

Estudo das propriedades funcionais da hemoglobina de *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (*)

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

Resumo

Hemolisados de *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* apresentaram padrões pouco nítidos de hemoglobina com 3 a 4 bandas, respectivamente, por eletroforesis alcalina em gel de disco. A afinidade da hemoglobina fracionada pelo oxigênio do *Hoplerythrinus* é cerca de um terço da do *Hoplias*; os valores do P_{50} para o *Hoplias* é cerca de 1,3 mm de Hg (pH 6,9 e 20°C). A adição de 1 mM ATP diminui a afinidade de oxigênio de cada hemoglobina 2,6 vezes. Ambas as hemoglobinas apresentam efeito Root e efeito Bohr; $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} = -0,40$ para hemoglobina fracionada no intervalo de pH 7 a 8. A velocidade de dissociação do oxigênio de cada hemoglobina é semelhante e é cineticamente homogênea com taxas de diminuição constante de 200-250 sec^{-1} no pH 6,2 para cerca de 25-26 no pH 7,7 com 1 mM ATP ou sem ele. A reação de combinação do CO para a hemoglobina do *Hoplias* é cineticamente heterogênea em todos os valores de pH e para a hemoglobina *Hoplerythrinus* em pH abaixo 7,5. As fases rápida e lenta explicam cerca da metade da reação observada. A heterogeneidade cinética e máxima em pH abaixo para ambas as hemoglobinas. A fase rápida para a hemoglobina do *Hoplias* é cerca de duas vezes mais do que para a hemoglobina do *Hoplerythrinus*.

INTRODUÇÃO

As duas espécies, *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*, são dois membros relacionados proximamente do primitivo *Erythrinidae*, já o *Hoplerythrinus* tem habilidade de respirar ar enquanto o *Hoplias* não. O classico trabalho de Carter & Beadle (1931) e Wilimer (1934) mostrou claramente que o *Hoplerythrinus* respira em águas com baixo

teor de oxigênio, confirmando assim o trabalho feito anteriormente por Jobert em 1877 (cf. Carter & Beadle, 1931). Carter & Beadle (1931) demonstraram que o oxigênio na *bexiga natatória* se consumia quando o peixe era privado de ar por duas ou três horas, e Willmer (1934) provou que a respiração aérea se torna obrigatória quando o teor de oxigênio cai abaixo de 1,5 ml por litros aproximadamente, o qual corresponde a um pO_2 de cerca de 40 mm de Hg. Ele também observou que o funcionamento das guelras é sensivelmente dependente do teor de CO_2 . Num pCO_2 acima de 30-35 mm de Hg CO_2 , o opérculo está ativamente fechado, e na tensão abaixo de 5-10 mm de Hg, o teor de CO_2 é, na aparência, insuficiente para estimular movimentos operculares. Estas adaptações estão associadas com a habilidade do *Hoplerythrinus* para sobreviver em lagoas de águas estagnadas durante a época da seca. Embora o *Hoplias* seja usualmente concentrado em águas correntes, igarapés e rios, também é encontrado em pequenas lagoas estagnadas. Por ser incapaz de respirar ar, tem que utilizar nestas condições a fina camada oxigenada da superfície da água. Willmer (1934) indicou que os *Hoplias* jovens também sobrevivem em condições de baixo teor de oxigênio com as bocas na superfície e têm uma aparência e hábitos tão diferentes que as pessoas do local chamam-na por um nome diferente. Temos estudado as propriedades funcionais das hemoglobinas do *Hoplias* e *Hoplerythrinus* como um primeiro passo para determinar a extensão em que as hemoglobinas destes dois peixes proximamente relacionados podem contribuir para as adaptações.

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

(1) — Department of Zoology, University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, U.S.A.

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

(3) — Department of Medicine and Biochemistry, State University of New York, Buffalo, New York 14215, U.S.A.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *Hoplias malabaricus* e *Hoplerhythrinus unitaeniatus* foram coletados em novembro e dezembro de 1976 durante a expedição na R/V "Alpha Helix" numa área de cerca de 50 km acima do encontro do rio Amazonas (rio Solimões) com o rio Negro. Espécimes de *Hoplias* (pesando 390-740 g) foram apanhados à rede perto da saída do lago de Janauacá. Os espécimes de *Hoplerhythrinus* (pesando 72-190 g) foram comprados de pescadores. O período da coleta foi o fim da estação seca quando as águas estavam em nível mais baixo.

O sangue para a eletroforesis de hemoglobina foi obtido por punção cardíaca, usando-se heparina em 1,7% de NaCl como anticoagulante. O hematócito foi determinado no material fresco, com o sangue misturado em tubos de micro-hematócrito e centrifugado os glóbulos vermelhos foram lavados três vezes em 10 volumes de 1,7% de NaCl contendo 1 mM de Tris, pH 8,0. As células foram lizadas em 3 volumes de 1 mM de Tris pH 8,0 por 1 hora a 0°C. O hemolisado foi levado a 0,1 M em NaCl e centrifugado a 28.000 X g por 15 minutos a 4°C. A hemoglobina para o estudo funcional foi preparada similarmente, exceto que o sangue foi obtido da veia caudal.

A eletroforesis de disco em *gel* de poliacrilamida alcalina (pH 8,9, 7,5% *gel* foi feita de acordo com Davis (1964) e Ornstein (1964). As amostras de hemoglobinas foram diluídas no tampão da curva superior contendo 0,1 M de β — mercaptoetanol e ditionito de sódio sendo borbulhado com o CO e aplicado no *gel*. Foi usada como padrão de mobilidade a albumina do soro bovino. Os *geis* foram corados por 3 horas com 0,25% "Brilliant blue R" (Sigma) e descorados por difusão. Os *geis* foram analisados a 560 nm, usando-se um analisador de *gel* Gilford acoplado a monocromador Beckman DU e acoplado a um registrador Taran ww 600. O peso molecular das cadeias de hemoglobinas desnaturadas foram determinadas por eletroforesis em *gel* de dodecil sulfato de sódio (SDS) de acordo com Weber e Osborn (1969) exceto, que a incubação da solução foi 6 M em uréia e 0,1 M em β -mercaptoetanol. Transferina humana, albumina de soro bovino, α -quimiotripsinogênio-A e mio-

globina na de baleia foram usadas como padrões de peso molecular.

O hemolisado foi separado dos fosfatos orgânicos por cromatografia em uma coluna de Sephadex G-25 equilibrada com 1mM de Tris, pH 8,0, e também por passagem através de coluna deionizadora descrita por Garlick *et al.* (1978). Todos os experimentos utilizaram tampões Bis e Tris de força iônica 0,05. O efeito do ATP foi medido pela adição de 1 mM de ATP no tampão.

O equilíbrio do oxigênio foi medido pelo método de Allen *et al.*, (1950) e Riggs & Wolbach (1956) e o resultado foi calculado como o descrito por Nagel *et al.* (1965). A solução foi desoxigenada com água saturada de argônio livre de oxigênio, a qual foi passada através de tonômetros contendo as soluções. Os espectros das soluções foram determinados com espectrofotômetro Beckman modelo DB acoplado ao registrador. Os tonômetros tinham cubetas pyrex de 1 cm fundidos aos mesmos. Todas as medidas cinéticas foram feitas com um aparelho "stopped-flow" do tipo descrito originalmente por Gibson e Milnes (1964) a 20°C. As constantes cinética apresentada são aos mínimos quadrados ajustados para as primeiras 65% das reações observadas. As análises cinéticas das reações bifásicas foram realizadas como descrito por Galdames-Portus *et al.* (1978).

A cinética da dissociação do oxigênio foi medida por variação de pH, procedimento descrito por Noble *et al.* (1950). Hemoglobina oxigenada em Tris 1mM, pH 8,0, foi misturada com uma solução de ditionito de sódio em tampão de força iônica 0,1 no pH desejado. A concentração final da hemoglobina foi aproximadamente 30 μ M (heme equivalentes). A reação foi acompanhada a 560 até 540 nm.

A cinética de combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina desoxigenada foi medida misturando-se soluções de hemoglobina em tampões de força iônica 0,1 e pH desejado com a solução contendo a concentração conhecida, aproximadamente de 85 μ M, de monóxido de carbono dissolvido em água. Depois da mistura, a concentração de hemoglobina foi aproximadamente 3 μ M em heme. A reação foi acompanhada a 420 até 435" nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese em gel de disco dos hemolisados de ambos *Hoplias* e *Hoplerythrinus* apresentou padrões pouco nítidos de bandas múltiplas com mobilidade eletroforética menor que a Hb. A humana aumentando a concentração da acrilamida no gel para 10% não melhorou significativamente a resolução. Padrões idênticos de hemoglobina foram encontrados em hemolisados de peixe de diferentes localidades. *Hoplias* apresentou 3 bandas nos geis com 60% de concentração de hemoglobina o meio da banda e 20% em cada uma das outras. Reischl (1976) tinha relatado que dois componentes da hemoglobina do *Hoplias* formam polímeros dependentes da oxidação. Tais polímeros não poderia ser vistos nos geis descritos aqui por causa da presença do 0,1 M -mercaptoetanol. *Hoplerythrinus* tem padrão mais complexo com cerca de 80% da concentração de hemoglobina no meio da banda dupla. O peso molecular das cadeias de hemoglobina desnaturadas do *Hoplias* e *Hoplerythrinus* foi estimado ser 14.400 a 14.700, respectivamente em SDS. Estes valores são semelhantes aos encontrados para cadeias de hemoglobinas humanas desnaturadas, 14.600. Valores de hematócritos para o *Hoplias* e *Hoplerythrinus* foram $31 \pm 6\%$ e $32 \pm 2\%$ (média \pm D. P. N=5), respectivamente. Os resultados das medidas do equilíbrio do oxigênio, resumidas nas tabelas I e II, mostram que a afinidade pelo oxigênio da hemoglobina do *Hoplerythrinus* corresponde aproximadamente a um terço da hemoglobina do *Hoplias* a pH 7-8. A pressão de oxigênio para 50% de saturação, P_{50} , é cerca de 4,1 mm de Hg para a hemoglobina do *Hoplias* a 20°C e pH 6.93. O fator de Bohr médio, $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$, é aproximadamente -0,40 para ambas as hemoglobinas no intervalo de pH 7-8. Por outro lado, o efeito de 1 mM ATP a pH 6,9 é idêntico para cada hemoglobina diminui cerca de 2,6 vezes. A pH 8, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio para *Hoplias* não é atingida pelo ATP enquanto a hemoglobina do *Hoplerythrinus* decresce cerca de 27%.

O valor do coeficiente de Hill, n , e cerca de 1,5-1,6 para ambas as hemoglobinas a pH 6,9 e este valor não é mudado pela adição de 1mM ATP. O valor de n é quase a unidade para a hemoglobina do *Hoplias*, porém permanece

como 1,5 para a hemoglobina do *Hoplerythrinus*. Entretanto, depois da adição de 1 mM ATP a pH 8, o valor de n é diminuído substancialmente na hemoglobina do *Hoplerythrinus* enquanto esta adição não tem efeito no valor de n obtido para a hemoglobina do *Hoplias*.

TABELA I — Sumário do equilíbrio de oxigênio da hemoglobina do *Hoplerythrinus unitaeniatus*^a

pH	ATP	log P_{50}	n	log P_{50}	
				pH	
5.9 ^b	—	1.8	—		
6.9	—	0.61	1.5		-0.40
8.0	—	0.17	1.5		
6.9	+	1.02	1.6		-0.68
8.0	+	0.28	1.9		

(a) Condições destas experiências:

20°C, tampão, 0.05 força iônica Bis-tris pH abaixo de 7, 0.05 força iônica Tris pH acima de 8.0. Concentração de ATP 1mM concentração de hemoglobina $\approx 40 \mu\text{M}$ (heme).

(b) Estes experimentos foram feitos como se segue:

A hemoglobina foi desoxigenada em 1 mM Tris, pH 8,75, depois foi suficientemente desoxigenada em 0.2 M Bis-tris de pH 5,9 foi adicionado para baixar o pH para 5,9. O tampão final Bis-tris foi de 0,05 de força iônica. Injeção de uma alíquota de ar resultou em único ponto, Y_{50} com $\log P = 1.73$; e $\log P_{50}$ foi estimado em valores de n compreendidos $1,0 < n < 1,5$. O espectro da oxiemoglobina foi obtida pela adição de Tris sólido, e equilibrado com ar com alto pH.

TABELA II — Sumário do equilíbrio de oxigênio da hemoglobina do *Hoplias malabaricus*^a

pH	ATP	log P_{50}	n	$\Delta \log P_{50}$	
				ΔpH	
6,9	—	0,01	1,6		-0.40
8,0	—	-0,35	1,1		
9,0	—	-0,23	1,1		
6,1 ^b	+	1,14	0,7		-0.68
6,9	+	0,52	1,5		
8,0	+	-0,35	1,1		

(a) Condições foram descritas na tabela I.

(b) Oxigênio a 1 ATM foi usado para oxigenar a amostra.



Fig. 1 — Poliacrilamida em disco de gel de hemolisados de *Hoplías malabaricus* (esquerda), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (centro), e homem (direita). As bandas restantes em cada gel é de albumina de soro de Boi. O anodo é a base.

A adição de 1mM ATP diminui o valor aparente do fator de Bohr, $\Delta \log P_{50}/\Delta pH$, de -0,40 para -0,68 (hemoglobina do *Hoplerythrinus*) e de -0,40 para -0,79 (hemoglobina de *Hoplías*) no intervalo de pH 7-8. Estas mudanças não são usuais para a hemoglobina dos teleósteos.

Ambas as hemoglobinas têm efeito Root, porém dados extensivos não foram obtidos a baixo pH porque cada uma dela não se mostraram sensíveis à oxigenação da meta hemoglobina a baixo pH. O valor do P_{50} da hemoglobina do *Hoplerythrinus* foi estimada em cerca de 63 mm de Hg a pH 5,9 (veja tabela I). Este experimento, que foi repetido, depende da desoxigenação e alto pH, a adição de tampão desoxigenado para abaixar o pH, seguindo-se de injeção de uma única alíquota de ar. Imediatamente depois desta injeção, seguindo o equilíbrio e medição, o tonômetro foi aberto, Tris sólido foi adicionado e o espectro resultante

da oxiemoglobina foi medido. O tempo total de exposição da hemoglobina ao pH baixo foi em torno de 11-12 minutos. Períodos de tempo mais longos (30-40 minutos) conduzem inevitavelmente para a não aceitação de grandes quantidades de metaemoglobina (50% ou mais). Se admitirmos que o coeficiente de Hill, n , é 1,0, o grau de saturação a um pO_2 de 150 mm de Hg (ar) poderá ser cerca de 70%. Do mesmo modo, se o valor de n for alto como 1,5 (valor improvável) o nível de oxigenação poderá ainda ser em torno de 75%.

Semelhantemente, na presença de 1mM ATP, a hemoglobina do *Hoplías* tem muito mais afinidade pelo oxigênio em pH, próximos de 6 do que a hemoglobina do *Hoplerythrinus* na ausência de fosfatos orgânicos. A pH 6,1 o valor P_{50} é apenas 13,8 mm de Hg, e o valor de n é apenas 0,7. Estes valores indicam um nível de oxigenação em torno de 83% a um pO_2 de 150 mm de Hg. Os índices de dissociação do oxigênio para a hemoglobina do *Hoplías* e *Hoplerythrinus* foram medidos a três pH em presença e ausência de 1mM ATP. Embora estas preparações de hemoglobina contenham múltiplos componentes, as reações parecem ser cineticamente homogêneas e cada uma poderá ser descrita por uma constante de velocidade única. Estas constantes velocidades são ploteadas em função do pH na fig. 2. As hemoglobinas do *Hoplías* e *Hoplerythrinus* apresentam-se muito semelhantes referentes a estas constantes. ATP tem mui pequeno efeito na velocidade de dissociação de oxigênio exceto a pH 6,9 em que na ausência de ATP a constante de velocidade para a hemoglobina do *Hoplías* é consideravelmente menor desnaturadas do *Hoplías* e *Hoplerythrinus* foque as encontradas por outros sistemas. A alta dependência do pH existem em todos estes sistemas: a constante de velocidade aumenta 10 vezes quando pH diminui de 7,8 para 6,3.

A reação do monóxido de carbono com a hemoglobina do *Hoplías*, em contraste com a dissociação de oxigênio é cineticamente heterogênea a todo pH examinado, com ATP ou sem ATP. Dois processos cinéticos podem facilmente ser discernidos, cada um respondendo aproximadamente pela metade do total da mudança na absorvância. Por suas dependências nos comprimentos de ondas foi claro que

ambos os processos foram reações de combinação com monóxido de carbono. A constante reação de segunda ordem para as duas fases foram computadas e esboçadas na fig. 3 em função do pH. A fase rápida tem um índice constante cerca de $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ e é inalterada pelo pH ou 1 mM ATP. A fase lenta é dependente do pH na faixa de 6,1 a 7,1 porém permanece inalterado quando o pH é aumentado além de 8,2. O único efeito significativo do ATP observado é até pH 6,1 na fase lenta o qual é diminuído cada vez mais pela adição de 1 mM de ATP.

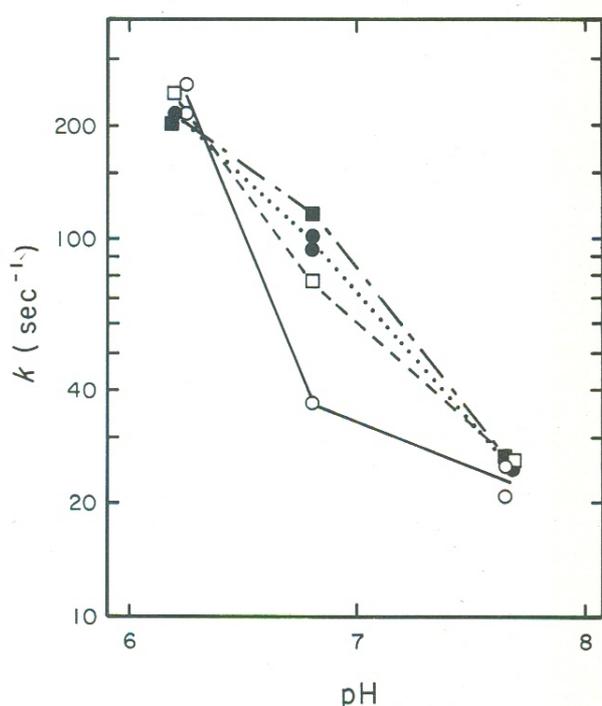


Fig. 2 — Dependência do pH da velocidade de dissociação do oxigênio das hemoglobinas do *Hoplias* (O, ●) e do *Hoplerythrinus* (□, ■) a 20°C. Os símbolos abertos representam os dados obtidos em ausência de ATP e os fechados em presença de 1mM de ATP. A constante de velocidade de primeira ordem, K, é graficada em escala logarítmica em função do pH.

A cinética da reação do monóxido de carbono com a hemoglobina do *Hoplerythrinus* foi medida sob as mesmas condições do *Hoplias* com resultados apresentando diferenças significativas. A heterogeneidade da cinética foi

máxima ao pH baixo e cada fase respondendo por cerca da metade das reações observadas, porém a heterogeneidade decresce e desaparece se o pH for aumentado. A constante de velocidade de segunda ordem foi esboçada na fig. 4. Ao pH 6,1, a fase rápida da reação tem uma velocidade constante, a qual é menor que metade da fase rápida da reação com a hemoglobina do *Hoplias*. A fase lenta tem uma velocidade semelhante à da hemoglobina do *Hoplias*, enquanto não é observado o efeito com ATP. Ao pH 8,2, a única constante de velocidade e próxima da mesma que foi obtida para a fase rápida ao pH 6,1 e é apenas 30% mais rápida que a fase lenta observada com a hemoglobina do *Hoplias* neste pH. Ao pH 7,1, há um efeito definido ao ATP. Na ausência dele, a reação é cineticamente homogênea com uma velocidade igual à da fase lenta ao pH 6,1. A adição de 1 mM ATP baixa a velocidade da reação e induz heterogeneidade, embora a constante de reação para as duas fases difiram por um fator menor que 2. A origem da heterogeneidade na reação destas hemoglobinas com o monóxido de carbono não está em nosso objetivo uma possível interpretação é que ela se reflete na heterogeneidade eletroforética da hemoglobina destes animais. Por outro lado, é estranho que cada uma das duas fases represente metade do total da reação. Isto é remanescente de alguns componentes simples das hemoglobinas do peixe, do qual tal heterogeneidade cinética provém a partir de uma heterogeneidade funcional das subunidades α e β (Bonaventura, *et al.* 1976; Pennelly, *et al.*, 1978). Mais dados são necessários para uma escolha ser feita entre estas alternativas.

Em conclusão, este estudo tem demonstrado uma larga semelhança nas propriedades funcionais das hemoglobinas do *Hoplias* e *Hoplerythrinus* apesar das diferenças em seus componentes respiratórios sob condições hipóxicas. Cineticamente, a maior diferença entre as duas hemoglobinas está nas velocidades da fase rápida de suas reações com monóxido de carbono. Fisiologicamente, a diferença na afinidade pelo oxigênio das duas hemoglobinas pode ser correlacionada com continuada respiração aquática pelos *Hoplias* e a mudança para respiração aérea pelos *Hoplerythrinus* em ambiente de baixo teor de oxigênio.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi patrocinado pela bolsa PCM75-06451 da NSF, e por outra da Norwegian Research Council for Science and the Humanities. Somos gratos aos Brasileiros por possibilitarem que R/V "Alpha Helix" entrasse no Amazonas e ao Capitão Clarck e sua tripulação por sua cooperação. Patrocínio adicional foi dado pelo NSF Frant PCM-76-06119 (A.R.) e pela University of Texas Research Institute. R. W. Noble is Established Investigator of the American Heart Association.

SUMMARY

Hemolysates from *Hoplias malabaricus* and *Hoplerhythrinus unitaeniatus* show blurred hemoglobin patterns with 3 and 4 bands, respectively, by alkaline disc gel electrophoresis. The oxygen affinity of the stripped hemoglobin from *Hoplerhythrinus* is about a third of that from *Hoplias*; the P_{50} value for *Hoplias* Hb is about 1.3 mm Hg (pH 6.9 and 20°C). The addition of 1 mM ATP lowers the oxygen affinity of each hemoglobin 2.6 fold. Both hemoglobins show Root and Bohr effects; $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH} = -0.40$ for the stripped hemoglobins for the interval pH 7-8. The rate of dissociation of oxygen from each hemoglobin is similar and is kinetically homogeneous with rate constants decreasing from 200-250 sec^{-1} at pH 6.2 to about 25-26 at pH 7.7 with or without 1 mM ATP. The CO combination reaction for *Hoplias* hemoglobin is kinetically heterogeneous at all pH values and for *Hoplerhythrinus* hemoglobin below pH 7.5. The fast and slow phases each account for about half the observed reaction. The kinetic heterogeneity is maximal at low pH for both hemoglobins. The fast phase for *Hoplias* hemoglobin is more than twice that for *Hoplerhythrinus* hemoglobins.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, D.W.; GUTHE, K.F. & WYMAN, J.
1950 — Further studies on the oxygen equilibrium of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 187:393-410.
- BONAVENTURA, C.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J. & BRUNORI, M.
1976 — Spot hemoglobin. Studies on the Root Effect Hemoglobin of a Marine Teleost. *J. Biol. Chem.*, 251:1871-1876.

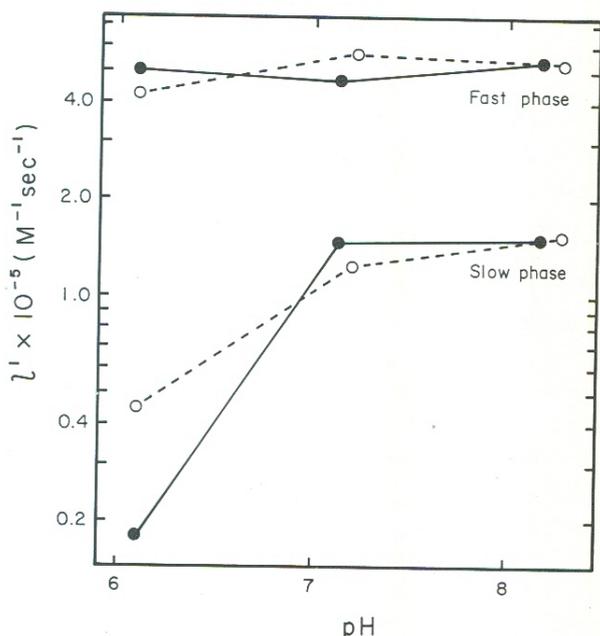


Fig. 3 — Dependência do pH do constante de velocidade l' para as fases rápidas e lentas de combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina do *Hoplias* em presença (●) ausência, O, de 1 mM de ATP a 20°C. As velocidades são desenhadas em escala logarítmica em função do pH.

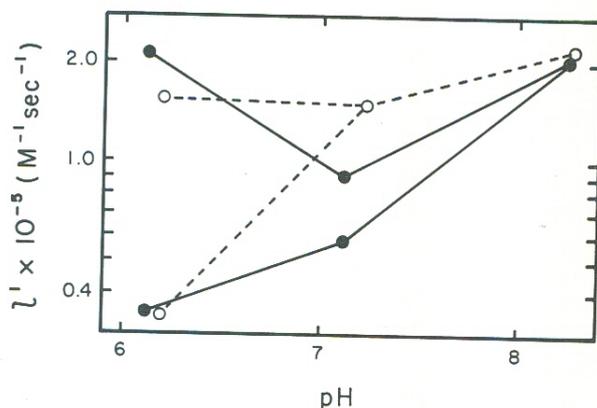


Fig. 4 — Dependência do pH da constante de velocidade l' , para a combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina do *Hoplerhythrinus* a 20°C, em presença (●), e ausência (O) de 1 mM de ATP. A constante de velocidade segunda ordem para esta reação foi desenhada em escala logarítmica em função do pH. Onde dois valores são dados para um único pH, isto representa as constantes associadas com as fases separadas na reação bifásica.

CARTER, G.S. & BEADLE, L.C.

- 1931 — The Fauna of the Swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its Environment. II. Respiratory adaptations in the Fishes. *J. Linnean Society*, 37:327-368.

DAVIS, B.J.

- 1964 — Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404-427.

GARLICK, R.L.; DAVIS, B.J.; FARMER, M.; FYHN, H.J.; FYHN, U.E.H.; NOBLE, R.W.; POWERS, D.A.; RIGGS, A. & WEBER, R.E.

- 1978 — Uma troca materno-fetal no equilíbrio de oxigênio das hemoglobinas dos caecílios vivíparos *Typhlonectes compressicauda*. *Acta Amazonica* 8(4): Suplemento. (Este volume).

GIBSON, Q.H. & MILNES, L.

- 1964 — Apparatus for Rapid and Sensitive Spectrophotometry. *Biochem. J.*, 91: 161-171.

NAGEL, R.L.; WITTENBERG, J.B. & RANNEY, H.M.

- 1965 — Oxygen equilibria of the hemoglobin-haptoglobin complex. *Biochim Biophys Acta*, 100:286-289.

NOBLE, R.; PARKHURST, L.J. & GIBSON, Q.H.

- 1970 — The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with hemoglobin of carp *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.*, 245:6628-6633.

PENNELLY, R.R.; RIGGS, A. & NOBLE, R.W.

- 1978 — Kinetics and equilibria of squirrel fish hemoglobin; A Root effect hemoglobin complicated by Large subunit heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta.*, (no prelo).

ORNSTEIN, L.

- 1964 — Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 321-349.

REISCHL, E.

- 1976 — The hemoglobins of the fresh-water teleost *Hoplias malabarica* (Bloch, 1794): Heterogeneity and Polymerization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B: 255-257.

RIGGS, A.F. & WOLBACH, R.A.

- 1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 39: 585-605.

WEBER, K. & OSBORN, M.

- 1969 — The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244:4406-4412.

WILLMER, E.N.

- 1934 — Some observations on the respiration of Certain Tropical fresh-water fishes. *J. Exp. Biol.*, II: