

# Equilíbrio e cinética de ligação de oxigênio e monóxido de carbono à hemoglobina de teleósteo *Synbranchus marmoratus* (\*)

Charles Phelps (1); Robert L. Garlick (2); Dennis A. Powers (3); Robert W. Noble (4); Joseph P. Martin (5); Unni E. H. Fyhn (6); Hans J. Fyhn (7)

## Resumo

As hemoglobinas do peixe que respira ar *Synbranchus marmoratus* apresentam componentes múltiplos e demonstram polimorfismo. Foi comparado o equilíbrio de oxigênio com células completas e hemoglobina isolada. Há um efeito Bohr alcalino considerável e este é mais marcado em hemoglobina fracionada à qual tem sido adicionado 1 mM ATP. Foram estudadas as cinéticas de dissociação de oxigênio da combinação de oxiemoglobina e monóxido de carbono, apresentando cursos de tempo cinético surpreendentemente uniformes para um sistema composto de componentes múltiplos. Estes resultados são discutidos dentro do contexto das exigências do animal em um meio ambiente aquático-aéreo misto.

## INTRODUÇÃO

Os órgãos acessórios de respiração aérea tem evoluído para acomodar as diferentes exigências dos vertebrados na transição entre respiração aquática e aérea. Estas adaptações variam grandemente desde as modificações faríngeas até o uso do intestino como depósito e intercambiador de gás, alcançando-se a máxima satisfação no verdadeiro peixe pulmonado Diproano. Os pormenores fisiológicos e anatômicos foram estudados por Johansen (1970).

A enguia sul americana, *Synbranchus marmoratus*, é um importante exemplo de um peixe no qual as guelras têm-se convertido em órgãos de respiração aérea. Vive em águas estagnadas e sabe-se que pode mover-se em terra quando as águas pantanosas retrocedem, onde pode sobreviver estivado durante meses em tocas.

Este trabalho continua a documentação sobre equilíbrio e propriedades cinéticas da hemoglobina em combinação com oxigênio e monóxido de carbono de peixes adaptados ao ar que foi pormenorizado anteriormente para *Lepidosiren paradoxa* (Phelps et al., 1978), descrevendo os atributos da hemoglobina de *Synbranchus marmoratus*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de *Synbranchus marmoratus* foram obtidos de um pescador local em novembro de 1976, durante uma expedição a bordo do R/V "Alpha Helix" no rio Solimões, num local aproximadamente 30 km rio acima da união deste com o rio Negro para formar o Amazonas. A coleta foi feita no final da época seca, quando o nível da água estava no ponto mais baixo em lagos e rios. Os animais (peso corporal 370 — 2000 g) foram mantidos em aquários por períodos de 2-15 dias antes de serem sangrados.

O sangue foi obtido por punção cardíaca de animais esfriados sob gelo com seringas de vidro heparinizadas frias; a preparação de hemolisados, eletroforese de gel de disco (pH 8.9), registro dos geis e eletroforese de gel em dodecyl sulfato de sódio foram realizadas segundo as técnicas de Fyhn et al., (1978).

A preparação de soluções de hemoglobina a partir de eritrócitos lisados e a desnudação (fracionamento) de compostos orgânicos fosfatados, assim como as medições de equilíbrio de oxigênio e cinéticas, foram feitas como descrito por Phelps et al., (1978).

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

(1) — Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster LA1 4YQ, Lancs, U.K.

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

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

(4) — Department of Medicine & Biochemistry, Veterans Administration Hospital, S.U.N.Y., Buffalo, New York 14215.

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

(6) — Institute of Zoophysiology, University of Oslo, Blindern, Oslo 3, Norway.

## RESULTADOS

### EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO COM ERITRÓCITOS INTACTOS

Os resultados da resposta do sangue completo a oxigenação podem ser observados na fig. 1, que contrasta o comportamento de equilíbrio a 30° e pH 7,60 em ausência de CO<sub>2</sub> onde o valor de P<sub>50</sub> é de 8,2 mm Hg com o equilíbrio encontrado a 5,6% V/V CO<sub>2</sub> onde o pH caiu a 7,40 e o valor de P<sub>50</sub> observado foi de 11,4 mm Hg.

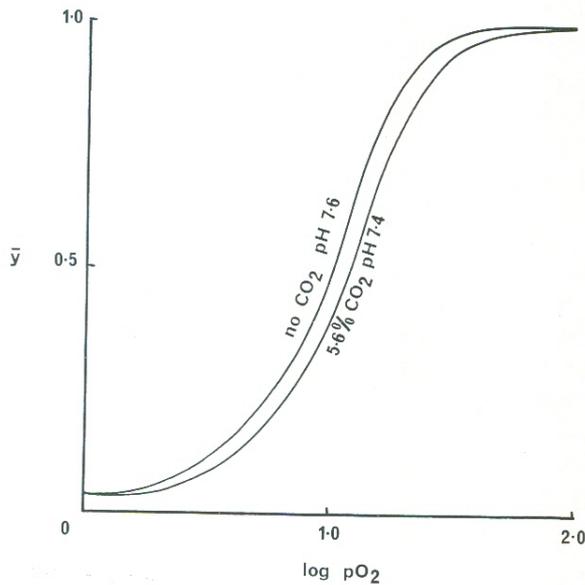


Fig. 1 — Equilíbrio de oxigênio de sangue completo de *Synbranchus marmoratus* determinado na presença e ausência de 5,6% (V/V) CO<sub>2</sub>.

Assim, com sangue completo, há evidência sob estas condições para um efeito Bohr composto, mediado por H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub> com um valor de

$$\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \text{pH}} = - 0,35$$

### ESTUDOS SOBRE HEMOLISADOS

A eletroforese de gel de disco mostrou que os hemolisados de eritrócitos de *Synbranchus marmoratus* são polimórficos. Três fenótipos diferentes foram encontrados e entre as amostras examinadas cada fenótipo foi encontrado em 2 a 3 hemolisados. Repetição das eletro-

foreses deram padrões idênticos. A fig. 2 indica a distribuição dos componentes de hemoglobina nos três fenótipos como mostrado por eletroforese de gel de disco.

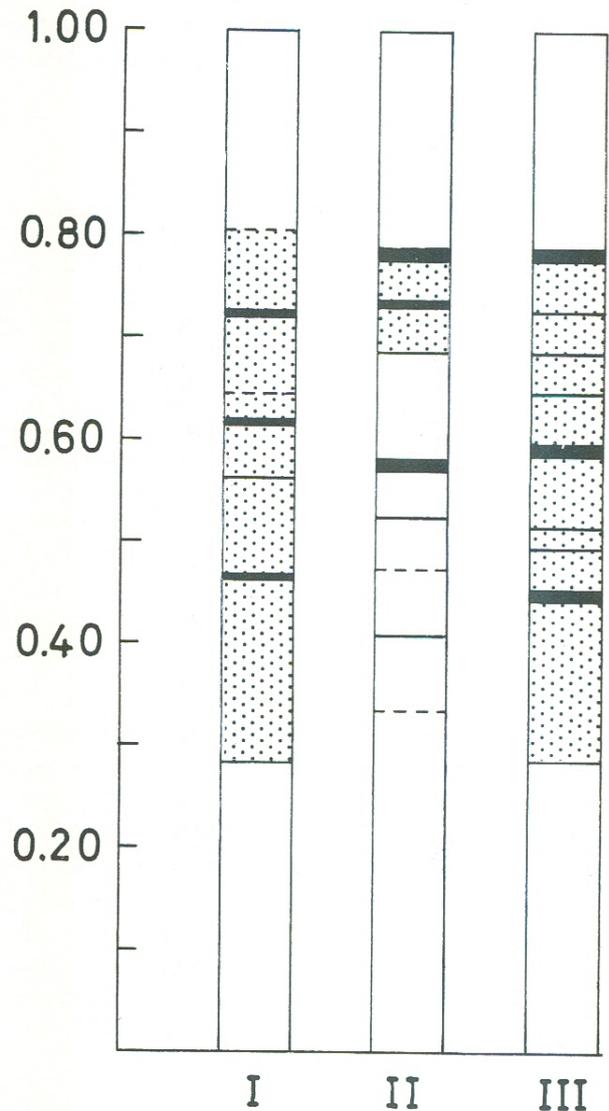


Fig. 2 — Eletroforese em gel de disco de 3 amostras de hemoglobina de eritrócitos de *Synbranchus marmoratus* mostrando o grande e variável número de componentes presentes.

Os componentes mais rápidos em todos os fenótipos apresentaram motilidades relativas acima de 0,70 ao serem comparados com albumina de soro bovino. A maioria dos hemolisados de peixes amazônicos apresentam componentes de hemoglobina com motilidades relativas menores em eletroforese de gel de

disco (Fyhn *et al.*, 1978). A HbA humana tem motilidade relativa de 0,66 I 0,01 (N = 5). Como está indicando a figura, dois dos fenótipos (I e III) estavam pouco nítidos. O aumento da concentração de acrilamida dos *geis* de 7,5 a 10% não melhorou a resolução significativamente. Decalques de densitômetro destes fenótipos não permitiram determinar a resolução de picos individuais.

Por eletroforese de *gel* SDS, notou-se que o peso molecular das cadeias de hemoglobina desnaturizada de *Synbranchus* era de 14.200, o que é similar ao peso molecular das cadeias de hemoglobina desnaturizada no homem (14.600).

O sangue de *Synbranchus* geralmente apresenta valores de hematócrito relativamente altos, variando entre 38 e 82% com média de 57% para 5 amostras.

#### EQUILÍBRIO DE OXIGÊNIO EM SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINA

Os resultados de uma série de experimentos desenhados para mostrar a dependência de pH na curva de equilíbrio de oxigênio para material denudado de fosfatos orgânicos podem ser observados na fig. 3, na qual é contrastado este comportamento com material ao qual tem sido adicionado ATP até uma concentração final de 1 mM. É facilmente observável o fato de que o ATP promove uma afinidade de oxigênio muito diminuída na faixa abaixo de pH 7,5, acima do qual a diferença torna-se marginal. Especialmente notável é o grau de resposta à variação de pH através da faixa fisiológica. Na presença de 1 mM de ATP o efeito Bohr é quatro vezes maior que para hemoglobina denudada, e o expoente de Hill é significativamente maior no primeiro caso. Estas descobertas apoiam a crença geral de que os fosfatos orgânicos estabilizam a conformação deóxi.

A comparação dos dados obtidos de soluções de hemoglobina a 20°C com aqueles obtidos de sangue total a 30°C só pode ser feita largamente, ainda se pode observar os valores de  $P_{50}$  estão mais ou menos de acordo nos dois casos. A magnitude do efeito Bohr em sangue completo a 30°C ( $-0,350$ ) é menor que o valor

obtido a 20° para hemoglobina com 1 mM de ATP; porém, o efeito de CO<sub>2</sub> e temperatura diminuem o valor de qualquer predição.

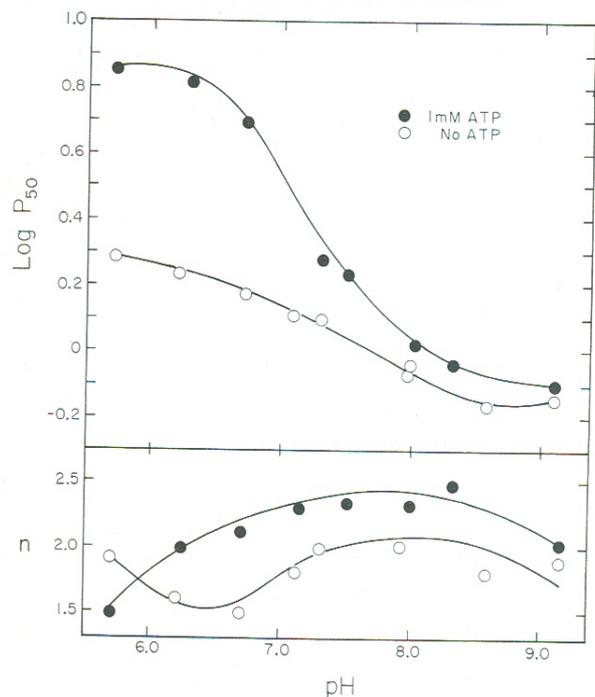


Fig. 3 — Efeitos do pH nos valores  $P_{50}$  de hemoglobina fracionada na ausência (O) e presença de 1 mM ATP (●) são mostrados na parte superior do gráfico. Embaixo, a resposta de  $n$  dos dois sistemas à mudanças de pH

#### CINÉTICA DE DISSOCIAÇÃO E COMBINAÇÃO DO LIGANTE GASOSO

A cinética de dissociação do oxigênio da hemoglobina foi medida através da faixa fisiológica de pH e deu valores para a constante de primeira ordem como se pode observar na Fig. 4 (a) onde são documentados os dados para soluções de hemoglobina livre com e sem adição de 1 mM de ATP; numa série similar de experimentos a velocidade de combinação da deoxiemoglobina com monóxido de carbono foi estudada com os resultados apresentados na fig. 4 (b).

O resultado cinético mais significativo é possivelmente a observação de que todas as reações examinadas foram cineticamente homogêneas, ou seja, exibiram percursos de tempo que podem ser descritos como uma única constante de velocidade. Em vista do

grande número de componentes de hemoglobina detectados em electroforeses do hemolisado de *Synbranchus*, isto é surpreendente e sugere que estes componentes devem apresentar propriedades funcionais semelhantes.

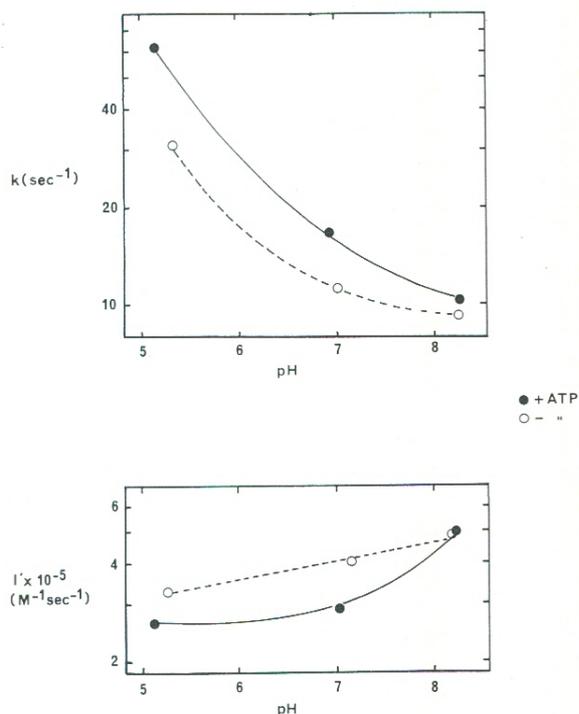


Fig. 4: a) — Efeito de pH e ATP na velocidade de dissociação de oxigênio de soluções fracionadas de oxiemoglobina de *Synbranchus marmoratus*; b) — Mudança na constante de velocidade de dissociação para CO com deoxiemoglobina fracionada de *Synbranchus marmoratus*.

As dependências de pH destas duas reações a 20°C são apresentadas tanto na presença quanto ausência de 1 mM de ATP é em todos os casos na direção prevista em base ao seu efeito sobre afinidade dos ligantes. O efeito diminuiu até quase zero quando o pH foi aumentado acima de 8. As dependências de pH não são notáveis, sendo mais ou menos as esperadas para uma hemoglobina com efeito Bohr normal. Além disto, as constantes de velocidade são similares às reportadas para hemoglobina humana (Antonini & Brunori, 1971).

## DISCUSSÃO GERAL

*Synbranchus marmoratus* mora em águas estagnadas de pântanos da América do Sul. Este peixe pode movimentar-se em terra e estiver durante vários meses em tocas profundas em solos úmidos. Quando confinado às águas estagnadas de aquários, o peixe respira ar intermitentemente em forma cíclica, uma vez cada 15-30 minutos. Tem-se demonstrado que *Synbranchus* utiliza suas guelras como órgãos modificados de respiração aérea (Carter & Beadle, 1931; Johansen, 1966). Estes órgãos são excepcionalmente grandes e as lamelas apresentam pregas secundárias extraordinariamente desenvolvidas, sugerindo um aumento na eficiência do epitélio para realizar intercâmbio respiratório.

A capacidade do sangue deste peixe para criar uma homeostase apropriada de utilização de oxigênio sob uma ampla gama de pressões ambientais à qual é exposta precisa de maior comentário. Johansen (1966) estudou a fisiologia da respiração aérea de *Synbranchus*. A extração de oxigênio da água circundante não parecia ser eficiente, sendo que um prolongado e vigoroso bombeamento branquial de água não conseguiu elevar a saturação arterial de oxigênio até mais de 50-60%. Porém, quando a câmara da guelra foi inflada, a oxigenação arterial foi quase total. Isto sugere uma especialização no epitélio branquial que favorece um intercâmbio fase gasoso-arterial sobre intercâmbio em solução.

Johansen (1966) também asseverou que o meio ambiente natural de pântano destes peixes favorece altos níveis de  $\text{CO}_2$ , e que o problema respiratório básico é otimizar a extração de oxigênio de um meio pobre em oxigênio, eliminando ao mesmo tempo  $\text{CO}_2$  em um meio rico em  $\text{CO}_2$ . Os dados de Willmer (1934) sugerem que os habitats pantanosos têm  $\text{PO}_2$  numa faixa de 5-55 mm Hg e  $\text{PCO}_2$  entre 16-32 mm de Hg respectivamente. Foi sugerido então que os órgãos de respiração basicamente aquáticos continuassem servindo à segunda função, enquanto que a maioria dos peixes de respiração tem modificado outro órgão para manter respiração aérea. *Synbranchus marmoratus* utiliza as guelras para isto. Fica claro, então, que a necessidade maior de *Syn-*

*branchus* é a provisão de meios moleculares ou fisiológicos através dos quais este intercâmbio de duas vias pode intervir.

As propriedades de equilíbrio e cinéticas da hemoglobina deste peixe como ligantes gasosos não são excepcionais. Demonstram um efeito Bohr significativo e uma forte dependência ao ATP. O que é surpreendente é que um peixe com componentes de hemoglobina manifestamente múltiplos não apresenta divisão aparente de função bioquímica dentro delas das maneiras que tem sido vista no caso de algumas hemoglobinas (Brunori, 1975; Riggs, 1970).

Há confiança razoável em que o equilíbrio de oxigênio do eritrócito pode ser substancialmente reconstruído com criteriosa mistura de hemoglobina fracionada com ATP propício a um pH requerido em um sistema "in vitro", e deve-se concluir que muito do controle dos processos de respiração aérea e aquática (e a passo de uma a outra) refere-se à regulação fisiológica de fluxo sanguíneo e comportamento arterial, mais que mudanças específicas dos transportes moleculares.

As demandas respiratórias especiais impostas no animal por estivação poderiam ser resolvidas modulando os níveis de ATP presentes no eritrócito como foi mostrado por Johansen *et al.*, (1976) para a ligação de GTP à hemoglobina em animais despertos e estivando do peixe pulmonado africano (*Protopterus amphibios*). É pertinente citar Krogh & Leitch (1919):

A adaptação do sangue de peixes deve ser causada por alguma substância ou substâncias presentes na hemoglobina dentro dos corpúsculos e queremos assinalar o significado de a hemoglobina estar envolvida nos corpúsculos por uma membrana semipermeável. Deste modo, só é assegurado o ambiente mais propício para a função respiratória da hemoglobina nesse organismo em particular.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela bolsa PCM-06451 da National Science Foundation para estudos a bordo do R/V "Alpha Helix".

Agradecemos aos brasileiros pela sua ajuda e por possibilitar o acesso do R/V ao rio Solimões. Queremos agradecer ao Capitão Clarke e tripulação pela cooperação. Apoio adicional foi dado pelo Conselho de Pesquisas para Ciências e Humanidade da Noruega (H. J. e U.E.H F.), bolsa do NSF DEB-76-19877 (D.A.P.), bolsa NIH HL-15460 (a J. Bonaventura para o apoio de M.F.) e bolsa NSF PCM 76-06719 (a A. Riggs).

#### SUMMARY

The haemoglobin of the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa* has a single component. The equilibria of this respiratory protein with oxygen have been investigated both in the blood and with the purified haemoglobin. There is a substantial, normal, alkaline Bohr effect and marked sensitivity to organic phosphates in the haemoglobin solutions. Studies on the pH dependence of the kinetics of oxygen dissociation can be interpreted in terms of a normal Bohr effect. The kinetics of combination of carbon monoxide have an unusual pH dependence. These findings are discussed in terms of the two state model of Monod, Wyman and Changeux (1965).

#### BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.  
1971 — Haemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands Chapt. 10.
- BRUNORI, M.  
1975 — Molecular adaptations to Physiological Requirements: the Hemoglobin system of Trout. *Current Topics Cellular Regulation.*, 9: 1-39.
- CARTER, G. S. & BEADLE, L. C.  
1931 — The fauna of the Swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environment — II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linn. Soc.*, 37: 327-365.
- 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(5): Suplemento. (Este volume).
- JOHANSEN, K.  
1966 — Air breathing in the teleost *Synbranchis marmoratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 18: 383-395.

- JOHANSEN, K.; LYKKEBOE, G. WEBER, R. E. & MALOIJ, G. M. O.**  
1976 — Respiratory properties of blood in awake and estivating lungfish, *Protopterus amphibius*. *Resp Physiol.*, 27 : 335-345.
- KROGH, A. & LEITCH, I.**  
1919 — The respiratory functions of the blood in fishes. *J. Physiol.* (London), 52 : 288-300.
- PHELPS, C.; FARMER, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H. & GARLICK, R. L.**  
1978 — Equilíbrio e cinética de união de oxigênio e monóxido de carbono à hemoglobina do peixe pulmonado sul-americano *Lepidosiren paradoxa*. *Acta Amazonica* 8 (4) : Suplemento. (Este volume).
- RIGGS, A.**  
1970 — Properties of Fish Hemoglobins. In: *Fish Physiology* (W. S. and D. J. Randall, eds.), 4 : 209-252.
- WILLMER, E. N.**  
1934 — Some observations on the respiration of certain tropical freshwater fish. *J. Exptl. Biol.*, 11 : 283-306.