

# Propriedades respiratórias do sangue e soluções de hemoglobina da piranha (\*)

Stephen C. Wood (1)  
Roy E. Weber (2)  
Dennis A. Powers (3)

## Resumo

As propriedades respiratórias do sangue da piranha, são diferentes das de outros peixes, primariamente pela alta capacidade tamponante do  $\text{CO}_2$  ( $\Delta\text{HCO}_3^-/\Delta\text{pH}=19,6$  mmol/L para o sangue oxigenado e 39,1 mmol/l para o sangue desoxigenado). A concentração de nucleosídeos trifosfato (NTP) e a tensão de meia de saturação ( $P_{50}$ ) do sangue total foi encontrado como sendo inversamente relacionado ao tamanho do corpo. O maior  $P_{50}$  em peixes pequenos, análogo aos valores obtidos em estudos prévios, envolvendo comparações inter-específicas, poderia ser uma adaptação ao mais alto índice metabólico específico ao peso. Tanto o ATP como a guanosina trifosfato (GTP), reduziram a afinidade pelo oxigênio das soluções de hemoglobina purificadas, considerando a correlação de tamanho dependente de  $P_{50}$  e a concentração de NTP no sangue total. Embora em concentrações similares, nos eritrócitos, o GTP é mais potente que o ATP, como um modificador alostérico da função da hemoglobina.

## INTRODUÇÃO

A fisiologia respiratória da fauna aquática na *Bacia Amazônica* é interessante, por causa da grande diversidade de *habitats* e das propriedades respiratórias na água. O grande número de peixes de respiração aérea encontrado no Amazonas, demonstra a hipoxia predominante da água. Muita atenção tem sido dada à fisiologia respiratória destes peixes de respiração aérea facultativa e obrigatória (cf. Johansen, 1970), porém pouco é conhecido a respeito da função respiratória em espécies que devem sobreviver graças à sua respiração branquial. A piranha pareceu-nos particularmente interessante, pelo seu notável comportamento agressivo (presumivelmente, depen-

dendo dos altos níveis do metabolismo aeróbico) e ubigüidade, sendo encontrada tanto em pântanos estagnados como em águas correntes.

Este trabalho descreve as propriedades respiratórias do sangue da piranha e da hemoglobina purificada e a modulação destas propriedades tamponantes do sangue, por fosfatos orgânicos. O transporte de oxigênio e as propriedades tamponantes do sangue, são comparadas com dados de outros peixes amazônicos (Powers *et al.*, 1978). Também uma inesperada descoberta, a de que a afinidade pelo oxigênio e níveis de fosfato orgânico são dependentes do tamanho é discutida com respeito à velocidade metabólica dependente do tamanho.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As piranhas vermelhas (*Serrasalmus rhombius*) foram capturados com rede de arrasto ao longo das margens do rio Amazonas próximo a Manaus, Brasil. O sangue foi obtido por punção cardíaca, do peixe levemente anestesiado com sulfonato de trocaína metano (MS-222, Sandoz).

Curvas de dissociação do oxigênio do sangue total foram determinadas a 30°C, usando o *Hem-o-Scan* (American Inst. Co.) como descrito por Powers *et al.* (1978). O fator Bohr ( $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ ) foi obtido através das curvas de dissociação de oxigênio, obtidas em diferentes valores de pH (diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$ ). A concentração do nucleosídeo trifosfato (NTP) nos eritrócitos, foi determinado por um método enzimático (Sigma Chemical Co., St. Louis). Ademais, as frações

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

(1) — Department of Physiology, University of New Mexico, School of Medicine, Albuquerque, New Mexico 87131.

(2) — Department of Zoophysiology, Aarhus University, DK 8000 Aarhus C. Denmark.

(3) — Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218.

derivado total de NTP da Adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP), foram determinados usando cromatografia em camada delgada (Johansen *et al.*, 1976).

A capacidade tamponante do sangue definido como  $\Delta \text{HCO}_3^- / \Delta \text{pH}$  (unidades = mmol/L/pH), foi determinado a partir de medidas de pH com valores conhecidos de  $\text{PCO}_2$  usando um Radiômetro BMS-2 e bombas misturadoras de gás "Wosthoff". O bicarbonato foi calculado a partir da equação de Henderson-Hasselbalch ( $\text{HCO}_3^- \text{ mmol/L} = 10^{(\text{pH} - \text{pK}') \cdot \infty \cdot \text{PCO}_2}$ ) usando  $\text{pK}'$  e valores de solubilidade do  $\text{CO}_2$  ( $\infty$ ) do plasma humano, a  $30^\circ\text{C}$  e o pH apropriado (Severinghaus, 1971).

Os hemolisados foram preparados a partir de eritrócitos saturados de monóxido de carbono, lavados em solução salina que haviam sido congelados. A hemoglobina em solução foi quantitativamente reduzida pela adição de ditionito de sódio e diálise exaustiva contra  $\text{CO}_2$  saturado em tampão Tris 0,01 M, pH 7,5 contendo  $5 \times 10^{-4}$  M de EDTA (Sullivan & Riggs, 1967). A hemoglobina foi liberada dos ions orgânicos ou inorgânicos pela passagem através da coluna de troca iônica *Mixed MB-3*. Curvas de equilíbrio do oxigênio em soluções de hemoglobina foram medidas com o método de câmara de difusão do oxigênio (Niesel & Thews, 1961) modificado como foi previamente descrito (Weber, Lykkeboe & Johansen, 1976).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PROPRIEDADES RESPIRATÓRIAS DO SANGUE

Não há nada de extraordinário sobre a maioria das propriedades respiratórias do sangue da piranha. O fator Bohr ( $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH} = -0,38$ ) e a afinidade pelo oxigênio (figura 1) são similares aos da maioria das outras espécies de respiração branquial no Amazonas (Powers *et al.*, 1978). Do mesmo modo, o hematócrito ( $\bar{x} = 33,2\%$ ) e a concentração da hemoglobina ( $\bar{x} = 1,24$  mmol/L de sangue) são dignos de nota (tabela 1).

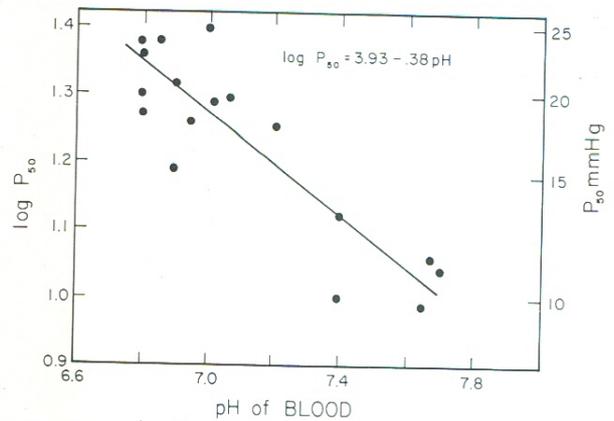


Fig. 1 — Dependência do pH na afinidade pelo oxigênio (medido como  $P_{50}$ , pressão parcial de oxigênio 50% de saturação) do sangue total da piranha a  $30^\circ\text{C}$ . A equação mostra os dados de regressão dos mínimos quadrados.

A capacidade tamponante do sangue da piranha é consideravelmente maior do que a da maioria dos peixes. Como é visto na (figura 2), a capacidade tamponante do sangue total ( $\beta = \Delta \text{HCO}_3^- / \Delta \text{pH}$ ) varia de 19,6 no sangue oxigenado até 39,1 no sangue desoxigenado. Em outro peixe não amazônico, examinado por Albers (1970), o valor de  $\beta$  para o sangue total varia de 6,7 a 14,8. As variações interes-

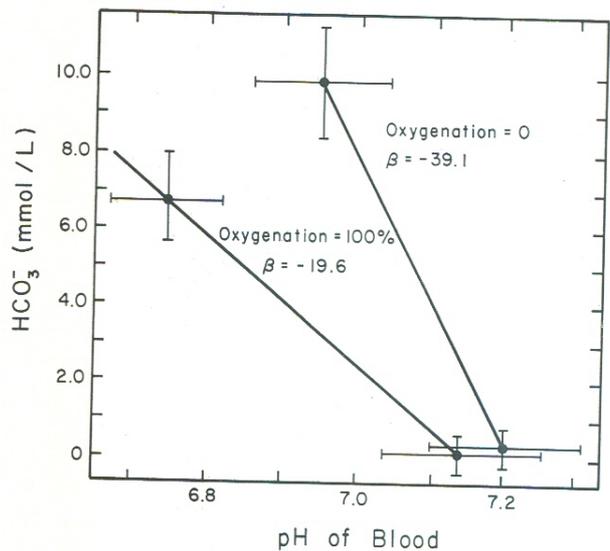


Fig. 2 — Curvas de equilíbrio de pH,  $\text{HCO}_3^-$  para o sangue total oxigenado e desoxigenado de *Serrasalmus rhombeus* A  $30^\circ\text{C}$ . Média  $\pm 2$  vezes o Erro Padrão da Média são indicados por barras verticais e horizontais. Beta ( $\beta$ ) é o grau de inclinação (capacidade tampão) em mmol  $\text{HCO}_3^-/\text{L/pH}$ .

TABELA 1. Níveis dos fosfatos orgânicos, tamanho corporal e afinidade pelo oxigênio no sangue total de *Serrasalmus rhombeus*.

Peso Corporal g	HCT %	mmoles de Hemoglobina/L de sangue	mmoles de NTP/L de sangue	NTP/Hb	P <sub>50</sub> mmHg (H 7,5; 30°C)	
110	35	1,06	2,09	1,97		
110	31	0,65	2,28	3,49		
250	40	1,55	4,41	2,84	15,5	
260	30	1,48	1,70	1,15		
300	34	1,41	2,89	2,06	14,0	
325	35	1,36	2,45	1,80	13,6	
350	30	1,08	1,42	1,32	11,0	
400	30	1,28	1,24	0,97	10,0	
600	34	1,29	1,75	1,36	11,2	
$\bar{x}$	300,6	33,2	1,24	2,24	1,88	12,6
D.P.	149,7	3,3	0,27	0,96	0,83	2,1

pecíficas das capacidades tamponantes são consideravelmente reduzidas, quando são corrigidas as diferenças na concentração de hemoglobina que é o maior tampão além do bicarbonato. Este valor da capacidade tamponante específica ( $\Delta \text{HCO}_3^- / \Delta \text{pH} / \text{Hb}$ ), varia de 0,117 até 0,230 mmol/L/pH/gHB nas espécies examinadas por Albers (1970). Usando uma concentração de hemoglobina de 79,9 g/L (1,24 mmol/L X 64,456 g/mmol; tabela 1), a capacidade tamponante específica é de 0,24 e 0,49 para o sangue oxigenado e reduzido, esta é uma vantagem evidente para a piranha visto que a capacidade tampão é considerada um fator limitante para a atividade aeróbica no peixe (Hochachka, 1961). As curvas tampão mostram na figura 2, que estão deslocadas em baixo e para a esquerda dada a presença de ácido metabólico (presumivelmente láctico) no sangue. Isto ocorre freqüentemente quando o peixe é manuseado e removido da água para retirar-se a amostra sangüínea. De qualquer modo, isto não altera o grau de inclinação  $\beta$ , das curvas tampão (cf. Siggaard-Andersen, 1974). Um resultado inesperado é aparentemente a grande dependência do pH do efeito de Haldane, resultando em um grande  $\Delta \text{HCO}_3^-$  com a oxigenação a baixos valores de pH. Isto é diferente no sangue de mamíferos e de outros vertebrados onde dentro dos limites fisiológicos, as curvas para o sangue óxi e desóxi

são paralelas. Os presentes resultados podem refletir uma forte dependência do pH na ligação de oxigênio e na união de carbamino.

#### EFEITOS DO TAMANHO CORPORAL

A descoberta de que no eritrócito o NTP e o P<sub>50</sub> estão inversamente relacionados ao peso do corpo não havia sido relatada anteriormente pelo menos que seja do nosso conhecimento. Embora o tamanho da amostra seja pequeno, a relação é bastante surpreendente (fig. 3). As variações do P<sub>50</sub> e do fosfato orgânico são opostas aos encontrados no desenvolvimento pós-natal dos mamíferos (cf. Dhindsa *et al.*, 1972) e de outros vertebrados (cf. Manwell, 1960), mas a relação do P<sub>50</sub> com o peso corporal é similar à observada, em comparações interespecíficas (Schmidt-Nielsen e Larimer, 1958).

O significado fisiológico deste fenômeno refere-se à relação alométrica entre o índice metabólico e o tamanho do corpo (cf. Hemmingsen, 1960). Comparações interespecíficas, revelam um aumento exponencial na demanda de oxigênio segundo o peso corporal nas espécies pequenas (cf. Schmidt-Nielsen, 1975). Esta relação é dada pela equação:

$$V_o = aM^b$$

onde "a" é a interceptação na ordenada, "b" é a inclinação da reta expressa em logarítmos, "M" é o peso corporal em gramas. A mesma relação tem sido demonstrada a um nível intraespecífico em "guppy" (*Lebistes reticulatus*) por Heusner *et al.* (1963). Para mamíferos esta equação se torna :

$$V_o = 3,8 M^{0,75}$$

(cf. Schmidt-Nielsen, 1975). Para peixes e outros poiquiloterms, o "custo de vida relativo", indicado pela interceptação "a", é cerca de 10 vezes menor (mesmo a 37°C), mas a inclinação "b" é normalmente a mesma (cf. Brett, 1972). A 25°C, a equação para um peixe "típico":

$$V_o \approx 0,75 M^{0,69}$$

(Hemmingsen, 1960). A importância desta relação alométrica é o aumento desigual na demanda de oxigênio por grama de peso corporal para os animais menores. Por exemplo, resolvendo a equação :

$$V_o / M = 0,75 M^{-0,31}$$

para um peixe hipotético pesando 10,000; 1,000; 100, 10 e 1 g, nos dá os seguintes valores de  $V_{O_2}$  (ml X g<sup>-1</sup> X hr<sup>-1</sup>): 0,04; 0,09; 0,18; 0,37; 0,75. Este efeito experimental do aumento corporal claramente se opõe à capacidade de transporte de O<sub>2</sub> em peixes menores que 1000g.

Os corolários de que a mais alta demanda de oxigênio de peso específico em espécies menores é aumentada pela densidade capilar (Schmidt-Nielsen & Pennycuik, 1961) e reduzem a afinidade pelo oxigênio do sangue (Schmidt-Nielsen & Larimer, 1958). O último é considerado adaptativo, pois proporciona uma maior liberação de O<sub>2</sub> para os tecidos, suprindo-os de O<sub>2</sub> em uma alta pressão parcial. Impõe-se considerar que a reduzida afinidade pelo oxigênio do sangue em piranhas pequenas é adaptativa a um aumento de necessidade

de O<sub>2</sub>. Este argumento foi proposto anteriormente em comparações interespecíficas em mamíferos (Schmidt-Nielsen & Larimer, 1958),

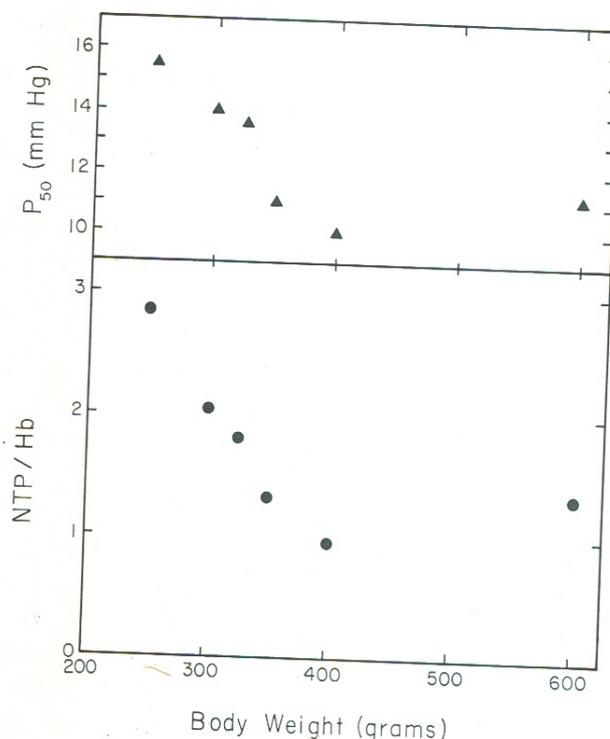


Fig. 3 — Relação entre o tamanho corporal e afinidade pelo oxigênio (quadro superior) e proporção de fosfato orgânico/hemoglobina (quadro inferior) em *Serrasalmus rhombeus*. Os valores de P<sub>50</sub> são a pH 7.5 e 30°C. NTP (nucleosídeo trifosfato).

répteis (Bennett, 1973) e pássaros (Lutz *et al.*, 1974) onde P<sub>50</sub> aumenta com a diminuição do peso corporal. Desde que a saturação arterial seja mantida na porção superior horizontal da curva de dissociação, uma curva deslocada para a direita resulta na liberação de uma dada quantidade de oxigênio em altos valores de PO<sub>2</sub> do tecido, o qual por sua vez, possibilita um aumento de velocidade de difusão de O<sub>2</sub> e índice metabólico do tecido. O presente trabalho mostra que a consideração acima pode também ser aplicada a uma espécie, i.e., que indivíduos pequenos têm sangue com uma baixa afinidade pelo O<sub>2</sub>. Também é de interesse que a baixa afinidade pelo O<sub>2</sub>, resulta de diferenças relacionadas ao tamanho em eritrócitos com concentração de fosfato orgânico (veja abaixo).

PROPRIEDADES DE SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINA

Experimentos de cromatografia em camada delgada mostram que eritrócitos contêm quantidades significantes, tanto de GTP como de ATP. Em quatro espécimes, os valores de ATP e GTP (média  $\pm$  desvio padrão) foram  $0,66 \pm 0,09$  e  $0,62 \pm 0,26$  mmol/L de sangue, respectivamente.

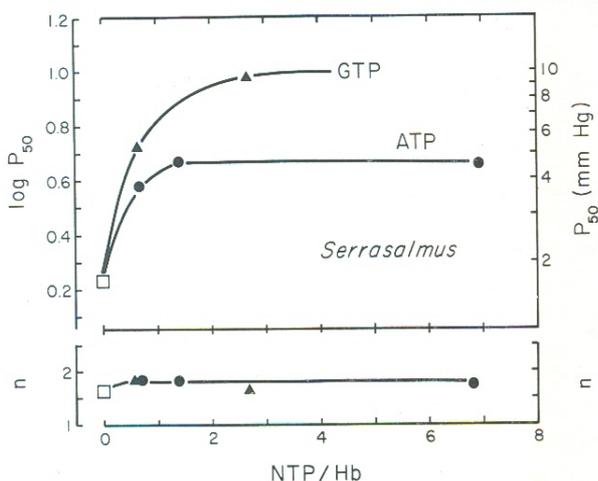


Fig. 4 — Influência do pH na afinidade pelo oxigênio ( $P_{50}$ ) e o coeficiente de Hill ( $n$ ) a 20°C ( $\blacktriangle$ ) e 30°C ( $\bullet$ ) da solução de hemoglobina fracionada de *S. rhombeus*. Tampão Tris, força iônica = 0,05; concentração da hemoglobina = 0,62 mM (tetramero).

Os valores de  $P_{50}$  e "n" (o coeficiente de Hill, indicando o grau de interação heme-heme) da hemoglobina fracionada de piranha e suas dependências de pH a 20°C e 30°C são mostradas na figura 4. Na ausência de cofatores a hemoglobina tem uma alta afinidade pelo oxigênio (o  $P_{50}$  é aproximadamente 1,6 mm Hg e pH 7,3 e 30°C, comparado o valor correspondente de 14 mm Hg no sangue total. O fator Bohr de soluções de hemoglobina é notavelmente dependente de pH, mudando de valores aproximados de  $O_2$  pH 7,3 até cerca de -1,0 a valores de pH abaixo de 7,0 (veja abaixo).

A grande diferença entre os valores de  $P_{50}$  da solução de hemoglobina e do sangue, pode

ser atribuída à presença de fosfatos orgânicos nos eritrócitos. Outros fatores que poderão contribuir para esta diferença, incluem uma alta concentração de hemoglobina nas células, a presença de  $CO_2$  no sangue, e o fato de que o pH intracelular de eritrócitos é mais baixa do que o pH plasmático, valor medido para o sangue total. Os últimos fatores podem também ser considerados pelo fato de que no pH abaixo de 7,0, o fator Bohr da solução de hemoglobina excede da do sangue total. Embora os fosfatos intensifiquem o fator Bohr, na solução de hemoglobina (Benesch, Benesch Yu, 1969), dado o aumento das ligações a pH baixo, o efeito específico de  $CO_2$  no  $P_{50}$  aumentando com o pH (Duhm, 1976) o qual contrabalança o efeito de fosfatos na sensibilidade do pH.

O valor do calor aparente da oxigenação ( $\Delta H$ ) da hemoglobina é cerca de -16,7 Kcal/mol a pH 7,3 para a variação da temperatura entre 20° e 30°C. Este valor inclui o calor de solução do oxigênio, e é similar aos valores encontrados para a maioria das hemoglobinas. O efeito da temperatura diminui em valores de pH mais baixos (figura 4) onde o efeito Bohr se torna operante, refletindo contribuições para o calor total de reação proveniente da oxigenação dos grupos ácidos na molécula.

Os efeitos dos nucleosídeos trifosfatos, ATP e GTP, na hemoglobina fracionada são mostrados na figura 5. Ambos os fosfatos manifestam um grande efeito no  $P_{50}$  em baixas proporções de fosfato/hemoglobina. Este dado é consistente, com a observação de que variações na proporção de NTP/hemoglobina no sangue total é de 0,8 a 2 e correlaciona-se com mudanças significativas no  $P_{50}$  (figura 1). A figura 4 também mostra que, como em outras hemoglobinas de peixes investigadas, o GTP diminui a afinidade pelo oxigênio mais fortemente do que o ATP na mesma concentração. Isto mostra que, não obstante concentrações similares nos eritrócitos, o GTP poderá desempenhar um papel mais importante que o ATP, modificando a afinidade pelo oxigênio do sangue total.

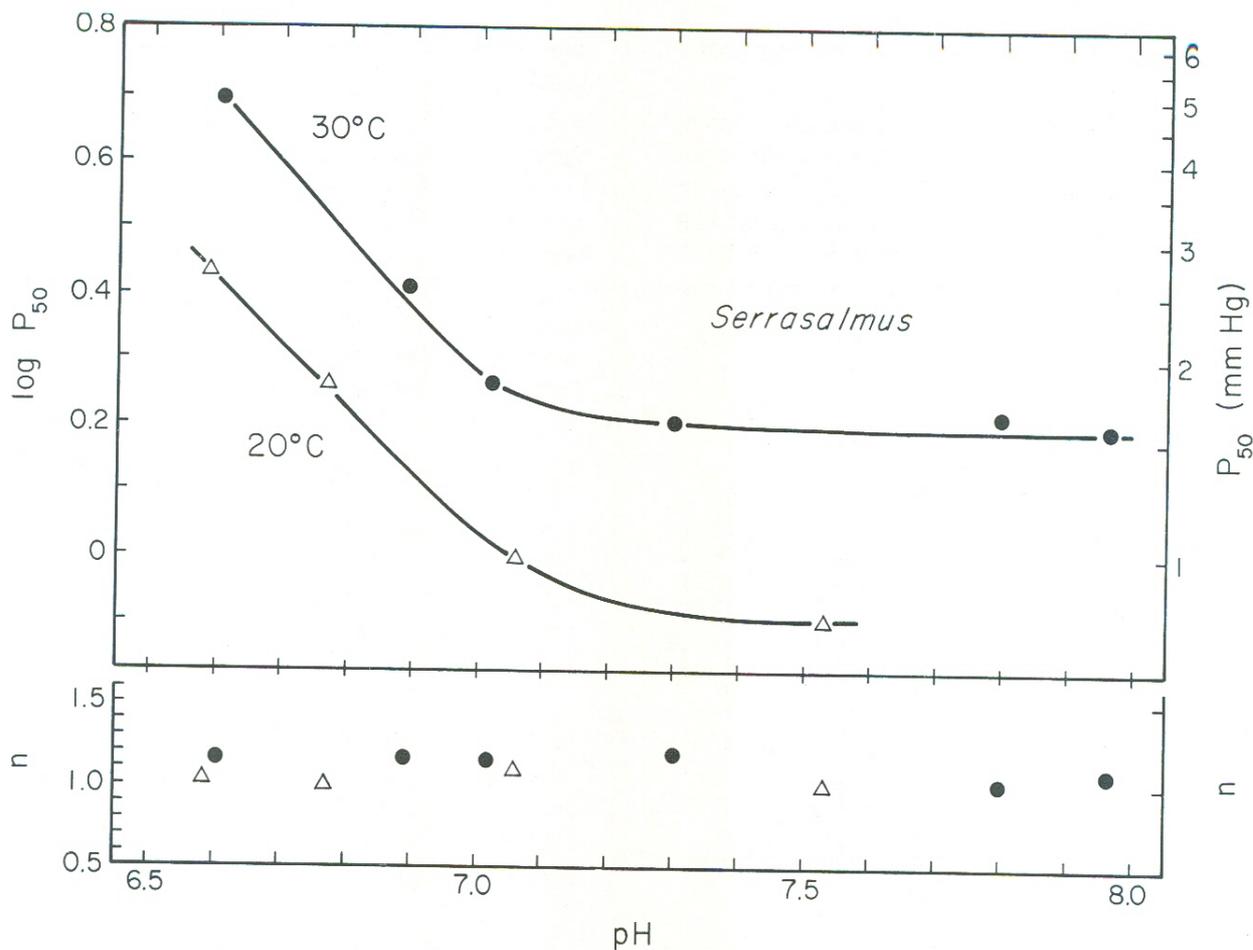


Fig. 5 — Efeitos do GTP e ATP na afinidade pelo oxigênio ( $P_{50}$ ) e o coeficiente de Hill ( $n$ ) da hemoglobina fracionada de *S. rhombeus*. Tampão Tris, pH 7,30 força iônica = 0,05, concentração da hemoglobina = 0,41 mM (tetrâmero), 30°C.

#### AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi patrocinada pelo *National Science Foundation*, auxílio PCM 75-06451, o *Danish Natural Science Council* (R.E.W.) e *National Institute of Health*, auxílio HL-18026 (S.C.W.). Auxílio adicional foi fornecido pela N.S.F., auxílio DEB 76-19877 (D.A.P.) e pela *National Geographic Society*.

#### SUMMARY

Respiratory properties of piranha blood are distinguished from those of other fish primarily by the high  $\text{CO}_2$  buffering capacity ( $\Delta\text{HCO}_3^-/\Delta\text{pH} = 18.6\text{mmol/L}$  for oxygenated blood and  $39.1\text{mmol/L}$  for deoxygenated blood). The concentration of nucleoside triphosphates (NTP) and the half-satu-

ration tension ( $P_{50}$ ) of whole blood were found to be inversely related to body size. The higher  $P_{50}$  in smaller fish, analogous to values obtained in previous studies involving interspecies comparisons, could be adaptive to higher weight-specific metabolic rate. Both ATP and guanosine triphosphate (GTP) lowered the oxygen affinity of purified hemoglobin solutions, accounting for the size-dependent correlation of  $P_{50}$  and NTP concentration in whole blood. While similar in concentration in red cells, GTP is more potent than ATP as an allosteric modifier of hemoglobin function.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, C.  
1970 — Acid-base balance. In: *Fish Physiology*. (ed. HOAR, W.S. and RANDALL, D.J.) New York, Academic Press, 4:173-208.

- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. & YU, C.I.  
1969 — The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2, 3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, 8:2567-2571.
- BENNET, A.F.  
1973 — Blood physiology and oxygen transport during activity in two lizards, *Varanus gouldii* and *Sauromalus hispidus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46a:673-690.
- BRETT, J.R.  
1972 — The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates. *Respir. Physiol.* 14:151-170.
- DHINDSA, D.A.; HOVERLAND, A.S. & TEMPLETON, J.W.  
1972 — Postnatal changes in oxygen affinity and concentration of 2, 3-diphosphoglycerate in dog blood. *Biol. Neonate*, 20:226-235.
- DUHM, J.  
1976 — Dual effect of 2, 3-diphosphoglycerate on the Bohr effects of human blood. *Pflugers Arch.*, 263:55-60.
- 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.
- HEMMINGSSEN, A.M.  
1960 — Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces and its evolution. *Rep. Steno. Mem. Hosp. Nord. Insulin Lab.*, 9:7-110.
- HEUSNER, A.; KAYSER, C.; MARK, C.; STUSSI, T. & HARMELIN, M.L.  
1963 — Relation entre le poids et la consommation d'oxygene. Etude intraspecificque chez le poisson. *C. R. Soc. Biol.*, 157: 654-657.
- HOCHACHKA, P.W.  
1961 — Effect of physical training on oxygen debt and glycogen reserves in trout. *Can. J. Zool.*, 39:767-776.
- JOHANSEN, K.  
1970 — Airbreathing in fishes. In: *Fish Physiology*, 532. (ed. HOAR, W.S. & RANDALL, D.J.). New York, Academic Press.
- JOHANSEN, K.; LYKKEBOE, G.; WEBER, R.E. & MALOIX, G.M.O.  
1976 — Respiratory properties of blood in awake and estivating lungfish, *Protopterus amphibius*. *Respir. Physiol.*, 27:335-345.
- LUTZ, P.L.; LONGMUIR, I.S. & SCHMIDT-NIELSEN, K.  
1974 — Oxygen affinity of bird blood. *Respir. Physiol.*, 20:325-330.
- MANWELL, C.  
1960 — Comparative physiology; blood pigments. *Ann. Rev. Physiol.*, 22:191-244.
- NIESEL, W. & THEWS, G.  
1961 — Ein neues verfahren zur schnellen und genauen aufnahme der sauerstoffbindungskurve des blutes und konzentrierter hamoproteidlosungen. *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, 273:380-395.
- POWERS, D.A.; FYHN, H.J.; FYHN, E.U.H.; MARTIN, J.P.; GARLICK, R.L. & WOOD, S.C.  
1978 — Estudo comparativo de equilibrio de oxigênio no sangue de 40 gêneros de peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* 8(4) : Suplemento. (Este volume).
- SCHMIDT-NIELSEN, K.  
1975 — Animal physiology: adaptation and environment. Cambridge, Cambridge Univ. Press, p. 237.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. & LARIMER, J.L.  
1958 — Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size. *Amer. J. Physiol.*, 195:424-428.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. & PENNYCUK, P.  
1961 — Capillary density in mammals in relation to body size and oxygen consumption. *Amer. J. Physiol.*, 200:746-750.
- SEVERINGHAUS, J.W.  
1971 — Carbon dioxide solubility and first dissociation constant (pK') of carbonic acid in plasma and cerebrospinal fluid: man. (ed. ALTMAN, P.L. & DITTMER, D.S.), Bethesda. In: *Handbook of Respiration and Circulation*. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., p. 218-219.
- SICK, H. & GERSONDE, K.  
1969 — Method for registration of O<sub>2</sub>-binding curves of hemoproteins by means of a diffusion chamber. *Analyt. Biochem.*, 32:362-376.
- SIGGARD-ANDERSEN, O.  
1974 — The acid-base status of blood. Copenhagen, Munksgaard, p. 46.
- SULLIVAN, B. & RIGGS, A.  
1967 — Structure, function and evolution of turtle hemoglobins. II. Electrophoretic studies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 23: 449-458.

**WEBER, R.E.; LYKKEBOE, G. & JOHANSEN, K.**

1976 — Physiological properties of eel hemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity. *J. Exp. Biol.*, 64:75-88.

**WEBER, R.E.; WOOD, S.C. & DAVIS, B.J.**

1978 — Efeitos da respiração aérea sobre o balanço ácido-base no cascudo *Hypostomus* sp. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).

**WOOD, S.C. & JOHANSEN, K.**

1972 — Adaptation to hypoxia by increased HbO<sub>2</sub> affinity and decreased red cell concentration. *Nature New Biology*, 237:278-279.

**WOOD, S.C.; JOHANSEN, K. & WEBER, R.E.;**

1976 — Effects of ambient PO<sub>2</sub> on red cell ATP and HbO<sub>2</sub> affinity in the bottom-dwelling fish, *Pleuronectes platessa*. *Respir. Physiol.*, 25:259-267.