

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE PEIXES AMAZÔNICOS. IV. PADRÕES ELETOFORÉTICOS DE HEMOGLOBINAS DE 22 ESPÉCIES COLETADAS NA ILHA DA MARCHANTARIA (MANAUS - AM).

Adalberto Luís Val (*)

Vera Maria Fonseca de Almeida-Val (*)

Plínio José Cavalcante Monteiro (**)

RESUMO

Foram estudados hemolisados de 22 espécies de peixes coletados na Ilha da Marchantaria (rio Solimões, Manaus - AM), através de eletroforeses em gel de amido e gel de agar-amido. Uma grande heterogeneidade hemoglobínica interespecífica foi detectada, a exemplo do observado para espécies de zona subtropical e temperada. A capacidade de resolução de dois suportes eletroforéticos é discutida. Os resultados são discutidos em função da possível adaptabilidade conferida pelos sistemas de múltiplas hemoglobinas.

INTRODUÇÃO

A multiplicidade e o polimorfismo de enzimas e hemoglobinas é um fato bem estabelecido em populações naturais (Fyhn et al., 1979; Val, 1983; Panepucci et al., 1984). Essa variabilidade tem sido objeto de muita especulação com pontos de vista contrários e muitas teorias diferentes que questionam a neutralidade ou a adaptabilidade que os sistemas múltiplos e/ou polimórficos podem conferir às espécies (Kimura, 1968; Wilson et al., 1977).

Reichlin & Davis (1979), durante a expedição científica do R/V Alpha Helix, descobriram que as hemoglobinas de várias espécies de peixes amazônicos reagem com o anti-soro da hemoglobina I de carpa e hemoglobina I de truta, mas nem todos reagem com o anti-soro de hemoglobina IV de truta. Uma vez que as propriedades antigênicas refletem características superficiais da molécula, é possível que boa parte da estrutura superficial dessas moléculas seja comum.

Em função da grande multiplicidade de componentes hemoglobínicos detectada entre os peixes, Powers (1974) sugeriu o uso do termo **isohemoglobinas** para aquelas codificadas

(*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Departamento de Biologia Aquática e Limnologia. Estrada do Aleixo, 1756, cep 69 000, Manaus - AM.

(**) Bolsistas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Estrada do Aleixo, 1756, cep 69 000, Manaus - AM.

em locos diferentes e alohemoglobinas para aquelas codificadas em alelos diferentes, analogamente à terminologia utilizada para enzimas.

A adaptabilidade conferida pelos sistemas múltiplos tem sido estudada através da determinação das propriedades funcionais dos componentes hemoglobínicos isolados. Em função de resultados obtidos dessa forma, Bonaventura et al. (1975) e Weber et al. (1976) propuseram que os hemolisados dos peixes fossem distribuídos em 3 classes, a saber: classe I - hemolisados cujas hemoglobinas são sensíveis a mudanças de pH, com propriedades semelhantes, mas não obrigatoriamente idênticas; classe II - hemolisados com hemoglobinas possuindo propriedades funcionais distintas e, classe III, onde está situada a hemoglobina do atum, sensível ao pH mas completamente insensível a mudanças de temperatura.

O estudo das hemoglobinas dos peixes amazônicos têm revelado que a grande maioria delas está inserida na classe II, o que nos leva a supor que os sistemas de hemoglobinas múltiplas se constituem numa importante estratégia adaptativa, para essas espécies uma vez que elas estão submetidas a importantes variações não só sazonais como também espaciais.

Em função da grande variabilidade interespecífica com relação ao número de componentes hemoglobínicos torna-se muito importante sua análise, principalmente em espécies que ocupam regiões ímpares, como é o caso da Amazônia. Esse trabalho refere-se às nossas observações com material obtido durante uma coleta piloto na Ilha da Marchantaria, para determinação das espécies a serem estudadas num projeto mais amplo, no qual foram realizadas coletas periódicas de um menor número de espécies com o objetivo de avaliar as estratégias adaptativas desenvolvidas por essas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Com auxílio de seringas heparinizadas obtivemos amostras de sangue da veia caudal de 234 exemplares de peixes coletados em setembro de 1983, na Ilha da Marchantaria, no rio Solimões, próximo a Manaus (Tabela I). O plasma de cada amostra foi descartado e os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina isotônica (0,9%). Após seu congelamento e transporte para o laboratório, os eritrócitos foram hemolisados com Tris 1mM, pH 8,0 (Tris(hidroxi)metilaminometano). Os restos celulares foram descartados após centrifugação a 15.000g numa centrífuga SORVALL RC-5B, a 4°C. As amostras que não foram imediatamente utilizadas foram congeladas a -20°C.

Dois sistemas eletroforéticos foram utilizados: a) gel de amido como descrito por Smithies (1955, 1959), utilizando amido de milho, obtido segundo Val et al. (1981). Tampão tris-borato-EDTA ácido 0,036M, pH 8,6 (tris 0,9M; ácido bórico 0,5M e ácido etileno diaminotetracético 0,02M, diluído 40 vezes) foi utilizado na preparação do gel e borato 0,35M pH 8,6 nas cubas. Ao gel e às amostras foi adicionado KCN sendo aplicados 5V/cm, durante 6 horas, através de uma fonte de tensão PHARMACIA EPS 500/400. O gel foi mantido a 4°C durante a separação; b) gel de agar-amido, segundo metodologia descrita por Araújo et al. (1970), modificada por Machado (1973), aplicando-se 2,5 mA em cada lâmina. O

sistema de tampões foi o mesmo utilizado em gel de amido, com exceção do borato que foi diluído 10 vezes. As eletroforeses em gel de ágar-amido também foram realizadas a 4°C, com KCN no gel. Eletroforeses adicionando-se β-mercaptoetanol foram feitas para verificar-se a possível existência de polimerizações entre as moléculas de hemoglobina.

As lâminas de ágar-amido foram coradas com Amido Black 10B e descoradas com solução acética a 5%. As placas de gel de amido eram seccionadas no sentido horizontal, sendo uma parte revelada com Benzidina e a outra com Amido Black 10B.

RESULTADOS

A Tabela I apresenta a lista de espécies estudadas, a amplitude de peso total (g) e comprimento padrão (mm), o número de exemplares estudados de cada espécie e o número de componentes hemoglobínicos detectados nos dois meios de migração eletroforética.

As Figuras 1, 2 e 3 mostram, esquematicamente, os padrões de hemoglobinas obtidos em gel de amido para todas as espécies estudadas. Com exceção das duas espécies do gênero *Mylossoma*, todas apresentaram padrões que, dentro da amplitude de peso e comprimento analisados, podem ser utilizados para diferenciá-las. Nenhuma espécie analisada apresentou apenas um componente eletroforético.

Os dois meios de migração apresentaram diferenças quanto ao número de componentes eletroforéticos. O número de componentes eletroforéticos detectados em gel de amido foi sempre igual ou maior do que aquele detectado em gel de ágar-amido para uma mesma espécie.

A Figura 4 apresenta uma comparação esquemática entre os dois extremos encontrados quanto ao número de componentes separados nos dois meios de migração: um em que o número de componentes é igual tanto em gel de amido como em lâminas de ágar-amido e, outro, em que há uma grande redução do número de componentes separados em lâminas de ágar-amido.

Não foi observada nenhuma diferença no número de frações obtidas com a adição de KCN ou de β-mercaptoetanol para nenhuma espécie.

DISCUSSÃO

A hemoglobina tem sido uma das proteínas mais bem estudadas. Isso decorre do fato dessa proteína estar situada na interface organismo-ambiente devendo, portanto, responder tanto às pressões ambientais quanto às pressões intra-corpóreas. Sob esse ponto de vista os peixes se constituem num dos grupos mais bem estudados (Powers, 1974; Reischl, 1976; Riggs, 1979; Almeida-Val, 1982; Val, 1983; Val et al., 1984).

Hemoglobinas múltiplas têm sido uma constatação comum entre os peixes. Fyhn et al. (1979) estudando 96 espécies pertencentes a 28 famílias de peixes amazônicos, através de eletroforeses em gel de poliacrilamida, constataram que apenas 8% das espécies possuíam fenótipos com um só componente. Galdames-Portus et al. (1982) ao estudarem 25 espécies

da ordem Siluriformes da Amazônia, também através de eletroforeses em gel de poliacrilamida, encontraram uma média de 2,52 componentes para o grupo.

Riggs (1970) afirma que o suporte eletroforético assim como o sistema de tampões utilizados podem levar a uma variação no número de componentes eletroforéticos. No presente trabalho o problema de tampões foi minimizado com o uso do mesmo sistema nos dois suportes (gel de amido e gel de ágar-amido). Com relação aos suportes utilizados, a Figura 4 comprova tal fato, evidenciando ainda que o gel de ágar-amido parece ter um menor poder de resolução, em relação ao gel de amido, quanto maior for o número de componentes hemoglobínicos (Tabela 1). O mesmo parece ocorrer em relação ao gel de poliacrilamida, como podemos observar ao compararmos os padrões aqui obtidos aos apresentados por Fyhn et al. (1979).

No trabalho de Fyhn et al. (1979) os siluriformes apresentaram uma média de 3,2 componentes, valor não muito diferente do obtido por Galdames-Portus et al. (1982), nem do obtido no presente trabalho. Essa comparação é possível dada à pequena complexidade dos padrões apresentados por esse grupo. De qualquer forma, a ordem Siluriformes parece possuir um número médio de componentes menor que as demais ordens estudadas, excetuando-se a espécie *P. multiradiatus* que apresentou 11 componentes em gel de amido.

As espécies da ordem Characiformes apresentaram uma média de 5,20 frações, valor superior ao encontrado por Fyhn e seus colaboradores. Tal diferença pode ser atribuída a diferenças no poder de resolução dos suportes utilizados (gel de amido e gel de ágar-amido). Fato semelhante também foi observado com relação à espécie *O. bicirrhosum* e as espécies da ordem Perciformes.

M. aureum e *M. duriventris* apresentaram o mesmo padrão eletroforético para suas hemoglobinas (Figura 1). Isso pode ocorrer dada à proximidade filogenética entre essas espécies e a semelhança do ambiente em que vivem. Porém Fyhn et al. (1979) encontraram dois padrões para a espécie *Mylossoma* sp., que denominaram de fenótipo I e fenótipo I variante, coletados no rio Solimões e na saída do lago Janauacá, respectivamente. Uma vez que nessa área ocorrem as duas espécies (*M. duriventris* e *M. aureum*), diversas suposições podem ser feitas, dentre elas a de uma possível variação espacial ou temporal.

Um aspecto importante a ser considerado é o possível uso de padrões eletroforéticos de proteínas, como um caráter fenotípico, no auxílio a sistemática, caráter esse que vem sendo subutilizado em relação às características clássicas (Eldredge & Cracraft, 1980). No que tange ao uso dos padrões de hemoglobina, deve-se levar em consideração que esta proteína está sob forte pressão ambiental e pode sofrer variações quali/quantitativas conforme época e/ou local de coleta (Houston & Cyr, 1974; Fourie & Van Vuren, 1976; Van Vuren & Hatting, 1978; Val, 1983; Val et al., 1984), além de possíveis variações ontogenéticas (Wilkens & Iles, 1966; Iuchi, 1973).

Os hemolisados das espécies aqui estudadas apresentaram separações características para as amplitudes de peso e comprimento analisados, revelando, portanto, que há bons indícios para que essa proteína possa servir como marcador bioquímico em nível interespecífico.

Fink & Fink (1981) através da análise de 127 caracteres propuseram que os Gymnotoidei

e os Siluroidei sejam colocados numa mesma ordem, localizando os *Characiformes* em outra. Compilando os dados da literatura com relação ao número de frações de hemoglobinas suspeita-se que essas possam servir como mais um parâmetro a reforçar aquela proposição.

De qualquer forma, o presente trabalho também mostra uma grande heterogeneidade eletroforética para as hemoglobinas de peixes da Amazônia. Alguns autores têm demonstrado que os diferentes componentes hemoglobínicos de uma mesma espécie possuem propriedade funcionais distintas incluindo-se espécies amazônicas (Powers & Edmundson, 1972; Powers, 1974; Johansen & Weber, 1976; Sullivan, 1977; Powers et al., 1979). Essa multiplicidade de componentes pode, por isso, ser vista como uma possível estratégia de adaptação às oscilações ambientais, às quais os peixes estão submetidos, através em um efetivo controle da concentração relativa dos diversos componentes segundo necessidades fisiológicas e condições do meio. Esse fato nos leva a indagar sobre a grande variação interespecífica do número de frações hemoglobínicas (Tabela I do presente trabalho, Fyhn et al., 1979; Galdames-Portus et al., 1981), uma vez que as espécies estudadas estavam submetidas ao mesmo regime de oscilação ambiental.

Sob esse aspecto devemos observar que a multiplicidade de componentes é apenas uma das inúmeras estratégias de adaptação à tomada de oxigênio do meio ambiente. Além disso, é possível que nem todas as frações hemoglobínicas de sistemas múltiplos possuam propriedades funcionais distintas mas tenham sido conservadas para manter a solubilidade do sistema (Riggs, 1979). Essas observações não implicam que a existência de múltiplos componentes seja exclusivo, isto é, que a sua existência concorra para a não existência de outros processos adaptativos. Deve-se considerar o aspecto energético que comanda, na realidade, a seleção do melhor conjunto de processos com o objetivo de tornar o menos dispendioso possível, a tomada de oxigênio do meio ambiente, seu transporte e sua liberação para os tecidos.

Dessa forma, é possível encontrar-se uma grande variação interespecífica no número de componentes hemoglobínicos em espécies que vivem num mesmo ecossistema, apesar da multiplicidade de componentes possuir um caráter adaptativo.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Geraldo Mendes dos Santos, Francisco Martinho Carvalho e Michel Jégu por terem prontamente identificados os exemplares aqui estudados. Os autores também são gratos à SDC/CNPq e SUDAM/POLAMAZÔNIA, pelo apoio financeiro à realização do presente trabalho.

SUMMARY

The hemoglobin patterns of hemolysates from 22 fish species belonging to Marchantia island (Solimões river, Manaus, AM) had been characterized by starch gel and agar-

Aspectos biológicos de peixes ...

starch gel electrophoresis. High interspecific hemoglobin heterogeneity was observed, similarly to those described for sub-tropical and temperate fish species. The resolution power of the electrophoretic supports was considered. The adaptability question of the multiple hemoglobin systems was regarded.

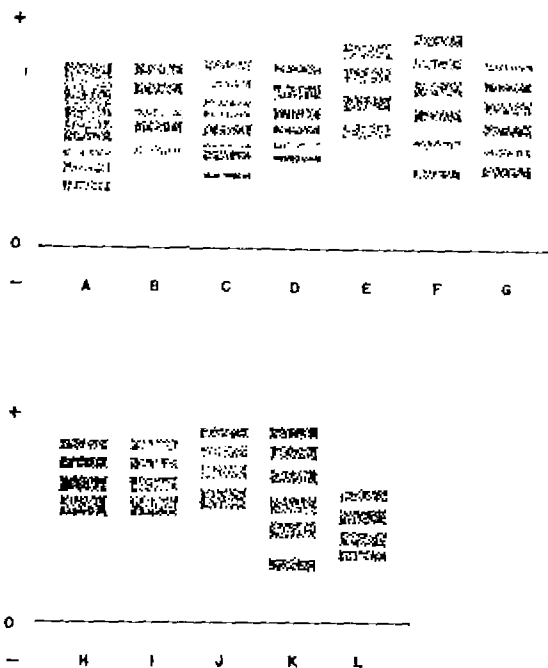


Fig. 1. Representação esquemática dos padrões de hemoglobinas obtidos em gel de amido para *Hoplias malabaricus* (A); *Schizodon fasciatus* (B); *Leporinus fasciatus* (C); *Rhytiodus microlepis* (D); *Prochilodus nigricans* (E); *Curimata laticeps* (F); *Curimata rhomboides* (G); *Mylossoma duriventris* (H); *Milossoma aureum* (I); *Piaractus brachipomus* (J); *Colossoma macropomum* (K); *Raphiodon vulpinus* (L).

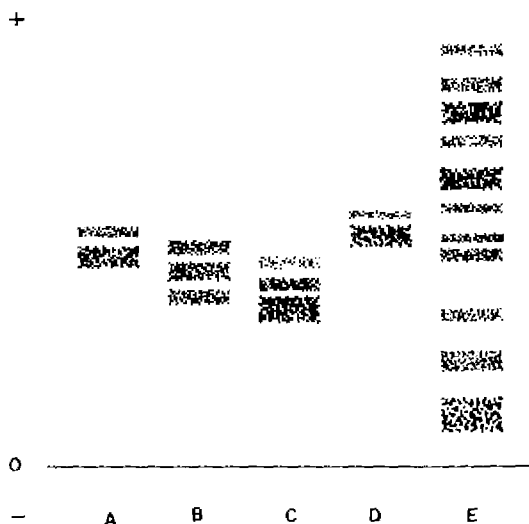


Fig. 2. Representação esquemática dos padrões de hemoglobinas em gel de amido para *Ageneiosus brevifilis* (A); *Sorubim lima* (B); *Callophysus macropterus* (C); *Pseudoplatystoma tigrinum* (D) e *Pterygoplichthys multiradiatus* (E).

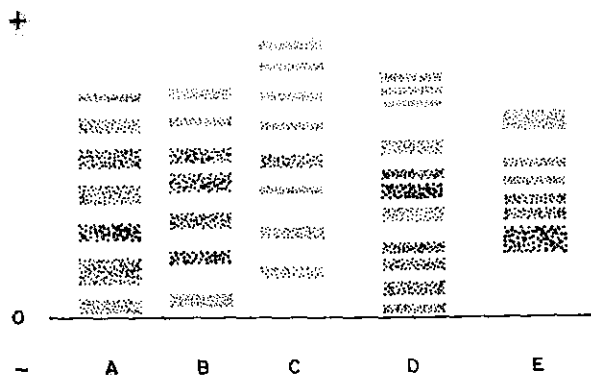


Fig. 3. Representação esquemática dos padrões de hemoglobinas obtidos em gel de amido para *Astronotus ocellatus* (A); *Cichla ocellaris* (B); *Chaetobranchopsis orbicularis* (C); *Plagioscion* sp. (D); *Osteoglossum bicirrhosum* (E).

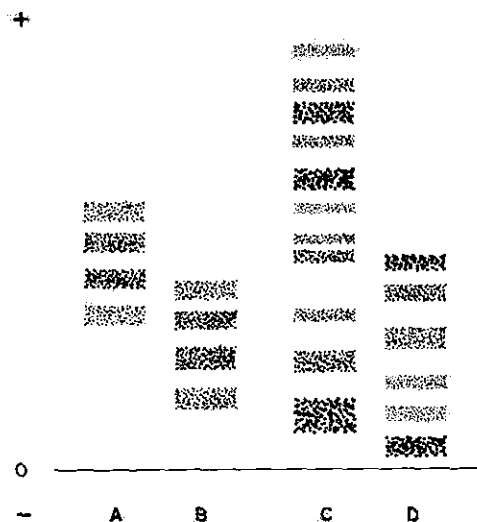


Fig. 4. Representação esquemática dos padrões de hemoglobinas obtidos em gel de amido (A e C) e em lâminas de ágar-amido (B e D) para *Prochilodus nigricans* (A e B) e para *Pterygoplichthys multiradiatus* (C e D).

Tabela 1. Relação das espécies estudadas com indicação da amplitude de peso total, comprimento padrão, número de exemplares, número de frações de hemoglobinas em gel de amido e em gel de ágar-amido.

ESPÉCIE/ORDEM/FAMÍLIA	Peso Total (g)	Comprimento Padrão (mm)	Número de Exemplares	Número de Frações Gel de amido	Número de Frações ágar-amido
<i>Ageneiosus brevifilis</i> (Siluriformes: Ageneiosidae)	271-553	233-279	9	2	2
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (Siluriformes: Pimelodidae)	823	445	1	2	2
<i>Sorubim lima</i> (Siluriformes: Pimelodidae)	-	226-279	12	3	3
<i>Callophysus macropterus</i> (Siluriformes: Pimelodidae)	525-670	322-355	8	3	3
<i>Prochilodus nigricans</i> (Characiformes: Prochilodontidae)	180-726	183-282	28	4	4
<i>Mylossoma duriventris</i> (Characiformes: Serrasalminidae)	51-232	97-191	28	4	4
<i>Mylossoma aureum</i> (Characiformes: Serrasalminidae)	-	-	6	4	4
<i>Piaractus brachipomus</i> (Characiformes: Serrasalminidae)	29-305	89-195	10	4	3
<i>Raphiodon vulpinus</i> (Characiformes: Characidae)	-	257-266	6	4	4
<i>Schizodon fasciatus</i> (Characiformes: Anostomidae)	-	138-193	5	5	5
<i>Rhytiodus microlepis</i> (Characiformes: Anostomidae)	-	190-254	2	6	5
<i>Curimata laticeps</i> (Characiformes: Characidae)	-	136-150	10	6	5
<i>Curimata rhomboides</i> (Characiformes: Curimatidae)	-	135-165	5	6	6
<i>Colossoma macropomum</i> (Characiformes: Serrasalminidae)	92-1935	103-450	25	6	5
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (Osteoglossiformes: Osteoglossidae)	480-699	380-430	15	6	2
<i>Hoplias malabaricus</i> (Characiformes: Erythrinidae)	276-930	225-380	5	*	5
<i>Astronotus ocellatus</i> (Perciformes: Cichlidae)	235-307	169-195	9	7	7
<i>Cichla ocellaris</i> (Perciformes: Cichlidae)	279-394	230-256	13	7	6
<i>Leporinus fasciatus</i> (Characiformes: Anostomidae)	-	149-160	2	8	6
<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i> (Perciformes: Cichlidae)	-	80-140	4	8	8
<i>Pterygoplichthys multiradiatus</i> (Siluriformes: Loricariidae)	160-430	173-275	25	11	6
<i>Plagioscion</i> sp. (Perciformes: Scianidae)	314-403	236-264	6	11	**

(*) Indefinido, possivelmente sete frações.

(**) Indefinido.

Referências bibliográficas

- Almeida-Val, V. M. F. - 1982. Aspectos estruturais e funcionais de hemoglobinas(Hb) de 7 espécies de peixes pertencentes à família Anostomidae (Cypriniformes:Characoidei). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 245 p.
- Araújo, J. T.; Toledo Filho, S. A.; Merino, M. M. S. S. - 1970. Aplicação de eletroforese em gel de amido-ágar para a identificação de hemoglobinas humanas. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 1-2: 67-69.
- Bonaventura, J.; Bonaventura, C.; Sullivan, B. - 1975. Hemoglobins and hemocyanins; comparative aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.*, 194: 155-174.
- Eldredge, N. & Cracraft, J. - 1980. Phylogenetic patterns and evolutionary process. New York. Columbia University Pres. 349 p.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. - 1981. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc.*, 72(4): 297-358.
- Fourie, F. R. & Van Vuren, J. H. J. - 1976. A seasonal study on the hemoglobins of carp (*Cyprinus carpio*) and yellow fish (*Barbus holubi*) in South America Africa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B: 523-525.
- 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. Biochem. Physiol.*, 62A:39-66.
- Galdames-Portus, M. T.; Donald, E. L.; Focesi Jr., A. - 1982. Hemoglobinas em silurídeos da Amazônia Central: I. Análise eletroforética dos hemolisados. *Acta Amazônica*, 12(4): 707-711.
- Houston, A. H. & Cyr, D. - 1974. Thermoacclimatory variation in the hemoglobin system of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zool.*, 61: 455-461.
- Iuchi, I. - 1973. Ontogenetic expression of larval and adult hemoglobin phenotypes in the intergeneric salmonids hybrids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 1087-1101.
- Johansen, K. & Weber, R. E. - 1976. On the adaptability of hemoglobin function to environmental conditions. In: *Perspectives in Experimental Biology, vol.1, Zoology*. Davies, P. S. ed., 210-234.
- Kimura, M. - 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature, Lond.*, 217:624-626.
- Machado, P. E. A. - 1973. Estudo de hemoglobina A₁, A₂ e S em ciclêmicos e não ciclêmicos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu. Botucatu.
- Panepucci, L. L. L.; Schwantes, M. L. B.; Schwantes, A. R. - 1984. Loci that encode the lactate dehydrogenase in 23 species of fish belonging to the orders Cypriniformes, Siluriformes and Perciformes: Adaptative features. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B:867-876.
- Powers, D. A. - 1974. Structure, function and molecular ecology of fish hemoglobins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 241: 472-490.
- Powers, D. A. & Edmundson, A. B. - 1972. Multiple hemoglobins of Catostomid fish. I. Isolation and characterization of the isohemoglobins from *Catostomus clarekii*. *J. Biol. Chem.*, 247: 6686-6693.
- Powers, D. A.; Martin, J. P.; Garlick, R. L.; Fyhn, H. J.; Fyhn, U. E. H. - 1979. The effect of temperature on the oxygen equilibria of fish hemoglobins in relation to
- Aspectos biológicos de peixes ...

- environmental thermal variability. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 87-94.
- Reichlin, M. & Davis, B. J. - 1979. Antigenic relationships among fishes common to the Amazon river basin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 101-104.
- Reischl, E. - 1976. The hemoglobins of fresh-water teleost *Hoplias malabarica* (Bloch, 1794): Heterogeneity and polymerization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B: 255-257.
- Riggs, A. - 1970. Properties of fish hemoglobins. In: **Fish Physiology**. W. S. Hoar & D. J. Randall ed. vol. IV. New York, Academic Press.
- Riggs, A. - 1979. Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: an overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 257-272.
- Smithies, O. - 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61: 629-641.
- Smithies, O. - 1959. An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem. J.*, 71: 585-587.
- Sullivan, B. - 1977. Hemoglobin variation and its significance in fish. US-USSR Workshop on Physiology and Biochemistry of Aquatic Animals. Georgetown, SC, November, 1977.
- Val, A. L. - 1983. Aspectos estruturais e funcionais de hemoglobinas de espécies do gênero *Semaprochilodus* (Prochilodontidae) do rio Negro, AM, Brasil. Dissertação de Mestrado, INPA/FUA.
- Val, A. L.; Schwantes, A. R.; Schwantes, M. L. B.; de Luca, P. H. - 1981. Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. *Cienc. Cult.*, 33(7): 992-996.
- Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Schwantes, A. R.; Schwantes, M. L. B. - 1984. Biological aspects of Amazonian fishes. I. Red blood cell phosphates of schooling fishes (Genus *Semaprochilodus*-Prochilodontidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B(1): 215-217.
- Van Vuren, J. B. J. & Hattingh, J. - 1978. A seasonal study of the hematology of wild freshwater fish. *J. Fish. Biol.*, 13: 305-315.
- Weber, R. E.; Sullivan, B.; Bonaventura, J.; Bonaventura, C. - 1976. The hemoglobin system of the primitive fish *Amia calva*: isolation and functional characterization of the individual components. *Biochem. Biophys. Acta.*, 434: 18-31.
- Wilkins, N. P. & Iles, T. D. - 1966. Hemoglobin polymorphism and its ontogeny in herring (*Clupea harengus*) and sprat (*Sprattus sprattus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 17: 1141-1158.
- Wilson, A. C.; Carlson, S. S.; White, T. J. - 1977. Biochemical evolution. **A. Rev. Biochem.**, 46: 573-639.

(Aceito para publicação em 08.07.1986)