

Efeito de nucleosídeo trifosfato eritrocítico no equilíbrio de oxigênio de hemoglobinas completas e fracionadas de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, bagres aeróbicos facultativos (*)

Roy E. Weber (1)
Stephen C. Wood (2)

Resumo

São estudados o equilíbrio de oxigênio de hemoglobinas de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* e suas sensibilidades ao nucleosídeo trifosfato eritrocítico (NTP), ATP e guanosina trifosfato (GTP) para investigar o mecanismo pelo qual o sangue se adapta à respiração aérea e aquática. As hemoglobinas de ambas as espécies são heterogêneas. Todas as frações hemoglobínicas isoladas por focalização isoeletrica, revelaram uma alta sensibilidade a NTP, mas a GTP decresce a afinidade de O₂ cerca de duas vezes tão efetivamente quanto a ATP. Foi encontrado um componente hemoglobínico catódico com um efeito Bohr revertido em *Pterygoplichthys* mas não em *Hypostomus*. Os dados são discutidos em relação à modulação do cofator *in vivo*, de afinidade pelo O₂ do sangue e a importância adaptativa da heterogeneidade funcional de hemoglobinas de peixes.

INTRODUÇÃO

Hypostomus e *Pterygoplichthys* são bagres inativos, habitantes de leito e encouraçados, encontrados no rio Amazonas, sendo capazes de respiração bimodal. Enquanto eles extraem oxigênio com as guelras em águas bem oxigenadas (monóxica), engolem o ar quando a água é hipóxica, usando o trato intestinal com órgão para as trocas gasosas.

Apesar de aeróbico a baixo O₂ na água, a afinidade pelo oxigênio do sangue de *Hypostomus* é mais alta quando o peixe está em água hipóxica do que em normóxica. A aumentada afinidade pelo oxigênio parece ser adaptativa a tensões internas de O₂ baixa, as tensões de oxigênio internas em proporção ao tempo sob hipóxica, são causada por uma diminuída interação com os cofatores alostéricos dos glóbu-

los vermelhos. Em *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*, a aclimatação hipóxica é acompanhada por um marcante decréscimo nas concentrações dos nucleosídeos trifosfatos (NTP), particularmente guanosina trifosfato (GTP) (Weber *et al.*, 1978). Embora a retenção de CO₂ ocorra durante a respiração aeróbica na água hipóxica, um aumento de bicarbonato no plasma prevê um decréscimo no pH sangüíneo, o qual, a miúdo aumenta a afinidade oxigênio associada a uma queda no GTP eritrocítico (Wood *et al.*, 1978).

Este artigo focaliza as propriedades de união de oxigênio e sensibilidade aos fosfatos eritrocíticos de hemoglobinas livres de cofatores, dos bagres encouraçado, *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* com o objetivo de elucidar, os mecanismos pelos quais todo o sangue responde aos níveis de oxigênio da água e ao modo de respiração. Ademais, as implicações de multiplicidade da hemoglobina a esta adaptação é investigada por medida de pH e sensibilidade de cofatores das frações de hemoglobina isoladas. Tais dados são de interesse comparativo adicional com respeito a possíveis relações entre multiplicidade da hemoglobina e *habitat* do peixe. Isto sustenta a hipótese (Hashimoto *et al.*, 1960; Powers, 1972 Powers & Edmundson, 1972) de que a ocorrência de componentes hemoglobínicos catódicos com afinidade por oxigênio alta e pH-insensibilidade ao pH no peixe, são adaptativos ao transporte de oxigênio sob condições de baixa tensão de oxigênio ou pH interno, quando os componentes anódicos sensíveis ao pH estão incapacitados para carregar o O₂. *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* são bagres intimamente relacionados, de hábitos e *habitat* similares.

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

(1) — Department of Zoophysiology of Aarhus, DK-8000 Aarhus C., Denmark.

(2) — Department of Physiol, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87131, U.S.A.

Entretanto, enquanto ambas as espécies mostram polimorfismo em heterogeneidade hemoglobínica, apenas *Pterygoplichthys* parece conter quantidades significativas de hemoglobinas (catódicas) eletroforéticamente lentas (Fyhn *et al.*, 1978). Isto sugere que *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* são candidatos promissores para atestar as argumentações acima sobre a importância adaptativa de hemoglobinas catódicas no peixe.

MATERIAL E MÉTODOS

Os *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* foram coletados no rio Amazonas, próximo ao lago do Janauacá, cerca de 150 km a oeste de Manaus, Brasil. Para prevenir heterogeneidade de amostras associada com polimorfismo hemoglobínico nestes peixes (Fyhn *et al.*, 1978), todos os presentes dados referem-se à hemoglobina de um espécime de cada espécie (pesando cerca de 850 e 300 g, respectivamente). Baseado na heterogeneidade hemoglobínica, os *Hypostomus* usados correspondem ao fenótipo V, e os *Pterygoplichthys* ao fenótipo I (Fyhn *et al.*, 1978).

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca usando seringas heparinizadas. Os glóbulos vermelhos foram lavados 3 vezes em NaCl a 1,5% contendo Tris 10^{-2} M, pH 7,4, empacotados por centrifugação e congelado por 2-4 semanas, após conversão da hemoglobina a carboxi derivado (ex., o estado no qual o padrão eletroforético de hemoglobina de truta é mais estável durante estocagem em congelador — Reinitz, 1976). A hemoglobina em solução foi preparada por mistura de 2-3 volumes de água com 1 volume de glóbulos vermelhos e precipitando os fragmentos celulares por centrifugação. Todos os processos preparativos foram conduzidos a $0-5^{\circ}\text{C}$.

As hemoglobinas foram fracionadas por passagem através de troca iônica em Amberlite MB-3. As amostras foram reduzidas por adição de ditionito de sódio sólido e dialisadas contra 3 trocas de tampão Tris 10^{-2} M, pH 7,5, contendo 5×10^{-4} EDTA por 48 horas. A hemoglobina foi concentrada usando concentradores Amicon B15 (Oosterhout, Holland), e as concentrações foram medidas espectrofotometricamente. O equilíbrio de O_2 foi medido por uma técnica de câmara de difusão, modificada

segundo Niesel e Thews (1961). Valores de P_{50} e n_{50} (expressando a tensão de oxigênio e o coeficiente de cooperatividade de Hill da hemoglobina a meia saturação) foram interpoladas por plotado logarítmico linearizado dos dados de equilíbrio de O_2 . Os efeitos de ATP e GTP foram medidos por adição às soluções de hemoglobina fracionada de volumes apropriados de soluções de concentrações conhecidas, dos sais dissodícos dos nucleosídeos trifosfatos (ensaiados usando testes químicos da Sigma).

As hemoglobinas foram separadas por focalização isoeétrica em uma coluna preparativa de 110 ml LKB, a 5°C usando uma mistura de anfolinas LKB de pH 5 a 8 e 3 a 10 (0,5 e 0,2% respectivamente). Na estabilização o conteúdo da coluna foi fracionada em amostras de 1,6 ml para medidas de D.O. a 540 nm e pH a 5°C . As frações de hemoglobina recuperadas da focalização isoeétrica foram dialisadas por 48 horas contra diversas trocas de Tris-EDTA anterior às medidas de equilíbrio de O_2 .

RESULTADOS

As afinidades por oxigênio e valores de n e suas dependências de pH dos hemolisados fracionados de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* são dados nas Figs. 1 e 2 (curvas sólidas). As hemoglobinas de ambas as espécies mostram distintos efeitos Bohr alcalinos — a pH 7,0, os valores ϕ ($\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$) são cerca de $-0,34$ e $-0,46$, respectivamente. A pH mais alto, os efeitos Bohr são, entretanto, reduzidos e revertidos (tornando-se cerca de $+0,04$ e $+0,14$, respectivamente, a pH 8,0). As hemoglobinas fracionadas de ambas as espécies mostram fraca cooperatividade na ligação O_2 ($n = 1,2$ a $1,5$).

Os efeitos dos principais nucleosídeos trifosfato eritrocíticos ATP e GTP, são mostrados nas Fig. 3A e B. A afinidade das hemoglobinas por O_2 , de ambas as espécies, é marcadamente decrescida por cada fosfato mas a tensão de O_2 de meia-saturação aumenta cerca de 2 vezes mais na presença de GTP, como o faz com ATP à mesma concentração. Os cofatores aumentam o coeficiente de cooperatividade n , mas este efeito é mais marcado em *Hypostomus* do que em *Pterygoplichthys*.

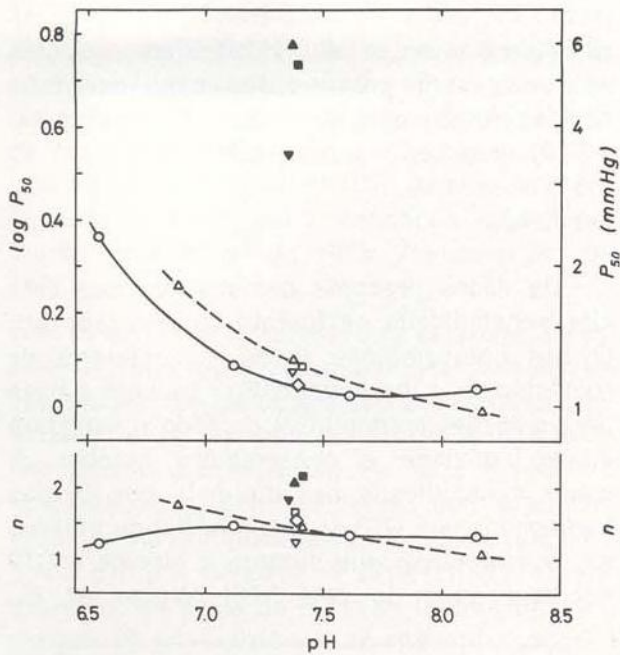


Fig. 1 — Efeitos de pH e GTP sobre a tensão de oxigênio à meia-saturação, P_{50} e coeficientes de cooperatividade de Hill n de hemoglobinas de *Hypostomus*, medidos em tampões Tris e Bis Tris, $I = 0.05$ a 25°C , hemolisado fracionado, $0,15 \text{ mM Hb}$ (base tetrâmera); Δ , \blacktriangle , componente hemoglobínico I; \square , \blacksquare , componente II; ∇ , \blacktriangledown , componente III (cf. Fig. 4A) todos a concentrações de $0,05 \text{ mM}$; \diamond , componentes I+II+III, concorrendo às suas concentrações relativas aproximadas *in vivo* (74, 18 e 8%, respectivamente, de hemoglobina total). Símbolos abertos — hemoglobinas fracionadas; símbolos fechados, hemoglobinas fracionadas adicionadas de GTP (excesso molar de cerca de 8 vezes sobre a Hb tetrâmera).

As fig. 4A e B mostram a separação dos componentes de hemoglobina de cada espécie por focalização isoeétrica. A hemoglobina de *Hypostomus* é resolvida em 3 frações principais. Os carboxiderivados destas frações foram isoeletricamente próximos de 7,4, 6,7 e 6,0 a 5°C , e suas abundâncias relativas decresceram com o decréscimo dos pontos isoeletricos (cerca de 72,17 e 7% do heme total, respectivamente). Além disso 2 componentes menores (cada um correspondendo a menos de 2% do heme total) foram focalizados perto de pH 8 e 5,7 (Fig. 4A). A hemoglobina de *Pterygoplichthys* exibiu alto grau de heterogeneidade de carga, resolvendo em 5 componentes principais com valores de pI próximos de 8,7, 7,9, 7,2, 6,9 e 6,4, e uns poucos compo-

nentes pequenos (valores de pI em torno de 7,6 e 5,6). Para os experimentos de equilíbrio de O_2 duas frações foram preparadas, contendo os mais abundantes componentes de hemoglobina catódico e anódico respectivamente (a e b na Fig. 4B).

O componente de hemoglobina mais abundante (I) de *Hypostomus* tem afinidade por O_2 similar e do hemolisado mas com um efeito Bohr levemente maior do que o hemolisado total (Fig. 1), indicando a presença de uma mais baixa sensibilidade de pH nos outros componentes na ausência de interações mútuas. Cada um dos 3 principais componentes mostrou uma alta sensibilidade de seus valores P_{50} à presença de GTP próximo a pH 7,4 (Fig. 1).

Em *Pterygoplichthys* os dois grupos de componentes estudados funcionalmente (a e b na Fig. 4B) demonstraram propriedades de equilíbrio de O_2 divergentes. Em contraste a um marcado efeito Bohr nos componentes anódicos (b), as hemoglobinas catódicas têm um leve efeito Bohr revertido $\phi = -0,53$ e $+0,08$, respectivamente, a pH 7,0). Tendo em mente as diferenças de concentração, a Fig. 1 mostra que a afinidade por O_2 e sua sensibilidade de pH do hemolisado em média aproximadamente aquelas das frações separadas, indicando a ausência de uma interação funcionalmente significativa entre estes. Ambas as frações exibem a mesma sensibilidade a ATP

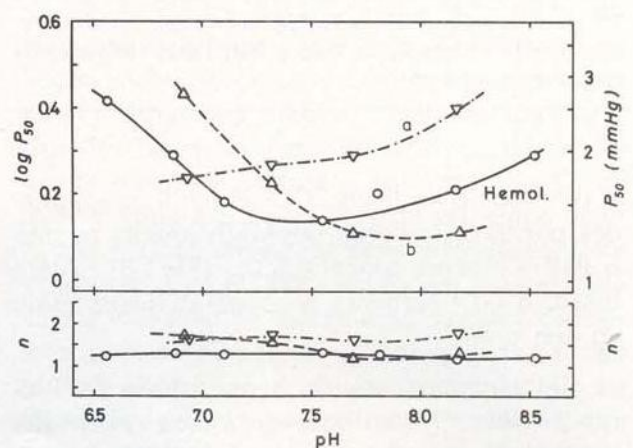


Fig. 2 — Dependência de pH do P_{50} e valores de n de hemoglobinas fracionadas de *Pterygoplichthys* medida em tampões Tris e Bis Tris, $I = 0,05$ a 25°C , hemolisado, $0,33 \text{ mM Hb}$; Δ , fração a (cf. Fig. 4B), $0,06 \text{ mM Hb}$; ∇ , fração b, $0,08 \text{ mM Hb}$.

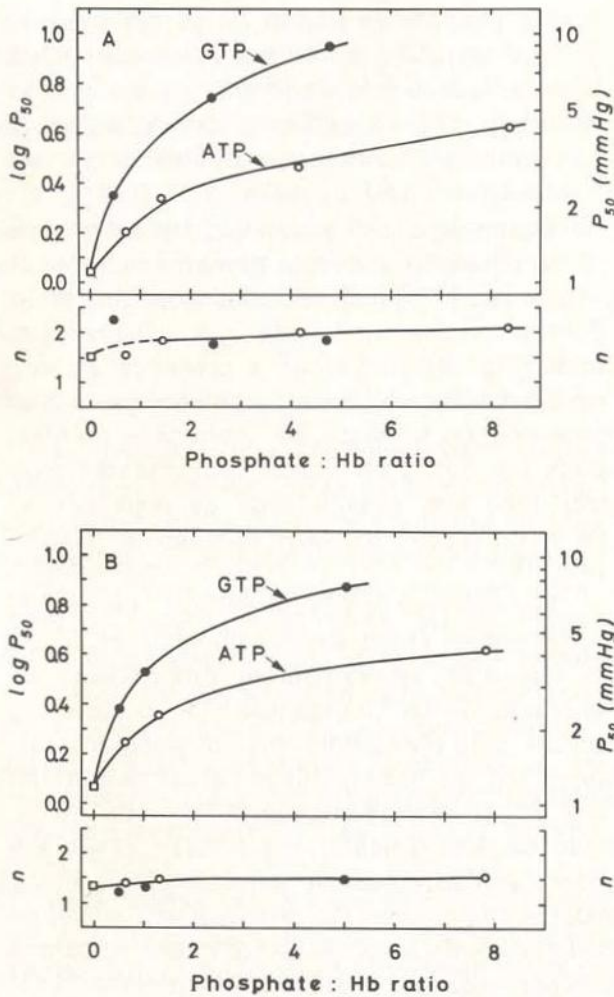


Fig. 3a e b — Efeitos de ATP (O) e GTP (●) sobre P_{50} e valores de n de hemolisados fracionados de (A) *Hypostomus* e (B) *Pterygoplichthys* medidos a 25°C em tampão Tris, pH 7,30, $I = 0,05$, concentração de hemoglobina de 0,15 e 0,27 mM, (tetrâmero) respectivamente.

e GTP; como no lisado GTP diminui as afinidades por O_2 duas vezes tão efetivamente quanto o ATP à mesma concentração, (Fig. 5). Além disso, o GTP aumenta a cooperatividade mais do que o ATP.

Os componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys* foram posteriormente resolvidos e estudados por Brunori *et al.* (1978). A comparação dos dois grupos de resultados indicam que as propriedades da hemoglobina da fração "a" (Fig. 4b) corresponde intimamente às do componente I de hemoglobina de *Pterygoplichthys* isolado por Brunori *et al.* (1978) e que a

fração "b" provavelmente contém o componente IV de Brunori *et al.* (1978) e componentes adicionais com propriedades mais parecidas com as do componente I (cf. Brunori *et al.* (1978) para pormenores posteriores).

DISCUSSÃO

Os dados presente demonstram que uma alta sensibilidade ao fosfato da afinidade por O_2 das hemoglobinas livres de cofatores de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* provêm a base para a resposta adaptativa de todo o sangue a águas hipóxicas e conseqüente aeróbia. A maior sensibilidade de afinidade por O_2 das hemoglobinas a GTP do que a ATP é de interesse, considerando que durante a hipóxia a GTP decresce mais do que ATP (Weber *et al.*,

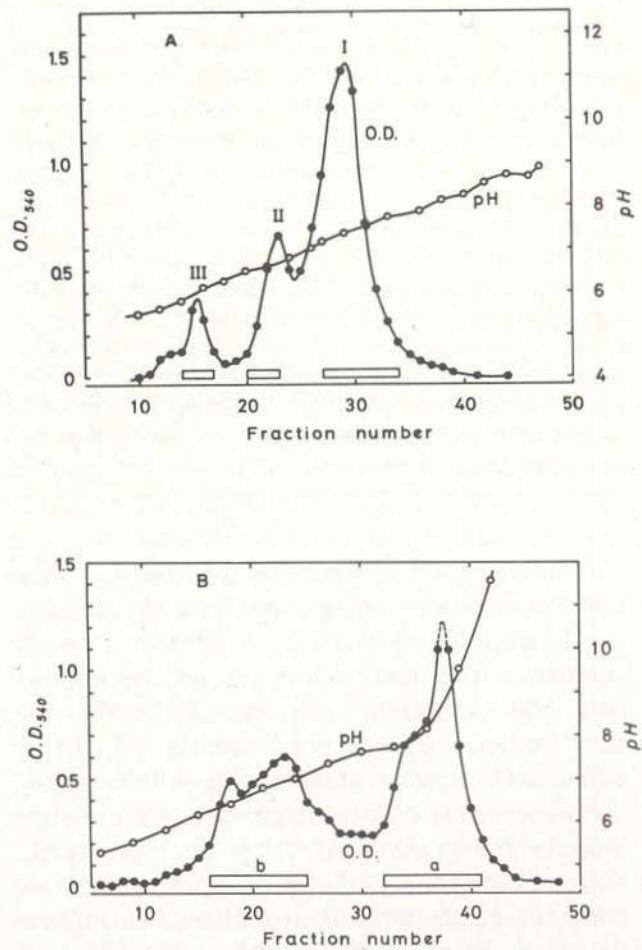


Fig. 4a e b — Focalização isoelétrica de carboxi derivados de hemoglobina de (A) *Hypostomus* e (B) *Pterygoplichthys*. ●, densidades óticas a 540 mμ; ○, valores de pH a 5°C de frações de 1,6 ml coletadas da coluna.

(1978). Assim, a GTP mais que a ATP é primariamente envolvido na adaptação do sangue P_{50} ao modo de respiração. Estas observações são similares a dados prévios sobre hemoglobinas de enguias e peixes pulmonados onde a GTP é o principal fator de adaptação da afinidade por O_2 a águas hipóxicas e estivação respectivamente (Weber *et al.*, 1975; Johansen *et al.*, 1975).

Há diversos fatores a que se poderia atribuir as diferenças entre as propriedades de oxigenação das soluções de hemoglobina aqui citadas, e as do sangue total. Os cofatores não apenas incrementam P_{50} , mas também o aparente efeito Bohr de acordo com a aumentada ligação dos poliânions pela hemoglobina a baixo pH (cf. Benesch & Benesch, 1974), explicando em parte os maiores fatores Bohr no sangue ($\phi = -0,18$ e $0,32$ entre pH 7,5 e 8,0 para respiração de *Hypostomus* aérea e na água respectivamente) do que no hemolisado fracionado à pH similar ($\phi \sim 0,0$; cf. Fig. 1). Mesmo na presença de nucleosídeo trifosfato saturante o P_{50} de soluções de hemoglobinas, entretanto, são consideravelmente mais baixos do que os do sangue. Para *Hypostomus* a $30^\circ C$ e pH 7,4 os valores P_{50} sangüíneos são cerca de 15 e 22 mm Hg para espécimes aclimatados e hipóxia e normoxia (Weber *et al.*, 1978). Outros três importantes fatores do que interação alostérica de hemoglobina e cofatores, têm que ser considerados. Primeiramente, as concentrações de hemoglobina dentro dos glóbulos vermelhos de bagre (ca. 5 mM) são mais altas do que as das quais as propriedades da hemoglobina em solução podem ser medidas. Enquanto a afinidade de O_2 de hemoglobina decresce com concentrações crescentes, este efeito é muito mais pronunciado na presença de fosfatos orgânicos mesmo à razão molar constante para hemoglobina (cf. Rorth, 1973).

Em segundo lugar, o pH intracelular de glóbulos vermelhos de peixe são significativamente mais baixos do que aqueles medidos no sangue total. A um plasma de pH 7,4, o pH intracelular em enguias é cerca de 0,3 a 0,6 unidades de pH mais baixas dependendo do NTP do glóbulo vermelho. (Wood & Johansen, 1973). Assim, o efeito Bohr medido a pH 7,0 a 7,5 no sangue total deve ser comparado com o de uma faixa mais baixa de pH no caso de

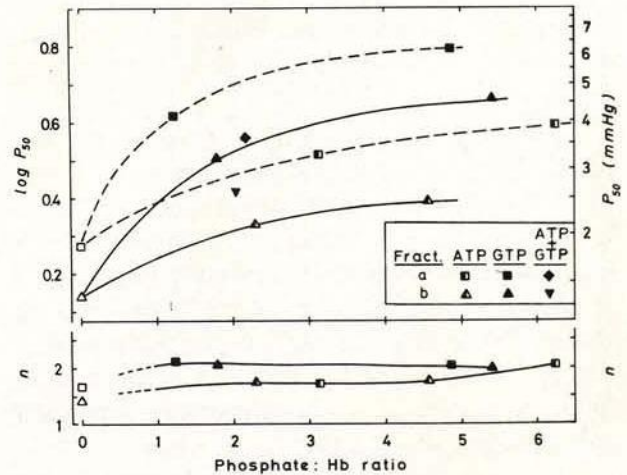


Fig. 5 — Efeitos de ATP (■, ▲), GTP (□, ▲) e de ATP+GTP (◆, ▼; plotados a concentrações totais de fosfato) sobre frações de hemoglobinas a (quadrados) e b (triângulos) isoladas de hemolisado de *Pterygoplichthys* (cf. Fig. 4B) por focalização isoeletrica, medidos a $25^\circ C$ em tampão Tris, $I = 0,05$, pH = 7,50. Concentrações hemoglobínicas 0,06 e 0,08 mM nas frações a e b, respectivamente.

soluções de hemoglobina. Por último, o CO_2 presente *in vivo* diminuirá a afinidade O_2 mais a pH alto do que baixo (o qual decrescerá o aparente efeito Bohr) pois o CO_2 compete com o fosfato por um sítio de ligação comum na cadeia β da hemoglobina tetrâmera de vertebrado (cf. Rorth, 1973).

Os cofatores fosfatos aumentam os valores n das hemoglobinas de bagre (Figs. 1, 3 e 5). Na presença de adequadas diferenças de pO_2 artério-venosas, isto significa uma liberação mais eficiente do pigmento quando o sangue está nos tecidos. Pode também ser significativo que, com o mesmo P_{50} , um incremento em n aumentará a saturação de O_2 de hemoglobina a altos valores de pO_2 como ocorre nas guelras em águas bem oxigenadas. Consequentemente, o incremento em n associado com a elevação de fosfatos de glóbulos vermelhos poderia aumentar a liberação de O_2 nos tecidos sem o correspondente decréscimo na liberação de O_2 nas guelras. Entretanto, um maior valor de n não aumentará necessariamente a liberação de O_2 , a menos que as tensões venosas de O_2 permaneçam abaixo do valor de P_{50} do sangue, ex., através de um concomitante decréscimo na afinidade de O_2 (Wood & Lenfant, 1976) e uma exata avaliação

da importância adaptativa das mudanças no n devem esperar medidas de tensão sanguínea de O_2 *in vivo*.

Os dados presentes mostram que em ambos os bagres, todos os componentes de hemoglobinas estudados estão envolvidos na modulação induzida por fosfato da afinidade de O_2 dos glóbulos vermelhos. Isto contrasta com a enguia européia onde o efeito alostérico de fosfatos sobre P_{50} é quase inteiramente atribuível ao efeito de GTP sobre um único componente hemoglobínico eletroforéticamente catódico (Weber *et al.*, 1975).

A heterogeneidade de cargas caracteriza as hemoglobinas de muitos peixes e outros vertebrados inferiores. Enquanto os diferentes componentes hemoglobínicos em peixe algo menos ativo mostra sensibilidade similares de P_{50} ("normal") a pH e temperatura (cf. o sugador *Catostomus insignis*, a carpa, um ciclídeo do Rio Grande e linguado norte-europeu — Power, 1972; Gillen & Riggs, 1972, 1973a; Weber & De Wilde, 1976), outros peixes como salmão, truta, enguias européias, norte-americanas e japonesas, e o sugador *Catostomus clarkii* de águas correntes, possuem componentes hemoglobínicos adicionais que migram catódicamente sob condições eletroforéticas normais, e possuem reduzidas ou revertidas sensibilidade de pH (Hashimoto *et al.* 1960; Binotti *et al.*, 1971; Gillen & Riggs, 1973b; Yamaguchi *et al.*, 1963; Weber *et al.* 1975; Powers, 1972; Powers & Edmundson, 1972). Nas hemoglobinas catódicas de truta e *Catostomus clarkii*, a ausência de um efeito Bohr "alcalino" normal correlaciona-se com a descoberta (Powers & Edmundson, 1972; Brunori *et al.*, 1973) de que o resíduo histidínico carbóxi-terminal da cadeia β e o grupo α -amino da cadeia α (os quais juntos são responsáveis por cerca de 75% do efeito Bohr em hemoglobina de mamíferos-Kilmartin & Wootton, 1970) são substituídos e bloqueados respectivamente.

Tem sido postulado que as hemoglobinas catódicas de peixe asseguram a ligação de O_2 no sangue sob condições de baixo ambiente de pO_2 e pH (Hashimoto *et al.*, 1960) ou durante acidose metabólica induzida pela atividade (Powers, 1972; Powers & Edmundson, 1972). A ocorrência de um componente hemoglobínico catódico com efeito Bohr revertido em

Pterygoplichthys mas não em *Hypostomus*, a despeito de seus hábitos e *habitat* similares e sua íntima relação filogenética, entretanto, provê evidência contra tais relações entre *habitat* e variação de hemoglobina no peixe.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pelo National Science Foundation Grant PCM 75-06451 para o barco de pesquisas "Alpha Helix", pelo Danish Natural Science Research Council, Grant 511-6734 (R.E.W.) e o U.S. National Institute of Health Grant HL-18026 (S.C.W.). Agradecimentos são devidos ao Governo Brasileiro pela permissão para efetivarmos a expedição no rio Amazonas.

SUMMARY

Oxygen equilibria of *Hypostomus* and *Pterygoplichthys* hemoglobins and their sensitivities to the erythrocytic nucleoside triphosphates (NTP), ATP and guanosine triphosphate (GTP) are studied to investigate the mechanisms by which blood adapts to air-and water-breathing. Hemoglobins of both species are heterogeneous. All hemoglobin fractions isolated by iso-electric focusing reveal a high sensitivity to NTP, but GTP depresses O_2 affinity about twice as effectively as ATP. A cathodic hemoglobin component with a reversed Bohr effect was found in *Pterygoplichthys* but not in *Hypostomus*. The data are discussed in relation to the *in vivo* cofactor modulation of blood O_2 affinity and the adaptive significance of functional heterogeneity of fish hemoglobins.

BIBLIOGRAFIA

- BENESCH, R. E. & BENESCH, R.
1974 — The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. In: *Advances in Protein Chemistry*, 28. (ed.: ANFINSEN, C.B. et al.) New York, Academic Press.
- BINOTTI, I.; GIOVENCO, S.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M. & WYMAN, J.
1971 — Studies on the functional properties of fish haemoglobins — II. The oxygen equilibrium of isolated haemoglobin components from trout blood. *Archs. Biochem. Biophys.*, 142:274-280.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C.; GIARDINA, B.; BOSSA, F. & ANTONINI, E.
1973 — Hemoglobins from trout: Structural and functional properties. *Molec. Cell. Biochem.*, 1:189-196.

- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI JR., A.; GALDAMES-PORTUS, M.I. & WILSON, M.T.
1978 — Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acaribodó. *Acta Amazonica*. 8(4): Suplemento. (Este volume).
- FYHN, U.E.H.; FYHN, H.J.; DAVIS, B.J.; POWERS, D.A.; FINK, W.L. & GARLICK, R.L.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobina nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- GILLEN, R.G. & RIGGS, A.
1972 — Structure and function of the hemoglobins of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 247:6039-6046.
1973a — The hemoglobina of a fresh water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird and Girard) — Subunit structure and oxygen equilibria of the isolated components. *Archs. Biochem. Biophys.*, 154:348-359.
1973b — Structure and function of the isolated hemoglobins of the american eel, *Anguilla rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 248: 1961-1969.
- HASHIMOTO, K.; YAMAGUCHI, Y. & MATSUURA, F.
1960 — Comparative studies on two hemoglobins of salmon — IV. Oxygen dissociation curve. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 26:827-834.
- JOHANSEN, K.; LYKKEBOE, G.; WEBER, R.E. & MALOY, G.M.O.
1976 — Respiratory properties of blood in awabe and estivating lungfish, *Protopterus amphibius*. *Respir. Physiol.*, 27:335-345.
- KILMARTIN, J.V. & WOOTTON, J.F.
1970 — Inhibition of Bohr effect after removal of C — Terminal histidines from haemoglobin B — chains. *Nature*, 228:766-767.
- NIESEL, W. & THEWS, G.
1961 — Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlosungen Pflügers *Arch. ges. Physiol.*
- POWERS, D.A.
1972 — Hemoglobin adaptation for fast and slow water habitats in sympatric catostomid fishes. *Science N. Y.*, 177: 360-362.
- POWERS, D.A. & EDMUNDSON, A.B.
1972 — Multiple hemoglobins of catostomid fish — I. Isolation and characterization of the isohemoglobins from *Catostomus*. *J. Biol. Chem.*, 247:6686-6693.
- REINITZ, G.L.
1976 — Comparison of techniques for stabilizing hemoglobins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during frozen storage. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B: 357-358.
- RORTH, M.
1973 — Hemoglobin interactions and red cell metabolism. Denmark, A. Backhaus & H. J. Sorensen Printers, pp. 1-104.
- WEBER, R.E. & DE WILDE, J.A.M.
1976 — Multiple haemoglobins in plaice and flounder and their functional properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B: 433-437.
- WEBER, R.E.; LYKKEBOE, G. & JOHANSEN, K.
1975 — Biochemical aspects of the adaptation of hemoglobin-oxygen affinity of eels to hypoxia. *Life Sciences*, 17:1345-1350.
- WEBER, R.E.; WOOD, S.C. & DAVIS, B.J.
1978 — Acimação de peixe de respiração aérea facultativa a água hipóxica: afinidade pelo oxigênio do sangue e agentes alostéricos. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- WOOD, S.C. & JOHANSEN, K.
1973 — Organic phosphate metabolism in nucleated red cells: Influence of hypoxia on eel HbO₂ affinity. *Neth. J. Sea Res.*, 7:328-338.
- WOOD, S.C. & LENFANT, C.J.M.
1976 — Respiration: Mechanics. Control and Gas Exchange. In: *Biology of Reptilia* (Ed. Gans, C. & Dawson, W.R.) New York, Academic Press. 5: 225-274.
- WOOD, S.C.; WEBER, R.E. & DAVIS, B.J.
1978 — Efeitos da respiração aérea sobre o balanço ácido-base no cascudo *Hypostomus* sp. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).
- YAMAGUCHI, K.; KOCHIYAMA, Y.; HASHIMOTO, K. & MATSUURA, F.
1963 — Studies on two hemoglobins of loach — II. Oxygen dissociation curve. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 29:180-188.