

PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE HEMOGLOBINAS DE PEIXES MARINHOS. I — CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA⁽¹⁾

Aila Maria S. Fontenele Duarte⁽²⁾
Maria do Socorro S. Silva Silveira⁽²⁾
Hélio Frota Vieira⁽³⁾
Maria Laise Chaves Vieira⁽³⁾

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza — Ceará — Brasil

As múltiplas formas de hemoglobina encontradas em um animal como o peixe, por exemplo, pode ser vista como uma consequência da adaptação desse animal ao meio ambiente e/ou das suas atividades biológicas (Wolvekamp, 1961; Prosser & Brown, 1961). Assim, em determinadas situações, uma de suas hemoglobinas pode desempenhar, com maior eficiência, a função de transporte do oxigênio, em consequência de modificação do "habitat" onde os diferentes teores de oxigênio exigem hemoglobinas de maior ou menor afinidade, ou pelas diferentes situações biológicas, causando uma maior ou menor acidose tecidual (Riggs, 1979).

A existência dessas múltiplas formas de hemoglobinas em hemolisados de eritrócitos tem se tornado um interessante modelo para estudos de adaptação do animal ao meio ambiente, bem como para estudos da diferenciação estrutural dessas moléculas.

Diferentes formas de hemoglobinas em um mesmo animal tem sido discutida como sendo consequência de: a) uma cadeia peptídica pode combinar-se com outra de maneira a formar híbridos diferentes; b) adição de outras moléculas, consequentemente, mais genes para codificar essa proteína; c) mudanças conformacionais e modificação no grau de polimerização de suas sub-unidades (Riggs, 1970). Qualquer que seja o mecanismo que leve à existência dessas formas múltiplas, é reconhecido que em hemolisados de eritrócitos de peixes, a diversidade no número de componentes é bastante pronunciada (Grigg, 1974).

Assim, iniciamos um estudo eletroforético de hemolisado de eritrócitos a fim de correlacionar esses dados com outras propriedades estruturais e algumas propriedades funcionais dessas diferentes moléculas.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes das espécies mais comuns do litoral cearense foram coletados por embarcações pesqueiras. Logo após a captura foram sangrados por punção cardíaca usando solução de citrato de sódio 0,35 M — cloreto de sódio 0,2 M e as amostras foram mantidas a 4°C.

(1) Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(2) Bolsista de Aperfeiçoamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

(3) Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Por centrifugação foram separadas as hemácias que, após lavadas 3-4 vezes em solução de cloreto de sódio 0,2 M contendo EDTA 10^{-3} M, foram hemolisadas com solução de EDTA 10^{-3} M, pH 7,0. As soluções de hemoglobina dos hemolisados foram obtidas por centrifugação e mantidas em refrigerador a 4°C.

Os ensaios eletroforéticos foram feitos em discos de gel de poli-acrilamida a 7,5% (Ornstein, 1964; Davis, 1964) e em gel de acetato de celulose (Pabis *et al.*, 1968). Na eletroforese em gel de poli-acrilamida, usando tampão tris - Cl 0,1 M, pH 8,1 na cuba inferior (anodo) e tris-glicina 0,05 M, pH 8,9 na cuba superior (catodo), a análise mostra a ser analisada consistia de uma solução de hemoglobina 10^{-2} M, onde foram adicionadas uma parte de glicerol e 2 partes de tampão tris-glicina 0,05 M, pH 8,9. Após a colocação da amostra foi feita a eletroforese usando uma intensidade de corrente elétrica de 140 V, por um período de 1 hora.

Os geles de poli-acrilamida após a eletroforese foram fixados por 30-60 minutos em solução de ácido tricloroacético a 12,5% e corados tanto para proteínas como para hemoglobinas. Os corantes utilizados foram: solução de comassie-blue 0,5%, para proteínas e solução de benzidina (benzidina, 1 g; metanol, 75 ml; ácido acético, 0,012 ml; água oxigenada a 130 V, 0,2 ml; e nitroprusiato de sódio, 0,01 g), para hemoproteínas. Como agente descorante foi utilizada solução de ácido acético a 7%.

A eletroforese em gel de acetato de celulose foi feita utilizando uma solução de hemoglobina a 2-3% usando como suporte fitas de cellogel em tampão tris-glicina 0,1 M, pH 9,5, mantendo uma intensidade de corrente elétrica da ordem de 200 V, por um período de 1 hora. Após a corrida eletroforética, as fitas foram coradas com solução Pouceau S'' (Pouceau, 0,9 g; ácido tricloroacético a 5%, 100 ml) e lavadas com solução de ácido acético a 5%, para retirar o excesso de corante.

Finalmente, as fitas foram desidratadas com metanol por 30 segundos e em seguida tratadas com solução contendo metanol, 85 ml; ácido acético, 14 ml; e glicerol, 1 ml por 1 minuto. Removido o excesso da solução, as fitas foram colocadas em estufa a 60°C até se tornarem transparentes (aproximadamente 5 minutos) e registradas, em densitômetro, as absorvâncias de todos os picos.

Com os valores das absorvâncias calculou-se as porcentagens de cada componente hemoglobínico usando-se para isso a integração simplificada de Simpson:

$$\int_{x_0}^{x_n} f(x) dx \cong \frac{h}{3} (f_0 + 4f_1 + 2f_2 + 4f_3 + 2f_4 + \dots + 2f_{n-1} + f_n)$$

onde:

$$h = \frac{x_n - x_0}{n}, \quad \text{sendo } x_n > x_0 \text{ e}$$

n = número de sub-intervalos.

Eventualmente, as amostras de hemoglobina foram convertidas para a forma férrica (metahemoglobina) pelo tratamento com ferricianeto de potássio, antes de se processar a eletroforese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das eletroforeses dos hemolisados de eritrócitos dos peixes estudados mostraram o número de componentes hemoglobínicos, suas proporções e sua velocidade de migração. Os resultados da eletroforese em gel de poli-acrilamida estão expressos na tabela I e figura 1, enquanto que os resultados da eletroforese em gel de acetato de celulose estão na tabela I e na figura 2. A figura 3 apresenta os registros das absorvâncias, obtidas em densitômetro, das fitas de acetato de celulose bem como a porcentagem calculada de cada componente.

Por esses resultados, podemos observar que algumas espécies possuem vários componentes hemoglobínicos como é o caso de *C. crysos* que apresenta oito e de *P. brasiliensis*, *O. crysurus*, *C. calamus* e

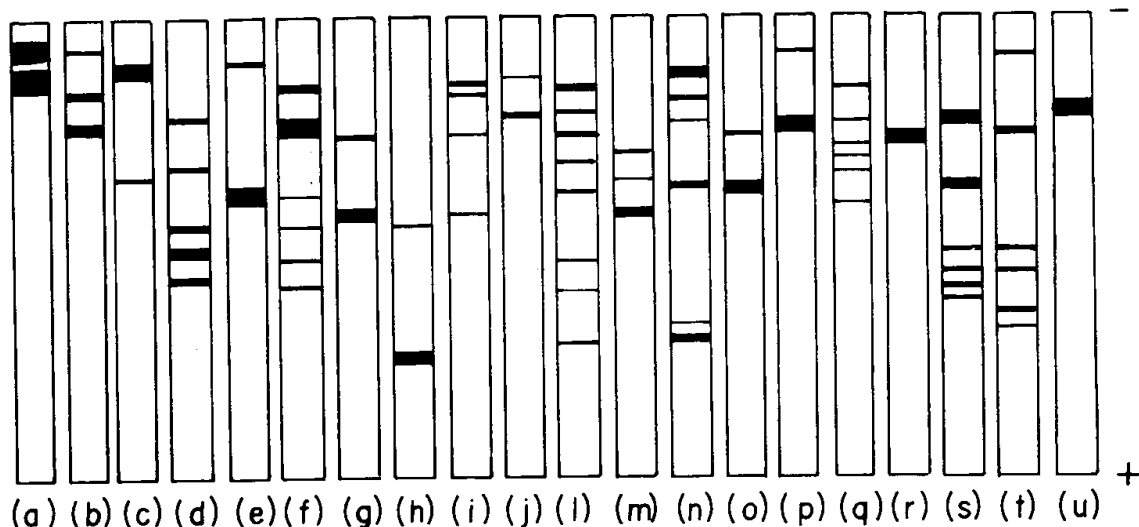


Figura 1 — Esquema mostrando a migração eletroforética em poliacrilamida dos componentes hemoglobínicos de hemolisados de eritrócitos: (a) *S. brasiliensis*; (b) *M. plumieri*; (c) *E. alletteratus*; (d) *H. plumieri*; (e) *C. hippurus*; (f) *O. chrysurus*; (g) *B. bagre*; (h) *G. cirratum*; (i) *M. bonaci*; (j) *S. crumenophthalmus*; (l) *C. crysos*; (m) *L. synagris*; (n) *P. brasiliensis*; (o) *C. hippos*; (p) *S. cavalla*; (q) *L. jocu*; (r) *B. vetula*; (s) *C. calamus*; (t) *H. ascencionis*; (u) *L. purpureus*.

TABELA I

Número de componentes hemoglobínicos obtidos na separação eletroforética em discos de poliacrilamida e em fitas de acetato de celulose (cellogel), de hemolisados de eritrócitos de diferentes peixes marinhos.

Espécies	Número de componentes	
	poliacrilamidade	acetato de celulose
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	2	2
<i>Malacanthus plumieri</i>	3	3
<i>Euthynnus alletteratus</i>	2	2
<i>Haemulon plumieri</i>	5	3
<i>Coryphaena hippurus</i>	2	3
<i>Ocyurus chrysurus</i>	6	5
<i>Bagre bagre</i>	2	2
<i>Ginglymostoma cirratum</i>	2	2
<i>Mycteroperca bonaci</i>	4	4
<i>Selar crumenophthalmus</i>	2	2
<i>Caranx crysos</i>	8	8
<i>Lutjanus synagris</i>	3	3
<i>Polyclemus brasiliensis</i>	6	6
<i>Caranx hippos</i>	2	2
<i>Epinephelus adscencionis</i>	—	3
<i>Gymnura micrura</i>	—	3
<i>Scomberomorus cavalla</i>	2	2
<i>Lutjanus jocu</i>	6	3
<i>Balistes vetula</i>	1	1
<i>Calamus calamus</i>	6	—
<i>Holocentrus ascencionis</i>	6	—
<i>Lutjanus purpureus</i>	1	1

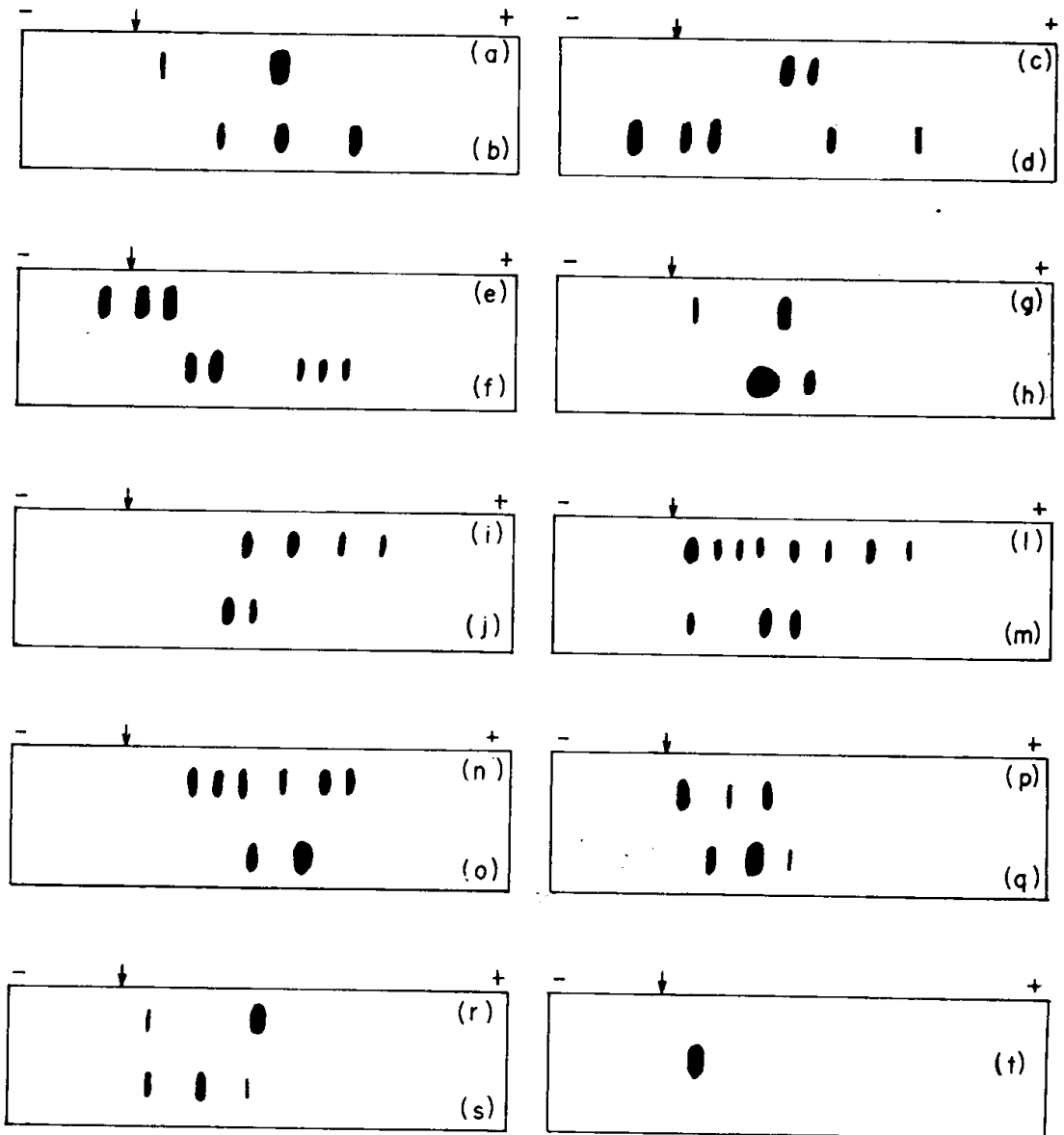


Figura 2 - Representação esquemática de eletroforese em fitas de acetato de celulose dos hemolisados de eritrócitos de: (a) *S. brasiliensis*; (b) *M. plumieri*; (c) *E. alletteratus*; (d) *H. plumieri*; (e) *C. hippurus*; (f) *O. chysurus*; (g) *B. bagre*; (h) *G. cirratum*; (i) *M. bonaci*; (j) *S. crumenophthalmus*; (k) *C. crysos*; (l) *L. synagris*; (m) *P. brasiliensis*; (n) *C. hippos*; (o) *E. adscencionis*; (p) *G. micrura*; (q) *S. cavalla*; (r) *L. jocu*; (s) *B. vetula*, utilizando tampão tris-glicina 0,1 M pH 9,5. A seta indica o ponto de aplicação da amostra.

H. ascencionis, que apresentam seis enquanto que *L. purpureus* e *B. vetula* possuem um único componente hemoglobínico.

Essa heterogeneidade no número de componentes hemoglobínicos pode ser atribuída, baseado nas conclusões de Johansen & Weber (1976), Sullivan (1977) e Riggs (1979), à capacidade de adaptação que esses animais possuem.

Aqueles que apresentam um único componente são animais que vivem sempre em iguais condições de "habitat" e "modus vivendi", isto é, são encontrados em uma mesma faixa de profundidade, possuindo hábitos pouco variáveis, ao passo que as espécies que apresentam grande número de componentes são animais encontrados em diferentes níveis de profundidade ou são animais que

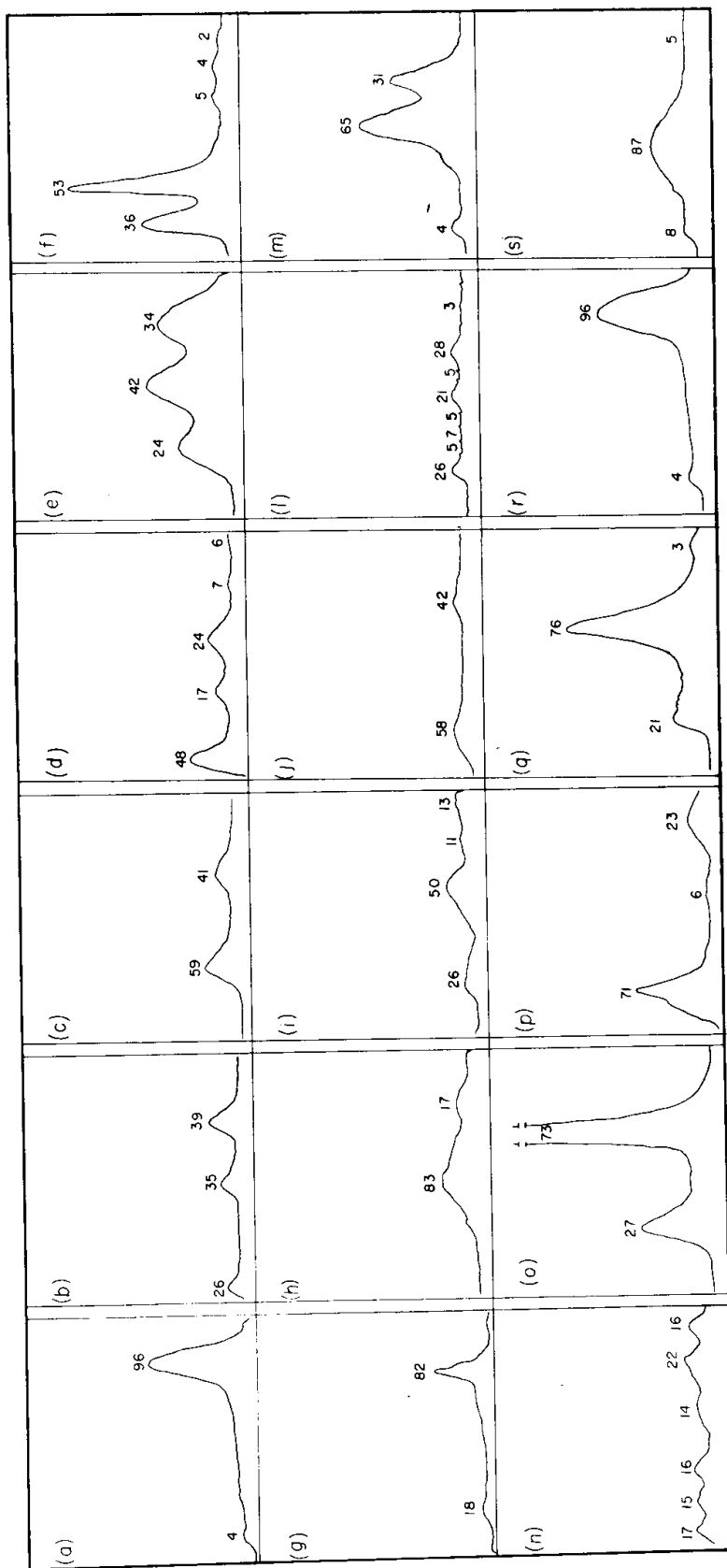


Figura 3 — Densitogramas da eletroforese em acetato de celulose de hemolisados de eritrócitos de: (a) *S. brasiliensis*; (b) *M. plumieri*; (c) *E. alleletteratus*; (d) *H. plumieri*; (e) *C. hippurus*; (f) *O. chrysurus*; (g) *B. bagre*; (h) *G. cirratum*; (i) *M. bonaci*; (j) *S. crumenophthalmus*; (k) *C. crysos*; (l) *L. synagris*; (m) *P. brasiliensis*; (n) *C. hippos*; (o) *E. adscencionis*; (p) *S. cavalla*; (q) *S. micrura*; (r) *S. focu*. Os valores indicados em cada pico correspondem à porcentagem desse componente hemoglobínico.

apresentam um comportamento bastante variado, estando às vezes em ligeiro repouso, às vezes, em movimentação excessiva.

Nesses resultados, alguns dados nos parecem surpreendentes, como o fato que, apesar de pertencerem à mesma família (Lutjanidae) a espécie *L. purpureus* apresentou um componente hemoglobínico enquanto a espécie *L. jocu* apresentou seis. Esse fato talvez possa ser discutido em função de seus "habitats", uma vez que o *L. purpureus* é peixe encontrado sempre em águas profundas enquanto que o *L. jocu* é encontrado em diferentes níveis de profundidade. Da mesma maneira, talvez, se possa discutir os resultados dos carangídeos *C. hippos* e *C. crysos*. Numa análise mais acadêmica esses resultados sugerem que algumas das espécies estudadas apresentam uma incrível capacidade de adaptação, a ponto de produzirem diferentes moléculas transportadoras de oxigênio, capazes de atender as diferentes condições ambientais às quais o animal se submete ou as suas necessidades de movimento, onde consumo maior ou menor de oxigênio condiciona suas necessidades desse gás. Essa capacidade adaptativa, baseando-se no estudo quantitativo dos componentes hemoglobínicos de peixes, é também analisada em trabalhos com *Cyprinus carpio* (Weber et al., 1976), em peixes da Amazônia Central (Davis et al., 1979) e na truta *Salmo gairdneri* (Brunori et al., 1973).

Quanto ao suporte eletroforético utilizado, podemos observar que tanto na eletroforese em discos de poliacrilamida como em fita de acetato de celulose a separação das hemoglobinas é eficiente. Entretanto, na poliacrilamida a separação é melhor pois permite melhor visualizar as faixas, isto é, por ser mais sensível, permite evidenciar faixas de alguns componentes que existem em porcentagens até muito pequenas no hemolisado de eritrócitos. Isso provavelmente explica o fato de os hemolisados de *L. jocu* e de *H. plumieri* terem mos-

trado maior número de componentes na eletroforese em poliacrilamida, porém no acetato de celulose os hemolisados de *C. hippurus* e *H. plumieri* revelaram a existência de um componente catódico, o que não é possível se observar em eletroforese em disco de poliacrilamida quando feita nessas condições de pH e força iônica.

A avaliação das proporções de cada componente no hemolisado, através da densitometria, permite observar que as espécies que possuem dois ou mais componentes os têm em proporções não semelhantes, predominando quantitativamente um deles, exceção feita aos hemolisados de *M. plumieri*, *C. crysos*, *P. brasiliensis* e *C. hippurus*. Esse fato nos permite observar que em quase todas as espécies estudadas existe um componente hemoglobínico principal, responsável pela oxigenação dos tecidos do animal durante quase todo período, e um ou mais componentes secundários que devem ser responsáveis por essa oxigenação tecidual nos períodos em que o animal está em condições de exercícios extremo ou em *locus* adverso, isto é, em condições não normais de vida ou ambiente.

SUMMARY

English title: Structural properties of hemoglobins of marine fish. I — Electrophoretic characterization.

The number of hemoglobin components under hemolysis of erythrocytes in some marine fishes of Brazilian northeastern region was determined, through electrophoresis in discs of poliacrilamide and bands of cellulose acetate.

The sampled submitted to electrophoresis was comprised of a hemolytic solution of erythrocytes containing hemoglobin at a 10^{-2} M concentration added of an equal volume of glycerol. In some tests potassium ferricyanite was added to the stuff so that metahemoglobin could be obtained. After the

electrophoretic migration took place, the tapes and bands were coloured both by a 0.5% Comassie-blue solution (colouration for proteins) and a benzidine solution (colouration for hemoproteins).

The number of presented bands showed a great diversity between the different hemolytic solutions studied: the ones for the triggerfish, *B. vetula* and the Caribbean red snapper, *L. purpureus*, revealed the existence of a single component whereas eight components were found in the hemolytic solution for *C. crysos*.

These data have been discussed concerning the behaviour of those fishes, a relationship having been found between number of hemoglobin components and adaptative capacity of the animal to its habitat: fishes with 1-2 components were found in a rather narrow depth range while those with a greater number were found both in bottom and surface waters.

BIBLIOGRAFIA

Brunori, M.; J. Bonaventura; B. Giardina; F. Bossa & E. Antonini — 1973 — Hemoglobins from trout: structural and functional properties. *Mol. Cell. Biochem.*, Den Haag, 1 : 189 — 196.

Davis, J. B. — 1964 — Disc electrophoresis. II — Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, 121 : 404 — 427.

Davis, U.E.H.; H.J. Fyhn; J. B. Davis; D. A. Power; W. L. Fink & R. L. Garlick — 1979 —

Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 62 : 39 — 66.

Grigg, G. C. — 1974 — Respiration: function of blood in fishes. *Chem. Zool.*, New York, 8 : 331 — 368.

Johansen, K. & R. E. Weber — 1976 — On the adaptability of haemoglobin function to environmental conditions. In D. P. Spencer (Ed.), *Perspectives in Experimental Biology*, 1st edition, Pergamon Press, New York.

Ornstein, L. — 1964 — Disc electrophoresis. I — Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, 121 : 321 — 349.

Pabis, A. ; E. Sulis; L. Alessio & P. M. Mannucci — 1968 — Cellogel electrophoresis of haemoglobins. *Clin. Chim. Acta*, New York, 20 : 449 — 453.

Prosser, C. L & F. A. Brown — 1961 — *Comparative animal physiology*, 1st edition, Saunders, Philadelphia.

Riggs, A. — 1970 — Properties of fish hemoglobins. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, 1st edition, Academic Press, New York.

Riggs, A. — 1979 — Studies of the hemoglobins of Amazonia fishes: an overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, London 62 : 257 — 272.

Sullivan, B. — 1977 — Hemoglobin variation and its significance in fish. US-USSR work-shop on physiology and biochemistry of aquatic animals.

Weber, R. E.; B. Sullivan; J. Bonaventura & C. Bonaventura — 1976 — The hemoglobin system of the primitive fish *Amia calva*. Isolation and functional characterization of the individual haemoglobin components. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, 434 : 18 — 31.

Wolvekamp, H. A. — 1961 — Hemoglobins. In R. G. Mac Farlane & A.H.T. Robb-Smith (Eds.), *Functions of the Blood*, 1st edition. Academic Press, New York.