

Propriedades das hemoglobinas isoladas de artrópodos e moluscos do rio Amazonas (*)

Joseph Bonaventura (1); Maurizio Brunori (2); Michael T. Wilson (3); Joseph P. Martin (1); Robert L. Garlick (4); Bonnie J. Davis (5)

Resumo

Hemocianinas de 4 organismos habitantes do rio Amazonas foram isoladas e parcialmente caracterizadas. Três espécies de artrópodos (*Dilocarcinus pagei cristatus*, *Silviocarcinus pardalinus* e *Macrobrachium amazonicum*) possuem hemocianinas cujas estruturas das subunidades são provavelmente simples. Eletroforese regular e eletroforese SDS em disco de poliacrilamida revelaram predominantemente bandas simples e nenhum polimorfismo. O experimento de ligação do oxigênio mostrou que as 3 hemocianinas dos artrópodos possuem um grande efeito Bohr e dependência do pH no grau de interações das subunidades. A hemocianina do molusco *Pila* sp. foi estudada e o tamanho de sua subunidade parece similar à das outras hemocianinas dos moluscos, i.e., polipeptídeo 400.000 dalton. Na de hemolinfa do molusco *Pila*, provavelmente existe uma mistura de agregados de 100S a 124S. As propriedades das ligações do oxigênio das grandes moléculas da hemocianina de *Pila* sp. são notáveis por sua baixa cooperatividade e perda da forte dependência do pH.

INTRODUÇÃO

Hemocianinas são proteínas de alto peso molecular ligando oxigênio, que ocorrem em dois filos, Arthropoda e Mollusca. Estas proteínas possuem cobre em seu sítio de ligação de oxigênio e mostram uma estequiometria de cobre para oxigênio de 2 para 1.

Diversas publicações têm aparecido sobre as relações de estrutura e função como também o papel fisiológico das hemocianinas (Redmond, 1968; Van Holde & van Bruggen, 1971; Lontie & Witters, 1973; Antonini & Bru-

norri, 1974; Bonaventura *et al.*, 1975; Bonaventura *et al.*, 1977). É digno de nota que as hemocianinas dos Artrópodos e Moluscos são estruturalmente diferentes e características. As hemocianinas dos artrópodos são compostas de subunidades com peso molecular variando de 70 a 80.000 daltons. Existem evidências de que seja significativa a carga de heterogeneidade das subunidades de alguns artrópodos (Sullivan *et al.*, 1974, Bonaventura *et al.*, 1975, Sullivan *et al.*, 1976, Bonaventura *et al.*, 1977). A forma molecular encontrada na hemolinfa dos artrópodes consiste em estados de agregação nos quais, hexâmeros, dodecâmeros, 24-mêros e 48-mêros são intermediários estáveis. As hemocianinas dos moluscos apresentam alguns contrastes quando comparadas à proteína dos artrópodos. As subunidades são muito grandes, 350 a 400.000 daltons, com múltiplos sítios de ligação de oxigênio. Estes são arranjados no distinto domínio de 50.000 unidades dalton (Lontie *et al.*, 1973, Brouwer *et al.*, 1976). Cada faixa possui 2 átomos de cobre e pode ligar uma molécula de oxigênio. Na hemolinfa, a forma da molécula é tipicamente de 20-mero, havendo um peso molecular de cerca de 9×10^6 .

Uma considerável quantidade de informações tem sido acumulada sobre hemocianinas de moluscos habitantes de zonas temperadas (Bonaventura *et al.*, 1977, observações não publicadas de Celia e Joseph Bonaventura). Nas hemocianinas dos artrópodos, heterogeneidade das subunidades e polimorfismo parecem ser comuns. Estudos do comportamento ele-

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

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

(2) — Instituto di Chimica Biologica, Centro di Biologia Molecolare, Citta Universitaria, 00185 Rome, Italy.

(3) — Department of Chemistry, University of Essex, Wivenhoe Park, Colchester CO4 3SQ, England.

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

(5) — Department of Biology, San Francisco State University, San Francisco, California 94132.

troforético das hemocianinas dos caranguejos do Panamá e Venezuela sugerem que existe um pequeno polimorfismo das subunidades nas espécies examinadas (B. Sullivan, H.J. Fyhn e U.E.H. Fyhn, observações não publicadas).

Os organismos do rio Solimões habitam um ambiente muito especial. A água é temperada $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o ano (Fisher, 1978). Estes organismos têm um problema adicional de sobrevivência na água com baixo conteúdo de oxigênio dissolvido. Nós estávamos, portanto, interessados em caracterizar as hemocianinas de organismos habitantes deste ambiente e comparar suas propriedades com outras hemocianinas conhecidas.

MÉTODOS E RESULTADOS

PEQUENO CARANGUEJO VERMELHO

O pequeno caranguejo vermelho, *Dilocarcinus pagei cristatus* (Bolt, 1969) (6) foi fornecido por um pescador local. Não conseguimos saber exatamente o local de captura. Hemolinfa foi obtida do sinus pedal. A hemolinfa foi gotejada dentro de um tubo de ensaio e posteriormente coagulada à temperatura ambiente. O coágulo foi mecanicamente dispersado e diluído com 0,1M Tris, 0,01M CaCl_2 , pH8. Depois de 10 minutos de centrifugação a 18.000 RPM numa Sorval, recolheu-se o sobrenadante contendo a hemocianina. No experimento destinado a observar as subunidades polimórficas, 50 μl do sobrenadante foi adicionado a 200 ml 0,1M Tris, 0,1M EDTA pH 9. Uns poucos microlitros desta solução foram usados para eletroforese regular e eletroforese em gel de SDS.

Eletroforese em gel de regular disco de 12 indivíduos do pequeno caranguejo vermelho mostraram que não há polimorfismo detectável das subunidades (Ornstein, 1964, Davis, 1964). Adicionalmente, contrastando com muitas das hemocianinas dos artrópodos, existem notavelmente poucos tipos de subunidades. De fato, o pequeno caranguejo vermelho pare-

ce ter um único e predominante tipo de subunidade. Eletroforese gel SDS (Weber & Osborne, 1969) mostrou que existe homogeneidade com respeito ao peso molecular das subunidades da hemocianina do pequeno caranguejo vermelho, i.e. uma única e pronunciada banda na eletroforese de disco SDS-gel com peso molecular de cerca de 75.000. Baseando-se nas condições eletroforéticas e da altíssima mobilidade das bandas eletroforéticas das hemocianinas dos artrópodos estudados, inferimos que elas são verdadeiramente subunidades de 75.000 daltons. Desde que os experimentos de ultra-centrifugação não foram realizados sob condições eletroforéticas, não podemos excluir a possibilidade de que as bandas que temos chamado de subunidades não sejam hexâmeros. Esta possibilidade, contudo, é muito improvável.

Os dados de ligação de oxigênio do pequeno caranguejo vermelho estão apresentados na Fig. 1. Esta hemocianina apresenta efeitos homo e heterotrópicos. Acima do pH examinado, o plotado de Hill apresenta valores para $n_{1/2}$ de 2 a 3. Os dados sugerem que a hemocianina é mais cooperativa a pH 7 e 8 do que a valores maiores ou menores. Há um forte e positivo efeito Bohr, com $\Delta \log P_{1/2} / \Delta \text{pH}$ de $-0,8$ entre pH7 e 8.

Ultracentrifugação da hemocianina do pequeno caranguejo vermelho a uma força iônica de 0.1 Tris, 0,01M CaCl_2 pH 8, deu 1 pico de 14S "schlieren" com indicações de uma pequena quantidade de produtos de dissociação e associação para a esquerda e direita do limite. O experimento ultracentrifugação indica que a espécie molecular predominante sob as condições da fig. 1 é o hexâmero.

PEQUENO CARANGUEJO MARROM

Hemocianina do pequeno caranguejo marrom *Sylviocarcinus pardalinus* (Gerstaecker, 1956) (6) foi isolada e tratada de maneira análoga àquela em que foi tratado o pequeno caranguejo vermelho.

(6) — Abreviaturas usadas: EDTA, ácido etilendiaminotetraacético bis-tris, bis (2-hidroxietil) imino-tris (hidroximetil) metano; $p_{1/2}$, a pressão do oxigênio expressa em milímetros de mercúrio, requerida para saturar a metade dos sítios da ligação do oxigênio da hemocianina; $n_{1/2}$, a inclinação do plotado de Hill para ligação de oxigênio medido a $p_{1/2}$; SDS, dodecilulfato sódico.

A eletroforese em *gel* regular de disco de 8 indivíduos do pequeno caranguejo marrom não mostraram variações detectáveis de um indivíduo para outro, sugerindo uma ausência de subunidades polimórficas. Igualmente, o *gel* SDS mostrou uma única banda do material, havendo um aparente peso molecular de cerca de 75.000.

Propriedades de ligação do oxigênio desta hemocianina são mostradas na Fig. 2. O efeito Bohr da hemocianina do pequeno caranguejo

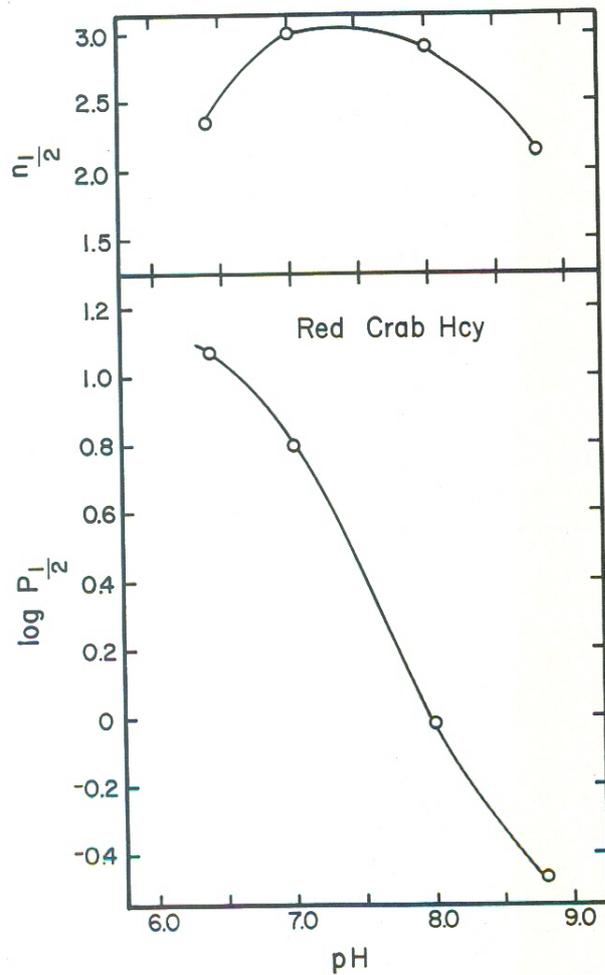


Fig. 1 — A dependência do pH da ligação do oxigênio da hemocianina de *Dilocarcinus pagei cristatus*. Experimentos realizados usando o processo tonométrico de Riggs & Wolbach (1956). Experimentos realizados em 0,05 M Bis-Tris (valores de pH 7,0 para baixo) e Tris (Valores de pH acima de 7,0) com tampão contendo 10 mM de cálcio. Experimentos realizados a 20°C. Valores para a porcentagem de saturação da hemocianina com oxigênio foram calculadas do espectro de absorção coletado sobre o comprimento de onda de 400 a 450 nm.

Propriedades das...

marrom e do pequeno caranguejo vermelho são muito semelhantes. Somente ao redor de pH 9 é que a afinidade do oxigênio é diferente ($P_{1/2} = 0,49$ mm Hg para a hemocianina do pequeno caranguejo marrom e 0,34 mm Hg para a hemocianina do pequeno caranguejo vermelho). Outras diferenças nas duas hemocianinas são aparentes se examinarmos o efeito do pH sobre a cooperatividade da ligação do oxigênio pelas duas hemocianinas. No caso do pequeno caranguejo marrom, aumentando o pH decresce a cooperatividade da hemocianina da ligação do oxigênio.

Ultracentrifugação da hemocianina do pequeno caranguejo marrom em força iônica 0,1; 0,01M CaCl_2 pH 8 mostrou dois picos "schlieren" simétricos aparecendo valores de 15 e

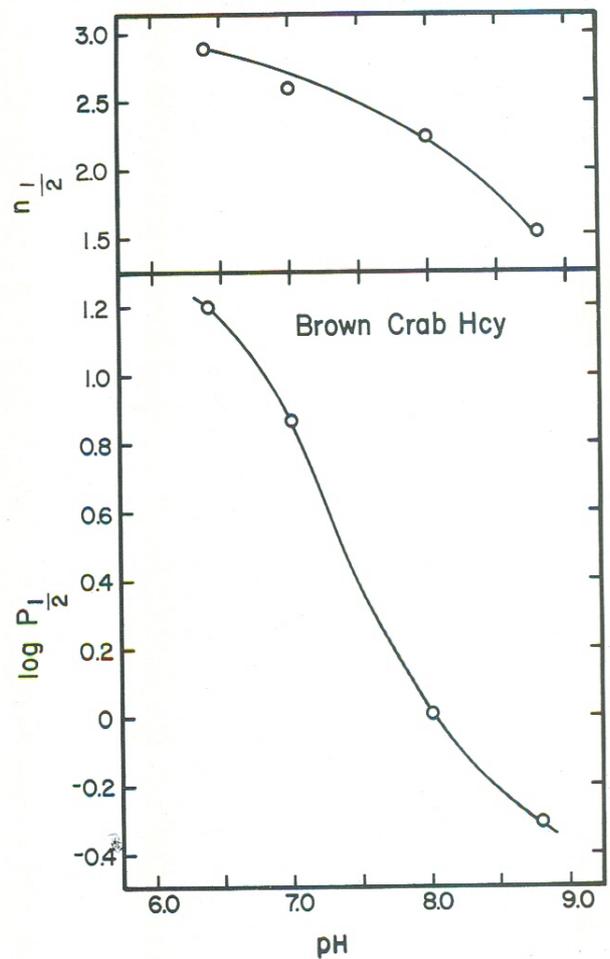


Fig. 2 — A dependência do pH da ligação de oxigênio da hemocianina de *Sylvioarcinus pardalinus*. Experimentos realizados sob condições idênticas àsquelas da fig. 1.

22,3S. O pico 15S corresponde à espécie molecular da qual faz parte o hexâmero. Seu total é cerca de 70% do total do material presente sob estas condições. O pico 22,3S provavelmente corresponde ao dodecâmero. Sua quantidade é de cerca de 30% do material presente.

HEMOCIANINA DE CAMARÃO

Um camarão do capim flutuante do Amazonas, *Macrobracium amazonicum* foi coletado com a técnica de Rapiché. A elevação da água do paraná que conecta o lago Janauacá e o rio Solimões cobre áreas com vegetação flutuante que aparentemente proporciona refúgio para estes camarões. Mergulhando-se a rede por baixo do capim flutuante obtínhamos muitos camarões que variavam entre 1 a 3 cm de comprimento. Obtivemos a hemolinfa inserindo um tubo capilar através da junção entre o tórax e a cauda, diretamente sobre o coração. A quantidade de hemolinfa obtida de cada camarão foi pequena (de 10 a 50 μ l). Para a maioria dos estudos, a hemolinfa foi reunida e deixada coagular. O coágulo foi então disperso mecanicamente e diluído com um volume aproximadamente igual de 0,1M Tris pH8 contendo 0,01M de CaCl_2 . A mistura resultante foi centrifugada e o sobrenadante foi conservado para os estudos subseqüentes. Nos experimentos destinados a observar a variabilidade eletroforética, amostras individuais de hemolinfa foram obtidas e sopradas em uma película de "parafilm". Quatro a cinco volumes de 0,10M Tris, 0,1M EDTA foram adicionados às amostras individuais de hemolinfa. A solução resultante foi então retirada com um tubo hematócrito, fechado e centrifugado por 5 minutos. Uns poucos microlitros desta solução foram usados para eletroforese. Preparações eletroforéticas de 8 indivíduos não mostraram nenhuma evidência de polimorfismo. O padrão do disco regular do *gel* eletroforético foi muito simples, uma banda rápida principal correspondendo a uma só espécie molecular, presumivelmente correspondendo a subunidades de hemocianina. Somando-se à banda rápida, havia uma banda lenta que provavelmente correspondia a hexâmeros de subunidades de baixo peso molecular. *Gel* de SDS mostrou uma banda difusa, provavelmente duas vezes

mais intimamente bandeadas e com um peso molecular de 75.000.

Ligação de oxigênio nas hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas na presença de 0,01M CaCl_2 está mostrada na Figura 3. A hemocianina é fortemente dependente do pH. O valor $p_{1/2}$ é 120,2mm Hg a pH 6,82 e cai a 2,5 mm Hg a pH 9! Por toda essa faixa de pH, a ligação de oxigênio é cooperativa, com valores de $n_{1/2}$ próximo de 3. Na ausência de cálcio, com pH 9,05, a afinidade do oxigênio é menor, com $p_{1/2}$ de 4,7 mm Hg. A cooperatividade observada na presença de cálcio é perdida na ausência de cátions divalentes ($n_{1/2} = 1$). Sob estas condições, a molécula é provavelmente dissociada em monômeros desde que pH alto e EDTA são geralmente efetivos em dissociar hemocianinas. Conseqüentemente, suspeitamos que os monômeros das hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas possam ser não cooperativos na ligação do oxigênio e têm uma baixa afinidade de oxigênio.

As cinéticas de dissociação do oxigênio da hemocianina dos camarões do Amazonas foram estudadas com uma técnica de combinação rápida descrita em (Bonaventura *et al.*, 1974). A dissociação do oxigênio das hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas é autocatalítica na presença de 0,01M CaCl_2 , a pH 8,9 com velocidades de 27 sec^{-1} a 43 sec^{-1} . A reação é também autocatalítica a pH 7,5 com velocidade de 55 sec^{-1} a 95 sec^{-1} . Uma grande parte da reação é perdida a pH 6,9, mas naquelas que foram observadas, a taxa foi cerca de 170 seg^{-1} . Ultra centrifugação da hemocianina destes camarões, como também o oxiderivado na presença CaCl_2 , mostraram que a espécie predominante foi o hexâmero 16S, com pequena quantidade de dodecâmero 23S.

HEMOCIANINA DE PILA SP

O grande caracol, *Pila* sp. foi coletado por um pescador local. Hemolinfa foi obtida do "sinus pedal". A hemolinfa foi então passada através de uma coluna Sephadex G-25 equilibrada com 0,001M Tris, 0,01M Ca^{2+} pH 8.0 equilíbrio do oxigênio foi medido com as ali-

bis-tris ou Tris, de maneira que a absorbância quotas desta amostra diluindo-as com tampão do derivado oxigenado a 340 nm foi cerca de 0,6 e a força iônica final do tampão foi 0,10.

A hemoglobina de *Pila* sp. foi eletroforizada em gel regular de poliacrilamida 7,5% e em gel SDS. O pigmento não penetrou no gel regular de poliacrilamida e penetrou levemente no gel de SDS. Existe alguma indicação de proteínas com mais baixos pesos moleculares, mas estas representaram somente uma pequena fração do total das proteínas presentes no

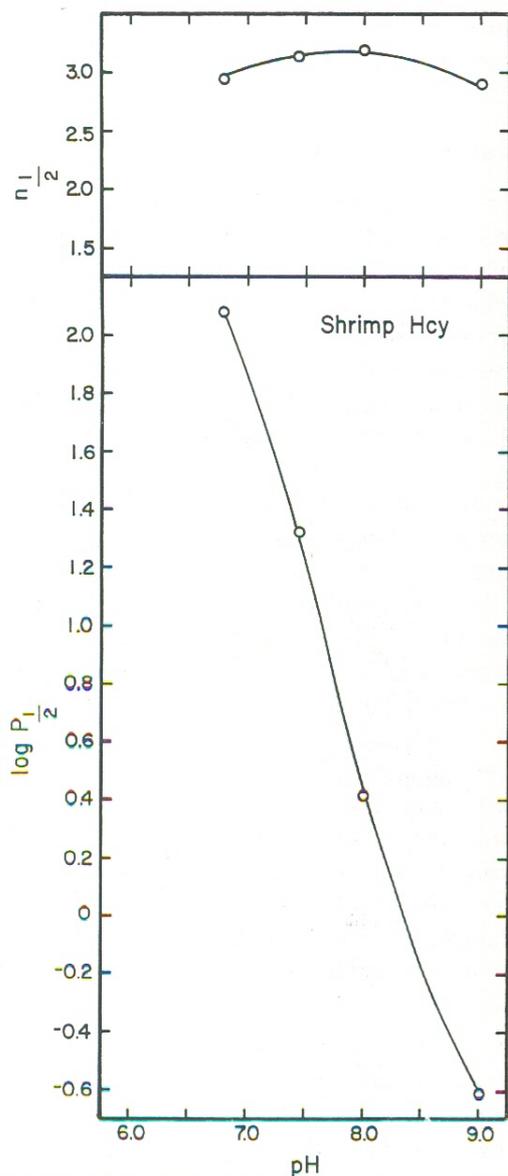


Fig. 3 — A dependência da ligação do oxigênio da hemocianina de *Macrobrachium amazonicum*. Condições experimentais idênticas às das fig. 1 e 2.

gel. Nós não temos marcadores de pesos moleculares para proteínas cujas subunidades sejam tão grande quanto às das hemocianinas dos moluscos (cerca de 400.000 daltons).

Entretanto, nossos resultados indicam que as subunidades da hemocianina de *Pila* sp. são também grandes, estando os pesos moleculares na ordem de várias centenas de milhares de daltons.

Sob todas as condições examinadas, existe pouca dependência do pH ou cooperatividade nas ligações do oxigênio das hemocianinas de *Pila* sp. Abaixo do pH 7,6, existe um pequeno e negativo efeito Bohr, $\Delta \log p_{1/2}/\Delta \text{pH} = 0,1$. Na faixa de pH entre 7,6 a 9, existe um pequeno e positivo efeito Bohr, $\Delta \log p_{1/2}/\Delta \text{pH} = 0,05$. A cooperatividade das ligações de oxigênio medidas por $n_{1/2}$, alcançam o valor máximo de 1,8 a pH 7,6 e em pH menor o valor de $n_{1/2}$ tende à unidade.

Na presença de 0,01M EDTA, a qual serve de quelantes para cátions divalentes, a afinidade do oxigênio da hemocianina do *Pila* sp. é aumentada. Isto é provavelmente um reflexo da diferença na afinidade do oxigênio das subunidades da hemocianina de *Pila* sp. relativa as moléculas totais. Sob estas condições a

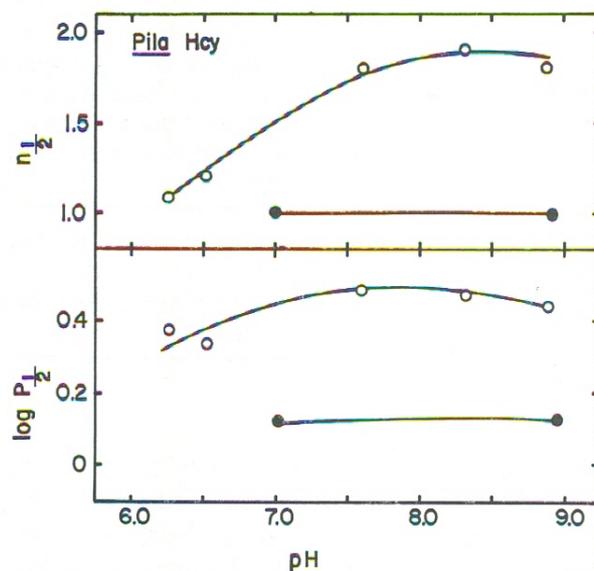


Fig. 4 — A dependência do pH da ligação do oxigênio da hemocianina de *Pila* sp. Experimentos realizados usando métodos similares aos das fig. 1-3. Os experimentos da fig. 4, entretanto, foram feitos a 29°C.

pH 7,0 e 8,9, a ligação de oxigênio é não cooperativa e a pressão do oxigênio necessária para meia saturação é 1,3 mm Hg.

A ultracentrifugação da hemocianina de *Pila* sp deu resultados não esperados. Em $I = 0,1$ Tris, 10 mM $CaCl_2$, pH 8, duas distintas bandas apareceram. Os dois picos apresentaram coeficientes de sedimentação de 100S a 124S. Existe alguma indicação de uma pequena quantidade de grandes agregados. O pico 124S e picos maiores não são típicos de hemocianina de moluscos.

TABELA 1 — Ultracentrifugação das Hemocianinas dos organismos do rio Solimões em $I = 0,1$ Tris, 0,01M $CaCl_2$ pH 8.

Organismo	Espécies Sedimentados e suas Prováveis Identidades
<i>Pila</i>	100S ("molécula inteira") 124S ("1,5 molécula") Tendência para aumentar — ordem de agregação
Camarão do capim flutuante	16S (hexâmero) 23S (dodecâmero, presente em pequena quantidade)
Pequeno caranguejo vermelho	14S (hexâmero) Apareceram indicações de uma pequena quantidade de dissociação e produtos de associação para a esquerda e direita do pico schlieren
Pequeno caranguejo marrom	15S (hexâmero, 70% do total) 23.3S (dodecâmero, 30% do total)

A hemocianina de *Pila* também corre na ultracentrífuga sob condições usadas para diferenciar entre hemocianina $\alpha - \beta$ (Van Holde & van Bruggen, 1971). Em acetado 0,1M, pH 5,7, três espécies sedimentares foram observadas com coeficientes de sedimentação de 76S, 100S e 113S. No mesmo tampão com 1M NaCl três espécies sedimentares de coeficientes comparáveis foram observadas. A

perda de dissociação sob estas condições indica que todas estas hemocianinas são do tipo β . Experimentos de ligação de oxigênio foram também realizadas sob estas condições. No tampão acetato não contendo NaCl, e $p_{1/2}$ e $n_{1/2}$ foram 2,3 e 1,0 respectivamente. No mesmo pH, mas na presença de 1,0M NaCl, os valores $p_{1/2}$ e $n_{1/2}$ foram 3,24 e 1,0, respectivamente. Em acetato a 0,1M pH 5,7 a taxa de dissociação de oxigênio da hemocianina de *Pila* sp é homogênea com a constante de velocidade de primeira ordem de 11 sec^{-1} . Quando o mesmo tampão é feito 1M em NaCl, a reação permanece homogênea, mas a velocidade aumenta ao redor de 24 sec^{-1} .

DISCUSSÃO

As hemocianinas dos artrópodos provenientes do rio Solimões foram notáveis pela relativa simplicidade de suas subunidades e a aparente perda de subunidades polimórficas. Um grande número de hemocianinas examinadas mostraram grandes diversidade de subunidades (i.e. muitos componentes eletroforéticos) e polimorfismo (Bonaventura *et al.* 1977). Ou seja, diferentes padrões de subunidades eletroforéticas são encontradas quando diferentes indivíduos da mesma espécie são examinados. Tem sido proposto que a diversidade das subunidades das hemocianinas e hemoglobinas e polimorfismo podem ser correlacionados com a instabilidade termal do ambiente (Bonaventura *et al.* 1975). Embora nossas observações não provem isto, elas cedem evidências para essa proposta. Apoio adicional vem dos estudos de eletroforese de hemoglobina (Fyhn *et al.*, 1978) já citado neste trabalho. As águas do rio Solimões onde o "Alpha Helix" estava ancorado são certamente termicamente estáveis. A variação de temperatura não é maior que 1°C ao longo do ano (Fisher, 1978).

O pequeno caranguejo vermelho *Dilocarcinus pagei cristatus*, e o pequeno caranguejo marrom *Sylviocarcinus pardalinus* são ambos do mesmo tamanho e provavelmente habitam áreas similares. Existem pequenas mas significativas diferenças nas propriedades funcionais de suas hemocianinas. Cooperatividade na ligação de oxigênio da hemocianina de *D.*

pagei cristatus é relativamente baixa a baixos e altos valores de pH. Cooperatividade na ligação de oxigênio da hemocianina de *S. pardalinus* é alta a pH baixo e decresce monotonicamente quando o pH aumenta. Em pH 8, na presença de cálcio, a hemocianina *D. pagei cristatus* está preponderantemente na forma de 14S hexâmeros, enquanto a hemocianina de *S. pardalinus* em 1 tampão comparável é cerca de 70% hexamérica e 30% dodecamérica.

A hemocianina do camarão do capim flutuante, *Macrobrachium amazonicum*, é notável por sua afinidade do oxigênio ser altamente dependente do pH. A pH 6,8, o valor de $p_{1/2}$ é maior que 100 mm Hg e a pH 9 é menor que 1 mm Hg. A cooperatividade da ligação de oxigênio por esta hemocianina é relativamente alta ($n \sim 3$) a todos valores de pH. A estrutura quaternária de hemocianina do *M. amazonicum* é hexamérica, com uma pequena porcentagem de dodecâmeros a pH 8 na presença de 0,01M de cálcio.

Hemocianina dos grandes caracóis de água doce, *Pila*, consiste de típicas moléculas (100S) "inteiras" dos gastrópodos e "uma e meia" molécula (124S). Em *Pila*, estas estruturas são caracterizadas por um muito pequeno e negativo efeito Bohr. Este efeito Bohr negativo é paralelo ao decréscimo na cooperatividade da ligação do oxigênio de um pouco menos que 2 a um pH de 8,5 até cerca de 1 em pH de 6,25. *Pila* aparentemente tem as hemocianinas α e β , desde que a ultracentrifugação em acetato 0,1M NaCl 1,0 pH 5,7 mostre que algumas moléculas dissociam-se (a α hemocianina) enquanto outras não se dissociam (a β hemocianina). A hemocianina de *Pila leopoldvillensis*, por outro lado é toda do tipo β , isto é, ela não dissocia a pH 5,7 com tampão acetato contendo 1M de NaCl (Witters & Lontie, 1968).

Resumindo, a hemocianina dos astrópodos do rio Solimões parece diferir das espécies que habitam ambientes mais variáveis sendo monomórficas com respeito à carga NETA. Nosso estudo, porém, é o primeiro neste tipo com grandes espécies de água doce e, portanto, não podemos rejeitar a possibilidade de que o ambiente constante iônico também contribui para a perda de polimorfismo. Nada pode ser dito sobre subunidades polimórficas em

Pila, porque nosso estudo eletroforético não determina proteínas de tão grande peso molecular. As propriedades funcionais da hemocianina de duas espécies de caranguejo são mais similares às dos caranguejos marinhos e o extremamente grande efeito Bohr do camarão do capim flutuante é diferente dos do camarão *Panesus*, os quais habitam ambientes marinhos (observações não publicadas de J. Bonaventura, C. Bonaventura e M. Brouwer). As propriedades funcionais da hemocianina de *Pila* sp são notáveis dada a ausência da dependência do pH na ligação do oxigênio. Isto pode ser explicado pelo fato de que *Pila* tem um número de espécies de pesos moleculares distintos cujas propriedades funcionais devem diferir. Por exemplo, na hemocianina de *Helix pomatia*, a hemocianina α tem um efeito dos Bohr positivo e a hemocianina β , um efeito Bohr negativo (Konings *et al.*, 1969). Portanto em misturas complexas de tipos moleculares presentes em hemocianina de *Pila*, as diferenças nas características das propriedades funcional devem ser mascaradas. Melhor entendimento destas hemocianinas precisam aguardar a separação e caracterização de espécies moleculares puras.

Nossos resultados leva-nos a desejar mais dados acerca das espécies por nós estudadas no rio Solimões e sobre as hemocianinas dos organismos habitando ambientes comparáveis. Tais estudos, feitos no "Alpha Helix" ou outros laboratórios poderiam ajudar-nos a entender as complexas relações entre a estrutura e função das hemocianinas dos moluscos e artrópodos.

AGRADECIMENTOS

Concessão PCM 75-06451 de U.S. National Science Foundation, auxílio a aspectos da fase IV da Expedição Amazônica "Alpha Helix" período de 1976 e 1977. Joseph Bonaventura é um pesquisador vinculado à American Heart Association e reconhecidamente agradece a subvenção de U.S. National Institutes of Health e National Science Foundation. Maurizio Brunori agradece ao Conselho Nacional de Recursos (CNR) da Itália pela ajuda financeira. Michael T. Wilson expressa seus agradeci-

mentos pelo auxílio da The Royal Society e a Duke University Biomedical Resources Support concedidos pelo National Institutes of Health. Bonnie J. Davies agradece a Joseph Henry-Marsh Fund of National Academy of Sciences e San Francisco State University pela ajuda financeira da viagem. Agradecemos aos Drs. Marius Brouwer e Thea Brouwer pela execução dos experimentos eletroforéticos e a Dra. Celia Bonaventura pela ajuda com a cinética dissociação do oxigênio. Auxílios adicionais referentes ao contrato ONR, ND0014-75-0190 (a J.B.), auxílio NIH, HL-15460 (a J.B.) e auxílio NIH, BM-21314 (a A. Riggs) os quais estão profundamente agradecidos.

SUMMARY

Hemocyanins from four organisms inhabiting the Amazon River were isolated and partially characterized. Three arthropodan species (*Dilocarcinus pagei cristatus*, *Silviocarcinus pardalinus* and *Macrobrachium amazonicum*) possess hemocyanins whose subunit structure is remarkably simple. Regular and SDS polyacrylamide disc electrophoresis revealed predominantly single bands and no polymorphisms. Oxygen-binding experiments showed that the three arthropodan hemocyanins possess large positive Bohr effects and pH dependence in the degree of subunit interaction. The hemocyanin of one mollusc, *Pila* sp., was studied and its subunit size appears to be similar to that of other molluscan hemocyanins, i.e., a 400,000 dalton polypeptide. In the hemolymph, *Pila* hemocyanin probably exists as a mixture of 100S and 124S aggregates. The oxygen binding properties of the large molecules of *Pila* hemocyanin are notable because of their low cooperativity and lack of a strong pH dependence.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1974 — Transport of Oxygen: Respiratory Proteins in Molecular Oxygen in Biology. In: *Topics in Molecular Oxygen Research* (Ed. Hayashi, O.) pp. 219-274.
- BOLT, R.
1969 — *The freshwater crabs of South American and their life histories*. Ahh. senckenherly naturf. 9s, 518 Frankfurt am Main.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J.
1974 — Effects of pH and Anions on Functional Properties of hemoglobin from *Lemur fulvus fulvus*. *J. Biol. Chem.*, 249: 3768-3775.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.
1975 — Hemoglobins and Hemocyanins: Comparative Aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.*, 194: 155-173.
1977 — Non-Heme Oxygen transport proteins. In: *Oxygen and Physiological Function*. (ed. Jobsis, F.). Texas, The Professional Information Library.
- BROUWER, M.; WOLTERS, M. & VAN BRUGGEN, E.F.J.
1976 — Proteolytic fragmentation of *Helix pomatia* a Hemocyanin: Structural domains in the polypeptide chain. *Biochemistry*, 15: 2618-2623.
- DAVIS, B.J.
1964 — Disc Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427.
- FISHER, T.R.
1978 — Plâncton e produção primária em sistemas aquáticos da bacia da Amazônia Central. *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).
- GERSTACKER, A.
1856 — Carcinologische Beiträge. *Arch. Naturg.*, 221: 101-162.
- KONINGS, W.N.; VAN DRIEL, R.; VAN BRUGGEN, E.F.J. & GRUBER, M.
1969 — Structure and properties of hemocyanin V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Acta*, 194: 55-66.
- LONTIE, R.; DELEY, M.; ROBBERECHT, H. & WITTERS, R.
1973 — Isolation of small functional subunits of *Helix pomatia* hemocyanin after subtilisin treatment. *Nature New Biology*, 242: 180-182.
- LONTIE, R. & WITTERS, R.
1973 — "Hemocyanin" In: *Inorganic Biochemistry* (Ed. Eichorn, G.L.) Amsterdam, Elsevier. pp. 344-358.

- ORNSTEIN, L.
1964 — Disc. Electrophoresis I. Background and theory. *Ann. of the New York Academy of Science*, 121 : 321-349.
- REDMOND, J.R.
1968 — The respiratory function of hemocyanin. In: *Physiology and Biochemistry of Hemocyanins*, (ed. Ghiretti, F.) New York, Academic Press. pp. 5-23.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R.A.
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39 : 585-605.
- SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C.
1974 — Functional differences in the multiple hemocyanins of *Limulus polyphemus* L. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 71 : 2558-2562.
- SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & GODETTE, G.
1976 — Hemocyanin of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*. I. Structural Differentiation of the Isolated Components. *J. Biol. Chem.*, 251 : 7644-7648.
- VAN HOLDE, K.E. & VAN BRUGGEN, E.F.J.
1971 — "The hemocyanins" In: *Subunits in Biological Systems*, (ed. Timasheff, S.H. & Fasman, G.D.) New York, Marcel Dekker. pp. 1-53.
- WEBER, K. & OSBORNE, M.
1969 — The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate — Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412.
- WITTERS, R. & LONTIE, R.
1968 — "Stability Regions and Amino Acid Composition of Gastropod Hemocyanins" In: *Physiology and Biochemistry of Haemocyanins*, (ed. Ghiretti, F.) New York, Academic Press. p. 61-73.

troforético das hemocianinas dos caranguejos do Panamá e Venezuela sugerem que existe um pequeno polimorfismo das subunidades nas espécies examinadas (B. Sullivan, H.J. Fyhn e U.E.H. Fyhn, observações não publicadas).

Os organismos do rio Solimões habitam um ambiente muito especial. A água é temperada $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o ano (Fisher, 1978). Estes organismos têm um problema adicional de sobrevivência na água com baixo conteúdo de oxigênio dissolvido. Nós estávamos, portanto, interessados em caracterizar as hemocianinas de organismos habitantes deste ambiente e comparar suas propriedades com outras hemocianinas conhecidas.

MÉTODOS E RESULTADOS

PEQUENO CARANGUEJO VERMELHO

O pequeno caranguejo vermelho, *Dilocarcinus pagei cristatus* (Bolt, 1969) (6) foi fornecido por um pescador local. Não conseguimos saber exatamente o local de captura. Hemolinfa foi obtida do sinus pedal. A hemolinfa foi gotejada dentro de um tubo de ensaio e posteriormente coagulada à temperatura ambiente. O coágulo foi mecanicamente dispersado e diluído com 0,1M Tris, 0,01M CaCl_2 , pH8. Depois de 10 minutos de centrifugação a 18.000 RPM numa Sorval, recolheu-se o sobrenadante contendo a hemocianina. No experimento destinado a observar as subunidades polimórficas, 50 μl do sobrenadante foi adicionado a 200 ml 0,1M Tris, 0,1M EDTA pH 9. Uns poucos microlitros desta solução foram usados para eletroforese regular e eletroforese em gel de SDS.

Eletroforese em gel de regular disco de 12 indivíduos do pequeno caranguejo vermelho mostraram que não há polimorfismo detectável das subunidades (Ornstein, 1964, Davis, 1964). Adicionalmente, contrastando com muitas das hemocianinas dos artrópodos, existem notavelmente poucos tipos de subunidades. De fato, o pequeno caranguejo vermelho pare-

ce ter um único e predominante tipo de subunidade. Eletroforese gel SDS (Weber & Osborne, 1969) mostrou que existe homogeneidade com respeito ao peso molecular das subunidades da hemocianina do pequeno caranguejo vermelho, i.e. uma única e pronunciada banda na eletroforese de disco SDS-gel com peso molecular de cerca de 75.000. Baseando-se nas condições eletroforéticas e da altíssima mobilidade das bandas eletroforéticas das hemocianinas dos artrópodos estudados, inferimos que elas são verdadeiramente subunidades de 75.000 daltons. Desde que os experimentos de ultra-centrifugação não foram realizados sob condições eletroforéticas, não podemos excluir a possibilidade de que as bandas que temos chamado de subunidades não sejam hexâmeros. Esta possibilidade, contudo, é muito improvável.

Os dados de ligação de oxigênio do pequeno caranguejo vermelho estão apresentados na Fig. 1. Esta hemocianina apresenta efeitos homo e heterotrópicos. Acima do pH examinado, o plotado de Hill apresenta valores para $n_{1/2}$ de 2 a 3. Os dados sugerem que a hemocianina é mais cooperativa a pH 7 e 8 do que a valores maiores ou menores. Há um forte e positivo efeito Bohr, com $\Delta \log P_{1/2} / \Delta \text{pH}$ de $-0,8$ entre pH7 e 8.

Ultracentrifugação da hemocianina do pequeno caranguejo vermelho a uma força iônica de 0.1 Tris, 0,01M CaCl_2 pH 8, deu 1 pico de 14S "schlieren" com indicações de uma pequena quantidade de produtos de dissociação e associação para a esquerda e direita do limite. O experimento ultracentrifugação indica que a espécie molecular predominante sob as condições da fig. 1 é o hexâmero.

PEQUENO CARANGUEJO MARROM

Hemocianina do pequeno caranguejo marrom *Sylviocarcinus pardalinus* (Gerstaecker, 1956) (6) foi isolada e tratada de maneira análoga àquela em que foi tratado o pequeno caranguejo vermelho.

(6) — Abreviaturas usadas: EDTA, ácido etilendiaminotetraacético bis-tris, bis (2-hidroxietil) imino-tris (hidroximetil) metano; $p_{1/2}$, a pressão do oxigênio expressa em milímetros de mercúrio, requerida para saturar a metade dos sítios da ligação do oxigênio da hemocianina; $n_{1/2}$, a inclinação do plotado de Hill para ligação de oxigênio medido a $p_{1/2}$; SDS, dodecilulfato sódico.

A eletroforese em *gel* regular de disco de 8 indivíduos do pequeno caranguejo marrom não mostraram variações detectáveis de um indivíduo para outro, sugerindo uma ausência de subunidades polimórficas. Igualmente, o *gel* SDS mostrou uma única banda do material, havendo um aparente peso molecular de cerca de 75.000.

Propriedades de ligação do oxigênio desta hemocianina são mostradas na Fig. 2. O efeito Bohr da hemocianina do pequeno caranguejo

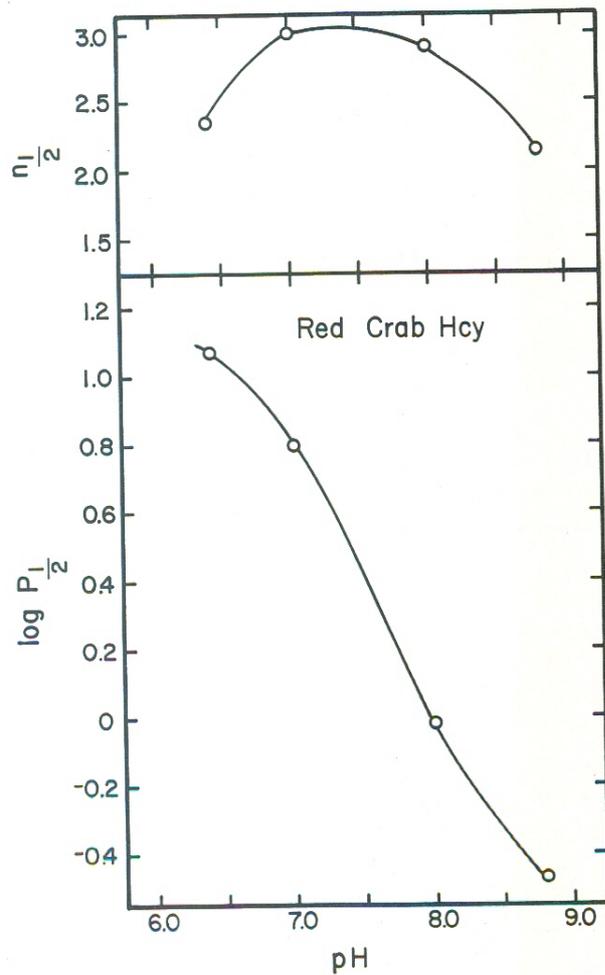


Fig. 1 — A dependência do pH da ligação do oxigênio da hemocianina de *Dilocarcinus pagei cristatus*. Experimentos realizados usando o processo tonométrico de Riggs & Wolbach (1956). Experimentos realizados em 0,05 M Bis-Tris (valores de pH 7,0 para baixo) e Tris (Valores de pH acima de 7,0) com tampão contendo 10 mM de cálcio. Experimentos realizados a 20°C. Valores para a porcentagem de saturação da hemocianina com oxigênio foram calculadas do espectro de absorção coletado sobre o comprimento de onda de 400 a 450 nm.

Propriedades das...

marrom e do pequeno caranguejo vermelho são muito semelhantes. Somente ao redor de pH 9 é que a afinidade do oxigênio é diferente ($P_{1/2} = 0,49$ mm Hg para a hemocianina do pequeno caranguejo marrom e 0,34 mm Hg para a hemocianina do pequeno caranguejo vermelho). Outras diferenças nas duas hemocianinas são aparentes se examinarmos o efeito do pH sobre a cooperatividade da ligação do oxigênio pelas duas hemocianinas. No caso do pequeno caranguejo marrom, aumentando o pH decresce a cooperatividade da hemocianina da ligação do oxigênio.

Ultracentrifugação da hemocianina do pequeno caranguejo marrom em força iônica 0,1; 0,01M CaCl_2 pH 8 mostrou dois picos "schlieren" simétricos aparecendo valores de 15 e

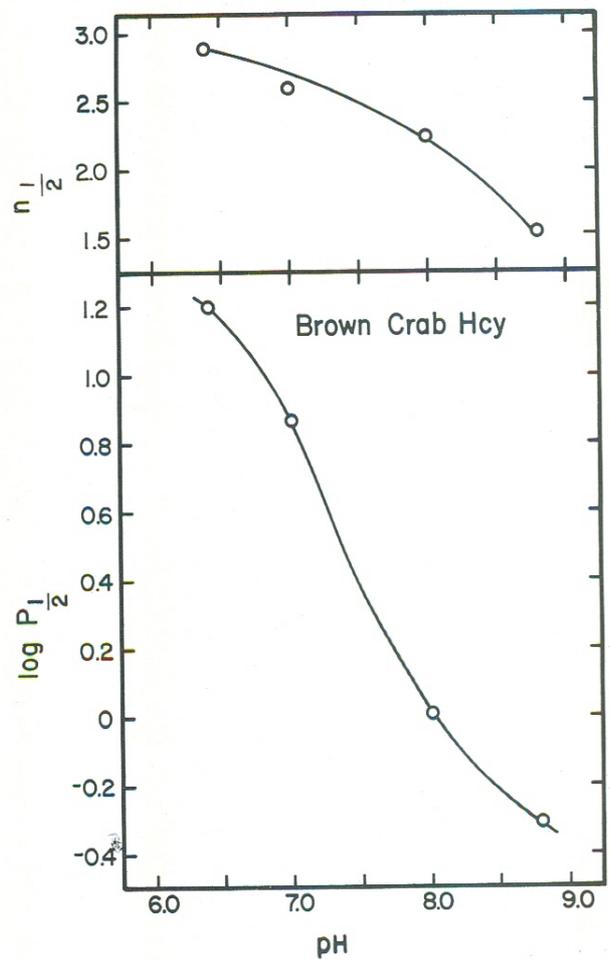


Fig. 2 — A dependência do pH da ligação de oxigênio da hemocianina de *Sylvioarcinus pardalinus*. Experimentos realizados sob condições idênticas àsquelas da fig. 1.

22,3S. O pico 15S corresponde à espécie molecular da qual faz parte o hexâmero. Seu total é cerca de 70% do total do material presente sob estas condições. O pico 22,3S provavelmente corresponde ao dodecâmero. Sua quantidade é de cerca de 30% do material presente.

HEMOCIANINA DE CAMARÃO

Um camarão do capim flutuante do Amazonas, *Macrobracium amazonicum* foi coletado com a técnica de Rapiché. A elevação da água do paraná que conecta o lago Janauacá e o rio Solimões cobre áreas com vegetação flutuante que aparentemente proporciona refúgio para estes camarões. Mergulhando-se a rede por baixo do capim flutuante obtínhamos muitos camarões que variavam entre 1 a 3 cm de comprimento. Obtivemos a hemolinfa inserindo um tubo capilar através da junção entre o tórax e a cauda, diretamente sobre o coração. A quantidade de hemolinfa obtida de cada camarão foi pequena (de 10 a 50 μ l). Para a maioria dos estudos, a hemolinfa foi reunida e deixada coagular. O coágulo foi então disperso mecanicamente e diluído com um volume aproximadamente igual de 0,1M Tris pH8 contendo 0,01M de CaCl_2 . A mistura resultante foi centrifugada e o sobrenadante foi conservado para os estudos subseqüentes. Nos experimentos destinados a observar a variabilidade eletroforética, amostras individuais de hemolinfa foram obtidas e sopradas em uma película de "parafilm". Quatro a cinco volumes de 0,10M Tris, 0,1M EDTA foram adicionados às amostras individuais de hemolinfa. A solução resultante foi então retirada com um tubo hematócrito, fechado e centrifugado por 5 minutos. Uns poucos microlitros desta solução foram usados para eletroforese. Preparações eletroforéticas de 8 indivíduos não mostraram nenhuma evidência de polimorfismo. O padrão do disco regular do *gel* eletroforético foi muito simples, uma banda rápida principal correspondendo a uma só espécie molecular, presumivelmente correspondendo a subunidades de hemocianina. Somando-se à banda rápida, havia uma banda lenta que provavelmente correspondia a hexâmeros de subunidades de baixo peso molecular. *Gel* de SDS mostrou uma banda difusa, provavelmente duas vezes

mais intimamente bandeadas e com um peso molecular de 75.000.

Ligação de oxigênio nas hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas na presença de 0,01M CaCl_2 está mostrada na Figura 3. A hemocianina é fortemente dependente do pH. O valor $p_{1/2}$ é 120,2mm Hg a pH 6,82 e cai a 2,5 mm Hg a pH 9! Por toda essa faixa de pH, a ligação de oxigênio é cooperativa, com valores de $n_{1/2}$ próximo de 3. Na ausência de cálcio, com pH 9,05, a afinidade do oxigênio é menor, com $p_{1/2}$ de 4,7 mm Hg. A cooperatividade observada na presença de cálcio é perdida na ausência de cátions divalentes ($n_{1/2} = 1$). Sob estas condições, a molécula é provavelmente dissociada em monômeros desde que pH alto e EDTA são geralmente efetivos em dissociar hemocianinas. Conseqüentemente, suspeitamos que os monômeros das hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas possam ser não cooperativos na ligação do oxigênio e têm uma baixa afinidade de oxigênio.

As cinéticas de dissociação do oxigênio da hemocianina dos camarões do Amazonas foram estudadas com uma técnica de combinação rápida descrita em (Bonaventura *et al.*, 1974). A dissociação do oxigênio das hemocianinas dos camarões do capim flutuante do Amazonas é autocatalítica na presença de 0,01M CaCl_2 , a pH 8,9 com velocidades de 27 sec^{-1} a 43 sec^{-1} . A reação é também autocatalítica a pH 7,5 com velocidade de 55 sec^{-1} a 95 sec^{-1} . Uma grande parte da reação é perdida a pH 6,9, mas naquelas que foram observadas, a taxa foi cerca de 170 seg^{-1} . Ultra centrifugação da hemocianina destes camarões, como também o oxiderivado na presença CaCl_2 , mostraram que a espécie predominante foi o hexâmero 16S, com pequena quantidade de dodecâmero 23S.

HEMOCIANINA DE PILA SP

O grande caracol, *Pila* sp. foi coletado por um pescador local. Hemolinfa foi obtida do "sinus pedal". A hemolinfa foi então passada através de uma coluna Sephadex G-25 equilibrada com 0,001M Tris, 0,01M Ca^{2+} pH 8.0 equilíbrio do oxigênio foi medido com as ali-

bis-tris ou Tris, de maneira que a absorbância quotas desta amostra diluindo-as com tampão do derivado oxigenado a 340 nm foi cerca de 0,6 e a força iônica final do tampão foi 0,10.

A hemoglobina de *Pila* sp. foi eletroforizada em gel regular de poliacrilamida 7,5% e em gel SDS. O pigmento não penetrou no gel regular de poliacrilamida e penetrou levemente no gel de SDS. Existe alguma indicação de proteínas com mais baixos pesos moleculares, mas estas representaram somente uma pequena fração do total das proteínas presentes no

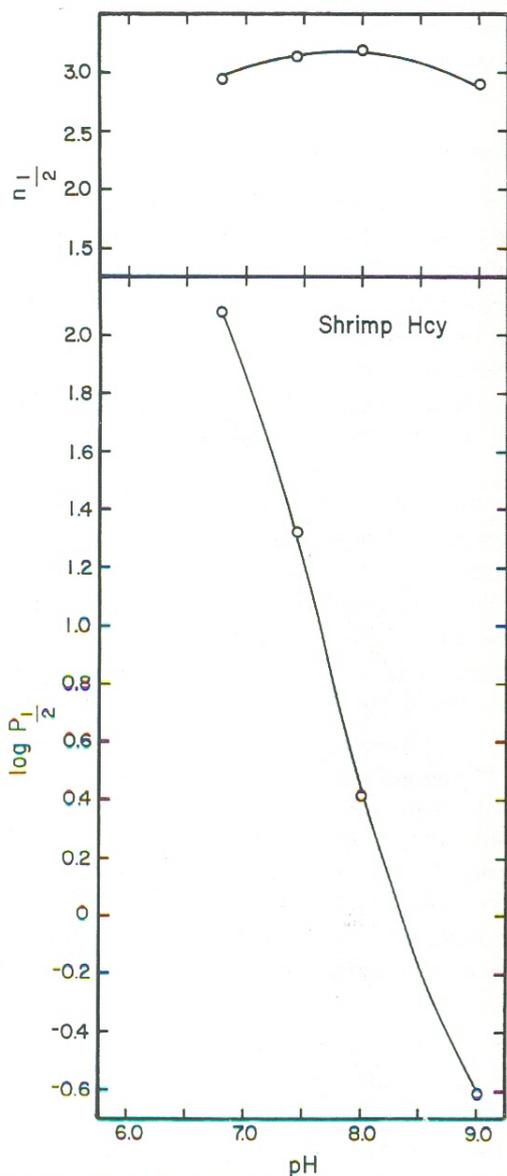


Fig. 3 — A dependência da ligação do oxigênio da hemocianina de *Macrobrachium amazonicum*. Condições experimentais idênticas às das fig. 1 e 2.

gel. Nós não temos marcadores de pesos moleculares para proteínas cujas subunidades sejam tão grande quanto às das hemocianinas dos moluscos (cerca de 400.000 daltons).

Entretanto, nossos resultados indicam que as subunidades da hemocianina de *Pila* sp. são também grandes, estando os pesos moleculares na ordem de várias centenas de milhares de daltons.

Sob todas as condições examinadas, existe pouca dependência do pH ou cooperatividade nas ligações do oxigênio das hemocianinas de *Pila* sp. Abaixo do pH 7,6, existe um pequeno e negativo efeito Bohr, $\Delta \log p_{1/2}/\Delta \text{pH} = 0,1$. Na faixa de pH entre 7,6 a 9, existe um pequeno e positivo efeito Bohr, $\Delta \log p_{1/2}/\Delta \text{pH} = 0,05$. A cooperatividade das ligações de oxigênio medidas por $n_{1/2}$, alcançam o valor máximo de 1,8 a pH 7,6 e em pH menor o valor de $n_{1/2}$ tende à unidade.

Na presença de 0,01M EDTA, a qual serve de quelantes para cátions divalentes, a afinidade do oxigênio da hemocianina do *Pila* sp. é aumentada. Isto é provavelmente um reflexo da diferença na afinidade do oxigênio das subunidades da hemocianina de *Pila* sp. relativa as moléculas totais. Sob estas condições a

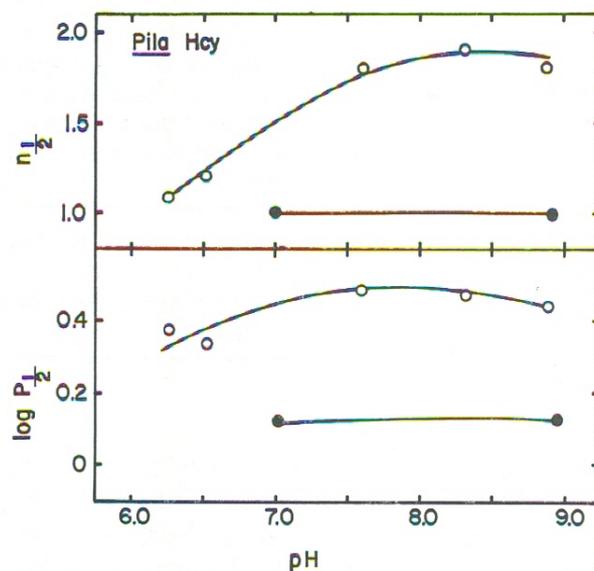


Fig. 4 — A dependência do pH da ligação do oxigênio da hemocianina de *Pila* sp. Experimentos realizados usando métodos similares aos das fig. 1-3. Os experimentos da fig. 4, entretanto, foram feitos a 29°C.

pH 7,0 e 8,9, a ligação de oxigênio é não cooperativa e a pressão do oxigênio necessária para meia saturação é 1,3 mm Hg.

A ultracentrifugação da hemocianina de *Pila* sp deu resultados não esperados. Em $I = 0,1$ Tris, 10 mM $CaCl_2$, pH 8, duas distintas bandas apareceram. Os dois picos apresentaram coeficientes de sedimentação de 100S a 124S. Existe alguma indicação de uma pequena quantidade de grandes agregados. O pico 124S e picos maiores não são típicos de hemocianina de moluscos.

TABELA 1 — Ultracentrifugação das Hemocianinas dos organismos do rio Solimões em $I = 0,1$ Tris, 0,01M $CaCl_2$ pH 8.

Organismo	Espécies Sedimentados e suas Prováveis Identidades
<i>Pila</i>	100S ("molécula inteira") 124S ("1,5 molécula") Tendência para aumentar — ordem de agregação
Camarão do capim flutuante	16S (hexâmero) 23S (dodecâmero, presente em pequena quantidade)
Pequeno caranguejo vermelho	14S (hexâmero) Apareceram indicações de uma pequena quantidade de dissociação e produtos de associação para a esquerda e direita do pico schlieren
Pequeno caranguejo marrom	15S (hexâmero, 70% do total) 23.3S (dodecâmero, 30% do total)

A hemocianina de *Pila* também corre na ultracentrífuga sob condições usadas para diferenciar entre hemocianina $\alpha - \beta$ (Van Holde & van Bruggen, 1971). Em acetado 0,1M, pH 5,7, três espécies sedimentares foram observadas com coeficientes de sedimentação de 76S, 100S e 113S. No mesmo tampão com 1M NaCl três espécies sedimentares de coeficientes comparáveis foram observadas. A

perda de dissociação sob estas condições indica que todas estas hemocianinas são do tipo β . Experimentos de ligação de oxigênio foram também realizadas sob estas condições. No tampão acetato não contendo NaCl, e $p_{1/2}$ e $n_{1/2}$ foram 2,3 e 1,0 respectivamente. No mesmo pH, mas na presença de 1,0M NaCl, os valores $p_{1/2}$ e $n_{1/2}$ foram 3,24 e 1,0, respectivamente. Em acetato a 0,1M pH 5,7 a taxa de dissociação de oxigênio da hemocianina de *Pila* sp é homogênea com a constante de velocidade de primeira ordem de 11 sec^{-1} . Quando o mesmo tampão é feito 1M em NaCl, a reação permanece homogênea, mas a velocidade aumenta ao redor de 24 sec^{-1} .

DISCUSSÃO

As hemocianinas dos artrópodos provenientes do rio Solimões foram notáveis pela relativa simplicidade de suas subunidades e a aparente perda de subunidades polimórficas. Um grande número de hemocianinas examinadas mostraram grandes diversidade de subunidades (i.e. muitos componentes eletroforéticos) e polimorfismo (Bonaventura *et al.* 1977). Ou seja, diferentes padrões de subunidades eletroforéticas são encontradas quando diferentes indivíduos da mesma espécie são examinados. Tem sido proposto que a diversidade das subunidades das hemocianinas e hemoglobinas e polimorfismo podem ser correlacionados com a instabilidade termal do ambiente (Bonaventura *et al.* 1975). Embora nossas observações não provem isto, elas cedem evidências para essa proposta. Apoio adicional vem dos estudos de eletroforese de hemoglobina (Fyhn *et al.*, 1978) já citado neste trabalho. As águas do rio Solimões onde o "Alpha Helix" estava ancorado são certamente termicamente estáveis. A variação de temperatura não é maior que 1°C ao longo do ano (Fisher, 1978).

O pequeno caranguejo vermelho *Dilocarcinus pagei cristatus*, e o pequeno caranguejo marrom *Sylviocarcinus pardalinus* são ambos do mesmo tamanho e provavelmente habitam áreas similares. Existem pequenas mas significativas diferenças nas propriedades funcionais de suas hemocianinas. Cooperatividade na ligação de oxigênio da hemocianina de *D.*

pagei cristatus é relativamente baixa a baixos e altos valores de pH. Cooperatividade na ligação de oxigênio da hemocianina de *S. pardalinus* é alta a pH baixo e decresce monotonicamente quando o pH aumenta. Em pH 8, na presença de cálcio, a hemocianina *D. pagei cristatus* está preponderantemente na forma de 14S hexâmeros, enquanto a hemocianina de *S. pardalinus* em 1 tampão comparável é cerca de 70% hexamérica e 30% dodecamérica.

A hemocianina do camarão do capim flutuante, *Macrobrachium amazonicum*, é notável por sua afinidade do oxigênio ser altamente dependente do pH. A pH 6,8, o valor de $p_{1/2}$ é maior que 100 mm Hg e a pH 9 é menor que 1 mm Hg. A cooperatividade da ligação de oxigênio por esta hemocianina é relativamente alta ($n \sim 3$) a todos valores de pH. A estrutura quaternária de hemocianina do *M. amazonicum* é hexamérica, com uma pequena porcentagem de dodecâmeros a pH 8 na presença de 0,01M de cálcio.

Hemocianina dos grandes caracóis de água doce, *Pila*, consiste de típicas moléculas (100S) "inteiras" dos gastrópodos e "uma e meia" molécula (124S). Em *Pila*, estas estruturas são caracterizadas por um muito pequeno e negativo efeito Bohr. Este efeito Bohr negativo é paralelo ao decréscimo na cooperatividade da ligação do oxigênio de um pouco menos que 2 a um pH de 8,5 até cerca de 1 em pH de 6,25. *Pila* aparentemente tem as hemocianinas α e β , desde que a ultracentrifugação em acetato 0,1M NaCl 1,0 pH 5,7 mostre que algumas moléculas dissociam-se (a α hemocianina) enquanto outras não se dissociam (a β hemocianina). A hemocianina de *Pila leopoldvillensis*, por outro lado é toda do tipo β , isto é, ela não dissocia a pH 5,7 com tampão acetato contendo 1M de NaCl (Witters & Lontie, 1968).

Resumindo, a hemocianina dos astrópodos do rio Solimões parece diferir das espécies que habitam ambientes mais variáveis sendo monomórficas com respeito à carga NETA. Nosso estudo, porém, é o primeiro neste tipo com grandes espécies de água doce e, portanto, não podemos rejeitar a possibilidade de que o ambiente constante iônico também contribui para a perda de polimorfismo. Nada pode ser dito sobre subunidades polimórficas em

Pila, porque nosso estudo eletroforético não determina proteínas de tão grande peso molecular. As propriedades funcionais da hemocianina de duas espécies de caranguejo são mais similares às dos caranguejos marinhos e o extremamente grande efeito Bohr do camarão do capim flutuante é diferente dos do camarão *Panesus*, os quais habitam ambientes marinhos (observações não publicadas de J. Bonaventura, C. Bonaventura e M. Brouwer). As propriedades funcionais da hemocianina de *Pila* sp são notáveis dada a ausência da dependência do pH na ligação do oxigênio. Isto pode ser explicado pelo fato de que *Pila* tem um número de espécies de pesos moleculares distintos cujas propriedades funcionais devem diferir. Por exemplo, na hemocianina de *Helix pomatia*, a hemocianina α tem um efeito dos Bohr positivo e a hemocianina β , um efeito Bohr negativo (Konings *et al.*, 1969). Portanto em misturas complexas de tipos moleculares presentes em hemocianina de *Pila*, as diferenças nas características das propriedades funcional devem ser mascaradas. Melhor entendimento destas hemocianinas precisam aguardar a separação e caracterização de espécies moleculares puras.

Nossos resultados leva-nos a desejar mais dados acerca das espécies por nós estudadas no rio Solimões e sobre as hemocianinas dos organismos habitando ambientes comparáveis. Tais estudos, feitos no "Alpha Helix" ou outros laboratórios poderiam ajudar-nos a entender as complexas relações entre a estrutura e função das hemocianinas dos moluscos e artrópodos.

AGRADECIMENTOS

Concessão PCM 75-06451 de U.S. National Science Foundation, auxílio a aspectos da fase IV da Expedição Amazônica "Alpha Helix" período de 1976 e 1977. Joseph Bonaventura é um pesquisador vinculado à American Heart Association e reconhecidamente agradece a subvenção de U.S. National Institutes of Health e National Science Foundation. Maurizio Brunori agradece ao Conselho Nacional de Recursos (CNR) da Itália pela ajuda financeira. Michael T. Wilson expressa seus agradeci-

mentos pelo auxílio da The Royal Society e a Duke University Biomedical Resources Support concedidos pelo National Institutes of Health. Bonnie J. Davies agradece a Joseph Henry-Marsh Fund of National Academy of Sciences e San Francisco State University pela ajuda financeira da viagem. Agradecemos aos Drs. Marius Brouwer e Thea Brouwer pela execução dos experimentos eletroforéticos e a Dra. Celia Bonaventura pela ajuda com a cinética dissociação do oxigênio. Auxílios adicionais referentes ao contrato ONR, ND0014-75-0190 (a J.B.), auxílio NIH, HL-15460 (a J.B.) e auxílio NIH, BM-21314 (a A. Riggs) os quais estão profundamente agradecidos.

SUMMARY

Hemocyanins from four organisms inhabiting the Amazon River were isolated and partially characterized. Three arthropodan species (*Dilocarcinus pagei cristatus*, *Silviocarcinus pardalinus* and *Macrobrachium amazonicum*) possess hemocyanins whose subunit structure is remarkably simple. Regular and SDS polyacrylamide disc electrophoresis revealed predominantly single bands and no polymorphisms. Oxygen-binding experiments showed that the three arthropodan hemocyanins possess large positive Bohr effects and pH dependence in the degree of subunit interaction. The hemocyanin of one mollusc, *Pila* sp., was studied and its subunit size appears to be similar to that of other molluscan hemocyanins, i.e., a 400,000 dalton polypeptide. In the hemolymph, *Pila* hemocyanin probably exists as a mixture of 100S and 124S aggregates. The oxygen binding properties of the large molecules of *Pila* hemocyanin are notable because of their low cooperativity and lack of a strong pH dependence.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1974 — Transport of Oxygen: Respiratory Proteins in Molecular Oxygen in Biology. In: *Topics in Molecular Oxygen Research* (Ed. Hayashi, O.) pp. 219-274.
- BOLT, R.
1969 — *The freshwater crabs of South American and their life histories*. Ahh. senckenherly naturf. 9s, 518 Frankfurt am Main.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B. & BONAVENTURA, J.
1974 — Effects of pH and Anions on Functional Properties of hemoglobin from *Lemur fulvus fulvus*. *J. Biol. Chem.*, 249: 3768-3775.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.
1975 — Hemoglobins and Hemocyanins: Comparative Aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.*, 194: 155-173.
1977 — Non-Heme Oxygen transport proteins. In: *Oxygen and Physiological Function*. (ed. Jobsis, F.). Texas, The Professional Information Library.
- BROUWER, M.; WOLTERS, M. & VAN BRUGGEN, E.F.J.
1976 — Proteolytic fragmentation of *Helix pomatia* a Hemocyanin: Structural domains in the polypeptide chain. *Biochemistry*, 15: 2618-2623.
- DAVIS, B.J.
1964 — Disc Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427.
- FISHER, T.R.
1978 — Plâncton e produção primária em sistemas aquáticos da bacia da Amazônia Central. *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).
- GERSTACKER, A.
1856 — Carcinologische Beiträge. *Arch. Naturg.*, 221: 101-162.
- KONINGS, W.N.; VAN DRIEL, R.; VAN BRUGGEN, E.F.J. & GRUBER, M.
1969 — Structure and properties of hemocyanin V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Acta*, 194: 55-66.
- LONTIE, R.; DELEY, M.; ROBBERECHT, H. & WITTERS, R.
1973 — Isolation of small functional subunits of *Helix pomatia* hemocyanin after subtilisin treatment. *Nature New Biology*, 242: 180-182.
- LONTIE, R. & WITTERS, R.
1973 — "Hemocyanin" In: *Inorganic Biochemistry* (Ed. Eichorn, G.L.) Amsterdam, Elsevier. pp. 344-358.

- ORNSTEIN, L.
1964 — Disc. Electrophoresis I. Background and theory. *Ann. of the New York Academy of Science*, 121 : 321-349.
- REDMOND, J.R.
1968 — The respiratory function of hemocyanin. In: *Physiology and Biochemistry of Hemocyanins*, (ed. Ghiretti, F.) New York, Academic Press. pp. 5-23.
- RIGGS, A. & WOLBACH, R.A.
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39 : 585-605.
- SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C.
1974 — Functional differences in the multiple hemocyanins of *Limulus polyphemus* L. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 71 : 2558-2562.
- SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & GODETTE, G.
1976 — Hemocyanin of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*. I. Structural Differentiation of the Isolated Components. *J. Biol. Chem.*, 251 : 7644-7648.
- VAN HOLDE, K.E. & VAN BRUGGEN, E.F.J.
1971 — "The hemocyanins" In: *Subunits in Biological Systems*. (ed. Timasheff, S.H. & Fasman, G.D.) New York, Marcel Dekker. pp. 1-53.
- WEBER, K. & OSBORNE, M.
1969 — The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate — Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412.
- WITTEBS, R. & LONTIE, R.
1968 — "Stability Regions and Amino Acid Composition of Gastropod Hemocyanins" In: *Physiology and Biochemistry of Haemocyanins*, (ed. Ghiretti, F.) New York, Academic Press. p. 61-73.