

O efeito Root na hemoglobina do jaraquí (*Prochilodus* sp.) um peixe teleósteo

Joseph P. Martin (1); Joseph Bonaventura (2); Maurizio Brunori (3); Robert L. Garlick (4); Dennis A. Powers (5)

Resumo

O sistema de hemoglobina do jaraquí, *Prochilodus* sp. consiste em componentes múltiplos de hemoglobina. O derivado oxidado elui como uma espécie de único peso molecular em experimentos de filtração. O derivado carboxi tem um peso molecular aparente de 60.000 determinado por filtração de gel. Uma mudança de 44 vezes no $p_{1/2}$ ocorre entre pH 6,4 e 8,6 na solução da hemoglobina. Esta mudança aumenta 388 vezes sob a mesma faixa de pH na presença de 1mM de ATP. A cooperatividade da união do oxigênio, medida por n na equação de Hill, é maior que um em pH acima de 6,7, porém menor que um quando abaixo deste valor. O hemolisado apresentou efeito "Root", sendo apenas 44% saturado a pH 6,4 em presença de 1mM de ATP e equilibrado com ar a uma atmosfera. Em 30°C e pH 7,6 o sangue total processa-se abaixo de $p_{1/2}$, 4,7 mm de Hg, menor que o de maioria dos outros teleósteos amazônicos. Ambas as velocidades de combinação do monóxido de carbono e velocidade de dissociação do oxigênio são dependentes do pH e ATP. Entre pH 6,2 e 8,8 a velocidade do CO_{on} aumenta 10 vezes. ATP reduz a velocidade em valores de pH intermediários. A velocidade de O_{off} aumenta 2,4 vezes entre pH 8,8 e 6,7. A adição de 1 mM de ATP produz um aumento de 4,5 vezes sobre a mesma faixa de pH. Os baixos valores de n abaixo de pH 6,7 e a heterogeneidade da combinação de CO e o processo de dissociação da combinação de O_2 sugerem que os componentes da hemoglobina podem ser funcionalmente diferenciados e/ou existem diferenças intramolecular nas propriedades cinéticas das cadeias α e β .

INTRODUÇÃO

A família Prochilodontidae é um grupo de peixes caracóides amplamente distribuída através dos rios tropicais da América do Sul. Espécies destes espalhados grupos conduzem anualmente migrações de desova em distâncias maiores que 700 km e viajam em grandes cardu-

mes (i.e. maior que 1×10^5 indivíduos). Eles são comedores de lama, digerindo bactérias e outros pequenos organismos que vivem de detritos do fundo do rio e um importante item alimentício, sendo dos peixes mais comumente consumidos pela população ribeirinha de vários países da América do Sul. Entretanto, os *Prochilodus* sp. freqüentemente habitam rios de águas rápidas, habitando também pequenos rios, leito de lagos, canais, pequenas depressões e sacados e, muitas vezes, sobre densas camadas de macrofitas flutuantes, i.e. campina flutuante (Lowe-McConnell, 1975). Nossos estudos em hemoglobina de *Prochilodus* sp. foram motivados por duas razões: 1) porque os *Prochilodus* sp. são fontes de alimentos cultivados, conseqüentemente, são mais facilmente obtidos; 2) estas espécies habitam faixas notáveis de ambientes aquáticos. Assim nós esperamos que suas hemoglobinas possam apresentar propriedades moleculares características de espécies de águas rápidas (e.g. efeito Bohr, efeito Root) como as trutas (*Salmo irideus*, Brunori, 1975) e salmão (*Oncorhynchus Keta*, Hashimoto et al., 1960) que já apresentaram propriedades (e.g., alta afinidade pelo oxigênio) típicas de hemoglobina de espécies como carpa *Cyprinus carpio*, Krogh & Leitch, 1919; Noble et al., 1970), o atum, *Amia calva* (Weber et al., 1976) e o *Hoplias malabaricus* (Powers et al., 1978), peixes que periodicamente experimentam condições hipóxicas.

MATERIAL E MÉTODOS

ISOLAÇÃO — Espécimes de *Prochilodus* sp. foram coletadas em novembro e dezembro de

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

(1) — Department of Zoology, Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516.

(2) — Department of Biochemistry, Duke University Medical Center and Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516.

(3) — CNR Center for Molecular Biology, Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Rome, Italy.

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

(5) — Department of Biology, John Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218.

1976, durante uma expedição do R/V "Alpha Helix" no rio Amazonas cerca de 50 km acima da junção com o rio Negro. Os peixes foram capturados com redes e malhadeiras e transportado para o "Alpha Helix" para estudos. O sangue foi obtido por punção cardíaca e aspirado em seringa de vidro gelado e heparizado (100 ul de heparina sódica (5000 I.U./ml), em 1,7% de NaCl por 5 ml de sangue). As hemácias foram lavadas três vezes em dez volumes de Tris 1 mM, gelado, pH 8,0⁽¹⁾ 1,7% NaCl e lizadas em três volumes de Tris 1mM, pH 8,0 por uma hora a 0°C. Um décimo do volume de 1 M NaCl foi adicionado no hemolisado e a mistura foi centrifugada a 28.000 x g por quinze minutos para remover restos celulares. O sobrenadante foi então separado dos sais de fosfatos por passagem através de uma coluna de Sephadex-G-25 de 2,5X50 cm seguindo-se por um tratamento em uma coluna desionizadora com as seguintes resinas do topo para a base: 2 cm de Dowex-50 (W) em forma de amônia, 2 cm Dowex-1 em forma de acetato, 20 cm Bio. Rad AG 501-X8(D) "Mixed Bed". A hemoglobina purificada foi estocada a 5°C até ser utilizada. A amostra hemolisada foi congelada a -70°C e transportada em gelo seco para Beaufort, N. C. e estocada por dois meses a -20°C. Determinações de peso molecular por filtração em *gel* do derivado carboxi e todos estudos de cinética rápida, foram realizados nestas amostras. A amostra descongelada foi reduzida por tratamento com pequenas quantidades de ditionito, depois da qual a hemoglobina foi purificada por passagem em uma coluna de Sephadex G-25 de 1X25 cm equilibrada com 1mM de Tris, pH 8,0 e usada imediatamente nos experimentos de dissociação do O₂ e combinação do CO.

ELETROFORESIS — Eletroforesis em *gel* vertical de poliacrilamida (pH 8.9, 7.5% de gel) foi feito em temperatura ambiente de acordo com Davis (1964) e Ornstein (1964). A amostra de hemoglobina (1 mg/ml) contida no tampão superior 0.1 M β mercaptoetanol e uma pequena quantidade de ditionito foram borbu-

lhadas com monóxido de carbono e aplicadas no *gel*. Albumina de soro bovino foi usada como padrão de mobilidade.

ESTUDOS DO PESO MOLECULAR — Experimentos com filtração em *gel* com α hemolisado oxidado de *Prochilodus* foram efetuados em uma coluna de Sepharose 4 B (2X90cm) em 0,05 M Tris pH 7,5 1mM EDTA de acordo com Fyhn & Sullivan (1975). Em adição, o peso molecular da carboxi hemoglobina do *Prochilodus* foi determinado de acordo com Martin *et. al.*, (1978).

ESTUDOS DO EFEITO "ROOT" — O hemolisado foi examinado visando a presença do efeito Root. A absorbância da solução de hemoglobina tamponada e equilibrada com ar + 1mM ATP foi considerado como função do pH. A absorbância foi lida a dois comprimentos de onda (560, 576 nm) foram convertidas para saturação fracional pela seguinte equação. Aobservada — Adeoxy = saturação fracional

Aoxy - Adeoxy

Aoxy = absorbância da solução oxigenada a pH=8.

Aobservado = absorbância da solução oxigenada a pH < 8.

Adeoxy = absorbância da solução tratada com ditionito a pH 8. Os dados foram plotados % de saturação versus pH.

EXPERIMENTOS DO EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO — O equilíbrio de oxigênio do sangue total de *Prochilodus* foi medido a 30°C como descrito por Powers *et. al.*, (1978) usando um "Hem-O-Scan" analisador de dissociação de oxigênio (American Instruments Corporation). O equilíbrio de oxigênio da hemoglobina purificada foi feito a 20°C como descrito por Riggs e Wolbach (1956). A solução de hemoglobina (60 uM in heme) foi levada a 0,05 de força iônica em tampão Tris ou Bis — Tris; o valor de p_{1/2} foi estimado sob várias condições de pH. Estes experimentos foram efetuados em presença e ausência de 1mM ATP.

(1) — Abreviações usadas neste trabalho foram as seguintes: Bis-tris, (2 hidroxietil) imino tris (hidroxietil metano); Tris, tris (hidroximetil) aminometano; ATP, adenosina trifosfato; EDTA, ácido etilenodiaminotetraacético; k_1 , constante de velocidade de combinação do monóxido de carbono de segunda ordem; K, constante de primeira ordem da dissociação de oxigênio; P_{1/2}, pressão parcial de oxigênio no qual metade dos sítios hemes disponíveis estão ocupados.

EXPERIMENTOS DE CINÉTICA RÁPIDA — Velocidade de dissociação de oxigênio da hemoglobina em soluções tampão contendo ditionito foram determinadas num espectrofotometro "stopped flow" Gibson-Durrum equipado com uma transmissão pneumática e uma câmara de observação de 2 cm descrita previamente no método (Bonaventura *et al.*, 1974). A solução de hemoglobina sem gás (7 μ M heme) foi rapidamente misturada com uma solução tampão contendo excesso de ditionito e a mudança da absorbância da mistura foi a seguinte 437,5nm. Velocidade de dissociação foram medidos com uma função do pH com ou sem 1mM ATP. A força iônica do tampão depois da mistura foi 0,05 I e a concentração de ATP foi 1 mM.

A velocidade de combinação do monóxido de carbono da hemoglobina do *Prochilodus* foi examinada por espectrofotometria "stopped flow" de acordo com Bonaventura *et al.*, (1974) e a influência do pH e fosfatos orgânicos nas velocidades foram verificados a 437.5 nm. A contração heme, depois da mistura foi 3.5 μ M. Todos os experimentos foram realizados a 20°C em tampões Tris ou Bis-Tris. A força iônica do tampão após a mistura foi 0.05 I. A análise dos dados cinéticos foram facilitados pelo uso de um computador PDP 11/E (Digital

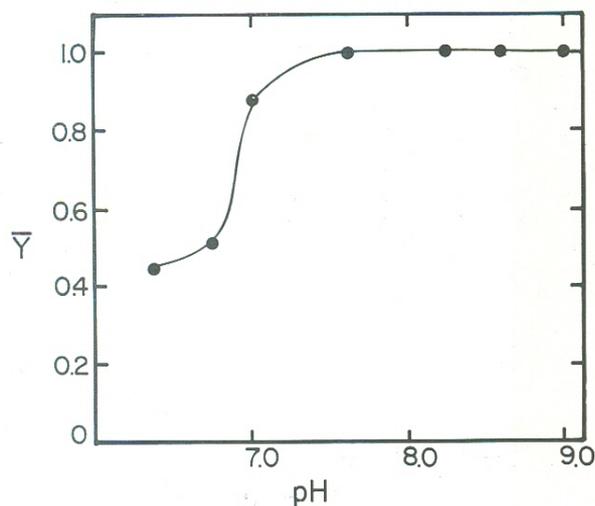


Fig. 1 — A dependência da saturação fracional, \bar{y} , da solução de hemoglobina equilibrada no ar como uma função do pH. O experimento foi realizado em tampões Tris e Bis-Tris 0,05 I + 1mM ATP.

Equipment Corporation) e a aquisição de dados na divisão de armazenamento (DASAR, American Instruments Corporation).

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DOS HEMOLISADOS

As hemoglobinas do *Prochilodus* apresenta aspectos estruturais semelhantes a todas as outras hemoglobinas dos teleósteos. Os hemolisados continham duas hemoglobinas, Fenótipo II de acordo com Fyhn *et al.*, (1978). O hemolisado não polimerizou depois da oxidação por ferricianeto de potássio enquanto que a polimerização da hemoglobina do *Hoplias malabaricus* (outro teleosteo amazônico) foi descrito por Reischl (1976). O derivado carboxi tem um peso molecular aparente de 60.000.

DADOS DA UNIÃO DE LIGANTE

Hemolisado de *Prochilodus* mostraram um efeito Root (fig. 1) o qual é elevado em presença de 1mM ATP. Sob pH 7,0, o nível de saturação de hemoglobina é diminuído para 87% na tensão atmosférica de oxigênio. Abaixo de pH 7,0 o nível de saturação cai além disso, atingindo um mínimo de 44% a pH 6,4.

O equilíbrio de oxigênio no sangue total (fig. 2) apoiado por dados antecedentes de efeito "Root" no sangue equilibrado com 5,6% CO₂ a 100% de saturação não foi alcançada sob a pressão atmosférica parcial do oxigênio.

Um grande efeito Bohr é evidente nos experimentos de equilíbrio com sangue (fig. 2) e hemolisados fracionado (fig. 3). A pH 7,6 e 30°C o $p_{1/2}$ do eritrócito é 4,7 mm de Hg, substancialmente menor que os referidos em outras espécies amazônicas conhecidas que possuem hemoglobinas com efeito "Root" (i. e., *Osteoglossum bicirrhosum*, *Hoplosternum littorale* e *Mylossoma* sp., Powers *et al.*, 1978). O $p_{1/2}$ do hemolisado fracionado a 20°C, pH 7,6 é 0,63 mm de Hg sem e 0,76 mm de Hg com 1 mM ATP presente na solução.

O valor $p_{1/2}$ aumenta com a diminuição do pH e o efeito inibitório do ATP aumenta, até a pH 6,4 ele chega a ser 16,22 mm de Hg e 182 mm de Hg respectivamente. Assim, o $p_{1/2}$

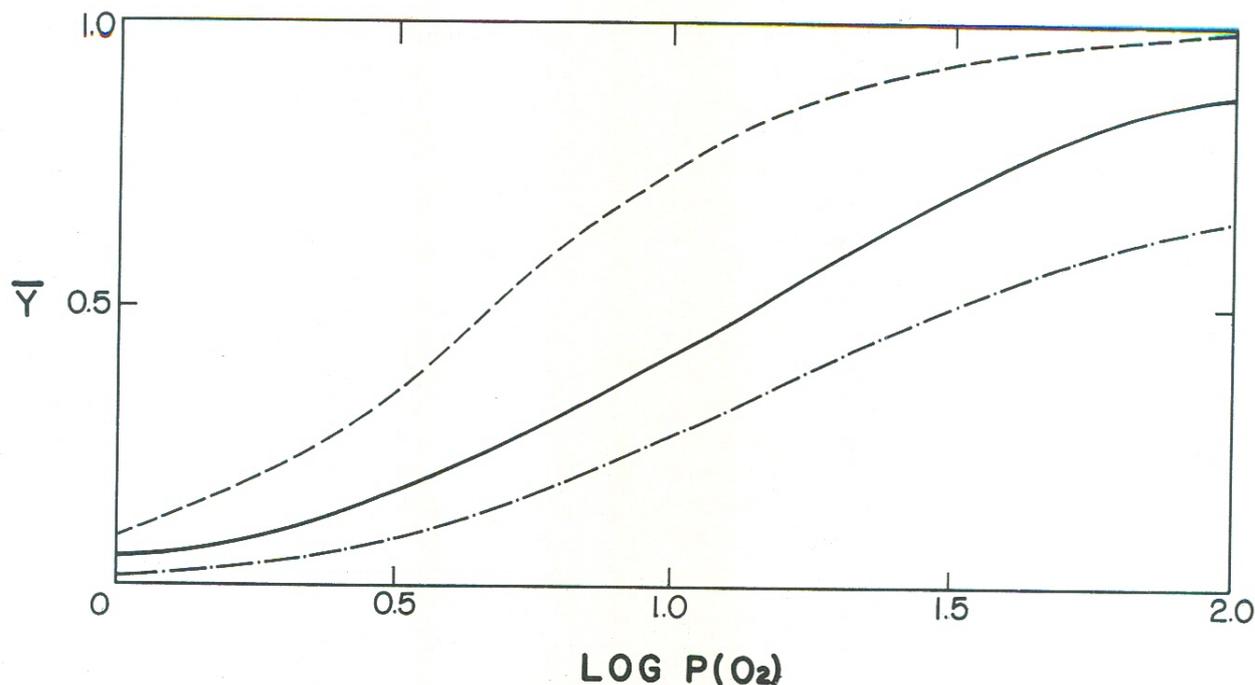


Fig. 2 — A saturação fracional \bar{y} , do sangue total do *Prochilodus* versus o log da pressão parcial do oxigênio a vários valores de pH e 30°C. Curva 1 (-.-) representa a curva média do equilíbrio de oxigênio do sangue de quatro indivíduos a pH = 7,6 na ausência de CO_2 . Curva 2 (—), a curva média de equilíbrio do sangue de dois indivíduos a pH = 7,0 na presença de 5,6% de CO_2 . Curva 3 (-.-), a curva média do equilíbrio de oxigênio do sangue de dois indivíduos a pH 6,7 na presença de 5,6% de CO_2 .

muda aproximadamente 44 vezes na hemoglobina fracionada e 388 vezes na hemoglobina fracionada + 1mM de ATP entre pH 6.4 e 8,6. Sob pH 5,9, a solução de hemoglobina fracionada alcança um $p_{1/2}$ de 34,7 mm de Hg, cerca de 94 vezes, mudança sobre o $p_{1/2}$ a pH 8,6. O efeito "Bohr", medido entre pH 7,0 e 7,5, foi $\Delta \log p_{1/2} / \Delta \text{pH} = -0,46$ para a solução da hemoglobina fracionada e $\Delta \log p_{1/2} / \Delta \text{pH} = -0,60$ para a hemoglobina fracionada + 1 mM de ATP. A pH 7.0 a adição de ATP causa um aumento de 4,8 vezes no $p_{1/2}$; sob pH 6,4, o aumento no $p_{1/2}$ é de 15,7 vezes. Com referência às fig. 2 e 3, estas indicam que a ligação de oxigênio é cooperativa ($n=1,3$ a pH= 7,0 na solução da hemoglobina fracionada). Entretanto, valores abaixo de pH 6,7, n , decresce menos do que um, sugerindo uma heterogeneidade intra ou intermolecular da ligação do oxigênio. (Antonini & Brunori, 1971). A adição de 1 mM de ATP não atinge significativamente da mesma maneira o valor de n a qualquer pH.

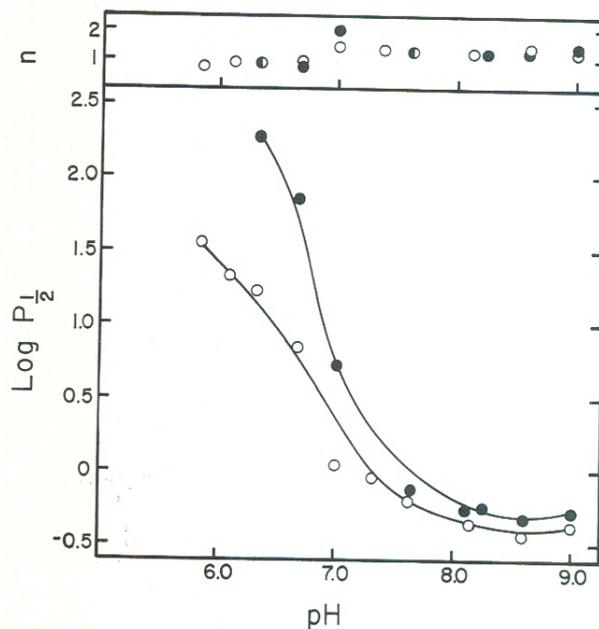


Fig. 3 — A dependência de $p_{1/2}$ e n da hemoglobina do *Prochilodus* do pH. Hemolisados fracionado (O) e fracionado + 1 mM ATP (●). Condições experimentais são descritas no texto.

RESULTADOS DE CINÉTICA RÁPIDA

A fig. 4 representa a fração de mudança máxima de absorvância obtida a pH 8,8, observada no tempo zero no processo de dissociação do oxigênio, obtidos a vários valores de pH. Estes dados são resultados de experimentos realizados em presença de 1 mM de ATP. A medida que o pH é reduzido, a velocidade aumenta e progressivamente uma maior percentagem do processo de dissociação ocorre dentro do tempo inativo do aparelho, 2,3. msec. Esta percentagem da reação total que é observada, decresce quando o pH é diminuído. O aumento da velocidade de O_2 off na Fig. 4 sugeriu redução paralela na percentagem de saturação na solução de hemoglobina a baixo pH grafado na Fig. 1. De fato, um grande aumento na velocidade de O_2 off abaixo pH é característico do efeito Root da hemoglobina. A hemoglobina de "Spot" (*Leiostomus xanthurus*) excede de 300 seg^{-1} abaixo do pH 6,0 medido por espectrofotometria de "Stopped flow" (Bonaventura *et al.*, 1976) e de efeito Root de hemoglobina de truta (*Salmo irideus*), deter-

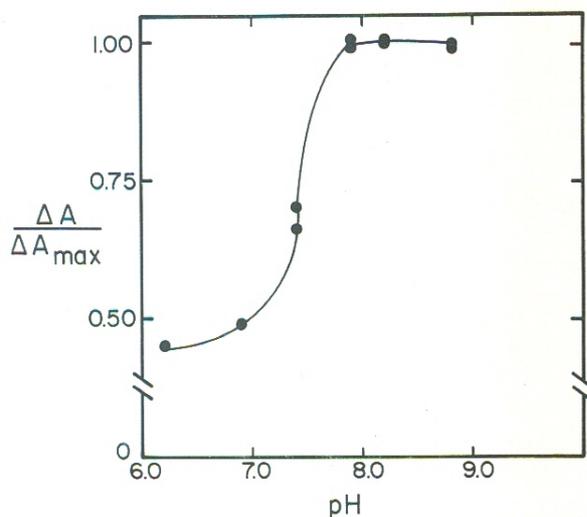


Fig. 4 — Um ploteo de $\Delta A/\Delta A_{\max}$ no tempo zero para a reação de dissociação da hemoglobina do *Prochilodus* em presença de ditronito e 1mM ATP a vários valores de pH. A concentração heme após a mistura foi 3,5 μM . ΔA e a variação absorvância observada em pH acima estudado, ΔA_{\max} e a variação de absorvância medida a pH 8,8 condições são descritas no texto.

O efeito...

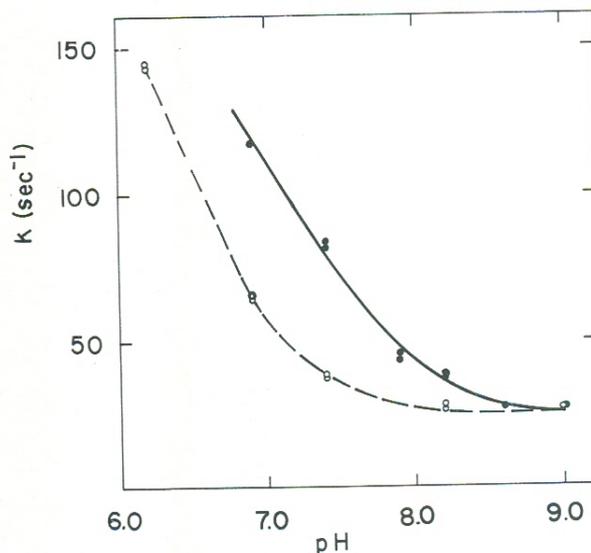


Fig. 5 — A constante de dissociação de primeira ordem (K) para o oxigênio versus pH. O ploteo representa velocidades do segundo quarto da reação. A concentração heme após a mistura foi 3,5 μM . Condições são como as descritas no texto. (O) hemoglobina fracionada de *Prochilodus* (●) hemoglobina fracionada + 1 mM de ATP.

minados por estudos de variações de temperatura, atinge uma velocidade de 1100 sec^{-1} a pH 7,0 (Giardina *et al.*, 1963). Naturalmente a redução na diferença de absorvância máxima abaixo pH pode também surgir como uma consequência da influência do pH na velocidade de O_2 on, o qual não foi determinado nestes estudos.

Dados da dissociação de oxigênio são resumidos na fig. 5. A velocidade de O_2 off foi heterogênea a todos os valores de pH testados. Os gráficos de velocidade representam os obtidos durante o segundo quarto da reação como a velocidade inicial não podia ser avaliada a baixos valores do pH. Estas velocidades de dissociação são ambas sensíveis a pH e ATP.

Entre pH 8,8 e 6,2 a velocidade de O_2 off, aumenta 5,5 vezes na solução fracionada enquanto na presença de 1mM ATP a mudança é 4,5 vezes entre pH 8,8 e 6,7. Sob pH 7,4 a adição de ATP causa um aumento de 2,2 vezes na velocidade de dissociação.

Dados para a reação de combinação de CO são ploteados em função do pH e concentração de ATP, na fig. 6. O processo de combi-

nação foi multifásico a todos os valores de pH estudados. A diferença entre a velocidade inicial e final aumenta com a diminuição do pH. O gráfico de velocidade representa a velocidade inicial da reação. A constante de velocidade de reação de segunda ordem para a união do CO é dependente do pH, mudando 10 vezes entre pH 6,2 e 8,8 na solução da hemoglobina fracionada. A baixo pH 6,2, k' igual a aproximadamente $5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ comparado com $20 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ a pH 6,5 e $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ a pH 6,2 obtidos para a solução de hemoglobina pura de carpa (Noble *et al.*, 1970), e "sport" (Bonaventura *et al.*, 1976) respectivamente. A velocidade de CO_{on} máxima a pH 8,8, é $6,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ e 1mM de ATP exerce um efeito sobre a velocidade CO_{on} a valores de pH intermediário, reduzindo a velocidade de combinação de 41% a pH 7,4.

DISCUSSÃO

O *Prochilodus* constitui um gênero de rio aberto, espécie comedora de lama (Fink & Fink, 1977). Eles gastam grande parte de seu tempo vagando no fundo dos rios. Em outras espécies epibêntica amazônicas (e.g., membro da família dos bagres), as quais requerem flutuações leves negativas para permanecer estacionados no leito do rio, a bexiga natatória está envolvida secundariamente dentro de um órgão emissor e sensível ao som e não sendo mais empregada como um sensor hidrostático (Alexander, 1967). Não obstante o *Prochilodus* possui uma bexiga natatória funcional e hemoglobina que apresentam consideráveis efeitos Bohr e Root, sem aparelho secretor de oxigênio na bexiga natatória, o "rete mirabile" (Bridge & Haddon, 1893). Contudo, igualmente apontado por Farmer *et al.* (1978), está aparentemente relacionado com o aparelho do olho "rete choroide", e este está a miúdo associado com a ocorrência de efeito Root. Num grande efeito Bohr e Root refletem provavelmente a distribuição de diversos *habitat* das espécies.

O sangue total do *Prochilodus* sp. apresenta uma alta afinidade pelo oxigênio a pH 7,6 e 30°C ($p_{1/2} = 4.7 \text{ mm de Hg}$), a alta afinidade que este reportou para 44 fora as 47 espécies de peixes Amazônica por Powers *et al.* (1978), especificamente mais alta que a daquelas es-

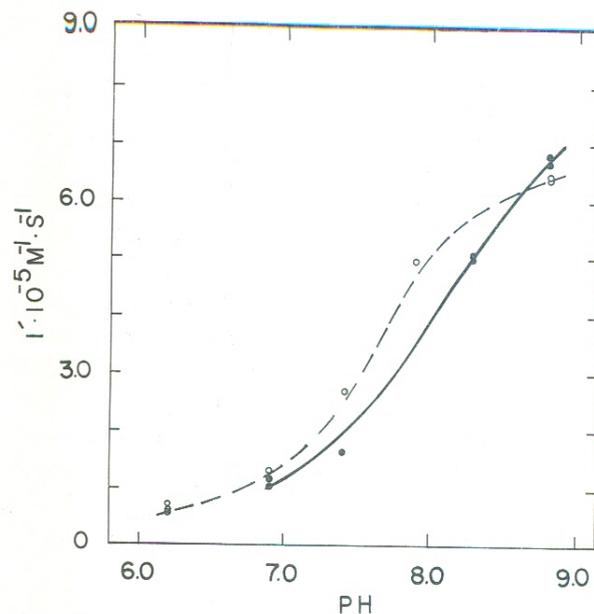


Fig. 6 — Constante de velocidade de combinação de segunda ordem da ligação do monóxido de carbono da hemoglobina do *Prochilodus* (L') a vários valores de pH. Condições são como as descritas no texto. A concentração heme depois da mistura foi de 3,5 μM : Hemolisado fracionado O, hemolisado fracionado + 1 mM ATP ●.

pécies, das quais as hemoglobinas apresentaram efeito "Root" (i. e., *Mylossoma* sp., Martin *et al.*, 1978; *Hoplosternum littorale*, Garlick *et al.*, 1978). De fato, a afinidade é comparável à alcançada por certas espécies de peixes de verão (i. e. *Amia, calva*, Weber *et al.*, 1976; *Protopterus annectans*, Weber *et al.*, 1977; *Lepidosiren paradoxa*, Powers *et al.* 1978) os quais sobrevivem longos períodos enterrados na lama. A alta afinidade pelo oxigênio no eritrócito pode oferecer alguma vantagem fisiológica em condições hipóxicas encontradas em vários *habitats* do *Prochilodus* sp.

O $p_{1/2}$ do sangue a pH 7,6 e 30°C é o maior que o da solução da hemoglobina fracionada + 1mM ATP, medidos a 20°C sob condições similares de pH. A diferença indubitável surge em parte, dadas as diferenças de temperatura e também porque a hemoglobina do eritrócito do peixe pode ser modulada por outros compostos além do ATP (Isaacks *et al.*, 1977).

A heterogeneidade de dados cinéticos e o baixo valor de n , obtidos em experimentos tonométricos abaixo de pH 6,7 indicam que os componentes do sistema de hemoglobina do *Prochilodus* pode ser diferenciado funcionalmente. Entretanto, parte desta heterogeneidade pode ser gerada a partir da não equivalência nas ligações das cadeias α e β a pH baixo. A heterogeneidade funcional intramolecular é conhecida em hemoglobinas de outros peixes, tendo sido relatada para o "spot" (Bonaventura *et al.*, 1976). Truta (Brunori, 1975); *Mylossoma* (Martin *et al.*, 1978) e carpa (Tan. *et al.*, 1973).

Os resultados das experiências de dissociação de oxigênio e combinação do monóxido de carbono estão em boa concordância com os de equilíbrio de oxigênio naquelas mudanças induzidas no K e L' por o pH e fosfato orgânicos são análogos pela influência destes moduladores no $p_{1/2}$ para o oxigênio. O efeito Root da hemoglobina do *Prochilodus* é principalmente mediado através dos efeitos de pH na constante O_2 off, como é o caso das hemoglobinas do "spot", truta e carpa, e a variação em ambas as constantes CO_{on} e O_2 off sujeita ao efeito de fosfatos orgânicos.

No experimento de focalização isoeletrico de Bunn e Riggs (1978) todos os componentes da hemoglobina do *Prochilodus* demonstraram efeito Bohr alcalino. Deste modo, se existe diferença entre a função dos dois componentes, elas podem ser diferença de quantidade e não de qualidade. Este componente pode ser funcionalmente diferenciado e sugerido por uma cinética complexa da ligação do ligante discutida anteriormente. Talvez o sistema do *Prochilodus* represente um estágio intermediário na evolução funcionalmente diversa do sistema hemoglobínico exemplificado pela truta. Estudos adicionais dos componentes purificados da hemoglobina de *Prochilodus* devem revelar um passo da diferenciação estrutural e funcional alcançados por esses dois componentes.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Célia Bonaventura por sua generosa assistência nos experimentos cinéticos. Maurizio Brunori expressa seus agradecimentos ao National Research

Council (C.N.R.) da Itália pela colaboração financeira. Joseph Bonaventura é um pesquisador estabelecido na América Heart Association e gratamente aprovou "grants" para United States National Institute of Health e National Science Foundation. Gostaríamos de agradecer aos oficiais e tripulantes do "Alpha Helix", sem cuja assistência este trabalho não teria sido realizado, e ao governo brasileiro pela permissão para realizarmos pesquisas em suas águas.

SUMMARY

The hemoglobin system of the jaraqui, *Prochilodus* sp., consists of multiple hemoglobin components. The oxidized derivative elutes as a single molecular weight species in gel filtration experiments. The carboxy derivative has an apparent molecular weight of 60,000 as determined by gel filtration. A 44-fold change in $p_{1/2}$ occurs between pH 6.4 and 8.6 in stripped hemoglobin solutions. This change increases to 388-fold over the same pH range in the presence of 1mM ATP. Cooperativity in oxygen binding, as measured by n in the Hill equation, is greater than one at pH values above 6.7 but less than one below this value. The hemolysate displays a Root effect, being only 44% saturated at pH 6.4 in the presence of 1 mM ATP and equilibrated with air at one atmosphere. At 30°C and pH 7.6 the whole blood possesses a low p_{50} , 4.7 mm Hg lower than that of many other Amazonian teleosts. Both the carbon monoxide combination rate and the oxygen dissociation rate are pH and ATP dependent. Between pH 6.2 and 8.8 the CO_{on} rate increases 10-fold. ATP reduces the rate at intermediate pH values. The O_2 off rate increases 2.4-fold between pH 8.8 and 6.7. Addition of 1 mM ATP causes a 4.5-fold increase over the same pH range. The low n values below pH 6.7 and the heterogeneity of the CO combination and O_2 dissociation processes suggests that the hemoglobin components may be functionally differentiated and/or intramolecular differences exist in the kinetic properties of α and β like chains.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, R. MCN.
1967 — *Functional design in fishes*. London, Hutchinson University Library. 160 p.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1971 — *Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands*. North Holland, Amsterdam, 436 p.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J.
1974 — The effects of pH and anions on functional properties of hemoglobins from *Lemur fulvus fulvus*. *J. Biol. Chem.*, 249: 3768-3775.

- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BRUNORI, M.
1976 — Spot hemoglobin. Studies on the Root effect hemoglobin of a marine teleost. *J. Biol. Chem.*, 1871-1876.
- BRIDGE, J. W. & HADDON, G. C.
1893 — Contributions to the anatomy of fishes II. The air bladder and Weberian ossicles in the siluroid fishes. *Phil. Trans. (B)*, 184: 65-434.
- BRUNORI, M.
1975 — Molecular adaptation to physiological requirements: The hemoglobin system ou Trout. *Curr. Topics in Cell Regulation* 9: 1-39.
- BUNN, H. F. & RIGGS, A.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- DAVIS, B. J.
1964 — Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- FARMER, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H. & NOBLE, R. W.
1978 — Ocorrência de hemoglobinas de efeito Root em peixes amazônicos. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- FINK, W. L. & FINK, S. U.
1978 — A Amazônia Central e seus peixes. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; DAVIS, B. J.; FINK, W. L.; GARLICK, R. L. & POWERS, D. A.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- FYHN, H. E. H. & SULLIVAN, B.
1975 — Elasmobranch hemoglobins. Dimerization and polymerization in various species. *Comp. Biochem Physiol.*, 50B: 119-129.
- GARLICK, R. L.; BUNN, H. F.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; MARTIN, J. P.; NOBLE, R. W. & POWERS, D. A.
1978 — Estudos funcionais dos componentes separados da hemoglobina de um bagre de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- GIARDINA, B.; BRUNORI, M.; BINOTI, J.
GIOVENCO, S. & ANTONINI, E.
1973 — Studies on the properties of fish hemoglobins; kinetics of reaction with oxygen and carbon monoxide of the isolated hemoglobin components from trout. *Eur. J. Biochem.*, 39: 571-579.
- HASHIMOTO, D.; YAMAGUCHI, Y. & MATSUURA, U.
1960 — Comparative studies on two hemoglobins of salmon-IV: Oxygen dissociation curves. *BULL. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 26: 827-834.
- ISSACKS, R. R.; 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.
- KROGH, A. & LEITCH, I.
1919 — The respiratory function of blood in fishes. *J. Physiol. Lond.*, 52: 388-300.
- LOWE-McCONNEL, R. H.
1975 — *Fish communities in Tropical Fresh Waters*. London, Longman Group Limited.
- MARTIN, J. P.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; GARLICK, R. L. & POWERS, D. A.
1978 — Isolamento e caracterização dos componentes da hemoglobina de *Milossoma* sp., um teleosteo da Amazônia. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- NOBLE, R. W.; PARKHUST, L. J. & GIBSON, Q. H.
1970 — The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp. *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 245: 6628-6633.
- 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.; GARLICK, R. L.; MARTIN, J. P. WOODS, S.
1978 — Estudo comparativo de equilíbrio de oxigênio no sangue de 40 gêneros de peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8 (4): Suplemento. (Este volume).
- REISCH, E.
1976 — The hemoglobin of fresh water teleost *Hoplias malabaricus*: Heterogeneity and polymerization. *Comp. Biochem Physiol.*, 556: 255-257.
- RIGGS, A. & WOLBACH, B. 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 transition in carp hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 248: 2880-2888.
- WEBER, R. E.; JOHNSEN, K.; LYKKEBOE, G. & MALOY, G. O.
1977 — The oxygen binding properties of hemoglobins from aestivating and active African lungfish. *J. Exp. Zool.*, 199: 85-99.
- WEBER, R. E.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C.
1976 — The hemoglobin of the primitive fish *Amia calva*: Isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. *Biochim. Biophys. Acta.*, 434: 18-31.