

NOTA DO TRADUTOR

RESUMO

Neste artigo, o autor faz uma revisão completa da situação, até aquele ano, dos estudos de hemoglobinas de peixes. Apesar de muitos trabalhos não terem sido citados, os principais estudos já realizados com hemoglobinas e sangue de peixes foram lembrados durante comparações com os estudos realizados nessa etapa da expedição do R/V Alpha Helix, que abrangeu um estudo amplo sobre esse assunto. O autor faz uma compilação dos resultados a respeito de estrutura (seqüência primária, componentes múltiplos, solubilidade, antigenicidade, etc.) e função (efeito Bohr, efeito Root, efeito de fosfatos orgânicos, etc.). Para tanto, são utilizados dados da maioria dos trabalhos realizados durante essa expedição e trabalhos anteriores, realizados com espécies de peixes da região temperada. Finalmente, ele apresenta uma valiosa comparação entre espécies de peixes de respiração aérea e espécies de respiração aquática, mostrando algumas controvérsias entre os diferentes autores que estudaram esses animais. O leitor poderá encontrar o conteúdo do artigo e principais conclusões, resumidamente, no capítulo CONCLUSÃO.

I. INTRODUÇÃO

Os peixes desenvolveram muitas estratégias de adaptação que lhes permitem habitar com sucesso diversos meios. A maioria dos animais terrestres tem essencialmente um suprimento constante de oxigênio, porém muitos peixes de água doce devem enfrentar amplas

Obs.: Quando o autor diz "no presente volume" entenda-se o suplemento da revista **Acta Amazonica**, nº 4 (ano VIII) publicado em dezembro de 1978.

(*) Tradução do original apresentado no *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62 A (1):257-272. (1979)

(**) Department of Zoology - University of Texas - Austin, Texas 78712.

(***) Tradução de Vera Maria Fonseca de Almeida-Val e Adalberto Luís Val.

Divisão de Biologia e Evolução de Peixes - Departamento de Biologia Aquática e Limnologia - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Manaus - AM.

variações no suprimento de oxigênio. Este fato tem levado ao aparecimento de muitas estratégias adaptativas. Estas adaptações, tanto as anatômicas como as moleculares, são encontradas numa variedade particularmente expressiva nos peixes de rios e lagos tropicais da América do Sul. As águas amazônicas, que constituem cerca de um quinto do total de água dos rios, estão sujeitas a uma grande variação sazonal. Grandes proporções da floresta tropical chuvosa se tornam submersas quando as águas atingem seu ponto máximo perto de Manaus o nível de água aumenta cerca de 15 metros nesse período. Quando as águas baixam, ou seja, durante a vazante, pequenos lagos são isolados e, com freqüência, secam completamente. Estas mudanças drásticas no ambiente exige uma maior adaptabilidade por parte dos peixes. As águas não somente se tornam altamente hipóxicas, como muito ácidas. Os "tetras" (o autor refere-se às espécies do grupo *Tetragonopterygii* do rio Negro toleram baixos pHs, tal como 3,1 (Dunson et al., 1977). Alguns peixes possuem respiração aérea obrigatória, outros respiram ar somente quando a pO_2 aquática decresce e se torna mais baixa que o nível crítico para a espécie. Algumas outras utilizam, ainda, a primeira camada de água, 1-2mm da superfície, que é rica em O_2 . Peixes sem capacidade de respiração aérea ou sem acesso a essa camada rica em oxigênio, devem modificar seu metabolismo de maneira a diminuir suas exigências de oxigênio. Essas adaptações são de particular interesse, uma vez que auxiliam no entendimento dos problemas que os organismos enfrentam, durante a evolução, na colonização do meio terrestre.

O estudo sobre sangue e hemoglobinas de peixes começou com o trabalho de Krogh & Leitch (1919) no qual os autores mostraram que as propriedades respiratórias do sangue poderiam estar relacionadas com o oxigênio do meio. Um estudo pioneiro da fisiologia respiratória de peixes de água doce tropical foi efetuado com as clássicas expedições de Carter & Beadle (1931) ao chaco Paraguai e de Willmer (1934) aos rios da Guiana (nessa ocasião Guiana Inglesa). Carter & Beadle (1931) mostraram existir diferentes estratégias de respiração aérea, além de demonstrar que as bexigas natatórias de certos peixes eram, de fato, funcionalmente ativas na respiração aérea; outros peixes utilizavam uma porção modificada do intestino, da faringe ou da cavidade bucal. Experimentos sobre equilíbrio de oxigenação de sangue eram difíceis de se efetuar sob as condições primitivas em que trabalhavam. Willmer (1934) considerou "portátil" todo o aparato manométrico de van Slyke, e com grande esforço, manipulou-o para obter um pequeno número de pontos da curva de equilíbrio de oxigenação num único dia, num ambiente quente como a selva. Que contraste com os dias de hoje, quando podemos obter automaticamente curvas completas em minutos. Johansen e seus colaboradores dedicaram-se ao estudo da fisiologia respiratória de peixes de respiração aérea. Estes estudos foram revistos por Johansen (1970) e Johansen & Lenfant (1972). A expedição canadense do Alpha Helix de deteve bastante nesses estudos. Seus resultados estão resumidos numa série de trabalhos fascinantes no volume 56, nº 4 (parte 2) do *Canadian Journal of Zoology* publicado em 1978. Nosso trabalho, reunido nos 32 artigos, foi efetuado nos dois meses seguintes à expedição canadense. As duas expedições estudaram, ocasionalmente, as mesmas espécies de peixes. Atualmente é evidente a importância dos estudos de hemoglobinas particular-

mente, na adaptação de peixes, uma vez que a molécula de hemoglobina está situada entre o metabolismo do organismo e o meio, sendo tão diretamente sensível aos requisitos metabólicos quanto às pressões ambientais.

A proposta dessa revisão é fornecer algum conhecimento prévio para a compreensão dos artigos deste volume. Resumirei a discussão aos aspectos da atual situação dos estudos de hemoglobinas de peixes. Aprendeu-se muito na última década sobre suas funções. Certamente, a maioria dos conhecimentos mais detalhados sobre hemoglobinas de peixes podem ser encontrados a partir de uma revisão anterior (Riggs 1970). Revisões mais recentes sobre aspectos da fisiologia e da bioquímica de hemoglobinas de peixes incluem aquelas de Grigg (1974), Brunori (1975) (sobre hemoglobinas de truta) e Bonaventura et al. (1975), assim como aquelas de Johansen e colaboradores que já foram mencionados no texto.

II. ESTRUTURA

Seqüência Primária

A estrutura completa da hemoglobina de um teleósteo não é conhecida até o presente momento. Apesar da seqüência de aminoácidos das cadeias α e β da hemoglobina de turbarão ter sido determinada (Nash et al., 1976; Fisher et al., 1977) e a estrutura das cadeias α de hemoglobinas de duas espécies de peixes serem conhecidas (carpa: Hilse & Braunitzer, 1968; "sucker": Powers & Edmundson, 1972 a,b), somente a seqüência parcial da cadeia β da hemoglobina IV de truta já é disponível (Bossa et al., 1976). Ainda, os segmentos NH_2 -- terminais e os respectivos COOH -- terminais de cadeias β de hemoglobinas de diferentes teleósteos são conhecidos (Tabela I). O provável significado dessas seqüências será discutido na seção III.

Componentes múltiplos: observações e especulações

A base para o polimorfismo de enzimas, bem estabelecido em populações naturais, tem sido objeto de muita especulação e tem resultado em diferentes teorias (veja para diferentes pontos de vista, por exemplo, Kimura 1968; Clark, 1970; Richmond, 1970; Kimura & Ohata, 1971; King & Jukes, 1969; Goldman et al., 1975; Riggs, 1976; Harris et al., 1977; e uma revisão bastante completa de Wilson et al., 1977). A grande multiplicidade e o polimorfismo de hemoglobinas em vertebrados estão da mesma maneira, bem estabelecidos. Os estudos de hemolisados de peixes da Amazônia (Fyhn et al., 1979) não solucionou esses problemas, porém, são de grande interesse, uma vez que parecem eliminar algumas especulações simples. Eles examinaram os padrões eletroforéticos de 77 gêneros de peixes de 28 famílias. Seus resultados mostram, claramente, que a presença de componentes múltiplos é uma regra: hemolisados com um só tipo de hemoglobinas foram encontrados em apenas 8% dos fenótipos; a média foi de quatro componentes eletroforéticos. Estes resultados devem ser interpretados levando-se em conta conhecimentos prévios de que o tamanho do genoma nos peixes varia enormemente, que a ocorrência de duplicações gênicas

é freqüente e que a poliploidia é amplamente distribuída (Ohno, 1970; Schröder *et al.* 1973). Allendorf (1978), observando que, ao menos cinco famílias de peixes têm caminhado para a tetraploidização, em alguns pontos recentes de sua história evolutiva, isoladamente, acredita que exista uma forte associação entre a tendência à perda da expressão da duplicação gênica e o alto grau de polimorfismo. Ele argumenta que este fato é mais compatível com o modelo de substituição neutra para mudanças nas proteínas do que com um modelo que envolva seleção. Fyhn & Sullivan (1974) fizeram uma observação interessante na qual o polimorfismo parecia estar muito mais distribuído em hemoglobinas de peixes provenientes de Beaufort, NC, do que naqueles provenientes da costa do Pacífico, e tentaram correlacionar este fato com a não uniformidade do meio em Beaufort. O alto grau de polimorfismo encontrado nos peixes da Amazônia por Fyhn *et al.* (1979) deveria ser, talvez, relacionado com as mudanças sazonais que ocorrem naquele ambiente.

A questão que surge imediatamente é: os diferentes componentes presentes nos hemolisados dos peixes amazônicos têm propriedades significativamente diferentes? As observações de Bunn & Riggs (1979) sugeriram que um número considerável de componentes, nem todos, têm claramente propriedades funcionais bastante diferentes. O levantamento dos padrões por isoeletrofocalização, realizado por esses autores, com hemolisados de 15 espécies de peixes, mostrou que seis delas possuem pelo menos duas hemoglobinas, uma das quais se torna mais ácida sob desoxigenação enquanto que a outra se torna menos ácida. Assim, quase a metade dos hemolisados examinados possui hemoglobinas com propriedades muito diferentes: um componente possui um aumento de sua afinidade pelo oxigênio, enquanto que o outro tem uma afinidade menor, conforme o aumento do pH. Três dos hemolisados com hemoglobinas funcionalmente diferentes foram cromatografados. O estudo dos componentes isolados mostrou, claramente, que os mesmos possuem propriedades muito diferentes (Martin *et al.*, 1979a; Brunori *et al.*, 1979; Garlick *et al.*, 1979b).

Bonaventura *et al.* (1975) e Weber *et al.* (1976b) forneceram uma classificação funcional para hemolisados de peixes cuja descrição pode nos ser útil. Hemolisados pertencentes à classe I contêm um ou mais componentes hemoglobínicos, sendo todos sensíveis à mudança de pH, com propriedades funcionais semelhantes mas não necessariamente idênticas. Os hemolisados de carpa (*Cyprinus carpio*), do ciclídeo do Rio Grande (*Cichlasoma cyanoguttatum*), do celacanto (*Latimeria chalumnae*), do "spot" (*Leiostomus xanthurus*), do linguado (*Pleuronectes platessa*), um outro tipo de linguado, o "flounder" (*Platichthys flesus*) e Amia, o "bowfin", pertencem a essa categoria. Hemolisados da Classe II contêm componentes múltiplos que diferem muito em suas propriedades funcionais: os componentes eletroforicamente anódicos são semelhantes àqueles da Classe I, porém, os componentes catódicos não possuem as sensibilidades normais a variações de pH e temperatura na sua união a ligantes. Os hemolisados da truta, enguia, salmão, "sucker" e "weatherfish" parecem pertencer a essa categoria, apesar da dependência à temperatura ter sido bem estudada em hemoglobina de truta. Os estudos no Alpha Helix indicam que hemolisados pertencentes à Classe II devem ser muito mais comuns do que se pensava anteriormente. A hemoglobina do atum justifica uma Classe III: a hemoglobina, em sua união a ligantes, é sensível a mudanças de pH mas não a mudanças na temperatura.

Reichlin & Davis (1979) efetuaram um levantamento da antigenicidade de hemoglobinas de muitos peixes amazônicos a três anti-soros de coelho: para hemoglobina de carpa e para os componentes I (catódico) e IV (anódico) de truta. As duas últimas hemoglobinas foram estudadas por Tan-Wilson *et al.* (1976) e mostraram reatividade antigênica cruzada, virtualmente nua. Como será pormenorizado adiante, elas possuem propriedades funcionais muito diferentes: a ligação ao oxigênio pela hemoglobina I é independente de variação no pH e na temperatura, enquanto que a ligação ao oxigênio pelo componente IV é dependente da variação do pH e/ou temperatura. Surpreendentemente, Reichlin & Davis descobriram que hemoglobinas de muitos peixes amazônicos reagiram com o anti-soro da hemoglobina I de carpa e truta, mas nem todos com o anti-soro de hemoglobina IV de truta. Uma vez que a antigenicidade reflete as propriedades de superfície da proteína, a presença de uma forte reação com hemoglobina I de truta significa que boa parte da superfície deve ser comum à hemoglobina I de truta, à hemoglobina de carpa e às hemoglobinas de muitos peixes amazônicos. Mais interessante foi a descoberta de uma nítida diferença imunológica entre os bagres de respiração aérea e os de respiração aquática: todas as hemoglobinas de bagres de respiração aérea precipitam com anti-soro hemoglobina I de truta, o que não acontece com nenhuma das hemoglobinas de bagre de respiração aquática. Uma vez que os determinantes antigênicos do anti-soro de carpa estão nos componentes anódicos e aqueles para o soro hemoglobina I de truta nos componentes catódicos, Reichlin & Davis sugerem que as cadeias polipeptídicas dos componentes catódicos e anódicos não se unem ao acaso. Esses estudos formam um quadro de relações intrincadas, das quais a verdadeira natureza será determinada somente quando as seqüências de aminoácidos para as cadeias polipeptídicas de um número mínimo de hemoglobinas forem conhecidas; esta é uma árdua tarefa, mesmo com a atual metodologia disponível.

Certamente, é aceitável supor que componentes com propriedades funcionais muito diferentes possam servir a necessidades fisiológicas diferentes, mas a identificação da suposta adaptação fisiológica tem sido pouco elucidativa. Não existe correlação evidente como habitat, comportamento ou presença da *rete* na coróide ou na bexiga natatória; ainda, as propriedades são tão diferentes que parece ser possível que os dois tipos de componentes representem uma adaptação específica. Uma das possibilidades é um meio de proteção contra os efeitos da hiperatividade (veja Black, 1958; Powers, 1972 e revisão por Riggs, 1976). Parece possível que os diferentes componentes múltiplos tenham um papel no aumento dos meios habitáveis ou que sirvam para mudar as necessidades fisiológicas durante o crescimento e desenvolvimento conforme ocorre no girino de "bullfrog" antes de sua metamorfose (Watt & Riggs, 1975). Weber *et al.* (1976c) sugerem que hemoglobinas insensíveis a mudanças de temperatura podem estabilizar sua afinidade ao oxigênio durante a variação deste parâmetro. Assim, é significativo que as proporções em que ocorrem certos componentes hemoglobínicos mudem durante aclimação a diferentes temperaturas na truta e no peixe dourado (Houston & Cyr, 1974; Weber *et al.*, 1976c). No peixe dourado, pelo menos, isso pode resultar da redistribuição das subunidades que constituem os componentes (Houston & Rupert, 1976). A proporção relativa do componente hemoglobínico

3 da carpa varia sazonalmente (van Vuren & Fourie, 1976); tal variação é de difícil explicação se as funções das hemoglobinas forem realmente idênticas. Como colocamos anteriormente (Riggs, 1976), é esperado que duas hemoglobinas com diferentes pontos isoelétricos possam ter diferenças em seu equilíbrio de oxigenação dentro das células mesmo se suas propriedades *in vitro* forem idênticas, pois, o equilíbrio de Donnan resultará, preferencialmente, num pH intracelular diferente. Mudanças nas proporções de componentes hemoglobínicos ocorrem durante o crescimento do salmão (Giles & Vanstone, 1976), no qual mais de 25 bandas eletroforéticas podem ser encontradas (Tsuyuki & Ronald, 1971; Wilkins, 1968, 1972 a, b). Da mesma maneira, mudanças nas proporções dos componentes de hemoglobinas da enguia ocorrem durante o desenvolvimento (Rizotti et al., 1977). O grande número de bandas de hemoglobinas de muitos peixes é devido, em parte, ao fato de dissociação tetrâmero-dímero ser tão pequena em hemoglobinas de peixes que tetrâmeros híbridos da forma $\alpha'\alpha''\beta'\beta''$, mantêm sua identificação durante a eletroforese (Wilkins, 1970, Gillen & Riggs, 1973a). Esta situação foi estudada em detalhe, recentemente, para hemoglobinas do "killifish" por Mied & Powers (1978).

A importância da solubilidade

Algumas hemoglobinas em hemolisados parecem não diferir umas das outras significativamente. *A priori*, nenhuma razão existe, é claro, para que procuremos por uma única explicação para essa multiplicidade. O que pode constituir uma diferença "significativa" merece um estudo cuidadoso. Deveríamos lembrar que corredores de maratona, nos quais a única diferença é um oitavo de polegada no comprimento de seu passo, podem estar separados por mais de 200 pés no final da corrida (Fixx, 1977). A presença de componentes múltiplos numa mistura possui algumas conseqüências, que podem ser importantes na manutenção da multiplicidade. Alguns desses fatores são essencialmente próprios da hemoglobina e, presumivelmente, não aplicáveis ao problema paralelo da multiplicidade de isozimas. Porém, para procurarmos "pela única explicação", devemos pesquisar incansavelmente. A hemoglobina existe na célula vermelha, no limite de sua solubilidade como já discutido (Riggs, 1976), de maneira que qualquer mutação que resulte num decréscimo significativo desta solubilidade será desvantajosa. Além disso, este limite é atingido mais proximamente pela forma "não ligada". Todas as desoxihemoglobinas que foram estudadas são menos solúveis que as respectivas oxihemoglobinas, assim, a solubilidade da não ligada nos é de fundamental interesse.

Desoxihemoglobinas de mamíferos não somente possuem baixíssimas constantes de dissociação tetrâmero-dímero ($K_{4,2} \sim 10^{-12}$ M) tipicamente somente um milionésimo da forma ligada (Thomas & Edelstein, 1972, 1973; Ip et al., 1976; Atha & Riggs, 1976), mas também têm uma certa tendência a agregarem-se reversivelmente com outros tetrâmeros. O melhor exemplo estudado é a célula humana com desoxihemoglobina síclêmica (Hb-S) que forma agregados fibrosos tão grandes que as células vermelhas mudam drasticamente sua forma, com uma conseqüência patológica. Este comportamento da Hb-S parece ser uma for-

ma grotesca e exagerada da propriedade regularmente presente no comportamento de muitas hemoglobinas. Assim, Finch *et al.* (1973) observaram fibras em preparação de desohemoglobina A humana "normal", semelhantes àsquelas da Hb-S, porém, o número de fibras encontrado foi muito menor. Observou-se que hemoglobinas de diversos anfíbios e um tipo de galinha se agregam sob desoxigenação em, pelo menos, octâmeros (Elli *et al.*, 1970; Araki *et al.*, 1974; Morrow *et al.*, 1974). Além do mais, medidas recentes de hemoglobinas de carpa (D.H. Atha & A. Riggs, resultados não publicados) indicam que esta hemoglobina se agrega em octâmeros quando desoxigenadas a baixo pH. Poderiam estar as mesmas interfaces intermoleculares envolvidas na agregação dessas diferentes hemoglobinas? Não parece provável que seja vantajoso para um organismo possuir hemoglobinas que se cristalizem ou se precipitem dentro da célula vermelha. Cristalização intramolecular tornaria a célula vermelha prontamente deformável. Uma vez que células vermelhas são aproximadamente do mesmo tamanho dos capilares através dos quais elas se movem, qualquer aumento em rigidez seria desvantajoso. Assim, parece que a seleção evolutiva existiria em favor das hemoglobinas tetraméricas com superfícies não complementares. Seleção a favor de componentes múltiplos poderia ser um dos processos. A presença de componentes múltiplos pode aumentar com sucesso a solubilidade total. Perutz *et al.* (1959) sugeriu que a presença de duas hemoglobinas nas células vermelhas de cavalo poderiam estar relacionadas com a seguinte regra: mais proteína deveria estar presente na solução saturada de uma mistura do que numa com um componente isolado. Se um componente hemoglobínico possuir uma forte tendência para formar agregados intermoleculares e precipitar, a presença de dois ou mais componentes irá interferir igualmente no processo do aumento da solubilidade. Esta idéia é apoiada pela descoberta de que o comportamento de gelificação alterado de misturas de hemoglobinas S - hemoglobina "X" seja devido à formação de tetrâmeros híbridos de dímeros desiguais; alguns híbridos incorporam em gel tão facilmente quanto a hemoglobina S, enquanto que outros o fazem, porém, não tão prontamente (Bookchin & Nagel, 1973; Moffat, 1974). Experimentos recentes de Benesch *et al.* (1976, 1977) fornecem uma notável demonstração dos efeitos da formação de híbridos na solubilidade. Eles demonstraram que a solubilidade das cadeias de hemoglobinas β^S poderia ser aumentada pela substituição de certas cadeias α mutantes no lugar das cadeias normais. Assim, a solubilidade da hemoglobina duplamente mutante $\alpha_2^{Sealy} \beta_2^S$, era 15 vezes mais solúvel que $\alpha^A \beta^S$. A prevenção da cristalização pode ser feita de duas maneiras: tanto pela presença de componentes múltiplos ligeiramente diferentes, quanto pela evolução de superfícies não complementares de um simples tipo de tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$. As barreiras evolutivas para esse último mecanismo seriam mais severas. Se essas considerações realmente se aplicam a hemoglobinas de peixes sô saberemos após a determinação experimental das solubilidades de componentes individuais ou de misturas.

Outros fatores mais sutis podem também influenciar a evolução da hemoglobina. Assim, a energia livre de desnaturação de mioglobinas parece estar relacionada com a taxa metabólica basal (Mc Lendon, 1977). Isto sugere que a estabilidade proteica pode evoluir de acordo com requisitos de "turnover", apesar disso não parecer ser real para o

citocromo c. Semelhantemente, as taxas degradativas para proteínas tem sido correlacionadas com o excesso de aminoácidos da superfície e com o tamanho da subunidade: as subunidades maiores degradam mais rapidamente que as menores (Momany *et al.*, 1976). Não existe explicação satisfatória para acetilação dos grupos α -NH₂ das cadeias α de hemoglobinas de peixes. O fato de 80% das proteínas solúveis de células ascíticas, bem como de outras células semelhantes, serem N-acetiladas (Brown & Roberts, 1976) torna improvável que somente uma única explicação para hemoglobina esteja correta. Possivelmente, como Brown e Roberts sugerem, a N-acetilação pode diminuir a taxa de "turnover". Se assim for, deveríamos procurar conhecer se tal acetilação poderia servir para que as taxas de "turnover" das cadeias α e β fossem aproximadamente iguais.

III. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

As propriedades funcionais das hemoglobinas de peixes têm sido amplamente descritas utilizando-se uma ou mais modificações do modelo alostérico de união com ligantes formulado por Monod *et al.* (1965). Neste modelo supõe-se que a hemoglobina esteja em dois estados "R" (conformação-oxi) ou "T" (conformação-desoxi). Estudos cristalográficos mostraram, claramente, as principais diferenças estruturais entre as conformações oxi e desoxi das hemoglobinas humana e de cavalo (veja revisão por Perutz, 1976). A determinação das propriedades funcionais das hemoglobinas nestas conformações têm mostrado, contudo, serem muito difíceis e enganosas. A descrição das propriedades funcionais em termos de teoria alostérica foi revista por Edelstein (1975), Shulman *et al.*, (1975) e Baldwin (1976). Grande esforço tem sido dispendido na determinação das propriedades intrínsecas das hemoglobinas nestes estados. Infelizmente, a análise das propriedades funcionais da hemoglobina nestas conformações é extremamente difícil, uma vez que as propriedades de "R pura" são, geralmente, observáveis a saturações de oxigênio acima de 99%, e as propriedades da forma "T pura" abaixo de 1% de saturação ao oxigênio. Medidas precisas nessas amplitudes são experimentalmente difíceis. Além disso, a análise das soluções diluídas de hemoglobina humana geralmente usadas, envolve um outro problema: a dissociação do tetrâmero em dímero (Mills *et al.*, 1976). Ambos os problemas parecem ser potencialmente evitáveis através do estudo de hemoglobinas de peixes. Assim, a ligação das hemoglobinas de peixes ao oxigênio parece ser discutível, pelo menos a primeira vista, em termos do estado "T", de baixa afinidade em um pH baixo e o estado "R" de alta afinidade em alto pH. As hemoglobinas de peixes não se dissociam significativamente de tetrâmeros para dímeros, mesmo em solução totalmente diluída (Edelstein *et al.*, 1976). Nesta seção tentarei elaborar um esboço de algumas das propriedades de hemoglobinas de peixes teleostes que têm sido melhor caracterizadas; principalmente as de carpa e truta, como modelos, com as quais outras hemoglobinas podem ser comparadas.

A forma da curva de equilíbrio da união a ligantes é fortemente dependente do pH na maioria das hemoglobinas de peixes: a transição "R" \leftrightarrow "T".

A hemoglobina de carpa tem sua afinidade ao O_2 reduzida em cerca de 160 vezes entre os pHs 8,0 e 5,6 (Noble et al., 1970; Tan et al., 1972; Gillen & Riggs, 1972; Tan & Noble, 1973). Assim, afinidades tão baixas ocorrem em pHs baixos, de maneira que a hemoglobina não volta a se saturar totalmente com o oxigênio quando equilibrada com ar; este fato é denominado "Efeito Root" (Root, 1931). Não há diferença qualitativa entre o efeito Root e a dependência normal da ligação da hemoglobina com o O_2 ao pH, o efeito Bohr; e efeito Root pode ser considerado como um efeito Bohr acentuado. As grandes mudanças na afinidade da hemoglobina de carpa ao oxigênio em relação a mudanças de pH, podem ser atribuídas, em sua maioria, à constante de dissociação do oxigênio, K , que aumenta aproximadamente 100 vezes quando o pH é elevado de 5,6 a 8,0 (Tan & Noble, 1973). Em contraste, a constante de combinação ao CO, ℓ' , diminui somente 3 vezes com mudanças de pH da mesma amplitude. Assim, o efeito Root foi atribuído à constante de dissociação do O_2 . Entretanto, quando em baixa concentração de hemoglobina, tanto a constante de dissociação quanto a de associação contribuem significativamente para o efeito Root (Bonaventura et al., 1976). Os experimentos do Alpha Helix que serão discutidos posteriormente, evidenciam que diferentes hemoglobinas utilizam um série de combinações de constantes cinéticas para atingir o mesmo resultado. A comparação K e ℓ' com esse propósito leva à idéia de que o O_2 e o CO_2 são ligantes equivalentes, exceto num fator quantitativo. Porém, isso parece não ser verdade para Noble e seus colaboradores que mostraram que o CO_2 e o O_2 têm propriedades de ligação ligeiramente diferentes. Por exemplo, o valor do coeficiente de Hill, n , em pH 5,6 é cerca de 1,0 para a ligação com o CO e 0,75 para a ligação ao O_2 (Tan et al., 1972). Além do mais, um efeito Bohr ácido está presente no equilíbrio de ligação ao CO abaixo de pH 5,6, o que não aparece no equilíbrio com O_2 (Tan et al., 1972; Tan & Noble, 1973). Assim, a afinidade ao CO aumenta conforme o decréscimo do pH para menos que 5,6. A não ser por esse efeito, as propriedades funcionais foram descritas como "invariáveis" abaixo de pH 5,6 e acima de pH 8,0, embora o coeficiente de Hill (n) para o equilíbrio com O_2 permaneça entre 1,3 e 1,4 em pHs altos. Esses valores poderiam ser interpretados em termos da presença de uma população residual de moléculas no estado "T" ou um subestado do estado "R". Tal interpretação, entretanto, mostra um risco em se atribuir propriedades ao modelo: os processos físicos envolvidos podem também ser prontamente estacionados.

A perda de cooperatividade da hemoglobina de carpa em pHs baixos apresenta outra característica comum das hemoglobinas de peixes: as cadeias α e β diferem significativamente na afinidade aos ligantes. Diferenças funcionais na ligação ao oxigênio entre as cadeias α e β ocorrem na hemoglobina humana, porém, elas são muito menores (Gibson, 1973). As diferenças entre as cadeias de hemoglobinas de peixes são responsáveis pelo valor 0,75 de n , no equilíbrio da ligação com o oxigênio em pH baixo. Tais diferenças são também manifestadas na reação de combinação com o CO: duas fases distintas estão presentes em baixos pHs. Tais fases são tão diferentes (~ 10 vezes) em algumas hemoglobinas de peixes, que a união a ligantes parece seguir uma seqüência escolhida (Pennelly et al., 1978; Saffran & Gibson, 1978).

Tan et al. (1973) demonstraram a natureza cooperativa da combinação da hemoglobi

Estudos de hemoglobinas ...

na ao CO, através das reações cinéticas de "flash photolysis" parcial e total. A fotólise total em pH neutro é seguida por uma taxa de recombinação inicial menor que aquela que é encontrada após a fotólise parcial. Apenas uma pequena diferença foi encontrada em pH elevado e nenhuma foi encontrada em baixo pH, de acordo com a conclusão de que a ligação ao ligante em questão, em extremos de pH, não é acompanhada por mudanças na conformação. Estes resultados foram confirmados por Pennelly *et al.* (1975) através da comparação da combinação do CO após fotólise total e fotólise parcial de 10%.

Hemolisados de carpa possuem três componentes que parecem ser funcionalmente idênticos, porém, isto está longe de ser verdade para os hemolisados de muitos outros peixes, como já descrito. Hemoglobinas de truta têm sido particularmente bem estudadas; suas propriedades foram revistas por Brunori (1975). As ligações da hemoglobina I de truta a ligantes, como já mencionado, são completamente independentes de pH e de fosfatos orgânicos: nenhum efeito Bohr ou efeito Root está presente. Ela é afetada, entretanto, por fosfatos inorgânicos e cloreto. A hemoglobina IV, entretanto, é fortemente dependente do pH e suas propriedades funcionais são geralmente semelhantes às aquelas descritas para a carpa. Algumas dessas diferenças funcionais entre os componentes resultam da presença de -Tyr-His e -Tyr-Phe- no COOH-terminal das hemoglobinas IV e I de truta, respectivamente. A histidina COOH-terminal nas cadeias β das hemoglobinas de mamíferos é responsável por aproximadamente metade da dependência ao pH da ligação da Hb com O₂ (veja revisão por Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1973). A presença de -Tyr-Phe acopladas com a ausência de grupamentos α -NH₂ livres na cadeia α (responsável por 1/3 do efeito Bohr) explica a independência de pH nesta hemoglobina. Porém, isto é somente parte da diferença para os autores Tan-Wilson *et al.* (1976), como mencionado anteriormente, que mostraram que hemoglobinas de truta parecem ser imunologicamente muito distantes.

Embora o equilíbrio de ligação ao oxigênio da hemoglobina I de truta pareça ser independente da temperatura, Wyman *et al.* (1977) mostraram que este equilíbrio resulta de um balanço extraordinário de processos endo e exotérmicos. Assim, o ΔH da ligação ao oxigênio aproxima-se de 6 kcal/mol a níveis baixos de oxigenação e -11,3 kcal/mol a altos níveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Carey & Gibson (1977) com hemoglobinas de atum. Eles mostraram que o resfriamento leva a um aumento na saturação ao oxigênio a baixos níveis de oxigenação e um decréscimo nesta saturação a altos níveis. O atum mantém sua temperatura acima da temperatura ambiente por um sistema contra-corrente de troca de calor, e os autores afirmam que "do ponto de vista do transporte de gases num sistema de troca de calor por contra-corrente, tal comportamento é ideal pois, uma vez que ocorre um equilíbrio de temperatura, a pO₂ do sangue arterial pode cair cerca de 60% de seu valor inicial enquanto que o sangue venoso não muda". Assim, os autores explicam seus resultados com base no coeficiente $L = ([R]/[T])$ do modelo alostérico, que aumenta após resfriamento.

Powers *et al.* (1979b) compararam a dependência da ligação ao oxigênio com a temperatura da hemoglobina "stripped" a pH 9,0 e com sangue de diversos tipos de peixes. Os resultados mostraram que a entalpia aparente (ΔH) calculada para hemoglobinas "strip-

ped" em pHs elevados não variam significativamente, apesar da energia livre total de oxigenação (ΔG) ter variado muito. As diferenças na afinidade ao oxigênio foram, as sim, atribuídas a fatores de entropia pois, tanto agentes alostéricos como efeito Bohr não são ativos em pH 9,0. A variação na entalpia da oxigenação de sangue parece ser, em sua maior parte, resultado das reações com fosfatos orgânicos e do pH. A entalpia das ligações com fosfatos parece ser inteiramente resultado de reação associada de protonação (Riggs, 1971).

Controle da ligação ao oxigênio por fosfatos

A ligação da hemoglobina a fosfatos orgânicos intraeritrocitários descoberta inicialmente por Chanutin e colaboradores (Sugita & Chanutin, 1963; Chanutin & Curnish, 1964; Ludwig & Chanutin, 1964), modula o equilíbrio de oxigênio (Benesch & Benesch, 1967; Chanutin & Curnish, 1967). O decréscimo da afinidade ao oxigênio da hemoglobina humana resulta da ligação preferencial à forma não ligada (desoxi-hemoglobina) (Benesch *et al.*, 1968); o sítio de ligação está entre os NH_2 -terminais das cadeias β (Arnone, 1972). Este sítio se torna menor após oxigenação, de maneira que o fosfato não se liga tão prontamente. A ligação de fosfatos aos grupos NH_2 -terminais das proteínas parece ser um fenômeno geral (Hol *et al.*, 1978). Presumivelmente, o sítio de ligação do fosfato em hemoglobinas de peixes é semelhante ao das hemoglobinas de mamíferos. O sítio de ligação na hemoglobina humana inclui, ainda, ao NH_2 -terminal, os resíduos $\beta 2$ lisil e $\beta 2$ histidil. Estes resíduos são a lisina e o ácido glutâmico, respectivamente, na hemoglobina IV de truta (Bossa *et al.*, 1976). A tabela I indica que $\beta 2$ e $\beta 3$ são o ácido glutâmico e triptofano na maioria das hemoglobinas de peixes. ATP e GTP são os agentes moduladores mais comuns das hemoglobinas de peixes. Talvez, o NH_3^+ do grupo adenílico do ATP possua interação com o grupo $\beta 2$ glutamil conforme o sítio da molécula de adenina se localize sobre o resíduo triptofano; já se sabe que o triptofano livre e ATP formam um complexo identificável (Morita, 1974). Infelizmente, por esta idéia, o resíduo triptofanil é, provavelmente, orientado para a superfície. Se uma interação como esta não ocorre, pode ser que os dois resíduos negativos glutamil diminuam a ligação de fosfatos também carregados negativamente. De qualquer maneira, o fato das constantes de ligação do GTP e ATP não serem as mesmas para muitas hemoglobinas de peixes, esse fato indica um papel especial para a molécula purínica.

Nenhuma cadeia α de hemoglobinas de teleosteos, já examinada, possui um grupo $\alpha\text{-NH}_2$ livre; a maioria é N-acetilada, apesar disto só ter sido evidenciado para três tipos de peixes (truta, Bossa *et al.*, 1976; "sucker" Powers & Edmundson 1972, a,b; carpa, Hilse & Braunitzer, 1968). Funcionalmente, isto significa que somente dois grupos $\alpha\text{-NH}_2$ por tetrâmero de hemoglobina de peixe são livres para se ligarem ao CO_2 , diferente da hemoglobina humana que possui quatro. Estes resultados, como veremos, mostram um decréscimo na sensibilidade da hemoglobina ao CO_2 e um aumento nas ligações funcionais entre os efeitos do CO_2 e dos fosfatos orgânicos. Isto ocorrerá porque o CO_2 poderá,

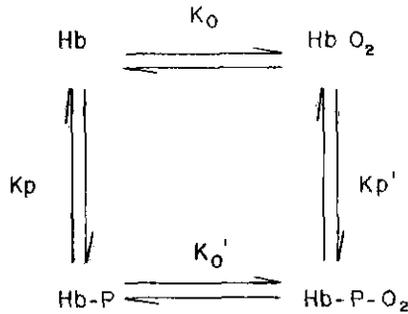
agora, se ligar somente ao NH_2 - terminal da cadeia β das hemoglobinas de peixes, numa competição exclusiva e direta com a ligação dos fosfatos orgânicos. Esta competição é parcial na hemoglobina humana, pois, a ligação ao CO_2 ocorre no NH_2 terminal das cadeias α , onde os fosfatos orgânicos não se ligam à desoxihemoglobina.

Apesar da descoberta inicial de que o ATP possui ação no controle da afinidade da hemoglobina de peixe ao oxigênio (Gillen & Riggs, 1971; Wood & Johansen, 1972), o GTP foi encontrado em predominância dentre os trifosfatos presentes nos eritrócitos de enguia (Geohegan & Poluhowich, 1974) e nesse caso, agia mais efetivamente como modulador do que o ATP (Peterson & Poluhowich, 1976). GTP também foi encontrado como agente modulador mais efetivo no teleosteo **Tilapia** (Lykkeboe et al., 1975) e no peixe dourado (Torraca et al., 1977). Isaacks et al. (1978a) encontrou GTP em maior quantidade que ATP em eritrócitos de quase todos os peixes amazônicos que ele analisou. Recentemente, foi encontrado inositol pentafofato como o principal fosfato em eritrócitos do peixe de respiração aérea, **Arapaima gigas**, inositol difosfato no peixe pulmonado **Lepdosirem**, 2,3 difosfoglicerato em acaribodó, **Pterygoplichthys** (Isaacks et al., 1977; Isaacks et al., 1978 a,b; Bartlett, 1978 a,b). Cada um estava presente em cerca de 0,5 mol/mol de hemoglobina. Bartlett (1976, 1978 a,b) e Kono & Hashimoto (1977) mostraram uma grande variação dentre os eritrócitos de vários peixes, na proporção de ATP e GTP.

Muitas evidências têm demonstrado que hipóxia é acompanhado por um decréscimo no conteúdo de ATP nos eritrócitos de peixes: enguia (Wood & Johansen, 1972), língüado (Wood et al., 1975) e em **Fundulus** (Greaney & Powers, 1978). O decréscimo está associado com um aumento na afinidade ao oxigênio das células vermelhas. Este fato contrasta com o aumento de 2,3 difosfoglicerato e o decréscimo na afinidade ao oxigênio das células vermelhas de mamíferos quando em hipóxia. Weber et al., (1976a) notaram que GTP, especialmente, diminui em eritrócitos de enguia durante hipóxia. O decréscimo de ATP em eritrócitos de **Fundulus**, durante hipóxia, parece ser resultado direto da diminuição da produção mitocondrial (Greaney & Powers, 1978). Da mesma maneira, a hipóxia em **Hypostomus** e em **Pterygoplichthys** é acompanhado pela mudança para respiração aérea, por um decréscimo no GTP e por um aumento da afinidade de seu sangue ao oxigênio (Weber et al., 1979). **Hypostomus** mantém constante o pH do sangue durante hipóxia por retenção de CO_2 (Wood et al., 1979a). Tais mudanças no GTP e afinidade ao oxigênio não ocorrem em **Symbranchus**, peixe de respiração bimodal, quando removida da água; as mudanças correspondem àquelas que ocorrem em organismos de respiração aérea obrigatória: um aumento no conteúdo de fosfatos orgânicos nos eritrócitos e um decréscimo na afinidade ao oxigênio (Johansen et al., 1978a; Weber et al., 1979).

Esses efeitos de fosfatos orgânicos na ligação ao oxigênio resultam diretamente da ligação preferencial à desoxihemoglobina. É importante reconhecer que quando dois fosfatos orgânicos têm efeitos quantitativamente diferentes na ligação da hemoglobina ao oxigênio, esta diferença pode ser medida somente pela diferença na afinidade com que cada um dos fosfatos são ligados. Johansen et al., (1978b) descobriram que a efetividade no decréscimo da afinidade da hemoglobina ao oxigênio está na ordem IHP>GTP> ATP, em **Arapaima**, e concluíram ainda, baseados nos efeitos da mistura de fosfatos,

que "nenhuma preferência marcante ocorre na ligação de um fosfato em particular". Entretanto, se os fosfatos diferem em seus efeitos, suas ligações devem diferir também. Isto é uma consequência da ligação funcional (Wyman, 1948, 1964). Considerem o seguinte esquema simplificado:



As constantes descritas representam as constantes de ligação para cada processo. Se os fosfatos diminuem a afinidade ao oxigênio, i.e., $K_0' < K_0$, isto pode acontecer em razão de $K_p > K_p'$ uma vez que $K_0 K_p' = K_p K_0'$. Assim, se dois fosfatos possuem efeitos diferentes, i.e., o valor de K_0' é diferente de K_0 , a razão de K_p para K_p' deve ser diferente. Muitos estudos, incluindo alguns dos autores, têm utilizado gráficos dos valores de $\log P_{50}$ "versus" a razão fosfato/hemoglobina. Entretanto, a equação de magnitude indica que as quantidades relevantes não correspondem ao total da razão P/Hb , mas sim às concentrações de fosfatos livres. Estes irão decrescer se a taxa P/Hb for constante e se a $[\text{Hb}]$ diminuir; assim, um aumento natural da afinidade ao oxigênio ocorrerá. O decréscimo na afinidade ao oxigênio depende da fração da hemoglobina, α , que se liga ao fosfato. Para a desoxihemoglobina, o valor de α será dado por:

$$\alpha = \frac{K_p [P]}{1 + K_p [P]}$$

Isto mostra que α depende diretamente da concentração de fosfatos livres (P).

Se C_p e C_h são as constantes totais de fosfatos e hemoglobinas, respectivamente, estão:

$$\frac{C_p}{C_h} = \alpha + \frac{[P]}{C_h}$$

Infelizmente, α é função do grau de oxigenação, pois K_p diminui com a oxigenação ($K_p > K_p'$). Nenhuma expressão simples relaciona α com grau de oxigenação, esta poderá ou não ser linear. Assim, somos incapazes de medir (P) e devemos usar C_p , reconhecendo todas as limitações.

Uma vez que fosfatos carregados negativamente se ligam preferencialmente à desoxihemoglobina, na qual os grupos NH_2 da cadeia β são protonados, isto significa que mais prótons estarão ligados à desoxihemoglobina em relação ao que ocorreria na ausência de fosfatos. Isto leva a duas conseqüências: 1) O efeito Bohr é acentuado na região de pH onde existe uma grande diferença na ligação protônica às oxí e desoxihemoglobinas e 2) uma proporção maior de espécies protonadas estará presente a pHs maiores, na presença de fosfatos orgânicos. Isto significa que a conformação desoxiprotonada (estado "T") é favorecida pela adição de fosfatos orgânicos e também pela diminuição do pH. Gillen & Riggs (1977) descobriram que a adição de 1mM de ATP é funcionalmente equivalente a uma queda no pH de 0,5 unidade, em termos do efeito sobre a afinidade ao oxigênio para hemoglobinas de diversos teleosteos. Da mesma maneira, Tan & Noble (1973) descobriram que adição de 0,7mM de inositol hexafosfato (IHP) à hemoglobina de carpa era equivalente a uma mudança no pH de 1,6 unidades. A diferença entre 1,6 e 0,5 reflete a maior negatividade na ligação do IHP comparada à do ATP.

Peixes de respiração aérea X peixes de respiração aquática

Johansen & Lenfant (1972) sugeriram que o sangue de peixes de respiração aérea estão adaptados à liberação de oxigênio em pressões parciais superiores que os de respiração aquática. Johansen et al. (1978a) efetuaram um estudo em peixes amazônicos e mostraram que a afinidade do sangue ao oxigênio de peixes de respiração aérea não apenas era menor, porém, a capacidade de oxigênio, conteúdo de fosfatos orgânicos e efeito Bohr eram todos maiores. Powers et al. (1979a) examinaram sangue de 40 gêneros de peixes amazônicos para verificar se ocorria uma boa generalização com respeito à afinidade ao oxigênio. Resumi alguns resultados na tabela 2. Os dados mostram, claramente, que as principais diferenças ocorrem em comparação a peixes que habitam zonas de correntes rápidas e lentas e que a comparação entre peixes de respiração aérea e de respiração aquática não mostra diferença. Os peixes de águas rápidas tendem a possuir seu sangue com valores de P_{50} maiores em cerca de 50% que aqueles encontrados para sangue de peixes de águas lentas; os valores de P_{50} de peixes de respiração aérea são, em média, menos que 10% maiores do que os de respiração aquática. Além disso, os valores de P_{50} obtidos na presença de 5,6% de CO_2 são cerca de duas vezes maiores que aqueles obtidos na ausência de CO_2 ; isto sugere uma pequena diferença na média dos valores de efeito Bohr em todas as categorias. A comparação desses dados com os estudos recentes de Johansen et al. (1978a) é difícil pois os peixes de respiração aquática examinados por Johansen et al. incluíram dois teleosteos, *Hoplias* e *Osteoglossom* e 4 espécies de elasmobrânquios, eles não estudaram nenhum dos peixes de "águas rápidas" examinados por Powers et al. (1979a) e também, em razão das diferenças nas técnicas utilizadas pelos dois autores. O procedimento usado por Johansen et al. (1978a) consiste na medida do decréscimo de $p\text{O}_2$, em função do tempo no qual a mistura de fermento (levedura) e eritrócitos consome gradativamente o oxigênio do meio. A saturação com O_2 do sangue não é medida, porém, inferida através da forma da curva de $p\text{O}_2$ X tempo.

A taxa de consumo de oxigênio pode não ser uniforme para todos os valores de pO_2 , não só pela preparação com fermento mas, o que é mais importante, pela mistura fermento/eritrócitos. A ação metabólica do fermento irá produzir CO_2 e poderia introduzir metabólitos desconhecidos. Eles usaram uma concentração relativamente alta de fermento, de maneira que a contribuição dos eritrócitos do peixe ao consumo total de oxigênio era presumivelmente negligível.⁽¹⁾ Porém, a alta taxa de fermento para eritrócitos aumenta a possibilidade de interferência dos metabólitos do fermento. Também existem problemas com o instrumento utilizado por Powers *et al.* (1979a). Apesar deles medirem a saturação ao O_2 espectrofotometricamente, eles supunham que o eletrodo de O_2 , em contacto com o espaço gasoso, media precisamente o que realmente acontecia nos eritrócitos e que o equilíbrio, através da fina membrana, era mantido. Seu método sofre pela incapacidade em medir o pH dentro da película e pela incerteza referente ao grau no qual ocorre completa saturação a baixos pHs. Contudo, a comparação entre os dois grupos de resultados parece conveniente e é possível para o sangue de peixes pertencentes a nove gêneros (tabela 3). Os valores de P_{50} foram estimados por Johansen *et al.* em pH 7,4 a partir das curvas de $\log P_{50} \times \text{pH}$ obtidas com a preparação de fermento e eritrócitos tamponados inicialmente com 11,9 mM de bicarbonato (o equilíbrio pCO_2 seria cerca de 10-15mmHg) e 0,05 M de Tris mais vários íons inorgânicos. Assim, o procedimento mediu uma suspensão diluída de eritrócitos ao invés de sangue total heparinizado, como utilizado por Powers *et al.* (1979a). Apesar dessas diferenças técnicas, os valores para sangue de três peixes *Lepidosiren*, *Hoplerythrinus* e *Pterygoplichthys* foram surpreendentemente semelhantes - dentro de 4 a 13%. No geral, os resultados de Johansen *et al.* estão mais próximos daqueles obtidos por Powers *et al.*, na ausência de CO_2 . Os resultados de Johansen *et al.* para as três espécies de *Potamotrygon* atingiram apenas metade dos valores encontrados por Powers *et al.*, mas um elasmobrânquio de outro gênero resultou em valor próximo ao encontrado por Powers *et al.* (1979a). Assim, parece possível que as espécies estudadas pelos dois grupos possam ter sido espécies diferentes. Valores relativamente baixos foram obtidos também para *Osteoglossum bicirrhosum* e *Symbranchus marmoratus*, espécies que não apresentam dúvidas quanto à sua taxonomia. A principal fonte dessa variação seria o conteúdo de fosfatos orgânicos presentes em seus eritrócitos. Este conteúdo pode decrescer com a hipóxia. As condições nas quais os peixes foram capturados e a maneira como seu sangue foi retirado variaram de acordo com as circunstâncias. Seria surpreendente se não ocorresse nenhuma variação. Posteriormente, Wood *et al.* (1979b) descobriram que o conteúdo de nucleosídeos trifosfatados encontrados nos eritrócitos de piranha, diminui de acordo com um aumento no peso de 250 a 400 g; e, simultaneamente, o valor de P_{50} decresce 1/3.

Essas comparações gerais (tabela 1) podem ser um pouco enganosas, pois, elas podem ocultar adaptações isoladas particulares a uma determinada espécie. Por essa razão é conveniente examinar as hemoglobinas de dois tipos de peixes correlacionados taxonomicamente, um dos quais é de respiração aérea e o outro de respiração aquática. As duas melhor estudadas durante a nossa expedição foram os dois osteoglossídeos *Arapaima* e *Osteoglossum* (Galdames-Portus *et al.*, 1979) e dois membros da família Erythrinidae,

Estudos de hemoglobinas ...

Hoplerythrinus e **Hoplias** (Riggs et al., 1979). Para cada uma dessas duplas existe uma diferença substancial: a espécie de respiração aquática tem sangue com afinidade maior ao oxigênio. Johansen et al. (1978b) encontraram resultados semelhantes.

Os resultados obtidos com hemoglobinas de **Arapaima** e **Osteoglossum** são particularmente elucidativos. Esses resultados (Galdames-Portus et al., 1979) indicam que as hemoglobinas de **Osteoglossum** e **Arapaima** possuem afinidades ao oxigênio praticamente iguais em pHs baixos, porém, a hemoglobina de **Arapaima** tem uma afinidade muito menor que aquela do **Osteoglossum** em pHs altos. Estudos da dependência da afinidade das hemoglobinas ao O_2 a variações de pH em **Osteoglossum** e **Arapaima** sugerem o que se segue. Os resultados de **Osteoglossum** podem ser descritos em termos de três grupos ácidos ligados à oxigenação, como formulado por Wyman (1948).

$$\log P_{50} = \text{constante} + \log \frac{(H+K_1)(H+K_2)(H+K_3)}{(H+K'_1)(H+K'_2)(H+K'_3)}$$

No caso, H é a atividade hidrogeniônica; K_1 ; K_2 e K_3 são as constantes de dissociação ácida da ligação ao O_2 para desoxihemoglobina e K'_1 , K'_2 , K'_3 são as mesmas constantes para oxihemoglobina. A amplitude de mudanças na afinidade ao O_2 da hemoglobina de **Osteoglossum** entre os pHs 6 e 8 exigem que, pelo menos, dois grupos estejam presentes. Uma vez que **Arapaima** e **Osteoglossum** parecem apresentar resultados virtualmente coincidentes em baixos pHs, podemos inferir que K_1 e K'_1 sejam, provavelmente, os mesmos, para cada um deles. Posteriormente, um pequeno efeito Bohr reverso, presente em pH acima de 7,5, parece ser o mesmo para cada espécie, de maneira que K_3 e K'_3 parecem possuir os mesmos valores em cada hemoglobina. Sob tais circunstâncias, a diferença em $\log P_{50}$ será dada por:

$$\Delta \log P_{50} = \frac{P_{50}(\text{Arapaima})}{P_{50}(\text{Osteoglossum})} = -\log \frac{(H+K_2)}{(H+K'_2)}$$

Em pHs altos, isto se reduz a:

$$\Delta \log P_{50} = \log \frac{K'_2}{K_2}$$

Uma vez que $\Delta \log P_{50} \approx 1,0$ em pHs altos, podemos inferir que a diferença entre as afinidades das hemoglobinas ao oxigênio de **Osteoglossum** e **Arapaima** podem ser explicadas através da suposição de que **Osteoglossum** possui um único grupo ácido por heme, que está ausente na hemoglobina de **Arapaima** e que o pK deste grupo decresce cerca de uma unidade após oxigenação. Os resultados entre pH 6 e 8 podem ser ajustados satisfatoriamente com o pK_2 (desoxi) = 7,4 e pK_2 (oxi) = 6,2. Esses valores sugerem resíduos de histidyl. Assim, a maior afinidade da hemoglobina de **Osteoglossum** ao oxigênio pode, provavelmente, ser encarada pela presença de resíduos de histidyl ligados à oxigenação, os quais não ocorrem na hemoglobina de **Arapaima**. Esta sugestão, é claro, deve permanecer es-

peculativa até que estudos sobre estruturas tenham sido realizados. Porém, isto ilustra a idéia, bem estabelecida por estudos em hemoglobinas humanas variantes, de que grandes mudanças na afinidade ao oxigênio podem ser encontradas em mudanças de apenas um único resíduo. Entretanto, as diferenças entre as duas hemoglobinas devem ser mais complexas do que o quadro apresentado indica. A dependência ao pH do coeficiente de Hill, n , para hemoglobina de **Osteoglossum** é baixa em pHs baixos e altos e é máxima em pHs próximos a 7. Este comportamento é típico de hemoglobinas de muitos teleosteos (Gillen & Riggs, 1977; veja também os vários estudos desse volume) e muito diferente da hemoglobina de **Arapaima** onde o coeficiente de Hill é baixo (<1) em pH baixo e parece ser máximo a pHs altos. É curioso (ou coincidente?) que este comportamento da hemoglobina de **Arapaima** seja compartilhado com outro peixe de respiração aérea, o "spotted gar", **Lepistesosteus osculatus** (Gillen & Riggs, 1977). **Hoplias**, um peixe de respiração aquática e **Hoplerythrinus**, um peixe de respiração aérea, ambos Erythrinidae primitivos, possuem hemoglobinas que diferem muito; o mesmo fato é encontrado para **Arapaima** e **Osteoglossum** apesar dos poucos resultados disponíveis. O valor de n para hemoglobina de **Hoplerythrinus** parece ter uma dependência ao pH semelhante àquela que acontece em **Arapaima** (Riggs et al., 1979).

Outro peixe de respiração aérea examinado pela IV expedição na Amazônia incluiu um teleosteo especializado, **Symbranchus** (Phelps et al., 1979b), o peixe pulmonado **Leplidosirem** (Phelps et al., 1979a) e três silurídeos "catfish" de respiração aérea **Hoplosternum** (Garlick et al., 1979b), **Pterygoplichthys** (Brunori et al., 1979; Weber & Wood, 1979) e **Hypostomus** (Weber & Wood, 1979). O equilíbrio de oxigenação dessas hemoglobinas diferem muito; elas parecem não compartilhar nenhum fator comum, ausente em peixes de respiração aquática.

Efeito Root

Root (1931) chamou atenção para o fato de que muitos peixes têm sangue que não se saturam completamente com oxigênio após equilibrado com ar a pHs baixos. O trabalho de Farmer et al. (1979) fornece uma nova luz ao problema. Apesar de se pensar que o efeito Root tivesse um papel importante na liberação de O_2 para a bexiga natatória, Farmer et al., (1979) concluíram que esta propriedade do sangue (e hemoglobina) pode ser melhor associada com a presença de **rete** na coróide do olho do que com a presença de **rete** na bexiga natatória. Assim, o efeito Root pode ter-se originado inicialmente como uma adaptação para assegurar o suprimento de O_2 aos tecidos retinianos, para adequar-se às necessidades visuais. O olho tem uma alta taxa de consumo de oxigênio, como o cérebro, do qual é uma extensão. Mas, diferente de nossos olhos o tecido retiniano por si só nesses peixes não é dotado de uma rede de capilares e assim, dependem da difusão do oxigênio em extensões consideráveis. Isto pode ser encontrado somente através de um alto gradiente fornecido pelo bombeamento de O_2 para o interior do olho (Wittenberg & Wittenberg, 1974; Wittenberg & Haedrich, 1974). Não foi encontrada **rete** na coróide de

Gymnotoidei nem de Siluroidei. Isto pode ser indicativo de que o primeiro depende, pelo menos em parte, de impulsos elétricos ao invés da visão; os *Siluroidei* parecem utilizar seus sensores químicos bastante desenvolvidos. O único peixe não teleosteo que sabe-se possuir *rete* é *Amia*, o "bowfin" (Wittenberg & Wittenberg, 1974); a hemoglobina deste peixe é caracterizada por um amplo efeito Root (Weber et al., 1976b).

Gostaríamos de considerar as propriedades de hemoglobinas que podem ser associadas à presença de efeito Root. O equilíbrio de oxigenação das hemoglobinas pode ser descrito entre 10 e 90% de saturação ao oxigênio pela equação de Hill que tem duas constantes, P_{50} e n . A figura 1 mostra, dessa maneira, a relação entre o valor de P_{50} e o potencial de saturação com oxigênio quando o sangue é equilibrado com o ar ($P_{O_2} \cong 150$ mmHg) para vários valores de n . Logo, fica evidente que baixos valores de n resultam em dessaturações substanciais em ar. Obviamente, se o valor de n cai a 0,5, um P_{50} de apenas 2mmHg pode ser associado com uma perda de 10% na saturação; a um P_{50} de somente 16mmHg, 1/4 dos sítios de ligação ao O_2 estará livre quando equilibrado com o ar. Valores de n menores que 1,0 em pHs baixos são comuns para hemoglobinas de uma ampla variedade de peixes e valores tão pequenos quanto 0,5 têm sido observados comumente (veja por exemplo, Pennelly et al., 1978; Galdames-Portus et al., 1979; Saffran & Gibson, 1978). Tais valores baixos parecem resultar de diferenças funcionais entre as subunidades α e β . Assim, ausência de cooperatividade e grandes diferenças funcionais entre as subunidades α e β , a baixos pHs, podem ser características de hemoglobinas com efeito Root, apesar da heterogeneidade α - β não ser grande em hemoglobinas de truta e de carpa. Tal heterogeneidade pode também ser comum em mamíferos e outras hemoglobinas que não possuem efeito Root, apesar da dificuldade em examiná-las devido à forte cooperatividade nelas presente.

O efeito Root, como discutido anteriormente, pode ser caracterizado como um efeito Bohr acentuado. Hemoglobinas de muitos peixes são caracterizadas por uma diferença de duas ordens de magnitude entre afinidade ao O_2 a altos e baixos valores de pH, mas para as quais o valor máximo de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ não é usualmente alto. Certos peixes amazônicos possuem hemoglobinas com altos valores máximos de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$: *Osteoglossum*, *Arapaima*, *Mylossoma* (II) e *Pterygoplichthys* (IV). A tabela 4 mostra que todos esses peixes têm *rete* na coróide (exceto pelos olhos de *Pterygoplichthys* que parecem não terem sido examinados); nenhum dos outros peixes amazônicos com baixos valores para essa variável possuem *rete* na coróide. As hemoglobinas com altos valores de efeito Bohr têm valores próximos de $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ que se aproximam de 2,0. Um valor semelhante alto foi encontrado em "menhaden" por Saffran & Gibson (1978). Isto significa que a oxigenação completa do tetrâmero, próximo a pH neutro, presumivelmente será acompanhada por uma liberação de cerca de 8 prótons. Um mínimo de 4 grupos ácidos em cada unidade α - β é necessário para tal efeito. Um estudo detalhado desses grupos e as mudanças em seus valores de pK com oxigenação, seria de muito valor no entendimento das mudanças que acompanham a oxigenação e o mecanismo de efeito Root em pHs baixos.

Qual a base cinética do efeito Root? Uma comparação com a cinética de combinação ao CO e de dissociação ao O_2 de várias hemoglobinas de peixes a pH 6 e 8 (Tabela 5)

mostra que um amplo efeito Root está, em geral, associado com a presença de duas fa - ses na cinética de combinação com CO a baixos pHs. Essas fases, acredita-se, refletem as propriedades das cadeias α e β dentro do tetrâmero, e diferem, em taxas, o equiva - lente a 40 vezes. Conforme o pH aumenta, a fase lenta aumenta proporcionalmente, de maneira que a cinética de combinação com o CO é, em geral, homogênea a pH 8,0. Esta heterogeneidade na dependência ao pH não é comumente evidenciada pela cinética de dis - sociação ao O_2 , mas nem sempre isso é verdadeiro (**Prochilodus, Amla**). Hemoglobina de carpa parece ser excepcional: apesar das duas fases da cinética CO estarem presentes, as diferenças são pequenas e suas dependências do pH não diferem muito. As hemoglobi - nas dos peixes amazônicos que não possuem amplo efeito Root não têm, em geral, tal se - paração na cinética de combinação com o CO. Algumas dessas hemoglobinas sem efeito Root têm comportamento autocatalítico a pH 6 na cinética de combinação ao CO e comportamento homogêneo em altos pHs (**Loricariichthys, Brachyplatystoma**). Em contraste, a reação CO_{on} na hemoglobina IV de **Pterygoplichthys** é homogênea a baixo pH e heterogênea a alto pH. Somente a hemoglobina de **Lepidosiren** parece ter cinética de combinação ao CO claramente bifásica a baixo pH, entre as hemoglobinas sem efeito Root examinadas. Em resumo, as aparentes diferenças α - β parecem comumente ser manifestadas no comporta - mento da desoxihemoglobina a baixo pH como refletiu a reação CO_{on} ; raramente a altos pHs e só ocasionalmente é que as cinéticas de dissociação ao O_2 sugerem que o comporta - mento da hemoglobina ligada seja heterogêneo - talvez em função das diferenças α - β ; po - rém, de maneira aceitável, por outras razões tais como mudanças na agregação.

Efeito do CO_2

Farmer (1979) mediu o efeito específico do CO_2 em hemoglobinas de vários peixes; os resultados são de considerável interesse. Em primeiro lugar, o efeito do CO_2 na diminuição da afinidade ao O_2 aumenta com pH, como em hemoglobina humana. Em segundo lugar, este aumento é aproximadamente o mesmo para todos os peixes examinados, exceto para **Brachyplatystoma**, para a qual o efeito de CO_2 é aproximadamente o dobro e igual ao efeito na hemoglobina humana. A similaridade entre os resultados para hemoglobinas humana e de **Brachyplatystoma** indicam que os NH_2 -terminais, para as quatro cadeias poli - peptídicas da hemoglobina de **Brachyplatystoma**, são livres como na hemoglobina humana, uma vez que a oxigenação dependente de ligação ao CO_2 ocorre nos NH_2 -terminais da hemo - globina humana. O efeito menor de CO_2 em hemoglobinas de outros peixes é, então, a - tribuído ao fato do grupo NH_2 -terminal da cadeia α estar, provavelmente, bloqueado. As hemoglobinas de todos os peixes examinados tem seus grupos NH_2 -terminais bloqueados (ver secção IIIb). É certo que o efeito do CO_2 é semelhante para **Hoplosternum, Lepidosiren** e **Typhlonectes** (um anfíbio), apesar do efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$) ser quantitativa - mente diferente para cada um deles. Para **Hoplosternum** $\phi > 0$; para **Lepidosiren** $\phi < 0$ e para **Typhlonectes** $\phi \cong 0$. Isto sugere que a ligação ao CO_2 é essencialmente independen - te do efeito Bohr na ausência do CO_2 e que os grupos NH_2 da cadeia β não são "grupos

Bohr', exceto quando seu equilíbrio é perturbado por uma ligação ao CO_2 ou a fosfatos.

CONCLUSÕES

Os estudos de sangue e hemoglobinas em peixes, descritos nos artigos desse volume, fornecem um quadro detalhado do que Jeffries Wyman denominou "variação de um tema". Assim, como os peixes desenvolveram muitas estratégias anatômicas para resolver problemas respiratórios, encontramos uma variação, igualmente intensa, nas propriedades moleculares de suas hemoglobinas. Tais variações funcionais foram desenvolvidas para enfrentar as pressões ambientais e satisfazer os requisitos metabólicos. Parece que de uma forma geral, as propriedades requeridas não seriam satisfeitas com um só tipo de hemoglobina, de maneira que, como resultado de duplicações gênicas, pelo menos dois tipos de hemoglobinas com propriedades ligeiramente distintas estão presentes em muitos hemolisados de peixes. O trabalho com peixes da Amazônia sugere que esta heterogeneidade funcional pode até ser uma regra ao invés de exceção. Agora está claro que muitos peixes espalhados pelo mundo possuem, pelo menos, duas hemoglobinas, uma das quais mostra um aumento na afinidade ao O_2 e a outra mostra um decréscimo (ou não muda) conforme um aumento de pH.

Sabemos, de estudos de hemoglobinas de mamíferos, que muito da adaptação funcional depende dos resíduos de aminoácidos próximos aos grupos NH_2 e COOH terminais das cadeias polipeptídicas α e β . Estas representam uma pequena fração da superfície tetramérica total. Não é surpreendente, entretanto, que a especificidade imunológica de superfície protéica possa ser relacionada com a genealogia da proteína, porém, não com a fina estrutura de sua função. Assim, a hemoglobina IV de truta possui propriedades funcionais muito semelhantes àquelas de muitos outros tipos de peixes que ainda mostram relações imunológicas essencialmente nulas com qualquer dos peixes amazônicos estudados. Em contraste, os testes imunológicos mostram que a hemoglobina I de truta, com propriedades funcionais um pouco diferentes da maioria das hemoglobinas, tem uma estrutura de superfície que tem muito em comum com a maioria das hemoglobinas dos peixes da Amazônia. A hemoglobina I de truta, diferente da IV, e a maioria das hemoglobinas típicas, são totalmente desprovidas dos efeitos heterotrópicos de fosfatos orgânicos e prótons na afinidade ao O_2 , mas possuem interações cooperativas homotrópicas de ligação ao O_2 .

Os resultados obtidos por Powers *et al.* (1979b) de que a entalpia total de oxigenação da hemoglobina a pH 9,0 parece ser essencialmente constante, enquanto que mudança na energia livre varia consideravelmente, sugerem que o principal fato da variação na afinidade intrínseca ao O_2 é entrópica. O pH 9,0 foi escolhido para evitar as complexidades de efeitos heterotrópicos dos fosfatos orgânicos e prótons. A base molecular para essa variação entrópica não é conhecida. Talvez ela esteja associada com diferenças sutis nas conformações oxí e desoxí da hemoglobina.

Desde o trabalho pioneiro de Krogh & Leitch (1919) muito esforço tem sido aplicado em correlacionar a afinidade do sangue e da hemoglobina ao oxigênio com a pressão

ambiental de oxigênio. Assim, Johansen et al. (1978a,b) correlacionaram baixas afinidades ao oxigênio com peixes de respiração aérea e altas afinidades ao oxigênio com peixes de respiração aquática. Esta relação parece ser verdadeira quando a comparação é efetuada em certas duplas de peixes amazônicos bastante relacionados, uma das quais respira ar e a outra não. Tais duplas são os dois osteoglossídeos *Osteoglossum* e *Arapaima* e dois membros da primitiva família Erythrinidae, *Hoplias* e *Hoplerythrinus*. Entretanto, Powers et al. (1979a) mostraram que esta correlação tende a desaparecer quando todos os peixes de respiração aquática e de respiração aérea são comparados. Esses autores encontraram, contrariamente aos anteriores, uma forte correlação dessa propriedade com o habitat: peixes que habitam águas rápidas apresentam sangue com baixas afinidades ao oxigênio comparativamente aos que habitam águas lentas. Provavelmente, isso está correlacionado à necessidade de natação mais intensa e assim, com a atividade metabólica maior em peixes de águas rápidas; baixas afinidades ao oxigênio significam que a liberação desse gás aos tecidos deve ser efetuada a pressões relativamente altas.

Afinidades menores das hemoglobinas de muitos peixes ao O_2 foram encontradas em baixos pHs. Claramente, elas não podem se saturar com o oxigênio quando equilibradas com ar em pHs baixos. Este fenômeno (efeito Root) vinha sendo atribuído a uma adaptação para facilitar a descarga de O_2 na bexiga natatória. O mecanismo proposto é que o ácido láctico, liberado pela glândula de gás controlada através de neurônios, direcione a liberação de oxigênio da hemoglobina. O sistema de distribuição contra-corrente dos capilares, a *rete mirabile*, atua na concentração do oxigênio a altas pressões na bexiga natatória. A descoberta de Wittenberg & Wittenberg (1974) de que uma *rete* está presente na coróide de olhos de diversos peixes e de sua função de facilitar a liberação de O_2 na retina, sugere outra função para as hemoglobinas com efeito Root. Correlação entre a presença de efeito Root e a presença de *rete* na coróide e na bexiga natatória de peixes amazônicos, levaram Farmer et al. (1979) a sugerir que o efeito Root pode ter sido desenvolvido inicialmente como parte de mecanismo de liberação de oxigênio para as necessidades visuais. Aqueles peixes que dependem de outros mecanismos de percepção sensorial - os Gymnotoidei (impulsos elétricos) e os Siluroidei (sensores químicos) - não possuem *rete* na coróide nem um efeito Root significativo.

Existem, ainda, muitas variações no tema, descritas nos demais artigos. Elas servem para ilustrar alguns dos caminhos pelos quais as hemoglobinas evoluíram de maneira a permitir aos organismos sobreviverem em diversas circunstâncias. Porém, somos ignorantes da maioria dos detalhes moleculares. Por exemplo, o mecanismo de efeito Root ainda não é compreendido em termos da anatomia molecular da molécula de hemoglobina. Apesar desses estudos terem mostrado que o efeito Root pode ser resultado de uma variedade de combinações de processos cinéticos, nós ainda não conhecemos quaisquer detalhes moleculares. Assim, restam ainda muitos trabalhos a serem efetuados até que possamos compreender completamente a base molecular para muitas das adaptações apresentadas pela molécula de hemoglobina. Da mesma maneira, estudos têm demonstrado mudanças acentuadas nos agentes alostéricos ATP e GTP nos eritrócitos de peixes, como um resultado de hipóxia, ainda que os detalhes enzimáticos desse processo adaptativo tenham sido par-

cialmente estudados. Apesar de conhecermos muito a respeito do comportamento dos eritrócitos humanos, o conhecimento do metabolismo das células vermelhas nucleadas de vertebrados inferiores é pequeno. Os eritrócitos de peixes amazônicos serão um campo rico para futuras investigações.

AGRADECIMENTOS

A maioria dos trabalhos recentes discutidos neste artigo foram efetuados no R.V. Alpha Helix e foram financiados pelo "GRANT" PCM 75-06451 fornecido pela **The National Science Foundation**.

(1) NOTA

1. Esta proporção pode ser criticamente importante. Uma vez que a taxa glicolítica em células vermelhas de mamíferos é intimamente ligada ao grau de oxigenação da hemoglobina e conseqüentemente à pressão de oxigênio (Brewer & Eaton, 1971), uma relação semelhante seria esperada nas células vermelhas nucleadas de peixes que podem ter taxas substanciais de consumo de O_2 . Se assim for, a proporção do consumo de O_2 pela mistura de células vermelhas e fermento (levedura) seria afetada pela pressão de oxigênio. Se as células vermelhas de peixes continham cerca de um mol ATP por mol de hemoglobina, tudo estaria virtualmente ligado à hemoglobina quando desoxigenada e a maioria estaria livre quando a hemoglobina estivesse saturada com oxigênio. Tal mudança no ATP poderia causar uma significativa mudança no metabolismo. Não está claro se essas mudanças ocorrem suficientemente rápido para perturbarem as medidas. Contudo, Rapoport et al. (1976) encontraram um rápido aumento de 26% na taxa glicolítica de eritrócitos humanos quando eram desoxigenados. Seria surpreendente se mudanças rápidas, semelhantes, não acompanhassem a desoxigenação das células vermelhas de peixes.

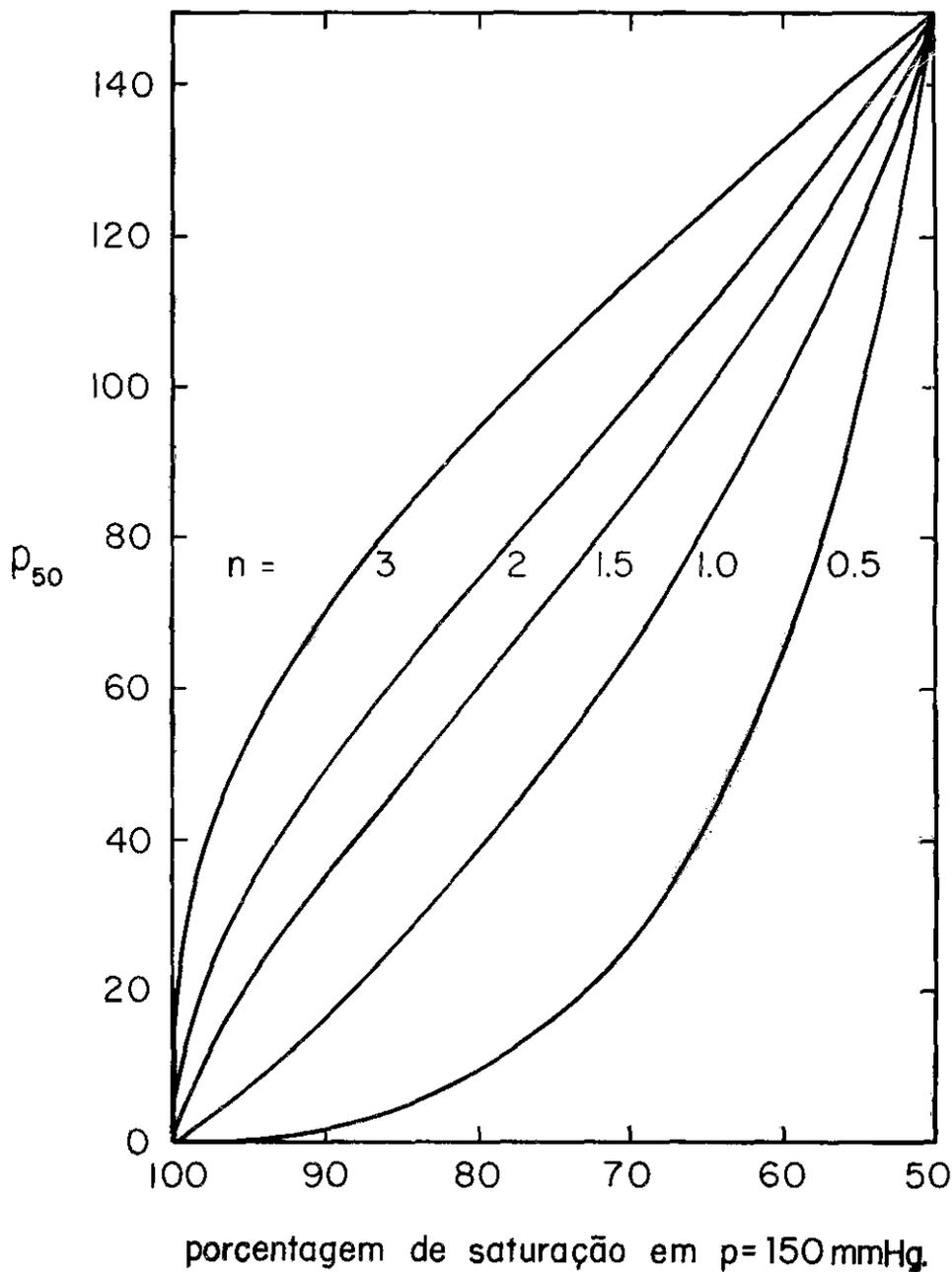


FIG. 1. Relação aproximada entre a pressão de saturação (mm Hg) de 50% da hemoglobina com oxigênio e a porcentagem de saturação da hemoglobina no ar ($pO_2 \cong 150$ mm Hg) para vários valores do coeficiente de Hill, n .

Tabeta 1. Comparação das seqüências NH₂ terminais das cadeias β de vários peixes.

"Sting Ray" (1)	Val-Lys-Leu-Gly-Glu-Gln-Lys-Lys-Ala-Ile-Ala-Gly- ? Trp-
Tubarão (2)	Val-His-Trp-Ser-Glu-Val-Glu-Leu-His-Glu-Ile-Thr-Thr-Thr-Trp-
Latimeria (3)	Val-Leu-Trp-Ala-Ala-Asp-Glu-Arg-Ala-Ile-Ile-Thr-Ile-Val-Tyr-
Carpa (4)	Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Ala-Leu-Trp-
Ciclídeo do Rio Grande (5)	Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Lys-Ala-Ile-Ala-Gly-Ile-Trp-
Enguia S (6)	Val-Glu-Trp-Ser-Ala-Gly-
Catostomus (7) anódica A	Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-Ala-Ile-Leu-Ser-Leu-Trp-
catódica	Val-Asp-Trp-Ser-Asp-Ala-Glu-Arg- ^{Lys} Gln-Thr-Leu-Val-Ser-Val-Trp-
Truta IV (8)	Val-Asp-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-Ala-Ile-Val-Gly-Leu-Trp-

- (1) Mumm *et al.* (1978)
- (2) Fisher *et al.* (1977)
- (3) Bonaventura *et al.* (1974)
- (4) Gillen & Riggs (1972)
- (5) Gillen & Riggs (1973a)
- (6) Gillen & Riggs (1973b)
- (7) Powers & Edmundson (1972)
- (8) Bossa *et al.* (1976)

Tabela 2. Resumo dos dados de Powers *et al.* (1978a) sobre equilíbrio de oxigenação de sangue de peixes amazônicos⁺.

	$P_{50}(-CO_2)$	$P_{50}(+CO_2)$	Razão
Peixes de respiração aérea	10,4	22,2	2,1
Peixes de respiração aquática	10,0	20,3	2,0
Razão	1,04	1,09	
Peixe de "água lenta"	9,0	17,8	2,0
Peixe de "água rápida"	13,3	26,6	2,0
Razão	1,5	1,5	

(+) Os números representam as médias dos valores encontrados para os peixes nas diferentes categorias. Os dados são compilados da Tabela 1 de Powers *et al.* (1979a).

Tabela 3. Comparação das afinidades ao oxigênio para vários peixes amazônicos.

Gênero	Johansen <i>et al.</i> (1979a)	Powers <i>et al.</i> (1979a)	
	P_{50} (29°)	$P_{50}(30^{\circ}, -CO_2)$	$P_{50}(30^{\circ}, +CO_2)$
Potamotrigon ⁺	6,46	12,2	17,8
Lepidosiren	8,00	7,1	13,8
Arapaima	21,00	14,8	37,3
Osteoglossum	6,08	9,4	25,0
Hoplias	6,05	4,8	16,4
Hoplerythrinus	12,07	11,4	36,2
Hoplosternum	11,1 (14,2 no ar)	9,5	17,8
Pterygopluchthys	10,4 (8,5 no ar)	10,8	13,5
Symbranchus	7,05	9,4	11,3

⁺ média de dados para 3 espécies

Tabela 4. Efeito Bohr de várias hemoglobinas¹

Gênero	$\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta pH}$ Máx	Efeito ¹² Root	Bexiga ¹² natatória	Retê ¹² Coróide
Potamotrygon ²	-0,5	+	0	0
Lepidosiren ³	-0,4	0	0	0
Osteoglossum ⁴	-1,9	+++	+	+
Arapaima ⁴	-1,9	+++	+	+
Mylossoma ⁵	I +0,14	+++	+	+
	II -1,8			
Pterygoplichthys ⁶	I +0,19	+	+	?
	IV -2,1			
Pseudodoras ⁷	-0,1	0	+	0
Brachyplatystoma ⁸	-1,0	0	+	0
Hoplosternum ⁹	I +0,3	+	+	?
	II -0,5	++		
Symbranchus ¹⁰	-0,2	0	0	?
Prochilodus ¹¹	-2,3	+++	+	+

¹ Estes valores diferem daqueles citados nos trabalhos porque aqueles se referem a um intervalo específico de pH que, em geral, divergiu do intervalo onde o efeito Bohr foi máximo.

²Martin et al., 1979c

³Phelps et al., 1979a

⁴Galdames-Portus et al., 1979

⁵Martin et al., 1979a

⁶Brunori et al., 1979

⁷Martin et al., 1979e

⁸Martin et al., 1979d

⁹Garlick et al., 1979b

¹⁰Phelps et al., 1979b

¹¹Martin et al., 1979b

¹²Como resumido por Farmer et al., 1979

Tabela 5. Comparação das constantes cinéticas aparentes da combinação ao CO e dissociação ao O₂ em pH 6 e 8 para várias hemoglobinas¹.

Gênero	Fase Cinética CO _{on}	ℓ' (pH 8) ℓ' (pH 6)	K (pH 6) K (pH 8)	Observações
Amplio efeito				
Root				
Osteoglossum ²	rápido	0,65	9,3	
	lento	22		
Arapaima ²	rápido	0,9		
	lento	9,0		
Mylossoma-1 ³		1,1	0,9	
Mylossoma-2 ³	rápido	1,0	5,9	Cinéticas on e off heterogêneas em todos os pHs.
	lento	3,8		
Hoplias ⁴	rápido	1,0-1,2	11	
	lento	3,3		
Hoplerhythrinus ⁴	rápido	1,0-1,3	11	
	lento	5,7		
Prochilodus ⁵		10	6,4	Razão O ₂ off a 20°C; razão muito rápida para ser medida a pH 6,0 e 20°C.
Cyprinus (Carpas) ⁶	rápido	1,6	10	
	lento	1,5		
Myripristis ⁷ ("squirrel fisch")	rápido	2	6,8	
	lento	40		
Amia ("Bowfin") ⁸		4,6-11	5,6-10	Amplitude de valores para 7 componentes: Reação O ₂ off bi-fásica a baixo pH.
Leiostomus (Spot) ⁹	rápido	28	5,7	
	lento	10,9		
Brevoortia ¹⁰ ("Manhaden")	rápido	5,2	-	
	lento	56,5		
Pequeno Efeito				
Root				
Potamotrygon ¹⁰		4,5	3,0	Cinética heterogênea para todos os pHs.
Pterygoplichthys-1 ¹¹ -4 ¹¹		1,0	0,9	
		3,0	2,7	
Sternopygus ¹²		8,0	4,0	Reação CO _{on} homogênea a baixo pH, heterogênea a alto pH. Cinética totalmente homogênea. Homogeneidade não especificada.
Hoplosternum -1 ¹³ -2 ¹³		0,8	0,7	
		2,4	16,7	

Tabela 5 . Continuação

Sem Efeito			
Root			
Lepidosiren ¹⁴	3,3	3,2	Reação CO ₂ bifásica em pH baixo; reação O ₂ off homogênea.
Loricariichthys ¹⁵	3,0	6,0	Autocatalítica a baixo pH reação O ₂ off homogênea.
Pseudodoras ¹⁶	3,3	6,7	Efeito Bohr ácido para reação CO ₂ on.
Brachyplatystoma ¹⁷	3,4	2,3	Autocatalítico a baixo pH; reação O ₂ off homogênea.
Synbranchus ¹⁸	1,4	2,0	Todas as cinéticas homogêneas

¹ Os números foram obtidos através dos trabalhos citados, algumas vezes diretamente, algumas vezes por interpolação e ocasionalmente pelo uso de dados em valores de pH ligeiramente diferentes de 6 ou 8. Alguns dados foram descritos meramente como "heterogêneos" sem posterior descrição. Teria sido mais útil fornecer pelo menos informação suficiente que permitisse o restabelecimento de uma descrição do tempo real do processo.

²Galdames-Portus et al. (1979)

³Martin et al. (1979a)

⁴Riggs et al. (1979)

⁵Martin et al. (1979b)

⁶Tan et al. (1973)

⁷Pennely et al. (1978)

⁸Weber et al. (1976b)

⁹Boaventura et al. (1976)

¹⁰Martin et al. (1979c)

¹¹Brunori et al. (1979)

¹²Garlick et al. (1979a)

¹³Garlick et al. (1979b)

¹⁴Phelps et al. (1979a)

¹⁵Focesi et al. (1979)

¹⁶Martin et al. (1979c)

¹⁷Martin et al. (1979d)

¹⁸Phelps et al. (1979b)

¹⁹Saffran & Gibson (1978)

Referências bibliográficas

- Allendorf, F.W. - 1978. Protein polymorfism and the rate of loss of duplicate gene expression. **Nature, Lond.**, 272:76-78.
- Araki, T.; Okasaki, T.; Kajita, A.; Shuluya, R. - 1974. Polymerization of oxygenated and deoxygenated bullfrog hemoglobins. **Biochim. Biophys Acta**, 351: 427-436.
- Arnone, A. - 1972. X-ray diffraction study of binding of 2,3 - diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. **Nature, Lond.**, 237: 146-149.
- Atha, D. H. & Riggs, A. - 1976. Tetramer-dimer dissociation in hemoglobin and the Bohr effect. **J. Biol. Chem.**, 251: 5537-5543.
- Baldwin, J. M. - 1976. A model of cooperative oxygen binding to haemoglobin. **Br. Med. Bull.**, 32: 213-218.
- Bartlett, G. R. - 1976. Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 55A: 211-214.
- - 1978a. Phosphates in red cells of two lungfish; The South American, *Lepidosireo paradoxa* and the african, *Protopterus aethiopicus*. **Can. J. Zool.**, 56: 882-886.
- - 1978b. Phosphates in red cells of two South American osteoglossids: *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum*. **Can. J. Zool.**, 56:878-881.
- Benesch, R. & Benesch, R. E. - 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 26: 162-167.
- Benesch, R.; Benesch, R. E.; Yu, C. I. - 1968. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. **Proc. Natn. Acad. U.S.A.**, 59: 526:532.
- Benesch, R.E.; Kwong, S.; Benesch, R.; Edalji, R. - 1977. Location and bond type of intermolecular contacts in the polymerisation of haemoglobin S. **Nature, Lond.**, 269:772-775.
- Benesch, R. E.; Yung, S.; Benesch, R.; Mack, J.; Schneider, R. G. - 1976. α -chain contacts in the polymerisation of sickle haemoglobin, **Nature, Lond.**, 260: 219-221.
- Black, E. C. - 1958. Hyperactivity as a lethal factor in fish. **J. Fisch. Res. Bd. Can.** 15: 573-586.
- Bonaventura, J.; Bonaventura, C.; Sullivan, B. - 1975. Hemoglobins and hemocyanins: comparative aspects of struture and function. **J. Exp. Zool.**, 194: 155-174.
- Bonaventura, J.; Gillen, R. G.; Riggs, A. - 1974. The hemoglobin of the crossopterygian fish, *Latimeria chalumnae* (Smith). **Archs Biochem. Biophys.**, 163: 728-734.
- Bonaventura, C.; Sullivan, B.; Bonaventura, J. - 1976. Spot hemoglobin. Studies on the root effect hemoglobin of a marine teleost. **J. Biol. Chem.**, 251: 1871-1876.
- Bookchin, R. M. & Nagel, R. L. - 1973. Conformational requirements for the polymerization of hemoglobin S: Studies of mixed liganded hybrids. **J. Mol. Biol.**, 76: 233-239.
- Bossa, F.; Barra, D.; Coletta, M.; Martini, F.; Liverzani, A.; Petruzzelli, R.; Bonaventura, J.; Brunori, M. - 1976. Primary struture of hemoglobins from trout (*Salmo irideus*). Partial determination of amino acid sequence of Hb trout IV. **FEBS Lett.**, 64: 76-80.
- Brewer, G. J. & Eaton, J. W. - 1971. Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport. **Science, N. Y.**, 171: 1205-1211.

- Brown, J. L. & Roberts, W. K. - 1976. Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from ascites cells are N¹ - acetylated. *J. Biol. Chem.*, 251: 1009-1014.
- Brunori, M. - 1975. Molecular adaptation to physiological requirements: the hemoglobin system of trout. *Curr. Topics Cell. Regul.*, 9: 1-39.
- Brunori, M.; Bonaventura, J.; Focesi, A.; Galdames-Portus, M. I.; Wilson, M. T. - 1979. Separation and characterization of the hemoglobin components of *Pterygoplichthys pardalis*, the Acaribodo, *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 173-178.
- Bunn, H. F. & Riggs, A. - 1979. The measurement of the Bohr effect of fish by gel electrofocusing. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 95-99.
- Carey, F. G. & Gibson, Q. H. - 1977. Reverse temperature dependence of tuna hemoglobin oxygenation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78: 1376-1382.
- Carter, G. S. & Beadle, L. C. - 1931. The fauna of the swamps of the paraguayan chaco in relation to its environment - II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linnean Soc.*, 37: 327-368.
- Chanutin, A. & Curnish, R. R. - 1964. Factors influencing the electrophoretic patterns of red cell hemolyzates analyzed in cacodylate buffers. *Archs. Biochem. Biophys.* 106: 433-439.
- - 1967. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Archs. Biochem. Biophys.*, 121:96-102.
- Clark, B. - 1970. Darwinian evolution of proteins, *Science, N. Y.*, 168: 1009-1011.
- Dunson, W. A.; Swarts, F.; Silvestri, M. - 1977. Exceptional tolerance to low pH of some tropical blackwater fish. *J. Exp. Zool.*, 201: 157-162.
- Edelstein, S. J. - 1975. Cooperative interactions of hemoglobin. *A. Rev. Biochem.*, 44: 209-232.
- Edelstein, S. J.; McEwen, B.; Gibson, Q. H. - 1976. Subunit dissociation in fish hemoglobins, *J. Biol. Chem.*, 251: 7632-7637.
- Elli, R.; Guillian, A.; Tentori, L.; Chiancone, E.; Antonini, E. - 1970. The hemoglobin of Amphibia - X. Sedimentation behavior of frog. *Triton*, and Axolotl hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 36: 163-171.
- Farmer, M. - 1979. The transition from water to air breathing: effects of CO₂ on hemoglobin function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 109-114.
- Farmer, M.; Fyhns, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Noble, E. W. - 1979. Occurrence of Root effect hemoglobins in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 115-124.
- Finch, J.T.; Perutz, M.F.; Bertles, J.F; Döbler, J. - 1973. Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibers, *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 718-722.
- Fisher, W. K.; Nash, A. R.; Thompson, E. O. P. - 1977. Haemoglobins of the shark, *Heterodontus portusjacksoni* III. Amino acid sequence of the β -chain. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30: 487-506.
- Fixx, J. F. - 1977. The complete Book of Running. Randon House, New York, p. 77.
- Focesi, A.; Brunori, M.; Bonaventura, J.; Wilson, M. T. & Galdames Portus, M. I. - 1979. Effect of pH on the kinetics of oxygen and carbon monoxide reaction with hemoglobin from the airbreathing fish, *Loricariichthys*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 169-171.

- Fyhn, U. E. H.; Fyhn, H. J.; Davis, B. J.; Powers, D. A.; Fink, W. L.; Garlick, R. L. - 1979. Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 39-66.
- Fyhn, U. E. H.; Sullivan, B. - 1974. Hemoglobin polymorphism in fishes. I. Complex phenotypic patterns in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biochim. Genet.*, 11: 373-385.
- Galdames-Portus, M.I.; Noble, R.W.; Farmer, M.; Powers, D.A.; Riggs, A.; Brunori, M.; Fyhn, H.J.; Fyhn, U.E.H. - 1979. Studies of the Functional properties of the hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* and *Arapaima gigas*. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 145-154.
- Garlick, R. L.; Bonaventura, J.; Martin, J. P.; Powers, D. A. - 1979a. Functional studies on the single component hemoglobin from an Amazon knife fish, *Sternopygus macrurus*. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 201-206.
- Garlick, R. L.; Bunn, H. F.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Martin, J. P.; Noble, R. W.; Powers, D. A. - 1979b. Functional studies on the separated hemoglobin components of an airbreathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 219-226.
- Geoghegan, W. D. & Poluhowich, J. J. - 1974. The major erythrocytic organic phosphates of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49B: 281-290.
- Gibson, Q. H. - 1973. The contribution of the α and β chains to the kinetics of oxygen binding to and dissociation from hemoglobin, *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 1-4.
- Giles, M. A. & Vanstone, W. E. - 1976. Ontogenetic variation in the multiple hemoglobins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and effect of environmental factors on their expression. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 33:1114-1149.
- Gillen, R. G. & Riggs, A. - 1971. The hemoglobins of a fresh water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird & Girard). I. The effects of phosphorylated organic compounds upon the oxygen equilibria. *Comp. Biochem. Physiol.*, 38B: 585-595.
- - 1972. Structure and function of the hemoglobins of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 247: 6039-6046.
- - 1973a. The hemoglobins of freshwater teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird & Girard). II. 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.
- - 1977. The enhancement of the alkaline Bohr effect of some fish hemoglobins with adenosine triphosphate *Archs. Biochem. Biophys.*, 183: 678-685.
- Goodman, M.; Moore, G. M. & Matsuda, G. - 1975. Darwinian evolution in the genealogy of haemoglobin. *Nature, Lond.*, 253: 603-608.
- Greaney, G. S. & Powers, D. A. - 1978. Allosteric modifiers of fish hemoglobins: *in vitro* and *in vivo* studies of the effect of ambient oxygen and pH on erythrocyte ATP concentrations. *J. Exp. Zool.*, 203: 339-350.
- Grigg, G. G. - 1974. Respiratory functions of bloods in fishes. In: *Florkin M.; Sheer, B. J. eds. Chemical Zoology. New York, Academic Press. V. 8, p. 331-368.*
- Harris, H.; Hopkinson, D. A.; Edwards, Y. H. - 1977. Polymorphism and the subunit of enzymes: a contribution to the neutralist selectionist controversy. *Proc. natn. Sci. U.S.A.*, 74: 698-701.
- Hilse, K. & Braunitzer, G. - 1968. Die Aminosäuresequenz der α -ketten der **beidäm**

- Hauptkomponenten des Karpfenhämoglobins. *Hoppe-seyler's Z. physiol. Chem.* 349:433-450.
- Hol, W. G. J.; Van Duijzen, P. T.; Berendsen, H. J. C. - 1978. The α -helix dipole properties of proteins. *Nature, Lond.* 273: 443-446.
- Houston, A. H. & Cyr, D. - 1974. Thermoacclimatory variation in the hemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Biol.*, 61: 455-461.
- Houston, A. H. & Rupert, R. - 1976. Immediate response of the hemoglobin system of the goldfish, *Carassius auratus*, to temperature change. *Can. J. Zool.*, 54: 1737-1741.
- Ip, S. H. C.; Johnson, M. L.; Ackers, G. K. - 1976. Kinetics of deoxyhemoglobin subunit dissociation determined by haptoglobin binding: Estimation of the equilibrium constant from forward and reverse rates. *Biochemistry*, 15: 654-660.
- Isaacks, R. E.; Kim, H. D.; Bartlett, G. R.; Harkness, D. R. - 1977. Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, Pirarucu (*Arapaima gigas*). *Life Sci.*, 20: 987-990.
- Isaacks, R. E.; Kim, H. D.; Harkness, D. R. - 1978a. Relationship between phosphorylated metabolic intermediates and whole blood oxygen affinity in some air-breathing and water-breathing teleosts. *Can. J. Zool.*, 56: 887-897.
- - 1978b. Inositol diphosphate in erythrocytes of the lungfish, *Lepidosiren paradoxa*, and 2,3 - diphosphoglycerate in erythrocytes of the armored catfish, *Pterygoplichthys* sp. *Can. J. Zool.*, 56: 1014-1016.
- Johansen, K. - 1970. Air breathing in fishes. In: *Fish Physiology*, Vol. 4 (Edited by Hoar, W. S. & Randall, D. J.), pp. 361-411. Academic Press, New York.
- Johansen, K. & Lenfant, C. - 1972. A comparative approach to the adaptability of O_2 -Hb affinity. In: *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status* (Edited by Rorth, M. & Astrup, P.), pp. 750-780.
- Johansen, K.; Mangum, C. P.; Lykkeboe, G. - 1978a. Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. *Can. J. Zool.*, 56: 898-906.
- Johansen, K.; Mangum, C. P.; Weber, R. E. - 1978b. Reduced blood oxygen affinity associated with air-breathing in osteoglossid fishes. *Can. J. Zool.*, 56: 891-897.
- Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L. - 1973. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide and organic phosphates. *Physiol. Rev.*, 53: 836-890.
- Kimura, M. - 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature, Lond.* 217: 624-626.
- Kimura, M. & Ohta, T. - 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature, Lond.*, 229: 467-469.
- King, J. L. & Jukes, T. H. - 1969. Non-Darwinian evolution. *Science, N.Y.* 164:788-797.
- Kono, M. & Hashimoto, K. - 1977. Organic phosphates in the erythrocytes of fishes. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 43: 1307-1312.
- Krogh, A. & Leitch, I. - 1919. The respiratory function of the blood in fishes. *J. Physiol. Lond.*, 52: 288-300.
- Ludewig, S. & Chanutin, A. - 1964. Effect of salts and pH on the organic and inorganic phosphates in human red cell hemolysate. *Act. Biochim. pol.*, 11: 85-90.
- Lykkeboe, G. Johansen, K.; Maloij, G. M. O. - 1975. Functional properties of hemoglobin

- in the teleost, *Tilapia grahami*. *J. Comp. Physiol.*, 104: 1-11.
- Martin, J. P.; Bonaventura, J.; Brunori, M.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Garlick, R. L.; Powers, D. A. & Wilson, M. T. - 1979a. The isolation and characterization of the hemoglobin components of *Mylossoma* sp., an Amazonian teleost. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 155-162.
- Martin, J. P.; Bonaventura, J.; Brunori, M.; Garlick, R. L. & Powers, D. A. - 1979b. The Root effect hemoglobin of the Jaraqui, a teleost fish, *Prochilodus* sp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 195-200.
- Martin, J. P.; Bonaventura, J.; Fyhn, U. E. H.; Garlick, R. L. & Powers, D. A. - 1979c. Structural and functional studies of hemoglobins from Amazon stingrays of the genus *Potamotrygon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 131-138.
- Martin, J. P.; Brunori, M.; Garlick, R. L. & Powers, D. A. - 1979d. The isolation and characterization of the hemoglobin of *Brachplatystoma* sp.: a tropical catfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 213-218.
- Martin, J. P.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Garlick, R. L.; Noble, R. W.; Powers, D. A. - 1979e. The hemoglobin of *Pseudodoras*, a South American catfish: isolation characterization and ligand binding studies. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 207-212.
- McLendon, G. - 1977. A correlation between myoglobin thermodynamic stabilities and species metabolic rates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77: 959-966.
- Mied, P. A. & Powers, D. A. - 1978. Hemoglobins of the killifish *Fundulus heteroclitus*. Separation, characterization, and a model for the subunit compositions. *J. Biol. Chem.*, 253: 3521-3528.
- Mills, F. C.; Johnson, M. L.; Ackers, G. K. - 1976. Oxygenation linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. *Biochemistry*, 15: 5350-5302.
- Moffat, K. - 1974. Gelation of sickle cell hemoglobin: effects of hybrid tetramer formation in hemoglobin mixtures, *Science, N. Y.*, 185: 274-277.
- Momany, F. A.; Aguano, J. J.; Larrabee, A. R. - 1976. Correlation of degradative rates of proteins with a parameter calculated from amino acid composition and subunit size. *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.*, 73: 3093-3097.
- Monod, J.; Wyman, J.; Chandeux, J. P. - 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12: 88-118.
- Morita, F. - 1974. Molecular complex of tryptophan with ATP or its analogs. *Biochim. Biophys. Acta.*, 343: 674-681.
- Morrow, J. S.; Wittebort, R. J.; Gurd, F. R. N. - 1974. Ligand-dependent aggregation of chicken hemoglobin A₁. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60: 1058-1065.
- Mumm, D. P.; Atha, D. H.; Riggs, A. - 1978. The hemoglobins of the common sting-ray, *Dasyatis sabina*: structural and functional properties. *Comp. Biochim. Physiol.*, 60B: 189-193.
- Nash, A. R.; Fisher, W. K.; Thompson, E. O. P. - 1976. Haemoglobins of the shark, *Heterodontus portsjacksoni*: II. Amino acid sequence of the α -chain, *Aust. J. Biol. Sci.*, 29: 73-79.
- Noble, R. W.; Parkhurst, L. J.; Gibson, Q. H. - 1970. The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 245: 6628-6633.

- Ohno, S. - 1970. **Evolution by Gene Duplication**. New York, Springer-Verlag. p.124-131.
- Pennelly, R. R.; Riggs, A.; Noble, R. W. - 1978. The kinetics and equilibria of squirrelfish hemoglobin. A Root effect hemoglobin complicated by large subunit heterogeneity. **Biochim. Biophys. Acta.**, 533: 120-129.
- Pennelly, R. R.; Tan-Wilson, A. L.; Noble, R. W. - 1975. Structural states and transition of carp hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 250: 7239-7244.
- Perutz, M. F. - 1976. Structure and mechanism in hemoglobin. **Br. Med. Bull.**, 32: 195-208.
- Perutz, M. F.; Steinrauf, L. K.; Stockell, A.; Bangham, A. D. - 1959. Chemical and crystallographic study of the two fractions of adult horse haemoglobin. **J. Molec. Biol.**, 1: 402-404.
- Peterson, A. J. & Poluhowich, J. J. - 1976. The effects of organic phosphates on the oxygenation behavior of eel multiple hemoglobins. **Comp. Biochem. Physiol.**, 55A:351-354.
- Phelps, C.; Farmer, M.; Fyhn, U. E. H.; Garlick, R. L.; Nobre, R. W.; Powers, D. A. - 1979a. Equilibria and kinetics of oxygen and carbon monoxide ligand binding to the haemoglobin of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 139-144.
- Phelps, C.; Garlick, R. L.; Powers, D. A.; Noble, R. W.; Martin, J. P. - 1979b. Equilibria and kinetics of oxygen and carbon monoxide binding to the hemoglobin of the teleost, *Symbranchus marmoratus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 227-230.
- 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. - 1972a. Multiple hemoglobins of catostomid fish. I. Isolation and characterization of the isohemoglobins from *Catostomus clarkii*. **J. Biol. Chem.**, 247: 6686-6693.
- Powers, D. A. & Edmundson, A. B. - 1972b. Multiple hemoglobins of catostomid fish. II. The amino acid sequence of the major α chain from *Catostomus clarkii* hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 247: 6694-6707.
- Powers, D. A.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Martin, J. P.; Garlick, R. L.; Wood, S. C. 1979a. A comparative study of the oxygen equilibria of blood from 40 genera of Amazonian fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 67-86.
- Powers, D. A.; Martin, J. P.; Garlick, R. L.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H. - 1979b. The effect of temperature on the oxygen equilibria of fish hemoglobins in relation to environmental thermal variability. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 87-94.
- Rapoport, I.; Berger, H.; Rapoport, S. M.; Elsnér, R.; Gerber, G. - 1976. Response of the glycolysis of human erythrocytes to the transition from the oxygenated to the deoxygenated states at constant intracellular pH. **Biochim. Biophys. Acta.**, 428:193-204.
- Reichlin, M. & Davis, B. J. - 1979. Antigenic relationships among fishes common to the Amazon river basin. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 101-104.
- Richmond, R. C. - 1970. Non-Darwinian evolution: a critique. **Nature, Lond.**, 225:1025-1028.
- Riggs, A. - 1970. Properties of fish hemoglobins. In: Hoar, W. S. & Randall, D.J., eds, **Fish Physiology**. New York, Academic Press. V. 4, p. 209-252.

- 1971. Mechanism of the enhancement of the Bohr-effect in mammalian hemoglobins by diphosphoglycerate. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, 68: 2062-2065.
- 1976. Factors in the evolution of hemoglobin function. **Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.**, 35: 2115-2118.
- Riggs, A.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H.; Noble, R. W. - 1979. Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Comp. Biochim. Physiol.**, 62A: 189-194.
- Rizzotti, M.; Comparini, A.; Rodino, E. - 1977. The hemoglobins of *Anguilla anguilla* (L.) ontogenetic variations. **Comp. Biochem. Physiol.**, 58A: 173-176.
- Root, R. W. - 1931. The respiratory function of the blood of marine fishes. **Biol. Bull.**, 61: 427-456.
- Saffran, W. A. & Gibson, Q. H. - 1978. The effect of pH on carbon monoxide binding to menhaden hemoglobin. Allosteric transitions in a Root effect hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 253: 3171-3179.
- Schröder, J. H. ed. - 1973. **Genetic and Mutagenesis of fish**. New York, Springer-Verlag. 339p.
- Schulman, R. G.; Hopfield, J. J.; Ogawa, S. - 1975. Allosteric interpretation of hemoglobin properties. **Q. Rev. Biophys.**, 8: 325-420.
- Sugita, Y. & Chanutin, A. - 1963. Electrophoretic studies of red cell hemolysates supplemented with phosphorylated carbohydrate intermediates. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 112: 72-75.
- Tan, A. L.; de Young, A.; Noble, R. W. - 1972. The pH dependence of the affinity, kinetics and cooperativity of ligand binding to carp hemoglobin, *Cyprinus carpio*. **J. Biol. Chem.**, 247: 2493-2498.
- Tan, A. L. & Noble, R. W. - 1973. The effect of inositol hexaphosphate on allosteric properties of carp hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 248: 7412-7416.
- Tan, A. L.; Noble, R. W.; Gibson, Q. H. - 1973. Conditions restricting allosteric transitions in carp hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 248: 2880-2888.
- Tan-Wilson, A. L.; Reichlin, M.; Brunori, M.; Noble, R. W. - 1976. The virtual absence of antigenic cross-reactivity between functionally distinct trout hemoglobins. **Eur J. Biochem.**, 71: 125-129.
- Thomas, J. O. & Edelstein, S. J. - 1972. Observation of the dissociation of unliganded hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, 247: 7870-7874.
- 1973. Observation of the dissociation of unliganded hemoglobin. II. Effect of pH, salt and dioxane. **J. Biol. Chem.**, 248: 2901-2905.
- Torracca, A. M. V.; Raschetti, R.; Salvioli, R.; Ricciardi, G.; Winterhalter, K. H. - 1977. Modulation of the Root effect in gold fish by ATP and GTP. **Biochim. Biophys. Acta.**, 496: 367-373.
- Tsuyuki, H. & Ronald, A. P. - 1971. Molecular basis for multiplicity of Pacific salmon hemoglobins. Evidence for *in vivo* existence of molecular species with up to four polypeptides. **Comp. Biochim. Physiol.**, 39B: 503-522.
- van Vuren, J. H. J. & Fourie, F. Le R. - 1976. A seasonal study on the hemoglobins of carp (*Cyprinus carpio*) and yellowfish (*Barbus holului*) in South Africa. **Comp. Biochem. Physiol.**, 55B: 523-525.

- Watt, K. W. K. & Riggs, A. - 1975. Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Biol. Chem.*, 250: 5934-5944.
- Weber, R. E.; Lykkeboe, G.; Johansen, K. - 1976a. Physiological properties of eel hemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity: *J. exp. Biol.*, 64: 75-88.
- Weber, R. E.; Sullivan, B.; Bonaventura, J.; Bonaventura, C. - 1976. The hemoglobin system primitive fish, *Amia calvia*: isolation and functional characterization of individual hemoglobin components. *Biochem. Biophys. Acta.*, 434: 18-31.
- Weber, R. E. & Wood, S. C. - 1979. Effects of erythrocyte nucleoside triphosphates on oxygen equilibria of composite and fractionated hemoglobins from the facultative air-breathing Amazonian catfish, *Hypostomus* and *Pterygoplichthys*. *Comp. Biochim. Physiol.*, 62A: 179-184.
- Weber, R. E.; Wood, S. C.; Davis, J. B. - 1979. Acclimation to hypoxic water in facultative air-breathing fish: blood oxygen affinity and allosteric effectors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 125-130.
- Weber, R. E.; Wood, S. C.; Lombolt, J. P. - 1976c. Temperature acclimation and oxygen-binding properties of blood and multiple hemoglobins of rainbow trout. *J. exp. Biol.*, 65: 333-345.
- Wilkins, N. P. - 1968. Multiple hemoglobins of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Bd Can.* 25, 2651-2653.
- - 1970. The subunit composition of the hemoglobins of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 214: 52-63.
- - 1972a. Biochemical genetics of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). I. A review of recent studies. *J. Fish. Biol.*, 4: 487-504.
- - 1972b. Biochemical genetics of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). II. The significance of recent studies and their application in population identification. *J. Fish. Biol.*, 4: 505-517.
- Willmer, E. N. - 1934. Some observations on the respiration of certain tropical freshwater fishes. *J. exp. Biol.*, 11: 283-306.
- Wilson, A. C.; Carlson, S. S.; White, T. J. - 1977. Biochemical evolution. A. *Rev. Biochem.*, 46: 573-639.
- Wittenberg, J. B. & Haedrich, R. L. - 1974. The choroid rete mirabile of the fish eye. II. Distribution and relation to the pseudobranch and to the swimbladder rete mirabile. *Biol. Bull.*, 146: 137-156.
- Wittenberg, J. B. & Wittenberg, B. A. - 1974. The choroid rete mirabile of the fish eye. I. Oxygen secretion and structure: comparison with the swimbladder, rete mirabile. *Biol. Bull.*, 146: 116-136.
- Wood, S. C. & Johansen, K. - 1972. Adaptation to hypoxia by increased HbO₂ affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature. New Biol.*, 237: 278-279.
- Wood, S. C.; Johansen, K.; Weber, R. E. - 1975. Effects of ambient PO₂ on hemoglobin oxygen affinity and red cell ATP concentration in a benthic fish, *Pleuronectes platessa*. *Resp. Physiol.*, 25: 259-267.
- Wood, S. C.; Weber, R. E.; Davis, B. J. - 1979a. Effects of air-breathing on acid-base balance in the catfish, *Hypostomus* sp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 185-186.
- Wood, S. C.; Weber, R. E.; Powers, D. A. - 1979b. Respiratory properties of blood and

hemoglobins solutions from the piranha. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62A: 163-168.

Wyman, J. - 1948. Heme proteins. **Adv. Protein Chem.**, 4: 407-531.

---- - 1964. Linked functions and reciprocal effects: a second look. **Adv. Protein Chem.**, 19: 223-286.

Wyman, J.; Gill, S. J.; Noll, L.; Giardina, B.; Colosimo, A.; Brunori, M. - 1977. The balance sheet of the hemoglobin. Thermodynamics of CO binding by hemoglobin trout I. **J. molec. Biol.**, 109: 195-205.

(Aceito para publicação em 31.10.1984)