

SECRETARIA DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

ESTUDO SAZONAL DE CARACTERÍSTICAS
RESPIRATÓRIAS DO SANGUE DE HOPLOSTERNUM
LITTORALE (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE)
DA ILHA DA MARCHANTARIA, AMAZONAS.

ELIZABETH GUSMÃO AFFONSO¹

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do INPA como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
Concentração: Biologia de Água Doce e
Pesca Interior.

Orientador: Dr. Adalberto Luís Val

¹Pesquisadora do Departamento de Biologia Aquática, INPA.

MANAUS - AM

1990

m/m
074.929.
A257e

Ao meu pai, Argemiro

À minha mãe, Lucila

À minha filha, Alessandra

FICHA BIBLIOGRÁFICA

AFFONSO, E.G. (1990) Estudo sazonal de características respiratórias do sangue de *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) da ilha da Marchantaria, Amazonas. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação do INPA. 87p.

Palavras chaves: adaptação bioquímica, *Hoplosternum littorale*, peixes, bacia amazônica, sangue, hematologia, fosfatos eritrocitários, efeito Bohr, hemoglobina.

SINOPSE

O trabalho apresenta as análises dos parâmetros hematológicos (série vermelha), das hemoglobinas detectadas eletroforeticamente em gel de amido e gel de ágar-amido, dos fosfatos eritrocitários e do efeito Bohr do sangue de *Hoplosternum littorale* capturados na ilha da Marchantaria no período de 1 ano. Esses parâmetros foram testados contra os fatores ambientais medidos (O_2 dissolvido, temperatura e nível da água). Pelos resultados obtidos, supõe-se que *Hoplosternum littorale* utiliza-se além da respiração aérea, de adaptações em nível molecular para se haver com as flutuações ambientais.

AGRADECIMENTOS

. Ao Dr. Adalberto Luís Val, meu orientador, não somente pelos ensinamentos desde o início da minha carreira, como também pelo incentivo, confiança, dedicação e amizade durante todo o tempo que temos trabalhado juntos.

. À Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val pelo carinho, amizade, incentivo e contribuição para minha formação.

. Ao Roberto Huet de Salvo Souza pelo companheirismo e contribuição em todas as etapas deste trabalho.

. À Nazaré Paula da Silva cujo respeito por este e outros trabalhos do laboratório a faz sempre presente.

. Ao Alberto Graça Lopes Peixoto Neto pelo companheirismo e ajuda na fase inicial deste trabalho.

. A todos os bolsistas, alunos e estagiários do laboratório de Genética e Evolução de Peixes que além de tornarem sempre agradável o nosso ambiente de trabalho, proporcionam uma visão da importância do trabalho em grupo.

. Aos amigos e colegas de trabalho do laboratório de Genética e Evolução de Peixes pelo constante apoio e incentivo na realização deste trabalho.

. Aos colegas e professores de pós-graduação pelo convívio e aprendizagem durante o curso.

. Aos senhores membros da Comissão Julgadora, Profs. Drs. Evaldo Reischl, Vera Maria Fonseca de Almeida e Val, José Eduardo Bicudo e Ulrich Saint-Paul, pelas valiosas contribuições.

. Ao Programa de Pós-Graduação do INPA por esta oportunidade.

. Ao Departamento de Biologia Aquática e à Divisão de Ictiologia e Mamíferos Aquáticos que através do Setor de Apoio viabilizaram a coleta do material aqui utilizado.

. Ao CNPq pela bolsa concedida.

. Ao INPA e ao CNPq pelo suporte financeiro a este trabalho.

. Aos pescadores e à tripulação do barco Uiara que tornaram possível a coleta dos peixes estudados.

. À minha família pelo incentivo, apoio e compreensão durante esse período de minha vida.

SEASONAL STUDY ON BLOOD RESPIRATORY CHARACTERISTICS OF
HOPLOSTERNUM LITTORALE (SILURIFORMES, CALLICHTHYIDAE) FROM
MARCHANTARIA ISLAND, AMAZONAS.

ABSTRACT

1. The present work describes hematological parameters (red-series), hemoglobin electrophoretic patterns, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Hoplosternum littorale* specimens caught at different seasons of the year.

2. The hematological parameters (red blood cell number, hematocrit, hemoglobin concentration, MCV, MCHC, and MCH) showed changes during the collecting period which could not be related with water oxygen concentration, water temperature, and water level oscillations.

3. GTP, Fe-GTP, ATP, and 2,3DPG were detected in the erythrocytes of *H. littorale* presenting all of them quantitative variations. 2,3DPG, even when found in low quantities, seems to be an important modulator of Hb-O₂ affinity, since its concentrations were related to the variation of water temperature and whole blood Bohr effect.

4. Five anodic hemoglobin fractions were detected in starch gel electrophoresis, and two fractions were detected in agar starch slices. The greater number of hemoglobin fractions found in the starch gel probably is caused by epigenetic features.

5. Besides air-breathing, *H. littorale* uses adaptative strategies at the molecular level to endure environmental changes.

RESUMO

No presente trabalho foram estudados aspectos relacionados à respiração em nível molecular de *Hoplosternum littorale*. A espécie apresentou variação sazonal dos parâmetros hematológicos (série vermelha), que não pôde ser relacionada com os fatores ambientais considerados. Por meio de cromatografia de troca iônica detectou-se a presença de 2,3DPG nessa espécie, um composto eritrocitário característico de mamíferos. Supõe-se que o efeito desse fosfato sobre a afinidade Hb-O₂ esteja relacionado com o aumento da temperatura. Além de 2,3DPG, outros fosfatos orgânicos como Fe-GTP, GTP e ATP apresentaram variações quantitativas nas diferentes coletas. As variações nos valores de efeito Bohr do sangue mostraram também correlação com as variações de temperatura e, pelas relações 2,3DPG/∅ e 2,3DPG:Hb/∅, verifica-se que o aumento de 2,3DPG diminui a afinidade Hb-O₂ em temperaturas mais altas. As análises eletroforéticas revelaram a presença de 5 frações hemoglobínicas em gel de amido e 2 frações em gel de ágar-amido; tais diferenças devem-se aos meios utilizados e acredita-se que as frações secundárias detectadas em gel de amido não sejam componentes hemoglobínicos de natureza genética.

Além da espécie *H. littorale* valer-se da respiração aérea, é capaz de regular adaptativamente a concentração de seus fosfatos eritrocitários, os seus parâmetros hematológicos (série vermelha) e o efeito Bohr de seu sangue, de acordo com as oscilações ambientais da temperatura e do nível de água.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais sobre adaptação e respiração.. em peixes.....	1
1.1.1. Variação dos parâmetros hematológicos.....	4
1.1.2. Variação na concentração dos fosfatos eritrocitários.....	4
1.1.3. Multiplicidade de componentes hemoglobínicos.....	6
1.2. O ambiente várzea.....	8
1.3. A espécie <i>Hoplosternum littorale</i>	10
1.4. Objetivos.....	12
2. Material e Métodos.....	14
2.1. Material biológico.....	14
2.1.1. Coleta de sangue.....	14
2.2. Métodos.....	15
2.2.1. Hematologia.....	15
2.2.2. Fosfatos eritrocitários.....	17
2.2.2.1. Identificação do 2,3-DPG.....	19
2.2.3. Equilíbrio de oxigenação de sangue.....	19
2.2.4. Eletroforese.....	21
2.2.5. Oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água.....	22
2.2.6. Análises estatísticas.....	23

3. Resultados.....	24
3.1. Oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água....	24
3.2. Hematologia (série vermelha).....	24
3.3. Fosfatos eritrocitários.....	29
3.4. Equilíbrio de oxigenação de sangue.....	34
3.5. Eletroforese em gel de amido e em gel de ágar amido.....	42
4. Discussão.....	44
4.1. Hemoglobinas: heterogeneidade eletroforética.....	44
4.2. Hematologia.....	48
4.3. Fosfatos eritrocitários.....	54
4.4. Equilíbrio de oxigenação de sangue.....	66
4.5. Conclusões.....	74
5. Perspectivas futuras.....	76
6. Summary.....	77
7. Referências bibliográficas.....	79

ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato
ATP - adenosina trifosfato
bis-tris - bis(2 hidroxí etil) imino tris (hidroxí metil) metano
°C - graus centígrados
CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média
cm - centímetros
CO₂ - dióxido de carbono
2,3DPG - 2,3 difisfoglicerato
EBT - tampão Tris-Borato-EDTA ácido
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
Fe-GTP - guanosina trifosfato ligado ao Ferro
GTP - guanosina trifosfato
Hb - hemoglobina
[Hb] - concentração de hemoglobina
Hb-O₂ - hemoglobina ligada ao oxigênio
HCl - ácido clorídrico
HCM - hemoglobina corpuscular média
H₂S - gás sulfídrico
Ht - hematócrito
H₂SO₄ - ácido sulfúrico
IP₂ - inositol difosfato
IP₃ - inositol trifosfato
IP₄ - inositol tetrafosfato
IP₅ - inositol pentafofato
IP₆ - inositol hexafofato
Km - quilômetro
KCN - cianeto de potássio
KH₂PO₄ - fosfato monobásico de potássio
K₃[Fe(CN)₆] - ferricianeto de potássio
Lt - comprimento total
mA - miliampére
M - molar
ml - mililitro
μM - micromoles

mm - milímetro
mm³ - milímetro cúbico
N - normal
NaCl - cloreto de sódio
N.A. - nível de água
NaHSO₃ - bissulfito de sódio
Na₂SO₃ - sulfito de sódio
nm - nanômetro (comprimento de onda)
NTP - nucleosídeo trifosfato
O₂ - oxigênio molecular
P₅₀ - pressão de O₂ para saturar 50% da hemoglobina
Pi - fósforo inorgânico
ppm - partes por milhão
PT - fosfato total
RBC - células vermelhas do sangue
S-S - pontes dissulfeto
T - temperatura
Tris - tris hidroxil metil amino metano
V - volts
VCM - volume corpuslar médio
Wt - peso total

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre adaptação e respiração em peixes

As condições físico-químicas do meio ambiente estão continuamente sofrendo alterações. Para que a homeostase seja mantida, os organismos devem adaptar-se a essas mudanças.

Adaptação é um dos conceitos mais importantes da Biologia Moderna, unindo muitas áreas de estudos. Em termos gerais, a adaptação permite ao organismo a manutenção da atividade fisiológica e sua sobrevivência quando o ambiente é alterado em um ou mais fatores. Os fatores ambientais são muitos e alguns como tensão de oxigênio, temperatura, densidade e disponibilidade da água, podem variar amplamente no tempo e no espaço. O sucesso da sobrevivência de um organismo depende, portanto, da capacidade com que ele enfrenta as dificuldades que o meio lhe apresenta.

As adaptações ambientais ocorrem em diversos níveis biológicos: comportamentais, anatômicos, fisiológicos, etc.. Uma vez que o organismo é um agregado de átomos e moléculas, a ocorrência de qualquer adaptação ao ambiente envolve a ocorrência de algum tipo de alteração bioquímica. No "sensu strictu" isso é verdade e poderíamos questionar qual das adaptações ambientais não é bioquímica? Apesar disso, o termo adaptações bioquímicas é reservado àquelas modificações que ocorrem em nível metabólico,

não aparentes macroscopicamente e que alteram as funções metabólicas normais (HOCHACHKA & SOMERO, 1973).

A respiração é um dos processos mais dependentes das flutuações do ambiente, particularmente para os organismos aquáticos, sendo, talvez, o melhor para estudos sobre espécies, populações e adaptações individuais ao meio ambiente. A hemoglobina, principal proteína do sistema respiratório, atua na interface organismo-meio, devendo responder tanto às pressões ambientais quanto às intracorpóreas. Os peixes são particularmente úteis nesses estudos, porque são afetados diretamente pelas variações do meio, tais como: temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e CO₂, que podem ser medidas e controladas de uma maneira definida, fazendo deles excelentes parâmetros para o estudo de estratégias de adaptação às mudanças no meio (POWERS, 1980).

A temperatura é um dos fatores que provoca influências marcantes no processo respiratório pois o aumento da mesma pode causar diminuição nos níveis de oxigênio dissolvido na água e aceleração do metabolismo celular.

A baixa disponibilidade de oxigênio tem sido considerada uma importante força seletiva na evolução dos organismos aquáticos e, em peixes, a respiração aérea e a tomada de oxigênio na camada superficial da água são consideradas ajustes importantes, sendo isso um fato comum entre os peixes amazônicos. Além das adaptações morfológicas, outros tipos de

estratégias adaptativas em nível bioquímico foram desenvolvidos por várias espécies de peixes.

Desde as pesquisas realizadas por KROGH & LEITCH (1919), o estudo de sangue e hemolisados de peixes tem demonstrado que as propriedades funcionais do sangue e da hemoglobina estão diretamente relacionadas às flutuações ambientais e habitats preferenciais. Relações com o oxigênio dissolvido no meio são frequentemente encontradas. POWERS (1980) constatou que os organismos com maior disponibilidade de oxigênio no meio, por exemplo, possuem sangue com menor afinidade com esse gás, enquanto que as espécies que habitam ambientes hipóxicos possuem sangue com altas afinidades com o oxigênio.

A região amazônica, cuja ictiofauna é umas das mais ricas do mundo, constitui um campo vasto para estudos de adaptação a modificações ambientais, uma vez que apresenta ecossistemas complexos com oscilações sazonais de parâmetros químicos, físicos e biológicos, particularmente entre estes, os decorrentes da oscilação do nível de água (SIOLI, 1985).

Assim sendo, estudos sobre processos de tomada, transporte e descarga de oxigênio nos tecidos podem revelar os mecanismos adaptativos desenvolvidos pelos peixes para enfrentarem as flutuações ambientais e, assim, manterem sua homeostase respiratória.

1.1.1. Variação dos parâmetros hematológicos

O estudo da composição do sangue é de fundamental importância na avaliação da condição fisiológica e muitos autores têm demonstrado que os parâmetros hematológicos de diferentes espécies de peixes podem variar morfológica e quantitativamente frente a modificações endógenas e mesmo exógenas, tais como: peso e comprimento (EZZAT *et al.*, 1974; JOSHI & TANDON, 1977); concentração de oxigênio (SOIVIO *et al.*, 1973; 1974; SCOOT & ROGERS, 1981); temperatura (DHEER, 1988); sexo (PANDEY & PANDEY, 1977; SIDDIQUI & NASSEN, 1979); atividade (GRAHAM *et al.*, 1985; RAMBHASKAR & SRINIVASA-RAO, 1987); habitat (WELLS *et al.*, 1980); maturação gonadal (KAVAMOTO *et al.*, 1983); e variação sazonal e espacial (DENTON & YOUSEF, 1975; FOURIE & VAN VUREN, 1976; HARDIG & HOGLUND, 1984; VAL *et al.*, 1986; MONTEIRO *et al.*, 1987).

Em peixes, não se tem estabelecido padrões hematológicos normais, apesar de muitos autores tentarem elaborar quadros sanguíneos normais para várias espécies (PITOMBEIRA & MARTINS, 1970; VAN VUREN & HATTINGH, 1978; TISA & STRANGE, 1983; SANDNES *et al.*, 1988). Entretanto, os valores hematológicos podem ser importantes indicadores das propriedades respiratórias e refletir estratégias adaptativas durante as flutuações sazonais.

1.1.2. Variação nas concentrações de fosfatos eritrocitários

Os fosfatos orgânicos intraeritrocitários existem de maneira preferencial nos diferentes grupos animais e tais

moléculas se constituem numa importante estratégia adaptativa em nível molecular, atuando como moduladores alostéricos da afinidade da hemoglobina com o oxigênio (BENESCH & BENESCH, 1967; CHANUTIN & CURNISH, 1967; GEOGHEGAN & POLUHOWICH, 1974; BARTLETT, 1976a; 1980; VAL, 1986).

Muitos autores têm estudado fosfatos orgânicos em peixes numa tentativa de correlacionar possíveis variações qualitativas e/ou quantitativas desses fosfatos com fatores ambientais e metabólicos (WOOD & JOHANSEN, 1973; POWERS, 1974; GREANEY & POWERS, 1978; WOOD *et al.*, 1979; WEBER *et al.*, 1978; BABIKER, 1984; VAL *et al.*, 1984; 1985; 1986; no prelo; MONTEIRO *et al.*, 1987).

Diversas espécies de peixes foram examinadas quanto ao tipo de fosfato predominante em seus eritrócitos, sendo ATP e GTP os mais comumente encontrados (KALOUSTIAN & POLUHOWICH, 1976; PETERSON & POLUHOWICH, 1976; BARTLETT, 1980; POWERS, 1980; VAL *et al.*, 1985; 1986; no prelo; VAL, 1986; MONTEIRO *et al.*, 1987). Entretanto, foram detectados outros tipos de fosfatos em peixes, podendo ser destacado IP_5 , IP_2 , e 2,3DPG, sendo que esses compostos são raros nesse grupo animal (GILLEN & RIGGS, 1971; ISAACKS *et al.*, 1977a; 1978ab; BARTLETT, 1978ab; BORGESE & NAGEL, 1978).

1.1.3. Multiplicidade de componentes hemoglobínicos

Hemoglobinas múltiplas têm sido descritas para muitas espécies de peixes através de técnicas eletroforéticas (FYHN et al., 1979; WILHELM F^o & REISCHL, 1981; ALMEIDA-VAL et al., 1985; GALDAMES-PORTUS et al., 1982; PEREZ & RYLANDER, 1985; VAL et al., 1987).

A utilização de eletroforese na caracterização de padrões estruturais de hemoglobinas de peixes tem sido muito difundida. Entretanto, os suportes e os tipos de tampões utilizados diferem muito entre os autores (FOURIE & VAN VUREN, 1976; FYHN et al., 1979; WILHELM F^o & REISCHL, 1981; VAL et al., 1987; DAFRE, 1989).

Além da eletroforese, a cromatografia em resina de troca iônica é bastante utilizada na separação dos componentes hemoglobínicos. Apesar disso, a eletroforese é o método mais utilizado na separação de proteínas de um sistema enzimático ou mesmo de diferentes tipos de moléculas de hemoglobina.

Os suportes mais utilizados empregam o papel de filtro, o acetato de celulose, o gel de amido, o gel de ágar-amido e o gel de poliacrilamida. Porém, o gel de amido e a poliacrilamida oferecem melhores resultados na separação de proteínas.

Apesar de ser grande o número de informações acerca da multiplicidade de componentes hemoglobínicos para as mais variadas espécies, o significado funcional da mesma ainda não está bem definido, ainda que muitos autores têm sugerido possíveis relações com as flutuações ambientais (POWERS &

EDMUNDSON, 1972; WEBER & DE WILDE, 1975; GARLICK *et al.*, 1979; MARTIN *et al.*, 1979; VAL *et al.*, 1986; MONTEIRO *et al.*, 1987).

FYHN *et al.* (1979) estudaram 96 espécies de peixes pertencentes à bacia amazônica e encontraram, através da análise dos hemolisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, uma grande multiplicidade de componentes, com uma média de 4 frações hemoglobínicas entre os teleósteos estudados. Formas polimórficas foram encontradas por aqueles autores em 9,2% das espécies estudadas. Esse percentual tem sido questionado em função dos problemas de identificação de espécies (VAL, 1983).

Assim como as isohemoglobinas (hemoglobinas múltiplas), o significado adaptativo das alohemoglobinas ainda não está bem estabelecido. Muitos autores, entretanto, têm relacionado o nível e a existência de polimorfismos proteicos com a variabilidade existente em habitats aquáticos sugerindo por intermédio de estudos comparativos, que o polimorfismo represente uma estratégia adaptativa disponível ao animal num ambiente variável (SICK, 1966; KOEHN, 1971; FYHN & SULLIVAN, 1974; POWERS & PLACE, 1978; CARACIOLO, 1989). KIRPICHNIKOV (1973), sugeriu três conjuntos de fatores que ajudam a demonstrar o significado adaptativo dos polimorfismos protéicos: variação clinal, heterose e as diferenças funcionais entre os isoalelos.

VAL *et al.* (1987) encontraram uma grande heterogeneidade eletroforética em gel de amido para as hemoglobinas de 22 espécies de peixes amazônicos. Ao compararem os padrões das mesmas espécies analisadas por FYHN *et al.* (1979),

observaram diferenças no número de componentes eletroforéticos, o que os levou a supor que tais diferenças devem-se aos diferentes suportes eletroforéticos empregados.

Segundo RIGGS (1970) os métodos eletroforéticos utilizados para a separação das diferentes hemoglobinas ainda estão sujeitos a erros, pois o número de frações hemoglobínicas obtidas em diferentes meios eletroforéticos e a possível ligação das moléculas do tampão com a hemoglobina, podem alterar a carga e a agregação de subunidades.

1.2. O ambiente várzea

As grandes modificações provocadas pelas mudanças climáticas durante as épocas glaciais, contribuíram para o aspecto atual dos rios amazônicos. Esses rios apresentam consideráveis diferenças tanto em relação à morfologia de seus leitos quanto às suas características físicas, químicas e biológicas (JUNK, 1983).

Em decorrência da grande deposição de sedimentos, fortes correntes e oscilações do nível de água, grandes áreas são inundadas às margens dos cursos dos rios de água branca as quais são denominadas várzeas. A várzea amazônica representa um sistema complexo de inúmeras ilhas, diques marginais, lagos, canais, paranás, etc., que variam permanentemente em relação à sua forma e ao seu tamanho, dependendo das oscilações do nível de água. O solo de várzea recebe anualmente uma quantidade significativa de

minerais e outros nutrientes através da subida do nível de águas ricas com aqueles elementos sendo, em função disso, altamente fértil. Economicamente, essas áreas são de grande interesse para as populações ribeirinhas que as utilizam para a produção agrícola e pesqueira.

Em função da sazonalidade do nível de água, os lagos de várzea apresentam dois períodos distintos: cheia e vazante. Durante a cheia, os rios inundam os lagos adicionando nutrientes e expandindo o habitat aquático favorecendo, assim, a permanência de organismos e o desenvolvimento de macrófitas. Na vazante, pequenos lagos podem secar completamente, enquanto outros podem atuar como canais naturais contendo água corrente ou parada, dependendo do seu nível. Com a redução da área, algumas vezes ocorre uma perda de mais de 90% da vegetação aquática e os animais ficam confinados em áreas muito restritas.

As condições físico-químicas dos lagos de várzea apresentam variações consideráveis com relação a pH, oxigênio dissolvido, temperatura e nutrientes. A baixa concentração de oxigênio dissolvido por longos períodos do ano é uma característica importante dos lagos de várzea. Essa situação é muito mais pronunciada durante a enchente, devido à grande decomposição de matéria orgânica proveniente da vegetação terrestre inundada, além da grande quantidade de macrófitas que diminuem a penetração de luz na superfície da água. A formação de gás sulfídrico (H_2S) durante esse período é evidente nesses

lagos, principalmente nos meses de maio e junho quando ocorre a friagem (SANTOS, 1979).

A diversidade ictiofaunística nessa região merece especial atenção, uma vez que as modificações sazonais exercem considerável influência sobre a biologia dos peixes. Em função disso, muitas espécies de peixes da Amazônia possuem adaptações morfológicas como a formação de lábios, órgãos acessórios para respirar oxigênio atmosférico e ainda podem apresentar adaptações bioquímicas que permitem sua sobrevivência frente às mudanças drásticas no seu habitat (RIGGS, 1979; SAINT-PAUL, 1983; VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987; ALMEIDA-VAL et al., 1990; VAL et al., em prep.).

Uma região típica de várzea é a ilha da Marchantaria que está localizada no rio Solimões a aproximadamente 15 Km de sua confluência com o rio Negro. Estudos sobre Limnologia (IRION et al., 1983; JUNK et al., 1983) e Ictiologia, particularmente sobre Citogenética, Sistemática e Adaptação bioquímicas (ALMEIDA-VAL, 1986; VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987; FALCAO, 1989; ALMEIDA-VAL et al., 1990; FELDBERG, 1990; VAL et al., em prep.), têm sido desenvolvidos nesse ambiente.

1.3. A espécie Hoplosternum littorale Hancock, 1828

Hoplosternum littorale é um Siluriforme neotropical da família Callichthyidae conhecido vulgarmente na região amazônica como tamoatá. É uma espécie de grande importância comercial para

a Venezuela e Guianas e serve de alimento para uma grande parte das populações ribeirinhas do norte do Brasil.

Esses peixes são encontrados em águas rasas e lentas. Durante o período de cheia, quando grandes áreas são inundadas, os tamoatás se dispersam nas várzeas e igapós. Na vazante, parte desse habitat desaparece quase completamente e em função disso, ocorre uma grande concentração desses animais que são capazes de suportar altas temperaturas (38°C) e baixas concentrações de oxigênio (0,03 - 0,05mg/l). Durante sua evolução essa espécie desenvolveu notáveis adaptações, dentre as quais a capacidade de respirar oxigênio atmosférico, graças a uma modificação do intestino. Algumas vezes esses peixes se locomovem sobre a terra e se deslocam de um lago seco para áreas mais úmidas.

Na literatura existe uma grande controvérsia a respeito do tipo de respiração de *H. littorale*. Alguns autores o citam como sendo um peixe de respiração aérea obrigatória (CARTER & BEADLE, 1931; JOHANSEN, 1979; FYHN *et al.*, 1979; GARLICK *et al.*, 1979) e outros acreditam que essa espécie possui respiração aérea facultativa (JOHANSEN *et al.*, 1978a; PEREZ, 1979; 1980). Experimentos por nós realizados confirmam o caráter bimodal para a respiração de *H. littorale*.

Características citogenéticas, reprodutivas, bioquímicas e alimentares de *H. littorale* têm sido estudadas (MACHADO-ALLISON, 1986; WINEMILLER, 1987; D'AVILA-LIMEIRA, 1989; PORTO & FELDBERG, *em prep.*). Desde o trabalho de CARTER & BEADLE (1931), tem sido implementada a obtenção de informações a

respeito de seu comportamento, fisiologia e/ou bioquímica respiratória, as quais foram obtidas, principalmente, durante a expedição científica do R/V Alpha Helix à Amazônia (BUNN & RIGGS, 1979; FYHN et al., 1979; GARLICK et al., 1979; POWERS et al., 1979).

O interesse pelo estudo dessa espécie tem sido grande e informações valiosas, como as verificadas na expedição Alpha Helix, favoreceram a continuidade desse trabalho para a obtenção de maiores conhecimentos sobre a espécie.

1.4. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo de adaptações ao ambiente na região amazônica, através da caracterização de aspectos relacionados à tomada e ao transporte de oxigênio pela espécie *H. littorale* da ilha da Marchantaria durante os períodos de cheia e vazante. Assim, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

a) Verificar a existência de variações sazonais nos parâmetros hematológicos;

b) Determinar as concentrações e os tipos de fosfatos eritrocitários nos períodos de cheia e vazante;

c) Verificar se os fatores ambientais (O_2 dissolvido, temperatura e nível de água) influenciam a concentração dos fosfatos eritrocitários, efeito Bohr e parâmetros hematológicos;

d) Contribuir para o estudo sobre hemoglobinas de peixes pertencentes a ambientes hipóxicos da Amazônia Central.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Foram utilizados 390 exemplares de *Hoplosternum littorale* capturados durante 6 excursões à ilha da Marchantaria nos meses de junho, agosto, setembro, e novembro de 1987, e janeiro e março de 1988 (Tabela 3.2. à página 27).

A captura dos peixes durante a cheia era geralmente feita pela manhã e no final da tarde, devido à frequência desses peixes em lugares acessíveis ao manuseio das malhadeiras. Na vazante, com a diminuição do nível de água, esses peixes eram encontrados, em abundância nos lagos, o que facilitou sua captura com tarrafas. Após a captura eram, imediatamente, transportados para o laboratório flutuante Harald Sioli para tomada de peso, comprimento e coleta de sangue.

2.1.1. Coleta de sangue

O sangue foi extraído da veia caudal com a utilização de seringas contendo traços de heparina ou EDTA 10%. As amostras eram colocadas em tubos de ensaio numerados e a seguir, mantidas a 0°C em gelo fundente numa caixa isotérmica.

Em função da rapidez com que o sangue de peixe coagula, tem sido demonstrado em alguns trabalhos que os anticoagulantes mais eficazes são EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e preferencialmente heparina.

O sangue obtido foi utilizado para análises dos parâmetros hematológicos, dos fosfatos intraeritrocitários, do equilíbrio de oxigenação, e dos padrões eletroforéticos das hemoglobinas.

2.2. Métodos

2.2.1. Hematologia

Foram analisados os parâmetros hematológicos referentes à série vermelha, ou seja, hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]) e número de eritrócitos (RBC), que foram determinados no campo, logo após a coleta dos animais.

Hematócrito (Ht)

Em um tubo de microhematócrito heparinizado, coletou-se uma amostra de sangue de cada animal. Os tubos foram fechados a fogo numa lamparina de álcool e centrifugados numa centrífuga de microhematócrito FANEM 207N a 12.000 rpm durante 10 minutos. A porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi lida em um cartão padronizado.

Concentração de hemoglobina ([Hb])

O método empregado foi o da cianometahemoglobina descrito por KAMPER & ZIJLSTRA (1964). Diluiu-se 15µl de sangue

em 3,0ml de solução de Drabkin (KCN - 0,5g; KH₂PO₄ - 1,4g; K₃[Fe(CN)₆] - 2,0g e água destilada - q.s.p. 1000ml), que após homogeneização permaneceram por 15 minutos em repouso. A absorbância foi determinada em 520nm num colorímetro Micronal modelo B220, no campo. No laboratório os valores obtidos foram transformados para 540nm através de um fator de correção determinado através da comparação de leituras com um espectrofotômetro Shimadzu UV-240.

A concentração de hemoglobina foi determinada pela fórmula:

$$\text{g\% Hb} = \text{D.O. (540nm)} \times 0,146 \times \text{diluição}$$

Número de eritrócitos (RBC)

O sangue foi diluído com uma solução fisiológica (NaCl 0,9%) na proporção 1:200. Após 5 minutos de repouso, foi feita a contagem dos eritrócitos em câmara de Neubauer, num microscópio KIOWA com ampliação de 400 vezes. Esta determinação foi realizada no laboratório montado no campo.

Constantes corpusculares

Para cada indivíduo, os valores de VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) e HCM (Hemoglobina corpuscular média) foram determinados segundo BROW (1976), como descrito a seguir:

$$\text{VCM} = \text{Ht} \times 10/\text{RBC} \quad (\mu\text{m}^3)$$

$$\text{CHCM} = [\text{Hb}] \times 100/\text{Ht} \quad (\%)$$

$$\text{HCM} = [\text{Hb}] \times 10/\text{RBC} \quad (\mu\mu\text{g})$$

2.2.2. Fosfatos eritrocitários

Os extratos de fosfatos intraeritrocitários foram feitos logo após a coleta do sangue utilizando-se a metodologia descrita por BARTLETT (1959). Foi feito um "pool" de sangue com amostras de vários indivíduos, sendo anotados o volume e o hematócrito. As amostras aqui utilizadas foram somente aquelas coletadas com heparina. Em seguida, o sangue foi centrifugado para a separação do plasma. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução isotônica (NaCl-0,9%). Os eritrócitos lavados foram homogeneizados com ácido perclórico 0,6M com um bastão de vidro e centrifugados numa centrífuga de mesa, sendo o sobrenadante colocado em frasco plástico apropriado. Esta operação foi repetida três vezes. O extrato assim obtido foi neutralizado com hidróxido de potássio 6M, identificado e congelado.

No laboratório, os extratos foram descongelados e centrifugados a 2.987g durante 10 minutos a 4°C, sendo parte do sobrenadante aplicada numa coluna de troca iônica do tipo DOWEX 1x8. Através da passagem de 800ml de gradiente 0-5M de ácido fórmico/formiato de amônio (400ml de água deionizada: 320ml de ácido fórmico + 80ml de formiato de amônio), obteve-se frações de 3,5ml com auxílio de um coletor de frações LKB Redirac. O eluato

foi lido em 280nm num espectrofotômetro SHIMADZU UV 240. Através do coeficiente de absorvidade molar da adenina as leituras foram convertidas em molaridade.

Para a dosagem de fósforo total, utilizou-se os mesmos eluatos lidos em 280nm, retirando-se de cada fração 0,5ml. A estas, adicionou-se 0,5ml de H_2SO_4 10N para a quebra dos fosfatos orgânicos, as quais permaneceram durante 10 horas em uma estufa a 160°C.

Após o resfriamento dos tubos retirados da estufa, acrescentou-se 4,6ml de molibdato de amônio 0,2% e 0,2ml do reagente de FISKE & SUBBAROW (15g de $NaHSO_3$, 250mg de ácido 1-amino-2-naphtol-4-sulfônico, 500mg de Na_2SO_3 , água deionizada qsp 100ml). Depois de agitados, os tubos foram levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos. As leituras das frações foram realizadas em 830nm, no mesmo espectrofotômetro acima citado. Através de uma curva padrão as leituras foram convertidas em molaridade.

As molaridades obtidas nos dois comprimentos de onda, 280 e 830nm, foram plotadas uma sobre a outra. As análises qualitativas dos picos de máxima absorção foram feitas comparando-se as varreduras obtidas entre 200 e 300nm com aquelas apresentadas pelo boletim da P.L. Biochemicals, 1976.

2.2.2.1. Identificação do 2,3DPG

Para confirmar a presença do 2,3-difosfoglicerato em *H. littorale*, utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por DISCHE & BORENFREUND (1951).

Princípio do método: O método baseia-se na detecção e determinação de cetoaçúcares e trioses que reagem com carbazol-cisteína na presença de ácido sulfúrico.

Procedimento: Dos eluatos que indicavam a provável presença de 2,3DPG no extrato, reuniu-se 2ml de cada um que foram em seguida levados à estufa para evaporação. O sal formado foi diluído com 2ml de água deionizada, acrescentando-se, em seguida, 2ml de cisteína-HCl 1,5%, 4ml de H₂SO₄ 95% e 2ml de carbazol 0,1% em etanol absoluto.

Após homogeneização, a mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Depois de frio foi feita uma varredura entre 500 e 700nm que foi comparada com vários padrões.

2.2.3. Equilíbrio de oxigenação de sangue

Para a determinação do efeito Bohr do sangue (ϕ), foi utilizada a metodologia descrita por COLMAN & LONGMUIR (1963), logo após a coleta das amostras. Utilizou-se para esse experimento um monitor biológico de oxigênio YSI modelo 57 com um

eletrodo polarográfico acoplado a um banho YSI modelo 53 e a um registrador gráfico Pharmacia.

Inicialmente, foi feito um "pool" das amostras, o qual foi mantido em gelo durante todo o experimento. Foram colocados em uma cubeta do eletrodo 0,5ml de tampão Tris/HCl 0,1M (pHs 6,2; 6,8; 7,4) ou Bis-Tris/HCl 0,1M (pHs 8,0; 8,6; 9,2), 4,5 ml de solução fisiológica (0,9%), fermento biológico e 3 gotas de sangue. Após agitação, o eletrodo foi introduzido na cubeta e ligado imediatamente o registrador onde foram traçadas as curvas de dissociação de oxigênio do sangue total. Os pHs inicial (tampão) e final (experimento) foram anotados nas curvas.

De acordo com a metodologia, o oxigênio dissolvido é consumido pelo fermento e, com a diminuição da pressão do gás, ocorre a liberação de oxigênio ligado à hemoglobina na tentativa de manter o equilíbrio, que pode ocorrer de forma diferente de acordo com o pH utilizado. A partir da curva obtida, foram calculadas as pressões parciais requeridas na saturação de 50% do sangue por oxigênio, segundo a fórmula:

$$PO_2 (n) = PB \times 0,2098 \times \frac{Ln}{4} \times L_{100}, \text{ onde:}$$

n = % de saturação; PB = pressão barométrica; Ln = leitura em n% de saturação; L₁₀₀ = leitura em 100% de saturação.

Os valores correspondentes à pressão parcial de O₂ necessário para saturar 50% da Hb (P₅₀), foram convertidos em logaritmos e, ao conjunto de pontos log P₅₀ x pH, ajustou-se uma

reta, cuja declividade corresponde ao valor de efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$).

2.2.4. Eletroforese

Para a obtenção da solução de hemoglobina, foi realizada no campo a separação do plasma. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução isotônica (NaCl-0,9%). A estes, foi adicionado tampão de hemólise na proporção 1:1, contendo 0,01M de Tris; 0,05M de EDTA alcalino, pH 8,0 ajustado com HCl 1N, segundo WEBER & DE WILDE (1975). As amostras foram congeladas e transportadas ao laboratório.

No laboratório, as amostras foram descongeladas e congeladas 3 vezes para efetivar a hemólise. Adicionou-se a elas KCN 0,1M; pH 8,0, sendo em seguida centrifugadas a 20.190g por 20 minutos a 4°C, numa centrífuga SORVALL RC-5B para a eliminação do estroma. A solução foi utilizada na determinação dos padrões eletroforéticos.

Foram utilizados dois meios diferentes para a determinação dos padrões eletroforéticos: lâminas de ágar-amido e gel de amido, sendo ambos os sistemas horizontais. A metodologia empregada para a eletroforese em gel de ágar-amido foi a descrita por ARAÚJO et al. (1970), modificada por MACHADO (1973), e para gel de amido foi a descrita por SMITHIES (1955). Em ambos os meios, foi utilizado amido de milho segundo VAL et al. (1981).

Nos dois tipos de eletroforese empregou-se o tampão EBT ácido 0,036M, pH 8,6 (Tris 0,9M; Acido Bórico 0,5M; EDTA ácido 0,02M diluído 40 vezes). Nas cubas o tampão utilizado foi o Borato pH 8,6, 0,35M para o gel de amido e 0,035M para o gel de ágar-amido. A corrida eletroforética, nos dois casos, foi realizada a 4°C com uma fonte de tensão PHARMACIA EPS 500/400. Utilizou-se nas eletroforeses de gel de amido uma voltagem constante de 5V/cm e nas lâminas de ágar-amido uma amperagem constante de 3mA/lâmina. KCN 0,01M pH 8,0 foi adicionado aos géis e às amostras.

Após a migração eletroforética, foram utilizados dois sistemas de coloração: Amido Black 10B (para proteína total) e Benzidina (específica para proteína com atividade peroxidásica). As lâminas de ágar-amido foram coradas com Amido Black 10B, sendo posteriormente lavadas com solução acética a 5% e secas a temperatura ambiente. Para as eletroforeses em gel de amido, ambos os corantes foram utilizados sendo os géis, em seguida, transparentizados com papel celofane e, após a secagem, arquivados.

2.2.5. Oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água

Oxigênio dissolvido (O₂) e temperatura (T°C) foram determinados com um termo-oxigenômetro YSI modelo 57 durante os períodos de coleta. As oscilações dos níveis de água (N.A.) foram obtidas junto à Capitania dos Portos de Manaus e são relativos aos níveis de água do rio Negro nos anos de 1987 e 1988.

2.2.6. Análises estatísticas

Foram feitas as médias e desvios padrão dos valores individuais dos 6 parâmetros hematológicos estudados. Para a comparação dos dados utilizou-se o teste F. Como as médias no teste F indicavam diferença significativa ($P < 0,05$), aplicou-se o teste de Scheffé para se saber quais grupos de médias eram diferentes entre si. Através da regressão linear, verificou-se as correlações dos parâmetros hematológicos com as três variáveis ambientais medidas bem como as correlações entre eles.

A regressão linear também foi utilizada para as relações feitas com os demais parâmetros estudados (fosfatos eritrocitários, efeito Bohr e hematologia) entre si e com as variáveis ambientais. Em todos os casos considerou-se os valores críticos para r (coeficiente de correlação) no nível de 95% (ZAR, 1974).

3. RESULTADOS

3.1. Oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água.

O perfil de oxigênio dissolvido e de temperatura em todas as situações de coleta são apresentados na Tabela 3.1. Na Figura 3.1. são mostradas as variações do nível de água do rio Negro medidas no Porto de Manaus (AM), relativos aos anos 1987 e 1988, da concentração de oxigênio e da temperatura da água a 10cm de profundidade (altura da malhadeira na qual a captura era mais frequente).

3.2. Hematologia (série vermelha)

Os valores correspondentes aos parâmetros hematológicos Ht, [Hb], RBC, VCM, HCM e CHCM, ao comprimento e ao peso dos exemplares de *H. littorale*, e às variáveis ambientais (oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água), nas seis diferentes épocas de coleta, são apresentados na Tabela 3.2.

Os dados hematológicos foram testados *versus* as variáveis ambientais consideradas, não tendo sido observada correlação entre esses parâmetros. Contudo, foram observadas diferenças entre os valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes meses de coleta que estão indicados por diferentes letras na Tabela 3.2.

Ht e [Hb] estão correlacionados positivamente ($Ht = 21,393 + 3,14 [Hb]$). O mesmo é observado para VCM *versus* HCM ($VCM = 64,691 + 4,718 HCM$). Na Figura 3.2. estão representadas

Tabela 3.1. Perfil de oxigênio dissolvido (O₂ em mg/litro) e temperatura (T em °C) em todas as situações de coleta (P= profundidade em centímetros).

JUNHO/87			AGOSTO/87			SETEMBRO/87		
P	T	O ₂	P	T	O ₂	P	T	O ₂
0	25,0	1,0	0	31,5	11,0	0	35,5	9,0
10	25,0	1,2	10	31,5	11,0	10	35,5	9,0
20	24,5	1,2	20	31,0	12,0	20	35,5	9,5
30	24,0	1,2	30	32,0	12,5	30	35,5	9,8
40	23,5	1,0	40	32,0	12,5	50	35,5	9,9
50	23,0	1,0	50	31,5	12,5			
70	23,0	0,8						
100	22,5	0,6						
150	22,3	0,5						

NOVEMBRO/87			JANEIRO/88			MARÇO/88		
P	T	O ₂	P	T	O ₂	P	T	O ₂
0	29,0	8,9	0	29,9	5,2	0	30,0	0,3
10	29,8	4,9	10	29,8	5,2	10	30,2	0,15
20	29,8	4,5	20	29,8	5,2	20	30,5	0,1
30	29,8	4,1	50	29,9	5,2	30	30,5	0,05
50	28,2	3,1				50	30,5	0,05
70	28,8	2,5				70	30,5	0,05
100	26,4	1,5				90	30,5	0,01
120	26,3	1,3						

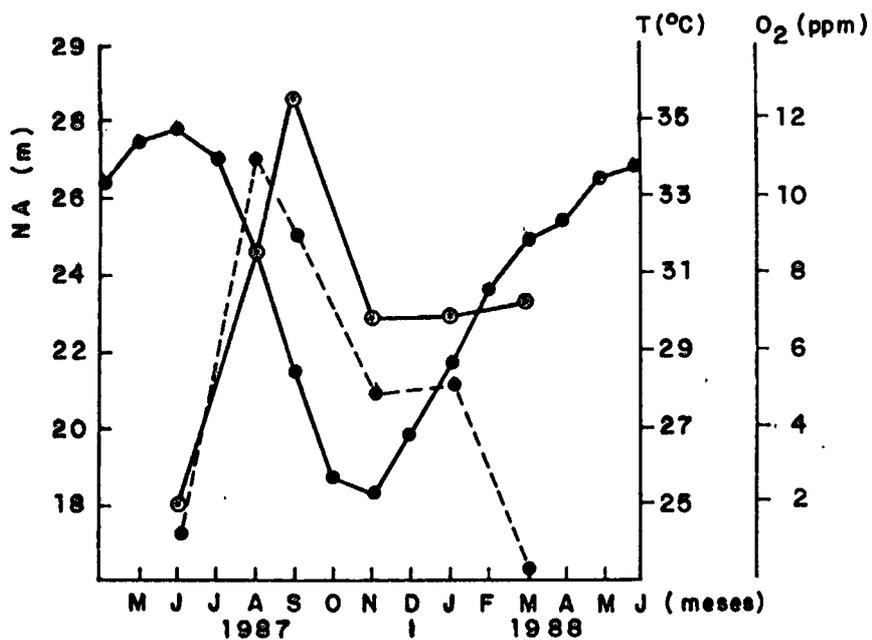


Figura 3.1. Oscilação do nível de água (●—●), oxigênio dissolvido a 10cm de profundidade (●---●) e temperatura (○—○), durante o período de coleta.

Tabela 3.2. Valores médios dos parâmetros hematológicos, comprimento (Lt) e peso (Wt) de *H. littorale* e oxigênio dissolvido (O_2), temperatura (T) e nível de água (N.A.) nos diferentes meses de coleta na Ilha da Marchantaria. Diferentes letras indicam médias estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). SE=Desvio padrão.

		JUNHO	AGOSTO	SETEMBRO	NOVEMBRO	JANEIRO	MARÇO
Ht (%)	Média	38,45(a)	39,11(a)	42,14(b)	43,72(c)	38,82(a)	37,16(a)
	SE	1,17	0,65	0,43	0,88	0,62	0,64
	N	20	28	168	54	65	50
[Hb] (g%)	Média	12,50(b)	12,85(b)	13,74(c)	16,07(d)	12,64(b)	11,09(a)
	SE	0,45	0,30	0,14	0,29	0,23	0,36
	N	17	29	168	48	64	50
RBC ($\times 10^6$)	Média	1,97(b)	1,90(a,b)	2,31(c,d)	2,46(d)	1,77(a)	2,25(c)
	SE	0,08	0,06	0,08	0,06	0,04	0,07
	N	20	27	31	48	61	50
VCM (μm^3)	Média	202,66(c)	212,12(c,d)	198,87(b,c)	183,95(a,b)	225,09(d)	173,44(a)
	SE	11,14	7,83	6,26	5,64	4,70	5,85
	N	20	27	31	48	61	50
HCM (μg)	Média	64,20(b,c)	69,32(c,d)	61,34(b)	67,35(c)	74,10(d)	51,61(a)
	SE	2,33	2,75	2,20	2,20	2,14	2,13
	N	17	27	31	48	60	50
CHCM (%)	Média	32,64(b)	32,57(b)	32,90(b)	36,72(c)	32,74(b)	29,79(a)
	SE	1,50	0,52	0,34	0,54	0,57	0,80
	N	17	28	168	48	64	50
Lt (mm)	Média	181,67	156,79	171,79	192,04	181,52	167,34
	SE	3,16	3,21	1,64	1,95	1,91	1,96
	N	18	29	170	50	67	50
Wt (g)	Média	100,67	69,49	85,73	115,25	113,72	105,18
	SE	5,81	4,13	2,20	4,28	4,27	4,40
	N	19	29	170	50	67	50
O_2 (ppm)		1,2	11,0	9,0	4,9	5,2	0,15
T (°C)		25,0	31,5	35,5	29,8	29,8	30,2
N.A. (m)		27,84	26,13	22,23	18,13	20,79	24,72

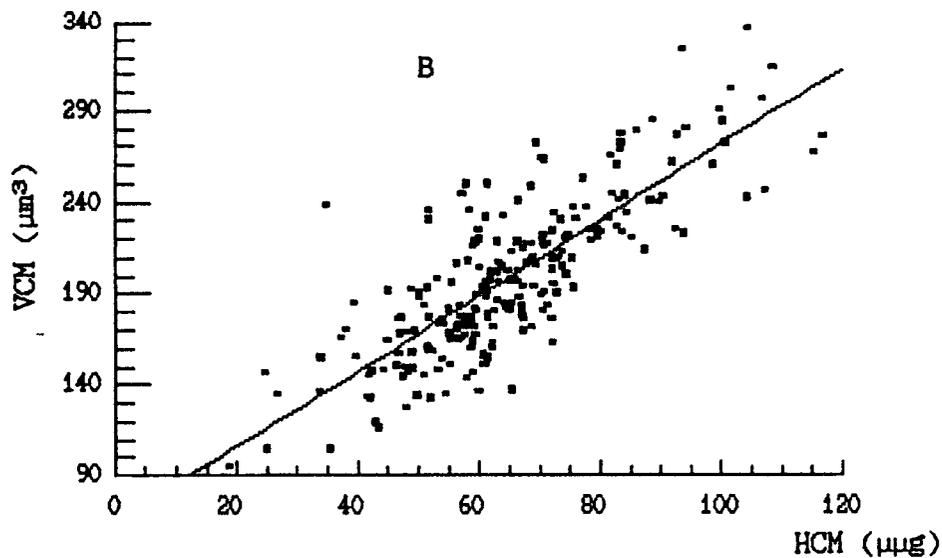
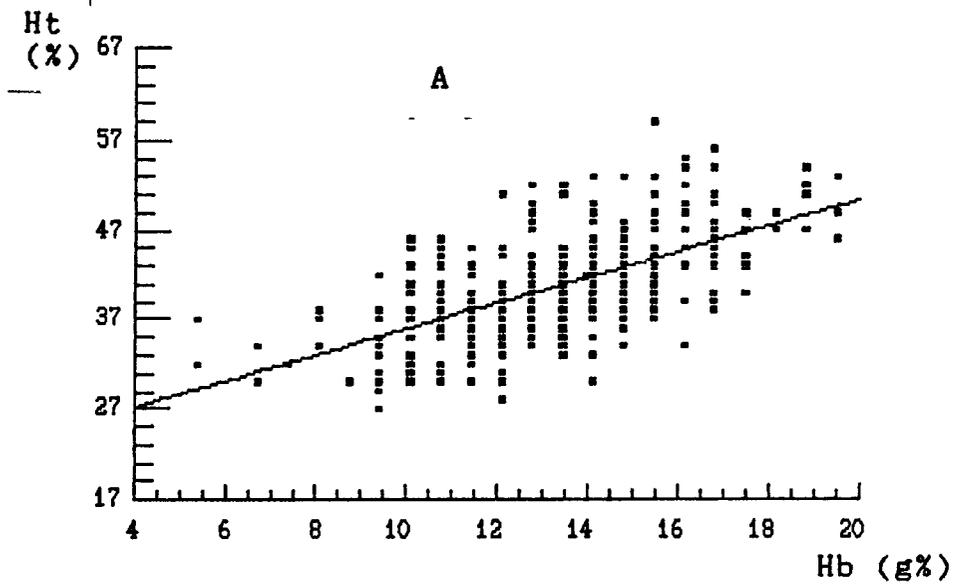


Figura 3.2. Correlação entre hematócrito (%) e concentração de hemoglobina (g%) (A, $r=0,60$) e entre hemoglobina corpuscular média (μg) e volume corpuscular médio (μm^3) (B, $r=0,80$) para *H. littorale*.

estas correlações.

O peso e o comprimento dos indivíduos coletados variaram de 69,49 a 115,25g e de 156,79 a 192,04mm respectivamente, não tendo sido detectadas correlações destes com os parâmetros hematológicos da espécie estudada.

3.3. Fosfatos eritrocitários

O perfil cromatográfico dos fosfatos eritrocitários de *Hoplosternum littorale* é mostrado na Figura 3.3a. Foram detectados na espécie os seguintes principais fosfatos orgânicos: ATP, GTP, Fe-GTP e 2,3DPG. Na Figura 3.3b é apresentado o perfil cromatográfico dos fosfatos eritrocitários para a espécie humana, para efeito de comparação. Na Tabela 3.3. são apresentadas as concentrações dos fosfatos intraeritrocitários detectados nas análises cromatográficas nos diferentes meses de coleta.

Nessa Tabela, verifica-se que os compostos fosfatados que apresentaram maiores concentrações foram Fe-GTP e GTP e os de menores concentrações foram ATP e 2,3DPG. A relação ATP/GTP em todas as coletas foi menor que 1,0, sendo o maior valor dessa relação (0,920) obtido em setembro. Ainda nessa Tabela, observa-se que a relação 2,3DPG/NTP foi maior no mês de setembro com uma diminuição progressiva nos meses de novembro, janeiro e março.

Das relações feitas entre ATP, GTP, Fe-GTP e 2,3DPG com as variáveis ambientais (oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água), somente a correlação 2,3DPG versus temperatura foi significativa ($P < 0,01$) (Figura 3.4.). Na Figura 3.5. podem ser

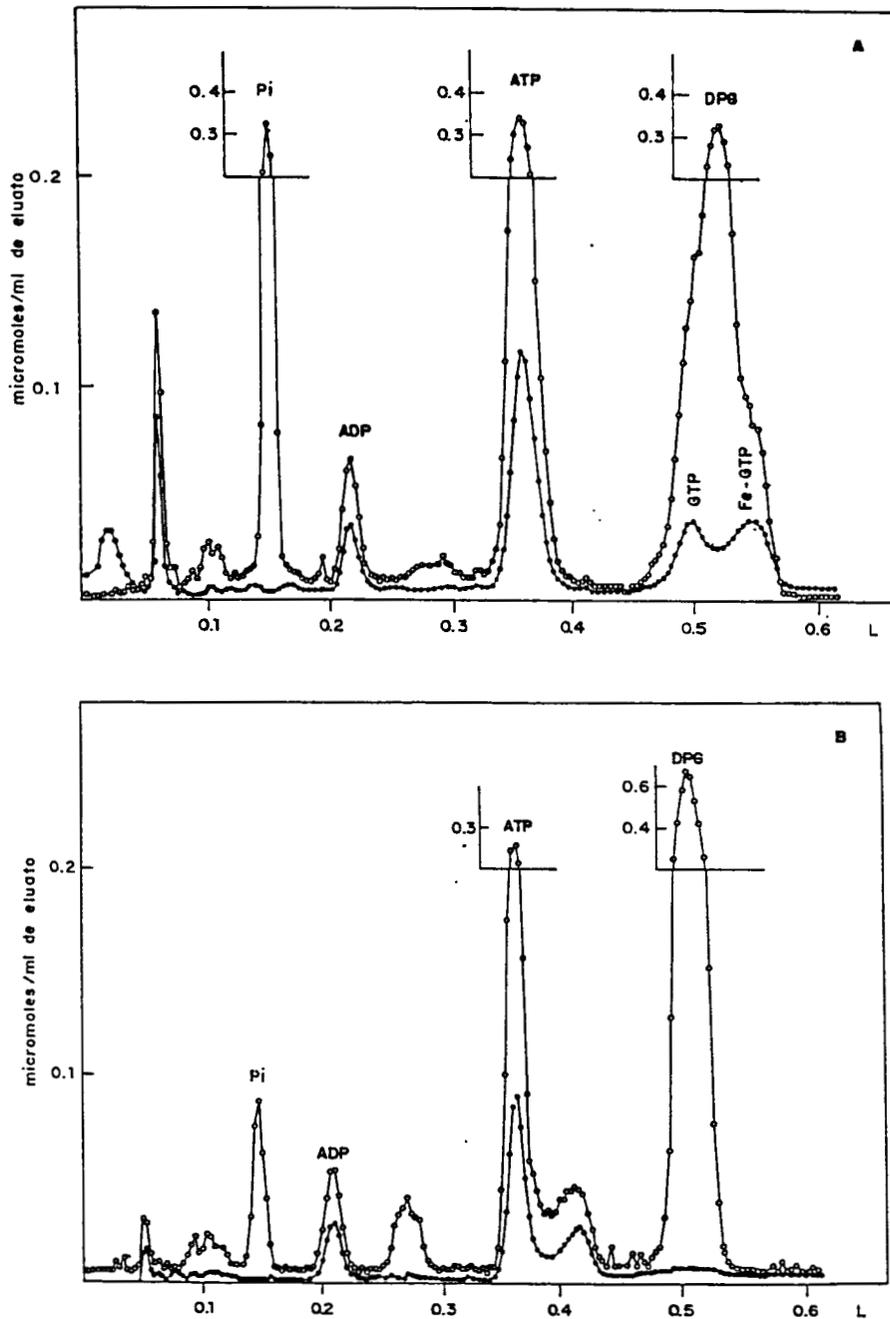


Figura 3.3. Perfil cromatográfico dos fosfatos intra-eritrocitários de *H. littorale* (A) e de humano (B). Eluição feita em 0,8 l de gradiente (0-5M) de ácido fórmico/formiato de amônio. As concentrações estão expressas em micromoles/ml de eluato. Absorbância em 260 nm calculada em micromoles de adenina ●—●; fósforo total ○—○.

TABELA 3.3. Concentrações dos diferentes fosfatos intraeritrocitários, obtidos nas análises cromatográficas, expressas em micromoles/ml de eritrócitos empacotados. As relações dos fosfatos com hemoglobina são expressas em mM NTP/mM Hb. A concentração mM de hemoglobina foi calculada dividindo-se o valor da CHCM por 6,45g% (DPG=2,3DPG).

	JUNHO	SETEMBRO	NOVEMBRO	JANEIRO	MARÇO
Pi	0,803	2,354	2,168	2,730	2,350
ADP	0,118	0,370	0,431	0,366	0,457
ATP	0,498	1,547	1,772	2,072	2,561
GTP	1,190	1,681	3,514	9,501	8,376
Fe-GTP	0,556	4,431	3,723	4,988	10,276
DPG	0,563	1,853	1,034	1,016	1,082
NTP*	1,688	3,228	5,286	11,573	10,937
ATP/GTP	0,418	0,920	0,504	0,218	0,306
DPG/NTP	0,334	0,574	0,196	0,088	0,099
PT**	2,807	9,882	10,474	17,943	25,103
ATP/PT	0,177	0,157	0,169	0,115	0,102
GTP/PT	0,424	0,170	0,335	0,530	0,334
DPG/PT	0,201	0,188	0,099	0,057	0,043
ATP/Hb	0,098	0,303	0,311	0,408	0,554
GTP/Hb	0,235	0,330	0,617	1,872	1,813
Fe-GTP/Hb	0,110	0,869	0,654	0,983	2,225
DPG/Hb	0,111	0,363	0,182	0,200	0,234

NTP* (ATP+GTP)

PT** (ADP+ATP+GTP+Fe-GTP+DPG)

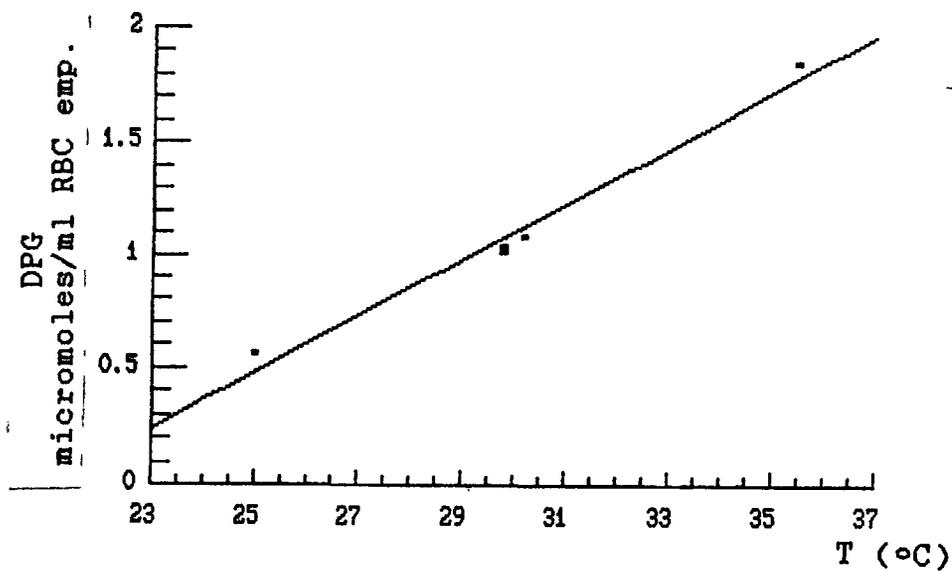


Figura 3.4. Correlação entre 2,3DPG e temperatura para *H. littorale* coletado na ilha da Marchantaria ($r=0,99$).

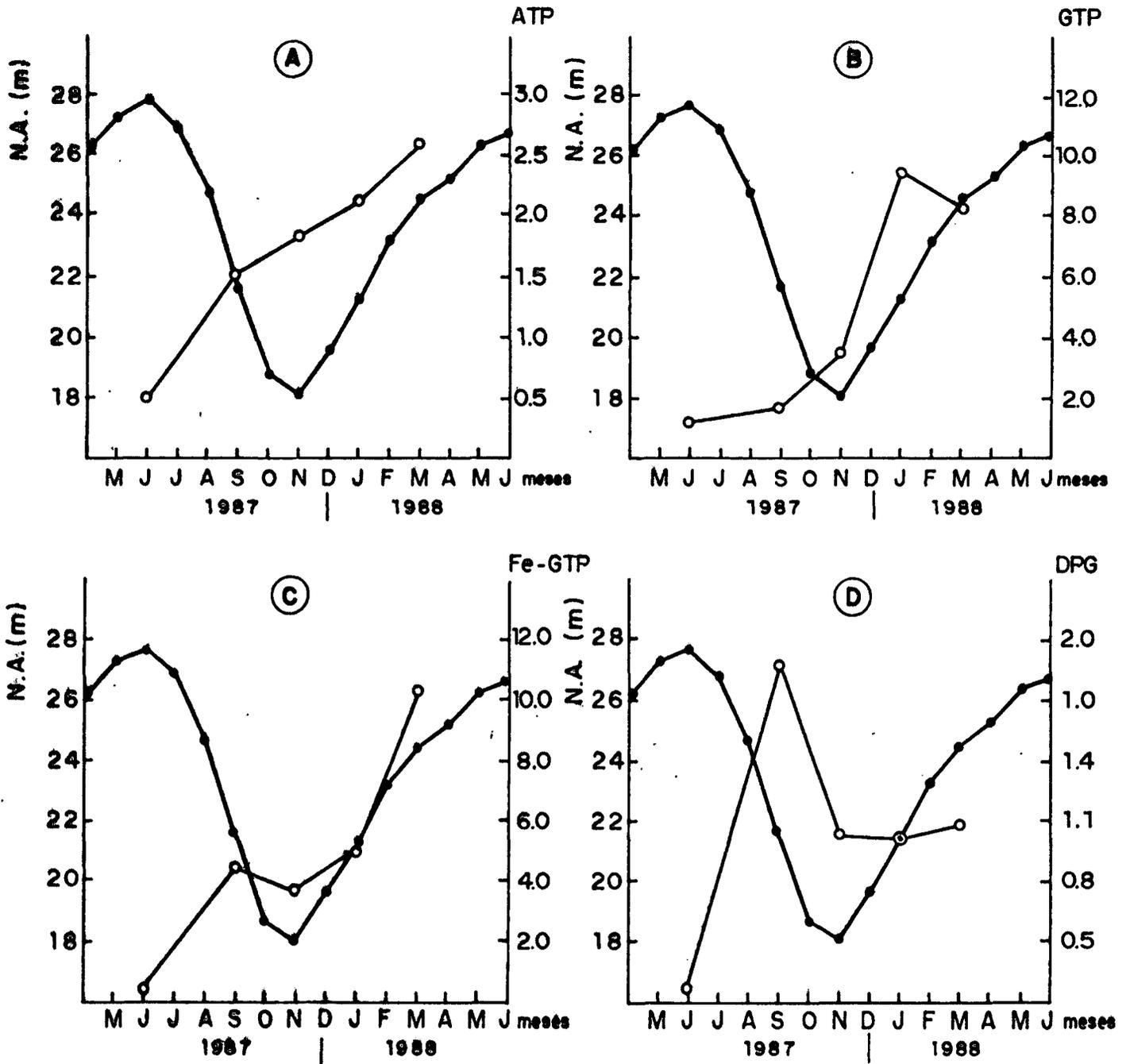


Figura 3.5. Nível da água no Porto de Manaus (—●—), e concentração intraeritrocitária (micromoles/ml de células empacotadas) de ATP (A), GTP (B), Fe-GTP (C) e 2,3DPG (D) de *H. littorale* nos diferentes meses de coleta.

observadas as oscilações do nível de água e das concentrações de ATP, GTP, Fe-GTP e 2,3DPG.

Apesar das razões Fe-GTP/Hb e GTP/Hb serem altas, nenhuma correlação significativa ($P < 0,05$) foi verificada entre estas e as variáveis ambientais estudadas. Entretanto, a razão 2,3DPG/Hb, que apresentou valores baixos, mostrou uma correlação significativa com a temperatura ($P < 0,01$) (Figura 3.6.). Nenhuma correlação foi verificada entre os fosfatos eritrocitários e os seis parâmetros hematológicos avaliados.

3.4. Equilíbrio de oxigenação do sangue

Na Figura 3.7., 3.8., e 3.9. é mostrado o efeito Bohr (ϕ) obtido no equilíbrio de oxigenação do sangue de *Hoplosternum littorale* nas diferentes coletas. A espécie apresentou efeito Bohr normal (correlação inversa entre pH e $\log P_{50}$) em todas as situações analisadas. A Tabela 3.4. apresenta os valores de ϕ ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) e $\log P_{50}$ em pH 7,0.

Das relações feitas entre ϕ e as variáveis ambientais medidas (oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água), observa-se correlação negativa entre ϕ e temperatura ($P < 0,05$) (Figura 3.10.), não sendo verificada nenhuma correlação com oxigênio e nível de água.

Os valores de efeito Bohr do sangue também foram avaliados *versus* os fosfatos eritrocitários (ATP, GTP, Fe-GTP e 2,3DPG), onde foi obtida correlação significativa ($P < 0,05$) entre ϕ e 2,3DPG (Figura 3.11a).

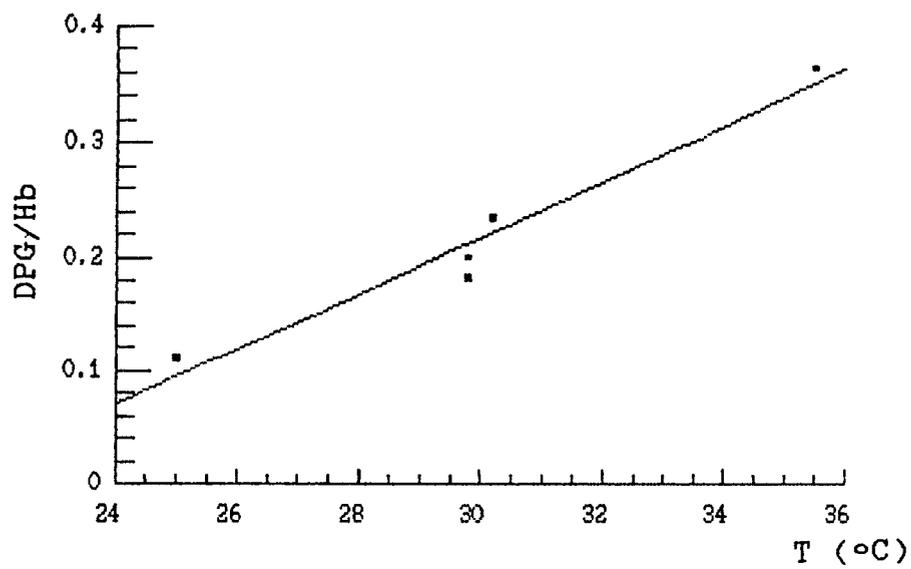


Figura 3.6. Correlação entre 2,3DPG/Hb (mM 2,3DPG/mM Hb) e temperatura (°C) para *H. littorale* ($r=0,98$).

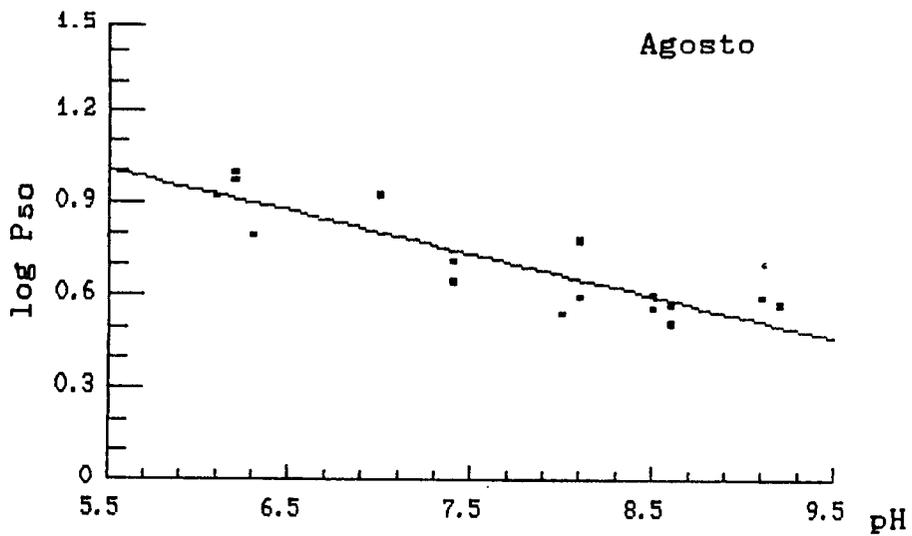
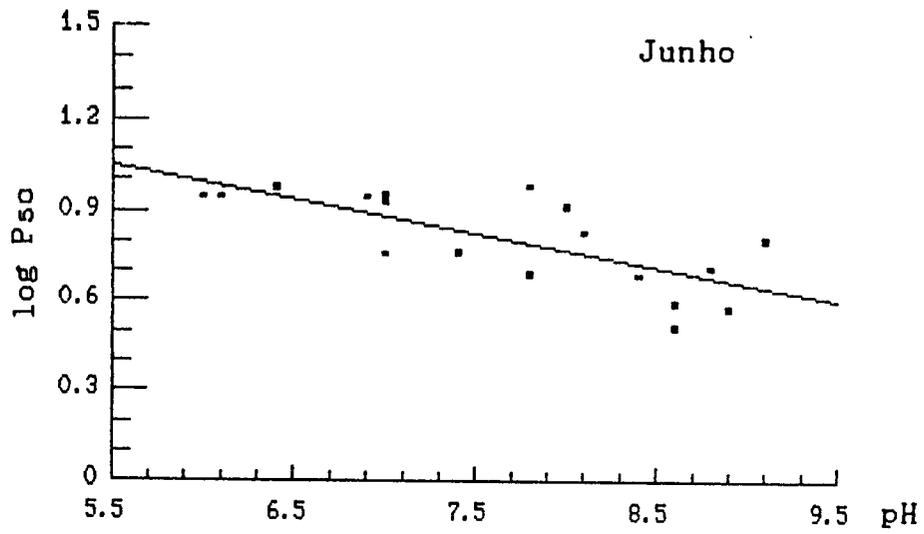


Figura 3.7. Efeito Bohr (ϕ) do sangue de *H. littorale* durante os meses de junho ($r=0,71$) e agosto ($r=0,87$).

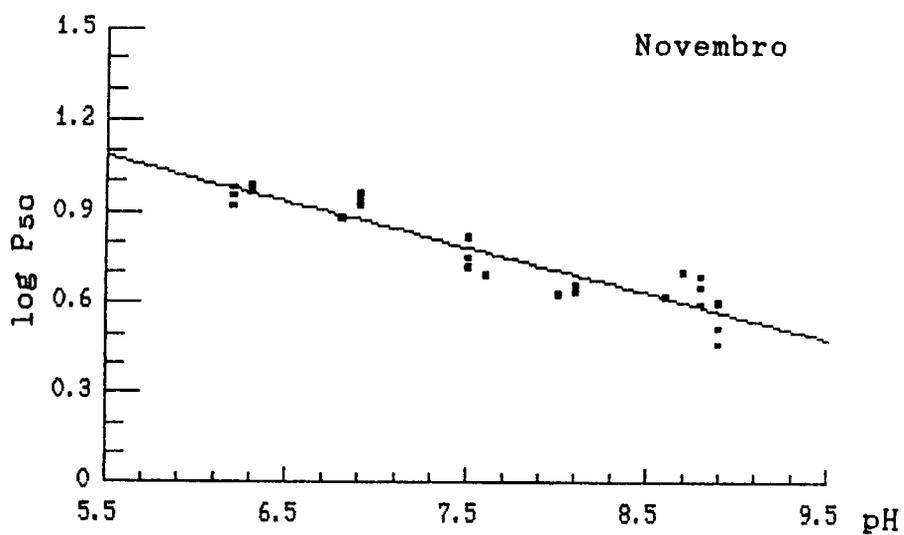
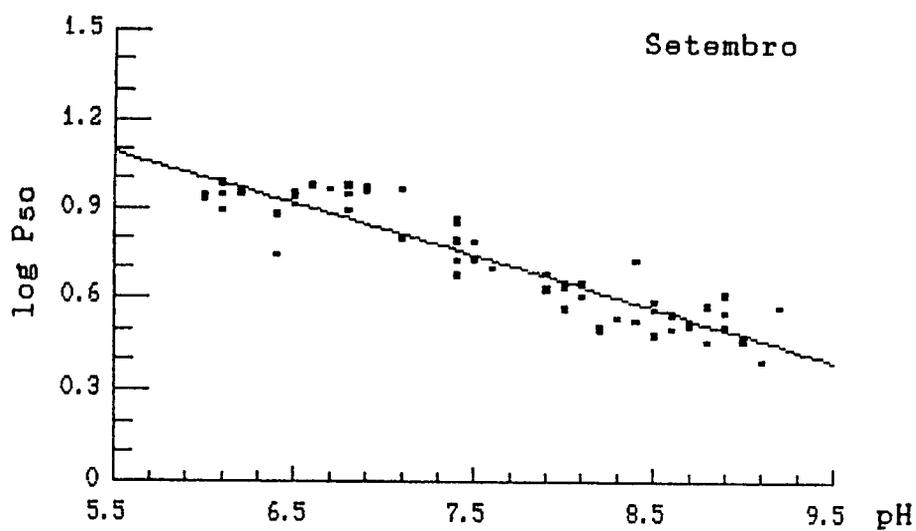


Figura 3.8. Efeito Bohr (ϕ) do sangue de *H. littorale* durante os meses de setembro ($r=0,92$) e novembro ($r=0,94$).

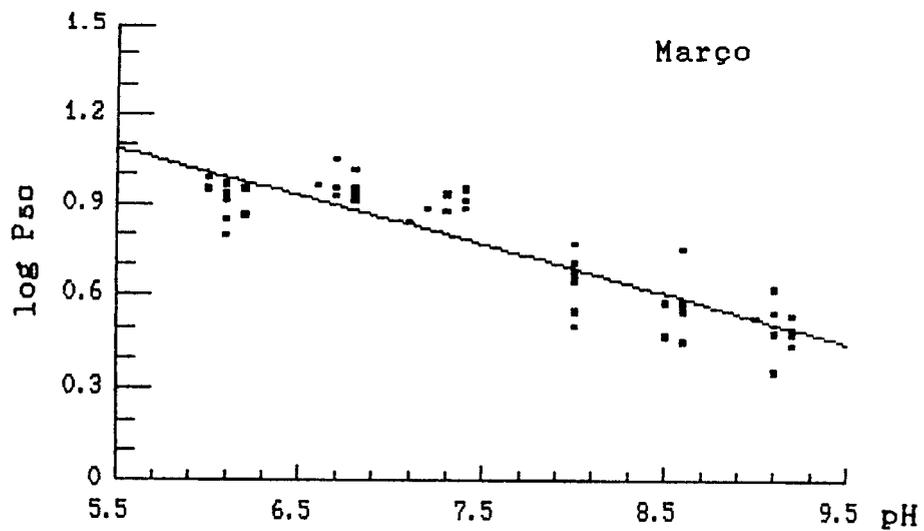
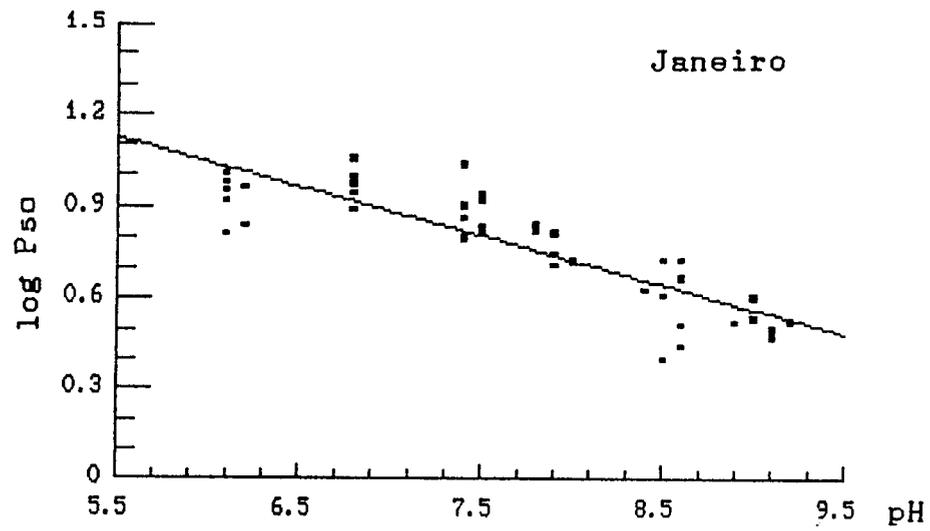


Figura 3.9. Efeito Bohr (ϕ) do sangue de *H. littorale* durante os meses de janeiro ($r=0,85$) e março ($r=0,88$).

Tabela 3.4. Valores de efeito Bohr ($\phi = \log P_{50} / \text{pH}$) e $\log P_{50}$ para sangue dos exemplares de *H. littorale* nas seis coletas.

	Efeito Bohr (ϕ)	$\log P_{50}$ pH 7,0
JUNHO	-0,110	0,880
AGOSTO	-0,135	0,803
SETEMBRO	-0,174	0,825
NOVEMBRO	-0,150	0,856
JANEIRO	-0,157	0,886
MARÇO	-0,160	0,849

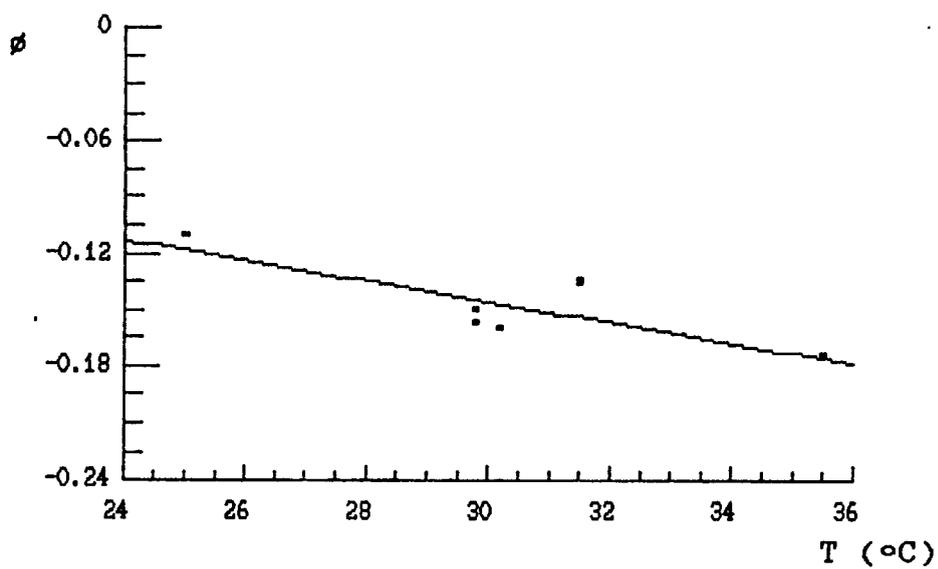


Figura 3.10. Correlação entre ϕ ($\Delta \log P_{\text{SO}}/\Delta \text{pH}$) e temperatura (°C) para *H. littorale* ($r=0,83$).

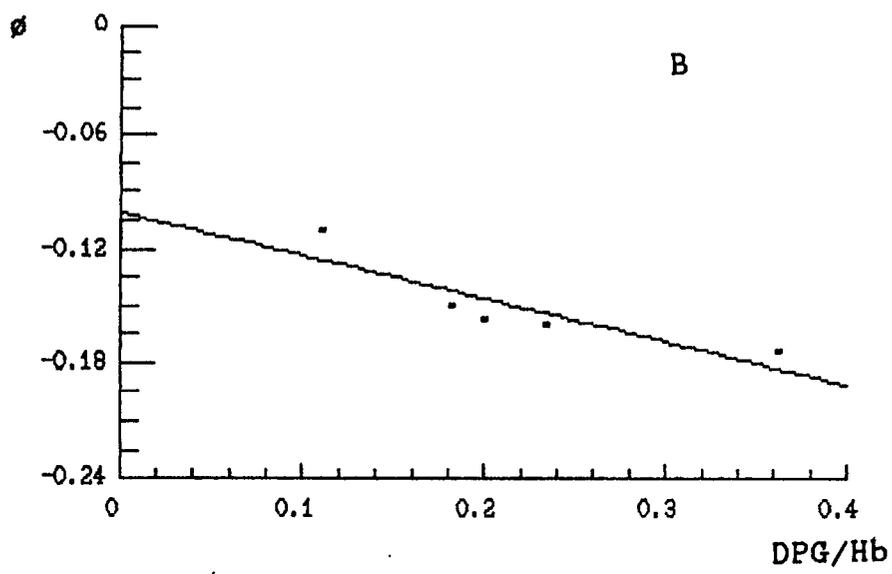
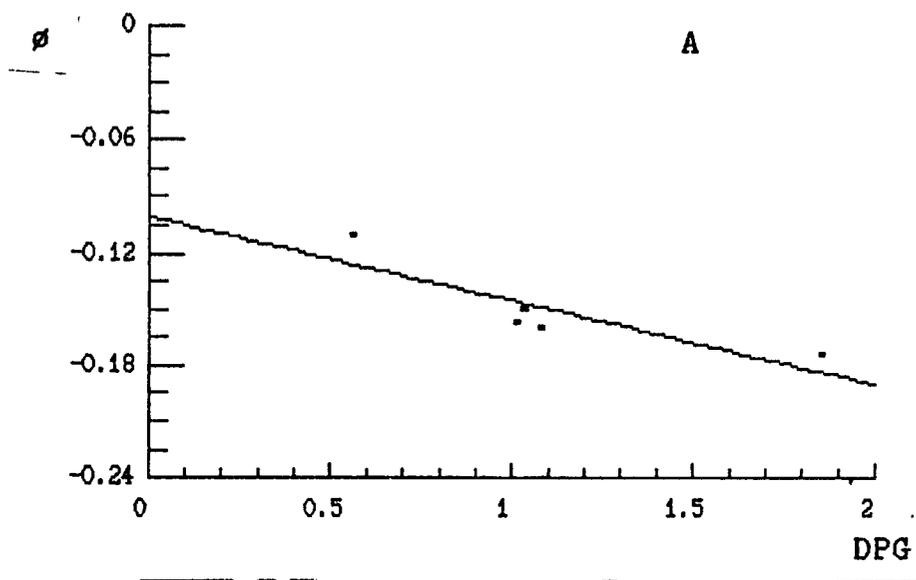


Figura 3.11. Correlação entre ϕ ($\Delta \log P_{50} / \Delta pH$) e 2,3DPG expresso em micromoles/ml de RBC empacotado (A, $r=0,86$) e entre ϕ e a razão 2,3DPG/[Hb] (B, $r=0,87$).

Além dessas correlações, os valores de efeito Bohr foram testados contra as razões ATP/Hb, GTP/Hb, Fe-GTP/Hb e 2,3DPG/Hb e os seis parâmetros hematológicos, dos quais somente ρ x 2,3DPG/Hb apresentou correlação significativa ($P < 0,05$) (Figura 3.11b).

3.5. Eletroforese em gel de amido e em gel de ágar amido

Os exemplares de *H. littorale* analisados, num total de 243, apresentaram 5 frações anódicas em gel de amido e 2 frações anódicas em gel de ágar amido (Figura 3.12.). Nos dois sistemas eletroforéticos, utilizou-se soluções tampão com pH 8,6 no gel e nas cubas, como descrito no item 2.2.4..

As frações II e V, numeradas do ânodo para o cátodo, apresentaram-se mais concentradas que as frações I, III e IV para todos os exemplares analisados. Considerando as frações II e V como as principais, podemos admitir que houve uma fusão das frações I e II e das frações III, IV e V em gel de ágar amido. Nenhum fenótipo variante foi detectado nos exemplares estudados nas 6 coletas.

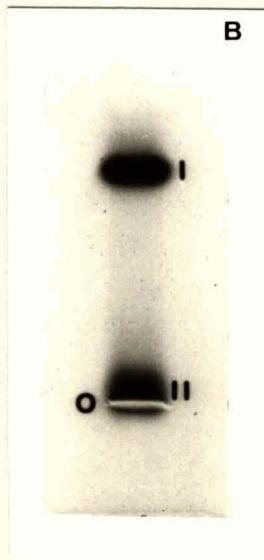
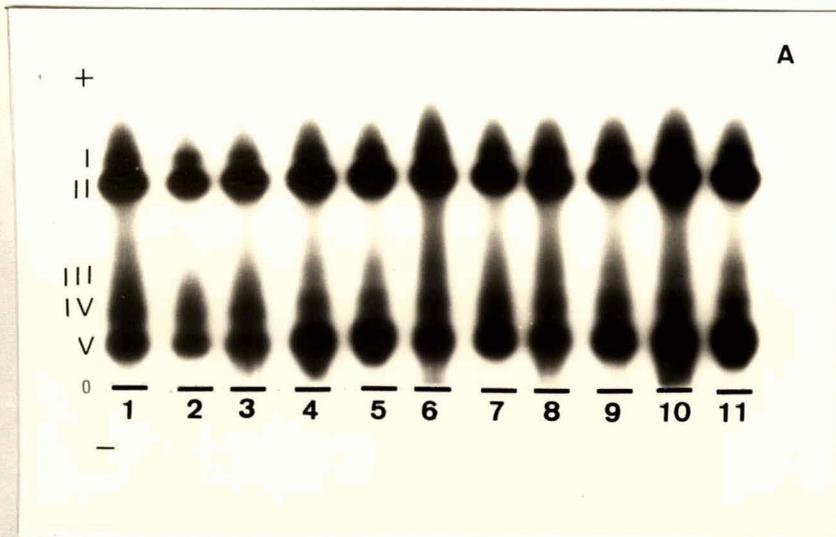


Figura 3.12. Separações eletroforéticas das hemoglobinas de *H. littorale* em gel de amido (A) e em lâminas de ágar-amido (B) em pH 8,6. Os números 1 a 11 referem-se a hemolisados de diferentes indivíduos.

4. DISCUSSÃO

4.1: Hemoglobinas: heterogeneidade eletroforética

O estudo de hemoglobinas tem revelado que quase todas as espécies de peixes possuem hemoglobinas múltiplas (RIGGS, 1970; POWERS & EDMUNDSON, 1972; FYHN et al., 1979; GALDAMES-PORTUS et al., 1982; ALMEIDA-VAL et al., 1985; PEREZ & RYLANDER, 1985; MONTEIRO et al., 1987; VAL et al., 1987).

Segundo RIGGS (1970), o suporte eletroforético, assim como o sistema de tampões utilizados, podem levar a uma variação no número de componentes eletroforéticos. Muitos autores utilizam eletroforese em gel de poliacrilamida na separação de hemoglobinas de peixes (FOURIE & VAN VUREN, 1976; FYHN et al., 1979; GARLICK et al., 1979; MARTIN et al., 1979; PEREZ, 1980; GALDAMES-PORTUS et al., 1982; PEREZ & RYLANDER, 1985). Apesar do grande poder de resolução desse suporte, VAL et al. (1987), estudando 22 espécies de peixes amazônicos, observaram um aumento no número de componentes hemoglobínicos detectados em gel de amido ao comparar com os padrões detectados em gel de poliacrilamida por FYHN et al. (1979) para as mesmas espécies. Em função disso, nosso grupo tem escolhido o gel de amido para a determinação dos padrões eletroforéticos de hemoglobinas de peixes (ALMEIDA-VAL et al., 1985; VAL et al., 1985; 1986; 1987; MONTEIRO et al., 1987). A utilização de eletroforeses em gel de ágar-amido, se deve à facilidade nas análises das concentrações relativas dos componentes hemoglobínicos.

Nas análises eletroforéticas de *H. littorale* foram utilizados o gel de amido e o gel de ágar-amido, ambos com o mesmo sistema de tampões. O padrão eletroforético obtido para essa espécie revelou 5 frações hemoglobínicas em gel de amido, sem que ocorressem variações fenotípicas nos diferentes períodos de coleta. Entretanto, em gel de ágar-amido apenas 2 frações foram evidentes. Sendo o gel de amido um meio de melhor resolução que o gel de ágar-amido, poderíamos supor que as frações secundárias observadas em gel de amido (I, III e IV) tenham sofrido uma fusão com as frações principais (II e V) (Figura 3.12.). O padrão eletroforético dessa espécie também foi estudado por outros autores, os quais detectaram somente 2 frações hemoglobínicas em gel de poliacrilamida (GARLICK et al., 1979; PEREZ, 1980; GALDAMES-PORTUS et al., 1982; PEREZ & RYLANDER, 1985).

KITCHEN (1974) supõe que as causas da heterogeneidade protéica podem ser de natureza genética, devido às diferenças na estrutura primária dos diferentes componentes hemoglobínicos e de natureza epigenética causada por alterações in vivo ou alterações artefatuais, ligadas à obtenção e preparação das amostras. Tais alterações devem-se principalmente à degradação por peptidases, metahemoglobinização, polimerização por pontes S-S intertetrameros, hemoglobinas assimétricas que não seguem o padrão $\alpha_2\beta_2$ (MIED & POWERS, 1978) e a dissociação em dímeros ou monômeros (BRIEHL, 1963).

DAFRÉ (1989), utilizando a eletroforese em gel de amido para a caracterização das hemoglobinas de duas espécies de tubarões, encontrou um aumento no número de frações hemoglobínicas nos hemolisados não tratados com agentes redutores de pontes S-S, concluindo que o aumento no número de frações deve-se à facilidade com que essas hemoglobinas formam dissulfetos mistos com a glutatona.

Assim, as três frações secundárias (I, III e IV) de *H. littorale*, detectadas por eletroforese em gel de amido, podem não ser, de fato, componentes hemoglobínicos de natureza genética e sim epigenética como descrito por KITCHEN (1974). Portanto, apesar da eficiência da eletroforese em gel de amido na caracterização de componentes hemoglobínicos, torna-se necessário a análise detalhada de frações secundárias presentes nessas eletroforeses.

Muitos autores têm constatado a presença de padrões eletroforéticos semelhantes para espécies filogeneticamente relacionadas (FYHN et al., 1979; WILHELM FO & REISCHL, 1981; ALMEIDA-VAL et al., 1985; VAL et al., 1986; 1987). GALDAMES-PORTUS et al. (1982) estudando hemoglobinas de siluriformes da Amazônia, encontraram duas frações hemoglobínicas tanto em *Hoplosternum littorale* como em *Hoplosternum thoracatum*, porém com diferentes mobilidades e destacaram a existência de fenótipos diferentes para as hemoglobinas de machos e fêmeas de *H. thoracatum*. O padrão eletroforético da hemoglobina de *H. thoracatum* obtido em nosso laboratório, revelou o mesmo número de

frações detectadas para *H. littorale* do presente trabalho, observando-se diferenças fenotípicas entre essas duas espécies, como descrito acima (dados não publicados).

A multiplicidade de componentes hemoglobínicos, ainda é muito questionada, uma vez que os resultados experimentais acumulados não são suficientemente definidos para explicar as origens e implicações funcionais das hemoglobinas múltiplas. Entretanto, as hipóteses avançam no sentido de que sistemas de múltiplas hemoglobinas, com diferentes propriedades funcionais, atuam como uma estratégia adaptativa dos peixes frente às flutuações ambientais (POWERS & EDMUNDSON, 1972; WEBER & DE WILDE, 1975; GARLICK et al., 1979; MARTIN et al., 1979; VAL, 1986; VAL et al., 1986; MONTEIRO et al., 1987).

Além disso, a aclimação de peixes a diferentes temperaturas tem mostrado variações significativas nas proporções relativas dos componentes hemoglobínicos e no número de frações (HOUSTON & CYR, 1974; HATTINGH, 1976; WEBER et al., 1976).

GARLICK et al. (1979) estudando hemoglobinas de *H. littorale* detectaram duas frações com propriedades funcionais diferentes, sendo uma delas com efeito Bohr reverso. Segundo esses autores, o efeito Bohr reverso poderia minimizar o efeito Root em condições ácidas, tal como durante a imersão, quando ocorre acúmulo do CO₂. Além disso a presença de duas hemoglobinas diferentes moduladas diferentemente pelos fosfatos orgânicos permite a essa espécie um controle mais amplo para enfrentar

mudanças na disponibilidade de oxigênio durante as variações sazonais.)

4.2. Hematologia

Estudos no sentido de desenvolver processos confiáveis de amostragem e análise do sangue de peixes têm sido implementados. Entretanto, a definição de padrões hematológicos normais continua sendo controversa (VAN VUREN & HATTINGH, 1978; SANDNES et al., 1988).

Dos parâmetros hematológicos medidos rotineiramente, o hematócrito tem sido o mais avaliado, graças à pequena quantidade de sangue necessária para análise, bem como graças à rapidez e facilidade na sua determinação, tanto no campo quanto no laboratório.

Os valores de hematócrito, em peixes, apresentam uma variação entre 10 e 59% (revisto por COBURN Jr & FISCHER, 1973). Muitos autores justificam esta variação como devida ao estresse por captura, aos anticoagulantes, às mudanças ambientais, à atividade, etc. (CASILLAS & SMITH, 1977, VAL, 1983; RAMBHASKAR & SRINIVASA-RAO, 1987; DHEER, 1988; KORCOCK et al., 1988).

Segundo LARSSON et al. (1976), as variações dos valores de hematócrito dos teleósteos são devidas, provavelmente, a uma adaptação fisiológica evolutiva ao modo de vida e habitat ecológico, sendo que os menores valores são encontrados em

espécies de movimentos lentos, hábitos sedentários e bentônicos e os maiores valores em espécies pelágicas e ativas/.

Pelas médias dos valores de hematócrito obtidas para *H. littorale* (Tabela 3.2.), a hipótese acima não pode ser generalizada, uma vez que as médias obtidas são relativamente altas para esta espécie que tem movimento lento e hábito sedentário.

Os valores médios de RBC determinados para *H. littorale* apresentaram uma variação entre 1,77 e 2,46 milhões/mm³. Tal variação está dentro dos limites encontrados para a maioria dos peixes da Amazônia (VAL, 1983; 1986; AMADIO, 1986; MONTEIRO et al., 1987).

A ausência de correlações entre os valores de RBC e as três variáveis ambientais medidas, sugere que algum outro fator, tanto intrínseco quanto extrínseco, deva estar relacionado às diferenças observadas nos mesmos para a espécie em questão.

Uma vez que a capacidade do sangue em transportar oxigênio depende da concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos, sua avaliação pode ser considerada significativa no entendimento das relações ecológicas e fisiológicas dos peixes. Muitos autores têm demonstrado que as variações nas concentrações de hemoglobina de peixes podem ser influenciadas pelos hábitos lentos ou ativos e que fatores ambientais como disponibilidade de oxigênio, temperatura e nível de água, podem também explicar as variações nesse parâmetro (WELLS et al., 1980; VAL, 1983; 1986; GRAHAM et al., 1985; DAFRE, 1989).

X Segundo LENFANT & JOHANSEN (1976) existe uma tendência dos peixes de respiração aérea apresentarem maiores concentrações de hemoglobina. SIAKEPERE (1985) acredita que o alto valor da concentração de Hb (14,56 g%) obtido para *Clarias isheriensis* ^{Tropical} reflete seu caráter de respiração aérea e alta atividade. SINGH et al. (1976), analisando a espécie *Amphipnous cuchia*, supõem que os altos valores da concentração de hemoglobina (17,8 a 20,8 g%) estão relacionados à respiração e habitat em águas hipóxicas, e não ao seu hábito, uma vez que essa espécie é de hábito lento. Os valores da concentração de Hb (11,08 a 16,07 g%) obtidos para *H. littorale* parecem confirmar a hipótese de que peixes de respiração aérea apresentam maior concentração de hemoglobina. Contudo, os dados do presente estudo não confirmam o que é proposto em relação ao hábito.

O sangue de peixes contém populações heterogêneas de eritrócitos, onde células imaturas são geralmente pequenas e contém menos hemoglobina do que as células maduras (SANDNES et al., 1988). De acordo com os dados encontrados nesse trabalho, a correlação positiva entre hemoglobina e hematócrito e a ausência de correlação entre esses dois parâmetros com RBC, poderia ser explicada pela entrada e saída de células vermelhas dos órgãos de estoque ou ainda pela entrada de células imaturas dos órgãos eritropoiéticos na circulação. Supomos ainda que as mudanças sazonais estão envolvidas nessas alterações.

VCM, HCM e CHCM são de extrema importância na avaliação e classificação morfológica do sangue (SCOOT & ROGERS, 1981;

HARDING & HOGLUND, 1984). Segundo SZARKI (1970), eritrócitos maiores teriam valor adaptativo, pois células grandes seriam mais econômicas para produzir-se e manter-se do que células pequenas. Entretanto, HOLLAND (1970) demonstrou que a taxa de combinação Hb/O₂ está inversamente relacionada ao volume celular.

O tamanho dos eritrócitos circulantes tem sido relacionado com a atividade do animal, variação sazonal, temperatura, eritrócitos imaturos em circulação, turgescência da célula, entre outros fatores (SOIVIO et al., 1974; DENTON & YOUSEF, 1975; HARDIG & HOGLUND, 1984; GRAHAM et al., 1985; VAL, 1986).

Os valores de VCM para *H. littorale* estão entre os valores médios encontrados para a grande maioria das espécies de peixes até agora estudada. As variações observadas nos valores de VCM não podem ser explicadas diretamente pelas mudanças ambientais de oxigênio dissolvido, temperatura e nível de água. Tais variações devem ser uma consequência da quantidade de hemoglobina por unidade de célula (HCM) (Figura 3.2b.).

Uma vez que as variações de VCM e HCM não apresentaram correlações com nenhuma das variáveis ambientais medidas no presente trabalho, acreditamos que outros fatores, endógenos (maturação gonadal, desova, ajustes metabólicos, entre outros) e/ou exógenos (doenças causadas por parasitas, disponibilidade de alimento, variações de outros parâmetros químicos e físicos da água, entre outros), influenciem as variações observadas.

A CHCM, comparada aos outros parâmetros hematológicos, varia pouco entre os vertebrados, sendo os menores valores encontrados nos peixes e nas lampréias e os maiores em vertebrados superiores (WINTROBE, 1933). As médias dos valores de CHCM obtidas para *H. littorale* estão entre os valores encontrados para outros peixes da Amazônia (VAL, 1983; 1986; AMADIO, 1986; MONTEIRO et al., 1987; SALVO-SOUZA, em prep.).

Apesar de nenhum dos parâmetros hematológicos estudados apresentarem correlações significativas ($P > 0,05$) com as variáveis ambientais medidas, os maiores valores médios dos parâmetros hematológicos obtidos para essa espécie foram encontrados no mês de novembro (baixo nível de água) e os menores em março (alto nível de água). As oscilações do nível de água determinam uma série de interações no ambiente aquático, que por sua vez podem exercer considerável influência sobre a biologia dos animais (VAL, 1983; 1986; AMADIO, 1986; MONTEIRO et al., 1987). Entre essas interações destacamos a disponibilidade de habitats, a disponibilidade de alimentos, a predação, entre outros.

AMADIO (1986), estudando as espécies *Semaprochilodus insignis* e *Semaprochilodus taeniurus*, obteve maiores valores de Ht, [Hb] e RBC para os exemplares coletados em açudes, em relação aos valores obtidos para os exemplares coletados em lagos e rios e supõe que tais diferenças ocorrem em função da condição de estresse por falta de espaço físico. Segundo SRIVASTAVA & SAHAI (1987) o aumento nos valores de Ht, [Hb] e RBC para a espécie *Heteropneustes fossilis*, pode ser atribuído ao estresse causado

pelo aumento da densidade populacional. Assim, acreditamos que o confinamento em lagos muito rasos e com grandes quantidades de peixes durante o mês de novembro, provavelmente levaram os indivíduos da espécie *H. littorale* a um maior estresse, tanto fisiológico como comportamental e, com isso, a uma maior necessidade de transporte de oxigênio para os tecidos.

No mês de março, todos os espécimens foram capturados em águas com alta concentração de gás sulfídrico (H_2S). Segundo SANTOS (1979) os lagos de várzea durante a cheia apresentam água pobre em oxigênio e rica em H_2S , o que pode causar a morte de um grande número de animais. /Esse gás, quando em grandes concentrações, é altamente tóxico pois ao combinar-se com a hemoglobina torna-a inativa do ponto de vista respiratório (LONGWELL & PENTELow, 1935; JONES, 1969). KULAKKATTOLICKAL & KRAMER (1988) sugeriram que a respiração aérea em *Clarias macrocephalus* aumenta a resistência a agentes tóxicos pela diminuição da taxa de ventilação branquial, diminuindo, assim, o fluxo de substâncias tóxicas sobre o epitélio branquial que é o principal local de absorção. Portanto, podemos supor que a sobrevivência de *H. littorale* nesse local deve-se, provavelmente, à utilização da respiração aérea. Pelos resultados obtidos com os parâmetros hematológicos (Tabela 3.2.) durante essa coleta, podemos supor ainda que o H_2S absorvido, mesmo em pequenas quantidades, pode levar os indivíduos dessa espécie a uma anemia, uma vez que todos os parâmetros hematológicos, com exceção de RBC, apresentaram valores muito baixos. Segundo HARDIG & HOGLUND

(1984), a diminuição do Ht e da concentração de Hb, que são negativamente correlacionadas com RBC inaturas, provavelmente atuam como "gatilho" da eritropoiese durante a variação sazonal em *Salmo salar*. Portanto, supomos que o aumento de RBC e a diminuição dos demais parâmetros hematológicos em *H. littorale* representem o aumento de RBC inaturas. Assim, além da respiração aérea, o aumento de RBC pode ser uma estratégia adaptativa importante no transporte de oxigênio para a espécie frente às altas concentrações de H₂S.

As variações nos parâmetros hematológicos de *H. littorale* podem ser o reflexo de um conjunto de interações entre mudanças ambientais sazonais, comportamento, e mecanismos fisiológicos endógenos que são temporariamente coordenados.

4.3. Fosfatos eritrocitários

Os fosfatos orgânicos presentes nas células vermelhas dos vertebrados foram descritos bem antes de se conhecer o seu significado funcional (RAPOPORT & GUEST, 1941). Somente a partir dos estudos realizados por BENESCH & BENESCH (1967) e CHANUTIN & CURNISH (1967), com células vermelhas de mamíferos, ficou estabelecida a função moduladora dos fosfatos sobre a afinidade da hemoglobina com o oxigênio.

Atualmente, é possível definir, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, os tipos de fosfatos predominantes em muitos vertebrados. Em mamíferos, o composto

fosfatado característico é o 2,3DPG (difosfoglicerato), com exceção de gatos e alguns ruminantes, onde, em função da ocorrência de baixas concentrações, não apresenta um efeito importante na regulação do transporte de oxigênio (BARTLETT, 1970). A síntese de 2,3DPG é estimulada em condições hipóxicas, quando este composto se liga à desoxihemoglobina circulante, o que resulta na diminuição de sua afinidade com o oxigênio. Apesar de bem estabelecida a sua função no homem, ainda não foi determinado se a presença desse composto em outros vertebrados tem algum significado funcional (BARTLETT, 1976a; BARTLETT & BORGESE, 1976).

Vários tipos de fosfatos tem sido detectados nas células vermelhas de aves, tais como o 2,3DPG, que apresenta-se em altas concentrações no final do desenvolvimento embrionário, desaparecendo no período recém-nato; o IP_5 (inositol pentafosfato), que também está presente nas células vermelhas de embriões de aves, alcançando níveis relativamente altos nos adultos, sendo o composto responsável pela modulação da afinidade da hemoglobina com oxigênio; o ATP que apresenta variações quantitativas desde o desenvolvimento embrionário até a forma adulta e outros compostos como IP_3 (inositol trifosfato), IP_4 (inositol tetrafosfato) e IP_6 (inositol hexafosfato) que se apresentam em concentrações muito baixas, cerca de 5% do total de IP_5 . Apesar da grande maioria das aves apresentarem esse quadro, algumas exceções foram verificadas por ISAACKS et al. (1977b) em *Struthio camelus*, onde a concentração de IP_4 foi duas vezes maior

que a de IPs, e por BARTLETT (1982a) em embriões de aves não voadoras, *Dromaius novaehollandiae* e *Pterocnemia pennata*, onde há ausência de 2,3DPG nas células vermelhas.

BARTLETT (1976a), analisando células vermelhas de algumas espécies de répteis, detectou a presença de 2,3DPG e IPs somente em tartarugas. Diferente das aves, a concentração de 2,3DPG mantém-se elevada em tartarugas recém-natas, diminuindo gradualmente no primeiro ano após o nascimento. Quanto ao IPs, está ausente no embrião, aparecendo uma pequena quantidade durante o período recém-nato e atingindo concentração máxima em um ano, nível em que é mantido. Apesar de estar sempre em altas concentrações, o ATP apresenta grandes variações durante o desenvolvimento dos répteis. BARTLETT (1976a) estudou, ainda, alguns anfíbios e detectou a presença de 2,3DPG e ATP em altas concentrações nos estágios branquial e pulmonar e nenhuma das espécies examinadas apresentou uma quantidade considerável de IPs.

Em peixes, a distribuição e a função dos fosfatos orgânicos intraeritrocitários são menos estudadas que em animais superiores. Apesar da descoberta inicial de que o ATP possui ação no controle da afinidade da hemoglobina com o oxigênio em peixes (GILLEN & RIGGS, 1971; WOOD & JOHANSEN, 1972), estudos posteriores feitos com um maior número de espécies mostraram a presença de outro importante fosfato eritrocitário: o GTP, que foi encontrado, em predominância, em *Anguilla rostrata* (GEOGHEGAN & POLUHOWICH, 1974) e *Tilapia grahani* (LYKKEBOE et al., 1975).

Além dessas espécies, vários autores encontraram GTP em maior concentração que ATP nos eritrócitos de peixes da Amazônia (BARTLETT, 1978c; ISAACKS et al., 1978a; VAL et al., 1984; 1985; no prelo; VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987). Outros tipos de fosfatos têm sido detectados em peixes como: IP₁ em *Arapaima gigas*, IP₂ em *Lepidosiren paradoxa* e 2,3DPG em *Pterygoplichthys* sp e *Cichlasoma cyanoguttatum* (GILLEN & RIGGS, 1971; ISAACKS et al., 1977a; 1978ab; BARTLETT, 1978ab).

Evolutivamente, a presença de 2,3DPG e IP₁ nas células vermelhas de diferentes vertebrados ainda não tem nenhuma explicação significativa. BARTLETT (1982b) postula a hipótese de que a evolução do 2,3DPG tenha ocorrido por uma simples mutação no ancestral de lampréias e que estas evoluíram a anfíbios, onde esse composto foi mantido através do processo evolutivo. A presença de 2,3DPG em répteis e mamíferos pode, então, ser explicada pela existência de um ancestral comum entre esses grupos e os anfíbios; tendo o composto desaparecido apenas em crocodilos e lagartos. Nesse trabalho, o autor sugere ainda que os "hagfish" tenham dado origem aos peixes verdadeiros.

Entretanto, como pode ser verificado na Tabela 4.1., o 2,3DPG também está presente nos eritrócitos de *Cichlasoma cyanoguttatum* (Perciformes), *Pterygoplichthys* sp e *Hoplosternum littorale* (Siluriformes). Assim, a hipótese acima, aparentemente, não é verdadeira e se seguirmos essa linha de raciocínio, as

Tabela 4.1. Fosfatos intraeritrocitários em vertebrados.

Espécies	2,3DPG	ATP	GTP	Fe-GTP	IP ₂	IP ₄	IP ₆	IP ₈	Refs.
Maníferos									
<i>Homo sapiens</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	a
<i>Ratus ratus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	b
<i>Coelhus coelhus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Felix catus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	a
Aves									
<i>Columba livia</i> (A)	+	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Columba livia</i> (B)	-	+	+	-	-	-	+	-	a
<i>Larus occidentalis</i> (A)	+	+	+	-	-	+	+	-	a
<i>Larus occidentalis</i> (B)	-	+	+	-	-	-	+	-	a
<i>Struthio camelus</i> (A)	+	+	+	-	-	-	+	-	a
<i>Struthio camelus</i> (B)	-	+	+	-	-	+	+	-	a
<i>Dromaius novaehollandiae</i> (A)	-	+	+	-	-	-	+	-	c
<i>Dromaius novaehollandiae</i> (B)	-	+	+	-	-	+	+	-	c
<i>Pterocnemia pennata</i> (A)	-	+	+	-	-	-	+	-	c
<i>Pterocnemia pennata</i> (B)	-	+	+	-	-	+	+	-	c
<i>Gallus domesticus</i> (A)	+	+	-	-	-	-	+	-	d
<i>Gallus domesticus</i> (B)	-	+	+	-	-	+	+	-	d
<i>Anas domesticus</i> (A)	+	+	-	-	-	-	+	-	d
<i>Anas domesticus</i> (B)	-	+	+	-	-	+	+	-	d
Répteis									
<i>Lepidochelys olivacea</i> (C)	+	+	-	-	-	-	-	-	a
<i>Lepidochelys olivacea</i> (B)	-	+	+	-	-	-	-	+	a
<i>Chelydra serpentina</i> (A)	+	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Chelydra serpentina</i> (B)	-	+	+	-	-	-	-	+	a
<i>Pseudemis scripta</i> (C)	+	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Pseudemis scripta</i> (B)	+	+	+	-	-	-	-	+	a
<i>Iguana iguana</i> (A)	-	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Iguana iguana</i> (B)	-	+	+	+	-	-	-	+	a
<i>Elaphe obsoleta</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	a
<i>Boa constrictor</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	a
<i>Aligator mississippiensis</i> (A)	+	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Aligator mississippiensis</i> (B)	-	+	+	-	-	-	-	-	a
<i>Crocodylus niloticus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	a
<i>Crocodylus moreletii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	a
<i>Chelonia mydas</i> (A)	+	+	-	-	-	-	-	-	e
<i>Chelonia mydas</i> (B)	-	+	+	-	-	-	+	-	e

Tabela 4.1. Continuação

Espécies	2,3DPG	ATP	GTP	Fe-GTP	IP ₂	IP ₄	IP ₆	IP ₈	Refs.
Anfíbios									
<i>Rana catesbiana</i> (D)	+	+	+	+	-	-	+	-	e
<i>Rana catesbiana</i> (E)	+	+	+	-	-	-	+	-	e
<i>Ambistoma tigrinum</i> (D)	+	+	+	-	-	-	-	-	e
<i>Ambistoma tigrinum</i> (E)	+	+	+	-	-	-	-	-	e
Peixes									
Myxiniiformes									
<i>Eptatretus stoutii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	f
<i>Entosphenus tridentatus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	f
Squaliformes									
<i>Squalus acanthias</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	g,h
<i>Squalus acanthias</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	i
<i>Narcacion nobiliana</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	i
<i>Mustelus canis</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	g
Chimaeriformes									
<i>Hydrolagus colhei</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	h
Dipnoi									
<i>Lepidosiren paradoxa</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	j
<i>Protopterus aethiopicus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	j
Anguilliformes									
<i>Anguilla rostrata</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	k
<i>Gymnothorax mordax</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	l
Osteoglossiformes									
<i>Arapaima gigas</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	m,n
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	n
Clupeiformes									
<i>Engraulis mordax</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	l
Salmoniformes									
<i>Oncorhynchus nerka</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	h
Characiformes									
<i>Mylossoma duriventris</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	o
<i>Prochilodus nigricans</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	p
<i>Semaprochilodus taeniurus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	q
<i>Semaprochilodus insignis</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	q
<i>Colossooa macropomum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	r
Siluriformes									
<i>Pterygoplichthys</i> sp	+	+	+	-	-	-	-	-	s
<i>Pterygoplichthys multiradiatus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	t
<i>Hoplosternum littorale</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	u
Gymnotiformes									
<i>Synbranchus marmoratus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	h
Perciformes									
<i>Scomber japonicus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	h
<i>Katsuwonus pelamis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	l
<i>Cichlasoma cyanoguttatum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	v

Tabela 4.1. Continuação

- A- Embrião
- B- Adulto
- C- Recém-nato
- D- Estágio de desenvolvimento aquático
- E- Estágio de desenvolvimento terrestre

Referências

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| a) Bartlett (1978c) | b) Bartlett (1976b) |
| c) Bartlett (1982a) | d) Bartlett & Borgese (1976) |
| e) Bartlett (1976a) | f) Bartlett (1982c) |
| g) Bartlett (1982d) | h) Bartlett (1978d) |
| i) Borgese & Nagel (1978) | j) Bartlett (1978b) |
| k) Bartlett (1979) | l) Bartlett (1980) |
| m) Isaacks et al. (1977a) | n) Bartlett (1978a) |
| o) Monteiro et al. (1987) | p) Val et al (em prep.) |
| q) Val et al. (1986) | r) Val (1986) |
| s) Isaacks et al. (1978b) | t) Val et al. (no prelo) |
| u) presente estudo | v) Gillen & Riggs (1971) |

lampréias teriam dado origem aos peixes verdadeiros e não os "hagfish". A presença de 2,3DPG nessas três espécies pode ser vantajosa ao animal e, em função disso, as informações genéticas relativas à sua produção podem ter se fixado, o que provavelmente não aconteceu nas demais espécies, onde as mesmas podem ter desaparecido.

Quanto à presença de IP₂ nos vertebrados, BARTLETT (1978a) sugere que esse composto, provavelmente, ocorreu primeiro em grandes concentrações nas células vermelhas de um ancestral dos répteis, os quais posteriormente divergiram para aves e tartarugas. Segundo BARTLETT (1980), a presença de 2,3DPG e IP₂ nesses vertebrados suportam a hipótese de que as aves estão mais intimamente relacionadas às tartarugas do que a outros répteis; e que a presença de IP₂ em baixas concentrações nas células vermelhas de tartarugas sugerem que esse composto não desempenhe função modulatória da afinidade da hemoglobina com o oxigênio. A alta concentração de IP₂ nos eritrócitos de *Arapaima gigas* detectada por ISAACKS et al. (1977a) e BARTLETT (1978a), levaram os autores a sugerir que a presença desse composto em peixes, do ponto de vista evolutivo, parece ser um fato isolado, uma vez que não está presente em nenhum outro teleósteo estudado, inclusive *Osteoglossum bicirrhosum* que como *A. gigas*, pertence à família Osteoglossidae.

BARTLETT (1982a) acredita que a alta concentração de 2,3DPG e IP₂ nas células vermelhas de alguns vertebrados pode ser o resultado de alterações metabólicas relacionadas à produção

desses compostos, as quais foram mantidas durante a evolução devido às vantagens dos mesmos na regulação do transporte de oxigênio.

Vários autores tentam verificar se as variações nas concentrações dos fosfatos eritrocitários conferem algum valor adaptativo aos peixes. ISAACKS et al. (1978a) questionam a possibilidade de que somente IP₃ exerça a função moduladora na diminuição da afinidade Hb-O₂ em *A. gigas*, e supõem que IP₃ em combinação com GTP possa regular a função da hemoglobina. VAL et al. (1989) encontraram, para essa espécie, uma relação direta entre a concentração de IP₃ e o comprimento do animal e acreditam que a presença desse composto deve refletir uma estratégia adaptativa do animal, podendo estar relacionado com suas características bioquímicas de respiração aérea obrigatória e rápido crescimento.

Da mesma forma, a função do 2,3DPG detectado em *Cichlasoma cyanoguttatum* e *Pterygoplichthys* sp ainda não está bem estabelecida. GILLEN & RIGGS (1971) supõem que a concentração de 2,3DPG (0,19 µM/ml de RBC) presente nos eritrócitos de *C. cyanoguttatum* não seja suficiente para modular a afinidade da Hemoglobina com o O₂ nessa espécie. ISAACKS et al. (1978b) sugerem que a alta concentração de 2,3DPG (1,9 µM/ml de RBC) nos eritrócitos de *Pterygoplichthys* sp apresente um papel funcional na modulação da afinidade Hb-O₂. VAL et al. (no prelo), entretanto, não detectaram 2,3DPG em *Pterygoplichthys*

multiradiatus e questionam a presença desse composto em *Pterygoplichthys* sp.

Vários autores têm encontrado um efeito modulador do ATP e do GTP na afinidade Hb-O₂ de todas as espécies de peixes estudadas (KALOUSTIAN & POLUHOWICH, 1976; VAL et al., 1984; 1985; no prelo; MONTEIRO et al., 1987). BARTLETT (1980) afirma que a diminuição ou o aumento na concentração de GTP e/ou ATP em peixes não apresenta, aparentemente, uma relação com a posição taxonômica, hábito e habitat da espécie, e que tais variações podem ser decorrentes do estado fisiológico do animal como uma resposta às modificações ambientais.

MONTEIRO et al. (1987) supõem que tanto o ATP quanto o GTP sejam importantes moduladores da afinidade da Hb-O₂ em *Mylossoma duriventris*, uma vez que as variações de suas concentrações intraeritrocitárias estão relacionadas às variações sazonais na concentração do oxigênio e no nível da água. O mesmo foi verificado nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* e *Prochilodus nigricans* (VAL, 1986; VAL et al., em prep.).

WEBER et al. (1979) mostraram que a concentração de ATP diminui menos que a concentração de GTP quando as espécies *Hypostomus* sp e *Pterygoplichthys* sp são aclimatadas a condições hipóxicas e sugeriram que as modificações na afinidade Hb-O₂ podem ser influenciadas primeiramente pelo GTP. Tal suposição também é consubstanciada por VAL et al. (no prelo) trabalhando com *Pterygoplichthys multiradiatus*.

Em alguns peixes, a afinidade Hb-O₂ aumenta durante a aclimatação a altas temperaturas. GREANEY & POWERS (1977) verificaram que a relação ATP/Hb em *Fundulus heteroclitus* diminui com o aumento da temperatura e que tal relação é independente da disponibilidade de oxigênio. Entretanto, os mesmos autores, simulando condições naturais para *Fundulus heteroclitus*, sugeriram que o aumento de temperatura provavelmente diminui o oxigênio dissolvido para níveis que levam à hipóxia e que ambos atuam no controle dos fosfatos eritrocitários. ALBERS et al. (1983) observaram que, durante a aclimatação em altas temperaturas, a diminuição do ATP é um dos fatores que possivelmente contribui para o aumento da afinidade Hb-O₂ em *Cyprinus carpio*.

De acordo com os resultados obtidos para *H. littorale*, existe uma correlação significativa ($P < 0,01$) entre a temperatura da água e as concentrações de 2,3DPG. Ao contrário dos exemplos citados acima, o aumento de temperatura parece ter estimulado o aumento na concentração de 2,3DPG. Aparentemente, a concentração de oxigênio dissolvido na água não apresenta nenhuma relação com o aumento de 2,3DPG nessa espécie. Fisiologicamente, um aumento na temperatura está associado a um aumento na taxa metabólica que por sua vez aumenta o consumo de oxigênio. WOOD (1980) mostrou que o 2,3DPG reduz a sensibilidade à temperatura na ligação Hb-O₂. Segundo JOHANSEN et al. (1978a), peixes de respiração bimodal, quando obrigados à respiração aérea, aumentam a concentração dos fosfatos orgânicos e, conseqüentemente,

diminuem a afinidade Hb-O₂. Nossos resultados mostram, também, que a relação 2,3DPG/Hb, variando de 0,111 a 0,363, apresentou uma correlação significativa ($P < 0,01$) com a temperatura da água. Em função do exposto, bem como dos resultados encontrados por GILLEN & RIGGS (1971) para *C. cyanoguttatum* e por ISAACKS et al. (1977a) para *Pterygoplichthys* sp, supomos que o 2,3DPG em *H. littorale*, pode ter um importante efeito na modulação da afinidade Hb-O₂.

Além do 2,3DPG, outros fosfatos foram detectados nos eritrócitos de *H. littorale*, como o ATP, o GTP e o Fe-GTP, que apresentaram variações quantitativas. JOHANSEN et al. (1978a) submeteram alguns exemplares de *H. littorale* à respiração aérea e outros à respiração aquática e, em ambas as situações, a relação ATP/GTP foi menor que um. No presente trabalho as relações ATP/GTP foram menor que um nas 5 coletas realizadas, independente do tipo de respiração utilizada pelo animal.

O Fe-GTP esteve sempre em maior concentração nos eritrócitos de *H. littorale*. Este composto foi descrito primeiramente em reticulócitos de rato por BARTLETT (1976b). Ainda não é conhecida a sua função nos eritrócitos mas, em virtude das grandes variações na concentração de Fe-GTP encontradas em peixes, tem sido sugerido por alguns autores a necessidade de se investigar o seu papel fisiológico (VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987; VAL et al., no prelo).

Apesar de ATP, GTP e Fe-GTP não mostrarem nenhuma relação significativa ($P > 0,05$) com as três variáveis ambientais

medidas no presente trabalho, o aumento na concentração desses fosfatos coincide com o aumento no nível de água (Figura 3.5.). Segundo alguns autores, as oscilações no nível de água determinam uma série de modificações no ambiente aquático, que por sua vez podem ter considerável influência sobre a biologia dos animais (VAL, 1983; 1986; AMADIO, 1986; MONTEIRO et al., 1987). Assim, acreditamos que as variações nas concentrações desses fosfatos sejam uma resposta adaptativa do animal a algum fator decorrente das oscilações do nível de água.

Alguns trabalhos têm mostrado correlações positivas entre a concentração dos fosfatos eritrócitários e os parâmetros hematológicos (POWERS, 1974; GREANEY & POWERS, 1977; 1978; Val, 1983). Em *Hoplosternum littorale*, tais relações não foram significativas ($P > 0,05$).

4.3. Equilíbrio de oxigenação do sangue

O efeito do pH sobre a afinidade Hb-O₂, denominado efeito Bohr, é uma das propriedades funcionais de grande interesse bioquímico e fisiológico. Esse efeito não somente facilita o transporte de oxigênio para os tecidos como também aumenta a capacidade das células vermelhas em retirar o O₂ dos pulmões.

Em peixes, a maioria das hemoglobinas possui efeito Bohr. O estudo desse efeito é de grande importância no

entendimento do hábito e habitat dos peixes (WOOD & JOHANSEN, 1972; POWERS, 1974; GREANEY & POWERS, 1978).

Segundo RIGGS (1971), um amplo efeito Bohr é altamente vantajoso para o animal, uma vez que facilita tanto a tomada de oxigênio em nível branquial quanto sua liberação em nível tissular. BLACK (1958) sugeriu que, embora um amplo efeito Bohr seja benéfico durante a liberação de oxigênio aos tecidos, pode haver uma certa dificuldade na captação de oxigênio próximo às brânquias quando o pH for muito baixo, como por exemplo após exercícios violentos, onde o aumento de ácido láctico pode levar o peixe à morte.

A ausência de efeito Bohr detectada nas hemoglobinas de alguns peixes pode estar relacionada à hiperatividade, o que pode permitir a manutenção da natação durante a acidose transiente nessas espécies (POWERS & EDMUNDSON, 1972; BRUNORI, 1975). ALMEIDA-VAL et al. (1985) estudou sete espécies de peixes da família Anostomidae e mostrou que as propriedades funcionais do sangue destas têm em comum um baixo ou nenhum efeito Bohr, o que pode servir como uma estratégia adaptativa durante sua migração.

JOHANSEN et al. (1978a) estudando peixes da Amazônia mostraram que a afinidade do sangue com o oxigênio em peixes de respiração aérea era baixa e que a capacidade de transporte de oxigênio, conteúdo de fosfatos orgânicos e efeito Bohr eram todos altos. Entretanto, POWERS et al. (1979) fizeram um estudo comparativo com o sangue de 45 espécies de peixes da Amazônia e não encontraram nenhuma diferença quanto à afinidade do sangue.

com o oxigênio entre os peixes de respiração aérea e aquática. As principais diferenças encontradas pelos autores foram relacionadas ao tipo de habitat dos peixes, onde peixes que habitam zonas de corrente rápida tendem a possuir baixa afinidade do sangue ao oxigênio comparadas a peixes de zonas lânticas. Ao contrário, VAL et al. (1985) mostraram que *Hypostomus regani* de ambiente lótico apresenta uma maior afinidade quando comparado com indivíduos de ambiente lântico, sendo que os autores chamam a atenção de que comparações entre ambientes não devem ser feitas sem medidas dos parâmetros ambientais como o pH, CO₂, conteúdo de O₂, entre outros.

Vários autores demonstraram que sangue de espécies de peixes de ambientes pouco oxigenados possui maior afinidade com o oxigênio em relação àquelas de ambientes bem oxigenados (JOHANSEN et al., 1978ab; POWERS et al., 1979; VAL et al., 1985). VAL et al. (1986) comparando os valores de efeito Bohr obtidos para as espécies *Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus insignis* com os valores encontrados pelas espécies estudadas por ALMEIDA-VAL et al. (1985), sugeriram que os valores superiores para as duas espécies deve-se, provavelmente, à baixa oxigenação das águas amazônicas.

BARCROFT & KING (1909) foram os primeiros a demonstrarem que um aumento na temperatura diminui a afinidade da Hb-O₂. A temperatura atinge uma ampla variedade de fenômenos bioquímicos que podem influir direta ou indiretamente nos equilíbrios de oxigenação, agindo sobre a fluidez das membranas

dos eritrócitos, sobre o pH do sangue, sobre os fosfatos orgânicos, sobre os coeficientes de atividade de um grande número de componentes intra e extracelulares, etc.. POWERS et al. (1979) acreditam que o efeito da temperatura sobre a afinidade Hb-O₂ pode estar relacionado com o efeito de outros parâmetros de ligação (por exemplo, fosfatos orgânicos e pH).

JOHANSEN & LENFANT (1972) estudando duas espécies de peixes de respiração aérea encontraram uma maior termodependência na ligação do sangue ao oxigênio da espécie que vive em ambiente com variação de temperatura em relação à espécie que vive em ambiente termicamente estável.

A região amazônica apresenta uma temperatura anual relativamente estável e, de acordo com a hipótese de JOHANSEN & LENFANT (1972), os peixes da região amazônica devem apresentar sangue com sensibilidade à temperatura. Assim, PEREZ (1980) encontrou uma diminuição na afinidade do sangue com o oxigênio quando elevou a temperatura de 20 a 40°C na espécie *Hoplosternum littorale*.

Os valores de ϕ obtidos para *H. littorale* no presente trabalho apresentam uma correlação positiva com a temperatura ($P < 0,05$), confirmando assim, os resultados de PEREZ (1980). Entretanto, VAL (1986) analisando o sangue da espécie *Colossoma macropomum* encontrou uma relação negativa entre os valores de ϕ e a temperatura, e acredita que uma relação desse tipo não comprometeria a tomada de oxigênio em nível branquial para essa espécie. Uma possível explicação para as diferenças nos

resultados obtidos entre as duas espécies deve-se, provavelmente, ao tipo de adaptação morfológica utilizada por cada uma das espécies. / A espécie *Colossoina macropomum* em condições hipóxicas, desenvolve lábios que facilitam a passagem de água do primeiro filme da coluna, mais oxigenada, através das brânquias. / Por sua vez, *H. littorale* utiliza-se da respiração aérea por meio de seu intestino altamente vascularizado, sendo portanto, independente da captação de oxigênio pelas brânquias (BRAUM & JUNK, 1982). / Assim, o aumento de θ em temperaturas mais altas parece ser uma vantagem adaptativa importante na liberação de oxigênio para os tecidos nessa espécie, que vive em áreas muito quentes, enfrentando além das variações anuais, principalmente durante a seca quando fazem migrações sobre a terra, notáveis variações de temperatura diurna e noturna.

Vários trabalhos têm demonstrado que as variações do efeito Bohr de peixes são diretamente influenciadas pelas concentrações dos fosfatos orgânicos (WEBER et al., 1979; VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987).

POWERS et al. (1979) estudando peixes da Amazônia, encontraram diferenças significativas na sensibilidade térmica do equilíbrio de oxigenação do sangue e hemoglobina e sugerem que essas sensibilidades dependem das diferenças no pH intracelular, níveis e tipos de fosfatos orgânicos e outros fenômenos de união de ligantes e não da seleção de hemoglobinas per se.

Segundo BENESCH et al. (1969), o efeito do 2,3DPG na diminuição da afinidade Hb-O₂ é menor em temperaturas maiores

sendo que o composto, segundo aqueles autores, não exerce qualquer influência sobre o efeito Bohr. Entretanto, DUHM (1976) mostrou que o 2,3DPG altera não apenas a afinidade com o oxigênio, mas também o efeito Bohr do sangue.

As relações $2,3DPG:Hb/\phi$ e $2,3DPG/\phi$ obtidas para *H. littorale* mostram que o aumento de 2,3DPG está relacionado ao aumento de ϕ o que proporciona a diminuição da afinidade Hb-O₂ em temperaturas mais altas. PEREZ (1980) demonstrou que a temperatura praticamente não afeta a afinidade com o oxigênio das Hb1 e Hb2 de *H. littorale*. Pelas variações dos resultados obtidos com sangue dessa espécie no presente trabalho, podemos supor que, apesar das hemoglobinas de *H. littorale* serem insensíveis à temperatura como descrito por PEREZ (1980), a temperatura pode causar efeitos indiretos nessa espécie, como o aumento da taxa metabólica, resultando em uma hipoxemia e com isso num aumento da concentração do 2,3DPG que conseqüentemente altera o efeito Bohr do sangue.

Muitos autores têm demonstrado que as variações nos valores de ϕ estão relacionadas com a disponibilidade de oxigênio (WOOD & JOHANSEN, 1973; VAL, 1983; 1986). Entretanto, os valores de ϕ obtidos para *H. littorale* não mostraram nenhuma relação significativa com as variações de oxigênio dissolvido.

WEBER et al. (1979) aclimataram uma espécie de respiração bimodal, *Synbranchus marmoratus*, em condições hipóxicas e normóxicas e não verificaram nenhuma diferença na afinidade do sangue com o oxigênio e também nenhuma mudança nas

concentrações dos fosfatos eritrocitários. Os autores acreditam que tal fato deve-se à alta eficiência das brânquias dessa espécie nas trocas gasosas aéreas, e que as baixas concentrações dos fosfatos nessa espécie, quando em condições hipóxicas, estão adaptadas ao transporte interno de oxigênio.

Segundo CARTER & BEADLE (1931), a superfície respiratória intestinal utilizada como órgão acessório de respiração aérea em *H. littorale*, é aproximadamente a metade da superfície branquial de muitos peixes. Portanto, o emprego da hipótese acima não seria válido para essa espécie.

A proposta mais provável seria a de que *H. littorale* fosse um peixe de respiração aérea obrigatória. Entretanto, os experimentos têm comprovado que essa espécie é de respiração aérea facultativa (JOHANSEN et al., 1978a; PEREZ, 1980; obs. pess.). PEREZ (1980) submeteu *H. littorale* à respiração bimodal, aérea e aquática e comparou os parâmetros hematológicos e afinidade Hb-O₂ dos indivíduos expostos à respiração bimodal com os resultados daqueles submetidos à respiração aérea e aquática. Não houve diferença significativa entre os resultados de respiração bimodal e respiração aérea, entretanto, os de respiração aquática apresentaram diferenças significativas. O autor concluiu que, apesar dessa espécie não ter perdido sua capacidade de utilizar o oxigênio da água, está bem adaptada à respiração exclusivamente aérea, portanto, sendo o tipo normal de respiração utilizada pela espécie.

/Os experimentos que realizamos para verificar o tipo de respiração de *H. littorale*, revelaram que os indivíduos dessa espécie são capazes de viver exclusivamente às custas da respiração aquática, quando impedidos de ir à superfície em ambiente normóxico. Esses resultados foram confirmados através do monitoramento da concentração de O₂, quando exemplares dessa espécie eram mantidos em ambiente fechado. Contudo, no estudo sazonal de *H. littorale*, os parâmetros analisados (hematologia-série vermelha, fosfatos eritrocitários e efeito Bohr) não apresentaram qualquer correlação com as variações de oxigênio dissolvido, indicando que essa espécie, em seu ambiente natural, parece usar, preferencialmente, a respiração aérea, independentemente das variações da concentração de oxigênio dissolvido na água, como proposto por PEREZ (1980). Entretanto, estudos de aclimação a diferentes concentrações de oxigênio devem ser realizados.

As oscilações do nível de água determinam uma série de modificações nos ecossistemas amazônicos, sob os mais distintos aspectos, sendo que em algumas situações, resultados aparentemente contraditórios como, por exemplo, o aumento da temperatura e da concentração de oxigênio no mês de setembro (Tabela 3.1.), são observados. IBÁÑEZ (em prep.) estudando a produção primária na região da ilha da Marchantaria discute as causas que determinam situações desse tipo. Alguns autores têm demonstrado que as variações dos valores de efeito Bohr em conjunto com as variações dos parâmetros hematológicos, fosfatos

eritrocitários, hemoglobinas e adaptações morfológicas podem representar uma estratégia adaptativa importante ao peixe em resposta às oscilações do nível de água (VAL, 1986; MONTEIRO et al., 1987). As variações nos valores de ρ de *H. littorale* não apresentaram correlação significativa com as oscilações do nível de água. Entretanto, acreditamos que a resposta a essas oscilações pode ser o resultado de mudanças morfológicas, fisiológicas e/ou bioquímicas que atuando em conjunto, podem manter a homeostase respiratória frente às modificações do ambiente.

4.5. Conclusões

- a) Os parâmetros hematológicos da série vermelha de *H. littorale* apresentam variações sazonais que não estão relacionadas às oscilações de temperatura, oxigênio dissolvido e nível de água.
- b) Foi detectada a presença de um composto intraeritrocitário raro entre os peixes, o 2,3DPG, cujas concentrações estão relacionadas com as variações da temperatura ambiental.
- c) O efeito Bohr de sangue de *H. littorale* está relacionado com a concentração intraeritrocitária de 2,3DPG.
- d) A afinidade do sangue com o oxigênio em *H. littorale* é afetada pela variação sazonal da temperatura da região amazônica.

e) *H. littorale* não é uma espécie polimórfica em relação às suas hemoglobinas, apresentando, em todas as coletas realizadas, duas frações eletroforéticas em gel de ágar-amido e cinco frações em gel de amido nos 243 espécimens analisados.

f) *H. littorale* utiliza-se de modificações fisiológicas em nível molecular que associadas a sua capacidade de tomar O₂ diretamente do ar (respiração aérea), garantem a sua homeostase respiratória.

5. Perspectivas futuras

O estudo da variação sazonal de aspectos respiratórios de *H. littorale* levou-nos a vários questionamentos e, para que se obtenha as respostas, estudos de aclimação devem ser feitos futuramente. Assim, pretendemos:

- a) Testar o efeito do H_2S em espécimens de *H. littorale* através dos parâmetros hematológicos da série vermelha e da série branca;
- b) Aclimatar indivíduos da espécie *H. littorale* a diferentes temperaturas e verificar se os principais fosfatos eritrocitários e efeito Bohr do sangue e das hemoglobinas sofrem variações;
- c) Submeter indivíduos de *H. littorale* a diferentes concentrações de oxigênio e verificar se ocorrem variações nos parâmetros hematológicos, fosfatos eritrocitários, efeito Bohr e hemoglobinas; e
- d) Comparar o sangue de *H. littorale* coletados em diferentes locais com os resultados obtidos no presente trabalho.

SUMMARY

The present work describes molecular features of the respiratory system from the armored catfish *Hoplosternum littorale* (tamoatá) from Amazon basin. They were detected hematological changes during the collecting period which can not be related with oxygen concentration, temperature, and water level oscillations. GTP, Fe-GTP, ATP and 2,3DPG are present in red blood cells of *H. littorale*. 2,3DPG is a characteristic intraerythrocytic phosphate of mammal red blood cell. In fish it was detected only in *Cichlasoma cyanoguttatum* and *Pterygoplichthys* sp, and now in *H. littorale*. The analysed specie presents quantitative changes on 2,3DPG from its red blood cells. Those changes could be related to the different collecting seasons. The remaining phosphates compounds (Fe-GTP, GTP, ATP), presented variation as well as 2,3DPG.

The whole blood Bohr effect values (ϕ) oscillated according to environmental parameters too, particularly according to temperature changes. The enhancement of 2,3DPG values could be associated with the decreasing of Hb-O₂ affinity and both features could be related to environmental temperature enhancement.

Multiple hemoglobins were detected on agar-starch (2) and starch (5) gels after electrophoresed. Minor hemoglobin fractions were present on starch gel, probably due to differences on supports resolution powers.

Hematology, erythrocytic phosphates, and whole blood Bohr effect presented no correlation with environmental dissolved oxygen levels. On the other hand, these parameters presented correlations with environmental temperature and water level variations. So *H. littorale*, besides using air-breathing, uses adaptative strategies at molecular level, that permit a best performance when it is exposed to environmental changes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, C.; GOETZ, K.H. & HUGHES, G.M. (1983) Effect of acclimation temperature on intraerythrocytic acid-base balance and nucleoside triphosphates in the carp, *Cyprinus carpio*. *Resp. Physiol.*, 54: 145-159.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F. (1986) Lactato desidrogenase de duas espécies de peixes da Amazônia, *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum* (Characiformes): Aspectos Adaptativos. Tese de doutoramento. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. AM. 141p
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SCHWANTES, A.R. & VAL, A.L. (1985) Electrophoretic patterns of hemoglobin and oxygen binding properties of blood of Anostomidae fishes from Parana-Pardo-Grande hydrographic basin (São Paulo state, Brazil). *J. Exp. Zool.*, 235 (1): 21-26.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SCHWANTES, M.L.B. & VAL, A.L. (1990) LDH isozymes in Amazon fish. I. Electrophoretic studies on two species from Serrasalminae family: *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 77-84.
- AMADIO, S.A. (1986) Variação dos parâmetros hematológicos das espécies do gênero *Semaprochilodus* (Ostariophysi, Prochilodontidae) em função de aspectos ontogenéticos, reprodutivos, comportamentais e ambientais, no baixo rio Negro, Amazonas, Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. AM. 101p.
- ARAUJO, J.T.; TOLEDO FO, S.A. & MERINO, M.M.S.S. (1970) Aplicação de eletroforese em gel de amido-agar para a identificação de hemoglobinas humanas. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 1/2: 67-69.
- BABIKER, M.M. (1984) Adaptive respiratory significance of organophosphates (ATP & GTP) in air-breathing fishes. *Hydrobiologia*, 110: 339-349.
- BARCROFT, J. & KING, W.D.R. (1909) The effect of temperature on the dissociation curve of blood. *J. Physiol. Lond.*, 39: 374-384.
- BARTLETT, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234: 466-468.
- BARTLETT, G.R. (1970) Patterns of phosphate compounds in red blood cells of man and animals. In: *Red cell metabolism and function*. Ed. G. J. Brewer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 6: 245-256.
- BARTLETT, G.R. (1976a) Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55A: 211-214.
- BARTLETT, G.R. (1976b) Iron nucleotides in human and rat red cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 70 (4): 1063-1070.
- BARTLETT, G.R. (1978a) Phosphates in red cells of two South American osteoglossids: *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum*. *Can. J. Zool.*, 56: 878-881.
- BARTLETT, G.R. (1978b) Phosphates in red cells of two lungfish: the South American, *Lepidosiren paradoxa* and the African, *Protopterus aethiopicus*. *Can. J. Zool.*, 56: 882-886.

- BARTLETT, G.R. (1978c) Phosphate compounds in reptilian and avian red blood cells: developmental changes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61A: 191-202.
- BARTLETT, G.R. (1978d) Water-soluble phosphate of fish red cells. *Can. J. Zool.*, 56: 870-877.
- BARTLETT, G.R. (1979) Phosphate compounds in red cells, liver and skeletal muscle of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Copeia* 2: 360-363.
- BARTLETT, G.R. (1980) Phosphates compounds in vertebrate red blood cells. *Amer. Zool.*, 20: 103-114.
- BARTLETT, G.R. (1982a) Developmental changes of phosphates in red cells of the emu and the rhea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 129-134.
- BARTLETT, G.R. (1982b) Diphosphoglycerate in vertebrate red cells. Where and how. *Ann. Meet. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., Louisiana.. Abst. 2265.*
- BARTLETT, G.R. (1982c) Phosphates in red cells of a hagfish and a lamprey. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 141-145.
- BARTLETT, G.R. (1982d) Phosphate compounds in red cells of two dogfish sharks: *Squalus acanthias* and *Mustelus canis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 135-140.
- BARTLETT, G.R. & BORGESSE, T.A. (1976) Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchling. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55A: 207-210.
- BENESCH, R. & BENESCH, R.E. (1967) The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26: 162-167.
- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. & YU, C.I. (1969) The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ion strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, 8: 2567-2571.
- BLACK, E.C. (1958) Hyperactivity as a lethal factor in fish. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 15: 573-586.
- BORGESSE, T.A. & NAGEL, R.L. (1978) Inositol pentaphosphate in fish red blood cells. *J. Exp. Zool.*, 205: 133-140.
- BRAUN, E. & JUNK, W.J. (1982) Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* 67(6): 869-886.
- BRIEHL, R.W. (1963) The relation between the oxygen equilibrium and aggregation of subunits in lamprey hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 238: 2361-2368.
- BROW, B.A. (1976) *Hematology: principles and procedures*. Philadelphia, Lea & Febiger 2nd edition.
- BRUNDORI, M. (1975) Molecular adaptation to physiological requirements: The hemoglobin system of trout. *Curr. Topics Cell Reg.*, 9: 1-39.
- BUNN, H.F. & RIGGS, A. (1979) The measurements of the Bohr effect of fish hemoglobins by gel electrofocusing. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 95-99.

- CARACIOLO, M.C.M. (1989) Estudos sobre a s-MDH em 12 espécies de peixes da família Curimatidae da bacia Amazônica: Aspectos evolutivos e filogenéticos. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. AM. 128p.
- CARTER, G.S. & BEADLE, L.C. (1931) The fauna of the swamps of the paraguayan chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptation in the fishes. *J. Linn. Soc. Lond., Zool.* 37: 327-368.
- CASILLAS, E. & SMITH, L.S. (1977) Effects of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.*, 10: 481-491.
- CHANUTIN, A. & CURNISH, R.R. (1967) Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Archs. Biochem. Biophys.*, 121: 96-102.
- COBURN Jr., C.B. & FISCHER, B.A. (1973) Red blood cell haematology of fishes: a critique of techniques and a compilation of published data. *J. Mar. Sci.*, 2 (2): 37-58.
- COLMAN, C.H. & LONGMUIR, I.S. (1963) A new method for registration of oxyhemoglobin dissociation curves. *J. Appl. Physiol.*, 18: 420-423.
- DAFRE, A.L. (1989) Hemoglobinas e tióis em eritrócitos de duas espécies de tubarões. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RGS. 122p
- D'AVILA-LIMEIRA, N.C. (1989) Estudos sobre a Lactato Desidrogenase (LDH) em 27 espécies de peixes da bacia amazônica: aspectos adaptativos e evolutivos. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. AM. 123p.
- DENTON, J.E. & YOUSEF, M.K. (1975) Seasonal changes in haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51A: 151-153.
- DHEER, J.M.S. (1988) Haematological, haematopoietic and biochemical responses to thermal stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *J. Fish Biol.*, 32: 197-206.
- DISCHE, Z. & BORENFREUND, E. (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.*, 192: 583-587.
- DUHM, J. (1976) Dual effect of 2,3-diphosphoglycerate on the Bohr effects of human blood. *Pflugers Arch.*, 363: 55-60.
- EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B. & FARGHALY, A.M. (1974) Studies on blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais). I. Blood cells. *J. Fish Biol.*, 6: 1-12.
- FOURIE, F.R. & VAN VUREN, J.H.J. (1976) A seasonal study on the hemoglobins of carp (*Cyprinus carpio*) and yellowfish (*Barbus holubi*) in South 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.
- FYHN, U.E.H. & SULLIVAN, B. (1974) Hemoglobin polymorphism in fishes. I. Complex phenotypic patterns in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biochem. Genet.*, 11: 373-385.

- GALDAMES-PORTUS, M.I.; DONALD, E.L. & FOCESI, A. (1982) Hemoglobinas em silurídeos da Amazônia Central. I. Análise eletroforética dos hemolisados. *Acta Amazonica*, 12 (4): 707-712.
- GARLICK, R.L.; BUNN, H.F.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; MARTIN, J.P.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A. (1979) Functional studies on the separated hemoglobin components of an air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 219-226.
- GEORGEAN, W.D. & POLUHOWICH, J.J. (1974) The major erythrocytic organic phosphates of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49B: 281-290.
- GILLEN, R.G. & RIGGS, A. (1971) The hemoglobins of a fresh-water teleost, *Cichlasoma cyanoguttatum* (Baird and Girard). I. The effects of phosphorylated organic compounds upon the oxygen equilibria. *Comp. Biochem. Physiol.*, 38B: 585-595.
- GRAHAM, M.S.; HAEDRICH, R.L. & FLETCHER, G.L. (1985) Hematology of three deep-sea fishes: A reflection of low metabolic rates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80A: 79-84.
- GREANEY, G.S. & POWERS, D.A. (1977) Cellular regulation of an allosteric modifier of fish haemoglobin. *Nature*, 270: 73-74.
- 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.
- HARDIG, J. & HDGLUND, L.B. (1984) Seasonal variation in blood components of reared baltic salmon, *Salmo salar* L.. *J. Fish Biol.*, 24: 565-579.
- HATTINGH, J. (1976) Hemoglobins in *Labeo umbratus*, the influence of temperature and oxygen. *A. Afr. J. Sci.*, 72: 27-28.
- HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. (1973) Strategies of biochemical adaptations. W. B. Saunders. Philadelphia.
- HOLLAND, R.A.B. (1970) Factors determining the velocity of gas uptake by intracellular hemoglobin. In: *Blood oxygenation* Daniel Hershey ed.. Plenum Press. New York.
- 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.
- IBANEZ, M.S.R. (em prep.) Produção primária e fatores ecológicos de um lago de várzea da Amazônia Central (Lago Camaleão, Ilha da Marchantaria. Tese de doutoramento. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. AM.
- IRION, G.; ADIS, J.; JUNK, W.J. & WUNDERLICH, F. (1983) Sedimentological studies of the "Ilha de Marchantaria" in the Solimões/Amazon river near Manaus. *Amazoniana*, 8(1): 1-18.
- ISAACKS, R.E.; KIM, H.D.; BARTLETT, G.R.; HARKNESS, D.R. (1977a) Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, Pirarucu (*Arapaima gigas*). *Life Sci.*, 20: 987-990.
- ISAACKS, R.E.; HARKNESS, D.R.; SAMPSELL, R.N.; ADLER, J.R.; ROTH, S.; KIM, C.Y. & GOLDMAN, P.H. (1977b). Studies on avian erythrocyte metabolism. VI. Inositol tetrakisphosphate: the major phosphate compound in the erythrocytes of the ostrich (*Struthio camelus camelus*). *Eur. J. Biochem.*, 77: 567-574.
- 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: 887-890.

- ISAACKS, R.E.; KIM, H.D. & HARKNESS, D.R. (1978b) Inositol diphosphate in erythrocytes of the lungfish, *Lepidosiren paradoxa*, and 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes of the armored catfish, *Pterygoplichtys* sp. *Can. J. Zool.*, 56: 1014-1016.
- JOHANSEN, K. (1979) Air-breathing fishes. *Sci. Amer.*, 1979: 68-77.
- JOHANSEN, K. & LENFANT, C. (1972) A comparative approach to the adaptability of O₂-Hb affinity. In: *Oxygen Affinity of Hemoglobin and Red Cell Acid-Base Status*. Ed. P. Astrup & M. Rorth. Academic Press. Copenhagen.
- JOHANSEN, K.; MANGUM, C.P. & LYKKEBOE, G. (1978a) Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. *Can. J. Zool.*, 56: 898-909.
- JOHANSEN, K.; MANGUM, C.P. & WEBER, R.E. (1978b) Reduced blood O₂ affinity associated with air breathing in osteoglossid fishes. *Can. J. Zool.*, 56: 891-897.
- JONES, J.R.E. (1964) *Fish and river pollution*. Butterworth & Co. Publishers Ltd. London. 203p.
- JOSHI, B.D. & TANDON, R.S. (1977) The correlation of body size and some haematologic values of the fresh water fish. I. *Clarias batrachus* (L.). *J. Anim. Morphol. Physiol.*, 24: 339-343.
- JUNK, W. (1983) As águas da região amazônica. In: *Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia*. Ed. E. Salati, Junk, W.; Schubart, H.O.R. e Oliveira, A.E. Editora Brasiliense & CNPq. São Paulo. SP.
- JUNK, W.J.; SOARES, G.M. & CARVALHO, F.M. (1983) Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana* 7(4): 397-431.
- KALoustIAN, K.V. & POLUHOWICH, J.J. (1976) The role of organic phosphates in modulating the oxygenation behavior of eel hemoglobin. *Comp. Biochem Physiol.*, 53A: 245-248.
- KAMPER, E.J. & ZIJLSTRA, W.G. (1964) Standardization of haemoglobinometry. In: *Erythrocytometric methods and their standardization*. Ch. G. Boroviczény ed.. *Bibl. Haematol.*
- KAVAMOTO, E.T.; TOKUMARU, M.; SILVA, R.A.P.S. & CAMPOS, B.E.S. (1983) Algumas variáveis hematológicas do "cascudo" *Plecostomus albopunctatus* Regan (1908). *B. Inst. Pesca*, 10: 101-106.
- KIRPICHNIKOV, V.S. (1973) Biochemical polymorphism and microevolution process in fish. In: *Genetics and mutagenesis of fish*. Ed. J.H. Schroeder. Springer-Verlag. Berlin.
- KITCHEN, H. (1974) Animal hemoglobin heterogeneity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 24: 12-24.
- KOEHN, R.K. (1971) Biochemical polymorphism: a population strategy. *Rapp. Proc. Verb. Rum.*, 161: 147-153.
- KORCOCK, D.E.; HOUSTON, A.H. & GRAY, J.D. (1988) Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33: 319-330.
- KROGH, A. & LEITCH, I. (1919) The respiratory function of the blood in fishes. *J. Physiol.*, 52: 288-300.
- KULAKKATTOLICKAL, A.T. & KRAMER, D.L. (1988) The role of air breathing in the resistance of bimodally respiring fish to waterborne toxins. *J. Fish Biol.*, 32: 119-127.

- LARSSON, A., JOHANSSON-SJOBECK, M.L. & FANGE, R. (1976) Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. *J. Fish Biol.*, 9: 425-440.
- LENFANT, C. & JOHANSEN, K. (1976) Gas exchange in gill, skin and lung breathing. *Respir. Physiol.*, 14: 211-218.
- LONGWELL, J. & PENTELOW, F.T.K. (1935) The effect of sewage on brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Exp. Biol.*, 12: 1-12.
- LYKKEBOE, G.; JOHANSEN, K. & MALDRY, G.M.O. (1975) Functional properties of hemoglobins in the teleost, *Tilapia grahami*. *J. Comp. Physiol.*, 104: 1-11.
- MACHADO, P.E.A. (1973) Estudos de hemoglobina A₁, A₂ e S em ciclêmicos e não ciclêmicos. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu. Botucatu. SP.
- MACHADO-ALLISON, A. (1986) Aspectos sobre la historia natural del "curito" *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes - Callichthyidae) en el bajo llano de Venezuela: desarrollo, alimentación y distribución espacial. *Acta Cient. Venez.* 37: 72-78.
- MARTIN, J.P.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A. (1979) The hemoglobin of *Pseudorasbora*, a South American catfish: isolation, characterization and ligand binding studies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 207-212.
- 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.
- MONTEIRO, P.J.C.; VAL, A.L. & ALMEIDA-VAL, V.M.F. (1987) Biological aspects of Amazonian fishes. Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates, and whole blood Bohr effect of *Mylossoma duriventris*. *Can J. Zool.*, 65: 1805-1811.
- PANDEY, K.C. & PANDEY, A.K. (1977) Hematology of a catfish *Rita rita* (Ham.). *Proc. Indian Acad. Sci.*, 85B: 369-377.
- PEREZ, J.E. (1979) Respiración aérea y acuática en peces de la especie *Hoplosternum littorale*. I. Parámetros sanguíneos. *Acta Cient. Venez.*, 30: 314-317.
- PEREZ, J.E. (1980) Respiración aérea y acuática en peces de la especie *Hoplosternum littorale*. II. Afinidad de sus hemoglobinas por el oxígeno. *Acta Cient. Venez.* 31: 449-455.
- PEREZ, J.E. & RYLANDER, M.K. (1985) Hemoglobin heterogeneity in Venezuelan fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B: 641-646.
- 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.
- PITOMBEIRA, M.S. & MARTINS, J.M. (1970) Hematology of the Spanish mackerel *Scomberomorus maculatus*. *Copeia*, (1): 86-102.
- P.L. BIOCHEMICALS (1976) Ultraviolet absorption of 5' Ribonucleotides. OR-10 Circular.
- PORTO, J.I.R. & FELDBERG, E. (em prep.) Comparative cytogenetic study of the armored catfishes of the genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae).
- POWERS, D.A. (1974) Structure, function and molecular ecology of fish hemoglobins. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 472-490.
- POWERS, D.A. (1980) Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *Amer. Zool.*, 20: 139-162.

- POWERS, D.A. & EDMUNDSON, A.B. (1972) Multiple hemoglobins of Catostomid fish. I. Isolation and characterization of the isohemoglobins from *Catostomus clarkii*. *J. Biol. Chem.*, 247(20): 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 environmental thermal variability. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 87-94.
- POWERS, D.A. & PLACE, A.R. (1978) Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L). I. Temporal and spatial variation in gene frequencies of Ldh-B, Mdh-A, Gpi-B and Pgm-A. *Biochem. Genet.*, 16 (5/6): 593-607.
- RAMBHASKAR, B. & SRINIVASA-RAO, K. (1987) Comparative haematology of ten species of marine fish from Visakhapatnam Coast. *J. Fish Biol.*, 30: 59-66.
- RAPOPORT, S. & GUEST, G.M. (1941) Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood of various vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 138: 269-282.
- RIGGS, A. (1970) Properties of fish hemoglobins. In: *Fish Physiology*. W. S. Hoar & D.J. Randall eds. Vol. IV. Academic Press. New York.
- RIGGS, A. (1971) Mechanism of the enhancement of the Bohr effect in mammalian hemoglobins by diphosphoglycerate. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 68: 2062-2065.
- RIGGS, A. (1979) Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: an overview. *Comp. Biochem Physiol.*, 62A: 257-272.
- SAINT-PAUL, U. (1983) Investigations on the respiration of the Neotropical fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalidae). The influence of weight and temperature on the routine oxygen consumption. *Amazoniana*, 7: 433-443.
- SALVO-SOUZA, R.H. (em prep.) Aspectos hematológicos-série vermelha do pirarucu, *Arapaima gigas*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. AM.
- SANTOS, U.M. (1979) Observações limnológicas sobre a asfíxia e migração de peixes na Amazônia Central. *Ciência e Cultura*, 31(9): 1034-1039.
- SANDNES, K.; LIE, D. & WAAGBØ, R. (1988) Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 32: 129-136.
- SCOTT, A.L. & ROGERS, W.A. (1981) Haematological effects of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.*, 18: 591-601.
- SIKAPERRE, D.K. (1985) Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. *J. Fish Biol.*, 27: 259-263.
- SICK, K. (1966) Hemoglobin polymorphism of cod in the Baltic and the Danish belt sea. *Hereditas*, 54(2): 19-48.
- SIDDIQI, A.Q. & NASSEN, S.M. (1979) The haematology of rohu, *Labeo rohita*. *J. Fish Biol.*, 14: 67-72.
- SINGH, B.R.; THAKUR, R.N. & YADAV, A.N. (1976) Changes in the blood parameters of an air-breathing fish during different respiratory conditions. *Folia Haematol.*, 103 (2): 216-225.
- SIDLI, H. (1985) *Amazônia. Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Ed. Vozes. Petrópolis. RJ.
- SMITHIES, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-641.

- SOIVIO, A.; NYHOLM, K. & WESTMAN, K. (1973) Notes on haematocrit determinations on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 2: 31-35.
- SOIVIO, A. WESTMAN, K. & NYHOLM, K. (1974) Changes in haematocrit values in blood samples treated with and without oxygen: a comparative study with four salmonid species. *J. Fish Biol.*, 6: 763-769.
- SRIVASTAVA, A.K. & SAHAI, I. (1987) Effects of loading density on carbohydrate metabolism and hematology in the indian freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture*, 66: 275-286.
- SZARSKI, H. (1970) Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature*, 226: 651-652.
- TISA, M.S. & STRANGE, R.J. (1983) Hematology of striped bass in fresh water. *Prog. Fish. Cult.* 45(1): 41-44.
- VAL, A.L. (1983) Aspectos estruturais e funcionais de hemoglobinas de espécies do gênero *Semaprochilodus* (Prochilodontidae) do rio Negro, Am, Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. AM.
- × VAL, A.L. (1986) Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characoidei, Pisces): Aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Tese de doutoramento. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus. 112p.
- VAL, A.L.; AFFONSO, E.G. & ALMEIDA-VAL, V.M.F. (em prep) Adaptative features of Amazon fishes. Blood characteristics of *Prochilodus nigricans* (Osteichthyes).
- VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; AFFONSO, E.G. (no prelo) Adaptative features of Amazon fishes. Hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol.*
- VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. & MONTEIRO, P.J.C. (1987) Aspectos biológicos de peixes amazônicos. IV. Padrões eletroforéticos de hemoglobinas de 22 espécies coletadas na ilha da Marchantaria (Manaus - AM). *Acta Amazonica* 16/17: 125-134.
- 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: 215-217.
- VAL, A.L.; SCHWANTES, A.R. & ALMEIDA-VAL, V.M.F. (1986) Biological aspects of Amazonian fishes. VI. Hemoglobins and whole blood properties of *Semaprochilodus* species (Prochilodontidae) at two phases of migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B (3): 659-667.
- VAL, A.L.; SCHWANTES, A.R.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. & SCHWANTES, M.L.B. (1985) Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostomus regani* populations (São Paulo, Brasil). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B: 737-741.
- VAL, A.L.; SCHWANTES, A.R.; SCHWANTES, M.L.B. & DE LUCA, P.H. (1981) Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. *Ciência e Cultura*, 33(7): 992-996.
- VAL, A.L.; SOUZA, R.H.; AFFONSO, E.G.; MOURA, M.A.; DEUS, C.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. & SILVA, S.F. (1989) Inositol pentafosfato em *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae). Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Zoologia.

- VAN VUREN, J.H. & HATTINGH, J. (1978) A seasonal study of the haematology of wild freshwater fish. *J. Fish Biol.*, 13: 305-313.
- WEBER, R.E. & DE WILDE, J.A.M. (1975) Oxygenation properties of hemoglobins from the Flatfish plaice (*Pleuronectes platessa*) and the flounder (*Platichthys flesus*). *J. Comp. Physiol.*, 101B: 99-100.
- WEBER, R.E.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. (1976) The hemoglobins system of the primitive fish, *Amia calva*: isolation and functional characterization of individual hemoglobin components. *Biochem. Biophys. Acta*, 434: 18-31.
- WEBER, R.E.; WOOD, S.C. & DAVIS, B.J. (1979) Acclimation to hypoxic water in facultative air-breathing fish: blood oxygen affinity and allosteric effectors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 125-129.
- WELLS, R.M.G.; ASHBY, M.D.; DUNCAN, S.J. & MACDONALD, J.A. (1980) Comparative study of the erythrocytes and haemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica. *J. Fish Biol.*, 17: 517-527.
- WILHELM FO, D. & REISCHL, E. (1981) Heterogeneity and functional properties of hemoglobins from South Brazilian freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 463-470.
- WINEMILLER, K.O. (1987) Feeding and reproductive biology of the currito, *Hoplosternum littorale*, in the Venezuelan llanos with comments on the possible function of the enlarged male pectoral spines. *Environ. Biol. Fish.* 20(3): 219-227.
- WINTROBE, M.M. (1933) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, 51: 32-49.
- WOOD, S.C. (1980) Adaptation of red blood cell function to hypoxia and temperature in ectothermic vertebrates. *Amer. Zool.*, 20: 163-172.
- WOOD, S.C. & JOHANSEN, K. (1972) Adaptation to hypoxia by increased Hb-O₂ affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature*, 237: 278-279.
- WOOD, S.C. & JOHANSEN, K. (1973) Organic phosphate metabolism in nucleated red cells: influence of hypoxia on eel Hb-O₂ affinity. *Netherlands J. Sea Res.* 7: 328-338.
- WOOD, S.C.; WEBER, R.E. & POWERS, D. A. (1979) Respiratory properties of blood and hemoglobin solutions from the piranha. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 163-167.
- ZAR, J.H. (1974) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. USA. 620pp.