

Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acaribodó (*)

M. Brunori (1); J. Bonaventura (2); A. Focesi Jr. (3); M. I. Galdames-Portus (4); M. T. Wilson (5)

Resumo

Os quatro componentes de hemoglobina principais do hemolisado de *Pterygoplichthys pardalis* foram isolados e caracterizados. As propriedades funcionais investigadas para os componentes isolados compreendem o efeito de pH e ATP sobre: (i) o equilíbrio de O₂, (ii) a cinética da dissociação de O₂, (iii) a cinética da combinação de CO. O componente I, corresponde a aproximadamente 50% da hemoglobina total, é caracterizado por propriedades funcionais que são diferentes das dos componentes II, III e IV, os quais são semelhantes. Assim, é provado, uma vez mais, que componentes múltiplos num hemolisado caem na categoria de hemoglobinas caracterizadas por propriedades funcionais distintas e complementares.

INTRODUÇÃO

Este artigo é um estudo dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, peixe da Bacia Amazônica pertencente à superordem Ostariophysi, ordem Cypriniformes, subordem Siluroidei (Greenwood *et al.*, 1966; Fink, 1977). É um dos numerosos bagres que povoam as águas amazônicas e, provavelmente, o mais comum entre os mesmos.

A investigação das hemoglobinas concernente ao hemolisado do sangue de *Pterygoplichthys* foi efetuada pelas seguintes razões: (1) Entre os hemolisados investigados em alguns pormenores, durante a expedição do "Alpha Helix", a grande maioria, escolhida, por óbvias razões práticas, continha apenas um ou dois componentes hemoglobínicos. Um estudo cuidadoso de, pelo menos, um multicomponente do hemolisado parecia, portanto, essencial por ser necessário retirar conclu-

sões relevantes a problemas fisiológicos. (2) Do ponto de vista da fisiologia respiratória, *Pterygoplichthys* é uma espécie muito interessante porque, além das guelras é provido de um sistema alternativo de troca de O₂, associado aos seus intestinos, o que o torna um aeróbico opcional. Esta habilidade representa uma razão importante junto com sua estrutura coriácea, para a resistência incomum destas espécies. (3) É um peixe muito comum e abundante, que pode ser facilmente obtido em boa quantidade; além disso, ele representa, como um aeróbico opcional, um passo intermediário na evolução de organismos de vida aquática e terrestre. (4) Finalmente, é também um animal importante do ponto de vista comercial, sendo usado como alimento na região.

MATERIAL E MÉTODOS

A preparação da hemoglobina de sangue recém coletado seguiu o método de rotina (vide Antonini & Brunori, 1971). A purificação foi feita por passagem através de coluna de Sephadex G-25 a pH 7,5, seguida por passagem através de coluna de troca iônica "mixed bed".

A eletroforese foi realizada em *gel* poliacrilamida. A separação dos componentes foi feita em coluna cromatográfica de DEAE, da seguinte maneira: a coluna e o hemolisado foram equilibrados com Tris 0,05 M pH 8,5; após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com aproximadamente 200 ml do mesmo tampão e posteriormente foi iniciada em gradiente de pH com 500 ml de Tris 0,05 M pH 8,5 e 500 ml de Tris-acetato 0,05 M pH 6,0.

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

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

(2) — Duke University, Marine Laboratory, Beaufort, N.C. 28516, U.S.A. Established Investigator of the American Heart Association.

(3) — Departamento de Bioquímica, I.B., Universidade Estadual de Campinas, 13100 Campinas, SP, Brasil.

(4) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 69000 Manaus, AM, Brasil.

(5) — Department of Chemistry, University of Essex, Wivenhoe Park, Colchester, Essex, U.K.

O equilíbrio de oxigênio foi medido segundo o método de Riggs & Wolbach (1956).

Experimentos cinéticos foram efetuados em um aparelho "Stopped flow" Gibson-Durum equipado com uma célula de observação de 2 cm. A cinética da dissociação de oxigênio foi medida usando-se o método do ditionito (Antonini & Brunori, 1971). Soluções de CO foram obtidas diluindo-se quantitativamente uma solução estoque de água destilada equilibrada com CO a 1 atm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$, conc. = 0,86 mM (Tabelas Críticas Internacional, Washburn, 1926).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO E CROMATOGRÁFICO

Os hemolisados de diversos indivíduos adultos foram caracterizados eletroforeticamente. As análises de, pelo menos, 20 espécimes provou que: (i) os hemolisados continham múltiplos componentes hemoglobínicos; (ii) a presença de uma banda principal, correspondendo a aproximadamente 50% da Hb total e 3 outros componentes menores; (iii) o padrão foi constante de um indivíduo para outro. Este padrão corresponde ao descrito por Fyhn et al. (1978) para espécies 1 de *Pterygoplichthys*.

A separação dos vários componentes foi efetuada por cromatografia em DEAE-Sephadex (ver métodos). A Fig. 1 ilustra o padrão de eluição, o qual é consistente com o padrão eletroforético observado. O componente principal (aqui denominado Componente I) foi eluído da coluna com o tampão inicial; após iniciar o gradiente, os outros componentes foram progressivamente eluídos. As frações dos 3 picos mais proeminentes (denominados Componentes II, III e IV respectivamente) foram agrupados e coletados como mostra a Fig. 1. Estes 4 componentes principais foram submetidos a *gel*-eletroforese em acrilamida e mostraram-se homogêneos.

Outros componentes ainda menores foram observados no cromatograma, mas parecem constituir uma pequena fração da hemoglobina total e foram, portanto, ignorados.

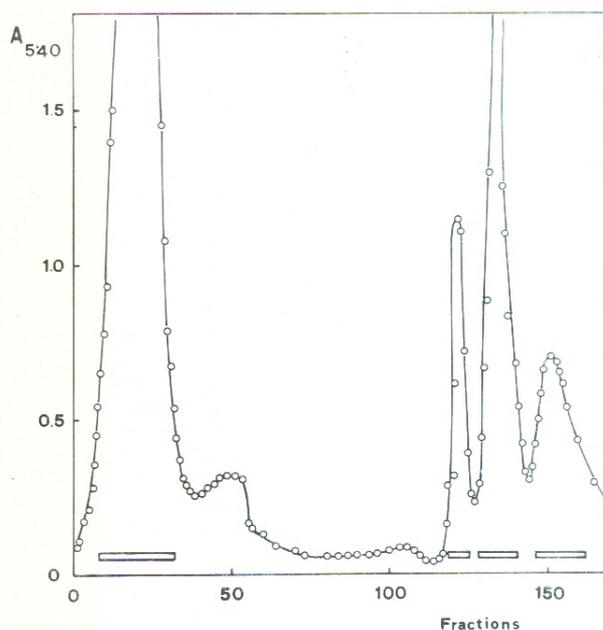


Fig. 1 — Cromatografia em DEAE — Sephadex do hemolisado de *Pterygoplichthys* (espécime n.º 772). As frações indicadas foram agrupadas e denominadas de I a IV em ordem de eluição (da esquerda para a direita). A gradiente (500 ml de tris-HCl 0,05 M pH 8,5 + 500 ml tris-acetado 0,05 M pH 6,0) foi iniciado após aproximadamente 40 frações coletadas.

PROPRIEDADES DA UNIÃO DE OXIGÊNIO

A curva de equilíbrio de O_2 do Componente I, sob condições de fracionamento é claramente cooperativa, com um valor do parâmetro de Hill — n , abrangendo de 1,9 a pH 6,7 a 1,3 a pH 8,5. Como mostra a Fig. 2, o componente I fracionado mostra um pequeno efeito Bohr reverso centralizado em cerca de pH 7,2 a 25°C . Deve-se notar que estes experimentos foram efetuados na presença de 1 mM de EDTA para diminuir a velocidade de auto-oxigenação a baixos valores de pH. O efeito do ATP (1 mM) é insignificante a pH $> 7,5$; a pH mais baixa, a adição de ATP é associada com um decréscimo na afinidade de O_2 , bem como um leve decréscimo em n (por ex: a pH 6,7 n vai de 1,87 a 1,4 por adição de 1 mM de ATP). A Fig. 3 mostra a dependência da concentração total de ATP de $\log P_{1/2}$ medida para o Componente I a pH 6,2, em bis-tris 0,05 M e 20°C . Os dados mostram que este pH efeito total de ATP é deduzido a concentrações consideravelmente maiores que 1 mM.

As propriedades da união de O_2 do componente IV fracionado (na presença de 1mM EDTA) foi investigada em um intervalo de pH de 6,2 a 8,4. A Fig. 2 mostra o efeito Bohr para este componente sob condições de fracionamento, bem, como na presença de ATP (1 mM). Os dados mostram que, em contraste ao comportamento I, a dependência de pH da afinidade de O_2 é, na verdade, muito marcante, o ($\Delta \log P_{1/2}/\Delta \text{pH}$) sendo aproximadamente 1 abaixo de 7. O valor de n é sempre abaixo de 2, abrangendo de 1,1 a 1,7 e mostra obscura dependência de pH ou ATP.

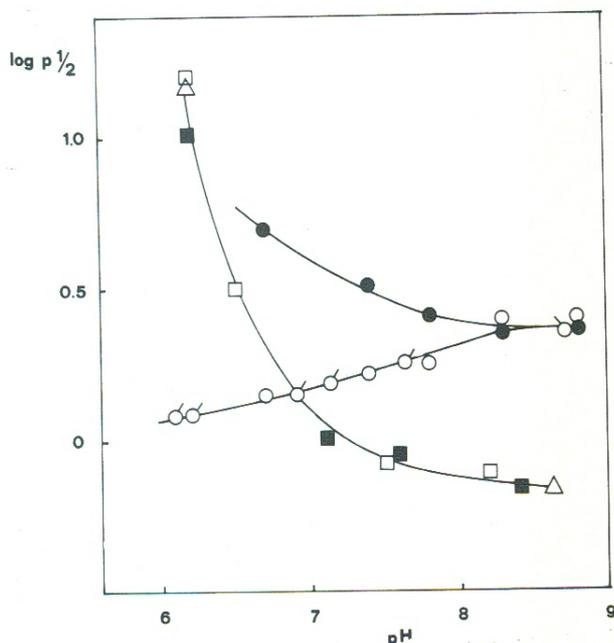


Fig. 2 — Efeito Bohr de oxigênio dos componentes de *Pterygoplichthys*. O componente I é indicado por círculos: O, fracionado; ●, + 1 mM ATP, δ indica experimentos efetuados a 20°C e deslocados de 0,05 nas escalas de $\log p_{1/2}$. O componente IV é indicado por quadrados □, fracionado; ■ + 1 mM ATP. O componente III é indicado por triângulos Δ. Condições: bis-tris 0,05 M ou tampão tris + 1 mM EDTA e 25°C. Concentração de Hh ~ 1 mg/ml.

O componente III fracionado parece ter essencialmente a mesma afinidade com O_2 que o componente IV. É muito significativo que a afinidade pelo O_2 do componente IV, embora dependente de pH, é independente de ATP, mesmo na região de baixo pH onde ATP tem um efeito no comportamento do componente I.

Separação e...

Nossos resultados ampliam o trabalho de Weber *et al.* (1978), que isolaram duas frações hemoglobínicas, *a* e *b*, do hemolisado de *Pterygoplichthys* por focalização do ponto isoeletrico. Parece que a fração *b* (Fig. 4B de Weber *et al.*, 1978) contém ambos os componentes IV e outros componentes com propriedades mais semelhantes às do componente I.

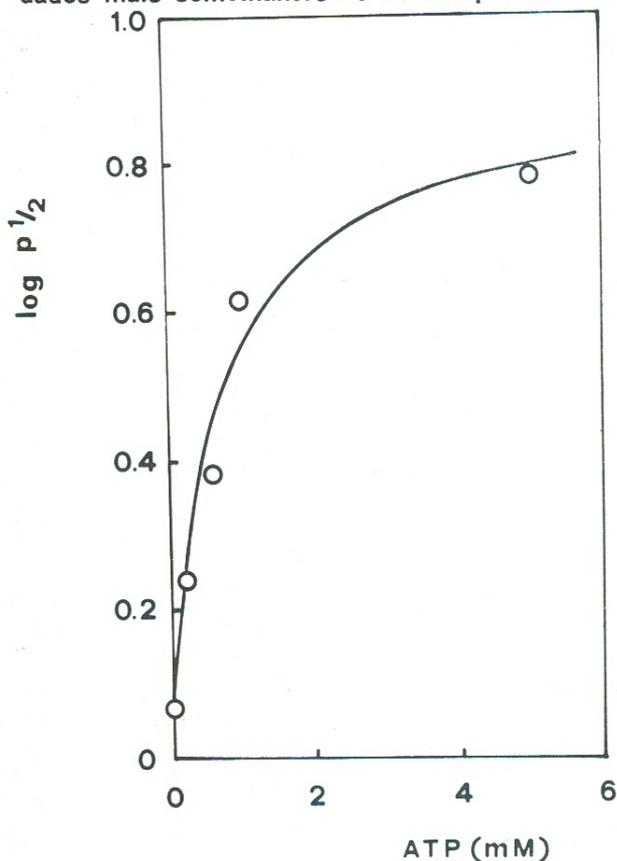


Fig. 3 — Dependência de $\log p(O_2)$ na concentração total de ATP para o componente I. Condições: pH 6,7 em bis-tris 0,05 M e 20°C.

PROPRIEDADES CINÉTICAS

a. Combinação com monóxido de carbono

Esta reação foi estudada em paralelo com todos os 4 componentes (a) sob condições de fracionamento, (b) como uma função da concentração de CO e (c) a dois pHs (~ 5,6 e 7,7). Em ambos os valores de pH, descobriu-se que a total pseudo constante média de 1ª ordem cresce linearmente com a concentração ligante (CO abrangendo de 7 a 43 μM , concentração de Hb ~ 2,5 μM (em heme). Estes

experimentos mostraram que, a ambos valores de pH, os componentes II, III e IV são semelhantes, enquanto o componente I é diferente dos outros três.

A Fig. 4 representa a dependência de pH da total constante média de combinação de 2ª ordem para CO (I'), ambos na ausência e presença de ATP (1,25 mM), para os componentes I e IV. A concordância destes resultados com o descoberto sobre o equilíbrio de O_2 é imediatamente evidente.

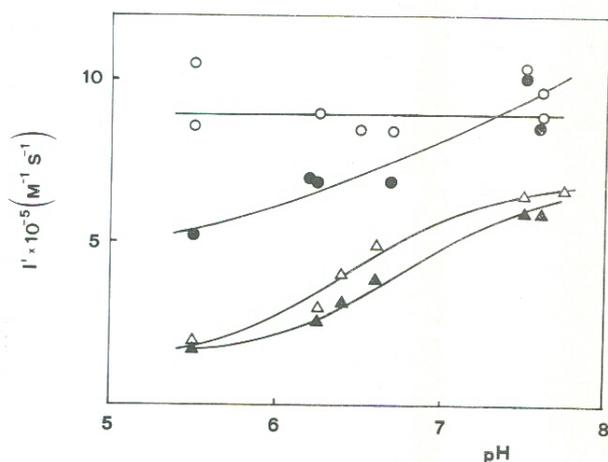


Fig. 4 — Dependência de pH da constante média total para a ligação CO (I') à deoxiemoglobina (s). ○ componente I, sem (O) e com (●) 1,25 mM de ATP. O componente IV sem (Δ) e com (▲) 1,25 mM de ATP. Concentração de Hb aproximadamente 2,5 μ M (heme). Tampão bis-tris 0,05 M ou tris e 20°C.

O componente cinético do componente I fracionado é independente de pH e mostra um efeito de ATP apenas na região de pH ácido. Assim, a pH 5,5 a 6,0 a constante média de combinação de CO decresce com adição de ATP, como mostra a Fig. 5, a qual representa a dependência de concentração de ATP de I' para componente I a dois valores de pH. Deve-se notar que o curso de tempo de combinação de CO é um tanto homogênea (2ª ordem) ou algo autocatalítico, dependendo do pH e (ou) da presença de ATP.

No caso do componente IV, o curso de tempo de combinação de CO é essencialmente homogênea a valores de pH abaixo de 7, enquanto parece ser algo heterogêneo a pH > 7. A dependência de pH de I' , segue um efeito

Bohr normal, trocando aproximadamente 3,5 vezes baixando de pH 5,5 para 7,7 (Fig. 4). Ainda mais importante é a descoberta de que a adição de ATP (1,25 mM) tem um efeito muito pequeno sobre I' a todos os pH examinados. A presença de um mensurável efeito cinético Bohr, a (quase completa) ausência de efeito de ATP e a similaridade no comportamento cinético dos componentes II, III e IV, estão todos em consonância com o equilíbrio verificado e referido acima.

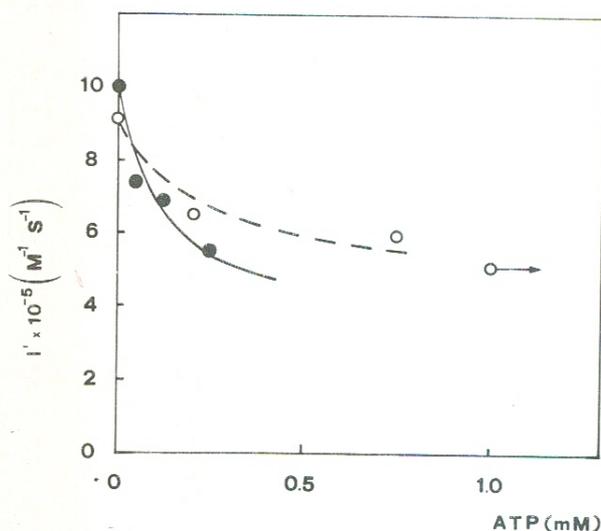


Fig. 5 — Dependência de I' sobre a concentração total de ATP a pH 5,55 (O) e a pH 6,21 (●) para o componente I. Condições como na Fig. 4.

Um número limitado de experimentos de "flash photolysis" foi feito com o componente I, a dois valores de pH. Alguns dos dados experimentais são citados na Fig. 6. Dois pontos se evidenciam do exame destes experimentos: (i) em fotólise total na presença e ausência de ATP, a reação é claramente autocatalítica e não há evidência de uma rápida forma reagente dada a presença de dímeros em solução, em contraste com o observado para a HbA (Antonini & Brunori, 1971; (ii) em fotólise parcial (aproximadamente 10% de fotodissociação), a combinação com CO é muito mais rápida que em fotólise total. Esta é uma indicação direta da existência de uma rápida espécie reagente, o qual é o único estado significativamente populado a baixos níveis de fotólise (ex., à altas saturações de CO).

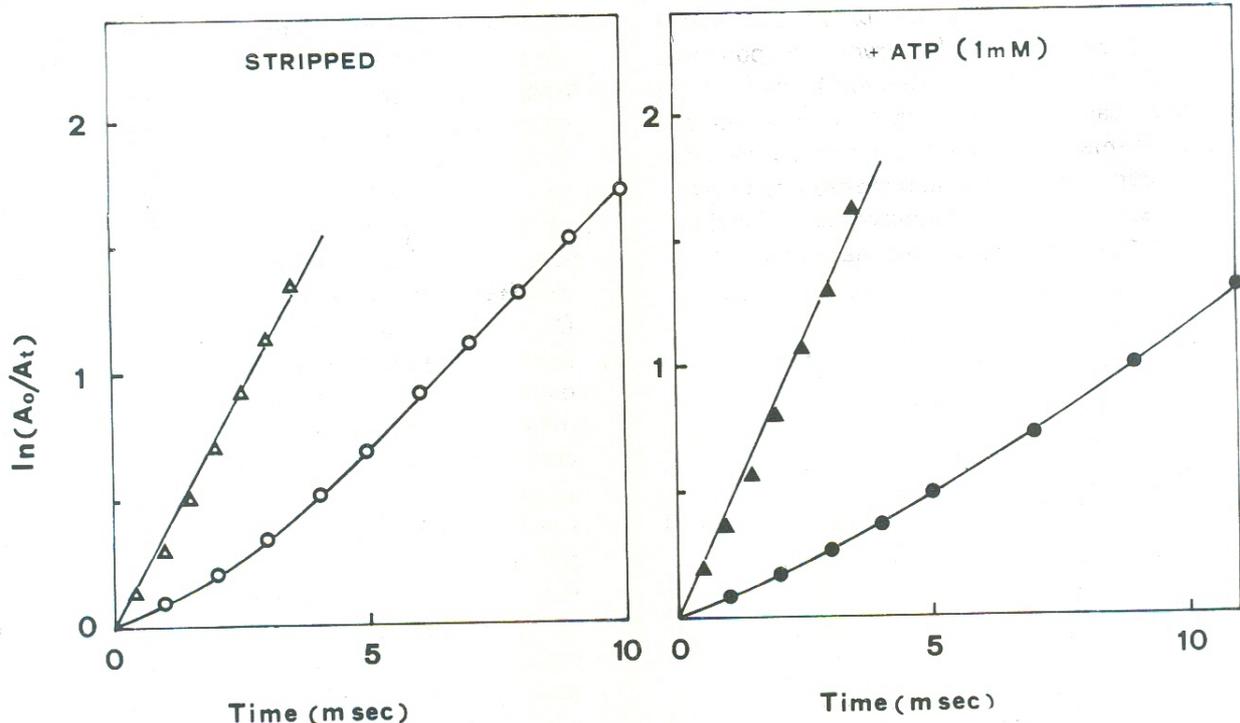


Fig. 6 — Efeito da extensão de fotólise no curso de tempo de combinação de CO a desoxiemoglobina do componente I. Os resultados citados referem-se a experimentos efetuados a pH 5,45 sem e com ATP (esquerda e direita respectivamente). Os resultados da fotólise total são mostrados como círculos (abertos ou fechados) e os de fotólise parcial (% de fotodissociação = 10%) como triângulos (aberto ou fechado). Também bis-tris 0,05 M.

Nota-se que a ambos os valores de pH, a adição de ATP (1 mM) não tem efeito na recombinação de CO como o observado na fotólise parcial, enquanto tem algum efeito na fotólise completa (vide fig. 6). Esta verificação está em concordância com os resultados citados acima (vide fig. 4).

b. Dissociação de oxigênio

A dissociação de O_2 pelo método do ditonito foi investigado para todos os componentes em paralelo, a pH $\sim 5,6$ e $7,7$ na ausência de ATP sob condições "fracionamento". Em todos os casos, o curso de tempo de dissociação de O_2 foi de 1ª ordem por uma boa aproximação. Novamente foi verificado que os componentes II, III e IV tem constantes médias muito similares, enquanto o componente I é diferente dos outros três.

A fig. 7 mostra a dependência de pH da constante média de dissociação de O_2 (K) para os componentes I e III, na ausência e na pre-

sença de ATP (1,25 mM). Novamente o comportamento é consistente tanto com o equilíbrio verificado como com a cinética da combinação de CO. Assim, o componente I fracionado é caracterizado por um efeito Bohr reverso muito pequeno, e a adição de ATP aumenta significativamente a constante "off" a pH abaixo de 6,5 (um efeito nítido é notado nos experimentos paralelos a pH 5,6 — 5,7). O comportamento III mostra um efeito Bohr positivo muito forte (abaixo de pH 7), o valor de K aumentando de um fator de ~ 10 , indo de pH 7 a pH 5,3. Em adição, não foi observado efeito de ATP na cinética da dissociação de O_2 do componente III.

CONCLUSÕES

Diversas espécies de bagres foram examinadas durante a Expedição "Alpha Helix" (Fink & Fink, 1978; e outros artigos deste volume), mas na maioria dos casos a atenção foi concentrada nos caracterizados por hemolisados

que continham um (*Pseudorasbora* e *Brachyplatystoma*) ou dois (*Hoplosternum*) componentes hemoglobínicos. *Pterygoplichthys pardalis* foi o único caso com 4 componentes principais, cuidadosamente estudado, e como tal ele pode desempenhar um papel importante nos padrões de entendimento de comportamento funcional de hemoglobinas de bagres da Amazônia.

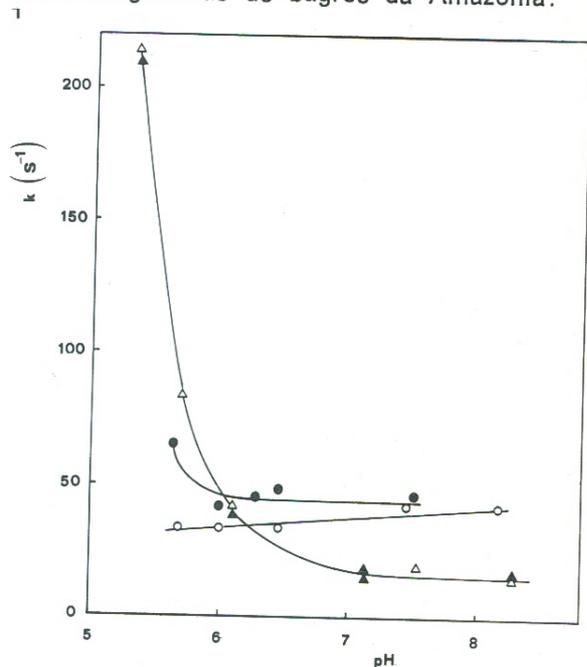


Fig. 7 — Efeito de pH na constante média da dissociação de O_2 (K) para componente I na ausência (O) e na presença (●) de 1,25 mM ATP e componente III na ausência (Δ) e na presença (\blacktriangle) de 1,25 mM de ATP. Tampões de bis-tris 0,05 M ou tris e 20°C. Concentrações de Hb \sim 25 μ M (heme).

As principais descobertas e conclusões deste trabalho podem ser resumidas como se segue: (i) os quatro maiores componentes hemoglobínicos podem ser divididos, funcionalmente, em dois grupos: um representado pelo componente I e o outro compreendendo os componentes II, III e IV. Assim, dentro da precisão de nossas medidas, os três componentes são, na verdade, muito, se não idênticos, no equilíbrio e cinética da reação com O_2 e CO (ii). Em geral, os experimentos de equilíbrio estão em excelente (semi-quantitativo) harmonia com os resultados cinéticos. Esta conclusão confirma ambos os efetores alostéricos, ex. prótons e ATP. (iii) O componente I, que

representa aproximadamente metade da hemoglobina total presente no hemolisado, é caracterizado quando fracionado por um efeito Bohr reverso de O_2 , muito pequeno; sua afinidade total com O_2 é ATP-dependente apenas nos intervalos de mais baixo pH. Cineticamente, o efeito de ATP resulta num decréscimo na constante média de combinação de CO e um aumento na constante média da dissociação de O_2 . (iv) Os componentes II, III e IV, os quais juntos compreendem aproximadamente metade da hemoglobina total, são funcionalmente similares um ao outro e muito diferentes do componente I. Assim, seu efeito Bohr de O_2 é grande, a afinidade ligante decrescendo por um fator próximo a \sim 20, indo de pH 8,5 a pH 6,2. Isto correlaciona-se com a cinética em (a) o grande acréscimo na constante média da dissociação de O_2 e (b) o significativo decréscimo na constante de combinação de CO, com o decréscimo do pH. Em adição, o efeito de ATP é desprezível sobre o intervalo de pH examinado. (v) Estes resultados somados juntos nos levam a concluir que os vários componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys* caem em duas categorias caracterizada por propriedades funcionais que são complementares com respeito à influência de típicos efetores alostéricos. Isto sugere que: (a) a presença de múltiplos componentes com propriedades funcionais altamente diferentes é um padrão comum, embora não universal, em sangue de peixe e (b) embora não se possa oferecer uma explicação total no presente, nós consideramos igualmente uma relação, ainda a ser definida, entre propriedades funcionais e papel fisiológico destas hemoglobinas. Tal relação foi proposta e substanciada para as hemoglobinas de truta (*Salmo irideus*) (Brunori, 1975). A existência de subgrupos de hemoglobinas com funções complementares parece, portanto, razoavelmente geral, pois tem se verificado também em outras espécies estudadas a bordo do "Alpha Helix", por ex. para o sistema de 2 componentes de *Mylosomma* (Martin et al., 1978).

Esta complementaridade de funções adquiriria importância se fosse verificado que os vários componentes coexistem num mesmo eritrócito, como mostra ser o caso do sangue de truta (Brunori et al., 1974).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por National Science Foundation Grant PCM 75-06451. Somos gratos ao Governo Brasileiro pela permissão de o "Alpha Helix" percorrer águas do Amazonas. M. Brunori expressa seus agradecimentos a National Research Council (CNR) da Itália pela cobertura financeira para a viagem. M. T. Wilson agradece os fundos para a viagem recebidos da Royal Society, U. K. e Duke University, USA. A. Focesi Jr. foi parcialmente assistido pelo Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia.

SUMMARY

The four main hemoglobin components of the hemolysate of *Pterygoplichthys pardalis* have been isolated and characterized. The functional properties investigated for the isolated components comprise the effect of pH and ATP on (i) the O₂ equilibrium, (ii) the O₂ dissociation kinetics, (iii) the CO combination kinetics. Component I, corresponding to approximately 50% of the total hemoglobin, is characterized by functional properties which are distinctly different from those of Components II, III and IV, which are alike. Thus it is shown, once more, that multiple components in an hemolysate fall into categories of hemoglobins characterized by distinct and complementary functional properties.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1971 — "Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands", North Holland, Amsterdam.
- BRUNORI, M.
1975 — Molecular adaptation to physiological requirements. *Curr. Top. Cell. Regulation*, 9:1-39.
- BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BENEDETTI, P.A. & BIANCHINI, G.
1974 — *J. Mol. Biol.*, 86:165-169.
- BUNN, H.F. & RIGGS, A.
1978 — A medida do efeito Bohr em hemoglobinas de peixe por focalização elétrica em gel. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- FINK, W.L. & FINK, S.V.
1978 — A Amazônia Central e seus peixes. *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).
- GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H. & MYERS, G.S.
1966 — Phyletic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 131:339-455.
- 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 da hemoglobina de *Milossoma sp.*, um teleosteo da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- RIGGS, A.F. & WOLBACH, R.A.
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39:585-605.
- WASHBURN, E.W.
1926 — International critical tables of numerical data, Physics, Chemistry and Technology.
- WEBER, R.E. & WOOD, S.C.
1978 — Efeito de nucleosídeo trifosfato eritrocítico no equilíbrio de oxigênio de hemoglobinas completas e fracionadas de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, bagres aeróbicos facultativos. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).