

# A medida do efeito Bohr em hemoglobinas de peixe por focalização elétrica em gel (\*)

H. Franklin Bunn (1)

Austen Riggs (1)

## Resumo

Hemolisados de 16 espécies de peixes amazônicos foram analisados por focalização elétrica em gel. A mudança do ponto isoelétrico sob desoxigenação proporcionou uma avaliação segura do efeito Bohr. Certas espécies de peixe têm componentes de hemoglobina simples cujo pI aumenta significativamente sob desoxigenação, de modo similar à do homem. Outros peixes tinham hemoglobinas, cujos pontos isoelétricos não eram atingidos pela desoxigenação. Seis espécies de peixe tinham, pelo menos, dois componentes na hemoglobina um dos quais tinha um ponto isoelétrico reduzido sob desoxigenação indicando um efeito Bohr reverso enquanto que outro (s) tinha um ponto isoelétrico aumentado sob desoxigenação como ocorre com o efeito Bohr alcalino normal. Uma correlação estreita foi encontrada entre a mudança do ponto isoelétrico com desoxigenação e o efeito Bohr determinado pelas medidas de equilíbrio do oxigênio.

## INTRODUÇÃO

O efeito do pH na oxigenação da hemoglobina comumente chamado "efeito Bohr" continua a ser de interesse bioquímico e fisiológico. Pesquisadores por volta de um século concluíram que o efeito Bohr não somente facilitava o transporte de oxigênio pela hemoglobina para os tecidos mas também aumentava a capacidade das células vermelhas de retirar dióxido de carbono dos pulmões.

O critério experimental e interpretativo de Wyman (1948, 1964) estabeleceu este fenômeno como uma função de união e protótipo de interações heterotróficas nas proteínas alostéricas. A mudança da afinidade de oxigênio com o pH pode ser relacionada à afinidade

diferencial de hemoglobinas oxigenadas e desoxigenadas pelos prótons :

$$-\left(\frac{\partial \log pO_2}{\partial pH}\right)_y = \left(\frac{\delta (H^+)}{\partial y}\right)_{pH}$$

O valor da expressão, à esquerda, pode ser determinado experimentalmente pela medida do equilíbrio de oxigênio a diferentes pH, enquanto o valor da expressão à direita pode ser determinado por titulações ácido-base de soluções de oxiemoglobina e desoxiemoglobina. Essas determinações podem não ser sempre exatamente equivalentes, contudo, porque a expressão da esquerda da equação é usualmente avaliada na metade da saturação ( $y = 0,5$ ) visto que a titulação ácido-base mede a diferença total em prótons unidos pela deóxi e oxiemoglobina. Uma mudança na afinidade dos prótons pela hemoglobina com a oxigenação deve estar diretamente refletida por uma diferença no ponto isoelétrico. O uso da focalização isoelétrica em gels de poliacrilamida tem estabelecido um método rápido de resolução suficientemente alta para medir a mudança no ponto isoelétrico com a desoxigenação (Park, 1973; Bunn & McDonough, 1974). Uma variante de hemoglobina humana (Hb Syracuse  $\alpha_2\beta_2$  143 His-D Pro) com um reduzido efeito Bohr alcalino, mostrou uma redução correspondente na diferença entre o ponto isoelétrico (pI) das formas ligadas e não ligadas (Jensen *et al.* 1975).

Neste trabalho, ampliamos este caminho experimental ao estudo das hemoglobinas. Há considerável heterogeneidade nas proprieca-

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

(1) — From the Department of Medicine, Peter Bent Brigham Hospital, Harvard Medical School and the Department of Zoology, University of Texas, Austin, Austin, Texas.



des estruturais e funcionais das hemoglobinas de peixe (Riggs, 1970; Bonaventura *et al.* 1975; Brunori, 1975). Algumas espécies tem hemoglobinas na qual falta a interação heterotrópica enquanto outras contém hemoglobinas com exagerada dependência do pH na oxigenação (o chamado efeito Root). O significado fisiológico do efeito Bohr em peixe pode ser mais amplo do que nos mamíferos. Hemoglobinas com efeitos Root podem ajudar a descarga do oxigênio para dentro da bexiga natatória, capacitando o peixe de controlar sua flutuabilidade (Riggs 1970; Brunori, 1975).

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes foram obtidos durante uma expedição no R/V "Alpha Helix" à bacia do rio Amazonas. Todas as amostras foram coletadas de peixes nas águas dentro de 50 milhas do encontro do Solimões com o Negro ou em canais e lagoas adjacentes. As amostras de sangue eram obtidas e os hemolisados preparados segundo descrição de Fyhn *et al.*, (1978). Todos os experimentos de focalização em *gel* eram completados dentro de 4 dias após a preparação dos hemolisados.

As hemoglobinas eram analisadas por focalização isoeletrica em *gel* de poli-acrilamida, como descrito por Drysdale *et al.* (1971). Amostras contendo 100 µg de proteínas eram aplicadas em cilíndricos de *gel* (10 x 0,3 cm) contendo acrilamida 4% e Ampholine 2%, pH 6-8 (LKB Produkter, Bromma, Sweden). Aproximadamente, 120 minutos eram seguidos para as amostras atingirem seus pontos isoeletricos. Os *geis* eram fotografados e então coloridos com azul de bromofenol.

Uma vez que esses experimentos requeriam análises de hemoglobinas desoxigenadas, foram usadas estritas condições anaeróbicas. Uma solução de ditionito de sódio (5 mg/ml) foi preparada liberando água desoxigenada dentro do sal seco sob pressão positiva de nitrogênio. Durante o período de vinte minutos de pré-focalização, antes da aplicação da amostra, o nitrogênio foi suavemente borbulhado dentro da cuba catódica e 0,02 ml da solução de ditionito foram aplicados no topo de cada tubo. Isto foi efetivo para remover os últimos traços de oxigênio dos *geis*.

Amostras de hemoglobina eram diluídas à concentrações de 10 mg/ml em 0,05 M bistris (2,2 -bis (hidroximetil) — 2, 2', 2" — nitriloetanol pH 7,0. As amostras (0,2 ml) eram colocadas em frascos p/vacina tampados com rolha de borracha e desoxigenada por lavagem com água saturada de nitrogênio. A adição de 0,02 ml de solução de ditionito garantia completa desoxigenação. Um frasco duplicado gasificado com monóxido de carbono. Para cada hemolisado testado, três *geis* sucessivos eram carregados com desoxiemoglobina, carboxiemoglobina e uma mistura contendo iguais quantidades de cada uma delas.

O gradiente de pH que estava estabelecido sob as condições acima foram medidos segundo o método descrito por Drysdale *et al.* (1971). Fatias de *gel* (~2 mm) eram colocadas em 0,3 ml de KCl 0,01 M e completamente cortados. No dia seguinte, os tubos eram centrifugados e o pH de cada sobrenadante era medido a 5°C em um pH-metro "Radiometer pH" com um elétrodo capilar. Estes resultados confirmaram a presença de um gradiente linear de pH 6,0 a pH 7,8. Os pontos isoeletricos das bandas de hemoglobina eram estimados pela medida de suas posições nos *geis* comparadas com as de carbóxi e deoxiemoglobinas humanas.

#### RESULTADOS

Dezesseis espécies de peixe e 1 anfíbio (um caecilian, *Typhlonectes compressicauda*) foram examinadas. Os resultados estão resumidos na Tabela I. Como mostrado na Figura 1, alguns peixes tinham padrões similares aos dos hemolisados humanos: um componente maior único, cujo ponto isoeletrico aumentara significativamente sob desoxigenação. Um aumento muito menor foi observado no hemolisado de *Pseudodoras*. Várias espécies testadas tinham padrões para desoxiemoglobina que eram indistinguíveis dos da carboxiemoglobina (Fig. 2). Estes incluíam animais com componentes simples de hemoglobina tais como *Typhlonectes* e *Ageneiosus* assim como em *Lepidosiren* (não mostrado).

Muitos dos peixes que foram examinados tinham componentes múltiplos na hemoglobina. Em duas espécies, *Doras* e *Au-*



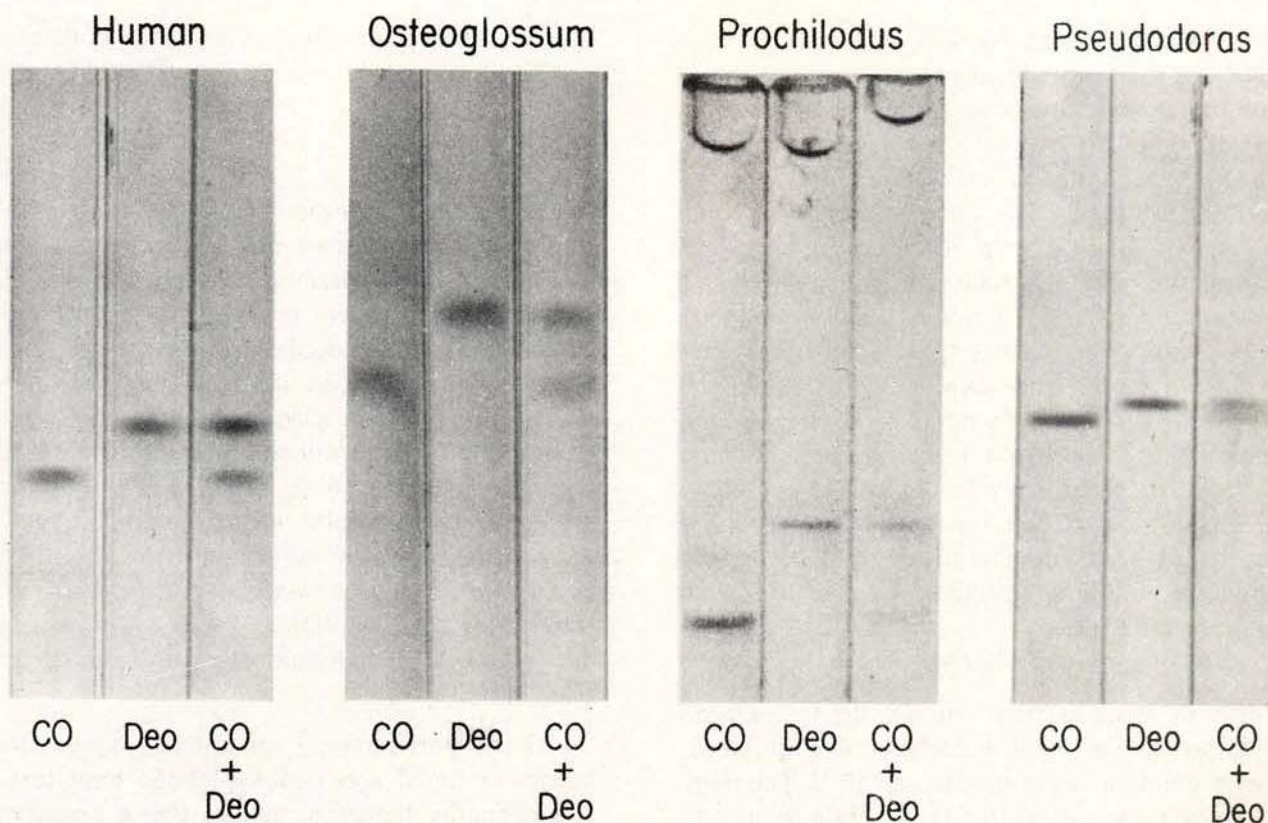


Fig. 1 — Padrões em gel de focalização elétrica de hemoglobinas de homem. *Osteoglossum*, *Prochilodus* e *Pseudodoras*. Os 3 primeiros têm um aumento de  $pI$  mais acentuado sob desoxigenação, comparados com *Pseudodoras*

*chenipterus* (Fig. 2), nenhum dos componentes da hemoglobina demonstraram qualquer mudança detectável no ponto isoelétrico sob desoxigenação. Em contraste, seis outras espécies de peixe com hemoglobina de componentes múltiplos tinham padrões mais complexos (Tabela I). Em 4 espécies mostradas na Figura 3, uma ou mais hemoglobinas cujo  $pI$  aumentava sob desoxigenação coexistiam com um componente da hemoglobina de ponto isoelétrico mais alto, que decrescia sob desoxigenação. Estes incluem *Hoplosternum* e *Pterygoplichthys*, cujas hemoglobinas foram estudadas em detalhe por Garlick *et al.* (1978) e Brunori *et al.* (1978) tanto quanto as de *Hemiodus* e *Mylossoma*.

Das dezesseis diferentes hemoglobinas analisadas por gel de focalização elétrica (Tabela 1) e equilíbrio de oxigênio foi determinado em onze (\*). Como mostra a Fig. 4, nota-

TABELA 1 — Padrões de focalização elétrica em gel de várias hemoglobinas de peixes

Padrões de hemoglobina	Efeito de desoxigenação no	ponto isoelétrico Organismo
Componente único (ou maior)	Aumenta	Human
		<i>Osteoglossum</i>
		<i>Arapaima</i> *
		<i>Prochilodus</i>
		<i>Pseudodoras</i>
	<i>Xenocara</i>	
	Não muda	<i>Typhlonectes</i>
		<i>Lepidosiren</i> *
		<i>Ageneiosus</i>
		<i>Spotted Ray</i> *
Dois ou mais componentes	Aumenta	
	Não muda	<i>Doras</i>
		<i>Auchenipterus</i>
	Aumenta e Diminui	<i>Hemiodus</i>
		<i>Mylossoma</i>
		<i>Rhytidus</i> *
		<i>Hoplosternum</i>
		<i>Pimelodus</i> *
		<i>Pterygoplichthys</i>

(\*) — Descrito em algum lugar deste volume.

(\*) — Não mostrados em figuras.



mos uma excelente correlação entre o efeito Bohr e a mudança do *pl* na desoxigenação e a determinação direta desse efeito pela medida da afinidade de oxigênio a diferentes valores de pH. Esses dados incluem os dois componentes purificados de *Hoplosternum* (Garlick *et al.*, 1978) e dois de *Pterygoplichthys* (Brunori *et al.*, 1978). A recíproca de inclinação da curva na Fig. 4 dá o número aproximado de prótons liberados tanto pela óxi como pela desoxiemoglobina por aumento de unidade no pH, nas vizinhanças do ponto isoelétrico. Este número cerca de 8 por tetrâmero, é o mesmo do valor de 8 encontrado em CO-hemoglobina de cavalos na (Cohn, *et al.*, 1937) e sugere que todas estas hemoglobinas tem curvas de titulação similares muito próximas de seus pontos isoelétricos.

Em nosso experimento, investigamos o efeito da temperatura em gel de focalização padronizada de deóxi e carbóxi hemoglobinas. Os 4 animais examinados a 15°C (homem, *Hoplosternum*, *Prochilodus* e *Hemiodus*) ti-

nam padrões indistinguíveis dos obtidos a temperaturas usuais (5°C).

#### DISCUSSÃO

Estes experimentos oferecem um novo caminho de comparação das propriedades funcionais de várias hemoglobinas. O efeito da desoxigenação sobre o ponto isoelétrico de componentes individuais da hemoglobina prevê uma determinação indireta mas exata do efeito Bohr. Esta aproximação é particularmente útil na determinação do efeito Bohr de hemoglobinas de peixe desde que este fenômeno parece ser muito variado nestes animais, em comparação com os mamíferos. Além disso, o fato de que hemoglobinas de peixes são freqüentemente múltiplas, faz a interpretação do equilíbrio de oxigênio dos hemolisados totais, difícil.

O inesperadamente encontrado de um decréscimo do *pl* sob desoxigenação num terço das espécies testadas, sugere que a presença

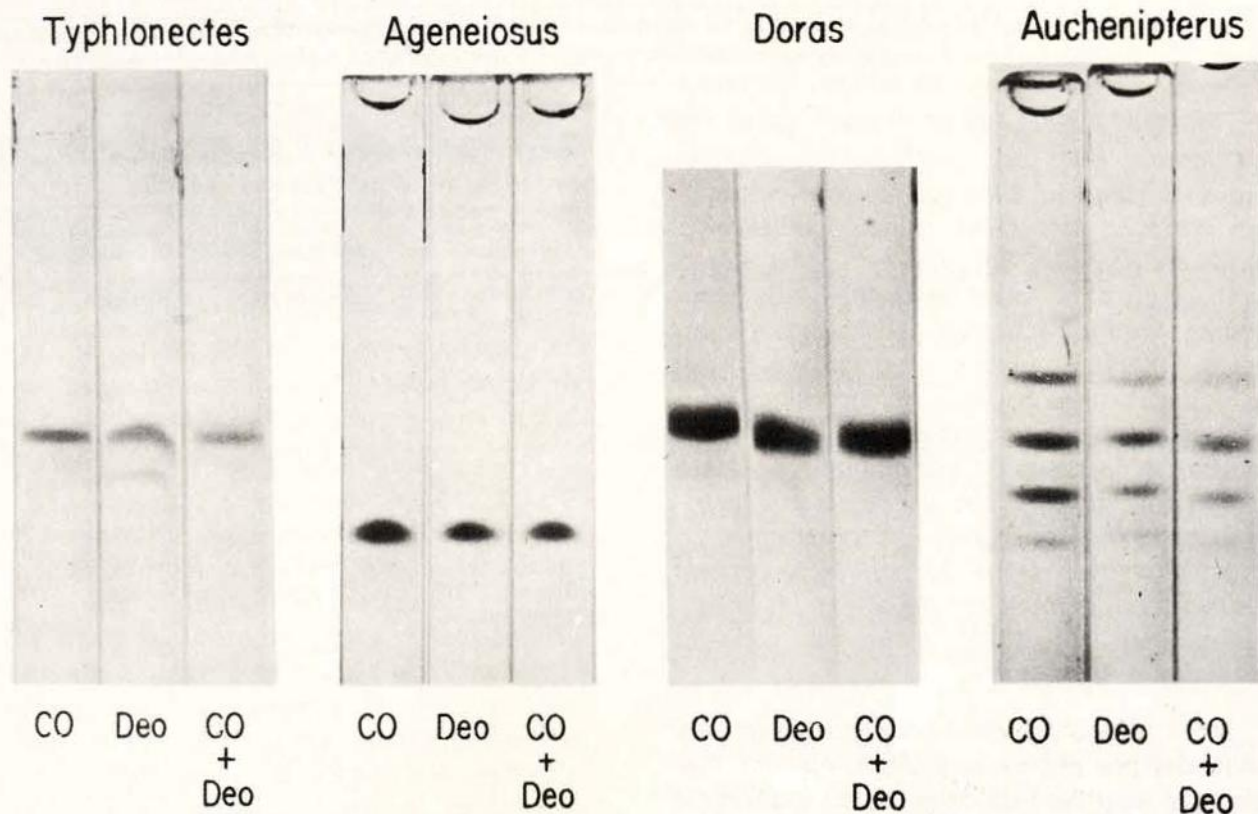


Fig. 2 — Padrões em gel de focalização elétrica de hemo globinas de *Typhlonectes*, *Ageneiosus*, *Doras* e *Auchenipterus* mostrando ausência de mudança no *pl* sob desoxigenação.



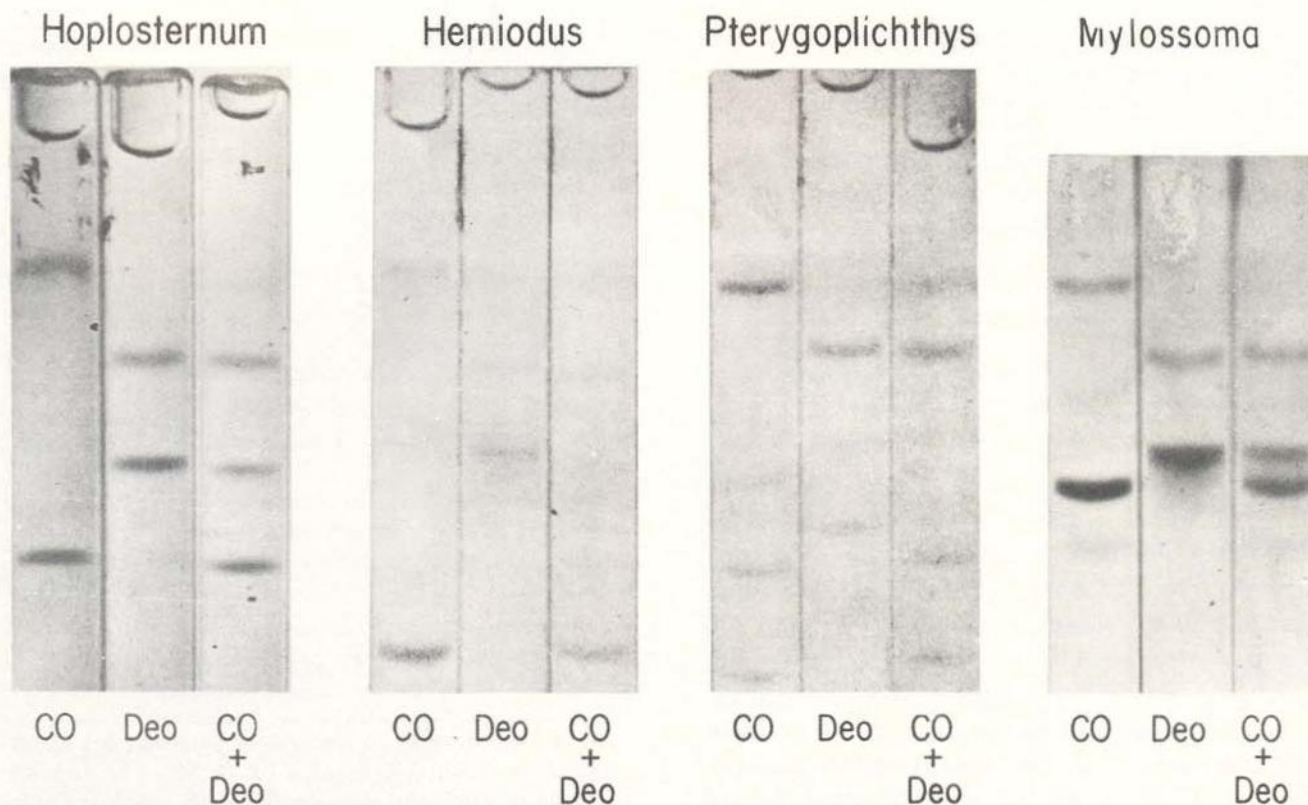


Fig. 3 — Padrões em gel de focalização isoeétrica de hemoglobinas de *Hoplosternum*, *Hemiodus* e *Pterygoplichthys* e *Mylossoma* mostrando um significativo decréscimo do pI do componente catódico da hemoglobina.

de um efeito Bohr reverso ( $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} > 0$ ) pode ser mais comum do que previamente considerado. A presença de dois componentes de hemoglobina em *Hoplosternum* com efeitos Bohr opostos foi confirmada por Garlick *et al.* (1978) que isolaram os componentes e mediram seus equilíbrios de oxigênio. De modo similar, os componentes isolados de *Pterygoplichthys* demonstraram uma forte correlação entre a mudança do ponto isoeétrico e o efeito Bohr medido. Pode ser significativo que todos os componentes que demonstraram este efeito Bohr "reverso" tenham pontos isoeétricos relativamente altos. Gillen & Riggs (1973) e Weber *et al.*, (1975) tinham observado este efeito Bohr "reverso" nos componentes catódicos de duas espécies de enguias (*Anguilla rostrata* e *Anguilla anguilla*). Efeitos Bohr reverso tem sido encontrados nas hemoglobinas de certos *Amphibia* (Watt & Riggs, 1975, Bonaventura, Sullivan, *et al.*, 1977). Será de

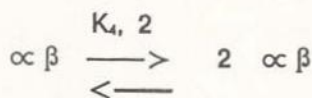
considerável interesse determinar quais resíduos de amino-ácidos são responsáveis por essas propriedades.

A interpretação fisiológica destes dados de focalização em gel precisa ser dada cautelosamente. Nossos resultados ofereciam estimativas do efeito Bohr apenas no ponto isoeétrico do componente hemoglobina. É possível que o efeito Bohr seja muito diferente a um pH fisiológico removido para longe do ponto isoeétrico. Além disso, nossos dados foram obtidos na ausência de fosfatos orgânicos do eritrócito que tem profundo efeito tanto na afinidade pelo oxigênio quanto na dependência do pH na oxigenação das hemoglobinas de peixes (Gillen & Riggs, 1971; Powers, 1972). Interessantemente, o efeito Bohr "reverso" da hemoglobina catódica de enguia era abolido pela adição de ATP (Gillen & Riggs, 1973). Finalmente, os dados do gel de focalização foram obtidos a uma única e não fisiológica temperatura (5°C). Um efeito significativo de



temperatura no efeito Bohr nas hemoglobinas de mamíferos tem sido notado (Rossi *et al.*, 1963; Antonini *et al.*, 1965).

As hemoglobinas de peixes diferem acentuadamente de hemoglobinas de mamíferos no grau em que os tetrâmeros ligados dissociam-se em dímeros:



As hemoglobinas da maior parte dos mamíferos incluindo o homem facilmente se dissociam em dímeros  $\alpha\beta$  sob condições fisiológicas ( $K_{4,2} = 4 \times 10^{-6}M$ ) (Gray, 1974). Por esta razão, quando duas hemoglobinas ligadas de cargas diferentes (i.e. Hemoglobinas humanas Hb A ( $\alpha_2\beta_2^{6 \text{ Glu}}$ ) e Hb S ( $\alpha_2\beta_2^{6 \text{ Val}}$ ) são misturadas, metade das moléculas na solução estarão na forma do tetrâmero híbrido assimétrico  $\alpha_2\beta^A\beta^S$ . Este híbrido pode ser facilmente demonstrado por eletroforese em condições anaeróbicas depois que as hemoglobinas têm sido estabilizadas por desoxigenação (Bunn & McDonough, 1974). Por outro lado, as formas ligadas de algumas e talvez todas as hemoglobinas de peixe são tetrâmeros muito mais estáveis (Edelstein *et al.*, 1976). O  $K_{4,2}$  para os dois componentes maiores da oxiemoglobina de truta (*Salmo irideus*) são de  $7,5 \times 10^{-8}M$  e  $5,2 \times 10^{-8}M$  (Brunori, 1975). Por esta razão, híbridos assimétricos estáveis podem existir no hemolisado oxigenado, e contribuir para a múltipla associação que é achada entre tantas espécies de peixes (Riggs, 1970). Assim, a formação de tetrâmeros híbridos adicionais podem não ocorrer após a desoxigenação. Não observamos a emergência de híbridos assimétricos em nenhum de nossos experimentos que foram realizados sob condições que facilmente permitem a demonstração de tais híbridos em hemoglobinas de mamíferos.

Em resumo, uma boa estimativa do efeito Bohr de componentes de hemoglobina de peixe e homem por ser obtido por focalização isoeletrica. O método consome muito menos tempo do que a medida do equilíbrio de oxigênio e pode ser facilmente feito em hemolisados sem a purificação dos componentes.

Esta aproximação serve para o levantamento de uma grande variedade de hemoglobinas de animais.

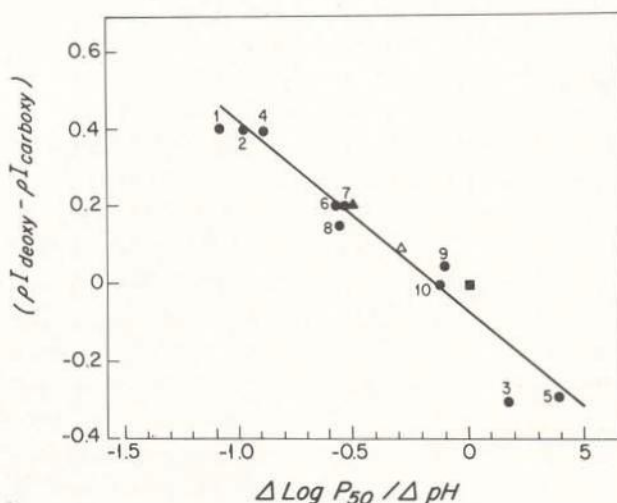


Fig. 4 — Correlação do efeito Bohr estimado dos dados de gel de focalização elétrica (pI deoxy — pI carboxi) com os determinados pelo equilíbrio de oxigênio ( $\Delta \log P_{50} / \Delta \log pH$ ); ● = hemoglobinas de peixes; ▲ = hemoglobina humana normal; ▲ = hemoglobina humana Syracuse ( $\beta$  143 His — Pro); ■ = hemoglobina de anfíbio (*Typhlonectes*). O  $\Delta \log P_{50} / \Delta \log pH$  foi calculado no pI do componente da hemoglobina. 1. *Prochilodus*, 2. *Pterygoplichthys* (componente anodal), 3. *Pterygoplichthys* (componente catódico), 4. *Hoplosternum* (componente catódico), 6. *Osteoglossum*, 7. *Arapaima*, 8. *Mylossoma* (componente anódico), 9. *Pseudodoras*, 10. *Lepidosiren*. Os pontos isoeletricos foram determinados a 4°C enquanto o equilíbrio de oxigênio foi determinado a 20°C.

#### SUMMARY

Hemolysates from 16 species of Amazon fish were analyzed by gel electrofocusing. The change in isoelectric point upon deoxygenation provided a reliable estimate of the Bohr effect. Certain species of fish had single hemoglobin components whose pI increased significantly upon deoxygenation, similar to man. Other fish had hemoglobins whose isoelectric points were unaffected by deoxygenation. Six species of fish had at least two hemoglobin components, one of which had a reduced isoelectric point upon deoxygenation indicating a reversed Bohr effect, whereas the other(s) had an increased isoelectric point on deoxygenation, as occurs with the normal alkaline Bohr effect. A close correlation was found between the change in isoelectric point with deoxygenation and the Bohr effect determined by oxygen equilibrium measurements.



## BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; FRONTICELLI, C.;  
BUCCI, E. & ROSSI-FANELLI, A.  
1965 — Studies on the Relations Between Molecular and Functional Properties of Hemoglobin. V. The Influence of Temperature on the Bohr Effect in Human and in Horse Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 240: 1096-1103.
- BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.  
1975 — Hemoglobins and hemocyanins: comparative aspects of structure and function. *J. Exp. Zoo.* 194: 155-174.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BOURNE, S.  
1977 — Anion modulation of the negative Bohr effect of haemoglobin from a primitive amphibian. *Nature* 265: 474-476.
- BRUNORI, M.  
1975 — Molecular adaptation to physiological requirements: the hemoglobin system of trout. *Current Topics in Cellular Regulation.* 9: 1-39.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI, A.;  
GALDAMES-PORTUS, M. I. & WILSON, M. T.  
1978 — Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acaribodó. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- BUNN, H. F. & McDONOUGH, M.  
1974 — Asymmetrical hemoglobin hybrids: an approach to the study of subunit interactions. *Biochemistry* 13: 988-993.
- COHN, E. J.; GREEN, A. A. & BLANCHARD, M. H.  
1937 — Studies in the physical chemistry of proteins XIV. The Amphoteric Properties of Hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 59: 509-517.
- DRYSDALE, J. W.; RIGHETTI, P. & BUNN, H. F.  
1971 — The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Biochim. Biophys Acta* 229: 42-50.
- EDELSTEIN, S. J.; McEWEN, B. & GIBSON, Q. H.  
1976 — Subunit dissociation in fish hemoglobins. *J. Biol. Chem.* 251: 7632-7637.
- FYHN, U. E. H.; FYHN, H. J.; DAVIS, B. J.;  
POWERS, D. A.; FINK, W. L. & GARLICK, R. L.  
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- 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 na hemoglobina de componentes separados de um bague de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- GILLEN, R. G. & RIGGS, A.  
1971 — The hemoglobins of fresh water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* — I. The effects of phosphorylated organic compounds upon the oxygen equilibria. *Comp. Biochem. Physiol.* 38B: 585-595.
- 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.
- GRAY, R. D.  
1974 — The effect of 2, 3-diphosphoglycerate on the tetramer-dimer equilibrium of liganded hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 249: 2879-2885.
- JENSEN, M.; OSKI, F. A.; NATHAN, D. G. & BUNN, H. F.,  
1975 — Hemoglobin Syracuse ( $\alpha_2\beta_2$  143 (H21) His — Pro), a new high-affinity variant detected by special electrophoretic methods. *J. Clin. Invest.* 55: 469-477.
- PARK, C. M.  
1973 — Isoelectric focusing and the study of interacting protein systems: ligand binding, phosphate binding and subunit exchange in hemoglobin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 209: 237-257.
- POWERS, D. A.  
1972 — Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in symmetric catostomid fishes. *Science* 177: 360-362.
- RIGGS, A.  
1970 — Properties of fish hemoglobins, in *Fish Physiology*, (Hoar W. S., and Randall, D.S., editors), Vol. 4, pp. 209-252, Academic Press, New York.
- ROSSI, L.; CHIPPERFIELD, J. R. & ROUGHTON, F. J. W.  
1963 — The effect of temperature on the titration curves of human oxygenated and reduced haemoglobin. *Biochem. J.* 87: 33 p.
- WATT, K. W. K. & RIGGS, A.  
1975 — Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Structure and function of the isolated components. *J. Biol. Chem.* 250: 5934-5944.
- WEBER, R. E.; LYKKEBOE, G. & JOHANSEN, K.  
1975 — Physiological properties of eel hemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity. *J. Exp. Biol.* 64: 75-88.
- WYMAN, J.  
1948 — Heme proteins. *Advan. Protein Chem.* 4: 407-531.
- WYMAN, J.  
1964 — Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin. A second look. *Advan. Protein Chem.* 19: 223-286.