

Efeito do pH na cinética das reações de oxigênio e monóxido de carbono com hemoglobina de *Loricariichthys* — peixe aeróbico (*)

A. Focesi Jr. (1); M. Brunori (2); J. Bonaventura (3); M. T. Wilson (4); M. I. Galdames-Portus (5)

Resumo

Loricariichthys sp., um peixe aeróbico do rio Amazonas, tem um componente hemoglobínico principal. Estudos quantitativos na cinética de dissociação de O₂ e combinação de CO a proteína foram efetuados por experimentos "stopped-flow" a diferentes valores de pH e uma concentração constante de 1,25 mM de ATP. A dissociação de oxigênio mostra um comportamento simples de 1.ª ordem e uma forte dependência de pH. Por outro lado, a cinética da combinação de CO foi homogênea e rápida a valores altos de pH, e lenta e claramente autocatalítica a valores de pH abaixo de 7,0.

INTRODUÇÃO

As adaptações anatômica e fisiológica dos peixes aeróbicos da família Loricariidae permitem-os viver sob variadas concentrações de oxigênio. Espera-se que alguns dos mecanismos de adaptação envolvam as hemoglobinas, pois as necessidades de oxigênio das espécies de *Loricariichthys* são maiores do que para outros peixes. (Britsky, E., comunicação pessoal). Para alcançar uma correlação entre as demandas respiratórias e as propriedades funcionais da hemoglobina, são necessários estudos qualitativos. Neste artigo, publicamos alguns resultados sobre a cinética das reações de O₂ e CO da hemoglobina de *Loricariichthys* em função do pH. Observe-se que o hemolisado de *Loricariichthys* contém uma banda principal de homoglobina encontrada por eletroforese em gel de poliacrilamida a qual aparece difusa e pode esta ser quimicamente heterogênea. A relação entre estes espécimes e os descri-

tos por Fyhn *et al.*, (1978) é incerta. Como Fink & Fink enfatiza, a classificação dos *Loricariidae* está num estágio primitivo. Na verdade, um espécime de *Loricariichthys* sp. revelou ser de uma espécie ainda não previamente descrita (Fyhn *et al.*, 1978; Fink & Fink, 1978). Os resultados publicados, embora preliminarmente, são mais do que nunca úteis como passo inicial para o entendimento das propriedades funcionais completas do sangue de *Loricariichthys*.

MATERIAL E MÉTODOS

O hemolisado foi preparado por lavagem dos glóbulos vermelhos recém-extraídos com NaCl a 1,7%, EDTA 10⁻³ M e pH 7,5. A hemólise foi efetuada por suspensão dos glóbulos vermelhos em 1-2 volumes de EDTA 10⁻³ M, tris-HCl 10⁻³ M pH 7,5, durante 1 hora. Após a adição de uma solução de NaCl 1,0M para uma concentração final de 0,1M, o hemolisado foi deixado por duas horas e centrifugado a 15.000 rpm (Sorvall RC-2B) para remover fragmentos celulares. Os experimentos cinéticos foram conduzidos em um aparelho "stopped-flow" Durrum-Gibson (Gibson & Milves, 1964). A concentração de hemoglobina foi medida usando-se um coeficiente de extinção milimolar de E = 13,8 a 540 nm na forma oxi (Antonini & Brunori, 1971). A concentração de monóxido de carbono foi calculada por titulação de mioglobina de cachalote com a solução gaseosa unida ao ligante.

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

(1) — Departamento de Bioquímica, I.B., Universidade Estadual de Campinas 13100 Campinas, SP. Brasil.

(2) — CNR Centre for Molecular Biology, Institutes of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Rome, Italy.

(3) — Duke University Marine Laboratory, Beaufort, N.C. 28516, USA. Established Investigator of the American Heart Association.

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

(5) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, 69000 Manaus, AM. Brazil.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) CINÉTICA DA DISSOCIAÇÃO DE OXIGÊNIO

A constante de velocidade de 1ª ordem para a dissociação de oxigênio a diferentes valores de pH foi obtida misturando-se rapidamente: (i) uma solução de hemoglobina equilibrada com ar em 2 mM de tris pH 8,0 e 2,5 mM de ATP com (ii) tampões sem gás (a diferentes valores de pH) contendo uma concentração de cerca de 1mg/ml de $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_4$. A dissociação de oxigênio segue um comportamento simples de 1ª ordem. A homogeneidade do curso de tempo desta reação sugere que a homogeneidade eletroforética não está associada com a heterogeneidade funcional grosseira.

A Fig. 1. descreve a dependência de pH na constante de velocidade de 1ª ordem para a dissociação de O_2 , e mostra um marcado efeito Bohr normal. A linha contínua é uma curva de titulação teórica para a dependência de pH de K, com os parâmetros característicos relacionados na Tabela I. Advirta-se que, também para a hemoglobina de mamíferos a constante de dissociação de O_2 segue uma dependência de pH simples, a qual foi classicamente associada com o efeito Bohr alcalino. (ver Antonini e Brunori, 1971). Os parâmetros análogos para a hemoglobina humana são também apresentados na Tabela I.

b) CINÉTICA DE COMBINAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO

Os experimentos de união de CO à hemoglobina de *Loricariichthys* foram efetuados por mistura de: (i) uma solução contendo a proteína em tampão bis-tris ou tris a diferentes valores de pH, na presença de 2,5 mM de ATP e ditonito com (ii) uma solução contendo $8,5 \times 10^{-5}$ M de CO em água sem gás. Fig. 2 mostra o curso de tempo da combinação de CO a dois valores de pH: 6,07 e 8,28. Estes experimentos foram efetuados sob condições de excesso do ligante além da concentração de heme. Assim, os dados foram tratados como um processo de aparente 1ª ordem. Pode-se notar, por comparação dos dois experimentos

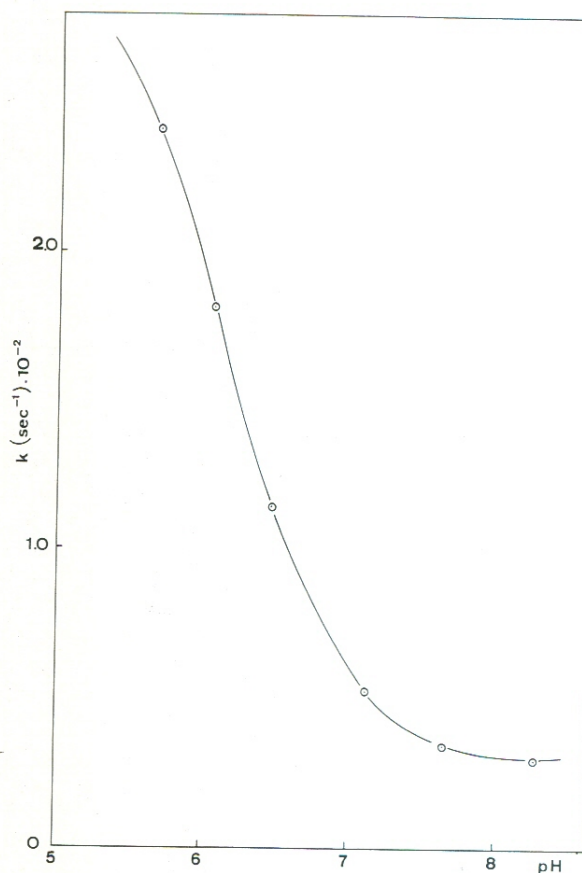


Fig. 1 — Dependência da constante de velocidade de 1.ª ordem para dissociação de O_2 em pH. A reação foi medida pelo método do ditonito em tampões bis-tris ou tris, 0,2M Cl⁻ + 1,25 mM ATP. Temperatura 20°C.

TABELA I — Cinética da dissociação de oxigênio de hemoglobina de *Loricariichthys* e humana.

Espécies	K(ácido)s-1	K(alcalino)s-1	pK app.	Temp.
<i>Loricariichthys</i> sp.	310	28	6.15	20
Homem	55	10	7.0	18

na Fig. 2, que o curso de tempo de união do ligante é de aparente 1ª ordem a pH 8,28, indicando que os efeitos de interação heme-heme cineticamente observáveis não são evidentes a este pH. Por outro lado, a valores inferiores de pH (por ex: pH 6,07), a combinação é mais lenta e claramente autocatalítica.

Isto mostra que o sistema é cooperativo a baixos valores de pH. A Fig. 3 mostra a dependência de pH da velocidade média de combina-

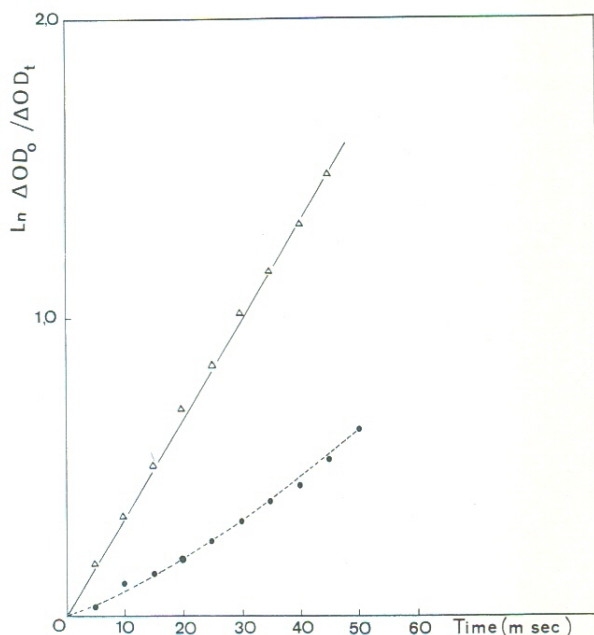


Fig. 2 — Curso de tempo da combinação de CO com deoxiemoglobina a pH 6,07 (círculos) e 8,28 (triângulos). CO após mistura = 4.3×10^{-5} M, ATP após mistura = 1,25 mM, $t = 20^{\circ}\text{C}$, comprimento de onda de observação, 420 nm.

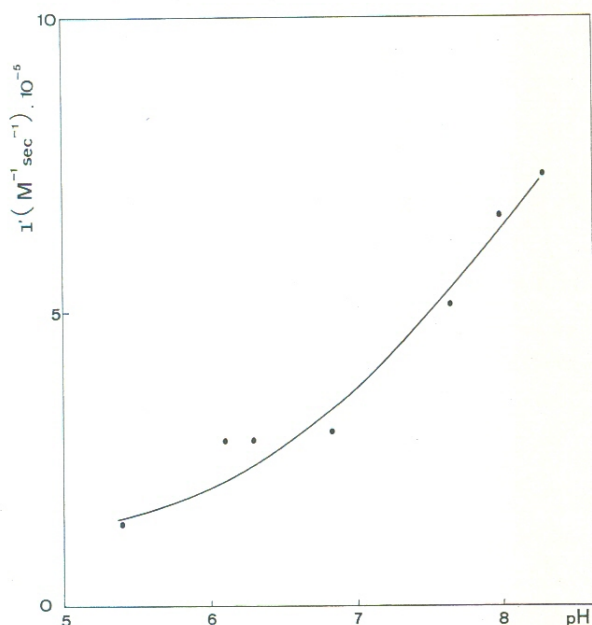


Fig. 3 — Dependência da constante de velocidade de 2.ª ordem para combinação de CO em pH. Condições experimentais como na Fig. 1.

ção total para CO (medida por volta de 50% de reação), e indica a presença de um significativo efeito Bohr normal. Se introduzirmos as conhecidas relações entre características de cooperatividade e afinidade de um modelo dois-estágios (Monod *et. al.* 1965), estes resultados sugerem que a $\text{pH} > 7$ a hemoglobina de *Loricariichthys* é caracterizada por alta afinidade e baixa cooperatividade, enquanto a $\text{pH} < 7$, os efeitos cinéticos de cooperatividade tornam-se evidentes e a afinidade total ligante decresce.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela National Science Foundation Grant PCM 75-06451. Somos gratos ao Governo Brasileiro pela permissão da entrada do "Alpha Helix" nas águas do rio Amazonas. M. Brunori, expressa seus agradecimentos ao National Research Council (CNR) da Itália pelo financiamento da viagem. M. T. agradece o suporte financeiro para a viagem concedido pela Royal Society, U. K. e Duke University, USA. A Focese Jr., recebeu auxílio parcial do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia. J.B. Bonaventura agradece a subvenção recebida de NIH Grant HL-15460 e de ONR Contract ND-0014-75-C-0190.

SUMMARY

Loricariichthys sp., an air-breathing fish from the Amazon River has one major hemoglobin component. Quantitative studies on the kinetics of O_2 dissociation and CO combination to the protein were performed by stopped-flow experiments at different pH values and a constant ATP concentration of 1.25 mM. The oxygen dissociation shows a simple first order behavior and a strong pH dependence. The CO combination kinetics, on the other hand, were homogeneous and fast at higher pH values and slow and clearly autocatalytic at pH values below 7.0.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONINI, E. & BRUNORI, M.
1971 — Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. North-Holland, Amsterdam.

- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI JR., A.;
GALDAMES-PORTUS, M.I. & WILSON, M.T.
1978 — Separação e caracterização dos compo-
nentes de hemoglobina de *Pterygoplich-
thys pardalis*, o acaribodó. *Acta Ama-
zonica*. 8(4): Suplemento. (Este volu-
me).
- FINK, W.L. & FINK, S.V.
1978 — A Amazônia Central e seus peixes. *Acta
Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este vo-
lume).
- 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).
- GIBSON, Q.H. & MILNES, L.
1964 — Apparatus for Rapid and sensitive
spectrophotometry. *Biochem. J.*, 91:
162-171.
- MONOD, J. WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P.
1965 — On the Nature of Allosteric Transitions:
A Plausible Model. *J. Mol. Biol.*, 12:
88-118.