

HEMOGLOBINAS EM CASCUDOS (SILURIFORMES) DA AMAZÔNIA CENTRAL.

II. Determinação do Efeito Bohr por Focalização Isoelétrica.

Maria Isabel G. Portus (*)

Nilce C. Meirelles (**)

Aldo Focesi Júnior (**)

Resumo

A análise qualitativa do efeito Bohr por eletrofocalização em gel de poliacrilamida dos hemolisados de sete espécies das famílias Loricariidae e Callichthidae da Amazônia Central nos revelou uma natureza diversa deste efeito. Algumas hemoglobinas destas espécies mostraram um incremento no ponto isoelétrico (PI) da forma deoxigenada em comparação à forma carboxy, como ocorre com a hemoglobina humana. Outras espécies contudo tiveram suas hemoglobinas com PI diminuído e ainda em outras espécies foi observado alteração no PI de somente um dos componentes. A modificação no PI das forma deoxy da hemoglobina correlacionada com a presença ou não de efeito Bohr normal ou ainda com efeito Bohr reverso. **Pterygoplichtys pardalis** apresenta efeito Bohr reverso por este método o qual foi comprovado por estudos de equilíbrio de oxigenação de suas hemoglobinas. **Plecostomus** e **Hoplosternum thorocatum** apresentaram componentes com efeito Bohr normal. Já em **Sturisoma robustum** observou-se a presença de alguns componentes com efeito Bohr reverso e de outros com efeito Bohr normal; enquanto que em **Canthoporus genibarbis** somente a presença de efeito Bohr normal pode ser encontrado. Esta variabilidade de efeitos Bohrs achados poderiam relacionar-se com o habitat destas espécies ou com sua habilidade para sobreviver em ambientes hipóxicos.

INTRODUÇÃO

O efeito Bohr que representa a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em função do pH, indica possivelmente a mais importante função da hemoglobina e é através dele que se pode explicar a descarga de oxigênio aos tecidos nos animais. É amplamente conhecido que graças ao relativamente baixo pH tecidual, a hemoglobina descarrega o gás. O estudo deste efeito em hemoglobina purificada é bastante simples, implicando na determinação de curvas de dissociação da proteína; contudo, em sistemas múltiplos, como as hemoglobinas de peixes, torna-se sobremaneira complexo uma vez que há necessidade da separação de cada componente do hemolisado e de sua análise individual. Recentemente Bunn & Riggs, 1979, publicaram elegante método de determinação do efeito Bohr através da eletrofocalização. Tal método permite uma análise qualitativa do efeito tanto do hemolisado total

*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. C.P. 478, 69000 Manaus. Est. do Amazonas. Brasil.

**) Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Est. de S. Paulo, Brasil, C.P. 1170, 13100. Camoínas, SP., Brasil.

como dos diferentes componentes do mesmo.

O presente trabalho relata o efeito Bohr e suas possíveis implicações fisiológicas em sete espécies de cascudos comumente encontrados na região da Amazônia Central, a influência do meio ambiente e as adaptações das hemoglobinas são discutidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O efeito Bohr foi analisado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida 4% contendo ampholine 2% pH 6-8 em hemoglobinas dos peixes das famílias **Loricariidae** e **Callichthyidae** coletados no lago Janauacá, rio Solimões. Animais adultos foram sangrados individualmente no local da coleta, por punção cardíaca, com seringa heparinizada, e as hemácias separadas por centrifugação e lavadas repetidas vezes com solução de NaCl 1,7% e Tris 1 mM, pH 8,0 a 4°C. Após a lise com Tris 1 mM pH 8,0 a 4°C o hemolisado foi centrifugado e mantido a 4°C até o momento do uso.

O método utilizado para a determinação do efeito Bohr em gel de poliacrilamida foi o descrito por Bunn & Riggs 1979. A eletroforese foi executada em condições anaeróbicas adicionando-se aos tampões dos eletrólitos 0,02 ml de ditionito de sódio 5 mg/ml e borbulhando lentamente nitrogênio durante todo o processo. Antes da

eletroforese propriamente dita, todo o sistema era acionado por 30 minutos para garantir orientação das cargas no gel de poliacrilamida. Após este tempo foram adicionadas amostras de 0,02 ml dos hemolisados a uma concentração de 10 mg/ml de proteínas, equilibradas até saturação com CO ou totalmente desoxigenadas através da passagem de nitrogênio, sobre gels individuais para cada amostra de carboxi e desoxi hemoglobina dos peixes estudados. A focalização isoelétrica foi alcançada aos 120-180 minutos.

RESULTADOS

O efeito Bohr analisado através do gel de poliacrilamida contendo ampholine entre pH 6 e 8, mostrou as seguintes características descritas na figura 1. I) O componente catódico das hemoglobinas de **Pterygoplichthys pardalis**, cascudo comum, possui efeito Bohr reverso (figura 1A) o que pode ser constatado pela posição mais catódica na forma carboxi em relação a da deoxihemoglobina. Já os outros três componentes anódicos mostraram um pequeno efeito Bohr normal, estando as três hemoglobinas na forma carboxi deslocadas mais para o polo positivo em relação a deoxi. II) O **Pterygoplichthys** (espécie não determinada aqui chamada SP2), cascudo jacaré, não apresentou efeito Bohr reverso no componente catódico,

contudo os componentes anódicos mostram efeito Bohr normal, com exceção do mais anódico que não apresentou o efeito uma vez que a migração do componente na forma tanto deoxi como carboxi foi idêntica (figura 1B). III) Na hemoglobina de **Plecostomus plecostomus** visualizamos quatro componentes com efeito Bohr normal pelos mesmos processos de análise (figura 1C). IV) Os componentes de hemoglobinas de **Hoplosternum throcatum** tanto macho como fêmea (figuras 1D e 1E) apresentaram-se como catódicos e anódicos respectivamente e apresentaram pequeno efeito Bohr normal. V) No hemolisado de **Sturisoma robusta** (figura 1F) observamos que os componentes catódicos tem pequeno efeito Bohr reverso e os

anódicos efeito Bohr normal, tendo o mais anódico efeito menos acentuado. VI) Em **Canthoporus genibarbis** todos os componentes das hemoglobinas apresentaram pequeno efeito Bohr normal (figura 1G).

DISCUSSÃO

A avaliação do efeito Bohr que pode ser estimada como uma modificação na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio com o pH, pode ser relatada como uma afinidade diferencial das hemoglobinas oxigenada e desoxigenada, por prótons através da equação:

$$\left(\frac{\delta \log PO_2}{\delta pH} \right) = \left(\frac{\delta (H)^+}{\delta pH} \right)$$

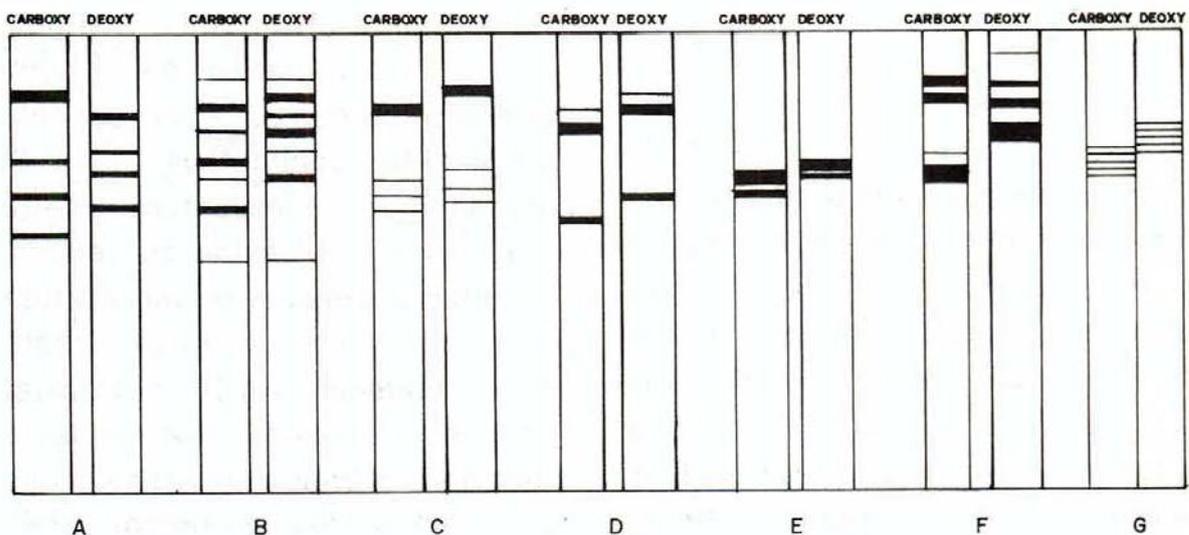


Figura 1. Diagrama de Eletrofocalização das formas de deoxihemoglobina (deoxy) e carboxihemoglobina (carboxy) em hemolisados totais de Silurideos. As condições estão descritas em "Material e Métodos" e os peixes utilizados foram a. **Pterygoplichtys pardalis**, b. **Pterygoplichtys sp.**, c. **Plecostomus plecostomus**, d. **Hoplosternum throcatum** (macho), e **Hoplosternum throcatum** (fêmea), f. **Sturisoma robustum** e g. **Canthoporus genibarbis**.

O valor da expressão à esquerda pode ser determinado pela medida da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em diferentes valores de pH, enquanto que a expressão à direita pode ser medida por titulação ácido-básica das soluções de oxi e desoxihemoglobina. Uma mudança na afinidade de prótons pela hemoglobina pode refletir-se em diferentes pontos isoelétricos da proteína. O método por nós utilizado baseou-se nesta última propriedade nos proporcionando avaliação precisa da presença ou não desta interação heterotrópica nas diferentes hemoglobinas analisadas; principalmente pelo fato destes peixes apresentarem multiplicidade de componentes.

A análise de hemolisados de sete espécies de peixes do rio Amazonas pertencentes às famílias Loricariidae e Callichthyidae teve por objeto a comparação dos hemolisados do ponto de vista de efeito Bohr. Estas duas famílias apresentam de forma geral habitat semelhantes pertencentes a regiões bênticas de pouco oxigênio dissolvido, possuem respiração bimodal, são bastante lentos e de hábitos noturnos. A família Loricariidae do ponto de vista ecológico é semelhante a **Catostomus** sp. dos Estados Unidos, embora neste último efeito Root esteja presente (Powers, 1979). A afinidade da hemoglobina destes peixes pelo ligante oxigênio é relativamente

baixa principalmente na ausência de CO₂. Tal fato estaria relacionado com a habilidade destes peixes para utilizarem respiração aérea em condições de hipoxia.

Como se sabe há uma heterogeneidade considerável em termos de propriedades estruturais e funcionais de hemoglobinas de peixes (Riggs, 1970; Brunori et al., 1979); algumas espécies possuem uma dependência marcada na oxigenação pela variação de pH enquanto outras hemoglobinas não apresentam nenhuma interação heterotrópica ocasionada por prótons. Pela figura 1 verificamos que **Pterygoplichtys pardalis** apresenta um componente com efeito Bohr reverso. Interessante notar que os componentes que apresentam efeito reverso tem pH isoelétrico relativamente alto (Gillen & Riggs, 1973) e apresentam-se como componentes catódicos. Na espécie dois de **Pterygoplichthys** todos os componentes apresentam efeito Bohr normal; o mesmo se verifica para **Plecostomus** e **H. thoracatum** tanto macho como fêmea. Neste último pode-se verificar notável dimorfismo sexual. Na espécie **Sturisoma robusta** observa-se que os componentes catódicos tiveram um pequeno efeito Bohr reverso e os anódicos, efeito Bohr normal. Já em **Canthoporus genibarbis** os componentes de hemoglobina, apresentam pequeno efeito normal.

A interpretação funcional dos dados sobre efeito Bohr é particularmente difícil uma vez que a eletrofocalização não representa em si as condições fisiológicas de pH e diferenças de efetores alostéricos comumente presentes nos eritrócitos dos peixes, podendo, portanto, algumas vezes levar a resultados anômalos quando em presença de ATP. Há casos de ocorrer inclusive desaparecimento de efeito Bohr reverso (Gillen & Riggs 1973). Das espécies por nós analisadas verificamos que só o **Pterygoplichthys pardalis** apresenta efeito Bohr reverso que aliás se torna normal e muito elevado na presença de ATP 1 mM (Galdames, 1978). Outro achado interessante é que as espécies estudadas apresentam grande variabilidade em termos de número de componentes, alguns como o **Hoplosternum thoracatum** possuindo somente dois componentes, enquanto que **Pterygoplichthys** sp₂ se evidencia a presença de pelo menos sete componentes embora quatro se apresentem em maior concentração.

A presença de componentes catódicos e efeito Bohr reverso tem sido correlacionada com uma maior afinidade desta hemoglobina em condições de baixos valores de pH e baixas tensões de O₂ (Hashimoto et al., 1960) ou a grande afinidade indutora de acidose metabólica (Powers, 1972). As diferenças encontradas em termos

de efeito Bohr talvez pudessem ser melhor elucidadas em um estudo do possível efeito de efetores alostéricos (GTP e ATP) que controlassem a efetividade de oxigenação tecidual destas espécies de peixes. A análise qualitativa como aquelas por nós apresentada, contudo, embora limitada, pode trazer à luz a natureza do efeito Bohr, normal ou reverso e portanto servir de ponto de partida de estudos de equilíbrio com componentes individuais o que seria desejável, como dissemos, embora difícil de ser executado.

SUMMARY

The qualitative analyse of Bohr effect by isoelectric focusing on polyacrilamide gel from hemolysed of the seven species hemoglobins of Loricariidae and Callichthidae family of Amazon River have a heterogeneous effect. Some of them have shown hemoglobins with isoelectric point which increase when the protein is in deoxygenated state in comparison to the carboxy state, likely human hemoglobin. Others presented its hemoglobins in the deoxy state without any change in the PI or have presented an decrease in such as value. The changes in isoelectric point when the carboxyhemoglobin was compared with the deoxyhemoglobin have been used as Bohr effect's indicator. Thus, **Pterygoplichthis pardalis** presents a reverse Bohr effect that was confirmed by oxygen equilibrium analysis. **Plecotomus**; **Canthoporus** and **Hoplosternum thoracatum** showed hemoglobins with normal Bohr effect. On the other hand **Sturisoma robustum** presented one hemoglobin component with normal and others with reverse Bohr effects. A close relationship between Bohr effect analysed by this methodology and that usually done by equilibrium studies could be ob-

served. The heterogeneous Bohr effect could be correlated with the habitat or their ability to survive in hypoxic environment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI, Jr. A.; GALDAMES PORTUS, M.I. & WILSON, M.T.

1979 — Separation and characterization of the hemoglobin components of *Pterygoplichthys pardalis*, the acari bodo. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 173-177.

BUNN, H.F. & RIGGS, A.

1979 — The measurement of the Bohr effect of fish hemoglobins by gel eletrofocusing. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 95-99.

GALDAMES, M.I. & FOCESI, Jr. A.

1979 — Estudos comparativos de efeito Bohr em hemoglobinas de *Osteoglossum bicirrhosum* e *Pterygoplichthys pardalis*. **Acta Amazonica**, 9 (1) 147-160, 1979.

GILLEN, R.G. & RIGGS, A.

1973 — Structure and function of the isolated hemoglobins of the

American eel, *Anguilla rostrata*. **J. Biol. Chem.**, 248: 1961-1969.

HASHIMOTO, K.; YAMAGUCHI, Y.; MATSUURA, F.

1960 — Comparative studies of two hemoglobins of Salmon. IV. Oxygen dissociation curve. **Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.**, 26: 827-833.

RIGGS, A.

1970 — Properties of fish hemoglobins. **Fish Physiology**, 4: 209-252.

POWERS, D.A.

1972 — Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes. **Science**, N.Y. 177: 360-369.

POWERS, D.A.; FYHN, H.F.; FYHN, U.E.H.; MARTIN, J.P.; GARLICK, R.L.; WOOD, S.C.

1979 — A comparative study of the oxygen equilibria of blood from 40 genera of Amazonian fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 67-85.

(Aceito para publicação em 13/9/82)