

Patrícia Cretano de Souza

Estudo Comparativo das Hemoglobinas de Tambaqui (*Colossoma
macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do híbrido Tambacu



1910001446



Patrícia Caetano de Souza

**Estudo Comparativo das Hemoglobinas de Tambaqui
(*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do
híbrido Tambacu**

**Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Patrícia Caetano de Souza

Estudo Comparativo das Hemoglobinas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*),

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do híbrido Tambacu



T. 1446/05

Tese apresentada para obtenção
do título de Doutor em Genética

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio preto – SP

2005

1597:591.2

5729e

06/12/2005

Doação

R\$ 23,00

Autor(a)

Patricia Cactano de Souza

Souza, Patricia Cactano de.

Estudo comparativo das hemoglobinas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e do híbrido Tambaqui /
Patricia Cactano de Souza – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

78 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobina. 2. Peixe. 3. Efeito Root. 4. Efeito Bohr. I.
Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Universidade Estadual Paulista.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

São José do Rio Preto – SP

2005

Este trabalho foi realizado no Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP de São José do Rio Preto - SP.

"Os homens que mais vencem na vida foram sempre simples e generosos; mas para
as suas conquistas diárias de vencer nos lábios e espremeram com dedicação as
velocidades da vida"

Carlos Klafky

Agradecimentos

Muito tenho a agradecer às pessoas que contribuíram com seu conhecimento e ajuda para que esta tese se concretizasse.

À Prof. Dr. Gláucia Helena Barreto Rodriguez, pelo seu caráter, ética, profissionalismo e senso de união, generosidade, principalmente durante os momentos difíceis que passamos no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dr. Claudio R. Bodini Domingos, que me iniciou no estudo das hemoglobinas, pela sua amizade e pelas suas dicas sempre acertadas.

À Prof. Dr. Walter P. de Azevedo Jr., pelas valiosas sugestões no campo da qualificação.

À Prof. Dr. Paula Rafael Liberato, pelo início e ajuda nos estudos moleculares.

À Prof. Dr. Andréia Leopoldina, pela paciência no ensino das técnicas moleculares.

**“Os homens que mais venceram na vida foram sempre afáveis e generosos; iam para
as suas ocupações diárias de sorriso nos lábios e suportavam com denodo as
vicissitudes da vida”**

À técnica do Laboratório de Hemoglobinas, Elvira Ubira, pela ajuda e
por momentos em que não precisava.

Carlos Kinsley

Agradecimentos

Muito tenho a agradecer às pessoas que contribuíram com seu conhecimento e ajuda para que esta tese se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pelo seu caráter, ética, profissionalismo e acima de tudo, generosidade, principalmente durante os momentos difíceis que passei no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Cláudia R. Bonini Domingos, que me iniciou no estudo das hemoglobinas, pela sua amizade e pelas suas idéias sempre coerentes.

Ao Prof. Dr. Walter F. de Azevedo Jr., pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

À Prof^ª. Dr^ª Paula Rahal Liberatore, pelo início e ajuda nos estudos moleculares.

À Prof^ª. Dr^ª Andréia Leopoldino, pela paciência no ensino das técnicas moleculares.

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto e toda sua equipe, pelo auxílio na identificação dos espécimes.

À técnica do Laboratório de Bioquímica, Eliani Ohira, pelo apoio sempre prestado nos momentos em que mais precisava.



Aos amigos do laboratório, Hamilton, Débora, Rejane, Patrícia, Ana Lúcia, que sempre me apoiaram neste trabalho.

Aos amigos Cecília Dominical Poy e Fábio Renato Lombardi, que sempre foram generosos na transmissão de seus conhecimentos, pela ajuda na realização deste trabalho e ao Evandro, pela ajuda nos estudos funcionais e tratamento de dados.

A todos funcionários da seção de pós-graduação, pela atenção com que sempre me atenderam.

À minha sogra, Helena, pela ajuda com minha filha para que eu conseguisse realizar este trabalho.

Aos meus pais, Sílvio e Heide, e meus irmãos, Rogério e Henrique, pelo estímulo e auxílio prestados para eu chegar até aqui.

Ao meu grande marido, Paulo, sem sua ajuda nada disso teria acontecido e à nossa filha, Ana Luísa, que me mostrou que tudo é possível, apesar das dificuldades.

A Deus, pela superação dos problemas.



SUMÁRIO

Introdução: Artigo 1	10
Resumo.....	12
1-Introdução.....	13
2- Estrutura da hemoglobina.....	14
3- Controle alostérico.....	16
4- Hemoglobinas de peixes.....	18
5- Efeito Root.....	25
Referências Bibliográficas	29
Objetivos	36
Artigo 2: Comparative Functional Study of the Hemoglobins from Tambaqui (<i>Colossoma Macropomum</i>), Pacu (<i>Piaractus Mesopotamicus</i>) and the Hibrid Tambacu	37
Abstrat.....	39
Introduction.....	39
Material and Methods.....	40
Results.....	43
Discussion.....	55
References.....	61
Conclusões Gerais	67
Referências Bibliográficas referente à introdução (artigo 1) de acordo com as normas da ABNT	69
Anexo: metodologia utilizada	75

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Artigo 1

Figura 1.....	15
---------------	----

Artigo 2

Figura 1.....	43
Figura 2.....	44
Figuras 3 e 4.....	45
Figura 5.....	46
Figura 6.....	47
Figuras 7 e 8.....	48
Figura 9.....	50
Figuras 10 e 11.....	51
Figura 12 e tabela I.....	52
Figura 13.....	53
Figuras 14 e 15.....	54
Tabela II.....	55

Anexo

Figura 1.....	77
---------------	----

SOUZA. P. C. *Estudo Comparativo das Hemoglobinas de Tambaqui (Colossoma macropomum), Pacu (Piaractus mesopotamicus) e do híbrido Tambacu*. São José do Rio Preto, 2005. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Resumo

O sangue de peixes tem sido constantemente estudado pois são, entre os vertebrados, os animais que despertam maior interesse nas pesquisas sobre processos adaptativos, devido a sua posição na escala evolutiva e as suas características genotípicas, que lhes garantem enorme plasticidade na seleção de ambientes e da capacidade de algumas espécies suportarem diferentes condições de temperatura e pressão, altos índices de salinidade ou baixas concentrações de oxigênio. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o padrão eletroforético das hemoglobinas do Pacu, Tambaqui e do híbrido Tambacu, realizando também estudos funcionais de ligação de oxigênio e controle alostérico. Foi observado que os três peixes apresentam hemoglobinas múltiplas, o que é comum em hemolisados de peixes, juntamente com a presença do efeito Bohr alcalino, importante na liberação do oxigênio, e do efeito Root com função de oxigenação da retina e enchimento da bexiga natatória. As hemoglobinas do peixe híbrido são herdadas da fêmea de Tambaqui. Além disso, foi observado uma diminuição linear da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio com o aumento da temperatura, e a presença de pelo menos dois sítios de ligação para o ATP nas hemoglobinas de Tambaqui e Tambacu.

Palavras-chave: hemoglobina, efeito Bohr, efeito Root

SOUZA. P. C. *Comparative Study of the Hemoglobins from Tambaqui (Colossoma macropomum), Pacu (Piaractus mesopotamicus) and of hybrid Tambacu*. São José do Rio Preto, 2005. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

Fishes' blood has attracted constant attention from research groups because they constitute, among vertebrates, animals that, due to their position in the evolutionary scale and their genetic characteristics, ensure occupation of a variety of environments, and the ability of some species to endure different conditions of temperature and pressure, high salinity or low oxygen concentrations. The goals of the present work were to evaluate the electrophoretic pattern of the hemoglobins from Pacu, Tambaqui and the hybrid Tambacu, performing also functional studies of oxygen binding and allosteric control. We observed that the three fishes present multiple hemoglobins, a common feature of fish hemolysates, together with alkaline Bohr effect, important for oxygen release, and the Root effect, that has the purpose of ensuring oxygenation of the retina and filling of the swim bladder. The hemoglobins from the hybrid fish are inherited from female Tambaqui. Besides, we observed that there is a linear decrease of hemoglobin oxygen affinity as temperature raises, and the presence of at least two binding sites for ATP in Tambaqui and Tambacu hemoglobins.

Key-words: hemoglobin, Bohr effect, Root effect

Este texto será submetido para a revista *Genetics and Molecular Biology* como artigo de revisão.

Patrícia Cecheto de Souza e Carolina Orlando Bratti Rodriguez*

Departamento de Química e Ciências Ambientais – Laboratório de Bioquímica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Key-words: hemoglobins, fish, Bohr effect, Hald effect

(*) Corresponding Author. Phone: (517) 32332341, Fax: 3231-2356, e-mail: carolinabraz@unesp.br

FISH HEMOGLOBINS: A REVIEW

Patrícia Caetano de Souza e Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez*

Departamento de Química e Ciências Ambientais – Laboratório de Bioquímica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Key words: hemoglobins, fish, Root effect, Bohr effect

(*) Corresponding author: Phone (5517) 32212361, Fax 3221-2356, e-mail bonilla@ibilce.unesp.br



RESUMO

A hemoglobina, contida nos eritrócitos, é uma proteína de estrutura globular e quaternária, composta por quatro cadeias polipeptídicas de globina (2 alfa e 2 beta), e um grupo prostético (grupo heme), ligado a cada uma delas. Tendo a mioglobina como ancestral, adquiriu a capacidade de responder a estímulos químicos que modulam sua função, em resposta às necessidades teciduais de oxigênio. Os peixes, em geral, estão submetidos a constantes variações espaciais e temporais da oferta de O_2 , e têm desenvolvido estratégias anatômicas, fisiológicas e bioquímicas para conciliar sua fisiologia com a disponibilidade do gás no ambiente. Estruturalmente, a maioria das hemoglobinas de peixes é tetramérica, porém algumas espécies podem exibir dissociação da proteína, como as lampréias e peixe-bruxa, monoméricas quando oxigenadas e oligoméricas desoxigenadas (Perutz, 1984).

O sangue de peixes tem, em geral, várias hemoglobinas; a origem primária desse achado reside no polimorfismo que ocorre nos loci de globina, e eventualmente esse polimorfismo poderia conferir vantagens aos seus portadores, ou ser apenas um remanescente evolutivo. As propriedades funcionais, por outro lado, exibem desde a ausência de resposta a regulação alostérica, até respostas drásticas, como no caso do efeito Root, que transforma a hemoglobina em uma bomba de oxigênio.

1. Introdução

A necessidade de atender às demandas por oxigênio do metabolismo aeróbico dos animais é possível apenas graças ao papel de proteínas como as hemoglobinas contidas nos glóbulos vermelhos, que facilitam a dissolução de grandes quantidades do gás e o transportam até os tecidos, nos quais cumpre sua função de aceptor final de elétrons derivados das reações catabólicas oxidativas (Giardina *et al.*, 2004). A função da hemoglobina parece estar adaptada às diferentes necessidades metabólicas dos animais e às constantes mudanças ambientais (Riggs, 1976).

Entre os vertebrados, os peixes são os animais que apresentam maior interesse nas pesquisas sobre processos adaptativos, devido à sua posição na escala evolutiva e às suas características genótípicas, que lhes garantem enorme plasticidade na seleção de ambientes, e da capacidade de algumas espécies suportarem diferentes condições de temperatura, pressão e salinidade ou baixas concentrações de oxigênio. Também são o grupo com maior incidência de hemoglobinas múltiplas (Giardina *et al.*, 2004).

A literatura tem registrado um número elevado de trabalhos sobre adaptações bioquímicas em peixes. Segundo estas pesquisas, os peixes apresentam grande plasticidade genotípica, isto é, seu material genético está apto a sofrer alterações e pode variar, na sua expressão, de acordo com mudanças ambientais. Pode-se confirmar também, a facilidade com que os peixes formam híbridos, permitindo maior troca de informações genéticas entre espécies diferentes, e a existência de espécies que sobreviveram conservando características muito semelhantes às de seus ancestrais (Almeida-Val & Val, 1992).

A evolução das hemoglobinas dos vertebrados foi sujeita a muitas restrições seletivas. A duplicação do gene ancestral que deu origem às subunidades alfa e beta de um ancestral comum ocorreu há pelo menos 450 milhões de anos. Grandes mudanças no ambiente ocorreram durante todo este período. A evolução das hemoglobinas foi



totalmente neutra e muito dessa evolução envolveu adaptações seletivas associadas às mudanças fisiológicas e ambientais (Brittain, 2005).

2. Estrutura da hemoglobina

A hemoglobina é composta por duas partes básicas: a cadeia polipeptídica, denominada globina, e um grupo prostético, o grupo heme. Enquanto o grupo heme da hemoglobina é idêntico em todas as espécies de peixes já estudados, a globina difere de espécie para espécie e entre isoformas.

As globinas, que evoluíram de uma molécula ancestral comum por duplicação gênica e evolução divergente, parecem ocorrer em todos os organismos e tecidos, e exibem uma diversidade de estruturas quaternárias, um grande número de funções além de transportar e estocar oxigênio, conforme ilustrado pelas citoglobinas e neuroglobinas (Weber & Voelter, 2004, Fago *et al.*, 2004).

A organização dos genes das globinas foi bem caracterizada em mamíferos, aves e anfíbios. Em mamíferos, os genes das globinas alfa e beta estão localizados em diferentes cromossomos, sendo que em humanos o gene da globina alfa está no cromossomo 16 e o da globina beta no cromossomo 11. Em frangos, os genes das globinas alfa e beta também estão em cromossomos diferentes. Em anfíbios, tais como *Xenopus*, os genes estão no mesmo cromossomo. Em teleósteos, como o Salmão do Atlântico, carpa e peixe-zebra, foi observado que o gene da globina alfa adulta está adjacente ao gene da globina beta, e as globinas embrionárias são completamente diferentes das globinas adultas (Maruyama *et al.*, 2003).

Em geral, em vertebrados, a molécula de hemoglobina inclui quatro cadeias globínicas que formam um tetrâmero estável (figura 1) formado por duas cadeias tipo alfa e duas tipo beta, cada uma com um grupo heme, o que permite que quatro moléculas de

oxigênio (O_2) possam se ligar a uma molécula de hemoglobina de forma reversível, segundo o esquema abaixo:

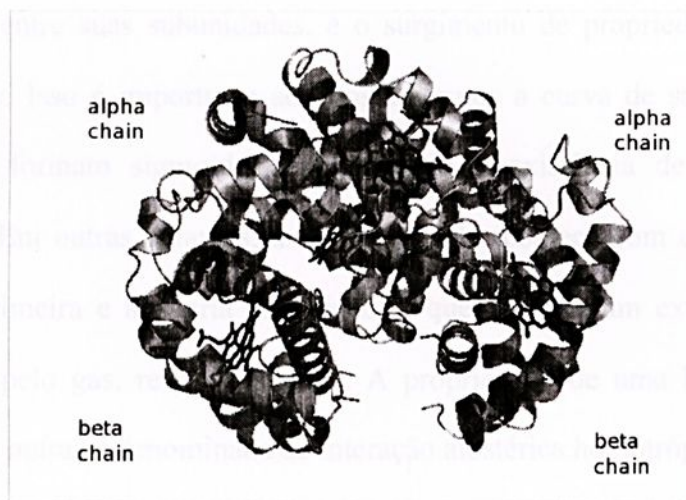
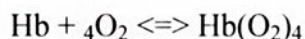


Figura1: Molécula de hemoglobina com quatro cadeias globínicas, duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma portando um grupo heme, responsável pela ligação reversível do oxigênio.

A função da hemoglobina é o transporte de oxigênio, e para tal função, ela deve ser capaz tanto de ligar-se fortemente ao oxigênio como de liberá-lo facilmente, dependendo das condições (Campbell, 2000). A ligação do oxigênio molecular é feita graças ao grupo heme, especificamente com a participação de um átomo de ferro na forma ferrosa, Fe^{2+} .

Para algumas espécies de peixes primitivos como lampréias e peixe-bruxa, ocorrem fenômenos de dissociação reversível da hemoglobina, em resposta à ligação de oxigênio. No caso das lampréias, a forma oxigenada é monomérica, sofrendo associação em dímeros e tetrâmeros ao se desoxigenar (Qiu *et al*, 2000). Em *Myxine glutinosa* (peixe-bruxa) há três hemoglobinas que são monoméricas na forma oxigenada e se associam formando heterodímeros e heterotetrâmeros ao liberarem o O_2 (Müller *et al*, 2003).

3. Controle alostérico

A estrutura quaternária garante, às hemoglobinas, a possibilidade de interação entre suas subunidades, e o surgimento de propriedades peculiares, chamadas alostéricas. Isso é importante ao considerarmos a curva de saturação por oxigênio, que apresenta formato sigmoidal, evidenciando a existência de cooperatividade entre as globinas. Em outras palavras, a ligação de O_2 acontece com uma facilitação progressiva entre a primeira e a quarta subunidades, que representam extremos de baixa e elevada afinidade pelo gás, respectivamente. A propriedade de uma ligação de O_2 interferir na ligação de outras é denominada de interação alostérica homotrópica (Brittain, 2005).

O modelo mais aceito para a explicação das propriedades alostéricas das hemoglobinas é o proposto em 1965 por Monod *et al.* De acordo com essa proposta, a hemoglobina apresenta duas formas com diferente afinidade por oxigênio: a forma de baixa afinidade, denominada “tensa” ou “T”, e a de alta afinidade, “relaxada” ou “R”. No estado desoxigenado há um predomínio do estado T, enquanto no oxigenado predomina o R (Brittain, 2005).

Contudo, outros ligantes estão envolvidos nos efeitos cooperativos que ocorrem quando o oxigênio se liga à hemoglobina, de forma a modular a afinidade por oxigênio de acordo com as necessidades fisiológicas. Tal mecanismo constituiria uma “sintonia fina” da função das hemoglobinas, e na medida em que afetam a ligação do O_2 ao grupo heme ao se ligarem em sítios diferentes, eles representam as interações alostéricas heterotrópicas (Giardina *et al.*, 2004). As espécies químicas capazes de causar tais alterações, são denominadas de efetores ou agentes alostéricos. Esses efetores ligam-se preferencialmente a um dos estados da hemoglobina, T ou R, estabilizando-os e assim potencializando suas propriedades de ligação de O_2 (Tsuneshige *et al.*, 2002). A ligação do efector pode ocorrer a ambos os estados canônicos ou clássicos, de forma significativa,

como ocorre com a hemoglobina do dromedário (Amiconi *et al.*, 1985) e do peixe matrinxã (Bonilla-Rodriguez e Poy, 2004). Os efetores heterotrópicos podem induzir sub-estados além dos citados acima, como foi determinado nas hemoglobinas de tamoatá (Peres *et al.*, 2004).

Tanto o H^+ como o CO_2 que também se ligam à hemoglobina, afetam a afinidade dela pelo oxigênio, alterando a estrutura tridimensional da proteína de maneira sutil. O efeito do H^+ sobre a afinidade por O_2 é chamado de efeito Bohr. Em geral, um aumento na concentração de H^+ , isto é, uma redução do pH, diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Giardina *et al.*, 2004, Jensen, 2004), caracterizando o efeito Bohr alcalino ou normal. A hemoglobina apresenta uma afinidade menor pelo oxigênio nessas condições e o libera nos tecidos, ou seja, a proteína retira um próton do meio, agindo como base, enquanto nos órgãos de troca gasosa faz exatamente o contrário, liberando os prótons e ligando oxigênio.

Uma variação, chamado efeito Bohr ácido ou reverso, consiste num aumento da afinidade pelo oxigênio quando o pH diminui, ocorrendo inclusive na hemoglobina humana adulta, HbA, em pH abaixo de 6,5 (Campbell, 2000).

O efeito Bohr alcalino desempenha um papel importante, modificando a afinidade do oxigênio pela hemoglobina, aumentando sua captação nos pulmões e facilitando sua liberação nos tecidos, em particular quando o tecido muscular esquelético libera ácido láctico durante o exercício intenso (Yokoyama *et al.*, 2004).

Os resíduos responsáveis pelo efeito Bohr normal têm sido identificados (Giardina *et al.*, 2004), tendo uma participação importante da His146 (beta), que forma uma interação salina com o Asp94 (beta) na forma desoxigenada. Outro resíduo importante é a Val 1 (alfa), cuja participação dependeria de vários fatores: 1) da presença de cloreto, 2) da acetilação ou formilação do resíduo, e 3) da proporção de CO_2 combinado ao N-terminal.

Os fosfatos orgânicos, particularmente, o 2,3-BPG, IPP, ATP e GTP¹, ligam-se em geral de forma preferencial à desoxi-hemoglobina, reduzindo sua afinidade pela hemoglobina. A afinidade do sangue pelo oxigênio depende da concentração da hemoglobina, da sua sensibilidade em relação aos efetores heterotrópicos, da concentração destes ligantes dentro dos eritrócitos e da temperatura. Mudando estes parâmetros, o animal pode alterar a afinidade do sangue pelo oxigênio, ajustando a transferência do oxigênio de acordo com as necessidades fisiológicas e/ou as condições ambientais (Val, 1995).

Os resíduos responsáveis pela ligação de fosfatos à Hb desoxigenada têm cargas positivas: His 2, Lys 82 e His 143 das cadeias beta, e o grupo amino da Val 1, das cadeias alfa (Arnone, 1972).

4. Hemoglobinas de peixes

As hemoglobinas são particularmente importantes nos estudos de adaptações em peixes, na medida em que elas constituem uma interface entre o organismo e o ambiente (Landini *et al*, 2002). Os peixes, em particular, enfrentam um ambiente muito variável, e alterações temporais e espaciais na disponibilidade de oxigênio.

Uma ampla variedade de ajustes bioquímicos e fisiológicos, a fim de melhorar a transferência de O₂, é observada em peixes expostos à hipóxia ambiental e durante anemia. Muitas espécies de peixes da Amazônia obtêm O₂ diretamente do ar quando submetidos a hipóxia. As alterações anatômicas que permitem respiração aérea acessória incluem modificações de brânquias, boca, estômago, intestino e vascularização da bexiga natatória (Val, 1996, Oliveira *et al.*, 2001). As espécies que não têm essa capacidade são obrigados a efetuar alterações metabólicas e comportamentais para lidar

¹Abreviações de 2,3-bisfosfoglicerato, inositol pentafosfato, adenosina e guanosina trifosfato, respectivamente.

com o desafio (Val, 1996, Riggs, 1979). Tais ajustes envolvem a frequência e volume de ventilação, frequência cardíaca, aumento do número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina, alteração da concentração de fosfatos orgânicos, a presença de iso-hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais, e depressão metabólica (Val, 1996).

As adaptações fisiológicas envolvem a depressão nas demandas metabólicas por energia e obtenção desta graças à via glicolítica, produzindo lactato como produto final. Esses ajustes são modulados pela expressão variável de enzimas daquela via, como a lactato desidrogenase, LDH (Almeida-Val e Farias, 1996). Em algumas espécies, como *Carassius carassius*, o produto final é o etanol (Nilsson, 2001), outorgando maior capacidade de resistir à hipóxia e anóxia por longos períodos, durante o inverno do norte europeu.

As várias frações de hemoglobinas presentes nas espécies de peixes foram chamadas de iso-hemoglobinas primeiramente por Powers, 1980. A ocorrência de hemoglobinas múltiplas é comum em hemolisados de peixes (Fyhn *et al.*, 1979; Di Prisco e Tamburrini, 1992; De Young *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995). A origem primária desse achado reside no polimorfismo que ocorre nos loci de globina constituintes dessas hemoglobinas, e duas hipóteses poderiam ser levantadas para evolução desses polimorfismos. A primeira seria chamada de “selecionista”, enquanto a segunda seria a “neutralista”, explicando a diversidade de hemoglobinas por mutações neutras (Pérez *et al.*, 1995; Kimura, 1989). Uma intensa análise de dados a respeito de hemoglobinas de peixes de várias espécies, leva a apoiar em definitivo, de acordo com Pérez e colaboradores (1985), a segunda hipótese, como causa da maioria das variações de sequência e também por operar em de resíduos de posições-chaves.

Do ponto de vista selecionista, na medida em que a heterogeneidade estrutural causa uma heterogeneidade funcional, pode se supor que espécies com

hemoglobinas múltiplas, atuando em combinação, podem ter melhor capacidade de transporte de gás durante variações ambientais, do que quando existe apenas um tipo de hemoglobina. Dessa forma, a heterogeneidade da hemoglobina teria um valor seletivo em ambientes instáveis. Trabalhos como os de Houston e Cyr (1974), demonstram que ocorre a variação do padrão de hemoglobinas com a aclimação em diferentes temperaturas em *Carassius auratus*, o que reforçaria a hipótese do polimorfismo como valor adaptativo. Em geral, o número maior de componentes de hemoglobina encontrada não apenas em peixes, mas também em répteis e anfíbios, é grande quando comparado com mamíferos e aves. Esta multiplicidade de componentes gera questões relativas a sua origem e seu possível significado funcional.

Um fenômeno adicional, constatado em hemoglobinas de algumas espécies de peixes, é a possibilidade de “troca” de dímeros entre hemoglobinas diferentes levando a arranjos assimétricos conforme verificado na carpa (Okhubo *et al.*, 1993). Dessa forma, o número de isoformas pode ser significativamente elevado por essa propriedade, observada “in vivo” e “in vitro”.

Outra possibilidade para explicar a existência de hemoglobinas múltiplas, mesmo quando nem sempre elas tenham diferenças funcionais perceptíveis, é o fato da desoxi-hemoglobina se encontrar no limite da sua solubilidade, e as isoformas evitariam a precipitação dentro do eritrócito (Riggs, 1979).

A pesquisa a respeito da presença de várias iso-hemoglobinas e a significativa variabilidade estrutural e funcional observada entre elas tem aumentado, gerando um volume significativo de dados nessa área. Conforme comentado por De Young *et al.* (1994), as hemoglobinas de peixes permitem o estudo de propriedades funcionais presentes de forma normal ou “exagerada”, ou até ausentes. (Gorr *et al.*, 1991; Cepregagonova *et al.*, 1992; Dafré & Reischl, 1997; Falk *et al.*, 1998).

Em geral, a literatura relativa a hemoglobinas de peixes divide essas proteínas em catódicas e anódicas, de acordo com o comportamento eletroforético. Em geral as Hb catódicas (também chamadas de Classe II), com maior ponto isoelétrico, têm baixa afinidade por O_2 e ausência de efeito Bohr. Já as anódicas, Classe I, têm menor afinidade e elevada sensibilidade a prótons (Weber, 1996). Algumas Hb catódicas, contudo, como a do tamoatá (*Hoplosternum littorale*), exibem efeito Bohr reverso e ligação significativa de fosfatos em pH baixo (Weber, 1996, Peres *et al*, 2004).

Por exemplo, *Salmo irideus* e *Salmo gairdneri* contêm quatro componentes de iso-hemoglobinas, sendo que a fração I não apresenta ligação de prótons, enquanto a fração V sim, na forma de efeitos Bohr e Root. O sangue da carpa (*Cyprinus carpio*) apresenta três bandas de hemoglobinas em gel de amido e quatro na focalização isoelétrica (Di Prisco & Tamburrini, 1992).

Em relação ao sangue da truta (*O. mykiss*), antes citado, existem controvérsias a respeito do número de frações de hemoglobinas, pois dependendo do método analítico, têm sido encontradas de seis a nove frações. A cromatografia de FPLC (*fast performance liquid chromatography*) de troca aniônica mostrou que há nove frações, identificando cinco cadeias alfa e quatro cadeias beta. Essa multiplicidade permitiria um melhor tamponamento do pH dentro do eritrócito e uma alta concentração de hemoglobina. Alterações na quantidade relativa das diferentes hemoglobinas, com correspondente ajuste das propriedades de ligação do oxigênio, pode representar adaptações a fatores ambientais como a temperatura (Fago *et al*, 2002).

A hemoglobina I (20% do total) da truta não apresenta efeito Bohr e não é sensível à fosfatos orgânicos, enquanto que a hemoglobina IV (60% do total) mostra efeito Bohr e é sensível a fosfatos orgânicos, apresentando também perda da cooperatividade em pH baixo, refletindo a presença do efeito Root (Fago *et al*, 2002). A hemoglobina tipo IV é a maior transportadora de O_2 consistindo de três tipos de cadeias beta (em quantidades

iguais) e três tipos de cadeias alfa (uma em maior concentração). No caso da Hb tipo I, é menos complexa porque contém apenas um tipo de cadeia beta e dois tipos de cadeias alfa que diferem em várias posições sugerindo duplicações do gene da globina alfa (tipo I). As cadeias alfa e beta da hemoglobina I diferem consideravelmente das cadeias alfa e beta da hemoglobina IV indicando a existência de genes da globina beta (I) e alfa (I) separados dos genes da globina beta (IV) e alfa (IV). (Cepregagonova *et al.*, 1992; Gabbianelli *et al.*, 2004).

A hemoglobina I da truta não apresenta efeito Bohr, ou seja, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio não depende do pH, mas apresenta cooperatividade. Já a hemoglobina IV mostra um grande efeito Bohr e pronunciada sensibilidade aos fosfatos orgânicos, e a baixo pH há efeito Root que causa secreção do oxigênio para dentro da bexiga natatória e da retina. Em pH 7,8, a hemoglobina IV está totalmente na forma oxigenada, enquanto que em pH 6,0, ela está totalmente na forma desoxigenada, como consequência do efeito Root (Fago *et al.*, 2002, Gabbianelli *et al.*, 2004).

A principal função da fração I da truta é garantir oxigênio aos tecidos, fornecendo um suprimento normal de oxigênio em casos de emergência, enquanto que o papel básico da hemoglobina IV é liberar oxigênio contra uma pressão alta dentro da bexiga natatória. Estudos de dicroísmo circular, demonstram grandes diferenças estruturais na hemoglobina I e na hemoglobina IV que estão relacionados aos papéis fisiológicos diferente que elas desempenham como transportadoras de gás (Gabbianelli *et al.*, 2004).

Muitas espécies de peixes do mundo foram investigadas com relação à demanda adequada de oxigênio aos tecidos durante variações ambientais. Tem sido feito estudos com a espécie *Labeo capensis* de água doce, relacionando os efeitos de temperatura e as taxas de consumo de oxigênio e foi observado um metabolismo aeróbico elevado a baixas tensões de oxigênio, que está correlacionado com a alta afinidade da hemoglobina ao oxigênio na forma *stripped*.

Como em outros vertebrados ectotérmicos, os peixes podem adaptar mudanças na temperatura ambiental e hipóxia, aumentando seu conteúdo de hemoglobina total ou provocando mudanças nas características de oxigenação como na estrutura ou nas concentrações relativas dos componentes de hemoglobinas individuais (Frey *et al*, 1998, Brix *et al*, 2004).

Em virtude de todas estas pesquisas, pode-se supor que num determinado momento geológico, houve como um produto final do processo evolutivo, uma seleção de fatores adaptativos que permitiram a sobrevivência de certas espécies em ambientes adversos ao seu metabolismo (Almeida-Val & Val, 1992).

Em resposta a pressões ambientais, modificações na fisiologia, no número de isoformas das hemoglobinas dos peixes e na atuação das mesmas como a presença ou ausência de efeito Bohr e Root, atuando de formas variadas nas diferentes espécies, permite uma maior exploração de ambientes, que a princípio seriam desfavoráveis, refletindo uma grande adaptabilidade a estes locais.

Val *et al*, (1992), estudando as hemoglobinas de *Prochilodus nigrans*, mostraram que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia de acordo com os níveis eritrocitários de GTP e ATP. Uma baixa afinidade foi observada em novembro quando as taxas de GTP e ATP estavam altas. Uma alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio foi observada em julho, simultaneamente com baixos níveis de GTP e ATP. Val *et al* (1990), observaram alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, devido a mudanças nos níveis intraeritrocitários de fosfatos orgânicos em espécimes de *Pterygoplichthys mustiradiatus*, quando expostos a condições de hipóxia. Affonso (1990), observou uma mudança sazonal na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em *Hoplosternum littorale*.

A acidificação do sangue não resulta em uma completa desoxigenação de toda a hemoglobina, mas uma pequena fração permanece oxigenada, mesmo em pH baixo. Isto se deve em parte à presença de hemoglobinas múltiplas, e estas hemoglobinas



múltiplas tem diferentes propriedades de ligação de oxigênio (Verde *et al*, 2002; Fago *et al*, 1997).

Há uma diminuição na concentração de ATP e GTP em peixes da Amazônia expostos à hipóxia. Diminuição da concentração de fosfatos orgânicos também foi observada quando houve aumento da temperatura ambiental. Weber (1996) relata a diminuição da concentração de nucleotídeos trifosfato em várias espécies de peixes após submetidos a hipóxia. Quando a temperatura ambiental aumenta, a quantidade de oxigênio dissolvido na água diminui.

As hemoglobinas de vertebrados se encontram contidas em células especializadas denominadas glóbulos vermelhos ou eritrócitos, que podem ser nucleadas ou anucleadas. Na grande maioria dos peixes os eritrócitos são ovais e nucleados, e bem maiores do que os de mamíferos (Tocidlowski *et al*, 1997), e seu número varia de 800 mil a 3,5 milhões/mm³. Os leucócitos são numerosos, na faixa entre 20 mil e 50 mil/mm³, sendo que em algumas espécies atingem valores acima de 100 mil/mm³ (Junqueira & Carneiro, 1991).

A eritropoese em peixes inicia-se no saco do ovo seguido pela massa celular intermediária. Esses locais são de origem transitória, ou seja, constituem a geração primitiva de células vermelhas que faz seu primeiro aparecimento filogenético em peixes e que são subsequentemente representados em todas as classes de vertebrados incluindo mamíferos. A produção da geração definitiva de eritrócitos está centrada no tecido pré-esplênico do trato gastrointestinal e no baço, em ciclóstomos, dipnói e condricteis, enquanto que em teleosteos ele está localizado nos rins com ou sem participação esplênica (Glonmski *et al.*, 1992). Na truta arco-íris (*O. mykiss*), as globinas embrionárias são inicialmente expressas na massa celular intermediária localizada abaixo da notocorda em embriões de 6 a 7 dias, enquanto que as globinas adultas são expressas em células eritróides no sangue, fígado e rim (Maruyama *et al*, 2003).



A grande maioria das espécies de peixes apresentam hemoglobinas simétricas, isto é, dois pares de cadeias globínicas idênticas. Todavia, algumas espécies de peixes apresentam hemoglobinas assimétricas, isto é, pelo menos três cadeias globínicas diferentes presentes em uma única molécula de hemoglobina (Val, 1995, Dafré & Reischl, 1997).

A região amazônica é considerada a mais rica em espécies de peixes de água doce do mundo (Weber, 1996). O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) está entre elas. Esta espécie apresenta excelentes características para criação, juntamente com o matrinxã, jaraqui, acará-açu e pirarucu. O Tambaqui é uma espécie nativa dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes. Apresenta alto valor comercial atingindo até 30 quilos de peso, é rústico e tolera baixos teores de oxigênio na água (Val & Honczaryk, 1995).

As concentrações de hemoglobinas são afetados pelo sexo, idade, estação do ano e meio ambiente (Glomski *et al.*, 1992). O tambaqui (*Colossoma macropomum*), por exemplo, é um teleósteo migratório de água doce que apresenta grande tolerância a mudanças de pH e quantidade de O_2 na água e resistência com relação a mudanças em parâmetros físicos-químicos que ocorrem durante o dia na água e oscilações sazonais (Marcon & Filho, 1999).

5. O efeito Root

O efeito Root é uma propriedade funcional de uma ou mais hemoglobinas em alguns teleósteos. Esta propriedade consiste em uma redução drástica da afinidade da hemoglobina por oxigênio, o que resulta em uma diminuição da capacidade de transporte de oxigênio quando o pH diminui e as tensões de oxigênio estão altas. Diferenças na expressão tanto do efeito Bohr, bem como do efeito Root, estão relacionadas à estrutura primária das iso-hemoglobinas (Val, 1995; Pelster & Decker, 2004). O efeito Root pode



ficar mais acentuado pela adição de ATP ou GTP (Val, 1995). Um exemplo é a hemoglobina majoritária do matrinxã, cuja saturação cai a 45% na presença de ATP, abaixo de pH 7,0 (Bonilla-Rodriguez & Poy, 2004). As hemoglobinas com efeito Root não têm efeito Bohr ácido, e em pH ácido a cooperatividade tende a ser nula (Brittain, 2005); por isso não é correto catalogar esse efeito como um “efeito Bohr exagerado”, a exemplo de alguns trabalhos recentes, como o de Bonaventura et al., 2004.

A bexiga natatória do peixe é um órgão que colabora no ajuste da flutuação, sendo enchida com O_2 do sangue por difusão. A acidificação que produz o efeito Root, não é produzida pelo eritrócito, e sim por estruturas anatômicas especiais. De acordo com Pelster (2001), o efeito Root é necessário para o enchimento da bexiga natatória, e para o suprimento de oxigênio para a retina do peixe, que não é capilarizada. A pressão parcial de gás necessária para que ocorra a difusão do sangue para a bexiga natatória é conseguida através da redução da capacidade de transporte de gás do sangue, que é obtida através da acidificação do sangue. Os ácidos láctico e carbônico, necessários para a acidificação do sangue, são produzidos por células epiteliais da bexiga natatória, que são chamadas de glândulas de gás. Essas glândulas, embora apresentem um excelente suprimento de oxigênio, têm seu metabolismo oxidativo muito baixo, e produzem ácido láctico pela via glicolítica, bem como CO_2 pela via das pentoses fosfato. Ambos metabólitos reduzem a capacidade do sangue de transportar oxigênio, desencadeando o efeito Root. Isto gera um aumento na pressão parcial de oxigênio do sangue, seguido pela difusão da pressão parcial de oxigênio para dentro do lúmen da bexiga natatória (Pelster & Decker, 2004).

Outra estrutura anatômica que requer efeito Root, é a retina do peixe. O efeito Root é desencadeado pela liberação de ácidos de células da retina e isto gera um gradiente de pressão parcial necessário para cobrir a distância longa de difusão até a retina (Bridges *et al.*, 1998). Esta parece ser a função fisiológica mais importante do efeito Root,

uma variação estrutural e funcional, entre hemoglobinas que não respondem a efeitos

uma vez que ele existe em algumas espécies que não têm bexiga natatória (Pelster & Decker, 2004).

Perutz & Brunori(1982), postularam que a presença de uma serina na posição F9 da cadeia beta seria fundamental para que uma hemoglobina apresente efeito Root. Contudo, Nagai et al. (1985), *apud* Brittain (1985) demonstraram que tal substituição não é essencial.

Não se sabe ainda se essas interações afetam o estado T (tenso) ou o estado R (relaxado) da hemoglobina (Pelster & Decker, 2004). Teoricamente, tanto a estabilização do estado T, diretamente, quanto a desestabilização do R, poderiam produzir o efeito Root, sendo importantes alguns resíduos, porém também alterações da estrutura secundária, e possivelmente não exista apenas uma combinação capaz de gerar o efeito Root (Bonaventura *et al.*, 2004).

No campo das certezas, conforme demonstrado em hemoglobina de atum, uma interação, em particular, seja responsável pela metade do efeito Root, pelo compartilhamento de um próton entre dois resíduos de aspartato: Asp95 (alfa) e Asp101(beta), que se aproximam no estado T pela rotação dos dímeros. A mesma hemoglobina mostra, ainda, duas interações, uma envolvendo a histidina distal e o grupo heme, e uma terceira a His69(beta) e Asp72(beta) (Brittain, 2005). As análises de outra hemoglobina que tem sido um exemplo clássico de efeito Root, de *Leiostomus xanthurus* (Mylvaganam et al., 1996), propoem a existência de uma região carregada positivamente, entre as cadeias beta, que protonada desestabilizaria o estado R.

Conforme apontado por Brittain (2005), provavelmente, ao longo da evolução, surgiram várias combinações de resíduos-chave e alterações secundárias capazes de outorgar a algumas hemoglobinas uma extrema sensibilidade à acidificação do sangue.

Em resumo, as hemoglobinas de peixes oferecem ao pesquisador uma enorme variação estrutural e funcional, com hemoglobinas que não respondem a agentes



alostéricos clássicos, ou que o fazem de forma “exagerada”, ou que ligam o oxigênio cooperativamente, sem cooperatividade ou com cooperatividade “negativa”. Certamente, apesar de existir uma extensa literatura a respeito de hemoglobinas de peixes, ainda restam muitas questões a serem respondidas, e as respostas definitivas dependem cada vez mais de abordagens multidisciplinares com a contribuição de bioquímicos, químicos, físicos e biólogos. Mais de 20 anos após Perutz formular uma série de questões (Perutz, 1984), elas continuam sem resposta.

Amazonas. MSB. Brasília. PPG INPA/FAU. Manaus. 87p.

Almeida-Val VMB and Torres D (1996). Respiration in fish of the Amazon: Metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon. Ed. By Al. Val, VMB Almeida-Val and DV Kistall. INPA, Manaus. 1996, pp. 253-271.

Almeida-Val VMB and Val AL (1992). Adaptação fisiológica dos peixes da Amazônia. Ciência Hoje 120: 124-128.

Amiconi G, Bertollini A, Bellotti A, Delam M, Carola SG and Brunori M (1985). Evidence for two oxygen-linked-binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. Eur J Biochem 150:382-393.

Andrew A (1977). X-Ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature 232: 146-149.

Bergmann F, Choudhary AI, Weber RE (2004). New insights into the proton-dependent oxygen effects of Hsp-113⁺ binding. Biophys J 87: 245-258.

Bonilla-Rodriguez LM and Kitzberg E (2004). The evolution of the phosphate binding in two sites and the role of the Hsp-113⁺ binding in the regulation of the oxygen binding in a T-state. In: The Molecular Basis of Environmental Adaptation. Symposium Proceedings. American Fisheries Society pp. 83-95.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas abaixo estão de acordo com as normas da revista **Genetics and Molecular Biology**

- Affonso EG (1990) Estudo sazonal de características respiratórias do sangue de *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) da ilha da Marchantaria, Amazonas. MSc thesis, PPG INPA/FAU, Manaus, 87p.
- Almeida-Val VMF and Farias IP (1996) Respiration in fish of the Amazon: Metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. Ed. By AL Val, VMF Almeida-Val and DJ Randall, INPA, Manaus, 1996, pp. 257-271.
- Almeida-Val VMF and Val AL (1992) Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. *Ciência Hoje* 120: 124-129.
- Amiconi G, Bertollini, A, Bellelli, A, Coletta, M, Condò, SG and Brunori M (1985) Evidence for two oxygen-linked binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. *Eur. J. Biochem.* 150: 387-393.
- Arnone A (1972) X-Ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* 237: 146-149.
- Bonaventura C, Crumbliss AL, Weber RE (2004) New insights into the proton-dependent oxygen affinity of Root effect haemoglobins. *Acta Physiol. Scand.* 182: 245-258.
- Bonilla-Rodriguez GO, Poy CD (2004) The combined effect of phosphate binding to two sites and protons can lock the major hemoglobin from *Brycon cephalus* (matrinxã) in a T-state.. In: VI International Congress on the Biology of Fish, 2004, Manaus, AM. The Molecular Basis of Environmental Adaptation: Symposium Proceedings, American Fisheries Society pp. 83-96.

- Bridges CR, Berenbrink M, Muller R, Waser W (1998) Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 67-77.
- Brittain T (2005) Root effect hemoglobins. *J. Inorg. Biochemistry* 99:120-129.
- Brix O, Thorkildsen S, Colosimo A (2004) Temperature acclimation modulates the oxygen binding properties of the Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) genotypes HbI*1/1, HbI*1/2, and HbI*2/2- by changing the concentrations of their major hemoglobin components (results from growth studies at different temperatures). *Comp. Biochem. Physiol. A* 138: 241-251.
- CAMPBELL, M. K. 2000. *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Ceprenagova B, Wilson JB, Webber BB, Kjovkareska B, Efremov GD, Huisman THJ (1992) Heterogeneity of the hemoglobin of the Ohid Trout (*Salmo l. typicus*). *Biochem. Genet.* 30: 385-399.
- Dafré AL, Reischl E (1997) Asymmetric hemoglobins their thiol content and blood glutathione of the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 116: 323-331.
- De Young A, Kwiatkowski LD and Noble RW (1994) Fish hemoglobins. *Methods in Enzymology* 231: 124-150.
- Di Prisco G and Tamburrini, M (1992) The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 661-671.
- Fago A, Hundahl C, Malte H, Weber, RE (2004) Functional Properties of Neuroglobin and Cytochrome. Insights into the Ancestral Physiological Roles of Globins. *IUBMB Life* 56: 689-696(8).
- Fago A, Forest E, Weber, RE (2002) Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 335-342.



- Fago A, Bendixen E, Malte H, Weber RE (1997) The anodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Molecular basis for allosteric effects in a Root-effect hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 272: 15628-15635.
- Falk TM, Villwock W, Renwranz L (1998) Heterogeneity and subunit composition of the haemoglobins of five tilapiine species (Teleostei, Cichlidae) of the genera *Oreochromis* and *Sarotherodon*. *J. Comp. Physiol.* 168: 9-16.
- Frey BJ, Weber RE, Van Aardt WJ, Fago A (1998) The haemoglobin system of the mudfish, *Labeo capensis*: adaptations to temperature and hypoxia. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 120: 735-742.
- Fyhn UEH, Fyhn HJ, Davis BJ, Powers DA, Fink, WL, Garlick RL (1979) Hemoglobin heterogeneity in Amazonian Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 62: 39-66.
- Gabbianelli R, Zolese G, Bertoli E, Falcione G (2004) Correlation between functional and structural changes of reduced and oxidized trout hemoglobins I and IV at different pHs. A circular dichroism study. *Eur. J. Biochem.* 271: 1971-1979.
- Giardina B, Mosca D and De Rosa MC (2004) The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol. Scand.* 182: 229-244.
- Glomski CA, Tamburlin J, Chainani, M (1992) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience. *Histol. Histopathol.* 7: 501-528.
- Gorr T, Kleinschmidt T and Fricke H (1991) Close tetrapod relationships of the coelacanth *Latimeria* indicated by haemoglobin sequences. *Nature* 351: 394-397.
- Gorr T, Kleinschmidt T, Sgouros JG and Kasang LA (1991) "Living fossil" sequence: primary structure of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) hemoglobin - evolutionary and functional aspects. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372: 599-612.

- Houston AH and Cyr D (1974) Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Experimental Biol. 61: 455-461.
- Jensen FB (2004) Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. Acta Physiol. Scand. 182: 215-227.
- Junqueira LCV and Carneiro J (1991) Biologia celular e molecular. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kimura M (1989) The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralist. Genome 24: 24-31.
- Landini GF, Schwantes AR and Schwantes MLB (2002) *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae). Hemoglobins: structure and function. Braz. J. Biol. 62: 595-599.
- Marcon JL and Filho SW (1999) Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from Amazon. Comp. Biochem. Physiol. C. 123: 257-263.
- Maruyama K, Yasumasu S, Naruse K, Mitani H, Shima A and Iuchi I (2003) Genomic organization and developmental expression of globin genes in the teleost *Oryzias latipes*. Gene 335: 89-100.
- Müller G, Fago A and Weber RE (2003) Water regulates oxygen binding in hagfish (*Myxine glutinosa*) hemoglobin. J. Exp. Biol. 206: 1389-1395.
- Mylvaganam ES, Bonaventura C, Bonaventura J and Getzoff ED (1996) Structural basis for the Root effect in haemoglobin. Nat. Struct. Biol. 3: 275-283.
- Nagai K, Perutz MF and Poyart C (1985) Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. USA. 82: 7252-7255
- Nilsson GE (2001) Surviving hypoxia with the brain turned on. News Physiol. Sci. 16: 217-221.



- Okhubo N, Watanabe S, Oshiro T, Takashima F and Nakajima H (1993) Subunit structures of multiple hemoglobins in carp. *J. Comp. Physiol.* 163: 445-461.
- Oliveira C, Taboga S, Smarra ALS, Bonilla-Rodriguez GO (2001) Microscopical aspects of accessorial air breathing through a modified stomach in the armored catfish *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytobios* 103: 153-162.
- Pelster B (2001) The generation of hyperbaric oxygen tensions in fish. *News Physiol. Sci.* 16: 287-291.
- Pelster B and Decker H (2004) The Root effect – a physiological perspective. *Micron*, 5: 7-7.
- Peres P, Azevedo Jr. WF and Bonilla-Rodriguez GO (2004) Allosteric water and phosphate effects in *Hoplosternum littorale* Hemoglobins. *European Journal of Biochemistry* 271: 4270-4274.
- Pérez J, Rylander K. and Nirchio M (1995) The evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 5: 304-319.
- Perutz MF (1984) Species adaptation in a protein molecule. *Advances in Protein Chemistry* 36: 213-244.
- Perutz MF and Brunori M. (1982) Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian haemoglobins. *Nature* 299: 421-426.
- Powers AD (1980) Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting Changing Environments. *Am. Zool.* 20: 139-162.
- Qiu Y, Maillett DH, Knapp J, Olson JS and Riggs AF (2000) Lamprey hemoglobin: Structural basis of the Bohr effect. *J. Biol. Chem.* 275: 13517-13528.
- Riggs, A (1979) Studies of the hemoglobins of amazonian fishes: An overview. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 257-271.
- Riggs, A (1976) Factors in the evolution of hemoglobin function. *Fed. Proceed.*, 35: 2115-2118.

- Tocidlowski ME, Lewbart GA, Stoskopf MK (1997) Hematologic study of red Pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology* 26: 119-125.
- Tsuneshige, A, Park, S, Yonetani, T (2002) Heterotropic effectors control the hemoglobin function by interacting with its T and R states – a new view on the principle of allostery. *Biophysical Chemistry* 98: 49-63.
- Val AL (1996) Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Ed. By AL Val, VMF Almeida-Val and DJ Randall, INPA, Manaus, 1996, pp. 59-73.
- Val AL, Almeida-Val VMF, Affonso EG (1990) Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 97: 435-440.
- Val AL and Almeida-Val VMF (1995) *Fishes of the Amazon and the environment*. Springer, Manaus, 226p.
- Val AL, Affonso EG and Almeida-Val VMF (1992) Adaptative features the Amazon fishes: blood characteristics of Curimatã (*Prochilodus cf nigrans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool.* 65: 832-843.
- Val AL and Honczaryk A (1995) *Criando peixes na Amazônia*. INPA, Manaus, 160p.
- Verde C, Carratore V, Riccio A, Tamburrini M, Parisi E and Di Prisco G (2002) The functionally distinct hemoglobins of the arctic spotted wolffish *Anarhichas minor*. *J. Biol. Chem.* 277: 36312-36320.
- Weber RE and Voelter W (2004) Novel factors that regulate oxygen binding in vertebrate hemoglobins. *Micron* 35: 45-46.
- Weber RE (1996) Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Ed. by AL Val, VMF Almeida-Val and DJ Randall, INPA, Manaus, pp. 75-90.

Weber RE, Sullivan, B, Bonaventura J and Bonaventura C (1976) The hemoglobin system of the primitive fish, *Amia calva*: isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. Bioch. Biophys. Acta 434: 18-31.

Wells RMG, Baldwin J, Seymour RS, Christian K and Brittain T (2005) Red blood cell function and haematology in two tropical freshwater fishes from Australia. Comp. Biochem. Physiology A 141: 87-93.

Yokoyama T, Chong KT, Miyazaki G, Morimoto H, Shih DTB, Unzai S, Tame JRH and, Park SY (2004) Novel mechanisms of pH sensitivity in Tuna hemoglobin. The Journal of Biological Chemistry, 279: 28632-28640.



OBJETIVOS

Tendo em vista a importância dos estudos em peixes, a análise bioquímica comparativa do Pacu, Tambaqui e Tambacu, incluiu o padrão de isoformas de hemoglobinas e os aspectos funcionais das hemoglobinas totais, que sejam portanto, responsáveis de forma significativa, de exercer efeitos no transporte de oxigênio. Então, nossos objetivos foram:

a-) Determinar os padrões de isoformas das hemoglobinas do Tambacu, Tambaqui e Pacu, identificando a heterogeneidade presente nas espécies analisadas e relacioná-las com a adaptação aos respectivos ambientes.

b-) Efetuar medidas de ligação de oxigênio por eritrócitos, calculando os parâmetros de P50, cooperatividade e regulação alostérica por prótons, cloretos e fosfatos orgânicos, investigando efeito Bohr, que é o efeito do pH na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, efeito de temperatura e titulação com ATP.



Este artigo foi submetido para a revista Journal of Experimental Biology, tendo sido formatado de acordo com as instruções para autores, com a única exceção de termos inserido figuras, tabelas e as respectivas legendas no próprio texto, a fim de facilitar a leitura pela banca, e o uso da vírgula nas figuras anexadas, que foram trocadas por pontos na versão submetida.

Departamento de Química e Ciências Ambientais - Laboratório de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

(*) corresponding author: Phone (5517) 3221-2361, Fax 3221-2356, e-mail: benilde@ibilce.unesp.br

Key words: Hemoglobin, fish, blood, crust

Short title: Hemoglobins from Tambacu, Tambacu and Pira

COMPARATIVE FUNCTIONAL STUDY OF THE HEMOGLOBINS FROM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*), PACU (*Piaractus mesopotamicus*) AND THE HIBRID TAMBACU

Patrícia Caetano de Souza, Cecília Dominical Poy and Gustavo O. Bonilla-Rodriguez*

Departamento de Química e Ciências Ambientais – Laboratório de Bioquímica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

(*) corresponding author: Phone (5517) 3221-2361, Fax 3221-2356, e-mail bonilla@ibilce.unesp.br

Key words: hemoglobin, fish, Root effect

Short title: Hemoglobins from Tambacu, Tambaqui and Pacu

Abstract

The present work performed a comparative analysis of the hemoglobin pattern of the hybrid fish Tambacu and its parental species: female Tambaqui (*Colossoma macropomum*) and male Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), as well as a functional characterization. The hemoglobin pattern and oxygen binding properties from the hybrid Tambacu are analogous to those from Tambaqui, showing five bands, against three fractions for the hemolysate from Pacu. The hemoglobins show Bohr effect and a phosphate induced Root effect, mainly below pH 7.0, that induces a fast partial deoxygenation of oxyhemoglobin.

Introduction

The Amazon basin presents a variety of aquatic environments isolated by geographical barriers that limit the genic flux among individuals, but produces a high intraspecific heterogeneity within fish populations. The ability of an organism to adapt to an unstable environment can be related to its biological and genetic variability (Ramirez-Gil et al., 1998).

Multiple hemoglobins (Hb) are common in fish hemolysates (Riggs, 1970; Sharp, 1973; Fyhn and Sullivan, 1975; Ohkubo et al., 1993; Pérez et al., 1995; Val, 1995; Fago et al., 2002). Besides, many fish species are polymorphic concerning their Hb loci (Deligny, 1969; Fyhn and Sullivan, 1974; Fyhn and Sullivan, 1975; Hojth, 1974; Hojth, 1975), and many authors consider that heterogeneity represents an adaptation to cope with an ever changing environment (Houston & Cyr, 1974; Riggs, 1976; Val, 1995). For that purpose, the functional properties of the isohemoglobins should be different, as described for several species (Giardina et al., 1973; Ohkubo et al., 1993; Pérez et al., 1995; Fago et al.,

2002; Giardina et al., 2004; Brunori et al., 1973), assuming that under those circumstances heterogeneity could have an adaptive value (Fyhn et al., 1979). One of the functional characteristics that Hb can exhibit is the Root effect, characterized by an extreme sensibility to pH decrease, enabling oxygen unload for the retina and the swim bladder, with simultaneous loss of cooperativity (Brittain, 2005).

The present work intended to analyze comparatively the iso-hemoglobins present in the hybrid fish known as “tambacu” with those present in the parental species, female “Tambaqui” (*C. macropomum*) and male “Pacu” (*P. mesopotamicus*), analyzing the number and pattern of iso-Hbs, and their functional properties. The hybrid and the other two species are largely cultivated in Brazil. The hemoglobins were analyzed concerning their electrophoretic pattern and functional properties.

Material and methods

Adult specimens of Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and Tambacu were obtained from a local “fish-and-pay” and identified by Dr. Francisco Langeani Neto, from the Dept. of Zoology and Botany. Fishes were anesthetized by immersion in a benzocain solution (1 gr. for 15L of water). Blood was obtained from the caudal vein using a disposable syringe containing 0.2mL of buffered saline (0.9% NaCl in 50mM Tris-HCl pH 8.0, containing 0.2% D-glucose and 1mM EDTA, and all subsequent purification procedures were performed at 4°C and all solutions were prepared with ultrapure water (ELGA Maxima, USF ELGA, Bucks, UK). Erythrocytes were washed three times by centrifugation in a refrigerated centrifuge Jouan CR3i (Societe Jouan S.A., St. Herblain, Cedex, France) a similar buffered saline without glucose, and hemolysis was achieved by the addition of 50mM Tris-HCl pH 9.0 buffer to

the pellet. Hemoglobin purification was performed using Sephacryl S-100 HR and anion-exchange chromatography in DEAE-Sepharose in the same buffer, using a salt gradient. The pure Hb was concentrated by centrifugation using Amicon Centriprep-50 (Amicon, Inc., Beverly, MA, USA) and kept in liquid nitrogen until use.

Purity of the isolated hemoglobins was checked by isoelectric focusing in agarose (Naoum, 1997) using samples stabilized by carbon monoxide. The present work was performed using the partially purified hemolysates from Tambacu, Tambaqui and Pacu.

Functional studies of 60 μ M (heme) Hb-II were performed at 20°C using tonometers as described (Colombo and Bonilla-Rodriguez, 1996, Bonilla et al., 1994a), using suitable buffers (TAPS, HEPES and ADA purchased from Sigma) to cover the tested pH range. Absorbance readings were carried out using a double beam spectrophotometer Cintra 10e GBC (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Melbourne, Australia). The parameters P_{50} and n_{50} were obtained from Hill Plots from samples containing up to 5% methemoglobin at the end of the experiments. The effect of ATP was analyzed at pH 7.5, applying the equations used by Bonilla et al. (1994b) and Olinas et al. (2005) to calculate the binding constants to one or two binding sites. The binding constants were estimated by nonlinear regression using a Levenberg-Marquardt algorithm.

$$\text{Log } P_{50} = \log P_{50}^0 + \frac{1}{4} \cdot \log \left| \frac{1 + K_D \cdot X}{1 + K_O \cdot X} \right|$$

(eqn. 1)

In Equation 1, $\log P_{50}$ and $\log P_{50}^0$ are the values obtained in the presence and in the absence of ATP, K subscripts D and O are the binding constants to deoxy and oxyhemoglobin respectively, and X is the concentration of free ATP, obtained by subtraction of concentration of Hb tetramers from nominal phosphate concentration. This equation describes phosphate binding to a single site per tetramer.

Olianas et al. (2005), used the equation below, where superscripts 1 and 2 refer to two binding sites:

$$\text{Log } P_{50} = \log P_{50}^0 + \frac{1}{4} \cdot \log \left| \frac{1 + K_D^1 \cdot X + K_D^1 K_D^2 \cdot X^2}{1 + K_O^1 \cdot X + K_O^1 K_O^2 \cdot X^2} \right|$$

(eqn.2)

The existence of a Root effect was analyzed by performing spectral analysis of the hemoglobins at varying pH values. The absorbance at 576nm was read for Hb (A_{oxy}), and after adding ATP (A_{ATP}). The absorbance for the deoxygenated Hb (A_{deoxy}) was obtained immediately after adding sodium dithionite. Saturation (Y) was calculated using the equation below:

$$Y = (A_{\text{ATP}} - A_{\text{deoxy}}) / (A_{\text{oxy}} - A_{\text{deoxy}}) \quad (\text{eqn. 3})$$

The temperature effect was analyzed using 15, 20 and 25°C. The parameters were calculated as described previously (Bonilla et al., 1994a) from Van't Hoff Plots (Log P_{50} vs. $1/T$).

Results

Figure 1 shows the electrophoretic pattern obtained by isoelectric focusing. The experiment was done using CO stabilized samples, except for the hemolysate from Pacu (Fig. 1). We added a sample of human blood containing Hbs A and S (1st well). For the CO-bound samples we can observe a similar pattern between Tambacu and Tambaqui, which present five distinct components, whereas Pacu showed only three (Fig. 2), suggesting that the hybrid fish inherits its pattern only from *C. macropomum* (Tambaqui).

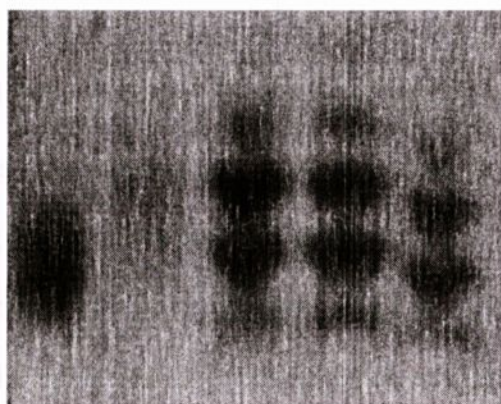


Figure 1. Electrophoretic pattern of hemoglobins. From the left to the right: human HbAS, Pacu (oxidized sample), Tambacu, and two samples of Tambaqui.

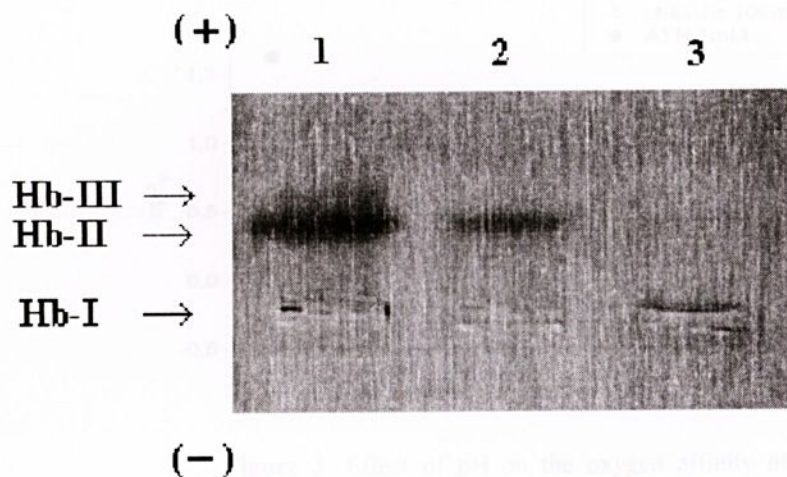


Figure 2. Isoelectric focusing: From the left to the right: Pacu (hemolysate), and purified Hb-II and Hb-I.

The isohemoglobins from the hemolysates of Tambaqui and Tambacu have very close isoelectric points, and we failed to isolate them for individual characterization. Although Pacu hemoglobins can be isolated easily, that analysis was already performed by Poy (2001), so we worked with the hemolysates, for a better comparison.

Figures 3 and 4 display the influence of pH on oxygen affinity and cooperativity for Pacu hemoglobins. Figure 3 shows that for the stripped form and in the presence of chloride, proton binding exerts an influence on O_2 -affinity below pH 7.5. Linear regression gives the number of protons per heme (nH^+) that are released during oxygenation. In the pH range cited above, for the stripped form, nH^+ was significant: -1.04 ± 0.3 . Above pH 8.0 there is a normal Bohr effect: nH^+ was -0.36 ± 0.12 . In the presence of chloride the Bohr effect increases to -1.19 ± 0.5 below pH 7.0. In the presence of ATP proton binding decreases; in the pH range from 6.5 to 8.0 was -0.8 ± 0.12 , and lower between pH 8.0 and 8.5: $-0.4 \pm 0.0/\text{heme}$.

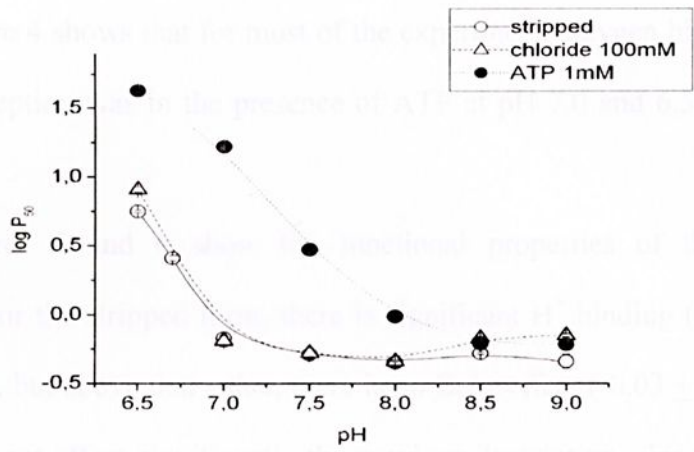


Figure 3: Effect of pH on the oxygen affinity of Pacu hemoglobins. Experiments were performed at 20°C in the absence of chloride and ATP (stripped), and in the presence of both effectors.

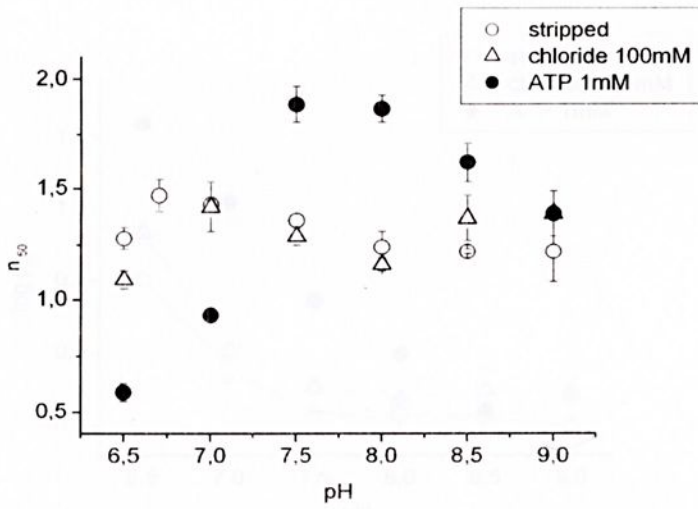


Figure 4: Cooperativity (n₅₀) of the hemoglobins from Pacu in the same experimental conditions described above.

Figure 4 shows that for most of the experiments oxygen binding was cooperative. The only exception was in the presence of ATP at pH 7.0 and 6.5, that showed negative cooperativity.

Figures 5 and 6 show the functional properties of the hemoglobins from Tambaqui. For the stripped form, there is significant H^+ binding (nH^+ was -0.95 ± 0.16) below pH 7.5, but above that value, there is no Bohr effect (-0.03 ± 0.02). The presence of chloride does not affect significantly the previous description, since nH^+ was -1.07 ± 0.32 and -0.012 ± 0.03 for the same pH ranges described above. In the presence of ATP the Bohr effect was -0.8 ± 0.12 between pH 6.5 and 8.5.

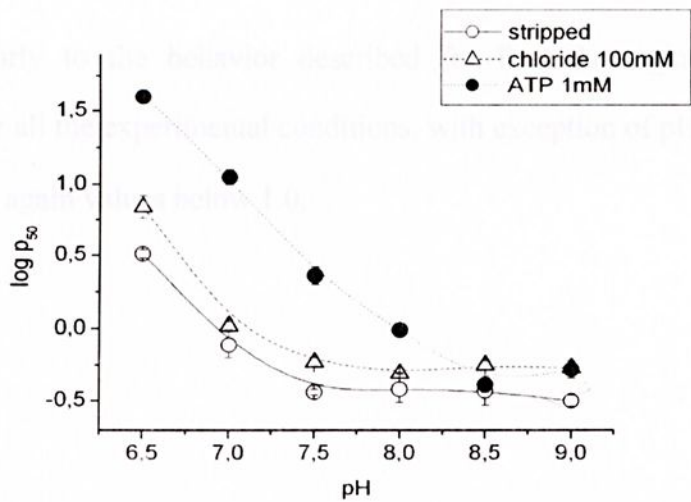


Figure 5: Effect of pH on the oxygen affinity of Tambaqui hemoglobins. Experiments were performed at 20°C in the absence of chloride and ATP (stripped), and in the presence of both effectors.

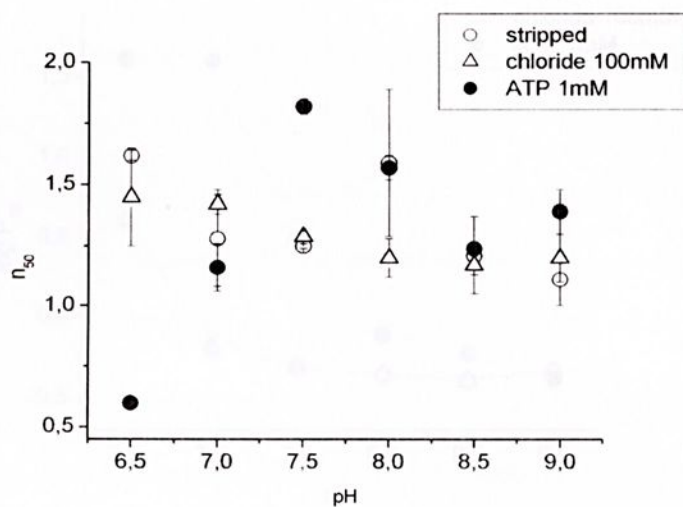


Figure 6: Cooperativity (n_{50}) of the hemoglobins from Tambaqui in the same experimental conditions described above.

Similarly to the behavior described for Pacu hemoglobins, O_2 -binding was cooperative for all the experimental conditions, with exception of pH 6.5 in the presence of ATP, reaching again values below 1.0.

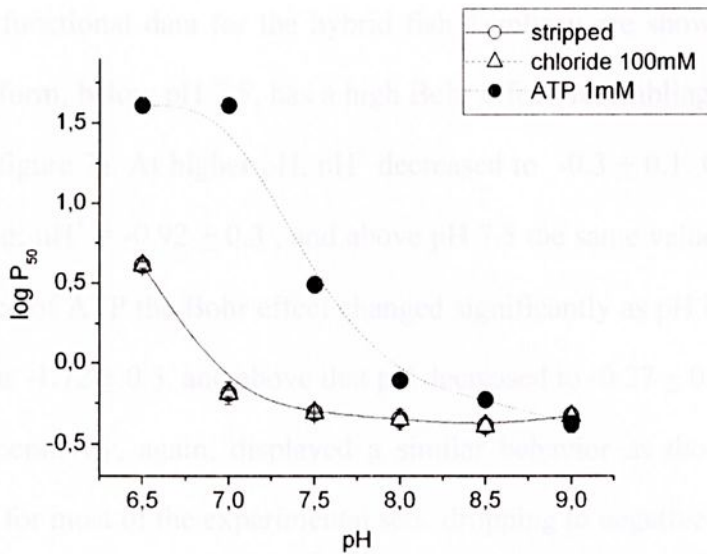


Figure 7: Effect of pH on the oxygen affinity of Tambacu hemoglobins. Experiments were performed at 20°C in the absence of chloride and ATP (stripped), and in the presence of both effectors.

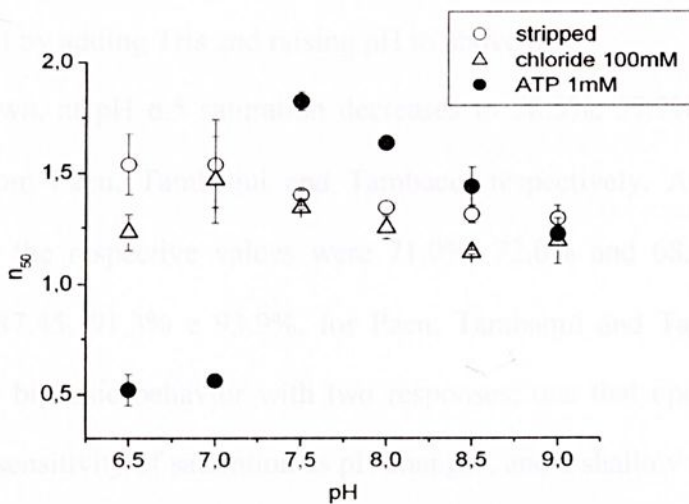


Figure 8: Cooperativity (n_{50}) of the hemoglobins from Tambacu in the same experimental conditions described above.

The functional data for the hybrid fish Tambacu are shown in Figures 7 and 8. The stripped form, below pH 7.5, has a high Bohr effect, resembling Tambaqui: nH^+ was -0.92 ± 0.39 (figure 7). At higher pH, nH^+ decreased to -0.3 ± 0.1 . Chloride did not affect proton binding: $nH^+ = -0.92 \pm 0.3$, and above pH 7.5 the same values reported previously. In the presence of ATP the Bohr effect changed significantly as pH increased: between 6.5 to 8.0 nH^+ was -1.72 ± 0.3 , and above that pH decreased to -0.27 ± 0.01 .

Cooperativity, again, displayed a similar behavior as those reported here: was higher than 1 for most of the experimental sets, dropping to negative values in the presence of ATP at pH 6.5 and 7.0 (Fig. 8).

Since the effect of ATP at acidic pH resembled a Root effect, we carried out some experiments to confirm such assumption. Figure 9 shows the effect of pH on the saturation in the presence of 1mM ATP (there is no apparent decrease of saturation for the stripped form, checking it by adding Tris and raising pH to above 8).

As shown, at pH 6.5 saturation decreases to 58.5%, 57.2% and 55.7%, for the hemoglobins from Pacu, Tambaqui and Tambacu, respectively. At only 0.2 pH units higher, pH 6.7, the respective values were 71.0%, 72.0% and 68.7%. At pH 7.0, Hb saturation was 87.45, 91.3% e 93.9%, for Pacu, Tambaqui and Tambacu, respectively. There is a clear biphasic behavior with two responses; one that operates below pH 7.0, showing a high sensitivity of saturation as pH changes, and a shallow one above that value, operating apparently up to pH 9 or even more.

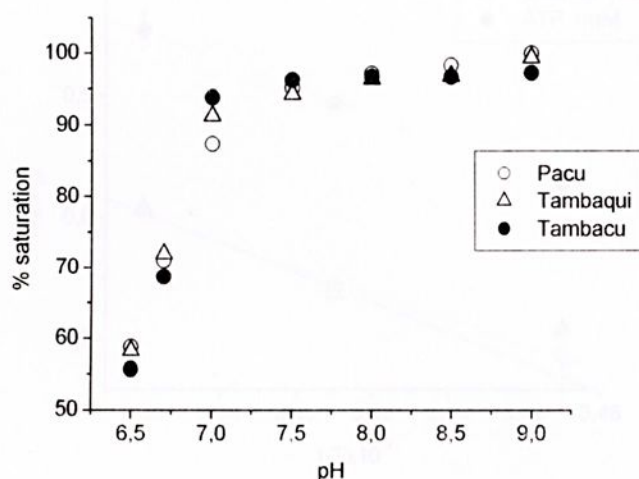


Figure 9: Effect of pH on hemoglobin saturation, in the presence of 1 mM ATP, showing an induced Root effect, at 25°C.

In terms of the effect of temperature, the enthalpy of hemoglobin oxygenation was determined from a Van't Hoff Plot ($\log P_{50}$ versus $1/T$). Figures 10, 11 and 12 illustrate the behavior of the hemoglobins from the three fishes at different temperatures (15, 20 and 25°C) at pH 7.5, for the stripped form, and also in the presence of 100mM NaCl and 1mM ATP. For all the experimental sets O_2 -affinity decreased with increasing temperature.



T. 1446/05

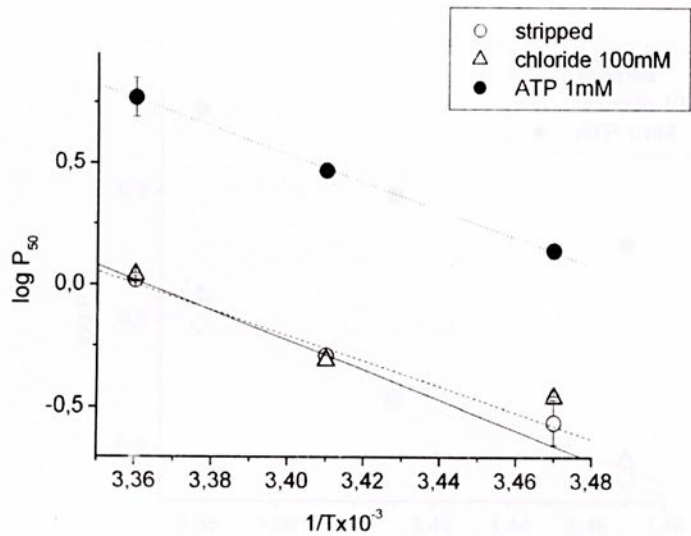


Figure 10: Van't Hoff Plot showing the oxygen affinity as a function of temperature for the hemoglobins from Pacu.

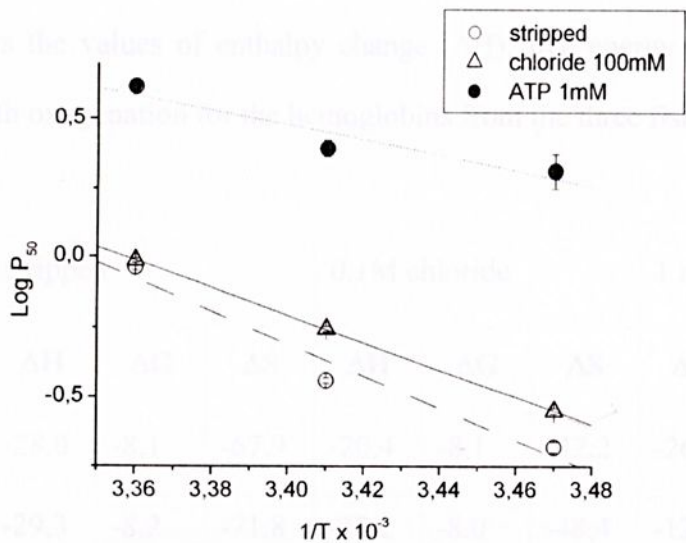


Figure 11: Van't Hoff Plot showing the oxygen affinity as a function of temperature for the hemoglobins from Tambaqui.

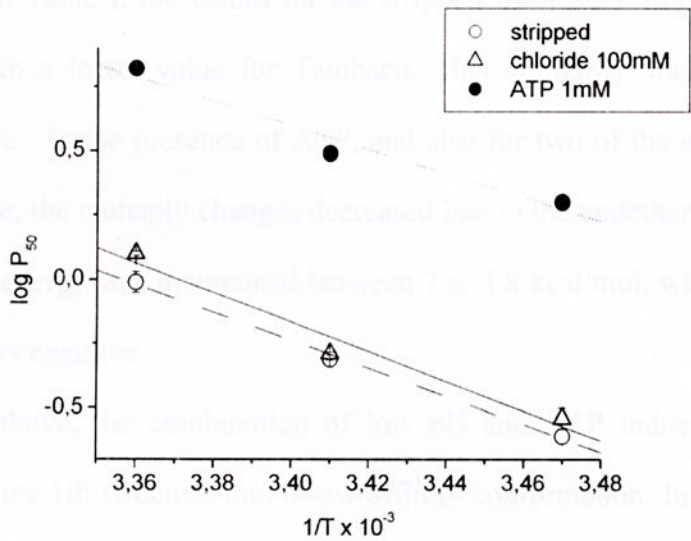


Figure 12: Van't Hoff Plot showing the oxygen affinity as a function of temperature for the hemoglobins from Tambacu.

Table I shows the values of enthalpy change (ΔH), free energy (ΔG) and entropy (ΔS) associated with oxygenation for the hemoglobins from the three fishes.

Fish	stripped			0.1M chloride			1 mM ATP		
	ΔH	ΔG	ΔS	ΔH	ΔG	ΔS	ΔH	ΔG	ΔS
Pacu	-28,0	-8,1	-67,9	-20,4	-8,1	-42,2	-26,1	-7,0	-65,2
Tambaqui	-29,3	-8,2	-71,8	-22,2	-8,0	-48,4	-12,6	-7,1	-18,8
Tambacu	-24,8	-8,1	-57,1	-26,3	-8,1	-62,3	-21,3	-7,7	-45,2

Table I. Enthalpy, Free energy and Entropy changes associated with oxygenation of the hemoglobins from Pacu, Tambaqui and Pacu. ΔH and ΔG are expressed in kcal/mol, and ΔS in u.e.

As shown in Table I, the values for the stripped form were similar between Pacu and Tambaqui, with a lower value for Tambacu. That similarity was sustained in the presence of chloride. In the presence of ATP, and also for two of the experiments in the presence of chloride, the enthalpy changes decreased due to the endothermic release of the effectors. The free energy was maintained between 7 and 8 kcal/mol, whereas the entropy changes were always negative.

As shown above, the combination of low pH and ATP induces a Root effect, capable of locking the Hb structure into a low affinity conformation. In order to estimate the binding constants of ATP to the hemoglobins here studied, we performed an analysis of its effect on oxygen-affinity, up to 10mM (Figures 13 to 15).

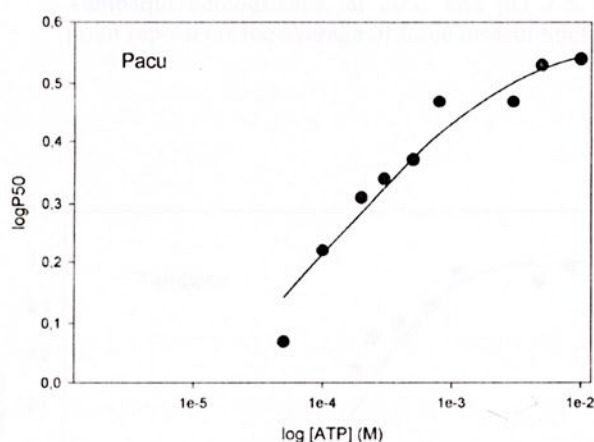


Figura 13. Effect of ATP on oxygen affinity of Pacu hemoglobins, at 20°C and pH 7.5. Each point represents the average of three measurements.

Since the slope of the curve returns the number of ATP molecules released per heme during oxygenation: $-\Delta X = \Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{ATP}]$ (Amiconi et al, 1985), we were able to estimate the binding relationship ATP:Hb. For Pacu Hbs the slope was 0.30 ± 0.01 , close to the expected relationship of 0.25/heme or 1:Hb. However, the plots for Tambaqui and Tambacu Hbs the plots show a different shape and a greater variation of oxygen

affinity within a narrow concentration range, that raises the estimated values: 0.74 ± 0.09 and 0.74 ± 0.06 , respectively.

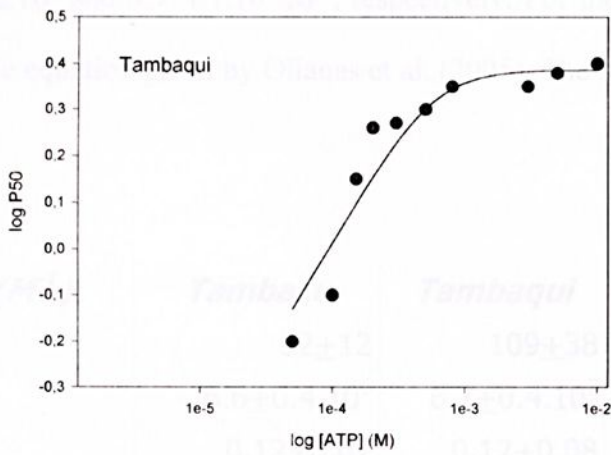


Figure 14. Effect of ATP on oxygen affinity of Tambaqui hemoglobins, at 20°C and pH 7.5. Each point represents the average of three measurements.

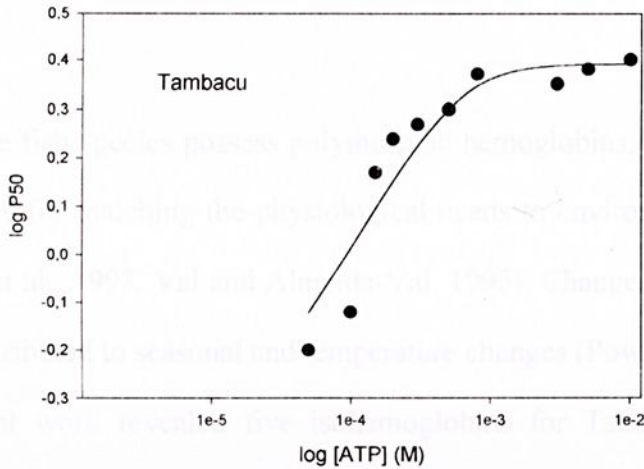


Figure 15. Effect of ATP on oxygen affinity of Tambacu hemoglobins, at 20°C and pH 7.5. Each point represents the average of three measurements.

The estimated values above mean that at least two ATP molecules bind per Hb tetramer. Applying the equation for a single site (Bonilla et al., 1994b) for the data gathered from Pacu Hb, the constants for the deoxygenated (K_D) and oxygenated (K_O) forms are $1.07 \pm 0.2 \cdot 10^6$ and $3.9 \pm 1.7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, respectively. For the other hemoglobins, we fitted the data to the equation given by Olinas et al. (2005). The results are summarized in Table II, below:

<i>Constants (M^{-1})</i>	<i>Tambacu</i>	<i>Tambaqui</i>
K1d	32±12	109±38
K1o	6.6±0.4.10 ⁶	6.7±0.4.10 ⁷
K2d	0.12±0.07	0.12±0.08
K2o	2.6±0.4.10 ⁶	2.6±0.4.10 ⁶
Log P ₅₀ ^o	-0.31	-0.45

Table II. Binding constants to deoxygenated (Kd) and oxygenated (Ko) hemoglobins of Tambacu and Tambaqui considering two sites, named 1 and 2. LogP₅₀^o refers to the reference value, in the stripped form. Temperature 20°C, pH 7.5.

Discussion

Most of the fish species possess polymorphic hemoglobins, that could constitute a successfull strategy for matching the physiological needs to environmental availability of oxygen (Ohkubo et al., 1993, Val and Almeida-Val, 1995). Changes in the Hb pattern can be detected and attributed to seasonal and temperature changes (Powers, 1980).

The present work revealed five isohemoglobins for Tambaqui and the hybrid Tambacu, whereas Pacu only three. The close isoelectric points from Tambaqui and Tambacu Hbs frustrated our efforts for isolation of each component. For Pacu a previous work (Poy, 2001, Souza et al., 2004) successfully purified the main hemoglobins, named I and II, that showed very different functional properties; Hb-I is a typical cathodic Hb, without proton binding and a weak phosphate binding, whereas Hb-II, the major fraction,

displays a large alkaline Bohr effect ($-0.9 \text{ H}^+/\text{heme}$). Clearly, Tambaqui inherits its Hb profile from the female Tambaqui.

Hb heterogeneity was described for fishes from the Amazon by the Alpha-Helix expedition (Fyhn et al., 1979), who found an average of four Hbs among teleosts from 77 genera, and also for Venezuelan species (Pérez and Rylander, 1985). The number of fractions we found agrees with that number, since the parental species inhabit the floodplains of the Amazon Basin, although the specimens used for this work were cultivated locally, northwest of the State of São Paulo. For fish species from temperate zones, Sullivan (1977) described an average of five Hbs, presumably an adaptation to the greater temperature changes along the year.

According to Riggs (1979), and Val et al. (1987), there is no clear correlation between species with multiple hemoglobins and environmental variables such as dissolved oxygen, water pH, temperature, behavior and the presence of a swim bladder, even though many authors propose that Hb heterogeneity would have an adaptive role (Val & Almeida-Val, 1995).

A comparison of oxygen equilibrium curves between fishes with exclusive water breathing and species with accessorial air breathing, showed that the second group presents lower O_2 -affinity (Powers et al., 1980). Fishes such as Tambaqui, Tambaqui and Pacu perform Aquatic surface respiration (ASR) when oxygen concentration drops below a critical value (Panepucci et al., 2001; Rantin and Kalinin, 1996), a common strategy among tropical fishes that improves gill oxygenation.

The functional studies showed that all the hemolysates present a Bohr effect under all the experimental conditions: stripped, and in the presence of chloride or ATP, specially below pH 7.0, with small effects due to chloride binding. The major component seems to dictate the properties of the Hb mixture, as we can deduce from the data gathered for Pacu.

The values reported by Poy (2001) for Hb-II show a close agreement with those found for the hemolysate.

The residues that contribute for the Bohr effect are Histidines 146 and 122 from the beta chain and Valine 1 from the alpha chain (Giardina et al., 2004; Brittain, 2005). Chloride enhanced the Bohr effect for Pacu and Tambaqui Hbs; according to Giardina et al. (2004), that anion can contribute by an interaction between Val 1 and Ser 131, both from the alpha chain, in the absence of phosphates and bound CO₂.

When hemoglobin can not saturate at acidic pH and under hyperbaric oxygen, it characterizes a Root effect (Brittain, 2005; Giardina et al., 2004; Pérez et al., 1995), and the presence of multiple Hbs could compensate O₂ deficiency due to that effect. According to the present interpretations, the Root effect has the physiological purpose of ensuring oxygenation to the retina, and also oxygen for the swim bladder (Pérez et al., 1995; Bonaventura et al., 2004; Brittain, 2005).

The hemolysates from Pacu, Tambaqui and Tambacu presented a Root effect induced by phosphate binding at acidic pH, able to unload almost half of the O₂ bound at pH 6.5 in vitro. The decrease of affinity does not reach the values described for *Leiostomus xanthurus* (spot) Hbs by Bonaventura et al. (2004), at pH 6.5 the level of saturation decreases in a similar extent to those we found. That property would allow the Hb to respond to a discharge of lactic acid with a fast O₂ unload.

When operates, this Root effect induces a drastic change in the oxygen binding behavior, dropping cooperativity to values that are considered as “negative cooperativity”, that is, under those circumstances it's imposible to fully oxygenate those Hbs, even under hyperbaric pure oxygen. That effect would not help to provide oxygen to tissues under hypoxia, since according to Pelster and Decker (2004), under stress conditions, such as

hypoxia, pH within the red blood increases due to epinephrine release and beta-adrenergic stimulation of the Na^+/H^+ exchanger.

A similar Root effect induced by phosphates was described for the anodic hemoglobin of the brown moray (*G. unicolor*) by Tamburrini et al. (2001), and other hemoglobins (Val and Almeida-Val, 1995; Pelster and Weber, 1990). A recent work from Yokoyama et al. (2004), with tuna Hb (*Thunnus thynnus*), also reports the existence of Bohr and Root effects, with cooperativity values close to those we found. At pH 6.4, the value of n_{50} was 0.52, close to those from Pacu, Tambaqui and Tambacu Hbs (0.59; 0.52 e 0.59) respectively, at pH 6.5. The fish known as Jaraqui (*Prochilodus*), a typical species from the Amazon, has three Hbs, and both Bohr and Root effects in the presence of ATP (Di Prisco and Tamburrini, 1992), and trout Hb IV, that has Root effect, showed a n_{50} lower than 1 at pH 6.5 (Giardina et al, 1973).

The Root effect that we found depends on phosphate binding. Pacu Hb showed having a single binding site for ATP, whose affinity in the deoxygenated state is lower than the values we found for snake Hbs (Bonilla et al., 1994b), but higher than for the cathodic Hb from another fish from the Amazon basin: *Hoplosternum littorale* (Peres et al., 2004). On the other hand, the estimation of the binding constants for Tambaqui and Tambacu Hbs supposing two sites, showed high affinity for the second site, both in the deoxygenated and oxygenated states, with very weak interaction with the first site. This interactions deserve a future deeper analysis.

Apparently there is no correlation between Hb heterogeneity and the presence of Root effect (Farmer et al, 1978; Val and Almeida-Val, 1995). The Root effect correlates with the distribution of the *rete mirabile* from the eye choroid and a well developed swim bladder. Among primitive species, the *rete mirabile* from this organ is not present, but their blood has a Root effect. As stated by Farmer et al. (1978), the *rete* from the eye may be the

most primitive anatomical structure associated to the origin of Hbs with Root effect, a previous adaptation for the evolution of an efficient mechanism of gas secretion in the swim bladder.

Concerning the temperature, the Amazon does not have great variations. Short changes, in terms of hours, are compensated by behavioral responses of ectothermic animals, such as migration to microhabitats (Val and Almeida-Val, 1995). When water temperature increases, fishes have to cope with two challenges: less dissolved oxygen and increasing biological and metabolic activity, leading fishes to consume more O_2 when it is less available. According to Val and Almeida-Val (1995), fishes that inhabit environments with constant temperature have Hbs that are sensitive to that variable, whereas those living in fluctuating temperature locations carry less sensitive Hbs.

The heat associated with oxygen binding to Hb is measured indirectly by O_2 -binding experiments, and interpreted by Van't Hoff plots. Their linearity ensure that enthalpy change is independent of the temperature, otherwise suggests changes in the system heat, as verified by Fago et al. (1997), in antarctic fishes. The hemoglobins of those fishes have a reduced temperature sensitivity, reflecting small heat exchanges. For the analyzed Hbs we verified a linear decrease of oxygen-affinity as temperature raised, due to exothermic O_2 -binding (Bonilla et al., 1994). The reduced affinity can improve tissue oxygenation, matching the higher needs due to metabolic stimulation (Wilhelm and Weber, 1983).

Among endothermic animals enthalpy variation is small, between -9 and -14 kcal/mol (Wood, 1980). For the Hbs here studied, the enthalpy changes were similar, but higher than for mammals (Wood, 1980) and for the fish Matrinxã (*Brycon cephalus*) that remained around -15 kcal/mol (Honda, 2001) under similar experimental conditions. Poy (2001) reported an enthalpy change of -27.2 and -15.8 for Pacu Hb-II in the absence and in

the presence of ATP, similar to those we found, and also high values were reported for the snake *Mastigodryas bifossatus* ($\Delta H = -22.4$) (Bonilla et al., 1994). Looking at the variation of Gibbs free energy, it remained with small changes, decreasing from 8 kcal/mol in the presence of ATP. That presumably reflects a compensation between enthalpy and entropy changes, as described by Bonilla et al. (1994) and Jensen and Weber (1987). The oxygenation process is enthalpy driven, overcoming the unfavorable entropy variation.

The present work will continue looking for a comprehensive analysis of the structure-function relationships, with particular focus on the induced Root effect. Despite the volume of work focusing that effect, it still has many unsolved aspects, and as Brittain (2005) concludes, probably nature offers many structural motifs that lead to the striking effect on oxygen-affinity.



References

- Amoconi, G., Bertollini, A., Bellelli, A., Coletta, m., Condo, S. G. and Brunori, M.** (1985) Evidence for two oxygen-linked binding sites for polyanions in dromedary hemoglobin. *Eur. J. Biochem.* **150**: 387-393.
- Bonaventura, C., Crumbliss, A. L. and Weber, R. E.** (2004) New insight into the proton-dependent oxygen affinity of Root effect haemoglobins. *Acta Physiol. Scand.* **182**, 245-258.
- Bonilla, G.O., Focesi Jr., A., Bonaventura, C., Bonaventura, J. and Cashion, R. E.** (1994a) Functional properties of the hemoglobin from the south american *Mastigodryas bifossatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **109**, 1085-1095.
- Bonilla, G.O., Oyama Jr., S., nagatomo, C.L., Matsuura, M.S.A. And Focesi Jr., A.** (1994b) Interactions of adenosine triphosphate with snake hemoglobins. Studies in *Liophis miliaris*, *Boa constrictor* and *Bothrops alternatus*. *Comp. Biochem. Physiol.B* **109**: 701-707.
- Brittain, T.** (2005) Root effect hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 120-129.
- Brunori, M., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Giardina, B., Bossa, F., Antonini, E.** (1973) Hemoglobins from trout.: strutural and functional properties. *Mol. Cel Biochem.* **1**:189-196.
- Colombo, M.F. and Bonilla-Rodriguez, G.O.** (1996) The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *J. Biol. Chem.* **271**: 4895-4899.
- Deligny, W.** (1969) Serological and biochemical studies on fish population. *Ann. Rev. Oceanogr. Mar. Biol.* **7**: 411-513.

- Di Prisco, G. and Tamburrini, M.** (1992) The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 661-671.
- Fago, A., Wells, R.M.G. and Weber, R.E.** (1997) Temperature – dependent enthalpy of oxygenation in antartic fish hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol B.* 118: 319-326.
- Fago, A., Carratores, V., Di Prisco, G., Feuerlein, R. J., Sottrup-Fago, A., Forest, E. and Weber, R. E.** (2002) Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 335-342.
- Farmer, M., Fyhn, H. J., Fyhn, U. E. H. and Noble, R. W.** (1978) Ocorrência de hemoglobinas de efeito Root em peixes amazônicos. *Acta amazônica*, 8: 55-86.
- Fyhn, U.E.H. and Sullivan, B.** (1974) Hemoglobin polymorphism in fishes. Complex phenotypic patterns in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biochem. Genet.* 11: 373-386.
- Fyhn, U.E.H. and Sullivan, B.** (1975) Elasmobranch hemoglobins: dimerization and polymerization in various species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 50: 119-129.
- Fyhn, U.E.H., Fyhn, H.J., Davis, B.J., Powers, D.A., Fink, W.L., Garlick, R.L.** (1979) Heterogeneidade de hemoglobina nos peixes da Amazônia. *Acta Amazônica* 8: 55-86.
- Giardina, B., Brunori, M., Binotti, I., Giovenco, S. and Antonini, E.** (1973) Studies on the properties of fish hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* 39: 571-579.
- Giardina, B., Mosca, D. and De Rosa, M. C.** (2004) The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates; an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol. Scand.* 182: 229-244.
- Hjorth, J. P.** (1974) Genetics of Zoarces populations VII. Fetal and adult hemoglobins and a polymorphism common to both. *Hereditas* 78: 69-72.
- Hjorth, J. P.** (1975) Molecular and genetic structure of multiple hemoglobins in the eelpout, *Zoarces viviparus*. *Biochem. Genet.* 13: 379-391.

- Honda, R.T.** (2001) Estudo funcional e estrutural da hemoglobina I do Matrinxã (*Brycon cephalus*, Pisces). *Master Dissertation*, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
- Houston, A.H. and Cyr, D.** (1974) Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Experimental Biol.* **61**: 455-461.
- Jensen, F.B. and Weber, R. E.** (1982) Respiratory properties of tench blood and hemoglobin. Adaptation to hypoxic-hypercapnic water. *Mol. Physiol.* **2**: 235-250.
- Jensen, F.B. and Weber, R. E.** (1987) Thermodynamic analysis of precisely measured oxygen equilibria of tench (*Tinca tinca*) hemoglobin and their dependence on ATP and prótons. *J. Comp. Physiol. B.* **157**: 137-143.
- Naoum, P. C.** (1997). Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.
- Okhubo, N., Watanabe, S., Oshiro, T., Takashima, F. and Nakajima, H.** (1993) Subunit structures of multiple hemoglobins in carp. *J. Comp. Physiol.* **163**: 445-461.
- Olianas, A., Messana, I., Sanna, M.T., Castagnola, M., Manconi, B., Masia, D., Coluccia, E., Giardina, B. and Pellegrini, M.** (2005) Two sites for GTP binding in cathodic haemoglobins from Anguilliformes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **141**: 400-407.
- Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R. and Rantin, F.T.** (2001) The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in Pacu (*Piaractus mesotamicus*) *Braz. J. Biol.* **61**, 547-554.
- Pelster, B. and Weber, R. E.** (1990). Influence of organic phosphates on the Root effect of multiple fish haemoglobins. *J. Exp. Biol.* **149**: 425 -437.
- Pelster, B. and Decker, H.** (2004) The Root effect – a physiological perspective. *Micron.* **5**: 7-7.
- Peres, P., Azevedo Jr., W.F. And Bonilla-Rodriguez, G.O.** (2004) Allosteric water and phosphate effects in *Hoplosternum littorale* hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* **271**: 4270-4274.



- Pérez, J. and Rylander, K.** (1985) Haemoglobin heterogeneity In Venezuelan fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **80**: 641-646.
- Pérez, J., Rylander, K. and Nirchio, M.** (1995) The evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **5**: 304-319.
- Powers, D. A., Martin, J. P., Garlick, R. L., Fyhn, H. J. and Fyhn, U. E. H.** (1978) O efeito da temperature sobre os equilíbrios de oxigênio das hemoglobinas de peixes em relação à variabilidade térmica ambiental. *Acta Amazônica* **8**: 113-123.
- Powers, D.** (1980) Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: Strategies for adapting to changing environments. *Amer. Zool.* **20**: 139-162.
- Poy, C. D.** (2001) Purificação e caracterização parcial das hemoglobinas de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Pisces). *Master Dissertation*, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
- Ramirez-Gil, H., Feldberg, E., Almeida-Val, V.M.F. and Val, A.L.** (1998) Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio Solimões and rio Negro (Central Amazon). *Braz. J. Med. Biol. Research* **31**: 1449-1458.
- Rantin, F.T. and Kalinin, A.L.** (1996) Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon* (ed. A.L. Val, V.M.F. Almeida-Val and D.J. Randall), pp. 169-180. Manaus: INPA.
- Riggs, A.** (1970) Properties of fish hemoglobins. In: *Fish Physiology* (Ed. D.J. Randall) pp. 209-252. New York: Hoar.
- Riggs, A.** (1976) Factors in the evolution of hemoglobin function. *Fed. Proceed.* **35**: 2115-2118.

Riggs, A. (1979) Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: an overview. *Comp. Biochem. Physiol. A* **62**: 257-272.

Sharp, G.D. (1973) An electrophoretic study of hemoglobins of some scombrid fishes and related forms. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **44**: 381-388.

Souza, P.C. ; Poy, C.D. and Bonilla-Rodriguez, G.O. (2004) Comparative analysis of the hemoglobins from Tambacu, Tambaqui (*C. macropomum*) and Pacu (*P. mesopotamicus*). In: *VI International Congress on the Biology of Fish. The molecular basis of environmental adaptation: Symposium Proceedings*. Bethesda, MD, USA. American Fisheries Society pp. 69-81.

Sullivan, B. (1977) Hemoglobin variation and its significance in fish. US-USSR workshop on Physiology and Biochemistry of Aquatic Animals. Georgetown, South Carolina.

Tamburrini, M., Verde, C., Olinas, A., Giardina, B., Corda, M., Sanna, M.T., Fais, A., Deiana, A.M. di Prisco, M. and Pellegrini, M. (2001) The hemoglobin system of the brown moray *Gymnothorax unicolor*: Structure/function relationships. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4104-4111.

Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. and Monteiro, P. J. C. (1987) Aspectos biológicos de peixes amazônicos. Padrões eletroforéticos de hemoglobinas de 22 espécies coletadas na ilha da Marchantaria (Manaus-AM). *Acta Amazônica* 16/17: 125-134.

Val, A. L. (1995) Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**: 1119-1127.

Val, A.L. and Almeida-Val, V. M. F. (1995) *Fishes of the Amazon and the environment*. Manaus: Springer , 226p.

Yokoyama, T., Chong, K.T., Miyazaki, G., Morimoto, H., Shih, D.T.B., Unzai, S., Tame, J.R.H. and Park, S.Y. (2004) Novel mechanisms of pH sensitivity in Tuna hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **279**: 28632-28640.

Wilhelm, D. and Weber, R. E. (1983) Functional characterization of hemoglobins from south Brazilian freshwater teleost – I. Multiple hemoglobins from the gut/gill breather *Callichthys callichthys*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 75: 475-482.

Wood, S.C. (1980) Adaptation of red blood cell function to hypoxia and temperature in ectothermic vertebrate. *Am. Zool.* 20: 163-172.

Acknowledgements: This work had financial support from FAPESP (00/04932-5 and 03/00085-4) and CNPq.

CONCLUSÕES GERAIS

1- Verificamos a presença de cinco frações de hemoglobinas no Tambaqui e Tambacu, mostrando que esses animais apresentam hemoglobinas múltiplas juntamente com o Pacu, sendo portanto, espécies com características próprias da Amazônia. Ainda não está bem claro o papel dessas várias isoformas nos peixes de uma forma geral, embora alguns autores acreditam que essas hemoglobinas estejam envolvidas com processos adaptativos ao meio, tais como, quantidade de oxigênio dissolvido na água, pH, temperatura, comportamento animal, presença de rete mirabile e bexiga natatória. O padrão de hemoglobinas do Tambacu é similar ao do Tambaqui.

2- Foi observada a presença de efeito Bohr nos três animais e de forma mais acentuada entre os pHs 6,5 a 7,5. Isto reflete a presença de efeito Bohr alcalino nas hemoglobinas totais de Pacu, Tambaqui e Tambacu. Não existe uma correlação clara entre número de isoformas e presença ou ausência de efeito Bohr alcalino ou ácido, embora sabe-se que diferentes frações podem desempenhar parâmetros funcionais diferentes, como a hemoglobina da truta ou matrixã. No nosso caso, o cloreto exerceu maior efeito Bohr que o ATP, uma vez que há evidências de que a Val α 1 participa do efeito Bohr alcalino apenas na presença de cloreto (Giardina *et al.*, 2004; Brittain, 2005), este resíduo deve ser, portanto, o maior responsável pela presença deste grande efeito com o cloreto. Acredita-se, também que as His β 146 e His α 122 também estejam envolvidas no efeito Bohr alcalino.

3- Uma vez que as espécies parentais e o híbrido apresentam retina e bexiga natatória, podemos correlacionar a presença do efeito Root com estas estruturas, como forma de auxílio para o enchimento da bexiga e oxigenação da retina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4- Foi observado uma log P50 maior na temperatura de 25°C, indicando uma diminuição linear da afinidade quando a temperatura é aumentada, isto reflete alterações como aumento dos processos metabólicos e diminuição da solubilidade do oxigênio na água. Nossos dados coincidem com alguns da literatura, de que a energia livre da ligação do oxigênio permanece praticamente invariável graças a um fenômeno de compensação entre a variação da entalpia e da entropia.

5- Foi verificada a presença de pelo menos dois sítios de ligação para o fosfato nos hemolisados de Tambaqui e Tambacu, e um sítio para o hemolisado de Pacu. Este dado reflete a necessidade de aprofundarmos nossas pesquisas com esses animais, uma vez que, ao longo da evolução houve uma seleção de fatores adaptativos que permitiram a sobrevivência de certas espécies em determinados ambientes. Conclui-se então, que, o metabolismo respiratório pode sofrer pressões ambientais e que todas as espécies de uma forma geral, podem responder de diferentes maneiras, permitindo-as se adaptarem a diferentes meios.

Caporaso, R., Wilby, J. B., Wilby, R. M., Kikuchi, R., Plummer, D. D., Haldeman, T. H. J. *Interpreting the hemoglobin of the Ohio River salmon (*Salmo gairdneri*)*. *Biochem. Genet.* v. 29, n. 2-3, p. 385-394, 1992.

Chen, A. J., Russell, E. *Apurine nucleotides their distribution and blood glutathione in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)*. *Comp. Biochem. Physiol.* B. *Biochem. Mol. Biol.* v. 118, n. 3, p. 223-231, 1992.

De Yoo, A., Kurokawa, T., U. A. Muto, R. W. Puh. *Hemoglobins. Methods in Biochemistry* v. 23, p. 134-150, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referentes à introdução (artigo 1), de acordo com as normas da ABNT

Affonso, E. G. Estudo sazonal de características respiratórias do sangue de *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) da ilha da Marchantaria, Amazonas. MSc thesis, PPG INPA/FAU, Manaus, 87p., 1990.

Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L. Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 120, p. 124-129, 1992.

Bridges, C. R., Berenbrink, M., Muller, R., Waser, W. Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question ? *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 119, p.67-77, 1998.

Campbell, M. K. *Bioquímica*. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Ceprenagova, B., Wilson, J. B., Webber, B. B., Kjovkareska, B., Efremov, G. D., Huisman, T. H. J. Heterogeneity of the hemoglobin of the Ohid Trout (*Salmo l. typicus*). *Biochem. Genet.*, v. 30, n. 7-8, p. 385-399, 1992.

Dafre, A. L., Reischl, E. Asymmetric hemoglobins their thiol content and blood glutathione of the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, v. 116, n. 3, p. 323-331, 1997.

De Young, A., Kwiatkowski, L. D. & Noble, R. W. Fish hemoglobins. *Methods in Enzymology*, v. 231, p. 124-150, 1994.



Di Prisco, G. & Tamburrini, M. The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 102, n. 4, p. 661-671, 1992.

Fago, A., Bendixen, E., Malte, H., Weber, R. E. The anodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Molecular basis for allosteric effects in a Root-effect hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 15628-15635, 1997.

Fago, A., Forest, E., Weber, R. E. Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 24, p. 335-342, 2002.

Fago, A., Forest, E., Weber, R. E. Hemoglobin and subunit multiplicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hemoglobin system. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 24, p. 335-342, 2002.

Falk, T. M., Villwock, W., Renwanz, L. Heterogeneity and subunit composition of the haemoglobins of five tilapiine species (Teleostei, Cichlidae) of the genera *Oreochromis* and *Sarotherodon*. *J. Comp. Physiol.*, v. 168, n.1, p. 9-16, 1998.

Frey, B. J., Weber, R. E., Van Aardt, W. J., Fago, A. The haemoglobin system of the mudfish, *Labeo capensis*: adaptations to temperature and hypoxia. *Comp. Biochem. and Physiol.*, v. 120, p. 735-742, 1998.

Fyhn, U. E. H., Fyhn, H. J., Davis, B. J., Powers, D. A., Fink, W. L., Garlick, R. L. Hemoglobin heterogeneity in Amazonian Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 62, p. 39-66, 1979.

Gabbianelli, R., Zolese, G., Bertoli, E., Falcione, G. Correlation between functional and structural changes of reduced and oxidized trout hemoglobins I and IV at different pHs. A circular dichroism study. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, 1971-1979, 2004.

Glomski, C. A., Tamburlin, J., Chainani, M. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience. *Histol. Histopathol.*, v. 7, n. 3, p. 501-528, 1992.

Gorr, T., Kleinschmidt, T., Fricke, H. Close tetrapod relationships of the coelacanth *Latimeria* indicated by haemoglobin sequences. *Nature*, v. 351, p. 394-397, 1991.

Gorr, T., Kleinschmidt, T., Sgouros, J. G., Kasang, L. A "living fossil" sequence: primary structure of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) hemoglobin - evolutionary and functional aspects. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, v. 372, n. 8, p. 599-612, 1991.

Houston, A. H. & Cyr, D. Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Experimental Biol.*, v. 61, p. 455-461, 1974.

Junqueira, L. C. V. & Carneiro, J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991.

Perez, J., Roldán, K. & Nishida, M. The evolution of multiple hemoglobins in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, v. 5, p. 304-319, 1995.

Kimura, M. The neutral theory of molecular evolution and the world view of the neutralist. *Genome*, v. 24, p. 24-31, 1989.

Landini, G. F., Schwantes, A. R. & Schwantes, M. L. B. *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae). Hemoglobins: structure and function. *Braz. J. Biol.* v. 62, n. 4A, p. 595-599, 2002.

Marcon, J. L., Filho, S. W. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v. 123, n. 3, p. 257-263, 1999.

Maruyama, K., Yasumasu, S., Naruse, K., Mitani, H., Shima, A., Iuchi, I. Genomic organization and developmental expression of globin genes in the teleost *Oryzias latipes*. *Gene*, v. 335, p. 89-100, 2004.

Okhubo, N., Watanabe, S., Oshiro, T., Takashima, F. & Nakajima, H. Subunit structures of multiple hemoglobins in carp. *J. Comp. Physiol.*, v. 163, p. 445-461, 1993.

Pelster, B. The generation of hyperbaric oxygen tensions in fish. *News Physiol. Sci.*, v. 16, p. 287-291, 2001.

Pelster, B., Decker, H. The root effect – a physiological perspective. *Micron*, v. 5, p. 7-7, 2004.

Pérez, J., Rylander, K. & Nirchio, M. The evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, v. 5, p. 304-319, 1995.



Perutz, M. F., Brunori, M. Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian haemoglobins. *Nature*, v. 299, p. 421-426, 1982.

Powers, A. D. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting Changing Environments. *Am. Zool.*, v. 20, p.139-162, 1980.

Riggs, A. Factors in the evolution of hemoglobin function. *Fed. Proceed.*, v. 35, n. 10, p. 2115-2118, 1976.

Tocidlowski, M. E., Lewbart, G. A., Stoskopf, M. K. Hematologic study of red Pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology*, v. 26, n. 3, p. 119-125, 1997.

Tsuneshige, A., Park, S., Yonetani, T. Heterotropic effectors control the hemoglobin function by interacting with its T and R states – a new view on the principle of allostery. *Biophysical Chemistry*, v. 98, p. 49-63, 2002.

Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F., Affonso, E. G. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 97B, p. 435-440, 1990.

Val, A. L., De Almeida-Val, V. M. F. Fishes of the Amazon and the environment. Manaus: Springer, 1995.



Val, A. L., Affonso, E. G., Almeida-Val, V.M.F. Adaptive features the Amazon fishes: blood characteristics of Curimatã (*Prochilodus cf nigrans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool.*, v. 65, n. 4, p. 832-843, 1992.

Val, A. L. & Honczaryk, A. Criando peixes na Amazônia. Manaus: INPA, 1995.

Yokoyama, T., Chong, K. T., Miyazaki, G., Morimoto, H., Shih, D. T. B., Unzai, S., Tame, J. R. H., Park, S. Y. Novel mechanisms of pH sensitivity in Tuna hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 27, p. 28632-28640, 2004.

Verde, C., Carratore, V., Riccio, A., Tamburrini, M., Parisi, E., Di Prisco, G. The functionally distinct hemoglobins of the arctic spotted wolffish *Anarhichas minor*. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 36312-36320, 2002.

Weber, R. E., Voelter, W. Novel factors that regulate oxygen binding in vertebrate hemoglobins. *Micron*, v. 35, p. 45-46, 2004.



METODOLOGIA UTILIZADA

1- Gel para isoeletrofocalização

Pesa-se 0,22g de agarose para isoeletrofocalização em erlenmeyer de 50ml e adiciona-se 13,2 ml de água bidestilada. Coloca-se em banho -maria de 3 a 5 minutos para a agarose dissolver e adiciona-se os anfólitos: 0,8 ml de anfólito na faixa de pH de 3-10 e 0,8 ml de anfólito na faixa de pH de 8-10,5. A solução dever ser rapidamente distribuída sobre uma placa de vidro (5 X 7 cm) que suporta 5 ml de gel. O gel solidifica-se rapidamente. Coloca-se, então, nas extremidades da placa duas tiras de papel de filtro (5 X 0,5 cm, com 1mm de espessura) embebidas em uma solução de NaOH 1M (extremamente catódica) e outra solução de H_3PO_4 1M (extremamente anódica).

Coloca-se a placa num isopor contendo gelo no seu interior, para dissipação do calor, e sobre a placa, coloca-se uma tampa de acrílico com os eletrodos sobre as tiras, permitindo, assim, a passagem de corrente elétrica pelo gel de agarose. Essa etapa é chamada pré-focalização. Durante a pré -focalização, é aplicada uma corrente de 5mA por 10 a 15 minutos, a fim de que os anfólitos se distribuam pelo gel, formando o gradiente de pH.

Após esse período, pressiona-se o gel, delicadamente, com um aplicador de amostra e adiciona-se as amostras de solução de hemoglobina no centro do gel. Inicia-se com uma corrente de 5mA até o gel absorver a amostra (mais ou menos 5 minutos), então, eleva-se a corrente elétrica para 8mA constante, no qual a corrida dura aproximadamente 40 minutos.



Após a corrida, o gel pode ser fixado com TCA 20% (ácido tricloroacético) por 3 minutos, cobrindo posteriormente o mesmo com papel de filtro para secagem. Se necessário, após uma boa desidratação do gel, procede-se a coloração com Ponceau ou Negro de Amido.

2- Propriedades Funcionais

Antes de se iniciar a desoxigenação da Hb, fez-se uma leitura da absorbância da oxihemoglobina inicial, uma vez que estes dados são utilizados para os cálculos de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_{50} .

O método experimental utilizado para avaliação das propriedades funcionais de ligação de O_2 foi o método espectrofotométrico - tonométrico (Giardina *et al.*, 1981). Este baseia-se nas mudanças espectrais que ocorrem durante a transição da forma desoxigenada para a forma oxigenada.

Em seguida, inicia-se a desoxigenação da Hb passando-se nitrogênio umidificado pelo tonômetro (Figura 1). Devido a alta afinidade desta Hb, foi necessário que se fizesse vácuo (com uma bomba de vácuo) no tonômetro, para auxiliar na desoxigenação da amostra. Após a desoxigenação da amostra que inicialmente foi avaliada visualmente, colocou-se o tonômetro em banho com temperatura controlada e, após cinco minutos, fez-se a leitura desta solução de acordo com a proposta de Benesch e Benesch, (1965):

$$\frac{\text{Abs}_{555}}{\text{Abs}_{540}} \geq 1,24$$

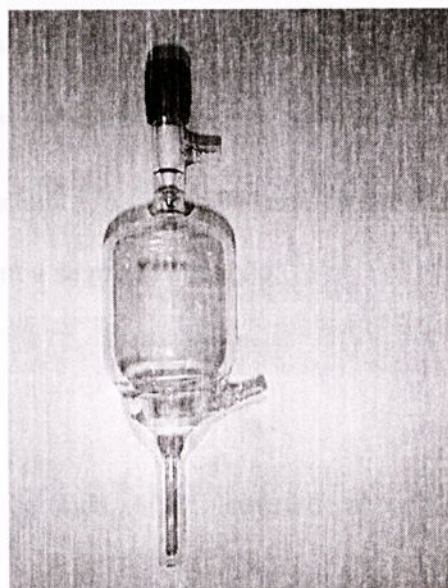


Figura 1: tonômetro utilizado nos estudos funcionais

Esta relação indica a proporção de hemoglobina desoxigenada na solução em relação à proporção de hemoglobina oxigenada, baseado nos coeficientes de absorvidade das formas desoxigenada e oxigenada em 555 e 540 nanômetros, respectivamente. Se o índice obtido for próximo ou igual a 1,24 iniciava-se a fase seguinte, se não era preciso passar mais nitrogênio pela amostra e fazer mais vácuo, até a obtenção de um bom coeficiente. A obtenção da forma desoxigenada não poderá ser um processo lento, pois poderia ocorrer a formação de meta-hemoglobina, o que prejudicaria todo o experimento.

Obtendo-se um bom índice, fez-se a leitura de absorbância da forma desoxigenada e, então, iniciou-se a adição de quantidades conhecidas de oxigênio no tonômetro, com uma seringa. Entre uma adição e outra esperava-se em média cerca de sete minutos para a leitura das absorbâncias que foram realizadas em: 690, 576, 569, 560 e 541nm. Este tempo era necessário para permitir o total equilíbrio entre a fase gasosa e a

solução. As adições de oxigênio prosseguiram até que se alcançasse elevados níveis de saturação. Por fim, o tonômetro era aberto para que se fizesse a leitura da oxihemoglobina final (100% saturada após o experimento).

As leituras em 576, 560 e 541nm, foram usadas para o cálculo da saturação fracional Y de acordo com a seguinte equação:

$$Y = \frac{(A^\lambda - A_0^\lambda)}{(A_{100}^\lambda - A_0^\lambda)}$$

onde λ é o comprimento de onda, A^λ é a leitura de absorvância da amostra, A_0^λ e A_{100}^λ as absorvâncias das formas desoxigenada e oxigenada, respectivamente. Como fizemos leituras em 3 comprimentos de onda, consideramos a variação total de absorvância entre oxi e desoxi-hemoglobina:

$$\Delta A_{REF} = (A_{100}^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_{100}^{560}) + (A_{100}^{576} - A_0^{576})$$

Após cada adição "i", foi feita a leitura de absorvância na amostra equilibrada permitindo calcular a saturação:

$$Y = \frac{(A_i^{540} - A_0^{540}) + (A_0^{560} - A_i^{560}) + (A_i^{576} - A_0^{576})}{\Delta A_{REF}}$$

As leituras de absorvância em 569nm (ponto isosbéstico) permitiram corrigir as medições espectrais.

Por sua vez, a pO_2 (pressão parcial de oxigênio) foi calculada pela equação abaixo (Giardina e Amiconi, 1981) modificada por Bonaventura:

$$pO_2 = \frac{(\% O_2 * \frac{TB}{TA}) * (PBC - (PV * UR))}{VT - VA} * VI$$

onde

pO_2 (mmHg): é a pressão parcial de oxigênio . $\% O_2$ é o percentual do gás na atmosfera

(21%), PBC é a pressão atmosférica corrigida (mmHg), PV é a pressão de vapor de água, UR é a umidade relativa (%), VT é o volume do tonômetro (mL), VA é o volume de amostra (mL), VI é o volume de ar injetado (mL), TB é a temperatura do banho (°C) e TA é a temperatura ambiente (°C).

As adições prosseguiram até que se alcançasse elevados níveis de saturação. Por fim, o tonômetro foi aberto para que fizéssemos a leitura da oxi-hemoglobina final (100% saturada após o experimento).

Posteriormente, os valores de absorbância obtidos foram digitados em um programa que mostra a representação gráfica de Hill e executa os cálculos de P_{50} , $\text{Log } P_{50}$ e n_H . Após cada experimento, a quantidade de meta-hemoglobina inicial e final foram quantificados de acordo com o procedimento mostrado a seguir. Os dados experimentais com mais de 5% de meta-hemoglobina inicial ou final formada foram descartados.

Cálculo da Concentração de Oxi-hemoglobina e Meta-hemoglobina

A determinação da concentração da oxi e meta-hemoglobina foi realizada utilizando as leituras em 576 e 630 nm, com coeficientes de extinção (ϵ_{576}^{meta} , ϵ_{576}^{oxi} , ϵ_{630}^{meta} e ϵ_{630}^{oxi}) determinados para a hemoglobina humana (Benesch *et al.*, 1973).

O cálculo da concentração de meta-hemoglobina foi obtido determinando as absorbâncias em 576 e 630 nm para depois correlacioná-las com seus respectivos coeficientes de extinção na seguinte equação:

$$\text{Abs}_{576} = [\text{oxiHb}] \cdot \epsilon_{576}^{oxi} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{576}^{meta} \quad \text{Eq. 14}$$

$$\text{Abs}_{630} = [\text{oxiHb}] \cdot \epsilon_{630}^{oxi} + [\text{metaHb}] \cdot \epsilon_{630}^{meta} \quad \text{Eq. 15}$$

Dessa forma, a concentração das duas espécies (as duas incógnitas) pode ser resolvida conforme segue, onde “DET” é a determinante da matriz:

$$DET = \begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & \epsilon_{576}^{meta} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix}$$

$$[metaHb] = \frac{\begin{vmatrix} \epsilon_{576}^{oxi} & Abs_{576} \\ \epsilon_{630}^{oxi} & Abs_{630} \end{vmatrix}}{DET}$$

$$[oxiHb] = \frac{\begin{vmatrix} Abs_{576} & \epsilon_{576}^{meta} \\ Abs_{630} & \epsilon_{630}^{meta} \end{vmatrix}}{DET}$$

Como no caso da meta-hemoglobina os coeficientes variam com o pH, usamos os valores de acordo com a condição experimental.

Efeito de Temperatura

Os parâmetros calculados foram a energia livre (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS). A energia livre foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\Delta G = -R.T.\ln 1/P50.cte \text{ Henry}$$

onde R é a constante universal dos gases ($R=1,987 \text{ cal/mol}^{\circ}\text{K}^{-1}$), T é a temperatura (K), $P50$ é a pressão de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios de hemoglobina em mmHg e a cte de Henry ($1\text{mmHg}=1,77\times 10^{-6} \text{ M O}_2$ a 20°C) (Brouwer & Baker-Kiry, 1988).

O cálculo da variação da entalpia (ΔH) foi obtido pela expressão:

$$\Delta H = 2,303.a.R$$

onde “a” é a inclinação da reta obtida pelo gráfico $\text{Log } P50 \times 1/T \text{ (K}^{-1}\text{)}$ (Powers, 1978) e R é a constante dos gases ($R=1,987 \text{ cal/mol}^{\circ}\text{K}^{-1}$) (Giardina et al., 1993).

A variação da entropia foi (ΔS) foi obtida da expressão:

$$\Delta S = \Delta H - \Delta G/T \text{ (20}^{\circ}\text{C)}$$

Autorização para reprodução

Autorizo a reprodução desta tese,

São José do Rio Preto, 12 de setembro de 2005.

Patrícia G. de Souza

Patrícia Caetano de Souza



