoglobinas pela falta de efeito Bohr normal.

A cooperatividade aparente na reação de união, como indica o coeficiente de Hill  $n$ , é também dependente do pH. A pH baixo, em que a afinidade é mínima, o valor  $n$  é aproximadamente 0,5 indicando uma acentuada heterogeneidade do sítio de união do grupo. Com um aumento de pH, este coeficiente aumenta e alcança um valor máximo de 2 quando o  $\log P_{50} (O_2)$  tem diminuído a 0,6. O coeficiente então diminui assim como é promovido um aumento de pH e nivela-se freqüentemente a um valor 1,0 e é mais ou menos independente do pH acima de pH 8,0. A adição de 1 mM ATP mais uma vez muda a curva para a direita, aumentando o pH, no qual  $n$  é máximo desde 6,9 até 7,4.

Mediações similares foram efetuadas na hemoglobina não fracionada de *Arapaima* e seus resultados são apresentados na Figura 5. Aqui, mais uma vez, concluímos que o coeficiente de Hill,  $n$ , e  $P_{50}$  são dependentes do pH. A pH baixo, esta hemoglobina comporta-se praticamente à semelhança do *Osteoglossum*. O valor de  $\log P_{50}$ , é aproximadamente de 2 e o coeficiente de Hill é menor que a unidade, indicando novamente a heterogeneidade do sítio de união do oxigênio. Conforme o pH é elevado, há um rápido aumento na afinidade pelo oxigênio e o coeficiente de Hill, até que o  $\log P_{50}$  alcança um mínimo de 0,75 e o  $n$  seja aproximadamente igual a 2. A reação é relativamente insensível ao pH entre pH 7,2 e 8,8. Em faixas de pH altos, as propriedades de hemoglobina de *Arapaima* são ligeiramente diferentes da de *Osteoglossum*. A afinidade de oxigênio difere por aproximadamente 10 vezes e a diminuição da afinidade de hemoglobina de *Arapaima* tem um aumento adicional na cooperatividade da reação de união do oxigênio. A adição de 1 mM de ATP não tem efeito significativo na afinidade de oxigênio de hemoglobina de *Arapaima* sob as condições destes

experimentos. Como podemos ver, ele atinge as reações cinéticas e é provável que a insensibilidade do equilíbrio resulte deste agente alostérico e está relacionada à presença de 1 mM EDTA no tampão. (ver métodos).

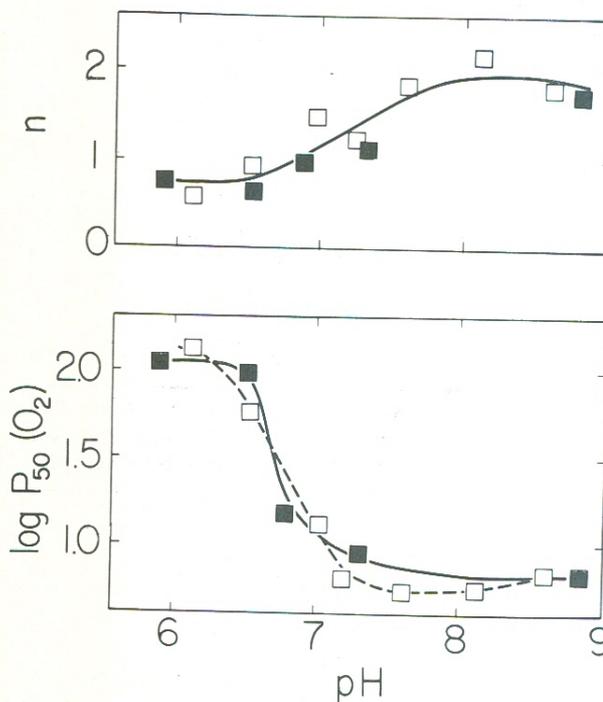


Fig. 5 — Efeito do pH na afinidade pelo oxigênio de hemoglobina de *Arapaima* na presença, ■, e ausência, □, de ATP a 20°C. Na parte inferior da figura, o logaritmo da pressão de oxigênio requerido para a saturação média, está no gráfico como uma função do pH.

#### CINÉTICA DE DISSOCIAÇÃO DE OXIGÊNIO

A velocidade de dissociação de hemoglobina de *Osteoglossum* foi medida como uma função do pH e o resultado apresenta-se na Fig. 6. Esta constante de velocidade aumenta aproximadamente 10 vezes à medida que o pH diminui de 8,0 a quase 6,0. A constante de velocidade é independente do pH abaixo de pH 6,0 e tem um valor de 130  $\text{seg}^{-1}$ .

A adição de 1 mM ATP não tem efeito na velocidade na região do "plateau", embora esta região se proiongue por aumento da velocidade a pH 6,1. O mesmo efeito é visto a pH 7,1 mas o ATP, mais uma vez, está sem efeito aparente acima de pH 8,0.

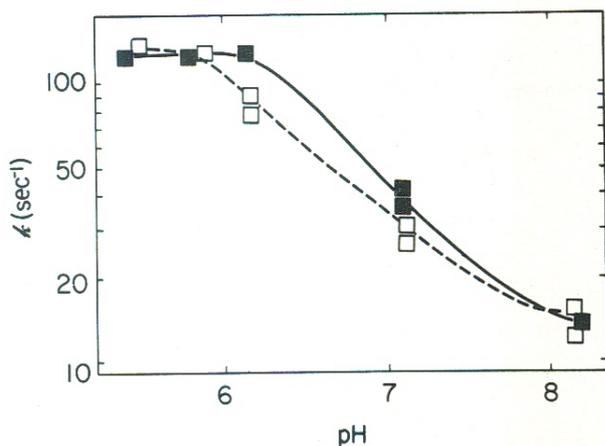


Fig. 6 — Efeito do pH na velocidade de dissociação de oxigênio,  $k$ , de hemoglobina de *Osteoglossum* a 20°C na presença, ■, e ausência, □, de ATP. A constante de velocidade de primeira ordem para esta reação é registrada em gráfico em escala logarítmica como uma função do pH.

A dependência do pH, na velocidade de dissociação do oxigênio de hemoglobina de *Arapaima*, foi medida a ambas as temperaturas de 20°C e 30°C como se apresenta na figura 7. A 20°C, a velocidade aumenta aproximadamente 20 vezes de pH 8,0 a pH 5,5. Dois pontos de informação sugerem um efeito real na adição de 1 mM ATP e isto é confirmado pelos dados a 30°C. Quando comparamos estas propriedades com as de hemoglobina de *Osteoglossum*, encontramos aproximada similar dependência do pH, embora o efeito total seja ligeiramente menor para hemoglobina de *Arapaima*. No entanto, a constante de velocidade absoluta para as duas hemoglobinas diferem substancialmente: A constante de velocidade mínima é de 14  $\text{seg}^{-1}$  para *Osteoglossum* e cerca de 25  $\text{seg}^{-1}$  para *Arapaima*, enquanto os tempos máximos de velocidade são 130  $\text{seg}^{-1}$  e 500  $\text{seg}^{-1}$  respectivamente. Aumentando-se a temperatura de 20°C, incrementa-se a velocidade de esta reação, mas tem um pequeno o não efeito na dependência do pH desta constante de velocidade para hemoglobina de *Arapaima*. A magnitude da porcentagem do aumento na velocidade, parece ser um tanto maior a pH alto que a pH baixo. No entanto, devemos ver a constante de velocidade maior que 500  $\text{seg}^{-1}$  com alguma prudência desde que 1 e 1,5 m sec é o tempo total que o aparelho de "stopped

flow" permite-nos só uma fração do processo cinético com uma constante de velocidade alta.

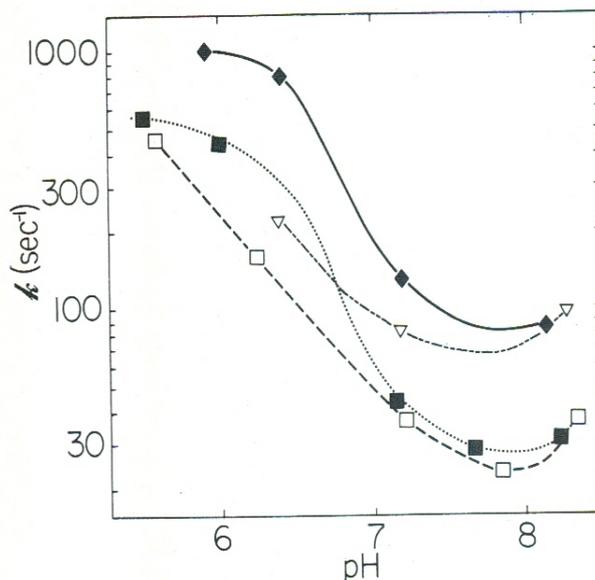


Fig. 7 — Efeito do pH na velocidade de dissociação de oxigênio,  $k$ , de hemoglobina de *Arapaima*. Os dados apresentados foram obtidos a 20°C na presença, ■, e ausência, □, de ATP 1 mM, e a 30°C na presença ▲ e ausência △ de ATP 1 mM. A constante de velocidade de primeira ordem para a reação está no gráfico em escala logarítmica como uma função do pH.

#### CINÉTICA DE COMBINAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO

A cinética de suas reações com CO são provavelmente as de maior interesse e informativas das propriedades destas hemoglobinas. As reações são heterogêneas acima da faixa de pH examinado e é composto de duas fases diferentes, cada qual contribui com 50% da mudança total de absorvância associada com a reação.

A dependência de pH destas constantes de velocidade de reação para a hemoglobina de *Osteoglossum* é apresentada na Fig. 8. Baixo de pH 6,3, na ausência de ATP, as velocidades das duas fases diferem aproximadamente em 30 vezes e mostra uma dependência relativamente pequena do pH. Conforme o pH aumenta, a velocidade da fase lenta aumenta abruptamente até o pH 7,2; a reação parece ser homogênea e pode ser descrita por uma

constante simples de velocidade. A velocidade da fase rápida varia muito pouco com o pH, tornando-se constante quando a velocidade de reação seja  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  e pH 5,4, diminuindo a  $1,2 \times 10^5$  e pH 7,2. A adição de 1 mM ATP aumenta o valor de  $p_k$  da transição da cinética bifásica à monofásica, mas não tem efeito significativo nos extremos das duas constantes de velocidade.

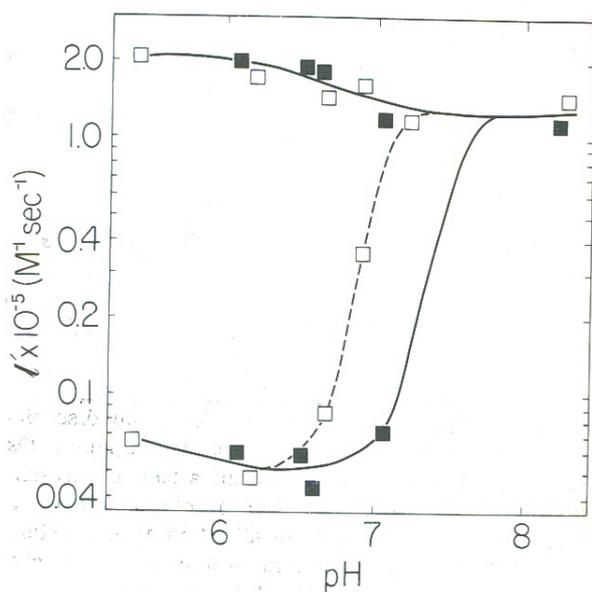


Fig. 8 — Efeito do pH na velocidade de combinação de monóxido de carbono, é, a 20°C de hemoglobina de *Osteoglossum* na presença, ■, e ausência, □, de ATP 1 mM. A constante de velocidade de segunda ordem da reação está no gráfico numa escala logarítmica como uma função do pH. Onde os dois valores são dados numa unidade de pH, este representa as constantes associadas com as fases isoladas de uma reação bifásica.

As dependências de pH da velocidade de reação de monóxido de carbono com hemoglobina de *Arapaima* são apresentadas na Figura 9. O padrão é notavelmente similar ao encontrado na hemoglobina de *Osteoglossum*. Sob pH 6,5, na ausência de ATP, a reação é formada por duas fases cujas constantes de velocidade diferem, em 10 vezes, enquanto que acima de pH 7,0, há uma fase simples, com uma velocidade de que parece ser uma extrapolação da dependência da velocidade da fase rápida que ocorre a pH baixo de 6,5. Mais uma vez, a adição de 1mM aumenta o  $p_k$  de transi-

ção da cinética bifásica à monofásica, mas tem efeito pequeno ou ausente nos valores de velocidades máximas e mínima.

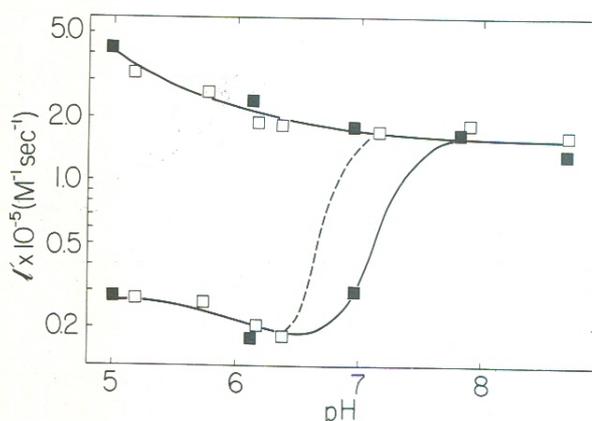


Fig. 9 — Efeito do pH na velocidade de combinação de monóxido de carbono, e a 20°C, da hemoglobina de *Arapaima* na presença, ■, e ausência, □, de ATP 1 mM. A constante de velocidade de segunda ordem para a reação é registrada em gráfico numa escala logarítmica em função do pH. Onde os valores são dados numa unidade de pH, isto representa as constantes associadas das fases isoladas de uma reação bifásica.

#### ESTUDOS DE "FLASH PHOTOLYSIS" NA REAÇÃO DE COMBINAÇÃO DE CO

Tem sido demonstrado através de numerosas hemoglobinas de peixes que a pH baixo, onde a afinidade pelo oxigênio é mínima, a união do ligante não é altamente cooperativa (Tan *et al.*, 1973; Lau *et al.*, 1975). Isto tem sido interpretado como um resultado de uma mudança conformacional no equilíbrio de tal forma que a molécula permanece predominantemente numa afinidade baixa, com formação T, ainda quando está saturada com o ligante. Os dados de equilíbrio não podem estabelecer a ausência de cooperatividade na união do ligante, desde que a redução no coeficiente de Hill pode resultar igualmente de uma heterogeneidade nas propriedades do sítio de união ou redução na cooperatividade. Isto é particularmente evidente no caso da hemoglobina de *Osteoglossum* e *Arapaima*, para o qual o valor de  $n$  é bem mais baixo do que a unidade a pH baixo, e há evidência de uma heterogeneidade nas subunidades, na cinética de combinação com CO.

A cinética de combinação com monóxido de carbono oferece um excelente ensaio de cooperatividade na união de ligante da hemoglobina.

O estado de alta e baixa afinidade de uma hemoglobina reage com CO a diferentes velocidades, a estrutura de alta afinidade reage mais rápido que a baixa. Se a união dos ligantes induz uma alteração significativa no equilíbrio conformacional, então uma molécula parcialmente ligada poderia combinar-se mais rapidamente com o ligante que uma unidade totalmente desoxigenada. Isto pode ser testado com a técnica de "flash photolysis", aproveitando-se a foto-sensibilidade do derivado carboxi-hemoglobina. Por variação da intensidade de "flash" diversos graus de fotólise podem ser produzidos permitindo qualquer medida de 0% a 100% de hemoglobina desoxigenada. Em nossos experimentos, as velocidades de recombinação de CO posterior a saturação

e aproximadamente 20% fotólise foram comparadas a vários valores de pH.

Os resultados obtidos para hemoglobina de *Osteoglossum* são apresentados na Fig. 10. A pH 6,65 na presença de 1 mM ATP, as cinéticas de recombinação após a saturação e após a "flash photolysis" parcial são idênticas. Os dados são encontrados em grupos em duas escalas de tempo na ordenada para demonstrar que isto é verdadeiro para ambas as fases de reação. A pH 7,06 na ausência de ATP, a situação é altamente diferente. Seguindo uma "photolysis" completa de recombinação de CO não numa reação bifásica mas autocataliticamente. Isto exclusivamente é uma cinética que indica a cooperatividade de CO após a "photolysis" parcial é mais rápida. Como o pH é aumentado de 8,2 a 9,2, a magnitude da diferença de velocidade diminui, mas a recombinação após a fotólise parcial é sempre o processo mais rápido.

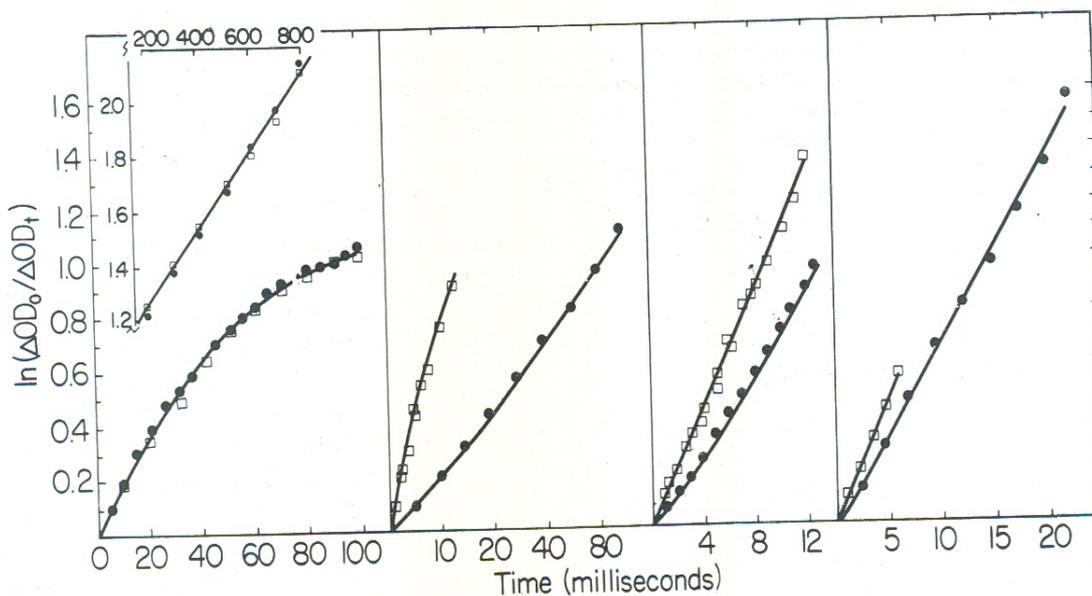


Fig. 10 — A cinética de pseudo primeira ordem registrada em gráfico para a reação de hemoglobina de *Osteoglossum* ( $5 \mu\text{M}$  em heme) saturada totalmente com  $85 \mu\text{M}$  CO, ■, e parcialmente, □, na "flash photolysis" a  $20^\circ\text{C}$ . Resultados obtidos sob quatro diferentes condições experimentais são apresentados. Da esquerda para a direita (a) pH 6,25 na presença de ATP 1 mM, (b) pH 7,06, (c) pH 8,2, (d) pH 9,2, as três últimas na ausência de ATP. Pela natureza bifásica da reação de combinação de CO a pH baixo, os resultados no primeiro quadro são apresentados em duas escalas que diferem num factor 10. A curva inferior é a fase rápida da reação e a escala de tempo é a ordenada inferior. A curva superior é a fase lenta. A escala de tempo é dada na ordenada superior enquanto a abscissa tem sido deslocada em baixo por 0,4 unidade como se apresenta.

Resultados similares foram obtidos para a hemoglobina de *Arapaima*. Os dados obtidos a pH 6,6 na presença de 1 mM ATP e a pH 8,9 foram representados na Fig. 11. No último pH, a cooperatividade é pronunciada como indica a diferença da velocidade, mas a pH 6,6 na presença de ATP está ausente.

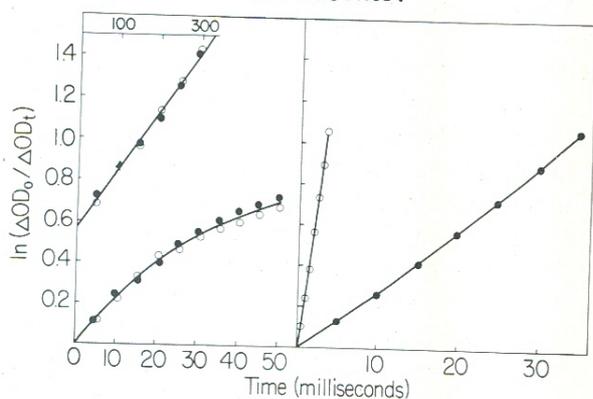


Fig. 11 — Cinética de pseudo primeira ordem registrada em gráfico para a reação de hemoglobina de *Arapaima* (5  $\mu$ M em heme) saturada completamente com 170  $\mu$ M CO, ●, e parcialmente, ○, na "flash photolysis" a 20°C. Resultados apresentados no quadro esquerdo foram obtidos a pH 6,6 na presença e ATP 1 mM. Os da direita foram obtidos a pH 8,9 sem ATP. Pela natureza bifásica da reação de combinação de CO a pH baixo, os resultados do quadro à esquerda são apresentados em duas escalas de tempo. A escala de tempo para a curva inferior é dada na ordenada inferior enquanto que para a curva superior aparece na ordenada superior.

#### FRACCIONAMENTO DOS DOIS COMPONENTES DA HEMOGLOBINA DE ARAPAIMA

Os dois componentes da hemoglobina de *Arapaima* foram isolados por focalização isoeletrica usando-se essencialmente o mesmo procedimento descrito por Weber *et al.*, (1976) para a separação de hemoglobinas de *Amia calva*. Uma coluna preparativa de focalização isoeletrica LKB de 110 ml foi usada a 4°C com uma mistura de "Anpholine", a qual produz um gradiente de pH entre pH 5,0 e 8,0. Após a eluição dos componentes da coluna, foram dialisados contra 1 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,0.

A fim de estabelecer se existe ou não a heterogeneidade cinética na reação de hemoglobina de *Arapaima* com o monóxido de car-

bono a pH baixo originado, certamente em parte, uma diferença funcional dada entre estes dois componentes, a cinética de combinação de CO dos componentes purificados seguindo na mistura rápida no aparelho de "Stopped-flow" foi examinada a pH 6,4. Cinética bifásica exactamente idêntica foi observada, a qual foi também a mesma encontrada para hemoglobina não fracionada.

#### EFEITOS NA CINÉTICA DE COMBINAÇÃO DE CO DE HEMOGLOBINA DE ARAPAIMA COM SUBEMERIDATO

A cooperatividade na união do ligante da hemoglobina resulta de uma transição na estrutura quaternária da molécula unida ao ligante. Uniões cruzadas da molécula com um reativo bifuncional supostamente pode perturbar tal transição conformacional e estas alteram as propriedades funcionais da molécula. Além disso, desde que a reatividade dos vários grupos na molécula de hemoglobina, tanto como as distâncias entre os grupos varie com os estados conformacionais, a natureza e por conseguinte os efeitos da reação com tais reativos podem ser diferentes quando reagem com a hemoglobina oxigenada e desoxigenada sob condições onde a união do ligante é cooperativa.

A fim de investigar isto, a hemoglobina de *Arapaima* reagiu com dimetil suberimidato. Na reação com o derivado oxigenado, 1 ml de hemoglobina deionizada de *Arapaima* (60 mg) foi adicionada a 3 ml de 0,125 M de trietanolamina-HCl, pH 8,1 e 40 mg de dimetil suberimidato (Pierce Chemical CO.); uma vez adicionado, permite-se prosseguir a reação a 0°C por 3 1/2 horas. O dimetil suberimidato que não reage foi suprimido pela adição de 0,5 ml de  $\text{HH}_4\text{CL}$  2 M. A mistura de reação foi dialisada contra 0,5 mM Tris pH 8,5. A reação do dimetil suberimidato com hemoglobina desoxigenada foi alcançada com um procedimento idêntico exceto que a solução de hemoglobina, trietanolamina foi desoxigenada, pelo burbulhamento com argon e adicionando-se uma pequena quantidade de ditionito, antes da adição de dimetil suberimidato e outra vez imediatamente seguida a reação.

A cinética de reação do monóxido de carbono com os dois modificadores químicos na

preparação de hemoglobina como também a hemoglobina não modificada foi examinada a pH 7,8 e pH 5,6 — 5,8. Os ploteados da cinética de pseudo primeira ordem aparecem na Fig. 12. As modificações químicas não produzem um grande efeito na cinética de combinação de CO a pH 7,8. O material modificado no estado oxigenado reage levemente mais rápido que o material não modificado enquanto o material modificado como um derivado deoxigenado reage heterogeneamente. A pH 5,8, os efeitos destas modificações são ligeiramente mais pronunciados. A hemoglobina não modificada reage igualmente nas duas fases cinéticas. O material modificado como derivado oxigenado também reage nas duas fases cinéticas aproximadamente igual mas as constantes de velocidade de reação, particularmente da fase lenta são mais rápidas que para as hemoglobinas não modificadas. A fase lenta da reação da hemoglobina modificada, como derivado desoxigenado, não representa 50%, mas só uns 30% da reação total. Como um resultado global, a reação com o ligante é muito mais rápida e a dependência do pH na reação do CO, com estes derivados aparecendo significativamente reduzidos.

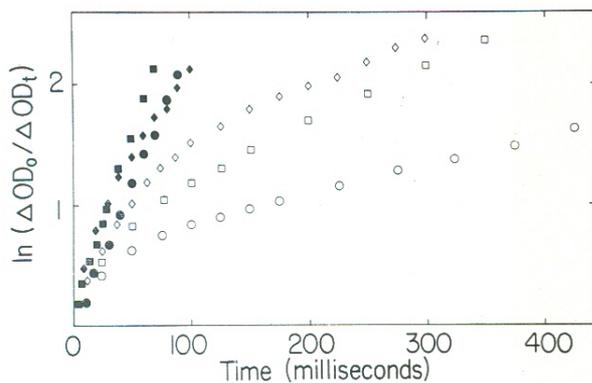


Fig. 12 — A cinética de pseudo primeira ordem registrada em gráfico para a reação a pH 5,6-5,8 símbolos vazios e a pH 7,8, símbolos cheios de monóxido de carbono, 215  $\mu$ M, com hemoglobina não modificada de Arapaima, O, e, ●, e hemoglobina de Arapaima modificada com suberimidato na forma oxigenada □ e ■, e na forma desoxigenada, ◇ e ◆.

As diferenças das propriedades funcionais dos dois modificadores químicos formados da hemoglobina de *Arapaima* sustentam a hipótese que a pH 8,1 os derivados oxigenados e desoxigenados destas hemoglobinas não são conformacionalmente equivalentes. As diferenças funcionais podem resultar das diferenças da natureza das modificações químicas ou provenientes do alcance da modificação. Os grupos exatamente modificados e a natureza das uniões cruzadas produzidas são desconhecidas. É curioso que a reação da hemoglobina desoxigenada com o reagente de união cruzada, material cujas propriedades são de menor preferência na estrutura deóxi ou de baixa afinidade nesta hemoglobina. Isto sugere mais propriamente que uma união cruzada está estabilizando a estrutura de baixa afinidade desta proteína. Este procedimento altera os grupos necessários para esta estabilidade, alcançando-se um equilíbrio conformacional para um estado de alta afinidade ou estados.

#### DISCUSSÃO

As hemoglobinas de *Osteoglossum* e *Arapaima* exibem efeitos Root e podem ter propriedades funcionais em comum com outros efeitos Root de hemoglobinas. Os estados de mínima afinidade pelo oxigênio em baixo pH, são associadas com a perda da cooperatividade com o ligante realmente como tem sido relatado em numerosas outras hemoglobinas (Tan *et al.*, 1973; Lau *et al.*, 1975; Noble *et al.*, 1975). Isto não pode ser deduzido das medidas do equilíbrio pela heterogeneidade intrínseca do ponto de união do ligante destas hemoglobinas. No entanto, os estudos de "flash photolysis" demonstraram ser totalmente convincente. Esta baixa afinidade pelo oxigênio destas hemoglobinas é alcançada pela eliminação da cooperatividade na união do ligante, presumivelmente como um resultado da eliminação da alteração da união do ligante na estrutura quaternária normalmente associada com a cooperatividade na união do ligante à hemoglobina. As propriedades destas moléculas a pH baixo podem portanto ser tomadas sendo as de sua baixa afinidade, estado conformacional T.

As propriedades do estado de baixa afinidade destas hemoglobinas são muito similares. Suas afinidades pelo oxigênio são aproximadamente iguais,  $\log P_{50} = 2$  e a curva de união são heterogêneas com um coeficiente de Hill aproximadamente de 0,5 para a hemoglobina de *Osteoglossum* e 0,6-0,7 para hemoglobina de *Arapaima*. Esta heterogeneidade no ponto de união é claramente vista na cinética de combinação de monóxido de carbono desta duas hemoglobinas. As heterogeneidades cinéticas são maiores para hemoglobina de *Osteoglossum* que para a do *Arapaima* e é compatível com o baixo coeficiente de Hill para a reação de oxigênio com o anterior. Esta heterogeneidade é quase com certeza o resultado de uma função inequivalente das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  no estado T destas hemoglobinas. Tal heterogeneidade das subunidades também tem sido encontrada por Pennelly *et al.*, 1977 no estado T da hemoglobina do peixe, *Myripristis berndi*. A constante de velocidade absoluta para as reações de hemoglobina de *Arapaima* com os ligantes são constantemente mais altas que para a hemoglobina de *Osteoglossum*. Esta hemoglobina de *Arapaima* no estado T dissocia 4 vezes mais rápido que a hemoglobina de *Osteoglossum*. Igualmente, a velocidade de combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina de *Arapaima* é quase 4 vezes mais rápida na fase lenta e 50% mais rápida na fase rápida que com a hemoglobina de *Osteoglossum*.

Aumentando-se o pH, desestabiliza-se o estado T de ambas as moléculas, aumentando a afinidade do ligante e restabelecendo a cooperatividade na união do ligante. Este reaparecimento de cooperatividade na união do ligante está associada com a conversão da cinética de combinação de modo similar à da fase rápida observada a pH baixo. Isto supõe que quando a união do ligante é cooperativa, a reação com monóxido de carbono, inicialmente reage rapidamente com a subunidade no estado T. No entanto, continuando esta reação, a hemoglobina é convertida à conformação R, na qual previamente as subunidades reagem lentamente e podem agora combinar-se rapidamente com monóxido de carbono. O resultado é uma reação aparentemente monofásica, na qual a velocidade é limi-

tada pela combinação do CO aos sítios reativos no estado T. Desta maneira, uma seqüência de reação tem sido postulada por Pennelly *et al.*, 1977 para interpretar as propriedades similares de hemoglobinas de *Myripristis b.* Para hemoglobina de *Arapaima*, a velocidade máxima de afinidade pelo oxigênio, que é alcançada a pH alto de  $\log P_{50}$  cerca de 0,8. Nesta faixa de pH, em que o efeito Bohr é zero e os fosfatos orgânicos não têm efeito, a união do oxigênio é cooperativa com um coeficiente de Hill próximo a 2.

A hemoglobina de *Osteoglossum* comporta-se totalmente diferente. Com um incremento de pH é aumentada a afinidade pelo oxigênio e a cooperatividade, mas com um aumento de afinidade pelo oxigênio, o valor máximo de cooperatividade diminui, uma vez mais evidenciado por um coeficiente de Hill da unidade, e as velocidades de recombinação do monóxido de carbono após a "flash photolysis" completa e parcial, embora não iguais, são muito similares às obtidas sob condições nas quais a cooperatividade é máxima. Exatamente o mesmo comportamento tem sido reportado para hemoglobina de carpa, e tem sido atribuído a uma quase completa estabilização do estado R, estado de alta afinidade da molécula de hemoglobina ainda quando desoxigenada (Ten *et al.*, 1973; Penneley *et al.*, 1975). Esta estabilização não é completa desde que alguma cooperatividade permaneça. Se admitir-se uma explicação para estes resultados, então a conclusão que se tira é que a maior diferença entre estas duas hemoglobinas é o equilíbrio que existe entre seus estados conformacionais na ausência de qualquer interação com prótons Bohr ou fosfatos orgânicos. Isto poderia explicar não só as diferenças na cooperatividade mas também as diferenças na afinidade de oxigênio observada a pH alto.

Não há evidência para sugerir que a heterogeneidade observada no estado T destas moléculas também ocorre em seu estado R. O dado relevante é raro, mas a recombinação do monóxido de carbono após a "flash photolysis" parcial a pH alto poderia refletir o comportamento destes estados estruturais. A reação não é bifásica para cada uma destas hemoglobinas.

O efeito do ATP nas propriedades destas hemoglobinas é compatível com a união preferencial a seu estado T. Isaacks *et al.*, (1977) tem recentemente reportado que o maior fosfato orgânico encontrado em eritrócito de *Arapaima* é o inositol pentafosfato mais que o ATP. Lamentavelmente esta informação não estava ao nosso alcance quando nosso experimento se realizou. No entanto esperamos que os efeitos destes dois fosfatos orgânicos possam ser qualitativamente os mesmos, embora difiram em magnitude.

Esta comparação das hemoglobinas de *Arapaima* e *Osteoglossum* foi empreendido em parte para conhecer que adaptação molecular nestas hemoglobinas poderia ser associada com a respiração aérea versus respiração branquial. A diferença funcional mas significativa que tem sido encontrada nestas hemoglobinas é sua máxima afinidade pelo oxigênio. Para hemoglobina de *Osteoglossum* esta é consideravelmente maior que para hemoglobina de *Arapaima*. Esta pode bem ser origem da grande afinidade pelo oxigênio do sangue de *Osteoglossum* quando se compara com sangue de *Arapaima* entre pH 7,5 e 7,8. No entanto, diferença nos fosfatos orgânicos e níveis de fosfatos podem também contribuir para isto. Há uma pequena dúvida de se *in vivo* a afinidade pelo oxigênio do sangue de *Arapaima* é mais baixa que a do *Osteoglossum*. Não somente isto é verdade num valor pH particular, mas também o pH do sangue de *Arapaima* possa certamente ser mais baixo do que o de *Osteoglossum* em virtude da alta tensão de CO<sub>2</sub> originada. Este resultado de uma menor eficiência de intercâmbio de CO<sub>2</sub> no pseudo-pulmão de *Arapaima* do que o que acontece com as brânquias. Poder-se-ia supor que *Osteoglossum* requer o sangue com uma mais alta afinidade com oxigênio que o do *Arapaima* desde que este é a miúdo forçado a obter oxigênio de águas hipóxicas. No entanto, isto poderia presumir uma importante informação do comportamento fisiológico que é absolutamente inacessível. A boca do *Osteoglossum* está satisfatoriamente adaptada a deslizar-se na superfície da água e aparentemente retira a poucos milímetros da superfície na boca e passa às brânquias. Deste modo, embora a tensão de oxigênio da água que passa através das

brânquias seja desconhecida, esta é provável e significativamente mais alta do que os valores de tensão de oxigênio encontrados nos intercâmbios de bases na bexiga natatória modificada equivalente ao pulmão em *Arapaima* é desconhecido. Contudo, a adaptação neste órgão é imprevisível quando se compara com a bexiga natatória de *Osteoglossum*, claramente não é um rival para o pulmão de mamífero. Além do mais, os valores de tensão de oxigênio no pseudo-pulmão de *Arapaima* e a frequência da troca da fase gasosa é desconhecida. Sem conhecer a tensão arterial de oxigênio relativa neste dois peixes sob variadas condições ambientais, uma especulação acerca da significância das diferenças da afinidade pelo oxigênio do sangue parece prematura. Além disso, a afinidade pelo oxigênio do sangue de *Arapaima* parece exageradamente baixa. Se a tensão de CO<sub>2</sub> no sangue do animal é moderadamente alta, então parece-nos muito desigual que a saturação de O<sub>2</sub> da hemoglobina possa ser alcançada no intercâmbio através dos pulmões. O animal poderia então ser forçado a operar bem baixo na curva de saturação deste sangue, mas com propósito incerto. Portanto, embora as diferenças funcionais entre as hemoglobinas destas duas espécies possam ser descritas e parcialmente explicadas a nível molecular, a fisiologia apropriada para estas diferenças funcionais deve aguardar estudos adicionais.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por a verba PCM-06451 da "National Science Foundation" para estudos a bordo do R/V "Alpha Helix". Agradecemos aos brasileiros por sua cooperação que tornou possível que o "Alpha Helix" entrasse no Amazonas. Desejamos agradecer ao Capitão Clarke e tripulação sua cooperação. Uma verba adicional foi proporcionada o "Norwegian Research Council for Science and the Humanities" (H.J. and U.E.H.F.), NSF verba DEB-76-19877 (D.A.P.), NIH verba HL-15460 (a J. Bonaventura, ajuda de M. F.), verba NSF PCM-76-06719 (A. R.), verba NIH BM-21314 (A. R.) e da "University of Texas

Research Institute" (A. R.) e de "National Geographic Society (D.A.P.) M. Farmer reconhecidamente agradece a "Duke University Research Award, n.º 303-3765.

#### SUMMARY

The effects of pH and organic phosphate on the equilibrium and kinetic properties of the binding of ligands to the hemoglobins of two related Amazonian fish, *Osteoglossum bicirrhosum*, an obligate water breather, and *Arapaima gigas*, an obligate air breather, have been studied. The hemoglobins of both fish exhibit a Root effect, and the minimum oxygen affinity is associated with the complete loss of cooperative ligand binding. In this low affinity, T state, there is great subunit heterogeneity in both hemoglobins as evidenced by Hill coefficients well below unity and biphasic carbon monoxide combination kinetics. The greatest difference in the properties of the hemoglobins of these two fish is found at high pH (above pH 8) where both hemoglobins exhibit their highest ligand affinities. Here the hemoglobins differ both in the affinity and cooperativity with which they bind ligands, *Arapaima* hemoglobin having the lowest affinity but the highest cooperativity.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, D.W.; GUTHE, K.F. & WYMAN, JR., J.  
1950 — Further studies on the oxygen equilibrium of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 187:393-410.
- BUNN, H.F. & RIGGS, A.F.  
1978 — A medida do efeito Bohr em hemoglobinas de peixe por focalização elétrica em gel. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- FYHN, U.E.H.; FYHN, H.J.; DAVIS, B.J.; POWERS, D.A.; FINK, W.L. & GARLICK, R.L.  
1978 — Heterogeneidade de hemoglobina nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- GARLICK, R.L.; DAVIS, 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 caecílios vivíparos *Typhlonectes compressicauda*. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- GIBSON, Q.H. & MILNES, L.  
1964 — Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem. J.*, 91: 161-171.
- GILLEN, R.G. & RIGGS, A.  
1972 — Structure and function of the hemoglobins of the Carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 247:6039-6046.
- 1973 — Structure and function of the isolated hemoglobins of the American Eel, *Anguilla rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 248: 1961-1969.
- 1977 — The Enhancement of the Alkaline Bohr effect of some fish hemoglobins with Adenosine Triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183:678-685.
- ISAACKS, R.E.; KIM, H.D.; BARTLETT, G.R. & HARKNESS, D.R.  
1977 — Inositol pentaphosphate in Erythrocytes of a freshwater fish, Pirarucu (*Arapaima gigas*) *Life Sciences*, 20:987-990.
- LAU, H.K.F.; WALLACH, D.E. & NOBLE, R.W.  
1975 — Ligand binding properties of hemoglobin 3 of the Trout, *Salmo gairdneri*: The Occurrence of an Acid Bohr effect in the absence of Heme-Heme interaction. *J. Biol. Chem.*, 250:1400-1404.
- NOBLE, R.W.; PARKHURST, L.J. & GIBSON, Q.H.  
1970 — The effect of pH on the Reaction of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 245:6628-6633.
- NOBLE, R.W.; PENNELLY, R.R. & RIGGS, A.  
1975 — Studies of the functional properties of the hemoglobin from the Benthic fish, *Antimora rostrata*. *Comp. Biochem Physiol.*, 52B:75-81.
- PENNELLY, R.R.; RIGGS, A. & NOBLE, R.W.  
The kinetics and equilibria of squirrel fish hemoglobin; A root effect hemoglobin complicated by Large subunit heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta* (In press.)
- PENNELLY, R.R.; TAN-WILSON, A.L. & NOBLE, R.W.  
1975 — Structural states and transitions of carp hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 250: 7239-7244.
- RIGGS, A.; & WOLBACH, R.A.  
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39:585-605.
- TAN, A.L.; NOBLE, R.W. & GIBSON, Q.H.  
1973 — Conditions restricting allosteric transitions in carp hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 248:2880-2888.
- WATT, K.W.K. & RIGGS, A.  
1975 — Hemoglobins of the tadpole of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*: Structure function of isolated components. *J. Biol. Chem.*, 250:5934-5944.
- WEBER, R.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C.  
1976 — The hemoglobin system of the Primitive fish. *Amia calva*: Isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. *Biochim. Biophys. Acta*, 434:18-31.