

# Uma troca materno-fetal no equilíbrio de oxigênio das hemoglobinas dos caecílios vivíparos, *Typhlonectes compressicauda* (\*)

Robert L. Garlick (1); Bonnie J. Davis (2); Martha Farmer (3); Hans Jorgen Fyhn (3); Unni E. H. Fyhn (4); Robert W. Noble (5); Dennis A. Powers (6); Austen Riggs (1); Roy E. Weber (7)

## Resumo

Mediram-se o equilíbrio e a cinética de ligação do oxigênio pelo sangue e hemoglobina de adultos e fetos de *Typhlonectes compressicauda*. A afinidade pelo oxigênio do sangue fetal é mais alta do que a do sangue do adulto. A eletroforese das hemoglobinas fetal e adulta sugere que elas podem ser idênticas, ocorrendo um componente principal e um secundário em cada uma delas. As hemoglobinas adulta e fetal possuem idêntico equilíbrio de oxigênio. Hemoglobinas fracionadas possuem uma alta afinidade pelo oxigênio e nenhum efeito Bohr entre pH 6,5 e 10,0. Um efeito Bohr reverso "ácido" está presente abaixo de pH 6,5. A adição de 1mM de ATP reduz acentuadamente a afinidade de oxigênio e produz um efeito Bohr normal moderado. O principal nucleosídeo trifosfato nos eritrócitos fetais e adultos é adenosina trifosfato; cerca de 10% dos nucleosídeos trifosfatos são guanosina trifosfato. Eritrócitos dos adultos contêm 3 vezes mais ATP do que os eritrócitos fetais. A troca fetal-maternal, no equilíbrio de oxigênio, é mediada inteiramente pela diferença no conteúdo de ATP das células sanguíneas vermelhas maternas e fetais.

## INTRODUÇÃO

Os caecílios tropicais ápodos pertencem à ordem *Gymnophiona*, os quais, juntos com os urodelos e anuros, compreendem as três ordens de anfíbios viventes (Taylor, 1968). O registro fóssil de caecílios consiste apenas de uma única vértebra; provou-se que os dois supostos fósseis mais primitivos pertenciam, um, a um bagre e outro a um molusco (Estes & Wake, 1972). Algumas espécies de caecílios escavam o solo úmido; outras são aquáticas. Algumas são ovíparas, mas, há mais, de cem anos, Peters (1875) descobriu

espécimes fetais nos ovidutos do caecílios aquático, *Typhlonectes compressicauda* e Parker (1956) mostrou que o desenvolvimento não é ovovivíparo mas vivíparo, por meio do qual o feto recebe nutrição da mãe. Estas espécies vivem em buracos submersos, em bancos de lama dos rios da bacia amazônica. O comportamento de reprodução foi descrito recentemente (Murphy *et al.*, 1977). Cada feto possui um par de brânquias externas grandes, altamente vascularizadas, as quais são perdidas logo após ao nascimento.

Towes & Macintyre (1977) observaram que a afinidade pelo oxigênio do sangue total de fetos de *T. compressicauda* é mais alta do que a do adulto. Esta diferença fetal-maternal pode facilitar as trocas gasosas, através da parede do oviduto para as brânquias fetais.

Neste trabalho, descreve-se a base fisiológica e bioquímica para a troca fetal-maternal na afinidade de oxigênio entre os sangues do adulto e o feto de *Typhlonectes compressicauda*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes do caecílios aquático, *Typhlonectes compressicauda*, foram obtidos de um pescador local em novembro, 1976, durante a IV Expedição amazônica R/V "Alpha Helix", em uma área no rio Solimões (Amazonas), cerca de 30 milhas acima da sua junção com o rio Negro, perto de Manaus, Brasil. O período de coleta foi no final da estação seca, quando o nível da água é o mais baixo. Dezesseis

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

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

(2) — Department of Biology, San Francisco State University, San Francisco, California 94132, U.S.A.

(3) — Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina 28516, U.S.A.

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

(5) — Department of Medicine and Biochemistry, Veterans Administration Hospital, State University of New York, Buffalo, New York, U.S.A. Established Investigator of the American Heart Association.

(6) — Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218, U.S.A.

(7) — Institute of Zoophysiology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark.

animais adultos jovens, medindo de 37 a 72 cm de comprimento e de 43 a 250 g de peso, foram estudados. Cinco dos animais (170 a 250 g cada) possuíam fetos em estado avançado de desenvolvimento nos ovidutos. O número de fetos era de 6 a 13 por animal, e pesavam de 5 a 10 g cada. Os fetos possuíam duas grandes (7x13 cm) brânquias externas em forma de folha fixas dorso-lateralmente. Foi feita sangria em 25 fetos imediatamente após terem sido retirados de três fêmeas adultas. Uma fêmea pariu três jovens, os quais foram sangrados, após terem sido mantidos por 8 horas em um aquário. Um jovem foi mantido por 14 dias em um aquário antes de ser-lhe feita a sangria.

Os adultos foram sangrados por perfuração cardíaca após terem sido congelados. Entre 5 e 15 ml de sangue, de cada animal, foram recolhidos em uma seringa de vidro, heparinizada, fria. (100  $\mu$ l sódio-heparina, 5000 unidades internacionais/ml em 1,7% NaCl por 5 ml sangue). Os fetos foram sangrados cortando-se-lhes as caudas. Cerca de 100-400  $\mu$ l de sangue foram coletados de cada feto em tubos de ensaio heparinizado a 5°C. Medidas hematocriticas, preparação hemolisada, disco de *gel*-alcalino para eletroforese (pH 8,9), registro do *gel*, sulfato de sódio dodecil (SDS em *gel* de poliácridamida para eletroforese, foram feitos como o descrito em Fyhn *et al.* (1978). A razão entre a distância de migração eletroforética de um componente de uma hemoglobina e o serum de albumina bovina calculada para cada *gel* foi usada para comparar a mobilidade relativa de componentes de hemoglobina em *geis* de diferentes corridas.

Equilíbrio de oxigênio do sangue total de fetos e adultos de *T. compressicaudas* foi determinado com um analisador de dissociação de oxigênio Hem-O-Scan (American Instrument Co., Silver Spring, Md.) como o descrito por Powers *et al.* (1978). Todo o sangue heparinado foi desoxigenado com 99,999% de nitrogênio, ou 94,4% de nitrogênio mais 5,6% de CO<sub>2</sub>; e foi reoxigenado com 100% de ar com 21% de oxigênio ou 69,4% N<sub>2</sub>, 25% O<sub>2</sub> e 5,6% CO<sub>2</sub>, as amostras de sangue não foram tampoadas, o valor de pH do sangue de cada animal foi tomado como a média do sangue desoxige-

nado e totalmente oxigenado e variaram consideravelmente de animal para animal.

Hemoglobina para os experimentos de equilíbrio de oxigênio e cinética rápida, foi cromatografada primeiro em uma coluna de 2x50 cm de Sphadex G-25 meio, em 0,1 mM Tris pH 8,5 e passada, então, em uma coluna deionizante (1,5x30cm) consistindo das seguintes resinas de cima para baixo: 2 cm Dowex-1 (em forma de acetato), 2 cm Dowex-50W (íon em forma de amônio) e 20 cm de Bio Rad AG 501-X8(D) resina de troca iônica de camada mista. Esta hemoglobina fracionada foi ajustada para cerca de 30  $\mu$ M (heme) em tampão de força iônica constante (I=0,05) e Cl constante feito com Tris ou Bis Tris. Medidas do equilíbrio do oxigênio foram feitas a 20°C em vidros tonométricos (Riggs & Wolbach, 1956). O valor para P<sub>50</sub>, o oxigênio para meia saturação em mm Hg e o coeficiente "n" de Hill foram determinados da média da inclinação da representação gráfica de Hill para os dados colocados entre 25 e 75% de oxigenação. Os equilíbrios de oxigênio foram determinados para hemoglobina fracionada com e sem 1mM de ATP.

Todas as medidas cinéticas foram com um aparelho regulador de fluxo do tipo originalmente descrito por Gibson & Milnes (1964). A força iônica da solução final foi de 0,05 em todo o experimento. Quando o ATP foi usado, estava em uma concentração de 1mM após a mistura. Os cálculos da constante cinética são derivados do ajuste dos pontos pelo método dos mínimos quadrados feito com os dados dos 65% das reações observadas inicialmente.

As dissociações cinéticas do oxigênio foram medidas em diferentes pH procedimento descrito por Noble *et al.* (1970). A hemoglobina oxigenada em 1 mM Tris, no pH 8,0, foi misturada a uma solução de ditionito de sódio em tampão de força iônica de 0,1 no pH desejado. A concentração final da hemoglobina foi cerca de 30  $\mu$ M (heme) e a reação foi seguida a 560 e 540 nm.

As cinéticas de combinação do monóxido de carbono com hemoglobina desoxigenada foram medidas por misturas de soluções de hemoglobina desoxigenada em tampão de força iônica 0,1 de pH desejado com uma solução

contendo 85  $\mu\text{M}$  de CO em água. Depois da mistura, a concentração de hemoglobina foi de cerca de 3  $\mu\text{M}$  (heme). A reação foi seguida a 420 e 435 nm.

A concentração total do nucleotídeo trifosfato nos eritrócitos foi medida enzimaticamente com um equipamento NTP (produto número 366-UV, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Na análise, usamos fosfoglicerato fosfoquinase e gliceraldeído fosfato desidrogenase e monitoramos o decréscimo na absorbância a 340 nm acompanhando a oxidação NADH a NAD<sup>+</sup>:

O total de ATP nos eritrócitos foi medido da seguinte maneira: 150  $\mu\text{l}$  de sangue foram coletados em um tubo capilar heparinizado. O sangue foi imediatamente suspenso em 6,0 ml 0,9% NaCl em 10 mM fosfato, pH 7,0 a 4°C; 3,0 ml foram removidos para determinação de hemoglobina e 2,0 ml foram removidos para determinação de ATP. Ambas as alíquotas foram transferidas para tubos de polipropileno de 10 ml e centrifugadas para aglutinar os eritrócitos. Depois de removido o sobrenadante, os eritrócitos usados para determinação de hemoglobina foram lisados com 2,0 ml de fosfato 10mM a frio, pH 7,0. O estroma foi removido por centrifugação e a absorbância da solução transparente foi medida a 540 nm como HbCO. Os agregados de eritrócitos usados para análise de ATP foi lisado com 5,0 ml de 0,05N de HNO<sub>3</sub> a frio. proteína precipitada e o estroma foram removidos por centrifugação a 4°C. O sobrenadante foi diluído 100 vezes com água destilada deionizada. As amostras diluídas foram examinadas dentro de 4 minutos para minimizar a hidrólise do ATP. Uma luciferase de vaga-lume modificada para análise de ATP (Greaney e Powers, 1977) foi usada com um fotômetro acoplado a um gravador de duplo canal Sanborn. Uma alíquota (0,1ml) da amostra foi injetada dentro da solução cuvette contendo 0,1 ml de uma solução de luciferase (Instituto Dupont, Wilmington, Del.). A altura do pico descrito no gravador é proporcional à intensidade de luz a qual por seu turno é proporcional à concentração de ATP na amostra. O sistema de análise foi calibrado diariamente com padrões preparados momentos antes do experimento. A intensidade de luz foi linear

com uma concentração entre 1 ng e 1  $\mu\text{g}$  de ATP por ml. As amostras, usualmente, contêm ATP próximo de  $5 \times 10^{-8}$  g/ml. Todas as amostras correram em triplicata.

As concentrações de ATP e GTP no sangue (desproteínizado com um volume de 10% de ácido tricloroacético) foram também determinadas com uma cromatografia de camada fina como descrita por Cashel *et al.* (1968) e modificada por Weber *et al.* (1976) com placas portadoras de celulose (CEL 300, PEI-Macherey, Nagel Co., Duren, Alemanha Ocidental).

## RESULTADOS

Os padrões eletroforéticos para as hemoglobinas do sangue do adulto e do feto de *T. compressicauda* foram idênticos (Fig. 1). O hemolisado teve um componente principal com uma mobilidade de 0,53-0,54 em relação ao serum de albumina bovina. A hemoglobina-A humana teve uma mobilidade relativa  $0,66 \pm 0,01$  (média  $\pm$  desvio padrão, N=5). Na maioria dos *geis* um componente mais lento com uma mobilidade relativa de  $0,44 \pm 0,02$  (N=41), estava presente em quantidades variando de 5-25% da quantidade total de hemoglobina. Um componente secundário abrangendo menos de 5-10% da hemoglobina e com uma mobilidade relativa de  $0,32 \pm 0,02$  (N=15) foi observado nos *geis* depois da armazenagem do hemolisado.

Os pesos moleculares das cadeias de hemoglobinas nos adultos, jovens e fetos, em eletroforese *gel* e SDS foram todos encontrados estando por volta de 17.200. Isto é ligeiramente mais alto que o peso molecular encontrado para as cadeias de hemoglobina humana desnaturada, 14.600 e do peso molecular encontrado para as hemoglobinas desnaturada dos peixes amazônicos, 14.200-17.200 (Fyhn *et al.*, 1978).

O hematócrito de sangue de uma espécie grávida de *T. compressicauda* foi de  $26 \pm 10\%$  (média  $\pm$  desvio padrão, N=5), a qual foi muito menor quando em comparação com o sangue das espécies não grávidas ( $48 \pm 9\%$ , N=9). Nenhuma correlação foi encontrada entre hematócrito e peso do corpo. O método de sangramento impediu determinações de hematócrito do sangue dos fetos.

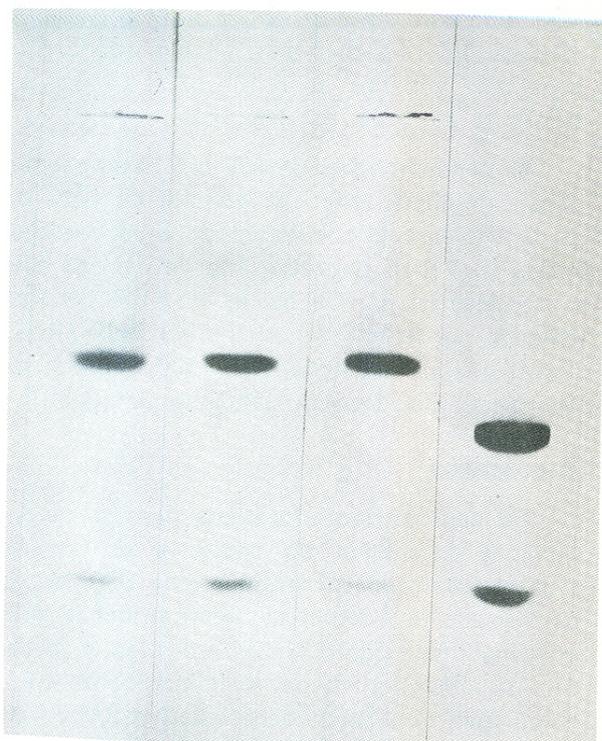


Fig. 1 — Eletroforese em disco gel de poliacrilamida dos hemolisados de adultos e fetos de *T. compressicauda* e de homem. Da esquerda para a direita: hemolisado de adulto de *T. compressicauda*; hemolisado de feto de *T. compressicauda*; hemolisado de feto mais adulto de *T. compressicauda*; hemolisado de células do sangue humano.

Os equilíbrios de oxigênio para o sangue do adulto e dos fetos de *T. compressicauda* são mostrados na Fig. 2. O valor de  $\log P_{50}$  para sangue de adulto e feto a 20°C e 30°C estão plotados contra o pH do sangue. Cada ponto representa o resultado com uma amostra de sangue de um diferente indivíduo. A figura 2 também indica em quais pontos foram usados 5,6% de  $\text{CO}_2$  para baixar o pH do sangue. Nenhum tampão foi usado em qualquer dos experimentos com o sangue total. A variação do pH do sangue entre indivíduos foi, presumivelmente, causada pelas diferentes quantidades de lactato no sangue gerado pelo esforço animal, diferenças nos níveis de ATP ou variações na capacidade de tamponamento do sangue de diferentes indivíduos. A 30°C o  $P_{50}$  para o sangue de espécies adultas aumenta de 10,5 mm Hg a pH 7,8 para 36,3 mm Hg a pH 7,01. A 20°C o  $P_{50}$  do sangue do adulto aumenta

de 8,4 mm Hg a pH 7,76 para 14,8 mm Hg a pH 7,30. O  $P_{50}$  para o sangue do feto a 30°C aumenta de 7,9 mm Hg a pH 7,69 para 8,6 mm Hg a pH 7,38. A 20°C o  $P_{50}$  do sangue fetal não mostra nenhuma troca entre pH 7,3 e 7,8. Um ótimo ajuste de regressão linear traçada através dos pontos da Fig. 2 pelo método da soma dos quadrados, indica que o fator Bohr ( $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ ) igual a  $-0,58$  para o sangue dos adultos a 20°C e 30°C;  $+0,02$  para o sangue dos fetos a 20°C e  $-0,14$  para o sangue dos fetos a 30°C.

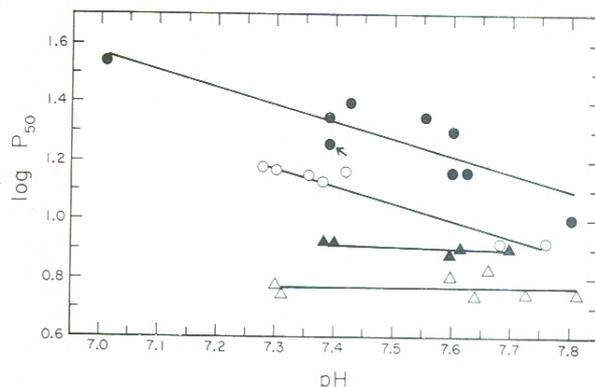


Fig. 2 — Efeito do pH e temperatura sobre a afinidade de oxigênio do sangue total em adultos e fetos de *T. compressicauda*. O valor de  $\log P_{50}$  para a totalidade de sangue foi obtido usando-se o analisador de dissociação de oxigênio Hem-O-Scan. Cada ponto representa um valor de  $\log P_{50}$  de sangue obtido de um indivíduo. Todos os pontos abaixo de pH 7,5, exceto o ponto marcado com uma seta, representa os experimentos nos quais foram usados 5,6% de dióxido de carbono. Todos os outros pontos foram obtidos na ausência de dióxido de carbono. ●, sangue de adulto a 30°C; ○, sangue de adulto a 20°C; ▲, sangue fetal a 30°C; △, sangue fetal a 20°C. As condições são descritas no texto.

Embora as medidas com o sangue total (Fig. 2) mostrassem que o sangue fetal das células vermelhas perderam o efeito Bohr encontrado no adulto, o comportamento das hemoglobinas fracionadas, isoladas dos fetos não foram distintas das do sangue dos adultos. Estes resultados (Fig. 3 e 4) mostram que os dados para as hemoglobinas dos adultos e dos fetos parecem ser diretamente sobrepostas dentro dos limites de erro. Nenhuma hemoglobina tem um efeito Bohr fisiologicamente significativo na ausência de fosfato orgânico e cada uma tem uma alta afinidade de oxigênio:

o valor de  $P_{50}$  a pH 7,5 e 20°C é cerca de 2 mm Hg e  $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$  não é mais que + 0,02 abaixo de pH 6,5. A afinidade do oxigênio de ambas as hemoglobinas decresce na presença de 1mM de ATP e um substancial efeito Bohr aparece. A pH 6,5 e 20°C o valor de  $P_{50}$  é aumentado de 2 mm Hg na ausência de ATP para cerca de 9 mm Hg em sua presença. O efeito Bohr máximo ocorre entre pH 7,5 — 8,0 onde  $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$  aumenta para cerca de — 0,45.

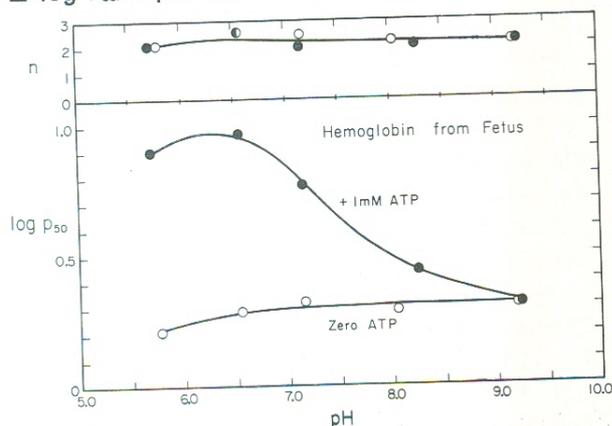


Fig. 3 — Distribuição dos pontos de  $\log P_{50}$  e do coeficiente 'n' de Hill, versus pH de hemoglobinas de fetos *T. compressicauda*. As condições são como as descritas no texto. ○, hemoglobina fracionada; ●, hemoglobina fracionada mais 1 mM de ATP.

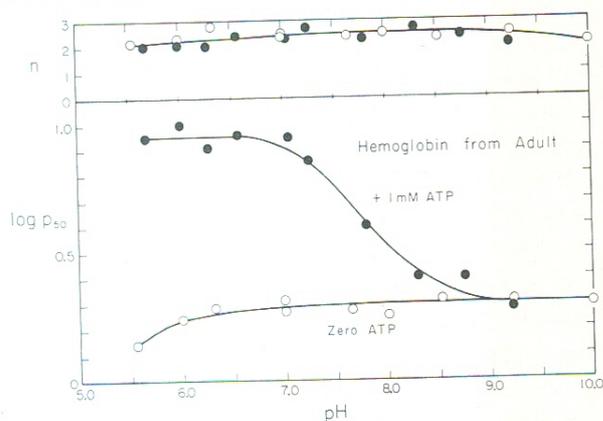


Fig. 4 — Distribuição de pontos de  $\log P_{50}$  e 'n' versus pH de hemoglobina de adulto de *T. compressicauda*. ○, hemoglobina fracionada; ●, hemoglobina fracionada mais 1 mM de ATP.

Medidas de velocidade de dissociação de oxigênio das hemoglobinas dos adultos (Fig. 5) entre pH 5,5 e 9,0 mostra que a velocidade é só ligeiramente dependente do pH na ausência

de fosfato mas que a dependência do pH aumenta enormemente na presença de 1mM de ATP. A troca é qualitativamente consistente com as trocas observadas na afinidade do oxigênio (Fig. 4). A velocidade de combinação de CO (Fig. 6) tem sido medida entre pH 5,5 e 7,5 na ausência de fosfato, mas somente abaixo de pH 7 na presença de ATP.

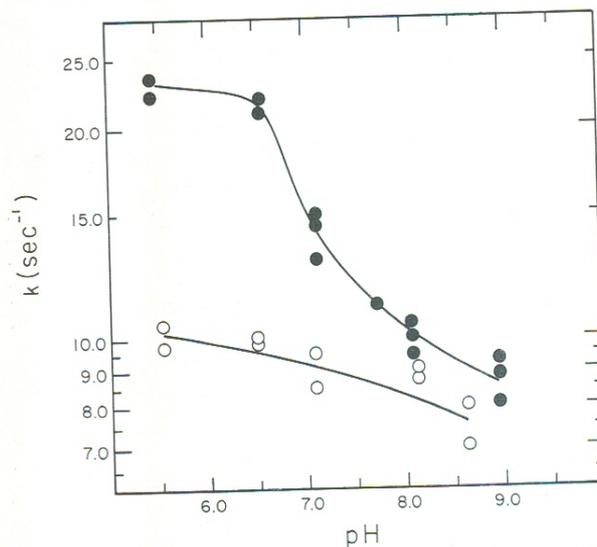


Fig. 5 — Velocidade de dissociação de oxigênio de hemoglobina de adulto de *T. compressicauda* plotadas versus pH. ○, hemoglobina fracionada; ●, hemoglobina fracionada mais 1 mM de ATP. As condições são como no texto.

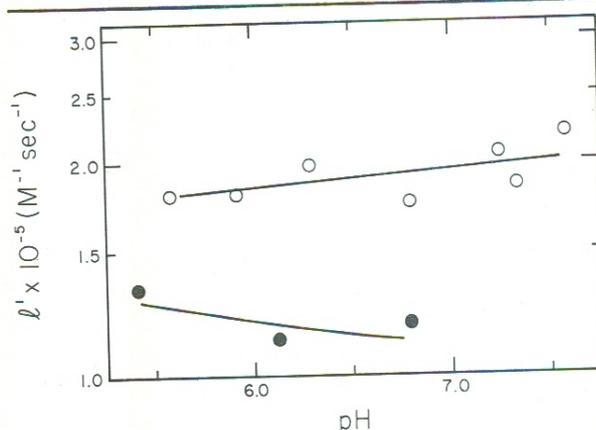


Fig. 6 — Velocidade de combinação de monóxido de carbono com hemoglobina de adulto de *T. compressicauda* plotada versus o pH. ○, hemoglobina fracionada; ●, hemoglobina fracionada mais 1 mM de ATP.

A análise enzimática do nucleosídeo trifosfato, resumida na Tabela 1, usou dois processos: (1) um ensaio enzimático não específico

do total de nucleosídeo trifosfato e (2) um ensaio pela produção de luz com o sistema luciferina-luciferase. Estes resultados mostram que os eritrócitos do adulto continham cerca de 1,9 moles de NTP por mole de hemoglobina, virtualmente tudo o que poderia ser contido como ATP, enquanto que as células vermelhas do feto continham somente 1/3 das contidas no ATP. Uma cromatografia de camada fina no nucleosídeo trifosfato dos eritrócitos dos adultos indicaram que cerca de 90% do NTP está como ATP e cerca de 10% como GTP. A dispersão de NTP estimada (Tab. 1) é grande e bastante para suportar esta pequena quantidade de GTP..

**TABELA I — Concentração de nucleosídeo trifosfato nos eritrócitos de *Typhlonectes compressicauda***

Moles ATP/Mole Hb* (Análise com luciferase)	Moles NTP/Mole Hb* (Processo Sigma)
Espécimes adultos	Espécimes adultos
1.80	1.44
1.87	2.12
1.89	2.23
1.90	1.95
1.94	
—	—
1.88±0.05	1.94±0.35
Espécimes fetais	Espécimes fetais
0.69	0.68
0.71	0.35
0.61	0.60
0.38	0.38
0.95	1.02
0.50	0.72
0.44	0.23
—	—
0.61±0.19	0.57±0.27

(\*) Baseada na hemoglobina tetrâmera.

## DISCUSSÃO

Towes & Macintyre (1977) descobriram que os fetos de caecílios aquáticos, *T. compressicauda*, possuem sangue com maior afinidade pelo oxigênio que os do adulto. Nossos resultados mostram que esta "troca materno-fetal" não resulta de diferenças intrínsecas nas hemoglobinas mas sim na concentração de ATP 3 vezes maior nas células dos adultos quando comparadas com as do sangue dos fetos. As

hemoglobinas dos fetos e dos adultos parecem ter idênticas propriedades de ligação com o oxigênio. Elas são eletroforicamente indistinguíveis e podem ser estruturalmente idênticas.

A diferença de 3 vezes na concentração de ATP parece também ser responsável pelo substancial efeito Bohr das células dos adultos, efeito que é perdido nas células dos fetos. A mais provável explicação para esta diferença funcional, entre os sangues, parece ser a seguinte: se o ATP age aqui como os fosfatos orgânicos fazem com outras hemoglobinas (ver revisão por Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1973), ela faz então ligando-se preferencialmente à deóxi-hemoglobina. Nossos resultados mostram que, na ausência de fosfato, a dependência do pH da ligação do oxigênio (efeito Bohr) é próxima de zero, isto é, o número de prótons ligados a oxi e deóxi hemoglobinas é o mesmo. O efeito Bohr então resulta das ligações do ATP preferencialmente se uma série de grupos protonados na deoxi-hemoglobinas. As ligações, com efeito, aumentam o valor de pK destes grupos, os quais poderiam ter o mesmo valor de pK, nas formas oxi e deóxi, na ausência de ligações específicas. As quantidades menores de ATP, nas células vermelhas fetais, o efeito Bohr poderia resultar grandemente diminuído. O efeito Bohr residual que poderia resultar pela presença de 0,6 moles de ATP por mole de hemoglobina (tetrâmero) pode ser coberto pela extensão dos pontos para o total de sangue desde que o valor de  $P_{50}$  para o sangue fetal seja cerca de 6 mm Hg a 20°C e são incertos por volta de 0,5 — 1,0 mm Hg.

A possibilidade que a hemoglobina fetal e adulta possa ser idêntica é curiosa mas não sem precedente. Hemoglobinas fetais de cavalo, cachorro e porco parecem ser idênticas às dos adultos (Stockell *et al.*, 1961; LeCrone, 1970; Kleihauer & Tautz, 1972; Tautz & Kleihauer, 1972). Os fetos de *T. compressicauda* estavam em avançado estágio de desenvolvimento. Uma hemoglobina de embrião, distinta das hemoglobinas fetais podem estar presentes em estágios mais novos de desenvolvimento. Uma hemoglobina de embrião ou de larva tem sido encontrada em representantes de outras duas ordens de anfíbios viventes. Por exemplo, girinos, de sapo-boi, *Rana catesbeia*.

na, tem 4 hemoglobinas principais. Os componentes I e II presentes em girinos muito jovens tem significativamente mais alta afinidade pelo oxigênio que os componentes III e IV, os quais predominam em girinos mais velhos (Watt & Riggs, 1975). A hemoglobina dos girinos com alta afinidade são substituídas pelas de mais baixa afinidade, após a metamorfose (McCutcheon, 1936; Riggs, 1951). Duas hemoglobinas são encontradas nos girinos de salamandra, *Ambystoma mexicanum*, as quais são substituídas por outros diferentes componentes nos adultos. Nenhuma troca na hemoglobina ocorre quando os adultos neotônicos sofrem o fenômeno da metamorfose (Maclean & Jurd, 1971).

Comparando nos nossos resultados obtidos com o sangue dos *caecili*os aquáticos, *Typhlonectes compressicauda*, com os resultados obtidos por Wood *et al.* (1975) com *caecili*os terrestres (África), *Boulengerula taitanus*, comprovamos que o primeiro tem uma muito maior afinidade pelo oxigênio do que os de *B. taitanus*, Wood *et al.*, (1975) fornecem dados sobre a afinidade pelo oxigênio da hemoglobina fracionada de *B. taitanus* a 10°C e 25°C. O valor de  $\log P_{50}$  é cerca de 0,55 a 25°C. A entalpia aparente de 19,4 K cal/mol permite cálculos do valor de  $\log P_{50}$  esperado a 20°C, o qual corresponde a 0,31 para a hemoglobina de *B. taitanus*, que é idêntica à obtida para a hemoglobina de *T. compressicauda*. Wood *et al.* (1975) descrevem que o efeito Bohr da hemoglobina fracionada de *B. taitanus* é muito pequena e que o efeito do ATP é também pequeno. Desde que a afinidade do oxigênio do sangue para as duas espécies difere grandemente, o que não ocorre para as hemoglobinas, algum outro fator não envolvendo a própria hemoglobina precisa ser responsabilizada pelas diferenças no sangue total.

A mais alta afinidade do oxigênio do sangue nas formas aquáticas não é imprevista. Um levantamento do sangue de anfíbios (Lenfant & Johansen, 1967, e Johansen & Lenfant, 1972) mostra uma clara tendência para com as mais baixas afinidades de O<sub>2</sub> nos sangues dos anfíbios, os quais contam com mais O<sub>2</sub> em seus pulmões do que as formas aquáticas que podem utilizar troca de O<sub>2</sub> pela cavidade bucal,

brânquias ou pele. Embora *T. compressicauda* provavelmente troque oxigênio mais frequentemente pelos pulmões, CO<sub>2</sub> é parcialmente eliminado através da pele (Sawaya, 1947). A alta afinidade de oxigênio do sangue dos *T. compressicauda* pode também estar associada com o ambiente aquoso relativamente hipóxico em que são encontrados.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo subsídio PCM-06451 de National Science Foundation para estudos a bordo do R/V "Alpha Helix". Estamos agradecidos aos brasileiros por sua ajuda por terem permitido que o R/V "Alpha Helix" entrasse em águas amazônicas. Gostaríamos de agradecer ao Capitão Clarke e tripulação por sua cooperação. Subvenção adicional foi cedida por Norwegian Research Council for Science and Humanities (H.J. e U.E.H.F.), subsídio NSF-DEB-76-19877 (D.A.P.), NIH-HL-15460 (a J. Bonaventura, pela ajuda a M.F.) NSF-PCM-76-06719 (A.R.) e NIH-BM-21314 (A.R.), da Universidade of Texas Research Institute (A.R.) e de National Geographic Society (D.A.P.). Auxílio n.º 303-3765 a M. Farmer da Duke University Research Award.

#### SUMMARY

The equilibria and kinetics of oxygen binding by blood and hemoglobin from adult and fetal caecilians, *Typhlonectes compressicauda*, have been measured. The oxygen affinity of fetal blood is higher than that of adult blood. Electrophoresis of adult and fetal hemoglobins suggests that they may be identical; a major and minor component occurs in each. Adult and fetal hemoglobins have identical oxygen equilibria. Stripped hemoglobins have a high oxygen affinity and no Bohr effect between pH 6.5 and 10.0. An "acid", reversed Bohr effect is present below pH 6.5. The addition of 1 mM ATP reduces the oxygen affinity markedly and produces a moderate, normal Bohr effect. The major nucleoside triphosphate in fetal and adult erythrocytes is adenosine triphosphate; about 10% of the nucleoside triphosphates is guanosine triphosphate. Adult erythrocytes contain 3 times as much ATP as do the fetal erythrocytes. The fetal to maternal shift in the oxygen equilibrium is mediated entirely by the difference in ATP content of the maternal and fetal red blood cells.

## BIBLIOGRAFIA

- CASHEL, M.; LAZZARINI, R. A. & KALBACHU, B.  
1968 — An improved method for thin-layer chromatography of nucleotide mixtures containing  $^{32}\text{P}$ -labeled orthophosphate. *J. Chromatog.* **40**, 103-109.
- ESTES, R. & WAKE, M.  
1972 — The first fossil record of caecilian amphibians *Nature* **239**, 228-231.
- 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 volume).
- GIBSON, Q. H. & MILNES, L.  
1964 — Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem. J.* **91**, 161-171.
- GREANEY, G. S. & POWERS, D. A.  
1977 — Allosteric modifiers of fish hemoglobins: *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of ambient oxygen and pH on erythrocyte ATP concentration. *J. Exp. Zool.* (In the press).
- JOHANSEN, K. & LENFANT, C.  
1972 — A comparative approach to the adaptability of  $\text{O}_2$ -Hb affinity. In: *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status.* (ed., P. Astrup and M. Rorth), Munksgaard, Copenhagen. pp. 750-780.
- KILMARTIN, J. V. & ROSSI-BERNARDI, L.  
1973 — Interaction of Hemoglobin with Hydrogen Ions, Carbon Dioxide, and Organic Phosphates. *Physiol. Rev.* **63**, 836-890.
- KLEIHAEUER, E. & TAUTZ, C.  
1972 — Gibt es ein fetales Hämoglobin beim Schwein? I. Analysen des Hämoglobins. *Resp. Exp. Med.*, **158**, 219.
- LENFANT, C. & JOHANSEN, K.  
1967 — Respiratory adaptations in selected amphibians. *Resp. Physiol.* **2**, 247-260.
- LE CRONE, C. N.  
1970 — Absence of special fetal hemoglobin in beagle dogs. *Blood* **35**, 451-452.
- MACLEAN, N. & JURD, R. D.  
1971 — Electrophoretic analysis of the haemoglobin of *Ambystoma mexicana* *Comp. Biochem. Physiol.* **40B**, 751-755.
- MCCUTCHEON, F. G.  
1936 — Hemoglobin function during the life history of the bullfrog. *J. Cell. Comp. Physiol.* **8**, 63-81.
- MURPHY, J. B.; QUINN, H. & CAMPBELL, J. A.  
1977 — Observations on the breeding habits of the aquatic caecilian, *Typhlonectes compressicauda*. *Copeia*, 66-69.
- NOBLE, R. W.; PARKHURST, L. J. & GIBSON, Q. H.  
1970 — The effect of pH on the reaction of oxygen and carbon monoxide with the hemoglobin of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Biol. Chem.* **245**, 6628-6633.
- PARKER, H. W.  
1956 — Viviparous caecilians and amphibian phylogeny. *Nature* **178**, 250-252.
- PETERS, W.  
1875 — Über die Entwicklung der Caecillen und besonders der *Caecilia compressicauda*. *Monatsber. Akad. Wissen. Berlin*, 45-49.
- POWERS, D. A.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; MARTIN, J. P.; GARLICK, R. L. & WOOD, S. C.  
1978 — Estudo comparativo de equilíbrio de oxigênio no sangue de 40 gêneros de peixes da Amazônia. *Acta Amazonica* **8**(4): Suplemento. (Este volume).
- RIGGS, A.  
1951 — The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog. *J. Gen. Physiol.* **35**, 23-40.
- RIGGS, A. F. & WOLBACH, R. A.  
1956 — Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **39**, 585-605.
- SAWAYA, P.  
1947 — Metabolismo Respiratório de Anfíbio Gymnophinona, *Typhlonectes compressicauda* (Dum. et Bibr.). *Bol. Fac. Fil. Ciên. Ltr. Univ. S. Paulo, Zool.* **12**, 51-56.
- STOCKELL, A.; PERUTZ, M. F.; MUIRHEAD, H. & GLAUSER, S. C.  
1961 — A comparison of adult and foetal horse haemoglobin. *J. Mol. Biol.* **3**, 112-116.
- TAUTZ, C. & KLEIHAEUER, E.  
1972 — Gibt es ein fetales Hämoglobin beim Schwein? II. Analysen des Globins. *Resp. Exp. Med.* **159**, 44-49.
- TAYLOR, E. H.  
1968 — *The Caecilians of the World*, Univ. of Kansas Press, Lawrence. 848 pp.
- TOEWS, D. & MACINTYRE, D.  
1977 — Blood respiratory properties of a viviparous amphibian. *Nature* **266**, 464-465.
- WATT, K. W. K. & RIGGS, A.  
1975 — Hemoglobins of the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Structure and function of isolated subunits. *J. Biol. Chem.* **250**, 5934-5944.
- 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.
- WOOD, S. C.; WEBER, R. E.; MALOY, G. M. D. & JOHANSEN, K.  
1975 — Oxygen uptake and blood respiratory properties of the caecilian *Boulengerula taitanus*. *Resp. Physiol.* **24**, 355-363.