

Ocorrência de hemoglobinas de efeito Root em peixes amazônicos (*)

Martha Farmer (1); Hans Jorgen Fyhn (2); Unni E. H. Fyhn (2); Robert W. Noble (3)

Resumo

O efeito Root foi medido em hemolisados de representantes de 56 gêneros de peixes amazônicos. Hemolisados de várias espécies de peixes de respiração aérea apresentaram efeito Root, contrariamente às hipóteses publicadas. Hemolisados de *Potamotrygon*, uma arraia de água doce, exibiram efeito Root sob nossas condições experimentais. O padrão de distribuição do efeito Root correlaciona-se positivamente com a distribuição das *retia mirabile* da coróide e a distribuição das bexigas natatórias, mas não com a das *retia mirabile* da bexiga natatória; propõe-se que a primeira é a estrutura mais primitiva que está associada à origem das hemoglobinas com efeito Root. Algumas das hemoglobinas de peixe diferem espectralmente uma das outras. As posições do máximo de absorção das desoxihemoglobinas vão de 553 nm (*Lepidosiren paradoxa* e *Potamotrygon* sp.) a 560 nm (*Plágiocion*). Ocorrência de efeitos Root não está correlacionada com a complexidade do padrão eletrofórico da hemoglobina, embora em várias espécies se tenha encontrado sistemas de hemoglobina múltipla, nos quais o efeito Root está restrito a certos componentes.

INTRODUÇÃO

Há, aproximadamente, cinquenta anos, duas expedições partiram para a América do Sul tropical, a fim de estudar o modo de vida da fauna habitante dos pântanos (Carter & Beadle 1931; Willmer, 1934). As baixas tensões de oxigênio e condições ácidas freqüentemente encontradas nestas águas paradas resultam em condições respiratórias muito especiais para os habitantes. Carter & Beadle descobriram que muitos dos peixes haviam adotado hábito de respiração aérea. Eles mostraram que a compo-

sição gasosa dos órgãos de respiração aérea destes peixes contém mais que 3% de dióxido de carbono. Erogh & Leitch (1919) já haviam demonstrado que 2% de CO₂ eram suficientes não somente para reduzir a afinidade com O₂ (efeito Bohr), mas também para desoxigenar os sangues de carpa e bacalhau para 52,5 e 32,5% de saturação de O₂ respectivamente. Esta resposta de dessaturação do sangue do peixe ao CO₂, ou, mais apropriadamente, ao pH baixo, veio a chamar-se de efeito Root (Root, 1931), e sua função é aceita como sendo a de facilitar a secreção de O₂ dentro da bexiga natatória (Fangë, 1966). Este efeito do CO₂ levou Carter (1931, p24) a propor mui razoavelmente que o "sangue como é encontrado em peixes típicos de água doce ou marinhos seria então um fluido respiratório impossível para uso em um órgão fechado de respiração aérea. Parece que um passo preliminar para a evolução de respiração aérea nos peixes foi a evolução de um tipo de sangue muito menos sensível à presença de dióxido de carbono...".

Willmer (1934) investigou a respiração de vários peixes sul-americanos, tanto de respiração aérea como aquática, e seus dados sugeriram que o sangue dos que têm respiração aérea era menos sensível ao pH baixo, apoiando a hipótese de Carter. Ele mostrou um efeito Bohr muito reduzido para o sangue de *Electrophorus electricus* e *Hoplosternum littorale*, e por evidência indireta sugeriu que no sangue de *Hoplerythrinus unitaeniatus* acontecia o mesmo. Fish (1956) encontrou efeitos Bohr muito pequenos nos sangues de certos peixes africanos de respiração aérea, *Clarius mossambicus* e *Protopterus aethiopicus*, também confirmando a hipótese de Carter. Johansen (1966) mostrou que o sangue de *Synbranchus*

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

(1) — Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516.

(2) — University of Oslo, Institute of Zoophysiology, Blindern-Oslo-3-Norway.

(3) — Department of Medicine and Biochemistry, State University of New York at Buffalo, Veterans Administration Hospital, Buffalo, New York 14215, Established Investigator of the American Heart Association.

marmoratus, um teleósteo sul-americano de respiração aérea, tem um pequeno efeito Bohr, mas não tem efeito Root. Ele e colaboradores (Johansen & Lenfant, 1967a; Lenfant & Johansen, 1968; e Lenfant, Johansen & Grigg, 1966) estudaram peixes dipnóicos de três continentes e encontraram um padrão similar: quanto maior a dependência de respiração aérea nas espécies de peixe dipnóico, tanto menor o efeito Bohr. Johansen & Lenfant (1967b) também estudaram três anfíbios que tendiam a contradizer a relação, uma vez que os efeitos Bohr aumentavam ligeiramente com o aumento de dependência de respiração aérea, mas os efeitos Bohr eram todos bem pequenos neste caso ($\Delta \log P_{50}/\Delta pH = -0,13$ a $-0,29$).

De modo geral, a literatura subsequente parece validar a hipótese de Carter de que a transição de respiração aquática para respiração aérea correlaciona-se com uma diminuição da influência do pH na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e sua capacidade de transportar oxigênio. Portanto, foi uma surpresa quando, no decorrer de nossa própria expedição ao Amazonas no R/V "Alpha Helix", notou-se que *Arapaima gigas*, que tem obrigatoriamente respiração aérea, mostrava um pronunciado efeito Root (Galdames-Portus *et al.*, 1978). A bexiga natatória de *Arapaima* é muito vascularizada e repartida, e serve como um pulmão, enquanto que no seu parente *Osteoglossum*, que tem respiração aquática, a bexiga natatória é normal. A tensão de CO₂ no sangue de um peixe respirando água é necessariamente menor que quando respirando ar, indo de 4-10 torr no primeiro a mais de 30 torr no último (Rahn & Garey, 1973). A hipótese de Carter de que uma hemoglobina com efeito Root na presença de tão altas tensões de CO₂ resultaria em uma séria redução na capacidade de O₂ é baseada em duas suposições: primeira, que o pH e capacidade tampão do sangue são semelhantes em peixes com respiração aérea e aquática, baixos demais para evitar uma acidificação significativa pela alta tensão de CO₂, e segunda, que qualquer redução significativa na capacidade de O₂ do sangue é prejudicial. É bem possível que os peixes de respiração aérea tenham desenvolvido diversos mecanismos de compensação, e que nenhuma das suposições seja correta.

Vários peixes com respiração aérea, cujos hemolisados não haviam sido examinados previamente quanto à presença de efeito Root estavam disponíveis e então foi possível testar mais além a hipótese de Carter. Além disso, a ausência de um efeito Root foi verificada em vários peixes de respiração aquática e se suspeitou de um padrão de distribuição filogenética ou relacionada com o *habitat*.

Como havia muito mais espécies disponíveis do que as que poderiam possivelmente ser examinadas com o demorado procedimento tonométrico para construir curvas de equilíbrio de O₂, nós examinamos tantos hemolisados quanto possível, com vistas a simples presença ou ausência de efeito Root. Neste artigo, a distribuição observada de efeitos Root em representantes de 56 gêneros de peixes amazônicos é discutida a relação ao hábito respiratório, à presença de bexiga natatória e *rete mirabile* da coróide e a considerações ecológicas e filogenéticas. Além disso, dados espectrofotométricos, eletroforéticos (Fyhn *et al.*, 1978) e imunológicos (Reichlin & Davis, 1978) são examinados no que diz respeito a correlações com a ocorrência de efeitos Root.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes de peixes foram coletados em duas áreas da bacia amazônica durante a expedição de novembro-dezembro com o R/V "Alpha Helix": no rio Solimões, cerca de 50 km acima de seu encontro com o rio Negro e no rio Negro, cerca de 60 km acima de Manaus. O período de coleta foi no fim da estação seca, quando o nível da água estava no seu mínimo na área. Os peixes eram em geral obtidos com arrastão de praia e malhadeiras e eram sangrados imediatamente após a coleta no campo ou transportados para o "Alpha Helix" e sangrados dentro de 4-6 horas após a coleta.

As amostras de sangue foram obtidas e preparadas como descrito por Fyhn *et al.* (1978). Os hemolisados foram armazenados a 5°C e testados para um efeito Root no período de 1-7 dias. Os hemolisados eram diluídos com tampão de citrato 0,05 M, pH 5,5, porque citrato é tanto um bom tampão neste pH como também um forte fator alostérico da hemoglo-

bina humana (Antonini *et al.* 1972) e provavelmente de muitas outras hemoglobinas de vertebrados. Efeitos intraeritrocíticos naturais, como fosfatos orgânicos, estavam necessariamente diluídos, e citrato foi empregado intencionalmente para intensificar o efeito a pH baixo. O método utilizou um espectrofotômetro DB Beckman, com a câmara celular mantida a 20°C, e uma cubeta de 1 cm. O hemolisado concentrado era pipetado na cubeta e diluído com tampão citrato 0,05 M (mantido a 20°C) até uma densidade ótica correspondente a uma concentração de hemoglobina (tetrâmero) de 10-12 μ M. O pH final era de aproximadamente 5,5. Registramos o espectro de 650 nm a 450 nm. Tampão Tris sólido era adicionado na cubeta para aumentar o pH para cerca de 8,0-8,5, permitindo saturação da hemoglobina a tensões de O₂ atmosféricas. Isto resultou em diluição não registrável da amostra de hemoglobina. Novamente, registramos o espectro entre 650 e 450 nm com o espectro de hemoglobina sobrepondo-se ao espectro registrado em pH baixo. Uma pequena quantidade de ditionito foi adicionada ao cubeta e o espectro da desoxiemoglobina foi registrado imediatamente sobre os outros dois espectros. Na maior parte dos casos, os pontos isosbéticos eram excelentes, embora alguns dos hemolisados contivessem metaemoglobina ou precipitassem (reversivelmente) quando submetidas a pH baixo. Os hemolisados eram examinados tão logo quanto possível, mas amostras mais velhas eram usadas se uma espécie de peixe não era obtida novamente. Amostras com mais de 5% de metaemoglobina (como determinado espectralmente, Benesch *et al.*, 1965) foram descartadas. Por causa das variáveis envolvidas, isto é, hemoglobina não fracionada, pequenas quantidades de metaemoglobina, algumas hemoglobinas ácido-lábeis, poderia ser enganoso quantificar a porcentagem de desoxigenação precisamente. Em vez disto, os dados estão divididos em quatro categorias arbitrárias baseadas em porcentagens aproximadas: O, menos que 10% de desoxigenação; +, 10-20% de desoxigenação; ++, 20-40% de desoxigenação; +++, mais que 40% de desoxigenação. Hb A humana fracionada foi examinada como controle, e apresentou menos que 2% de desoxigenação sob as

condições experimentais. Deve-se levar em conta que os espectros, em muitos casos, são na verdade médias de várias hemoglobinas (ver Tabela I) e um pequeno efeito Root no hemolisado pode resultar da presença de uma hemoglobina (ou hemoglobinas) com um grande efeito Root e uma hemoglobina (ou hemoglobinas) mais abundante sem efeito Root.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados na Tabela I, com os peixes dispostos de acordo com a posição taxonômica. O fenótipo da hemoglobina, o número de componentes principais da hemoglobina, e o número total de componentes da hemoglobina referem-se aos padrões eletroforéticos encontrados por eletroforese em disco de gel, de acordo com Fyhn *et al.* (1978). Os efeitos Root são classificados de acordo com sua magnitude, como foi descrito na seção de métodos.

Contrariamente à proposição de Carter de que o sangue de peixes de respiração aérea não teria efeito Root, vários peixes de respiração aérea examinados neste estudo apresentaram este efeito. *Arapaima gigas*, que tem respiração aérea obrigatória, tem um grande efeito Root, como foi mencionado anteriormente. Além disso, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, que tem respiração aérea facultativa, contrariamente à predição de Willmer (1934), tem um grande efeito Root (ver Riggs *et al.*, 1978, esta edição). *Hoplosternum littorale* (bagre calictídeo), com respiração aérea obrigatória tem também um pequeno efeito Root (ver Garlick *et al.*, 1978). Entre os bagres loricariídeos, vários parecem ser capazes de respiração aérea acessória, e muitos têm efeitos Root significativos (Tabela I). *Hypostomus* tem respiração aérea facultativa (Kramer & Graham, 1976) e um dos seus fenótipos mostrou um efeito Root. *Pterygoplichthys* e *Loricaria* mostraram não ser prejudicialmente afetados por períodos prolongados na terra (observações pessoais) e ambos mostraram efeito Root. Exceto os *Callichthyidae* e *Loricariidae*, nenhuma das famílias de bagre predominantemente sem respiração aérea mostrou qualquer evidência de hemoglobinas com efeito Root. O gimnotídeo com respiração aérea, *Gymnotus carapo*, tem

TABELA I: Efeitos Root em hemolisados de peixes amazônicos

| Posição taxonômica/espécies | Fenótipo de hemoglobina | N.º maior Hb comp. | N.º total Hb comp. | Efeito Root | Bexiga Natatória |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------|------------------|
| Classe Chondrichthyes | | | | | |
| Subclasse Elasmobranchii | | | | | |
| Ordem Rajiformes | | | | | |
| Família Potamotrygonidae | | | | | |
| Potamotrygon sp. 1 | I | 2 | 3 | + | não |
| | II | 2 | 5 | + | não |
| | II var. | 2 | 4 | + | não |
| Potamotrygon sp. 2 | I | 3 | 7 | + | não |
| Potamotrygon sp. 4 | I | 2 | 4 | + | não |
| Classe Osteichthyes | | | | | |
| Subclasse Sarcopterygii | | | | | |
| Ordem Dipteriformes | | | | | |
| Família Lepidosirenidae | | | | | |
| Lepidosiren paradoxa (a.b.) | I | 1 | 1 | 0 | não |
| Subclasse Actinopterygii | | | | | |
| Superordem Clupeomorpha | | | | | |
| Ordem Clupeiformes | | | | | |
| Subordem Clupeoidel | | | | | |
| Família Clupeidae | | | | | |
| Ilisha amazonica | I | 3 | 4 | +++ | sim |
| Superordem Osteoglossomorpha | | | | | |
| Ordem Osteoglossiformes | | | | | |
| Família Osteoglossidae | | | | | |
| Osteoglossum bicirrhosum | I | 1 | 1 | +++ | sim |
| Arapaima gigas (a.b.) | I | 1 | 2 | +++ | sim |
| Superordem Ostariophysii | | | | | |
| Ordem Cypriniformes | | | | | |
| Subordem Characoidel | | | | | |
| Família Characidae | | | | | |
| Chalceus sp. | I | 1 | 1 | +++ | sim+ |
| Charax sp. | I | 2 | 7 | +++ | sim |
| Colossoma sp. | II | 3 | 5 | +++ | sim |
| | III | 4 | 6 | +++ | sim |
| Mylossoma sp. | I | 2 | 2 | +++ | sim |
| Serrasalmus sp. 1 | I | 2 | 4 | +++ | sim |
| Serrasalmus sp. | IV | 3 | 3 | +++ | sim |
| Triportheus sp. | I | 4 | 4 | ++ | sim+ |
| Família Erythrinidae | | | | | |
| Hoplias erythrinus | | | | | |
| unitaeniatus (a.b.) | I | 4 | 4 | +++ | sim* |
| Hoplias malabaricus | I | 3 | 3 | +++ | sim* |
| Família Cynodontidae | | | | | |
| Rhapiodon vulpinas | | | | | |
| | I | 4 | 4 | +++ | sim* |
| Família Prochilodontidae | | | | | |
| Prochilodus sp. | | | | | |
| | I | 1 | 2 | +++ | sim* |
| Família Curimatidae | | | | | |
| Curimatus sp. | | | | | |
| | II | 1 | 2 | ++ | sim* |
| Leporinus sp. | | | | | |
| | I | 1 | 2 | ++ | sim* |
| | II | 2 | 2 | +++ | sim* |
| Rhytiodus sp. | II | 2 | 4 | +++ | sim* |
| Schizodon sp. | I | 3 | 4 | +++ | sim* |

TABELA 1 (Continuação)

| | | | | | | |
|--|--------|---|---|-----|-------|------|
| Família Hemidontidae | | | | | sim+ | sim* |
| Hemiodus sp. 1 | I | 2 | 2 | +++ | | |
| Subordem Gymnotoidei | | | | | | |
| Família Gymnotidae | | | | | sim+ | não* |
| Gymnotus carapo (a.b.) | I | 1 | 1 | + | | |
| Família Electrophoridae | | | | | sim+ | não* |
| Electrophorus electricus (a.b.) | I | 1 | 2 | 0 | | |
| Família Rhamphichthyidae | | | | | sim+ | não* |
| Eigenmannia sp. (a.b.?) | I | 1 | 1 | ++ | | |
| Rhamphichthys sp. (a.b.?) | II | 3 | 5 | + | | |
| Sternopygus macrurus (a.b.?) | I | 1 | 1 | ++ | | |
| Subordem Siluroidei | | | | | | |
| Família Doradidae | | | | | sim++ | não* |
| Opsodoras sp. | I | 1 | 2 | 0 | | |
| Pseudodoras sp. | I | 1 | 1 | 0 | | |
| Família Pimelodidae | | | | | sim++ | não* |
| Brachyplatystoma sp. 1 | I | 1 | 1 | 0 | | |
| Brachyplatystoma sp. 2 | I var. | 2 | 3 | 0 | | |
| Pimelodella sp. | I var. | 2 | 3 | 0 | | |
| Pimelodus sp. | III | 2 | 2 | 0 | | |
| Pinirampus sp. | I | 3 | 3 | 0 | | |
| Pseudoplatystoma sp. | I | 3 | 3 | 0 | | |
| Sorubim lima | I | 3 | 5 | 0 | | |
| Família Ageneiosidae | | | | | sim++ | não* |
| Ageneiosus sp. | I | 1 | 1 | 0 | | |
| Família Hypophthalmidae | | | | | sim++ | não* |
| Hypophthalmus sp. | I | 3 | 5 | 0 | | |
| Família Callichthyidae | | | | | sim++ | n.e. |
| Hoplosternum littorale (a.b.) | I | 2 | 2 | + | | |
| Hoplosternum littorale, componente II | | | | ++ | | |
| Família Loricariidae | | | | | sim++ | n.e. |
| Hypostomus sp. (a.b.) | I | 5 | 5 | 0 | | |
| Loricaria sp. (a.b.?) | V var. | 2 | 3 | + | | |
| Loricariichthys, nova espécie (a.b.?) | X | 2 | 2 | + | | |
| Parahemiodon sp. (a.b.?) | I | 1 | 4 | 0 | | |
| Pterygoplichthys sp. 1 (a.b.) | IV | 1 | 1 | + | | |
| Pterygoplichthys sp. 2 (a.b.) | I | 4 | 4 | + | | |
| Spatuloricaria sp. (a.b.?) | I | 4 | 5 | + | | |
| Sturisoma sp. (a.b.?) | I | 1 | 3 | 0 | | |
| Sturisoma sp. (a.b.?) | II | 2 | 3 | 0 | | |
| Subfamília Ancestrinae, Unidentified espécies | I | 1 | 3 | ++ | | |
| Superordem Atherinomorpha | | | | | | |
| Ordem Atheriniformes | | | | | | |
| Família Belontiidae | | | | | sim | sim |
| Potamorhaphis sp. | I | 2 | 3 | +++ | | |
| Superordem Acanthopterygii | | | | | | |
| Ordem Synbranchiformes | | | | | | |
| Família Synbranchidae | | | | | não | n.e. |
| Synbranchus marmoratus (a.b.) | II | 6 | 8 | 0 | | |
| Ordem Peciformes | | | | | | |
| Subordem Percoidei | | | | | | |
| Família Sciaenidae | | | | | sim | sim |
| Plagioscion sp. | I | 3 | 8 | +++ | | |

TABELA 1 (Continuação)

| | | | | | | |
|--------------------------------------|----|---|---|-----|-----|------|
| Família Cichlidae | | | | | sim | sim |
| <i>Acaronia nassa</i> | I | 4 | 4 | +++ | | |
| <i>Aequidens tetramerus</i> | I | 4 | 4 | +++ | | |
| <i>Astronotus ocellatus</i> | II | 5 | 9 | +++ | | |
| <i>Chaetobranchopsis orbicularis</i> | I | 6 | 9 | +++ | | |
| <i>Cinhlasona severum</i> | I | 5 | 9 | +++ | | |
| <i>Pterophyllum</i> sp. | I | 5 | 8 | +++ | | |
| Ordem Pleuronectiformes | | | | | | |
| Subordem Soleodei | | | | | | |
| Família Soleidae | | | | | não | sim* |
| <i>Achirus</i> sp | I | 1 | 1 | ++ | | |
| Ordem Tetraodontiformes | | | | | | |
| Família Tetraodontidae | | | | | sim | sim |
| <i>Colomesus psittacus</i> | I | 2 | 2 | +++ | | |

TABELA I. Efeitos Root em hemolisados de peixes amazônicos. O esquema filogenético está de acordo com Fink & Fink (1978). Fenótipos e variantes de hemoglobina e número de componentes de hemoglobina referem-se aos padrões eletroforéticos descritos por Fyhn et al. (1978). A classificação do efeito Root refere-se ao grau em que o hemolisado é desoxigenado a pH 5,5 20°C, em tampão de citrato 0,05 M.; menos que 10%; +, 10-20%; ++, 20-40%; +++, mais que 40%. A ocorrência de rete mirabile da bexiga natatória e da coróide é tomada da literatura (Bridge & Haddon, 1893; Jones & Marshal, 1953; Alexander, 1965; Greenwood et al., 1966; Nelson, 1976; Wittenberg & Haedrich, 1974).

um efeito Root, assim como muitos outros gimnotóides cuja capacidade de respiração aérea não foi avaliada. Verificamos no entanto que alguns outros com respiração aérea são desprovidos de efeito Root, por ex., *Lepidosiren*, *Electrophorus* e *Synbranchus*, como já havia sido registrado na literatura (Johansen & Lenfant, 1967a; Willmer, 1934; Johansen, 1966).

Os diversos peixes com respiração aérea diferem no método de obter oxigênio do ar. Enquanto que os bagres usam porções do intestino intensamente vascularizados para respirar ar, *Hoplerythrinus* e *Arapaima* usam ambas bexigas natatórias modificadas como o órgão de respiração aérea (Carter & Beadle, 1931; Johansen, 1970). *Synbranchus* respira ar com suas guelras, *Electrophorus* com o epitélio da boca, altamente vascularizado, e *Lepidosiren* com um pulmão verdadeiro (Johansen, 1968). Nenhuma correlação entre órgão de respiração aérea e efeito Root é aparente. Claramente estes órgãos internos de respiração aérea funcionam adequadamente, ainda que p CO₂ seja alta e hemoglobinas com efeito Root estejam presentes. Talvez a reduzida capacidade de oxigênio do sangue não seja uma desvantagem séria, ou seja parcialmente compensada por um aumento na concentração de

hemoglobina. Possivelmente também uma alcalose metabólica seja utilizada por estes peixes para compensar a acidose respiratória.

Um segundo achado inesperado foi a descoberta de que as arraias de água doce que nós examinamos, *Potamotrygon* spp. tinham um efeito Root, embora pequeno, o que é incomum entre os elasmobrânquios. Maxwell (1958, 1963) registrou um grau de dessaturação semelhante para soluções de hemoglobinas de *Squalus suckleyi* e *Raja binoculatu* em tampões de fosfato, mas não considerou isto como sendo um efeito Root, embora isto possa ser uma questão de definição. O sangue de muitos elasmobrânquios carece até de um efeito Bohr (Riggs, 1970). Quatro espécies de *Potamotrygon* foram apanhadas durante a expedição, e as três examinadas neste estudo tinham todas efeitos Root. Martin et al. (1978a), no entanto, não encontraram efeito Root no espécime de *Potamotrygon* (espécie 4, fenótipo II) que eles examinaram por equilíbrios tonométricos de oxigênio. Existem três diferenças técnicas que poderiam ter gerado esta discrepância. Primeiro, a pesquisa presente foi efetuada a um pH mais baixo, 5,5, ao invés de 6,0, e segundo, nós usamos tampão de citrato 0,05 M no lugar do bis-tris/HCl, pre-

sumivelmente mais inerte (Antonini *et al.*, 1972). Ambos os fatores poderiam contribuir para decrescer mais a afinidade com o oxigênio da maior parte das hemoglobinas. Além disso, a espécie 4, fenótipo II, tem um padrão eletroforético surpreendentemente diferente do da espécie 4, fenótipo I, que foi examinada neste estudo (Fyhn *et al.*, 1978).

Classicamente o efeito Root, relatado originalmente por R. W. Root (1931) tem significado simplesmente uma redução na capacidade de oxigênio do sangue quando exposto a condições ácidas na presença de tensões de oxigênio atmosféricas. Nenhum padrão foi estabelecido na literatura subsequente para limites inferiores de desoxigenação, efeitos alostéricos, temperatura ou pH. Mesmo a Hb A humana pode ser induzida a se comportar um pouco como uma hemoglobina com efeito Root (na presença de IHP 100 vezes em excesso pH 5°, 30°C), como nós observamos. Já que a ligação do oxigênio com a hemoglobina é um processo assintótico, saturação de 100% teoricamente nunca é alcançada, somente aproximada. Existe na realidade uma constante entre o efeito Bohr e o efeito Root que está evidente em nossos dados, e qualquer ponto de ruptura é necessariamente arbitrário. Nossa distinção entre hemoglobinas com e sem efeito Root é baseada nos espectros de Hb A registrados como controle. Hb A não é desoxigenada mais que 2% sob as condições experimentais, como pode ser visto na Fig. 1, A. Como foi mencionado na seção de metodologia, menos que 10% de desoxigenação sob nossas condições experimentais foram consideradas um resultado negativo.

Espectros para *Lepidosiren paradoxa*, *Potamotrygon* (sp. 4, fenótipo I), *Sternopygus macrurus*, *Hoplosternum littorale* (hemolisado e componente II isolado), *Achirus* sp. e *Plagioscion* sp. são mostrados na Fig. 1, B-H, ilustrando a continuidade entre efeitos Bohr e Root.

Uma variável não controlada nestes experimentos é a efetividade dos íons de citrato em reduzir a afinidade, ou capacidade, de oxigênio, que pode variar entre as hemoglobinas. Em concentração experimental, citrato pode ter sido mais efetivo em algumas soluções

diluídas de hemoglobina do que o é o fator intraeritrocítico natural no sangue integral. Uma vez que não se sabe a que pH o sangue é submetido na *rete mirabile* da coróide de nenhum dos peixes examinados, é impossível dizer se um pequeno efeito Root (+ na nossa classificação) sempre afeta a capacidade de O₂ ou é funcionalmente apenas um efeito Bohr forte. Além da *rete mirabile*, no entanto, existe um possível papel para o efeito Root/efeito Bohr em aumentar a liberação de O₂ para tecidos com taxa metabólica especialmente alta ou concentrações de metabólitos ácidos. No caso de *Potamotrygon*, onde nenhuma das *retia* está presente, este é um papel potencial para o efeito Root.

O padrão de ocorrência do efeito Root (Tabela I) segue grosseiramente o esquema filogenético (ver Fink & Fink, 1978). Espécimes das ordens primitivas dos *Clupeiformes* e *Osteoglossiformes* exibem grandes efeitos Root. Hemolisados tanto de caracóides como de percóides também mostram grandes efeitos Root, enquanto hemolisados da maioria das famílias de *Siluróides* são desprovidos deste efeito. O efeito Root nos hemolisados de *Gimnotóides* varia, indo de ausente até um efeito pronunciado. Como foi visto na Tabela 1, peixes amazônicos com uma bexiga natatória bem desenvolvida geralmente têm um efeito Root pronunciado. A mesma correlação geral existe entre o efeito Root e a presença de uma *rete mirabile* da coróide, nos olhos, embora não com a presença de uma *rete mirabile* na bexiga natatória. A ocorrência da bexiga natatória nos diversos peixes foi tomada da literatura (Bridge & Haddon, 1894; Jones & Marshall, 1953; Alexander, 1967; Greenwood *et al.*, 1966; Nelson, 1976). Esta informação se aplica às diversas famílias ou em alguns casos a subordens, uma vez que informação específica sobre os gêneros e espécies examinados só raramente é disponível. A ocorrência de uma *rete* na coróide em algumas famílias (marcadas com um asterisco na Tabela 1) é deduzida de informação sobre outras famílias da mesma subordem ou ordem como foi dado por Wittenberg & Hae-drich (1974), uma vez que informação específica novamente não é disponível. A suposição de que gêneros estreitamente relacionados mos-

trarão um padrão semelhante de ocorrência de *rete* na coróide é fortemente apoiada por seus dados.

Altas tensões de oxigênio são geralmente encontradas em bexigas natatórias (ver revisão por Fanguë, 1966) e no humor vítreo do olho de teleósteos (Wittenberg & Wittenberg, 1974). Através das semelhanças estruturais das duas *retia*, Wittenberg & Wittenberg (1974) propuseram que a *rete mirabile* da coróide funciona do mesmo modo que a *rete mirabile* da bexiga natatória. Um mecanismo multiplicador de contra-corrente dá como resultado a concentração do oxigênio que é liberado da hemoglobina por acidificação do sangue (Steen, 1963; Kuhn *et al.*, 1963). Hemoglobinas com efeito Root poderiam estar intimamente envolvidas neste processo, por intensificar a transferência do oxigênio do sangue para o lúmen da bexiga natatória ou do olho. No caso de caracóides por exemplo, que têm uma bexiga natatória bem desenvolvida, mas como outros ostariofísios, não possuem a *rete mirabile* da bexiga natatória (Bridge & Haddon, 1893: 293), a secreção de oxigênio precisa ser completada sem o efeito concentrador da *rete*. Um forte efeito Root em peixes que têm uma *rete* na coróide, mas carecem da *rete* da bexiga natatória, como é visto entre os caracóides, clupeídeos (Fahlén, 1967a) e a maior parte dos salmonídeos (Fangë, 1958; Fahlén, 1967b), sugere que a *rete mirabile* da coróide pode ser a característica mais primitiva associada à origem das hemoglobinas com efeito Root. Isso poderia funcionar como uma pré-adaptação para a evolução de um eficiente mecanismo de secreção de gás na bexiga natatória. Os peixes antes mencionados são mais primitivos que os acontopterídeos, onde ambas as *retia* são geralmente encontradas. *Lepidosiren paradoxa*, o mais primitivo peixe ósseo encontrado, não tem nenhum tipo de *rete*, nenhuma bexiga natatória, e nenhum efeito Root. Por outro lado, exclusivo de água doce, *Achirus*, que perdeu secundariamente a bexiga natatória, mas tem uma *rete* na coróide, um efeito Root é encontrado. Não foi determinado se os bagres com efeitos Root têm uma *rete* na coróide, mas não é improvável que uma característica possa ser perdida sem perda da outra. *Eigenmannia*

por exemplo, não tem qualquer tipo de *rete mirabile*, mas tem um apreciável efeito Root.

Entre os ostariofísios (Tabela 1), o efeito Root é forte nos caracóides que têm uma bexiga natatória bem desenvolvida e uma *rete* na coróide, é variável nos gimnotóides que têm uma bexiga natatória mas presumivelmente não têm *rete* na coróide, e é pequeno ou ausente nos siluróides que têm bexigas natatórias reduzidas e geralmente encapsuladas (Bridge & Haddon, 1893) sendo que os examinados também carecem de *rete* na coróide. O desenvolvimento do altamente especializado aparelho weberiano em peixes ostariofísios tornou a bexiga natatória importante para audição. (Poggendorf, 1952), bem como para flutuabilidade. Foi provavelmente a importância do aparelho weberiano que impediu a perda da bexiga natatória em siluróides que vivem no fundo, já que ela comumente foi perdida em outros peixes habitantes do fundo (Alexander, 1967). Nas famílias de bagres encouraçados, *Callichthyidae* e *Loricariidae*, às quais as espécies de respiração aérea pertencem, a bexiga natatória é minúscula, e encapsulada em uma bainha óssea (Alexander, 1966). Pode-se deduzir que a capacidade para secreção e absorção de gás na bexiga natatória, especialmente na ausência da *rete mirabile*, deve ser muito limitada e de pouca importância nos ajustamentos para flutuação, já que hemoglobinas com efeito Root são encontradas em ambas as famílias. Possivelmente a *rete* da coróide não foi perdida nestas duas famílias, mas os dados não são ainda disponíveis.

Em conjunto, o padrão de ocorrência de efeito Root nos bagres é o contrário do que seria de esperar-se de acordo com a hipótese de Carter de que a respiração aérea é incompatível com a presença de efeito Root.

Talvez o efeito Root e a *rete mirabile* da coróide tenham sido secundariamente perdidas por estes peixes, geralmente habitantes de pântanos, que não desenvolveram a opção da respiração aérea porque eles precisam ainda estar aptos a extrair O₂ de águas que são frequentemente pouco oxigenadas e acidificadas. Hemolisados de *Arapaima gigas* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* mostram também grandes efeitos Root; as espécies próximas, *Osteoglossum bicirrhosum* e *Hoplias malabaricus*, res-

pectivamente, que não têm respiração aérea, mas têm efeitos Root semelhante, morrem, se impedidas de alcançar a camada superficial mais oxigenada de tal água (Lowe-Mc Connell, 1975).

O estudo imunológico de Reichlin & Davis (1978) mostra uma correlação entre a ocorrência de efeitos Root nos bagres siluróides e a reação imunológica de seus hemolisados. Os hemolisados de siluróides com efeito Root, todos de peixes com respiração aérea, foram os únicos hemolisados de siluróide que precipitaram com anti-soro para componente I da hemoglobina da truta; uma hemoglobina sem efeito Root. Hemolisados de caracóides e gimnotóides, também Ostariophysii, precipitaram do mesmo modo com este anti-soro. Isto sugere que a superfície das moléculas de hemoglobina com efeito Root dos siluróides assemelha-se tanto à superfície do componente I do sistema de hemoglobina da truta, como à superfície de componentes da hemoglobina de outros ostariofísios. Aparentemente, reatividade cruzada entre duas hemoglobinas pode indicar parentesco evolucionário refletido em certas propriedades da superfície, mas se a base estrutural para o efeito Root altera as propriedades de superfície, esta análise não o detecta.

Os espectros dos hemolisados de diferentes peixes divergem um pouco dos espectros para Hb A humana. Enquanto executávamos os equilíbrios de oxigênio, notamos que o pico da desoxiemoglobina era notavelmente mais amplo para alguns peixes que para outros, como pode ser visto na Fig. 1. Durante a análise, uma tendência tornou-se aparente. Em geral, o pico de desóxi em certos peixes é ligeiramente deslocado em direção aos comprimentos de onda mais altos em comparação com Hb A. *Plagioscion* é representante dos perciformes; neste caso, o espectro de deóxi é quase simétrico. Os picos dos espectros de deóxi de hemoglobinas de outros peixes ficam entre os de Hb A e *Plagioscion*. Não há correlação entre dependência do pico de deóxi do comprimento de onda da presença de um efeito de Root, mas há uma correlação com parentesco filogenético: os espectros de hemoglobina dos peixes mais primitivos, como *Lepidosiren* e

Potamotrygon são mais semelhante à Hb A do que aos espectros dos peixes perciformes, que são evolucionariamente mais avançados. Uma vez que o espectro de deóxi foi obtido imediatamente após a adição de ditionito, admite-se que a metaemoglobina não está contribuindo para o espectro de deóxi, uma suposição que não poderia ser feita para o espectro de óxi. No entanto, formação de hemocromógeno poderia afetar o espectro de desóxi, se ocorresse. Um argumento contra esta possibilidade é que os espectros de espécies estreitamente relacionadas são virtualmente idênticos, e isto seria improvável se hemocromógeno se formasse em quantidades variáveis. Uma investigação das diferenças espectrais relacionadas às diferenças seqüenciais ou de propriedades funcionais das hemoglobinas dos vertebrados primitivos pode provar ser muito interessante enquanto mais hemoglobinas são eventualmente sequenciadas.

Hemolisados de peixe podem conter um número variável de componentes de hemoglobina eletroforicamente diferentes (Tabela 1; Riggs, 1970; Fyhn *et al.*, 1978). Uma correlação entre multiplicidade de hemoglobina dos hemolisados e ocorrência ou magnitude do efeito Root foi procurada, mas não encontrada. Dentro da ordem Cypriniformes, que inclui cerca de 70% dos peixes testados, estão representadas todas as categorias de efeito Root. Os Cipriniformes desprovidos de efeito Root mostram tantas bandas de hemoglobina quantas mostram os cipriniformes com um forte efeito Root ($2,9 \pm 0,33$, N=17 e $3,4 \pm 0,43$, N=16, respectivamente). Nenhuma correlação foi encontrada entre hemolisados de hemoglobina simples ou hemolisados de hemoglobina múltipla e a presença de um forte efeito Root ou a ausência deste efeito. Aparentemente, a multiplicidade de hemoglobina dos hemolisados não é um fator crucial para a presença de um efeito Root. Alguns hemolisados de hemoglobina simples apresentam tanto um efeito Bohr como um efeito Root (ex., *Osteoglossum*, *Sternopygus*), enquanto outros têm o efeito Bohr, mas não o Root (ex., *Lepidosiren*, *Electrophorus*). (Para presença de efeito Bohr nestes peixes, ver artigos de Galdames-Portus *et al.* (1978), Garlick *et al.* (1978), Phelps *et al.*

(1978) e Johansen *et al.* (1968)). A base estrutural da diferença entre o efeito Root e Bohr fica para ser demonstrada.

Em *Hoplosternum littorale*, em que os dois componentes foram separados (Fig. 1, E e F), um tem efeito Root e o outro um efeito Bohr reverso (ver também Garlick *et al.*, 1978). Um padrão semelhante ocorreu em vários ou-

tros ostariofisios (*Mylossoma*, Martin *et al.*, 1978b; *Hemiodus*, *Rhytiodus* e *Pimelodus*, Bunn & Riggs, 1978; *Pterygoplichthyes*, Brunori *et al.*, 1978). Restringir o efeito Root a certos componentes da hemoglobina pode ser uma ocorrência comum em peixes com hemoglobinas múltiplas, e parece ser uma estratégia útil. Tal compartimentação de função tem sido

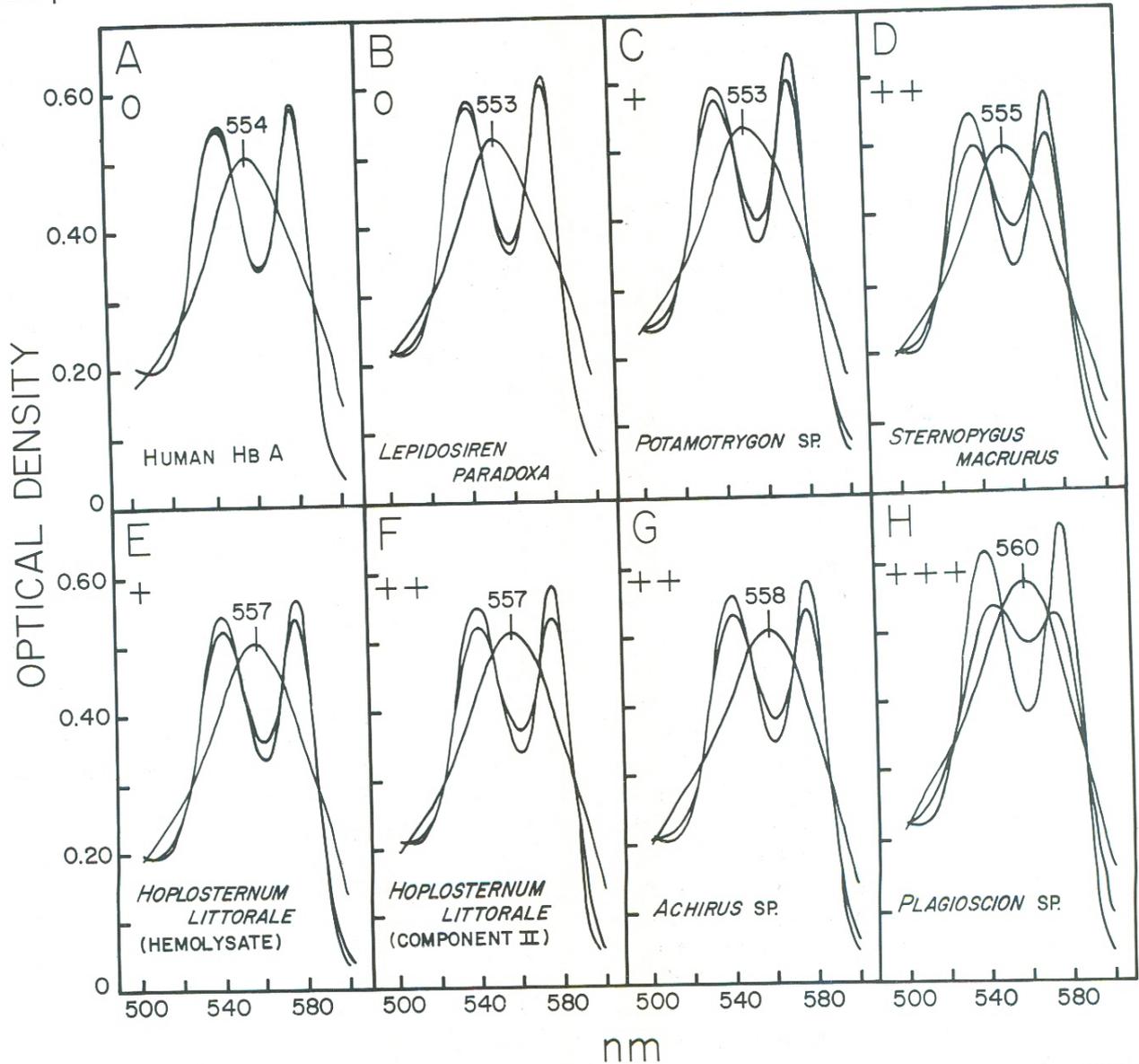


Fig. 1 — Espectros da Hb A humana (A) e hemolisados de cinco espécies de peixes *Lepidosiren paradoxa* (B); *Potomotrygon* sp. 4, fenótipo I (C); *Sternopygus macrurus* (D); *Hoplosternum littorale* (E); *Hoplosternum littorale* componente II da hemoglobina (F); *Achirus* sp (G); *Plagioscion* sp (H). Todos os espectros foram registrados a 20°C na presença de tampão de citrato 0,05 M. Os espectros das hemoglobinas parcialmente desoxigenadas foram registrados a pH 5,5, espectros das óxi a pH 8,0 a 8,5 após a adição de Tris sólido, e espectros de deóxi após adição de ditonito. Uma designação de efeito Root de O é determinada se o hemolisado é desoxigenado menos que 10% a pH 5,5, + se 10-20%, ++ se 20-40%, e +++ se desoxigenada mais que 40%.

encontrada em vários peixes para o efeito Bohr e o efeito de temperatura (revisitos por Johansen & Weber, 1976). Presumivelmente a presença de dois diferentes tipos de hemoglobina permitiria transporte adequado de oxigênio por uma das hemoglobinas mesmo sob condições ácidas, enquanto reteria a vantagem de uma hemoglobina com efeito Root na *rete mirabile* do olho ou da bexiga natatória.

SUMÁRIO

Este levantamento de efeitos Root em peixes amazônicos traz à luz muitos fatos importantes. A coexistência de hemoglobinas com efeito Root e um hábito de respiração aérea, com conseqüentes tensões de CO₂ sanguíneas altas em um certo número de peixes, é contrária a informações prévias, e nos força a questionar as suposições usadas para explicar estas informações. Nenhum efeito Root foi encontrado em *Lepidosiren*, *Electrophorus* ou *Synbranchus*, corroborando relatos prévios, mas efeitos Root pronunciados foram encontrados em *Arapaima* e *Hoplerythrinus* e efeitos Root menores em certas gimnotóides e siluróides de respiração aérea. Aparentemente, a redução na capacidade de oxigênio do sangue induzida pelo CO₂ não torna o mecanismo de respiração aérea impraticável. São propostas duas possíveis explicações que requerem investigação posterior. Primeiro, a capacidade global de O₂ pode ser maior em peixes com respiração aérea que em peixes com respiração aquática, e é reduzida pelo CO₂ a um nível que é ainda adequado. Segundo, a acidose respiratória pode ser contrabalançada por uma alcalose metabólica forte, e o pH pode não ser seriamente reduzido.

Relatamos a presença de um efeito Root no hemolisado de *Potamotrygon*, uma arraia de água doce. Que nós saibamos, este é o primeiro relato de uma hemoglobina com efeito Root em um elasmobrânquio. No entanto, efeitos Bohr pronunciados em elasmobrânquios já haviam sido registrados anteriormente, e reconhecemos o problema semântico de separar os dois efeitos. O grau de desoxigenação do hemolisado suficiente para ser chamado um efeito Root, e que limite mais baixo pH, está arbitrariamente definido neste estudo como

10% a pH 5,5. Fisiologicamente, um efeito Root mínimo pode ser imperceptível de um efeito Bohr grande. Físico-quimicamente, a distinção entre os dois efeitos é igualmente obscura.

O padrão de ocorrência do efeito Root segue imperfeitamente linhas filogenéticas, mas há numerosas exceções que sugerem um elemento comum. A ocorrência de efeitos Root pronunciados parece correlacionar bem com a distribuição das *retia mirabile* da coróide dos olhos e com a distribuição da bexiga natatória bem desenvolvida. As *retia mirabile* da bexiga natatória, no entanto, estão geralmente ausentes nos grupos primitivos (ostariofísios, clupeídeos) embora o efeito Root esteja presente. Possivelmente, a *rete mirabile* da coróide seja a mais primitiva estrutura associada à origem das hemoglobinas com efeito Root, resultando em um tipo de pré-adaptação para a evolução de um eficiente mecanismo de secreção gasosa na bexiga natatória.

Dados imunológicos indicam que duas hemoglobinas podem ser significativamente diferentes em termos das propriedades de superfície, embora ambas tenham efeito Root ou vice-versa. As hemoglobinas de siluróides com efeito Root, bem como as hemoglobinas de outros ostariofísios, precipitam com antisoro para componente I do sistema de hemoglobina da truta, uma hemoglobina sem efeito Root, mas as hemoglobinas de siluróides sem efeito Root não o fizeram.

Os espectros de deóxi de hemolisados de diferentes peixes variam significativamente. Como na reatividade imunológica cruzada, as diferenças espectrais parecem estar relacionadas com a distância evolucionária e não se correlacionam com a distribuição do efeito Root. As hemoglobinas de peixe diferem espectralmente da Hb A humana, e os peixes mais "primativos" parecem ser menos divergentes que os peixes evolucionariamente mais "avançados".

A presença de efeitos Root não se correlaciona com a presença de hemoglobinas simples ou múltiplas, como foi visto pelos padrões eletroforéticos para os hemolisados destes peixes. No entanto, efeitos Root parecem estar restritos a apenas certos componentes em

vários peixes onde há presença de hemoglobinas múltiplas. Tal compartimentação de função pode permitir transporte adequado de O₂ através de uma grande variedade de condições ambientais.

AGRADECIMENTOS

A parte experimental do trabalho foi executada a bordo do R/V "Alpha Helix" e foi apoiada pela subvenção PCM75-06451 da National Science Foundation. Drs. Hans Jorgen Fyhn e Unni E.H. Fyhn agradecem o apoio da viagem do "Norwegian Research Council for Science and the Humanities". Somos gratos ao Dr. William L. Fink ("Museum of Comparative Zoology, Harvard University") pela identificação dos peixes. Martha Farmer agradece a bolsa de pesquisa da "Duke University Graduate School", Nº 303-3765. Apoio adicional para M. F. foi proporcionado por uma subvenção de pesquisa da NIH, HL-15460 para J. Bonaventura.

SUMMARY

The Root effect was measured in hemolysates from representatives of 56 genera of Amazonian fishes. Hemolysates from several species of air-breathing fishes were found to have Root effects, contrary to published hypotheses. Hemolysates from *Potamotrygon*, a fresh water ray, exhibit a Root effect under our experimental conditions. The pattern of Root effect distribution correlates positively with the distribution of choroid retia mirabile and swimbladders, but not with the distribution of swimbladder retia mirabile; it is proposed that the former is the more primitive structure which is associated with the origin of Root effect hemoglobins. Some of the fish hemoglobins differ spectrally from one another. The positions of the absorption maxima of the deoxyhemoglobins range from 553 nm (*Lepidosiren paradoxa* and *Potamotrygon* sp.) to 560 nm (*Plagioscion*). Occurrence of Root effects is not correlated with the complexity of the hemoglobin electrophoretic pattern, although several species are found to have multiple hemoglobin systems in which the Root effect is restricted to certain components.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, R. MCN.
 1965 — Struction in the catfish. *J. Zool.*, 148 : 88-152.
 1966 — Physical aspects of swimbladder function. *Bio. Rev.*, 41 : 141-176.
- 1967 — **Functional Design in Fishes.** London, Hutchinson & Co. 160 p.
- ANTONINI, E.; AMICONI, G. & BRUNORI, M.
 1972 — The effect of anions and cations on the oxygen equilibrium of human hemoglobin. In: **Oxygen Affinity of Hemoglobins and the Red Dell Acid-base Status** (Ed. M. Rorth & P. Astrup.) Copenhagen: Munksgaard. pp. 121-129.
- BENESCH, R.; MACDUFF, G. & BENESCH, R.E.
 1965 — Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer. *Analytical Biochemistry*, 11 : 81-87.
- BRIDGE, T.W. & HADDON, A.C.
 1893 — Contribution to the anatomy of fishes — II. The airbladder and Weberian ossicles in the siluroid fishes. *Phil. Trans. (B)*, 184 : 65-333, 9 plates.
- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI JR.; A.; GALDAMES-PORTUS, M.I. & WILSON, M.T.
 1978 — Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acaribodó. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este número).
- BUNN, H.F. & RIGGS, A.
 1978 — A medida do efeito Bohr em hemoglobinas de peixe por focalização elétrica de Gel. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este número).
- CARTER, G.S.
 1931 — Aquatic and aerial respiration in animals. *Biol. Rev.* 6 : 1-35.
- CARTER, G.S. & BEADLE, L.C.
 1931 — The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linn. Soc. (Zool.)*, 37 : 327-368.
- FAHLÉN, G.
 1967a — Morphological aspects on the hydrostatic function of the gas bladder of *Clupea harengus*. *Acta Univ. Lund. Sect.*, 2(1) : 49.
 1967b — Morphology of the gas bladder of *Coregonus larvaretus* L. *Acta. Univ. Lund. Sect.*, 2(28):37.
- FANGE, R.
 1958 — The structure and function of the gas bladder in Argentina silus. *Quart. J. Microscop. Sci.*, 99 : 95-102.
 1966 — The physiology of the swimbladder. *Physiol. Rev.*, 46 : 299-322.
- FINK, W.L. & FINK, S.V.
 1978 — A Amazônia Central e seus peixes. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este número).

Farmer et al.

- FISH, G.R.
1956 — Some aspects of the respiration of six species of fish from Uganda. *J. Exp. Biol.*, 33 : 185-195.
- FYHN, U.E.H.; FYHN, H.J.; DAVIS, B.J.; POWERS, D.A.; FINK, W.L. & GARLICK, R.L.
1978 — Heterogeneidade de hemoglobinas nos peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este número).
- GALDAMES-PORTUS, M.I.; NOBLE, R.W.; FARMER, M.; POWERS, D.A.; BRUNORI, M.; FYHN, H.J. & FYHN, U.E.H.
1978 — Estudos das propriedades funcionais das hemoglobinas de *Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas*. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este número).
- GARLICK, R.L.; BUNN, H.F.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; MARTIN, J.P.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A.
1978 — Estudos funcionais na hemoglobina de componentes separados de um bagre de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este número).
- GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H. & MYERS, G.S.
1966 — Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 131 : 339-455.
- JOHANSEN, K.
1966 — Airbreathing in the teleost *Symbranchus marmoratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 18 : 383-395.
1968 — Air-breathing fishes. *Sci. Amer.*, 219 : 102-111.
1970 — Air breathing in fishes. In: *Fish Physiology* (ed. Hoar, W.S. & Randall, D.J.). New York, Academic Press. v. 4:361-411.
- JOHANSEN, K. & LENFANT, C.
1967a — Respiratory function in the South American Lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Fitz) *J. Exp. Biol.*, 46 : 205-218.
1967b — Respiratory adaptations in selected amphibians. *Resp. Physiol.*, 2 : 247-260.
- JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; SCHMIDT-NIELSEN, K. & PETERSEN, J.A.
1968 — Gas exchange and control of breathing in the electric eel, *Electrophorus electricus*. *Z. Vergl. Physiol.*, 61:137-163.
- JOHANSEN, K. & WEBER, R.E.
1976 — On the adaptability of haemoglobin function to environmental conditions. In: *Perspectives in Experimental Biology* (ed. David, P.S.) Zoology. Oxford, Pergamon Press. 1 : 219-234.
- JONES, F.R.H. & MARSHALL, N.B.
1953 — The structure and functions of the teleostean swimbladder. *Biol. Rev.*, 28 : 16-83.
- KRAMER, D.L. & GRAHAM, J.B.
1976 — Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. *Copeia*, pp. 689-697.
- KROGH, A. & LEITCH, I.
1919 — The respiratory function of the blood in fishes. *J. Physiol.*, 52 : 288-300.
- KUHN, W.; RAMEL, A.; KUHN, H.J. & MARTI, E.
1963 — The filling mechanism of the swim-bladder. Generation of high gas pressures through hairpin countercurrent multiplication. *Experientia*, 19:497-552.
- LENFANT, C. & JOHANSEN, K.
1968 — Respiration in the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. I. Respiratory properties of blood and normal patterns of breathing and gas exchange. *J. Exp. Biol.*, 49 : 437-452.
- LENFANT, C.; JOHANSEN, K. & GRIGG, G.C.
1966 — Respiratory properties of blood and pattern of blood and pattern of gas exchange in the exchange in the lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Kreff) *Resp. Physiol.*, 2 : 1-21.
- LOWE-McCONNELL, R.H.
1975 — *Fish communities in tropical Freshwaters*. New York, Longman, 337 p.
- MANWELL, C.
1958 — Ontogeny of hemoglobin in the Skate *Raja binoculata*. *Science*, 128 : 419-420.
1963 — Fetal and Adult hemoglobin of the Spiny Dogfish *Squalus suckleyi*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 : 504-511.
- MARTIN, J.P.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L.; POWERS, D.A. & WILSON, M.T.
1973 — The isolation and characterization of the hemoglobin components of *Mylossoma* sp., an Amazonian teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* (this issue)
- MARTIN, J.P.; BONAVENTURA, J.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L. & POWERS, D.A.
1978 — Estudo da estrutura e função das hemoglobinas isoladas das arraias da Amazônia do gênero *Potamotrygon*. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este número).
- NELSON, J.S.
1976 — *Fishes of the world*. New York, John Wiley. 416 p.
- PHELPS, C.; FARMER, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; GARLICK, R.L.; NOBLE, R.W. & POWERS, D.A.
1978 — Equilíbrio e cinética de união de oxigênio e monóxido de carbono à hemoglobina do peixe pulmonado sul americano *Lepidosiren paradoxa*. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este número).

POGGENDORF, D.

- 1952 — Die absoluten Horschwellen des Zwergwelses (*Ameriurus nebulosus*) und Beitrage zur Physik des Weberschen Apparates der Ostariophysen. *Z. Vergl. Physiol.*, 34 : 222-257.

RAHN, H.

- GAS transport from the external environment to the cell. In: *Ciba Foundation Symposium on Development of the Lung* (Ed. A.V.S. de Reuck & R. Porter) London, J. & A. Churchill Ltd. pp. 3-23.

REICHLIN, M. & DAVIS, B.J.

- 1978 — Relações antigênicas entre peixes comuns à bacia do rio Amazonas. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este número).

RIGGS, A.

- 1970 — Properties of fish hemoglobins. In: *Fish Physiology*. (Ed. W.S. Hoar & D.J. Randall) New York, Academic Press. v. 4 : 209-251.

RIGGS, A.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H. & NOBLE, R.W.

- 1978 — Estudos das propriedades funcionais da hemoglobina de *Hoplias malabaricus* e

Hoplerythrinus unitaeniatus. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este número).

ROOT, R.W.

- 1931 — The respiratory function of the blood of marine fishes. *Biol. Bull.*, 61 : 427-456.

STEEN, J.B.

- 1963 — The physiology of the swimbladder in the eel *Anguilla vulgaris*. III. The mechanism of gas secretion. *Acta Physiol. Scand.*, 59 : 221-241.

WILLMER, E.N.

- 1934 — Some observations on the respiration of certain tropical fresh-water fishes. *J. Exp. Biol.* 11 : 283-306.

WITTENBERG, J.B. & HAEDRICH, R.L.

- 1974 — The choroid rete mirabile of the fish eye. II. Distribution and relation to the pseudobranch and to the swimbladder rete mirabile. *Biol. Bull.*, 146 : 137-156.

WITTENBERG, J.B. & WITTENBERG, B.A.

- 1974 — The choroid rete mirabile of the fish eye. I. Oxygen secretion and structure: comparison with the swimbladder rete mirabile. *Biol. Bull.* 146 : 116-136.