



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
EVOLUÇÃO

Via Washington Luís, Km 235 - Caixa Postal 676
CEP 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil
e-mail ppggev@power.ufscar.br
Fone/Fax: (0XX16) 260-8306

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS E
CONCENTRAÇÃO DE FOSFATOS ORGÂNICOS EM
ERITRÓCITOS DE DEZ ESPÉCIES DE MORCEGOS
PERTENCENTES ÀS FAMÍLIAS PHYLLOSTOMIDAE E
MOLOSSIDAE (CHIROPTERA - MAMMALIA)**

SIMONI SAVAZZI REINOSO

SÃO CARLOS - SP
2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
EVOLUÇÃO

Via Washington Luís, Km 235 - Caixa Postal 676
CEP 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil
e-mail ppggev@power.ufscar.br
Fone/Fax: (0XX16) 260-8306

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS E CONCENTRAÇÃO
DE FOSFATOS ORGÂNICOS EM ERITRÓCITOS DE DEZ ESPÉCIES DE
MORCEGOS PERTENCENTES ÀS FAMÍLIAS PHYLLOSTOMIDAE E
MOLOSSIDAE (CHIROPTERA MAMMALIA)**

SIMONI SAVAZZI REINOSO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução, área de concentração Genética e Evolução.

Financiamento: CAPES/CNPq/FAPESP

São Carlos - SP
Dez/2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R373pf

Reinoso, Simoni Savazzi.

Propriedades funcionais e estruturais e concentração de fosfatos orgânicos em eritrócitos de dez espécies de morcegos pertencentes às famílias Phyllostomidae e Molossidae (Chiroptera – Mammalia) / Simoni Savazzi Reinoso. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

92 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Morcego. 2. Hemoglobina. 3. Afinidade Hb-O₂.
4. Efeito Bohr. 5. Equilíbrio de oxigenação. 6. Fosfatos
intraeritrocitários. I. Título.

CDD: 599.4 (20^a)



*“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano”.*

Isaac Newton (1642 – 1727)

*Ao meu filho Mateus, que veio de
presente para completar minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Com carinho, respeito e admiração, ao Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes e à Prof.a. Dra. Maria Luiza Barcellos Schwantes: pelo apoio, orientação, críticas, amizade e paciência que ambos me ofereceram.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, do Departamento de Genética e Evolução da UFSCAR: pela ajuda na realização das coletas, além da amizade. Ao Prof. Dr. Manoel M. Dias Filho, do Departamento de Ecologia da UFSCar, pelas boas dicas e aos professores Dr. Paulo César Naoum e Dr. Alfredo De Vitto Neto pela participação na banca e correções feitas.

Aos colegas e companheiros de laboratório Marc, Gustavo, Hugo, Flávia e Rejane : pelo convívio, ajuda, pousadas e bons momentos juntos.

Aos técnicos do laboratório de Citogenética e de Bioquímica, deste departamento, Luís (Piau) e Antônio, pelo bate-papo e apoio nas coletas.

Às funcionárias da secretaria do DGE e do PPG-GEV: Leila, Rosemeire, Regiane e Tatiana: pela compreensão e carinho durante este período.

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e, aos órgãos responsáveis pela preservação da flora e fauna, Instituto Florestal e Ibama.

Em especial:

Aos meus pais, José e Claudete, pelo exemplo de amor, dedicação, honestidade e educação que sempre foram e serão os pilares de minha vida.

Ao meu irmão Rafael, por nosso amor, amizade e cumplicidade.

Ao meu querido esposo Luciano, que me possibilitou trazer ao mundo a forma de vida mais bela, nosso filho Mateus e, pelo carinho, paciência e apoio pessoal dedicado durante a fase final deste trabalho.

Com toda gratidão: a *Deus*.

*Ao meu filho Mateus, que veio de
presente para completar minha vida.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	VI
ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO	1
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1 HEMOGLOBINA: ESTRUTURA FUNDAMENTAL	5
1.1.1 Propriedades funcionais	7
1.2 MORCEGOS: CLASSIFICAÇÃO	11
1.2.1 Morfologia externa e o voo	13
1.2.2 Algumas considerações: reprodução, ecolocalização e órgãos sensoriais	16
1.2.3 Abrigos	17
1.2.4 Regime alimentar	18
1.3 FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE	20
1.4 FAMÍLIA MOLOSSIDAE	21
1.5 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS HB DE CHIROPTERA	22

2.	OBJETIVOS	24
3.	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	25
3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	25
3.3	EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO EM SANGUE TOTAL	34
3.4	SOLUÇÃO DE HEMOGLOBINA	35
3.4.1	Eletroforese	35
3.4.1.1	Eletroforese em gel de amido	36
3.4.1.1.a	Coloração da hemoglobina	36
3.4.2	Solução de Hb “stripped”	37
3.4.3	Equilíbrio de oxigenação – Método espectrofotométrico	37
3.4.3.1	Adição de fosfatos	40
3.4.3.2	Determinação do efeito Bohr	41
3.4.4	Extrato de fosfato intraeritrocitário	42
3.4.4.1	Hematócrito (Ht)	42
3.4.4.2	Dosagem do 2,3-Bifosfoglicerato	43
3.4.4.3	Determinação de inositois	44
4.	RESULTADOS	46
4.1	ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO	46
4.2	EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO	46
4.2.1	Sangue total	47
4.2.2	Hemoglobina “stripped”	61
4.2.3	Efeito de moduladores	61
4.2.3.1	2,3-Bifosfoglicerato (2,3-BPG)	61
4.2.3.2	Inositol hexafosfato (IHP)	62
4.3	HEMATÓCRITO (Ht)	62
4.4	DOSAGEM DE INOSITOIS FOSFATADOS E 2,3- BIFOSFOGLICERATO	63
5.	DISCUSSÃO	65
5.1	ELETROFORESE	65
5.2	EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO	67

5.2.1	Equilíbrio de oxigenação em Hb “stripped”, Hb “stripped + 2,3-BPG e IHP e em sangue total	67
5.3	VALORES DE “n” PARA AS HB “STRIPPED”, HB “STRIPPED + MODULADORES E EM SANGUE TOTAL	74
5.4	FOSFATOS ORGÂNICOS (2,3-BPG) E Ht	75
	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1** – Estrutura tridimensional da hemoglobina: (a) oxihemoglobina e (b) desoxihemoglobina com o 2,3BPG evidenciado na cavidade central. 7
- FIGURA 1.2** – Gráfico de Hill mostrando como são determinados o “log(P₅₀)” e a cooperatividade “n₅₀” (IMAI, 1981). 9
- FIGURA 1.3** - Representação esquemática: Morfologia externa de um morcego. 13
- FIGURA 3.1** - Espécies pertencentes às famílias Phyllostomidae e Molossidae analisadas quanto à característica estrutural e funcional da Hb, bem como a concentração de fosfatos. 26
- FIGURA 3.2** – Mapa do estado de São Paulo identificando os diferentes locais de coleta do material biológico. 32

FIGURA 3.3 – Espectro de absorção na faixa visível da hemoglobina que se muda ao se ligar com o oxigênio. 38

FIGURA 4.1 – a) Padrão eletroforético das espécies estudadas: 1. *A. planirostris*, 2. *P. discolor*, 3. *A. lituratus*, 4. *C. perspicillata*, 5. *D. rotundus*, 6. *G. soricina*, 7. *M. ater*, 8. *M. molossus*, 9. *N. laticaudatus* e 10. *E. perotis*. b) Padrão eletroforético das hemoglobinas humana e das espécies 6 e 7. 48

FIGURA 4.2 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Artibeus planirostris*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M. 49

FIGURA 4.3 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Phyllostomus discolor*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M. 50

FIGURA 4.4 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Artibeus*

lituratus. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr
($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e 51

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.5 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Carollia perspicillata*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr 52
($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.6 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Desmodus rotundus*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr 53
($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.7 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Glossophaga soricina*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr 54
($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.8 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Molossus ater*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). 55

Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.9 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Molossus molossus*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e 56

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.10 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Nyctinomops laticaudatus*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e 57

Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

FIGURA 4.11 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Eumops* 58

perotis. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta \text{pH}}$).

Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M.

Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 3.1** - Posição taxonômica das espécies analisadas no presente trabalho segundo VIZZOTO, L.D. & TADDEI, V.A (1973). Locais de coletas e número de indivíduos coletados por espécie. 31
- TABELA 3.2** - Valores médios do peso do corpo e número de machos (♂) e fêmeas (♀) capturados para o presente trabalho. Valores estatísticos do peso (em grama) são demonstrados através da média e desvio padrão. 33
- TABELA 3.3** - Solução de coloração e de lavagem, em gel de amido. 37
- TABELA 4.1**- Valores de efeito Bohr (ϕ), P_{50} e n em sangue, hemoglobina “stripped”, 2,3-BPG e inositol hexafosfato (IHP) das dez espécies de morcegos. 59
- TABELA 4.2** - Valores de hematócrito (Ht), inositol (INS) e

2,3-BPG (BPG) das diferentes espécies. Os resultados de Ht são a média dos valores dos indivíduos por espécie incluindo o desvio padrão ($\bar{X} \pm SD$). A concentração de BPG está expressa em micromoles por mililitro de sangue. 64

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenilato monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-Tris	Bis (2 hidroximetil) amino tris (hidroximetil) metano
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
IHP	Inositol hexafosfato
ml	Mililitro (10^{-3} litro)
mM	Milimolar (10^{-3} molar)
μ M	Micromolar (10^{-6} molar)
n	Coefficiente de Hill (cooperatividade)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	Nanometro (10^{-9} metro)
PGM	Fosfoglicerato mutase
P ₅₀	Pressão de O ₂ para saturar 50% da hemoglobina
pI	Ponto isoelétrico
SD	Desvio padrão (Standard Deviation)
Tris	Tris hidroximetil amino metano

2,3-BPG	2,3-Bifosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
ϕ	Amplitude do efeito Bohr

RESUMO

Foram estudados aspectos estruturais e funcionais da hemoglobina, bem como, a presença dos fosfatos orgânicos em 163 indivíduos de 10 espécies de morcegos pertencentes à família Phyllostomidae (*Artibeus planirostris*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*), e Molossidae (*Molossus ater*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *Eumops perotis*). Essas espécies foram coletadas em regiões diferentes do estado de São Paulo. Através de eletroforese em gel de amido, foram detectado nas 10 espécies estudadas, dois componentes hemoglobínicos, um componente maior, de mobilidade próxima à hemoglobina A₂, e outro menor, de mobilidade próxima a da Hb A humana. Não foi detectada qualquer variação intra ou interespecífica.

Foram detectadas, variações nas propriedades funcionais do sangue. A maioria (7) das espécies apresentou efeito Bohr normal, enquanto que *C. perspicillata*, *D. rotundus* e *M. molossus* apresentou efeito Bohr nulo. *Artibeus planirostris* apresentou efeito Bohr reverso. Todas as espécies apresentaram hemoglobina com efeito Bohr normal na forma stripped, bem como na presença dos moduladores 2,3-bifosfoglicerato e inositol hexafosfato. A adição desses fosfatos orgânicos alterou tanto amplitude do efeito Bohr quanto os valores de P₅₀. A afinidade ao oxigênio das

hemoglobinas stripped das espécies estudadas é alta, sendo diminuída, *in vivo*, por ação de moduladores, provavelmente o 2,3,bifosfoglicerato. Nos eritrócitos de todas as espécies estudadas mostraram 2,3.bifosfoglicerato em concentrações que variaram dependendo da espécie, mas levemente superiores à da maioria dos mamíferos. Não foi detectado qualquer tipo de inositol polifosfatado nos eritrócitos das espécies estudadas.

ABSTRACT

Hemoglobin structural and functional aspects, as well as the presence of intraerythrocytic organic phosphates of 167 individuals of 10 species of bats, belonging to Phyllostomidae (*Artibeus planirostris*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*), and Molossidae family (*Molossus ater*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *Eumops perotis*) were studied. These individuals were collected in different areas of São Paulo State. Hemoglobin of these individuals were submitted to starch gel electrophoresis and showed all the same pattern: one slow major, migrating close to A₂ human hemoglobin and one minor fast component, migrating close to human hemoglobin A. No intra and inter specific variation were detected.

Variations on functional properties in blood were detected. Most of the species (7) presented normal Bohr effect, while *C. perspicillata*, *D. rotundus* e *M. molossus* null Bohr effect. *Artibeus planirostris* presented reverse Bohr effect. All the hemoglobin samples showed normal Bohr effect in the stripped form as well as in the presence of 2,3-biphospho glicerate and inositol hexaphosphate. The addition of this organic phosphate has altered both Bohr

effect and P_{50} values. The oxygen affinities were high in all hemoglobins. *In vivo*, the oxygen affinity of bat hemoglobins is lower due to modulator effect, probably 2,3-biphospho glicerate. In the erythrocytes of all individuals studied 2,3-biphospho glycerate were found in varying concentrations and a little higher than most of Mammals. No inositol polyphosphates were found in any sample tested.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é uma proteína apropriada para estudos que relacionam estrutura, função e adaptação ambiental. Tem como função retirar do meio o oxigênio disponível para suprir as necessidades do organismo. De acordo com HOCHACHKA e SOMERO (1973), não há melhor exemplo de adaptação bioquímica ao ambiente do que a hemoglobina de vertebrados, a qual tem servido de modelo para o estudo de proteínas alostéricas. Mudanças adaptativas na afinidade da Hb ao oxigênio estão relacionadas a alterações ambientais quando o organismo lança mão de maior ou menor produção de Hb ou ação de efetores, que melhorem o seu transporte de oxigênio (RIGGS, 1976). Efetores alostéricos, ou moduladores, modificam a curva de afinidade da Hb ao oxigênio, para regular sua função. Dentre eles temos a concentração de prótons (H^+) que modula negativamente a afinidade da Hb ao oxigênio, constituindo o “efeito Bohr”

$$\left(\phi = \frac{\Delta(\log P_{50})}{\Delta pH} \right), \text{ descrito por BOHR et al. (1904).}$$

Estudos realizados no laboratório do departamento de Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar em morcegos nos motivaram pesquisar o comportamento das hemoglobinas de diferentes espécies relacionando os diferentes hábitos alimentares e estilo de vôo.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As adaptações ao ambiente refletem a habilidade que os organismos desenvolvem para se haverem com as flutuações ambientais. Estas adaptações podem ocorrer em todos os níveis de organização biológica, desde comportamentais, morfológicos, anatômicos e fisiológicos, até moleculares. Assim, todas as interações que esses organismos mantêm com o ambiente afetam seu metabolismo celular (HOCHACHKA e SOMERO, 1984).

A produção de diferentes proteínas por mais de um loco gênico, resultante da duplicação gênica, é um dos processos básicos nos quais as mudanças evolutivas estão baseadas (OHNO, 1970).

Existem evidências de que a variabilidade genética está relacionada com a taxa de mudanças evolutivas (AYALA, 1965, 1968). Alguns pesquisadores acreditam que a maior parte da variabilidade esteja sob controle de seleção natural e, portanto, seja importante na adaptação dos organismos ao meio (SELANDER, 1977).

O processo de seleção natural consiste, basicamente, no fato de um indivíduo portador de uma adaptação ao meio, ter maiores chances de sobreviver e transmitir esta característica à sua progênie.

Existe uma relação direta entre a função de determinadas proteínas e

a ocorrência de polimorfismo. Algumas proteínas são quase sempre polimórficas nas populações, enquanto que outras são raramente (SELANDER, 1977). Assim sendo, mutações gênicas (ocasionando mudanças na sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica) e, conseqüentemente, polimorfismos genéticos podem ser determinados através da variabilidade existente em proteínas. Desde esta descoberta, um grande número de geneticistas e evolucionistas vem se preocupando com o problema do significado biológico da variação genética na estrutura primária das proteínas (MARKERT *et al.*, 1975). Com a finalidade de tentar explicar esta variabilidade genética encontrada nas populações, duas hipóteses foram então formuladas. Uma delas, defendida por Ayala (AYALA, 1969; AYALA & GILPIN, 1974), procura demonstrar que a maioria dos polimorfismos são mantidos pela seleção natural. De outro lado Kimura (KIMURA, 1968; KIMURA & OHTA, 1971) procura demonstrar que a maioria dos polimorfismos é neutra, não existindo portanto, vantagens adaptativas dos portadores de determinados genótipos em relação a outro.

Uma das técnicas mais utilizadas na análise de variabilidade protéica é a eletroforese, que tem fornecido informações sobre a existência e grau de genes polimórficos nas populações (AYALA, 1978). Através deste método pode-se observar a ausência de um aminoácido ou a presença de aminoácido diferente desde que sua carga elétrica total e, conseqüentemente, seu ponto isoelétrico (pI) estejam modificados. Como resultado tem-se a obtenção de faixas, utilizando-se métodos histoquímicos de coloração, que indicam as regiões de atividade enzimática ou de concentração protéica. Assim, devido às suas propriedades eletrocinéticas, proteínas extraídas do sangue e demais tecidos de diferentes indivíduos de uma população podem ser comparadas através da eletroforese.

Polimorfismos hemoglobínicos são relativamente raros, mas não em alguns grupos de animais que apresentam Hb insensíveis a fosfatos orgânicos tais como: bovinos, ovinos, gatos e peixes-bruxa.

1.1- HEMOGLOBINA: ESTRUTURA FUNDAMENTAL

A hemoglobina (Hb), uma proteína apropriada para estudos que relacionam estrutura, função e adaptação ambiental, localiza-se na interface organismo - meio, tendo que retirar do meio o oxigênio disponível para suprir as necessidades do organismo. Sua distribuição filogenética é muito ampla, sendo encontrada tanto em invertebrados quanto em vertebrados.

A Hb é o principal pigmento responsável pelo transporte de oxigênio em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (SCHWANTES, 1972). Estes organismos podem apresentar uma grande variabilidade na estrutura primária da Hb, o que lhes possibilita uma ampla adaptação a diversos ambientes, sejam eles aquáticos, terrestres ou aéreos. Pode ainda ser encontrada em vegetais (leguminosas, alfafa) e em microorganismos como fungos (leveduras), protozoários (Paramecium, Tetrahymena) e bactérias. Várias hipóteses têm sido propostas para a sua função nestes organismos (SCHMIDT-NIELSEN, 1972).

De acordo com HOCHASCHKA e SOMERO (1984), não há melhor exemplo de adaptação bioquímica ao ambiente do que a hemoglobina de vertebrados, a qual tem servido de modelo para estudos de proteínas alostéricas em geral e tem sido denominada “enzima honorária”. Esta denominação baseia-se, segundo RIGGS (1991), na ausência de atividade catalítica e pela molécula possuir todas as propriedades esperadas para uma proteína regulatória (cabe aqui observar que a hemoglobina apresenta algumas atividades catalíticas, pelo menos *in vitro*).

Segundo POWERS (1974), em analogia a denominação utilizada para enzimas, o termo isohemoglobina seria utilizado para as Hb múltiplas que são codificadas em locos gênicos diferentes, e o alohemoglobina para Hb polimórficas que são codificadas em alelos diferentes de um mesmo loco. As hemoglobinas, independentemente de sua origem, possuem subunidades de estrutura semelhante a mioglobina, o reservatório de oxigênio dos músculos.

A Hb é uma proteína conjugada, constituída de uma parte protéica, a globina, e de um grupo prostético, o heme, que é um complexo ferro-protoporfirina IX (WINTROBE, 1974). O átomo de ferro se liga a 4 átomos de

nitrogênio no centro do anel tetrapirrólico da protoporfirina e assim, este átomo se mantém no estado ferroso (Fe^{+2}), durante os processos de oxigenação e desoxigenação, para manter suas propriedades funcionais. O caráter fundamental desta ligação consiste na capacidade da Hb em realizar uma reação reversível com o O_2 molecular que é a base de sua função fisiológica - o transporte deste gás do meio externo para os tecidos. A oxidação do ferro ($\text{Fe}^{+2} \leftrightarrow \text{Fe}^{+3}$) resulta na formação de metahemoglobina, que a torna incapaz de realizar a ligação com o O_2 de modo reversível.

A porção protéica, formada pelas globinas, em função da composição dos aminoácidos, é responsável pelas diferenças encontradas nas suas propriedades funcionais. Essa proteína é simétrica, ou seja, se compõe de quatro cadeias ou quatro subunidades: duas α -globinas idênticas (cadeias α) e duas β -globinas idênticas (cadeias β) formando um tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$ (Fig 1.1). Cada subunidade contém um grupo heme que é capaz de captar a molécula de O_2 e transportá-la até os tecidos. Como estas subunidades estão associadas com duas diferentes estruturas quaternárias (T e R), é importante lembrar que se mantém em equilíbrio, em todos os estágios de ligação. Essas duas formas de estrutura quaternária da hemoglobina foram denominadas forma T (tensa) e forma R (relaxada). A forma T é a de baixa afinidade pelo ligante, o que torna, então, a forma mais estável das moléculas quando não ligadas. A forma R, de maior afinidade, é a mais estável para as moléculas ligadas. Assim a função da Hb está relacionada com sua estrutura quaternária.

Modificações na conformação espacial da molécula de Hb ao longo do curso de oxigenação foram descritos por PERUTZ *et al* (1968a); os dois dímeros $\alpha\beta$ arranjam-se em contraposição um ao outro a nível de contato $\alpha_1\beta_2$, realizando movimento de amplificação, enquanto que, um pequeno movimento de deslizamento se produz a nível de contato $\alpha_1\beta_1$. Duas das quatro cadeias de Hb se deslocam para frente e para trás, formando um espaço central, que se estreita quando se liga ao O_2 (oxi-hemoglobina) e aumenta quando se desliga deste (desoxihemoglobina, Fig. 1.1.b, PERUTZ *et al.*, 1968b).

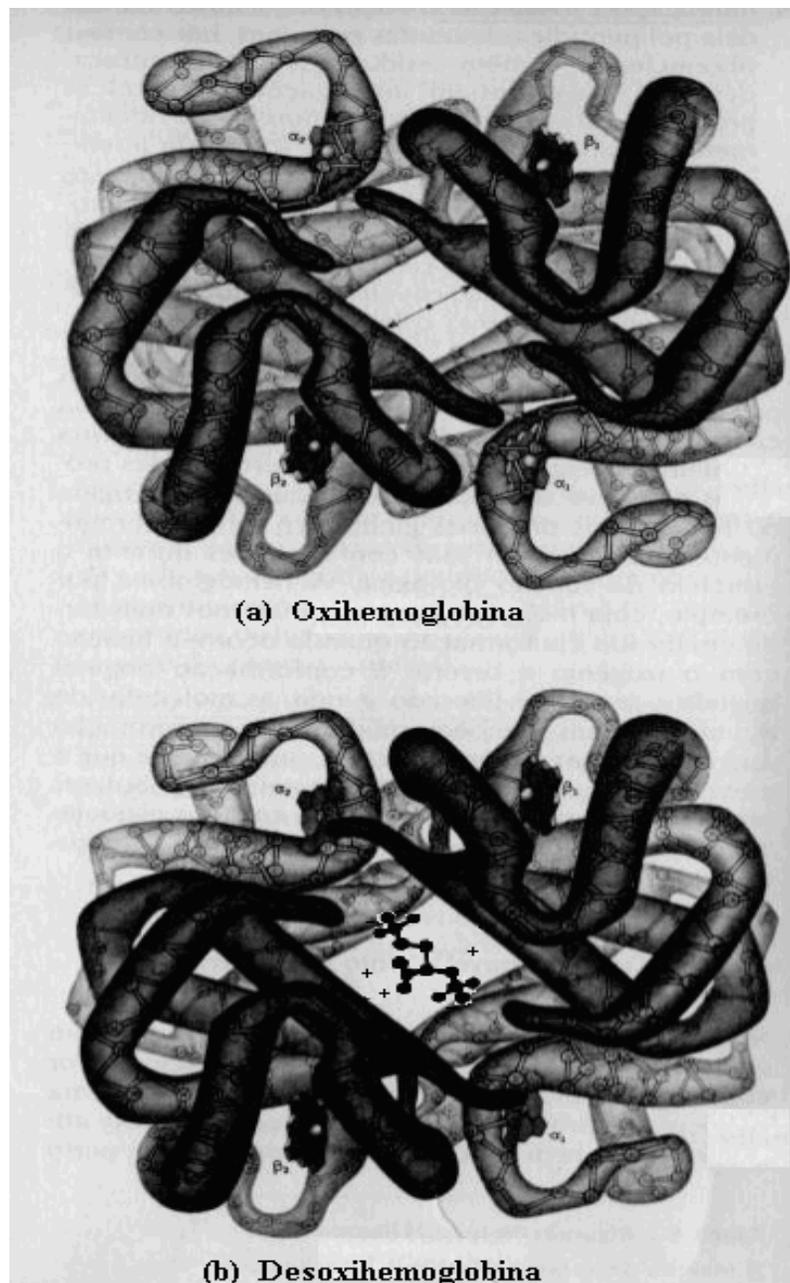
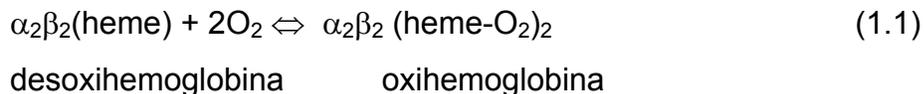


FIGURA 1.1 – Estrutura tridimensional da hemoglobina: (a) oxihemoglobina e (b) desoxyhemoglobina com o 2,3-BPG evidenciado na cavidade central.

1.1.1 Propriedades funcionais

A função fundamental da hemoglobina é o transporte de oxigênio nos animais, entre o tecido e os pulmões segundo a seguinte reação reversível (eq.1.1):



A curva de saturação da hemoglobina tetramérica de vertebrados é sigmoideal, o que permite sua saturação por O_2 , quase completa a nível pulmonar e demonstra, ainda, a existência de interações ou cooperatividade entre as subunidades durante a ligação com o O_2 . Esta cooperatividade advém de modificações conformacionais entre as formas oxi e desoxihemoglobina de onde a oxigenação de um grupo heme pode aumentar a afinidade ao O_2 por um outro grupo heme desoxigenado. Esta interação é expressa através do índice n (RIGGS, 1972). Esse fenômeno torna possível aos quatro átomos de ferro, dentro de cada molécula, interagirem de uma maneira fisiologicamente vantajosa. A combinação de um dos grupos heme com um átomo de oxigênio acelera a combinação dos demais hemes com outros átomos de oxigênio. Da mesma forma, a liberação de O_2 por um dos grupos heme faz com que outros hemes, da mesma molécula, liberem oxigênio mais rapidamente, tornando assim o transporte de oxigênio eficiente (PERUTZ, 1964). Na ausência de interações ou cooperatividade entre as subunidades, n assume o valor de 1, como é o caso da mioglobina ou de algumas hemoglobinas diméricas, cuja curva de oxigenação (saturação versus a pressão parcial de O_2) é hiperbólica.

O comportamento funcional da Hb também é caracterizado pelo P_{50} que define a pressão parcial de oxigênio requerida para saturar 50% dos seus sítios de ligação. O P_{50} é usado, na prática, como medida da afinidade Hb- O_2 . É inversamente proporcional à afinidade da Hb ao O_2 : quanto maior for o valor de P_{50} , menor será a afinidade da Hb ao O_2 . Ambos os parâmetros podem ser calculados a partir do Gráfico de Hill (Fig. 1.2), que é a representação gráfica de uma curva de oxigenação, onde cada ponto representa um par "log $Y/(1-Y)$ " versus "log PO_2 ". Mudanças adaptativas na afinidade da Hb ao O_2 estão relacionadas a alterações ambientais, quando o organismo lança mão de maior ou menor produção de Hb, ou a ação de efetores, que melhoram o transporte de O_2 (RIGGS, 1976). Assim, a

hemoglobina adquire a capacidade de receber e responder a estímulos do seu ambiente, tais como CO_2 , fosfatos orgânicos, prótons, etc. Estes estímulos ou moduladores fazem aumentar sua eficácia no transporte de oxigênio pela interação da Hb com o seu microambiente (interior do eritrócito). Os moduladores têm em geral afinidade preferencial pelo “estado T” (estado desoxigenado ou “tenso”), e a sua ligação confere uma maior estabilidade a esta forma, o que dificulta a passagem para o estado “relaxado” ou oxigenado (estado R). Agindo desta forma, os moduladores ou “efetores alostéricos” diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

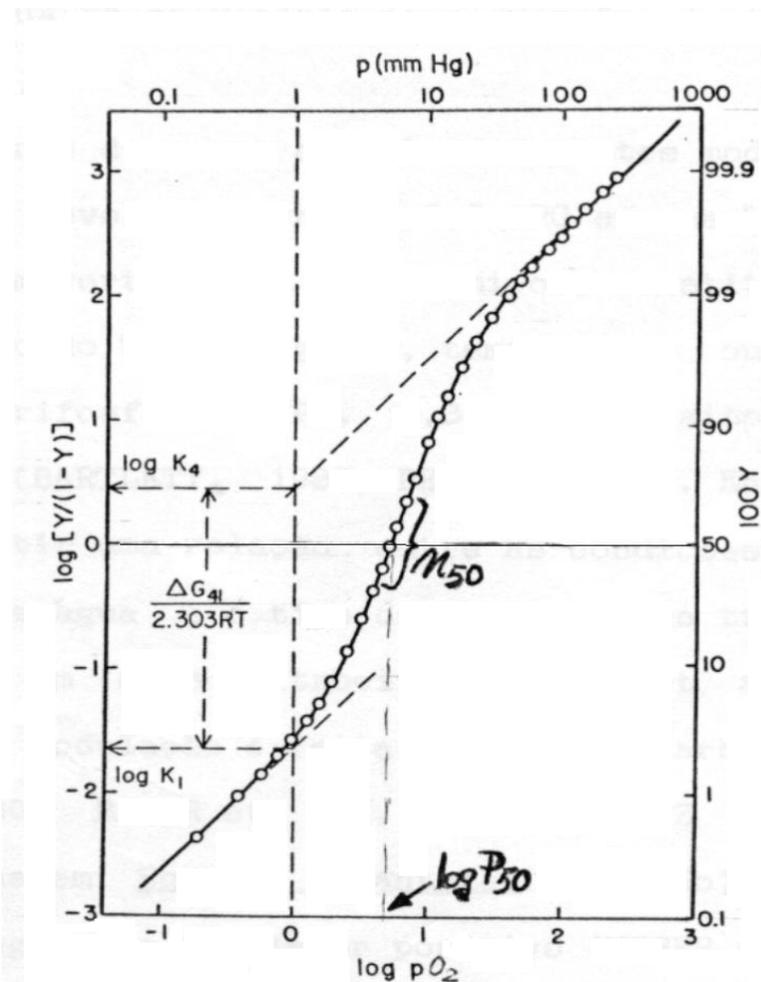


FIGURA 1.2 – Gráfico de Hill mostrando como são determinados o “ $\log(P_{50})$ ” e a cooperatividade “ n_{50} ” (IMAI, 1981).

Dependendo do grupo animal, alguns fosfatos orgânicos são efetores alostéricos, como o 2,3 bifosfoglicerato (2,3-BPG) em mamíferos. Nas aves e tartarugas, o IP_5 (ISAACKS & HARKNESS, 1975; ISAACKS *et al.* 1976; BARTLETT, 1976, 1978, 1980, 1982b, 1982c); nos crocodilos, o ATP (BARTLETT, 1980) e, em serpentes e peixes, o ATP e o GTP (BARTLETT, 1976, 1978, 1980, 1982a, 1982b; OGO, 1982).

Os inositois polifosfatados são poderosos moduladores negativos da maioria das Hbs, além das de aves, do pirarucu e das tartarugas (BARTLETT, 1976, 1980; ISAACKS *et al.*, 1976). A razão pela qual esses animais possuem um modulador poderoso como o IP_5 não foi ainda esclarecido. É possível que esteja relacionado a necessidade constante ou eventual de uma descarga grande de O_2 nos tecidos.

BUNN (1971) estudando vários mamíferos verificou que as Hb do homem, do cavalo, do coelho, do cachorro e do rato possuem alta afinidade ao oxigênio, e que na presença de 2,3-BPG há uma diminuição na afinidade Hb- O_2 tendo suas células altas concentrações desse efector. Em contraposição, este pesquisador verificou que as Hb de bovinos, carneiros, cabras e gatos possuem baixa afinidade ao oxigênio e uma fraca modulação ao 2,3 BPG, tendo suas células vermelhas um nível baixo de 2,3-BPG.

Dados de BENESCH *et al.* (1968) apud BUNN (1971) indicam que o 2,3 BPG se liga a uma cavidade central recoberta com muitos grupos carregados positivamente ao longo dos eixos de simetria da cadeia β da desoxihemoglobina.

Estas relações, bem como a regulação da afinidade da Hb pelo oxigênio por ligação com 2,3 BPG, são mediadas por sítios de ligação específicos para O_2 , H^+ , CO_2 , fosfatos orgânicos e por mudanças na estrutura quaternária da hemoglobina durante o ciclo de oxigenação-desoxigenação. Os fosfatos orgânicos passaram a receber uma atenção especial dos pesquisadores após evidências de que alguns teriam um papel importante no transporte do O_2 devido ao seu efeito sobre a afinidade da Hb ao O_2 .

O efeito específico da diminuição da afinidade por oxigênio produzido pela ligação de prótons denomina-se “Efeito Bohr”, descrito por BOHR *et al.* (1904), onde a concentração de prótons H^+ na célula modula negativamente a afinidade Hb- O_2 . Fisiologicamente é de grande importância uma vez que, em condições de acidez, facilita a liberação de O_2 para os tecidos.

A hemoglobina também participa do transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões e do equilíbrio ácido-básico do sangue. O transporte de anidrido carbônico ocorre também por sua combinação com grupos α -amino não carregados da hemoglobina, formando carbaminoemoglobina. A reação global mostra que a combinação do CO_2 à hemoglobina dá-se da seguinte forma:



A ligação do CO_2 aos grupos α -amino das cadeias α diminui o efeito Bohr, como demonstrado por KILMARTIN *et al.* (1969), porque ocorre liberação de prótons, como demonstrado nas equações químicas acima (eq. 1.2 e 1.3).

1.2 MORCEGOS: CLASSIFICAÇÃO

Um dos fatos mais interessantes na evolução dos vertebrados é a diversidade dos animais da ordem *Chiroptera*.

Amplamente distribuídos e bem sucedidos, animais dessa ordem ocorrem em muitas áreas tropicais e subtropicais constituindo a maior parte da fauna de mamíferos, tanto em números de espécies como em números de indivíduos (TADDEI, 1983). Além disso são os únicos mamíferos que apresentam características morfológicas e fisiológicas que os tornam aptos ao voo verdadeiro.

Animais do filo *Chordata*, classe *Mammalia* e ordem *Chiroptera*, englobam cerca de 900 espécies agrupadas em 175 gêneros de 17 famílias e 2 subordens: Megachiroptera e Microchiroptera.

A subordem Megachiroptera contém apenas a grande família Pteropodidae, com 42 gêneros e cerca de 62 espécies (KOOPMAN, 1984). A subordem Microchiroptera, de distribuição ampla, inclui 16 famílias, com uma representação no Novo Mundo de aproximadamente 280 espécies. Dessas, 134 são encontradas no Brasil, abrangendo representantes de 9 famílias das 16 que constituem a subordem: Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Molossidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae e Vespertilionidae (TADDEI, 1983; VARELLA-GARCIA *et al.*, 1989).

As 4 famílias mais freqüentes no Estado de São Paulo são:

- Noctilionidae: é monotípica e exclusivamente neotropical (DAVIS, 1973; 1976);
- Phyllostomidae: distribuída desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (JONES JR & CARTER, 1976);
- Vespertilionidae, cosmopolita (ALLEN, 1939);
- Molossidae: com representantes no Velho e no Novo Mundo.

Os morcegos são muito mais ativos à noite. Durante o dia repousam em abrigos que, na maioria, são de difícil localização e acesso. Geralmente são considerados como animais temíveis e até mesmo indesejáveis, o que pode ser devido à superstições ou crenças (por exemplo: os morcegos são ratos velhos que criaram asas) ou, ainda, devido a um conceito tradicional dos reais riscos que muitas espécies representam (transmitem doenças como a raiva e a histoplasmose – fungo: *Histoplasma capsulatum*; sintomas: lesões na pele, mucosa intestinal e pulmão).

1.2.1 Morfologia externa e o vôo

Os morcegos são os únicos mamíferos com capacidade para o vôo, devido à transformação de seus braços em asas aliados a suas características fisiológicas próprias. Na figura 1.3 é possível identificar, na asa aberta, o braço, o antebraço e a mão. Na mão, podem-se observar todos os dedos; o polegar (único dedo com “unha” (garra) nos morcegos das Américas), os metacarpos e as falanges dos dedos. O polegar é curto e é freqüentemente usado para agarrar a superfície onde o morcego pousa enquanto que, os outros dedos ajudam a estender a asa (TADDEI, 1983).

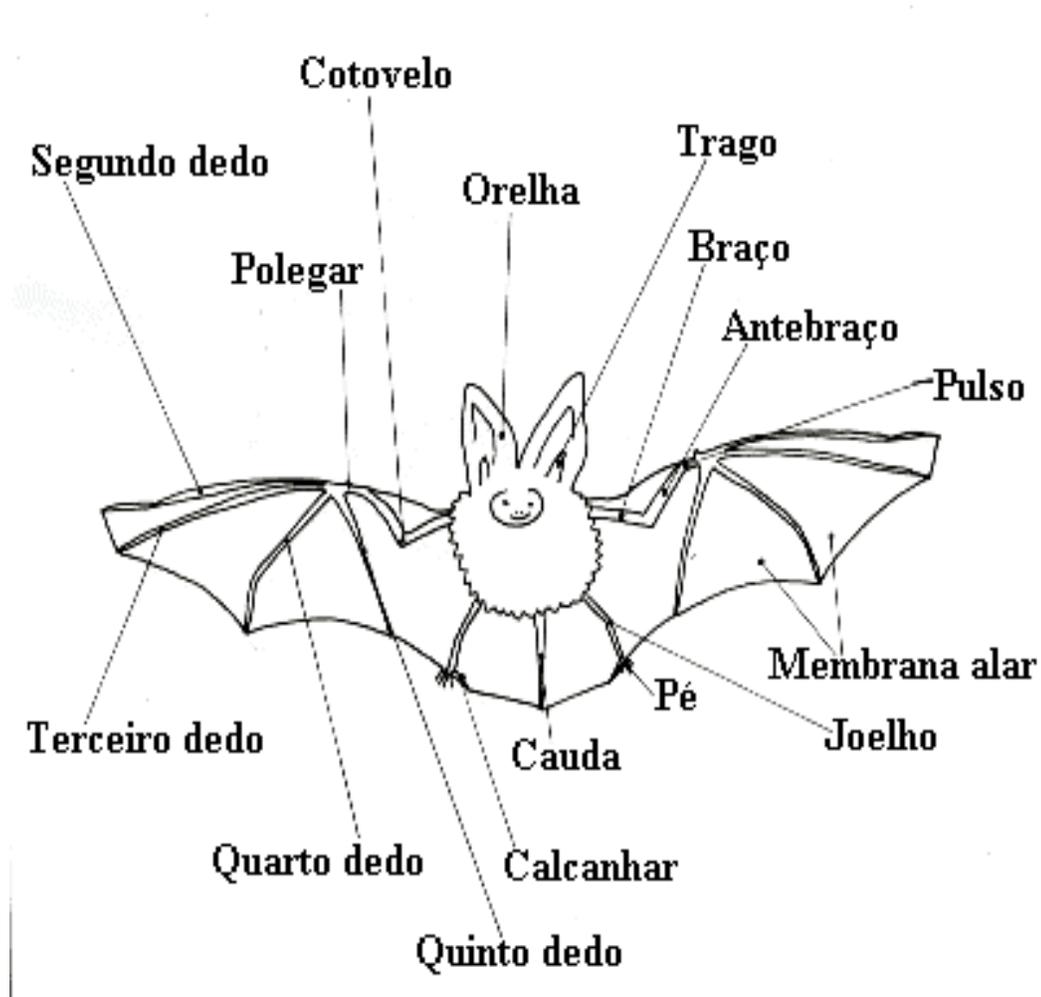


FIGURA 1.3- Representação esquemática: Morfologia externa de um morcego.

A membrana alar existente nos lados do corpo, pernas e cauda, é nada menos que extensão da pele do dorso e do ventre. É elástica e fina, sustentada pelos dedos da mão e é formada por duas camadas de pele sem musculatura entre elas e somente uma pequena quantidade de tecido conjuntivo, onde se localiza os nervos e os vasos sangüíneos (VAUGHAN, 1970). Apenas o polegar não está conectado diretamente à membrana de vôo (Fig. 1.3).

Nas extremidades posteriores, os joelhos estão voltados para a região dorsal e os pés para a região ventral, o que possibilita o pouso característico e permanecer suspensos através das patas posteriores (os pés) que têm garras curvadas e afiadas (Fig. 1.3).

Vários aspectos estruturais dão suporte rígido ao braço, para que ele possa ser usado como asa. A cintura escapular é mais desenvolvida que a cintura pélvica e está firmemente ancorada por uma clavícula bem desenvolvida, que se estende para o esterno. Este, normalmente, tem uma quilha ou um sulco, para abrigar e sustentar os grandes músculos que movimentam as asas.

Estilo e tempo de vôo, bem como musculatura e morfologia das asas, sistemas neural, circulatório e termorregulação, são influenciados por comportamentos do animal, tais como: hábito alimentar, hábito de forragear, tendências migratórias e comportamento de hibernação.

Embora morcegos e pássaros apresentem um ciclo de batimento das asas semelhante, ambos utilizam estilos de vôo diferentes como resultado de tipos diferentes de superfície de asas (JEPSEN, 1970).

A asa do morcego é uma superfície contínua e, quando dobrada em vôo, sua rigidez é mantida por um sistema de músculos adaptados e fibras elásticas desenvolvidas (membrana da asa) especializado para velocidades e tempo de vôo diferentes.

A habilidade de controlar a velocidade em vôo é encontrada em morcegos que predam insetos voadores. Suas asas são altamente curvadas, característica que favorece a mudança de velocidade e lhes confere o vôo planado. Planar, para os morcegos, significa lucro de energia através de

correntes de ar sem esforçar significativamente os músculos (KOOPMAN, 1984). Estes morcegos permanecem continuamente em vôo enquanto forrageiam e capturam insetos com a boca ou com a membrana das asas, depois de súbitas manobras. Porém, há muita variação em padrão de vôo e hábitos de forrageamento entre espécies diferentes de morcegos insetívoros (PADIAN, 1987).

Asas com a forma plana elíptica permitem a habilidade de pairar e de voar lentamente próximo a vegetação ou superfície do solo. O vôo pairado é usualmente desenvolvido em muitos Phyllostomidae da superfamília Glossophaginae e alguns da Macroglossinae, que são adaptados para alimentar-se de néctar, com o estilo de vôo que os permitem se alimentar por um tempo demorado sem descer (KOOPMAN, 1984; VAUGHAN, 1970a).

Outro estilo bastante distinto de vôo é demonstrado pelos morcegos frugívoros. É um vôo forte, direto e não muito manobráveis. Estes morcegos voam do local de repouso para a área de alimentação e se movimentam de uma região para outra a procura de comida.

Um vôo, nomeado de vôo rápido, é típico em morcegos caudas-livres pertencentes a família Molossidae. Estes morcegos insetívoros forrageiam em vegetação alta e algumas espécies viajam longas distâncias durante o período de forrageamento. Suas asas são longas, estreitas e muito menos curvadas que a dos outros morcegos, o que reduz, para os caudas-livres, a resistência do ar durante o vôo e lhes confere uma redução em gasto de energia. Com as asas dobradas executam manobras espetaculares não superadas pelos outros morcegos (KOOPMAN, 1984; VAUGHAN, 1970a).

Esta habilidade dos morcegos para desenvolver uma variedade de estilos de vôo foi importante, pois facilitou uma radiação adaptativa em um notável número de nichos ecológicos.

1.2.2 Algumas considerações: reprodução, ecolocalização e órgãos sensoriais

Como todo mamífero, os filhotes dos morcegos são gerados dentro do útero de suas mães. Machos e fêmeas convivem muito bem em uma mesma toca e estes acasalam-se em uma determinada época do ano. As fêmeas geralmente apresentam um par de mamas localizadas na região torácica. A maioria tem apenas uma cria por ano e um filhote por gestação. Esta baixa taxa reprodutiva é compensada pelo fato dos morcegos apresentarem uma longevidade maior que a maioria dos mamíferos do mesmo tamanho. Apresentam uma expectativa de vida alta, variando de 10 a 30 anos. Nas formas hibernantes, a ovulação ocorre no verão com a procriação ocorrendo no outono precedente. O esperma fica retido no aparelho reprodutivo da fêmea durante o inverno. Nas formas não hibernantes, a ovulação e a procriação ocorrem na primavera ou nas estações favoráveis. Normalmente os morcegos dão à luz suspensos de cabeça para baixo. A cria ao nascer agarra-se à pelagem da mãe, que às vezes a ajuda com o focinho, e se arrasta até as mamas, onde começa a mamar (NOWAK,1991; ORR, 1970 e TADDEI, 1983).

Os morcegos insetívoros, habitualmente, possuem um pico de reprodução que ocorre no período mais quente do ano (primavera e verão), quando os insetos são mais abundantes; já no caso dos frugívoros, a reprodução está associada à frutificação das plantas que lhes servem de alimento, ocorrendo em diferentes épocas do ano.

A estrutura social dos agrupamentos de morcegos é complexa e varia de uma espécie para outra, podendo também variar de uma região para outra. Muitas espécies possuem uma estrutura social baseada na formação de haréns: um macho dominante com um grupo de fêmeas (facilmente observado na natureza(REINOSO, 1998)). Poucas espécies parecem ser monogâmicas (TADDEI, 1983).

De um modo geral, os morcegos saem de seus abrigos ao entardecer ou no início da noite. Apesar de voarem no escuro, seus olhos são funcionais, havendo muitas espécies que localizam seu alimento com o

auxílio da visão, além do olfato. Entretanto, a orientação noturna é melhor realizada por um fenômeno chamado ecolocalização, pelo qual o morcego emite sons de alta-frequência através da boca ou do nariz durante o voo. Estes sons retornam em forma de ecos, captados pelos seus ouvidos, muito sensíveis permitindo aos morcegos evitar trombadas quando encontram um obstáculo, bem como, localizar e caçar insetos durante o voo.

Em várias famílias de morcegos está presente um lóbulo sobre o nariz, que provavelmente possui uma função sensorial, assim como o trago, que é um lóbulo localizado em frente ao orifício do ouvido (Fig. 1.3). O sistema de ecolocalização é característico dos morcegos da subordem Microchiroptera, é um dos responsáveis pela maior diversidade de espécies desse grupo.

1.2.3 Abrigos

Como já mencionado, os morcegos são ativos durante a noite, porém alguns permanecem durante o dia em locais abertos e são encontrados presos a troncos ou suspensos a ramos e protegidos pela folhagem. A esse grupo, denominados quirópteros externos, pertence a maioria dos Megachiroptera do Velho Mundo e alguns morcegos americanos, como certas espécies das famílias Emballonuridae, Phyllostomidae e Vespertilionidae. Exemplares de *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae), um dos morcegos mais comum no estado de São Paulo, inclusive em áreas urbanas e periurbanas, podem ser encontrados durante o dia, nas copas de mangueiras, jaqueiras, cássias, sibipirunas, jabuticabeiras. Provavelmente outras árvores de folhagem espessa são também utilizados como abrigos e ocorrem solitários ou em grupos com até 12 indivíduos de ambos os sexos (TADDEI, 1973).

A maioria das espécies, porém, pertencem ao grupo dos quirópteros internos, e se abrigam em grutas, porões, sótãos e locais similares, os quais oferecem condições de temperatura e umidade favoráveis, além de proteção

contínua, tanto pela obscuridade, como pela quase ausência de inimigos naturais. O vampiro comum, *Desmodus rotundus*, além de seus abrigos normais, grutas e ocos de árvores, no estado de São Paulo, tem sido encontrado em túneis abandonados, sob pontes, em tubos para escoamento de águas e outros lugares escuros.

Ocasionalmente os morcegos se alojam em construções, às vezes habitadas. Nestas circunstâncias podem ser inconvenientes pela sujeira, barulho e odor desagradável que aumenta em razão do número de indivíduos que constituem as colônias (TADDEI, 1973).

1.2.4 Regime alimentar

O regime alimentar das várias espécies de morcegos compreende insetos, crustáceos, peixes, aracnídeos, rãs, lagartos, pássaros, frutos, néctar, partes florais, pequenos animais e alguns casos, sangue. Conforme GARDNER (1977), o regime alimentar em indivíduos de uma mesma família, no caso dos Phyllostomidae, podem incluir em sua dieta vários dos itens citados. Então, conforme o hábito alimentar, os morcegos podem ser: insetívoros, frugívoros e nectarívoros (fitófagos), hematófagos, carnívoros e ictiófagos (ou piscívoros).

Os morcegos insetívoros ocorrem em quase todo o mundo. Na natureza, apresentam uma função ecológica importante, uma vez que auxiliam no controle de populações de diversos tipos de insetos como mariposas, percevejos e outros.

Os morcegos fitófagos são encontrados somente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde existem plantas produzindo néctar e/ou frutos, praticamente o ano todo. Nos ecossistemas naturais, esses morcegos são importantes, pois promovem a polinização das flores e a dispersão de diversas plantas.

Poucas espécies são carnívoras. Estes saem para caçar pequenos vertebrados como peixes, rãs, camundongos e outros morcegos; podem

ainda completar a dieta consumindo insetos e, eventualmente, frutos (NOWAK, 1991).

Os morcegos hematófagos (os vampiros) compreendem apenas três espécies e apresentam um regime alimentar bastante restrito, consomem somente sangue. Geralmente atacam vertebrados homeotérmicos. Aves e mamíferos domésticos ou silvestres estão sujeitos ao ataque pelos hematófagos. Nos ambientes rurais, tendem a explorar qualquer tipo de animais de criação. Diversas pessoas salientam, apenas os aspectos negativos desses morcegos e questionam sua importância ecológica. Nos ecossistemas naturais, os morcegos hematófagos auxiliam no controle das populações de vertebrados herbívoros, evitando que superpopulações dessas presas destruam a vegetação e, conseqüentemente, o ecossistema. Esse controle populacional é feito não somente por sangrias dos animais, mas também por transmissão de doenças, como a raiva.

A maioria das pessoas considera os morcegos como vampiros sedentos de sangue, animais sujos e que carregam escondidas doenças prejudiciais à saúde humana. De fato, alguns morcegos estão envolvidos na epidemiologia de doenças importantes, tais como a raiva e a histoplasmose. Essas doenças podem ser transmitidas aos seres humanos, direta ou indiretamente, assim como a outros animais de sangue quente.

Em acordo com as diferenças dietéticas, tipos dentais diferentes aparecem. Estas diferenças podem ser notadas, por exemplo, nos morcegos que se alimentam da polpa de frutos que tem os molares modificados; nos de néctar que apresentam dentes reduzidos (para acomodar a grande língua) ou ausentes, pois a comida não requer mastigação; e nos que se alimentam de sangue, onde a dentição é modificada com a finalidade de escavar uma concha rasa na epiderme da vítima (GLASS, 1970).

A apreensão de presas envolve, além da dentição, outras especialidades. Dentre elas, o estilo de vôo e a ecolocalização, que permite percepção detalhada de obstáculos (principalmente para vôos lentos) e localização de comida (VAUGHAN, 1970; PADIAN, 1987).

1.3 FAMÍLIA PHYLLOSTOMIDAE

A família Phyllostomidae está restrita às regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, ocorrendo desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos. A grande irradiação adaptativa apresentada por esta família, aparentemente foi uma resposta à exploração de diversos nichos alimentares (SMITH, 1976; DAVIS, 1976; JONES JR. & CARTER, 1976). Os membros desta família apresentam tamanho e coloração da pelagem variada (alaranjado até castanho escuro), porém a característica mais evidente é a presença, na maioria das espécies, de um apêndice nasal em forma de folha triangular. O apêndice nasal discóide, que lembra a forma de ferradura, é característico dos filostomídeos hematófagos, o que facilita sua identificação. Animais desta família podem apresentar os mais diversos hábitos alimentares, como insetos, frutos, néctar, partes florais, pequenos vertebrados ou sangue (GARDNER, 1977). Para a exploração dessas fontes alimentares, as diferentes espécies desta família sofreram modificações que lhes permitem uma utilização eficiente dos diferentes recursos alimentares. Neste aspecto, os Glossofagíneos (nectarívoros, completando a dieta com partes florais, sucos de frutos tenros e, ocasionalmente, insetos encontrados no néctar floral (TADDEI, 1973)) e os Desmodontíneos (hematófagos) mostram as mais extraordinárias modificações. Nos glossofagíneos, o porte de pequeno a médio, dentição reduzida, rostró alongado, língua extensível e vôo pairado são adaptações para uma estratégia alimentar baseada em néctar e frutos (SMITH, 1976). Nos desmodontíneos, as modificações são ainda mais notáveis, devido ao tipo de fonte alimentar (sangue) que exploram. O sangue apresenta alta concentração de proteínas e baixa concentração de gorduras e carboidratos. A utilização de uma dieta nitrogenada deveria provocar uma uremia excessivamente elevada e, como consequência, grande perda de água para eliminar a uréia do corpo. Isto é evitado pela eliminação de uma urina com altas concentrações de uréia. A retenção de água pelo sistema renal é muito favorável, uma vez que esses morcegos apresentam uma taxa alta de evaporação corporal e aparentemente, não bebem água (McFARLAND & WIMSATT, 1969). De

acordo com os autores citados, os morcegos hematófagos podem ser considerados como habitantes do deserto no meio dos trópicos.

Carollia perspicillata, *Artibeus lituratus* e *A. planirostris*, são espécies predominantemente frugívoras sendo que, *Phyllostomus discolor* explora frutos, mas também néctar, partes florais e insetos(TADDEI, 1973).

Os nossos espécimens foram coletados algumas vezes durante a noite - *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus* e *A. planirostris* – e outras vezes durante o dia (porém em lugares escuros) - *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus* (este também coletado a noite). Pudemos observar durante as coletas que estes animais estão sempre em grupos e apresentam-se acompanhados de outras espécies (não no mesmo grupo, mas no mesmo local).

1.4 FAMÍLIA MOLOSSIDAE

É uma família cosmopolita ocorrendo no Velho e no Novo Mundo, de hábito exclusivamente insetívoro, formando colônias desde pequenas até grandes. Os molossideos podem abrigar-se em diversos locais como, cavernas, sob pedras no chão, ocos-de-árvores e outros. A cor da pelagem apresenta várias tonalidades podendo ser negro, cinza ou marrom. Os molossideos se caracterizam por apresentar asas estreitas e longas; orelhas curtas, porém largas e achatadas e projetadas para a frente, sobre os olhos; focinho largo e obliquamente truncado e uma cauda longa e livre (principal característica para identificação). A cauda livre, a cor quase negra e também o hábito de caminhar em superfícies horizontais, apoiado sobre os pés e polegares das asas, devem ter contribuído para o aparecimento da crença de que “rato quando fica velho vira morcego” (NOWAK, 1991).

Em nossas coletas as espécies *Nyctinomops laticaudatus*, *Molossus molossus* e *Molossus ater* foram capturados ao crepúsculo no momento em que saíam para se alimentar enquanto que o *Eumops perotis* foi capturado no forro de uma residência.

1.5 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS HB DE CHIROPTERA

Os estudos taxonômicos na ordem Chiroptera, na sua maior parte, fundamentam-se em padrões morfométricos comparativos que envolvem características dentárias, como fórmula dentária, e medidas cranianas e corporais externa. Porém, essas características, consideradas isoladamente, não são suficientes para definir com certeza as relações entre os diferentes *taxa*.

Recentemente, outras fontes de estudos vêm sendo utilizados nas interpretações sistemáticas, como os histomorfológicos, imunológicos, bioquímicos e citogenéticos, todos voltados ao esclarecimento das relações filogenéticas entre diferentes famílias, gêneros e espécies.

Estudos de proteínas do sangue têm sido orientados para o uso das hemoglobinas como ferramentas na taxonomia, examinando as características imunológicas dos morcegos e avaliando as proteínas como fonte de energia.

Visto por alguns autores, o número de componentes de hemoglobina, quando analisado por eletroforese em poliacrilamida e cromatografia de troca iônica, varia de um como em *Rousettus aegyptiacus* (CONDÒ *et al.*, 1989), *Macrotus californicus* (SOSKIC *et al.*, 1987), *Myotis velifer* (KLEINSCHMIDT *et al.*, 1982 e 1986) e *Cynopterus sphins* (SGOUROS *et al.*, 1987), a dois componentes, como em *Myotis myotis* (CONDÒ *et al.*, 1989) e *Tadarida brasiliensis* (KLEINSCHMIDT *et al.*, 1987). Esses últimos autores relatam os resultados obtidos em equilíbrio de oxigenação em câmara de difusão tanto do hemolisado quanto dos componentes isolados, encontrando afinidades bastante baixas para a condição "stripped" (log P₅₀ em torno de 1,0) e sensibilidade ao íon cloro e a 2,3 BPG, sendo a amplitude de efeito Bohr bastante reduzida. Tanto no hemolisado quanto nos componentes isolados, as diferenças observadas são pequenas e os valores de *n* foram em torno de 2. CONDÒ *et al.* (1989) estudaram duas espécies: *Rousettus aegyptiacus*, com baixa afinidade ao oxigênio (pH 7, log P₅₀ em 1,3), efeito Bohr normal, aparentemente não sofre modulação pelo 2,3 BPG

e por íons cloro, mas pode ser modulada pelo inositol hexafosfato (IHP); a outra espécie, *Myotis myotis* mostrou efeito Bohr normal (log P_{50} próximo a 0,8 em pH 7,0) e sensibilidade ao 2,3 BPG (log P_{50} em torno de 1,2 em pH 7,0) e ao inositol hexafosfato (em pH 7, log P_{50} em torno de 1,7); em ambas as espécies os valores de n foram acima de 2 em pH fisiológico. A insensibilidade da hemoglobina de *R. aegyptiacus* ao 2,3-BPG é surpreendente, o que nos faz pensar na possibilidade da existência de inositóis polifosfatados em hemácias de morcegos (até agora não encontramos dados e esse respeito na literatura).

Comparativamente, experimentos feitos em nosso laboratório (REINOSO,1998), utilizando eletroforese horizontal em gel de amido a uma série de hemoglobinas de morcegos pertencentes a algumas espécies encontramos a presença de dois componente hemoglobínicos, indicando uma baixa heterogeneidade.

As Hbs “stripped” das espécies de morcegos estudadas possuem alta afinidade ao oxigênio. Quanto ao efeito dos moduladores 2,3-BPG e IHP, em algumas destas espécies, apenas o IHP mostrou-se mais eficiente na diminuição da afinidade da Hb. É possível que as diferenças na ligação dos fosfatos, em especial o 2,3-BPG na hemoglobina, esteja relacionado com os diferentes tipos de vôo, uma vez que a afinidade ao O_2 pode ser diferente, conforme a demanda de energia. Por razões apresentadas, julgamos ser a hemoglobina de morcegos um modelo interessante, quer pela correlação que se possa fazer com o hábito do animal, quer pelas implicações fisiológicas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo o estudo do comportamento funcional e populacional de hemoglobinas de quirópteras. Dessa forma, nos dispomos a:

1. determinar o comportamento funcional da Hb através de equilíbrio de oxigenação em sangue total;
2. determinar o comportamento funcional da Hb “stripped”, bem como o efeito do 2,3-BPG e IHP através de equilíbrio de oxigenação pelo método espectrofotométrico;
3. verificar a presença dos fosfatos orgânicos nos eritrócitos: inositois polifosfatados e 2,3-BPG
4. verificar a expressão dos componentes hemoglobínicos através de eletroforese;
5. relacionar os distintos tipos de vôo com as possíveis estratégias adotadas por esse animais nos sítios de ligação de suas Hb.

Procuramos contribuir para o melhor conhecimento das hemoglobinas de morcegos que, sem dúvida, como veremos, apresentam comportamentos funcionais e estruturais curiosos.

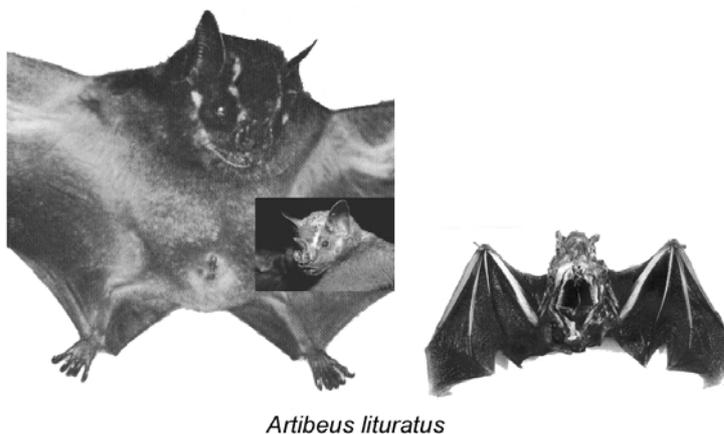
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para o presente estudo, analisamos amostras de sangue de 123 indivíduos da família Phyllostomidae e 40 indivíduos da família Molossidae (Fig. 3.1 e Tab. 3.1). Os exemplares utilizados foram capturados no interior do Estado de São Paulo. Alguns foram coletados em residências (abandonadas ou no forro de ocupadas) urbanas e rurais; outros foram coletados em Reservas e Parque Ecológicos: Parque Estadual da Serra do Mar e Reserva Ecológica da Juréia-Itatins. A Fig.3.2 ilustra as localizações geográficas, referentes ao estado de São Paulo, dos locais de coleta. Todos os animais coletados eram adultos, de ambos os sexos, e com peso corporal variando de 8 a 70 gramas, dependendo da espécie (Tab 3.2).

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram obtidas através de punção intracardíaca, com seringas heparinizadas. As mesmas foram divididas em três partes: uma para realização dos experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue, outra para equilíbrio em solução de Hb stripped, incluindo efeito



Nyctinomops laticaudatus

FIGURA 3.1 - Espécies pertencentes às famílias Phyllostomidae e Molossidae analisadas quanto à característica estrutural e funcional da Hb, bem como a concentração de fosfatos.

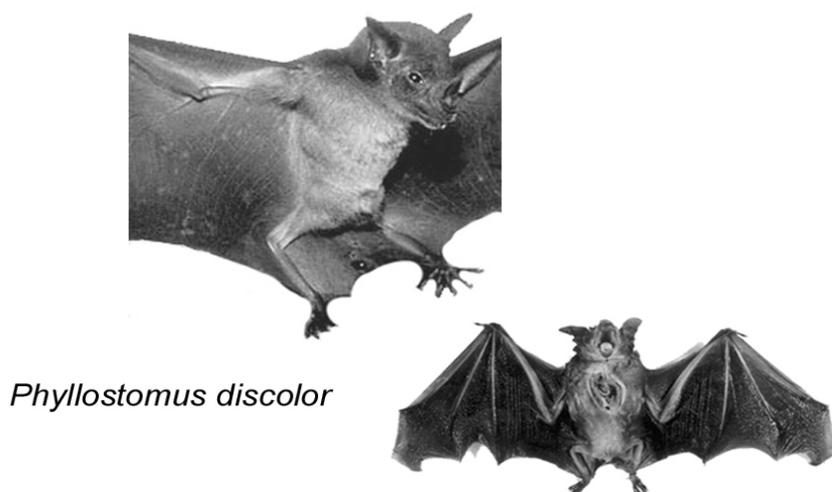
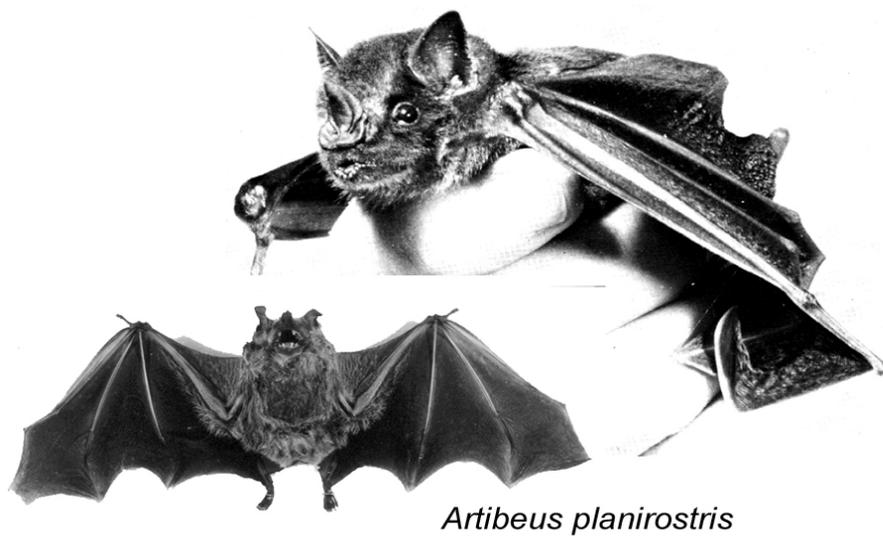


FIGURA 3.1 - Continuação

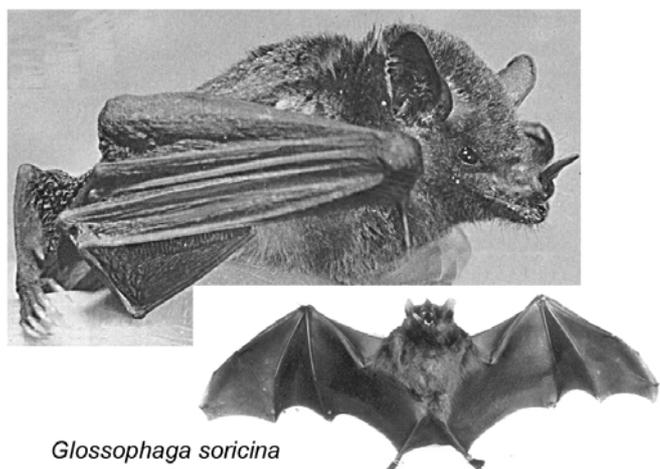
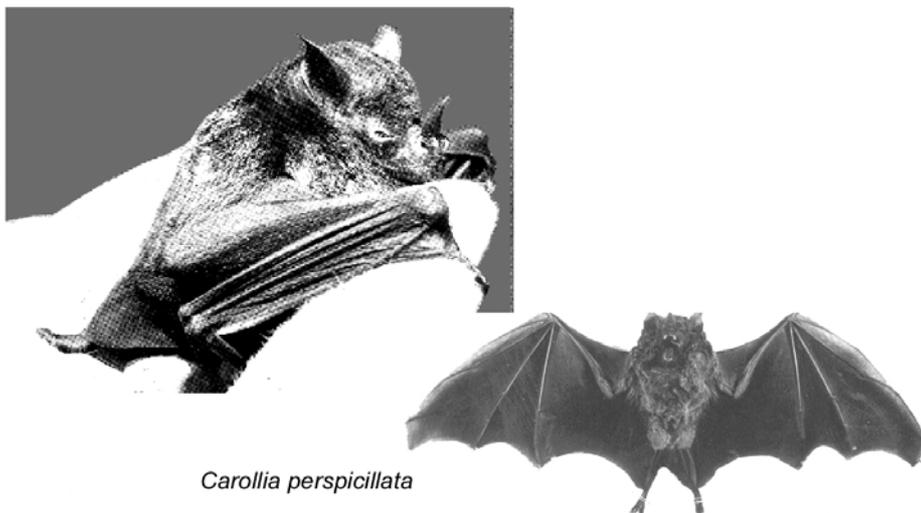
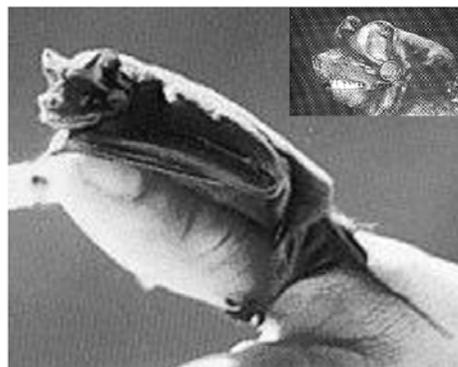


FIGURA 3.1 - Continuação



Desmodus rotundus



Molossus molossus

FIGURA 3.1 - Continuação

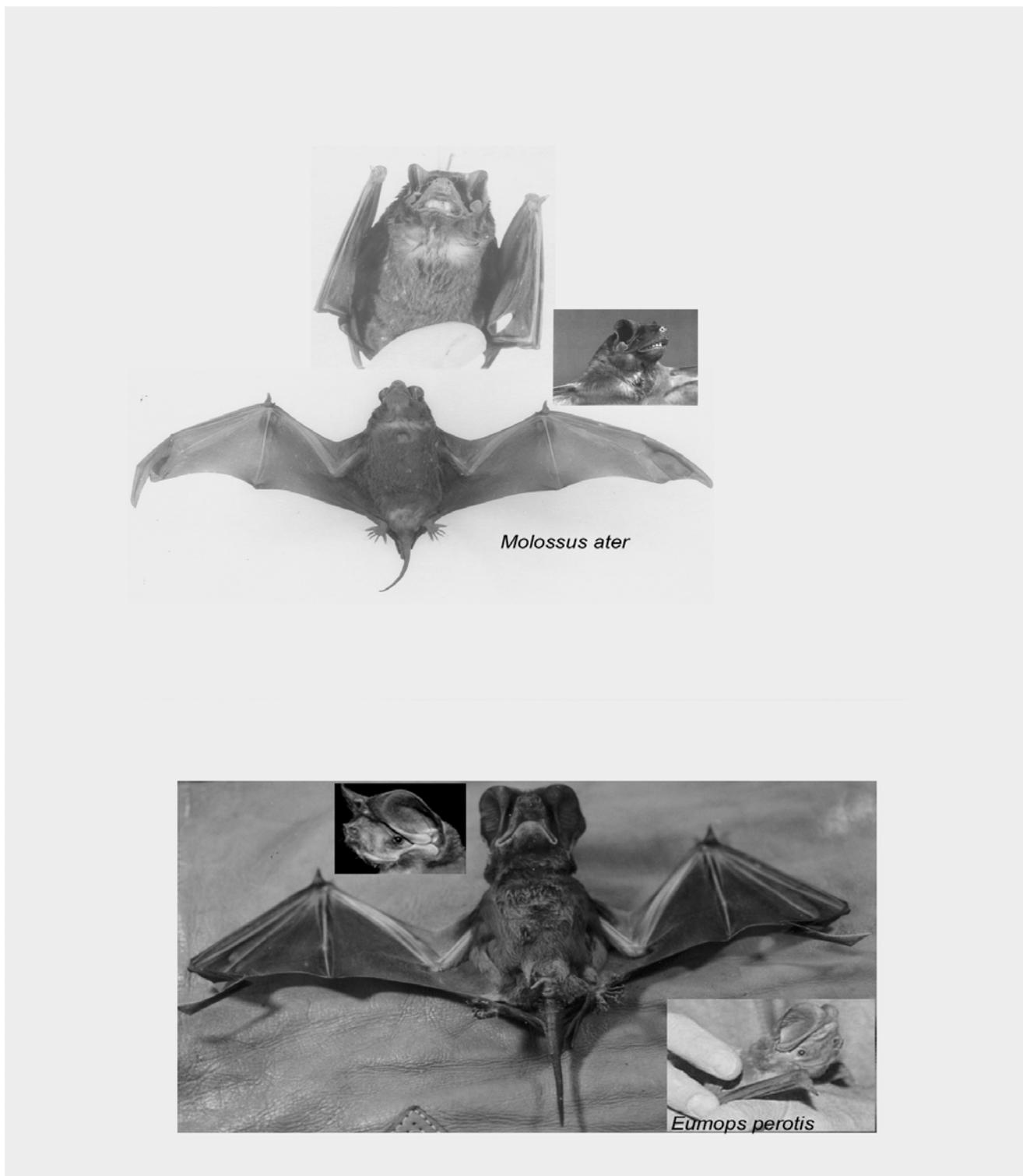


FIGURA 3.1 - Continuação

TABELA 3.1 - Posição taxonômica das espécies analisadas no presente trabalho segundo VIZZOTO, L.D. & TADDEI, V.A (1973). Locais de coletas e número de indivíduos coletados por espécie.

Família	Espécie	Local de Coleta	Número de exemplares coletados
PHYLLOSTOMIDAE	Artibeus lituratus	Bady Bassit	2
		São Carlos	7
		Reserva Ecol. Juréia	2
	Artibeus planirostris	São José do Rio Preto	2
	Phyllostomus discolor	Catanduva	3
	Carollia perspicillata	Termas do Ibirá	11
		P. E. Serra do Mar	4
		Itirapina	14
	Glossophaga soricina	Termas do Ibirá	16
		Itirapina	21
	Desmodus rotundus	Itirapina	18
		Reserva Ecol. Juréia	23
	Total de exemplares PHYLLOSTOMIDAE		
MOLOSSIDAE	Molossus molossus	São José do Rio Preto	3
		São Carlos	1
		Catanduva	13
	Molossus ater	São Carlos	11
	Nyctinomops laticaudatus	Água Vermelha	11
	Eumops perotis	São Carlos	1
	Total de exemplares MOLOSSIDAE		
Total de indivíduos analisados			163



FIGURA 3.2 – Mapa do estado de São Paulo identificando os diferentes locais de coleta do material biológico. (www.detran.sp.gov.br)

TABELA 3.2 - Valores médios do peso do corpo e número de machos (♂) e fêmeas (♀) capturados para o presente trabalho. Valores estatísticos do peso (em grama) são demonstrados através da média e desvio padrão.

ESPÉCIES	INDIVÍDUOS POR SEXO	PESO (g) (Média ± Desvio Padrão)
<i>Artibeus lituratus</i>	7 ♂; 4 ♀	64,04 ± 8,56
<i>Artibeus planirostris</i>	2 ♂	45,26 ± 1,60
<i>Phyllostomus discolor</i>	2 ♂; 1 ♀	41,37 ± 1,43
<i>Carollia perspicillata</i>	10 ♂; 19 ♀	14,59 ± 1,54
<i>Glossophaga soricina</i>	17 ♂; 20 ♀	9,20 ± 1,11
<i>Desmodus rotundus</i>	27 ♂; 14 ♀	32,29 ± 3,79
<i>Molossus molossus</i>	8 ♂; 9 ♀	11,18 ± 2,06
<i>Molossus ater</i>	3 ♂; 8 ♀	29,07 ± 2,00
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	6 ♂; 5 ♀	11,39 ± 0,78
<i>Eumops perotis</i>	1 ♂	61,0

de 2,3.BPG e IHP, e eletroforese e uma terceira parte para a extração de fosfatos. Para algumas espécies (ex.: *G. soricina*, *C. perspicillata*) foi necessário um pool de amostras para realizar satisfatoriamente alguns experimentos.

3.3 EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO EM SANGUE TOTAL

Os experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue total foram realizados logo após a coleta e feito como descrito por JOHANSEN *et al.* (1978).

O método baseia-se na determinação contínua de O₂ dissolvido em solução tamponada, contendo fermento biológico e sangue. O fermento consome inicialmente todo o oxigênio dissolvido, e a tentativa de equilíbrio da pressão parcial de oxigênio é efetuada pelo sangue, que cede o oxigênio ligado à Hb, ao meio. A resposta do sangue para ceder o oxigênio pode depender do pH.

Utilizou-se um monitor biológico YSI, com eletrodo polarográfico para determinação de O₂, acoplado a um registrador CG. Adicionou-se 5 ml de cada tampão, fermento e algumas gotas de sangue na cubeta do eletrodo e agitado rapidamente para então ligar o equipamento. A curva de consumo de O₂ foi assim registrada e os pH, inicial e final, anotados.

A curva de saturação do O₂ foi calculada, segundo a eq.(3.1) abaixo:

$$P_{O_2}(n) = \frac{PB \cdot 0,2098 \cdot L_n}{4 \cdot L_{100}} \quad (3.1)$$

onde: PB é pressão barométrica, L_n é a leitura em n, L₁₀₀ é a leitura em 100% e n é a porcentagem de Hb ligada ao O₂

Os valores de P_{50} (pressão necessária de oxigênio, para saturar 50% da Hb) foram convertidos para a forma logarítmica e plotados contra o pH final. A curva de efeito Bohr foi levantada a partir de regressão linear.

Os tampões utilizados nos diferentes pHs foram: Bis-Tris-HCl, com 0.1M (concentração final) para os pHs até 7,4; e o tris-HCl, com 0.1M (concentração final para os pHs acima de 7,4).

3.4 SOLUÇÃO DE HEMOGLOBINA

A parte do sangue destinado ao estudo da estrutura e função de Hb, foi centrifugada a 2000 rpm, a 4°C por 20 minutos, em centrífuga SORVALL, modelo RC-5B, para eliminar o plasma. Os eritrócitos passaram por 3 lavagens consecutivas com solução salina 0,9% e hemolisados com água destilada na proporção de 1:1. Em seguida as amostras foram congeladas e descongeladas por 3 vezes para que ocorresse uma hemólise mais efetiva. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante, solução de Hb, foi mantida a -20°C até o momento da realização dos demais experimentos descritos abaixo.

3.4.1 Eletroforese

Eletroforese é um método físico-químico de separação, utilizado no estudo de macromoléculas. Uma vez que diferentes proteínas diferem em conteúdo e seqüência de aminoácidos, elas diferem também na sua carga líquida a um dado pH. A eletroforese é um método que utiliza essa diferença para, sob um campo elétrico, separar proteínas.

3.4.1.1 Eletroforese em gel de amido

Empregou-se a técnica de eletroforese em gel de amido, sistema horizontal, segundo SMITHIES (1959). Na preparação dos geis, foi utilizado o amido de milho, obtido segundo VAL *et al.* (1981). Esse meio de migração propicia uma melhor separação das proteínas, pois as separa também segundo seus tamanhos e formas.

O tampão utilizado para preparação do gel foi Tris-Borato EDTA, solução diluída 0,036M com pH 8,6, e o da ponte foi Borato 0,35M e pH 8,6. Nesse pH, o amido 13% foi suficiente para um gel com boas propriedades mecânicas e separativas.

A cocção foi realizada num bico de gás, em um balão de um litro com fundo redondo, com agitação contínua até o aparecimento das primeiras bolhas de fervura no fundo do frasco, momento este que se adicionou 2 ml de KCN 0,1N pH 8,0. Após deaeração, o gel foi derramado numa placa de acrílico (26 cm de comprimento, 16 cm de largura e 6 mm de altura), previamente untada com óleo mineral. Após o resfriamento do gel a 4°C, pequenos retângulos de papel Whatman 3 MM (0,5 x 0,5), previamente embebidos na amostra, foram aplicados no gel, em cortes transversais à altura, a uma distância de 5 cm da extremidade catódica.

A migração eletroforética também foi realizada a 4°C, aplicando-se ao gel 5 V/cm e 1,25 mA/cm, durante 6 horas.

3.4.1.1.a Coloração da hemoglobina

Após a migração, o gel foi seccionado em duas partes, no sentido horizontal. Uma parte foi corada com amido Black 10B, para proteínas totais, e a outra foi tratada com benzidina, específica para proteínas com atividade peroxidásica (Tabela 3.3).

Os padrões eletroforéticos foram desenhados em papel milimetrado e a seguir os geis foram transparentizados.

A transparentização foi efetuada, após revelação das bandas, colocando-se o gel de amido entre duas folhas de papel celofane umedecidas e esticadas num bastidor.

TABELA 3.3 - Solução de coloração e de lavagem, em gel de amido.

SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO			
Amido Black 10B		Benzidina	
Solução saturada de amido Black 10B		Benzidina	1 g
Metanol	10 vol	Nitroprussiato de Na	1 cristal
Água	1 vol	Metanol	75 ml
SOLUÇÃO DE LAVAGEM			
Amido Black 10B		Benzidina	
Ácido acético	0,2 volume	Éter	1 volume
Metanol	1,0 volume	Metanol	2 volumes
Água destilada	1,0 volume	Na hora do uso: ácido acético para abaixar o pH para 4.0 e 0,5 ml de Peróxido de Hidrogênio 20V.	

3.4.2 Solução de Hb “stripped”

A solução de Hb isenta de fosfatos (designada de Hb stripped) foi obtida por meio de filtração em coluna de Sephadex G-25. A resina contida na coluna foi equilibrada com solução tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 (Tris-0,05M HCl 1N).

Quando a amostra apresentava-se parcialmente como meta-hemoglobina, a sua redução era feita adicionando-se ditionita de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) à coluna de Sephadex G-25, antes de passar à Hb.

3.4.3 Equilíbrio de oxigenação. Método espectrofotométrico

As medidas de afinidade ao oxigênio foram feitas espectrofotometricamente como descrito por RIGGS & WOLBACH (1956).

Esse método utiliza as variações de espectro obtidas entre as formas oxi e desoxi da hemoglobina.

A hemoglobina expõe diferentemente os átomos de ferro de seus grupos tetrapirrólicos de acordo com o grau de oxigenação da molécula (ANTONINI e BRUNORI, 1971). Populações de hemoglobinas com taxas diferentes de oxigenação possuem diferentes conformações espaciais, apresentando diferentes espectros de absorção. Através desses diferentes espectros pode-se correlacionar pressão de oxigênio e taxa de oxigenação de Hb.

Esse método através do qual foram determinadas as curvas de O₂, consiste em desoxigenar, dentro de um tonômetro (câmara de vidro com cubeta ótica acoplada), a amostra de Hb diluída em tampão, por meio de injeções de nitrogênio (N₂) e fazendo-se, em seguida, vácuo com subsequente agitação em banho rotativo.

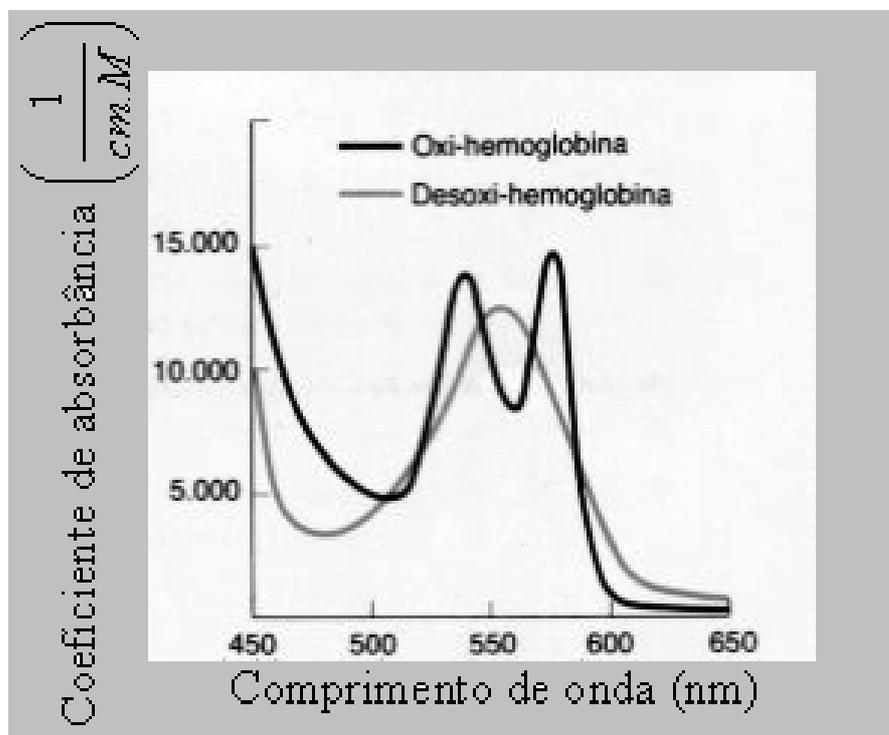


FIGURA 3.3 –. Espectro de absorção na faixa visível da hemoglobina que se muda ao se ligar com o oxigênio.

Para as amostras de hemolisado foram usadas varreduras entre 500 e 600 nm e suas leituras foram feitas em um espectrofotômetro HP através das diferenças entre as absorbâncias das formas oxi e desoxihemoglobina, em 560, 577, e 540 nm e em função do volume de ar adicionado (Fig. 3.3).

Após a primeira curva (Hb desoxigenada) foram injetadas quantidades crescentes e conhecidas de ar e traçados novos espectros de absorção para cada quantidade de ar injetada sobre os espectros anteriores.

Depois de algumas injeções de ar, o tonômetro foi aberto, expondo-se a solução de Hb à pressão de O₂ do meio. Foi traçado então a última curva, que corresponde ao espectro de absorção da Hb 100% oxigenada. O pH da amostra de cada tonômetro, foi determinado ao final do experimento (Fig. 3.3).

A partir dos espectros de absorção, da Hb desoxi e oxigenada, foram calculadas as oxigenações parciais de Hb, nos três comprimentos de onda (540, 560 e 580 nm). Assim, foi obtida a média aritmética das oxigenações parciais de cada injeção de ar (Y). A pressão de O₂ para cada oxigenação parcial da hemoglobina é dada pela fórmula:

$$P_{O_2} = R.V \quad (3.2)$$

onde P_{O_2} é a pressão de oxigênio no interior do tonômetro, V é o volume de ar injetado e R é a constante dada pela seguinte equação:

$$R = \frac{T_b \cdot T_a \cdot \{0,21 [PB_c - (P_v \cdot UR)]\}}{V_t - V_a} \quad (3.3)$$

onde T_b é a temperatura do banho (em graus Kelvin), T_a é a temperatura do ambiente (em graus Kelvin), PB_c é a pressão barométrica corrigida, P_v é a pressão de vapor da água, UR é a umidade relativa do ar, V_t é o volume do tonômetro e V_a é o volume da amostra colocada no tonômetro.

Um gráfico de “ $\log P_{O_2} \times \log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)$ ” foi feito para cada tonômetro (pH), através do qual se determinou os valores de $\log P_{50}$ e o coeficiente de Hill (n) pela declividade da reta obtida. Os valores de $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)$ foram calculados e registrados nos gráficos contra $\log P_{O_2}$ (logarítmo da pressão de oxigênio). O $\log P_{50}$ corresponde ao intercepto no eixo X onde se obtém a pressão suficiente para 50% de saturação, e n corresponde à tangente da reta obtida. Pela regressão linear:

$$\begin{aligned} \log P_{50} &= -\frac{a}{b} & e & & (3.4) \\ n &= b \end{aligned}$$

onde:

a = coeficiente linear

b = coeficiente angular.

Assim, a amplitude de efeito Bohr foi obtida por análises de regressão linear dos pontos obtidos nos diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram o Bis-Tris Cl⁻ 0,05M, para os valores de pH abaixo de 7,4, e o Tris Cl⁻ 0,05 para os valores de pH acima de 7,4.

3.4.3.1 Adição de fosfatos

A influência de fosfatos na afinidade Hb-O₂ foi verificada pela mesma metodologia descrita em 3.4.2.

Os fosfatos testados foram o 2,3-BPG e o IHP, sendo que os experimentos foram realizados em uma relação molar de 1:8 (Hb: nucleotídeo), e o volume necessário de solução de fosfatos para gerar essa relação molar foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{(mM.deN) \times (vol.deN)}{\frac{(DO_{577} / 14,6)}{4}} = 8 \quad (3.5)$$

onde:

mM de N = molaridade da solução de nucleotídeo;

vol.de N = volume de solução de nucleotídeo para gerar a relação 1:8;

DO₅₇₇ = densidade ótica a 577 nm da solução de Hb a ser utilizada;

14,6 = coeficiente de extinção da Hb a 577nm;

4 = subunidades por tetrâmero de Hb;

8 = relação cofator/ tetrâmero de Hb desejada.

O volume do efetor, assim que determinado, foi adicionado ao tonômetro juntamente com o tampão e a amostra de Hb, mantendo-se o volume final de 3,0 ml.

3.4.3.2 Determinação do efeito Bohr

O efeito Bohr é definido como mudança da afinidade da hemoglobina pelo O₂ em função da alteração do pH do meio. Pode ser descrito como efeito Bohr ácido e efeito Bohr alcalino dependendo da faixa de pH onde ocorre a alteração da afinidade, e positivo ou negativo, dependendo de como a afinidade é alterada. Se a afinidade da hemoglobina pelo O₂ aumentar conforme se aumenta o pH, temos efeito Bohr negativo (normal); caso a afinidade diminua com a elevação do pH, temos efeito Bohr positivo.

A determinação do efeito Bohr foi feita através do gráfico onde se colocou em ordenadas $\log P_{50}$ e nas abscissa os valores de pH. O coeficiente angular da reta determinado corresponde ao efeito Bohr. Os valores de $\log P_{50}$ utilizados correspondem à média desses valores obtidos em experimentos em idênticas condições.

3.4.4 Extratos de fosfatos intraeritrocitários

Para o cálculo da quantidade de fosfatos presentes nos eritrócitos foram determinados o volume e hematócrito das amostras. Para a extração de fosfato é necessário que o sangue seja recém tirado do animal. Das amostras obtidas de sangue, foi descartado o plasma e adicionado a seguir ácido perclórico 7% às células empacotadas, para que ocorresse lise e liberação dos fosfatos eritrocitários (BARTLETT, 1959). As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada a 3 °C, girando a 10000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio plásticos (GREANEY & POWERS, 1978). A solução de ácido perclórico, contendo os fosfatos, foi então neutralizada com KOH 6M, na presença do indicador vermelho de fenol e/ou pHmetro e a seguir, as amostras foram congeladas em frascos de polietileno.

3.4.4.1 Hematócrito (Ht)

Para o cálculo da concentração de fosfatos é necessário determinar o hematócrito da amostra de sangue. Essa medida tem, aqui neste trabalho, somente essa finalidade.

Literalmente a palavra hematócrito significa separação do sangue e esta separação é facilmente obtida no laboratório através da centrifugação. Após este processo, o sangue fica separado em três partes: a massa (ou camada) vermelha de eritrócitos, logo acima desta, uma camada fina e esbranquiçada, formada pelos leucócitos e plaquetas e por fim, o plasma. O hematócrito corresponde ao volume ocupado pelas hemácias contidas numa certa quantidade de sangue total sendo os resultados expressos em porcentagens (%).

Para a determinação do hematócrito foi usado sangue recém tirado com anticoagulante. O método do micro-hematócrito foi utilizado para a

determinação do volume globular, por requerer menor quantidade de sangue e possuir maior rapidez.

3.4.4.2 Dosagem do 2,3-Bifosfoglicerato

Na determinação quantitativa do 2,3-bifosfoglicerato utilizamos um kit da Sigma Diagnósticos. Neste, o NAD liberado como resultado da clivagem do 2,3-BPG da amostra testada, em gliceroldeído-3-fosfato (3-PGA) e fósforo inorgânico, é então mensurado colorimetricamente em 340nm.

Utilizou-se as mesmas amostras do item 3.4.4. Para cada determinação do 2,3-BPG, utilizou-se duas cubetas com propriedades ópticas para leitura, sendo uma delas o tubo teste e a outra, o branco, utilizado apenas para calibrar o equipamento. No tubo teste, 0,25 ml de cada amostra foi adicionado a 2,5 ml de tampão trietanolamina contendo 0,1 ml de solução de ATP. Em seguida foram adicionados 0,02 ml da mistura de enzimas GAPD/PGK e 0,02 ml de fosfoglicerato mutase (PGM). Após 5 minutos realizou-se a primeira leitura em 340 nm, utilizando o tubo branco (com água) como referência.

Ainda no tubo teste foi adicionado 0,1 ml de ácido fosfoglicólico, que é o estimulador da reação catalisada pela PGM e, em seguida foi aquecido a 37^oC em banho-maria por 15 minutos para permitir a reação. Novamente, leituras de absorvância foram realizadas em 340nm usando água como referência.

3.4.4.3 Determinação de inositois

Para a análise dos inositois, extraídos dos eritrócitos (item 3.4.4), utilizou-se uma coluna cromatográfica de troca iônica que baseia-se no aprisionamento eletrostático de moléculas com cargas contrárias a da resina e que, através de um gradiente de tampão, obtêm-se uma troca seletiva das moléculas aprisionadas.

Levantou-se uma curva padrão em concentrações conhecidas e crescentes de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄). A essas soluções foram adicionados 0,5ml de H₂SO₄ 10N, 0,2ml de molibdato de amônio 5%,

0,2ml de reagente de *Fisk & Subbarow* a 0,25% (15 g de NaHSO_3 ; 250mg de redutor de *Fisk & Subbarow* e 500mg de Na_2SO_3) e água deionizada. Os tubos foram cromatografados segundo a metodologia descrita por BARTLETT (1959).

Utilizamos a resina DOWEX 1x8 (400 *mesh*), empacotada numa coluna de 1,0 cm de diâmetro interno por 28,0 cm de comprimento, que foi previamente tratada com água deionizada, formiato de amônia/ácido fórmico 5M e novamente água deionizada com a finalidade de eliminar os contaminantes.

O extrato de fosfato foi centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante aplicado a coluna. Com a finalidade de retirar os fosfatos que não sejam inositolis (ex.: NAD, ADP, AMP, BPG), aplicou-se à coluna uma solução de ácido fórmico 5M/formiato de amônia 3M, lavando-a posteriormente com água deionizada. A seguir dois vasos comunicantes, um contendo 400ml de água deionizada e outro contendo 400ml de HCL 1N, foram conectados a coluna por intermédio de uma bomba peristáltica. Submetemos a coluna a um fluxo constante de 1,0 ml/minuto e a um gradiente linear de 0 a 1N de HCL para a separação dos inositolis. Utilizamos um coletor de frações REDIRAC para obtermos frações de 5ml de eluato.

A quantidade de cada inositol fosfatado foi determinada pelo seu conteúdo de fósforo. Para tanto, 0,5ml de cada fração obtida foi transferida para tubos de ensaio, aos quais adicionamos 0,5ml de H_2SO_4 10N, colocando-os numa estufa FANEN, modelo 320SG, com circulação mecânica de ar, a 180°C durante 3 horas, para que ocorresse a hidrólise dos fosfatos orgânicos. Duas gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram, então, adicionados a cada tubo que foram mantidos por mais 1 hora na estufa.

Com o auxílio de “dispensadores”, adicionamos a cada um dos tubos já resfriados 0,2ml de molibdato de amônio 5%, 0,2ml de reagente *Fisk & Subbarow* a 0,25% e 4,6 de água deionizada para obtermos o volume final de 5 ml. A seguir os tubos foram agitados e levados a banho-maria a 100°C por mais 10 minutos, quando então devemos obter uma coloração azul,

diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico da amostra. Sua densidade óptica foi determinada em 830 nm. A concentração de fósforo foi calculada através da curva de calibração (padrão) descrita anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO

A Fig. 4.1 mostra o padrão eletroforético das hemoglobinas obtidas para as 10 espécies pertencentes a família Phyllostomidae e Molossidae, assim como hemoglobina humana normal utilizada como padrão.

Todas as espécies apresentaram o mesmo padrão eletroforético mostrando 2 bandas anódicas, onde o componente de maior concentração apresentou mobilidade mais lenta e semelhante a HbA₂ e o componente de menor concentração mostrou mobilidade semelhante a HbA₁ humana (Fig. 4.1.b). Assim, não foram observadas diferenças intraespecíficas e nem interespecíficas.

4.2 EQUILÍBRIO DE OXIGENAÇÃO

Foram realizados experimentos de equilíbrio de Hb-O₂ para 10 espécies, sendo elas: *Artibeus planirostris*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus ater*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus* e *Eumops perotis*. Em alguns desses experimentos, devido a pequena quantidade de sangue obtida, houve a necessidade de utilizarmos um “pool” de amostras.

A determinação do efeito Bohr e sua amplitude (ϕ) foi realizada em intervalos de pH final medido de 7 a 8. Em pH próximo de 7,5 (fisiológico) foram determinados os valores de afinidade (P_{50}) e a cooperatividade do processo de oxigenação (expresso em n) no comportamento funcional da Hb em sangue total (não fracionado), Hb “stripped”, Hb “stripped”+ 2,3-BPG e Hb “stripped”+ IHP.

4.2.1 Sangue total

O comportamento funcional da Hb em sangue total, juntamente com outras curvas, estão ilustrados nas Figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 e os resultados resumidos na Tabela 4.1.

Os valores de afinidade (P_{50}) e a amplitude de efeito Bohr variam segundo a espécie (Tab. 4.1). Em nossa amostra, *A. planirostris* apresentou efeito Bohr reverso com valores mais baixos de P_{50} (aumento da afinidade Hb-O₂) a medida que se acidificava o pH (Tab. 4.1; Fig. 4.2). *P. discolor*, *A. lituratus*, *G. soricina*, *M. ater*, *N. laticaudatus* e *E. perotis* apresentaram efeito Bohr normal, sendo que os valores de P_{50} diferem de acordo com a espécie (Tab. 4.1; Fig. 4.3, 4.4, 4.7, 4.8, 4.10 e 4.11). *G. soricina* e *M. ater* apresentaram uma amplitude de efeito Bohr baixa, com valores de P_{50} mais elevados do que os encontrados para as condições “stripped” e 2,3-BPG (Fig. 4.7 e 4.8). Ainda, este último também apresentou valores de P_{50} mais altos do que os encontrados na presença de IHP e, os valores mais baixos de afinidade quando comparados com as demais espécies (Fig. 4.8). No sangue de *C. perspicillata*, *D. rotundus* e *M. molossus* não houve alterações significativas da afinidade pelo oxigênio quando se varia o pH do meio, determinando inexistência de efeito Bohr, ou seja, efeito Bohr nulo (Fig. 4.5 e 4.6). A cooperatividade do processo de oxigenação em pH próximo de 7,5 e o seu comportamento em relação à variação de pH para todas as espécies são mostrados nas figuras 4,2 a 4.11 e tabela 4.1. Apenas *M. ater* apresentou valores de $n < 1$ em todos os pHs.

FIGURA 4.1 a) Padrão eletroforético das espécies estudadas: 1. *A. planirostris*, 2. *P. discolor*, 3. *A. lituratus*, 4. *C. perspicillata*, 5. *D. rotundus*, 6. *G. soricina*, 7. *M. ater*, 8. *M. molossus*, 9. *N. laticaudatus* e 10. *E. perotis*. b) Padrão eletroforético das hemoglobinas humana e das espécies 6 e 7.

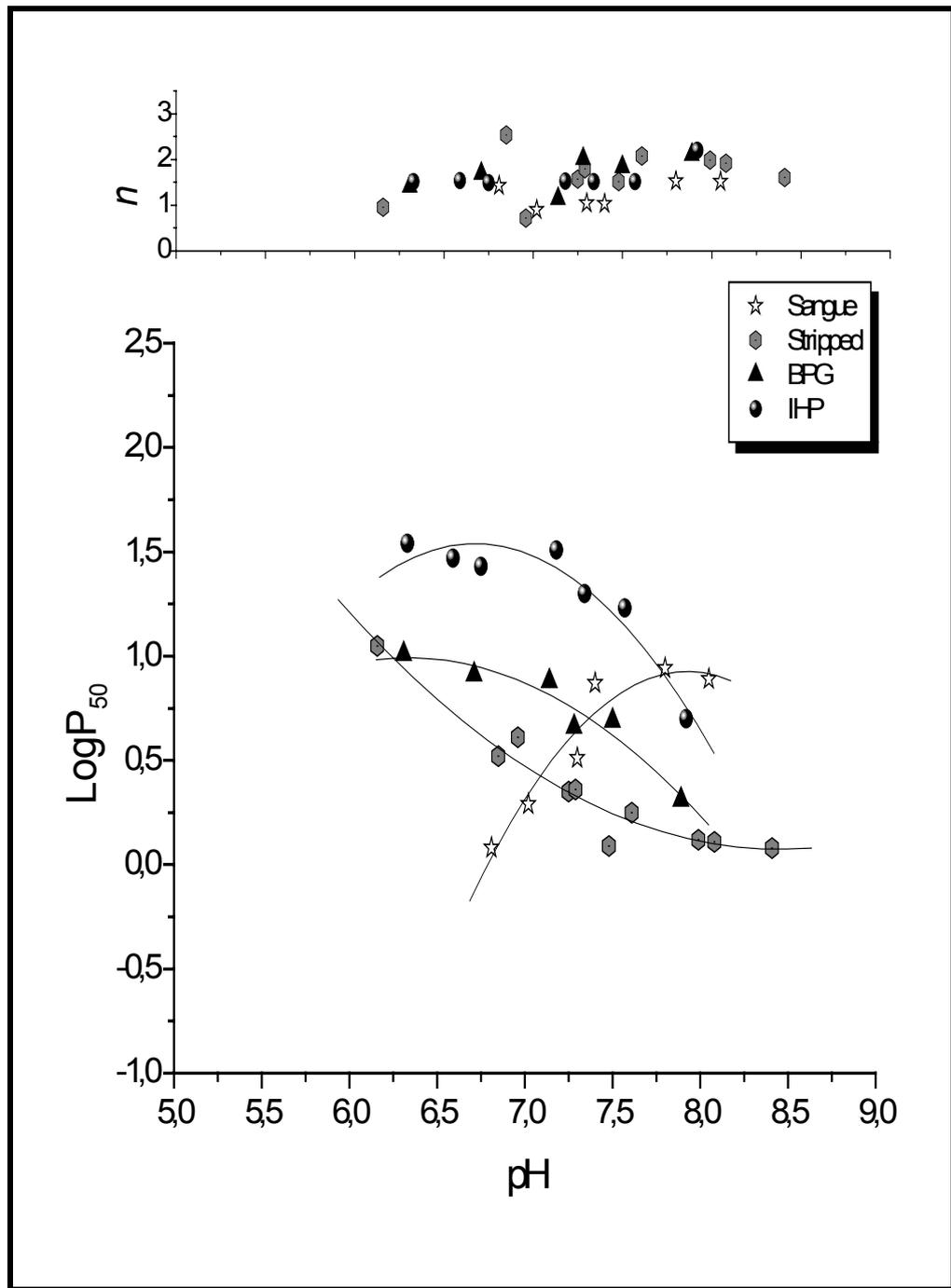


Figura 4.2 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Artibeus planirostris*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

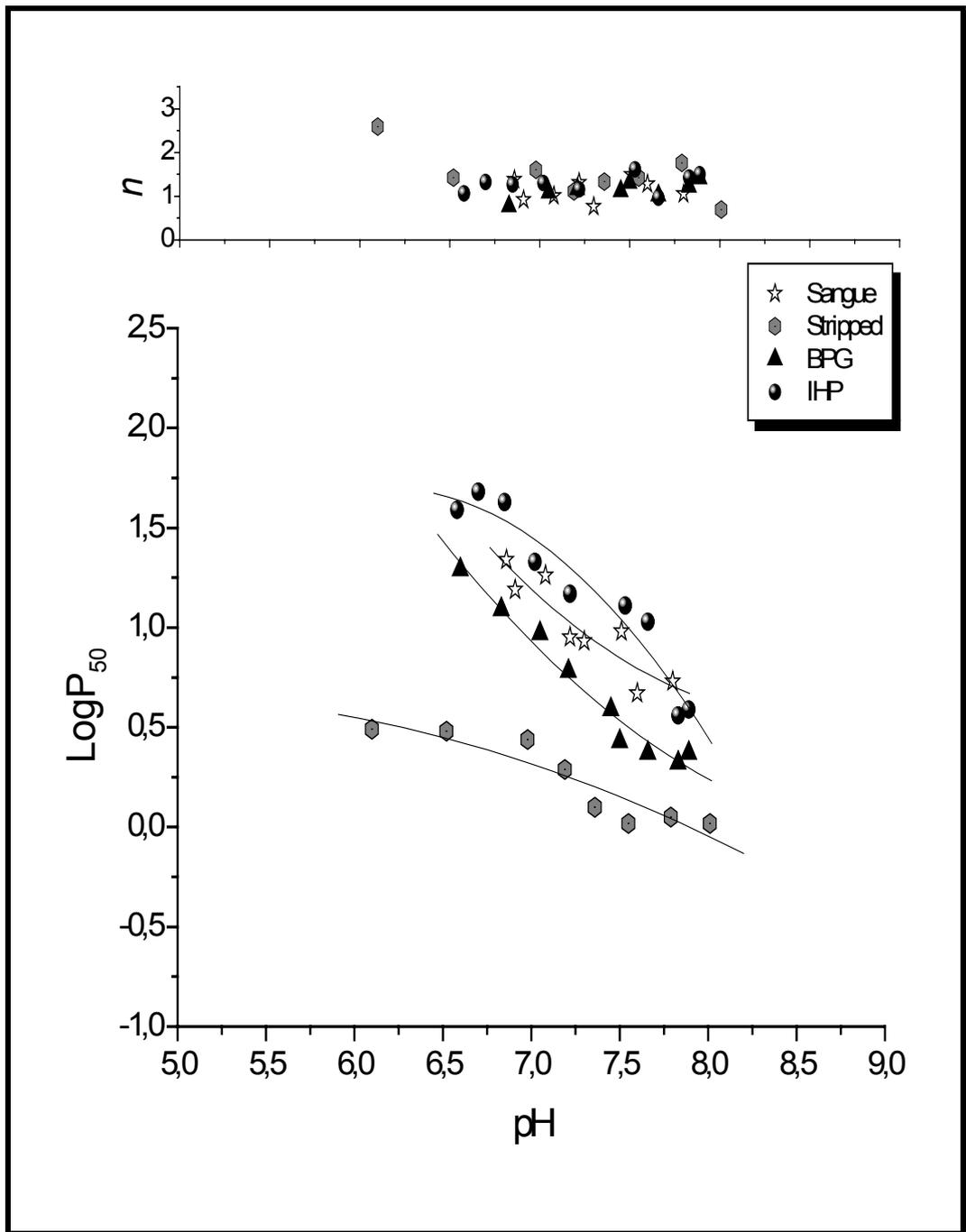


Figura 4.3 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Phyllostomus discolor*. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

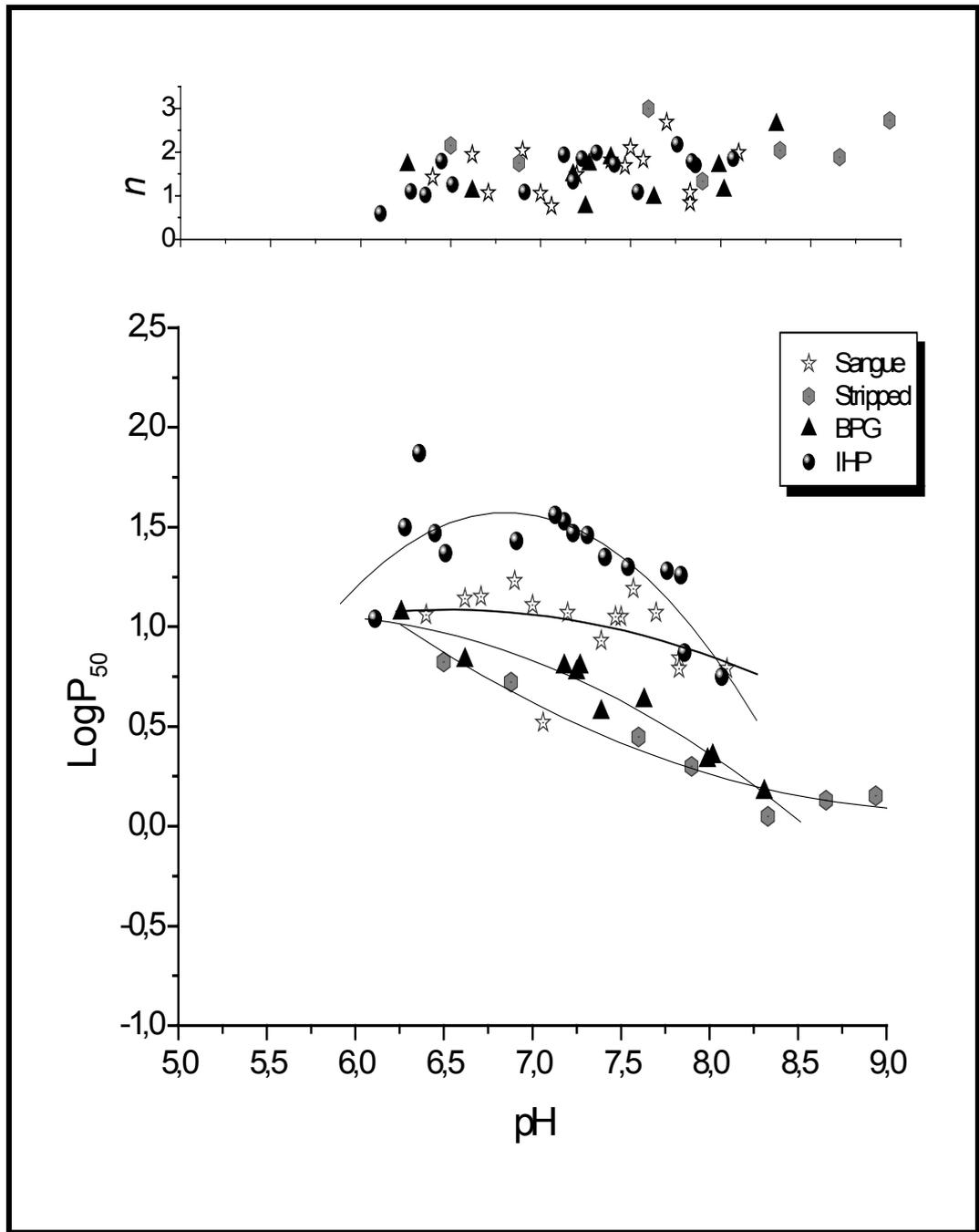


Figura 4.4 - Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado "stripped" na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Artibeus lituratus*. Cooperatividade ($n \times pH$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb "stripped" e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

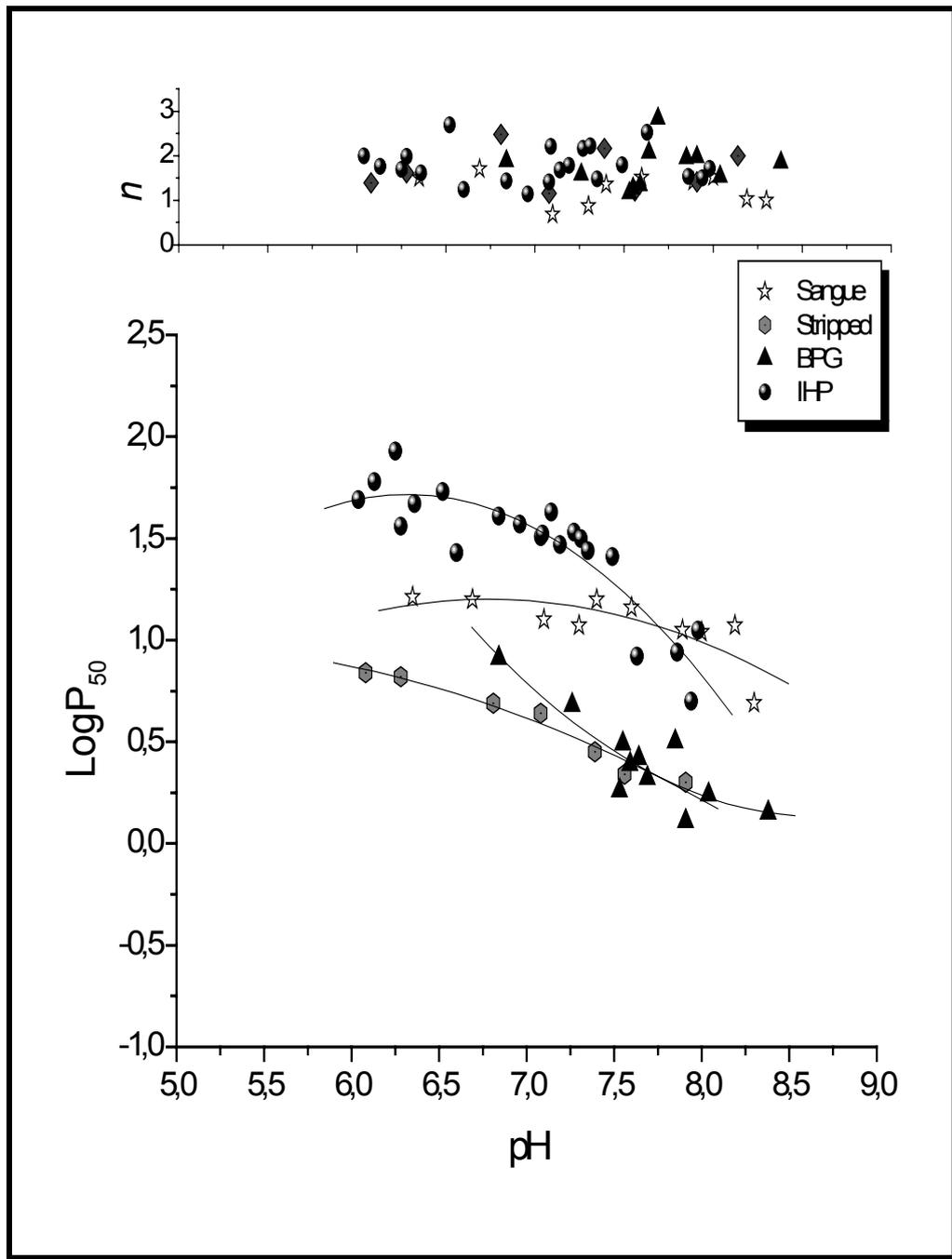


Figura 4.5 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Carollia perspicillata*. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

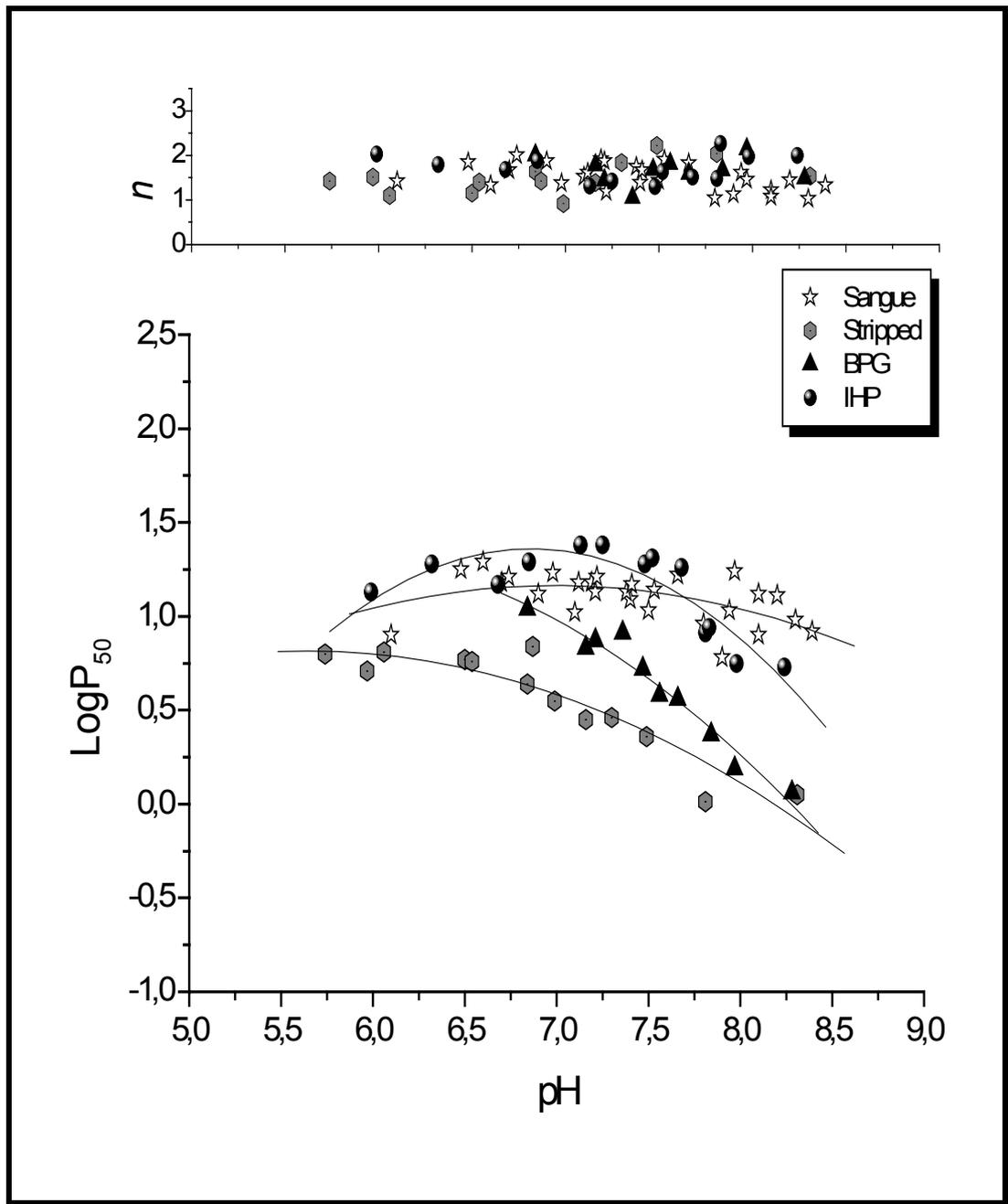


Figura 4.6 - Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado "stripped" na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Desmodus rotundus*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb "stripped" e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

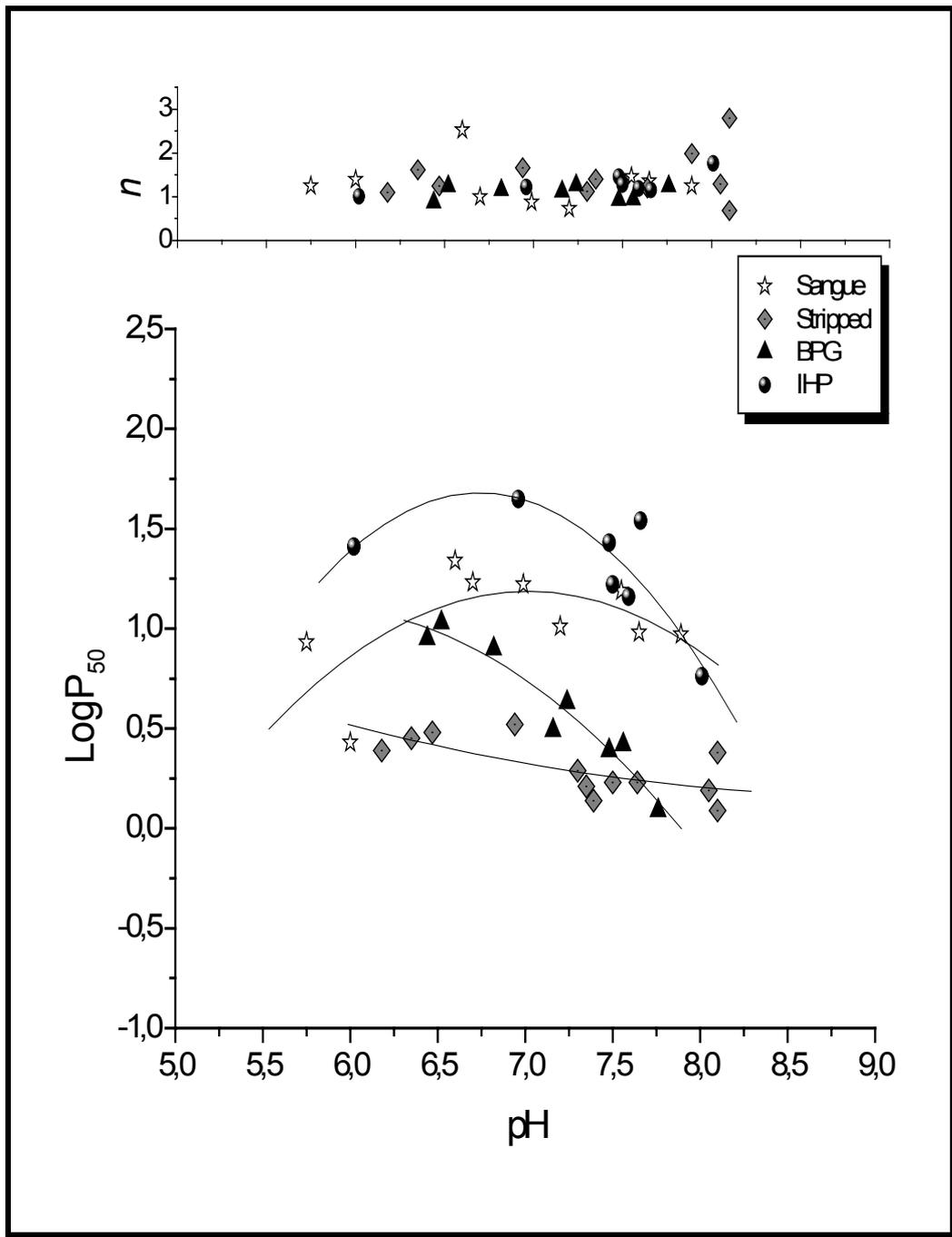


Figura 4.7 - Dependência da afinidade da Hb ao O₂ em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Glossophaga soricina*. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl⁻ 0,05M e Tris Cl⁻ 0,05M.

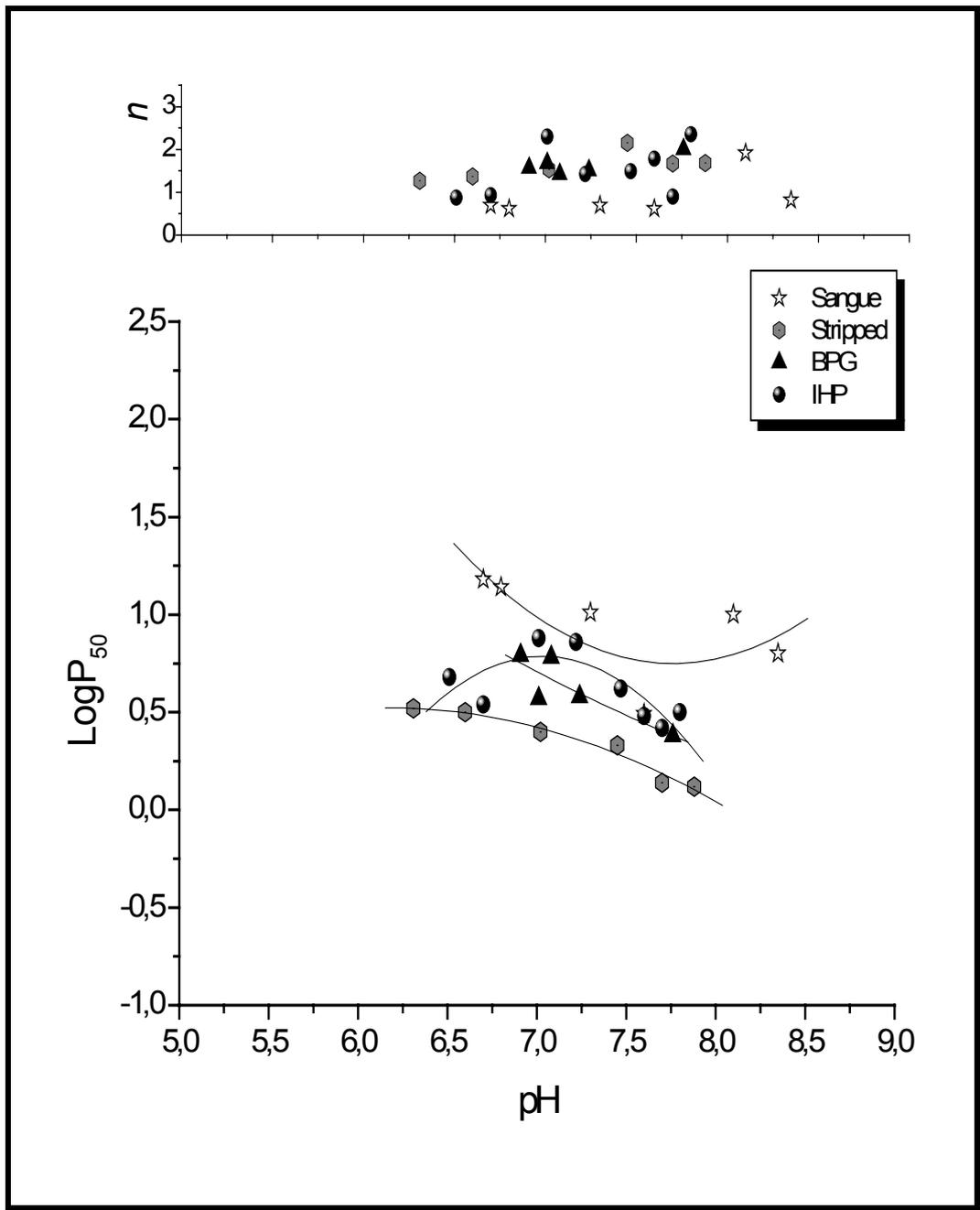


Figura 4.8 - Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado "stripped" na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Molossus ater*. Cooperatividade ($n \times pH$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb "stripped" e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

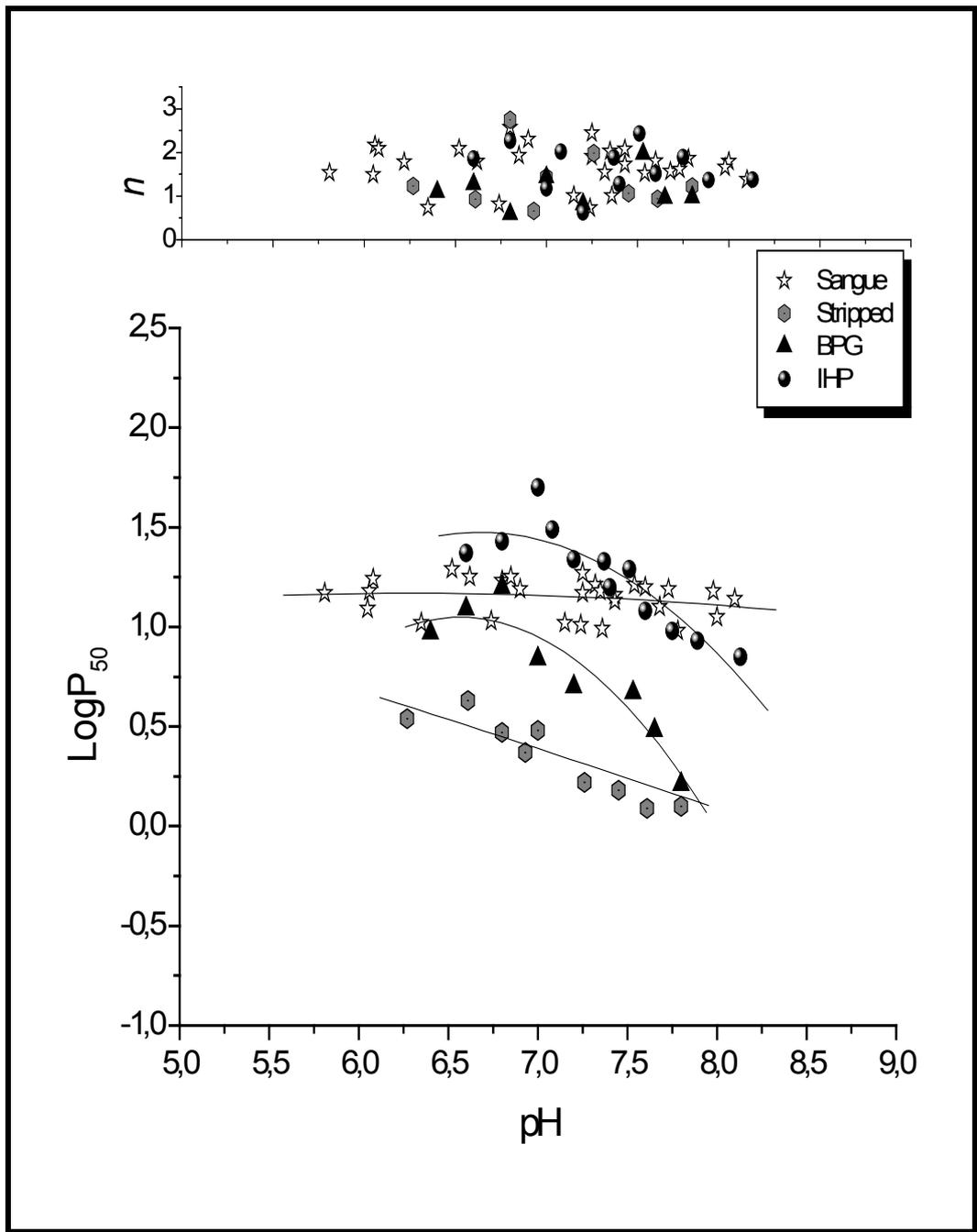


Figura 4.9 - Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado "stripped" na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Molossus molossus*. Cooperatividade (n x pH) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb "stripped" e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

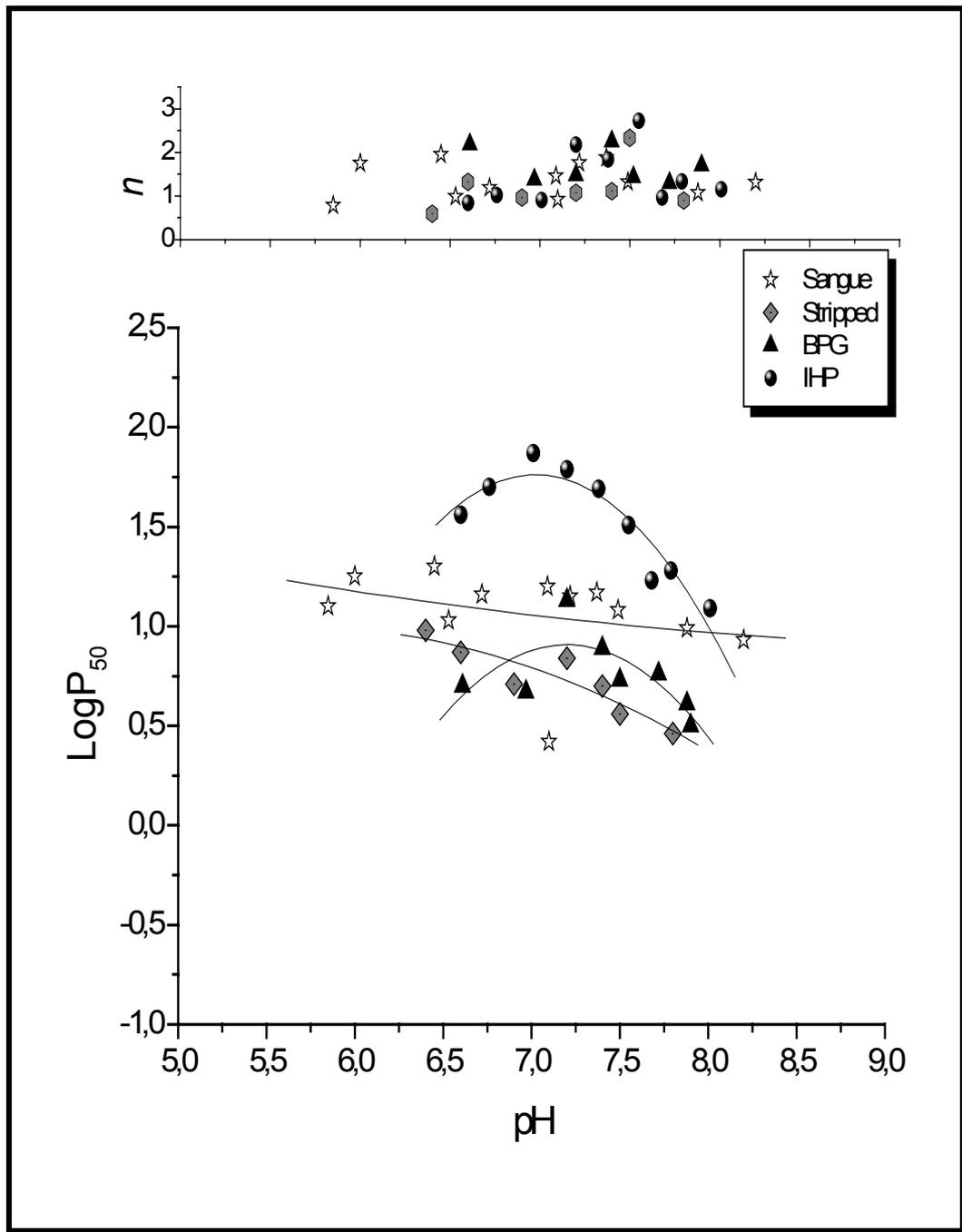


Figura 4.10 -Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado “stripped” na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Nyctinomops laticaudatus*. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb “stripped” e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

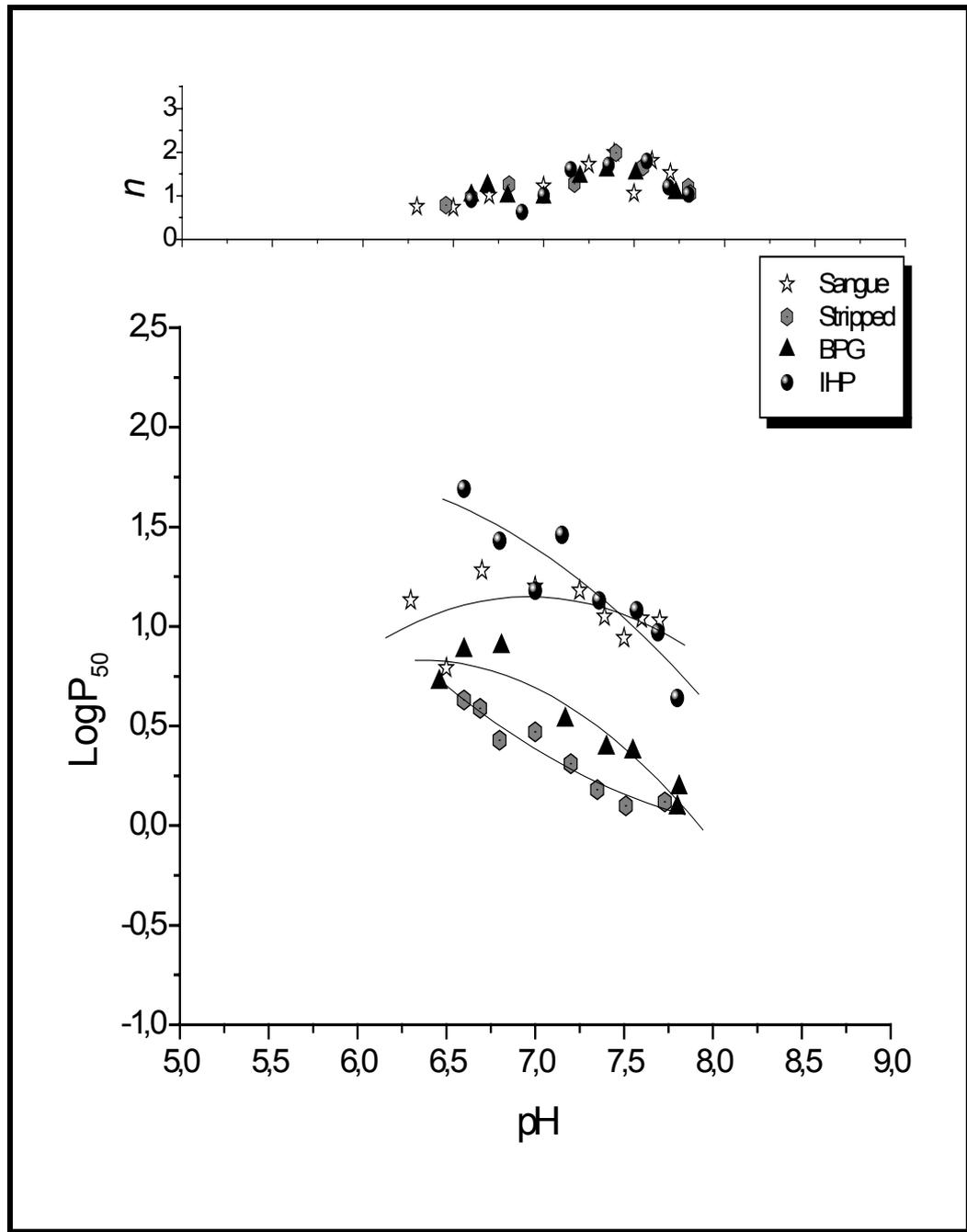


Figura 4.11 -Dependência da afinidade da Hb ao O_2 em função do pH em sangue e no hemolisado "stripped" na ausência e na presença de 2,3-DPG e IHP em *Eumops perotis*. Cooperatividade ($n \times \text{pH}$) e efeito Bohr ($\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$). Tampão para sangue: Bis-Tris HCl 0,1M e Tris-HCl 0,1M. Tampão para Hb "stripped" e moduladores: Bis-Tris Cl^- 0,05M e Tris Cl^- 0,05M.

TABELA 4.1- Valores de efeito Bohr (ϕ), P_{50} e n em sangue, “stripped”, 2,3-BPG e inositol hexafosfato (IHP) das dez espécies de morcegos.

Espécie	Elemento em estudo	pH 7 – 8	pH \approx 7,5	
		Efeito Bohr	P_{50}	n
<i>Artibeus lituratus</i>	Sangue	-0,30	11,22	2,10
	Stripped	-0,40	2,75	2,99
	2,3 BPG	-0,54	4,26	0,95
	IHP	-0,62	19,95	1,09
<i>Artibeus planirostris</i>	Sangue	0,69	7,42	1,03
	Stripped	-0,45	1,23	1,52
	2,3 BPG	-0,50	4,90	1,84
	IHP	-0,61	16,90	1,51
<i>Phyllostomus. discolor</i>	Sangue	-0,66	9,54	1,49
	Stripped	-0,38	1,04	1,42
	2,3 BPG	-0,77	2,69	1,31
	IHP	-0,84	12,88	1,61
<i>Carollia perspicillata</i>	Sangue	-0,03	15,84	1,36
	Stripped	-0,41	2,62	1,21
	2,3 BPG	-0,62	3,09	1,27
	IHP	-0,84	25,70	1,79
<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	-0,15	15,48	1,46
	Stripped	-0,45	1,70	1,34
	2,3 BPG	-0,76	2,45	0,93
	IHP	-0,75	16,60	1,28
<i>Desmodus rotundus</i>	Sangue	-0,05	10,70	1,44
	Stripped	-0,62	2,29	2,22
	2,3 BPG	-0,74	5,24	1,68
	IHP	-0,75	20,41	1,64

TABELA 4.1 – Continuação.

Espécie	Elemento em estudo	pH 7 – 8	pH \approx 7,5	
		Efeito Bohr	P ₅₀	n
<i>Molossus molossus</i>	Sangue	-0,08	16,22	1,53
	Stripped	-0,47	1,51	1,07
	2,3 BPG	-0,68	4,67	1,97
	IHP	-0,70	19,49	2,43
<i>Molossus ater</i>	Sangue	-0,18	3,09	0,62
	Stripped	-0,35	2,13	2,15
	2,3 BPG	-0,43	3,80	1,52
	IHP	-0,61	4,16	1,49
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Sangue	-0,24	12,02	1,82
	Stripped	-0,34	3,63	2,33
	2,3 BPG	-0,74	5,37	1,44
	IHP	-0,84	32,35	2,73
<i>Eumops. perotis</i>	Sangue	-0,30	8,70	1,06
	Stripped	-0,50	1,25	1,66
	2,3 BPG	-0,66	2,34	1,52
	IHP	-0,69	12,02	1,79

4.2.2 Hemoglobina “stripped”

Para a obtenção dos valores de $\log P_{50}$ do hemolisado na ausência e na presença de moduladores, foi utilizado o método espectrofotométrico. Em intervalos de pH de 7 a 8 determinamos o efeito Bohr. Seu comportamento em relação à variação de pH para as mesmas espécies é mostrado nas Figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.11 e Tabela 4.1.

As propriedades funcionais dos hemolisados “stripped” das 10 espécies mostraram um efeito Bohr normal. A afinidade aumenta na medida em que diminui a concentração de prótons, ou seja, valores de P_{50} diminuem com a elevação do pH (Figs. 4.2 a 4.11). Quando analisados na faixa de pH determinada (7 – 8), verifica-se diferenças na amplitude de efeito Bohr (ϕ) entre uma espécie e outra. O hemolisado de *P. discolor* apresenta o menor valor de amplitude ($\phi = -0,38$) e *D. rotundus* o maior ($\phi = -0,62$) (Tab. 4.1).

Os valores de n , estes permanecem entre de 1 e 2 no intervalo de pH 7 a 8. A variação de P_{50} e a cooperatividade (valor de n) em pH próximo do fisiológico podem ser visto na Tabela 4.1.

4.2.3 Efeito de moduladores

4.2.3.1 2,3-Bifosfoglicerato (2,3-BPG)

A adição de 2,3-BPG a Hb “stripped” mostrou-se efetivo na diminuição da afinidade da Hb-O₂ em quase todos os hemolisados. As curvas de $\log P_{50} \times pH$ mostraram-se pouco mais elevadas às obtidas na ausência do modulador.

O 2,3-BPG muda a afinidade da Hb ao oxigênio em: *A. planirostris*, *P. discolor*, *D. rotundus*, *G. soricina*, *M. molossus*, *M. ater*, *N. laticaudatus* e *E. perotis*. Porém, ao contrário do que se esperava, a Hb de *A. lituratus* e *C. perspicillata* demonstram uma fraca modulação pelo 2,3-BPG em quase todos os pHs usados (Figs. 4.4 e 4.5).

Amplitude de efeito Bohr e o P_{50} em pH próximo do fisiológico variam de acordo com a espécie. Em pH fisiológico, os valores de n são maiores que 1 e na faixa de pH 7-8 mostrou-se quase sempre maior que 1 (Tab. 4.1 e Fig. 4.2 a 4.11). As curvas de efeito Bohr estão ilustradas nas Figuras 4.2 a 4.11, bem como, a cooperatividade do processo de oxigenação em relação à variação de pH.

4.2.3.2 Inositol hexafosfato (IHP)

Aparentemente quase todos apresentaram o mesmo comportamento na presença do IHP. Sua adição reduz a afinidade da Hb ao oxigênio, modifica o valor de efeito Bohr e aumenta os valores de P_{50} em pH fisiológico (Tab. 4.1). Suas curvas são mais elevadas quando comparadas com as condições anteriores, mostrando-se mais efetivo do que o 2,3-BPG na diminuição da afinidade ao oxigênio da Hb de quase todas as espécies estudadas. Entretanto, em *G. soricina* e *D. rotundus* a diferença de amplitude dos dois moduladores é praticamente nula (Tab. 4.1). *M. ater* demonstra valores de P_{50} muito próximos, tanto na presença do 2,3-BPG como do IHP, sugerindo uma fraca modulação pelo IHP.

As curvas de efeito Bohr na presença do modulador IHP, a cooperatividade (n) em pH fisiológico e o seu comportamento em relação à variação de pH são mostradas na Tabela 4.1 e nas Figuras 4.2 a 4.11.

4.3 HEMATÓCRITO (HT)

Apesar dos poucos estudos quantitativos sobre os parâmetros hematológicos, achamos importante o estabelecimento de suas variações normais para possíveis respostas adaptativas. Para os morcegos estudados, os valores de hematócrito variaram entre 40 e 72%. Indivíduos pertencentes às espécies *A. lituratus* e *D. rotundus*, capturados em locais onde a pressão barométrica é um pouco maior (775 mmHg), apresentaram os maiores

valores de hematócrito (60-67% e 65-72%, respectivamente) quando comparados com indivíduos das mesmas espécies e espécies diferentes capturados em outras localidades.

O hematócrito foi realizado, fundamentalmente, para permitir o cálculo da concentração de fosfatos orgânicos.

Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.2, juntamente com os valores obtidos para fosfatos intraeritrocitários nas diferentes espécies.

4.4 DOSAGEM DE INOSITOIS FOSFATADOS E 2,3-BIFOSFOGLICERATO

Usando a metodologia descrita anteriormente não foi detectada a presença de inositois polifosfatados. O 2,3-BPG, entretanto, foi detectado em todas as amostras estudadas (Tab. 4.2). Os valores de hematócrito (%), para as espécies analisadas foram: *A. lituratus* = 40%, *A. planirostris* = 43%, *P. discolor* = 43%, *C. perpicillata* = 45%, *D. rotundus* = 40%, *G. soricina* = 39%, *M. molossus* = 46%, *M. ater* = 43%, *N. laticaudatus* = 40% e *E. perotis* = 51%.

Após a quantificação do 2,3-BPG, conforme método descrito, foram realizados os cálculos para dosagem das concentrações de 2,3-BPG para as diferentes espécies (Tab. 4.2). Os valores encontrados, demonstram níveis de 2,3-BPG nas células vermelhas destes animais, sugerindo que este seja o responsável pela diminuição da afinidade da Hb-O₂ em quase todas as espécies.

TABELA 4.2 - Valores de hematócrito (Ht), inositol (INS) e 2,3-BPG (BPG) das diferentes espécies. Os resultados de Ht são a média dos valores dos indivíduos por espécie incluindo o desvio padrão ($\bar{X} \pm SD$). A concentração de BPG está expressa em micromoles por mililitro de sangue.

Espécie	Ht (%) ($\bar{X} \pm SD$)	BPG ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	INS
<i>A. lituratus</i>	46,10 ± 9,49	4,87	0,0
<i>A. planirostris</i>	43,00	1,77	0,0
<i>P. discolor</i>	43,00 ± 2,00	5,53	0,0
<i>C. perspicillata</i>	45,09 ± 9,60	1,04	0,0
<i>D. rotundus</i>	48,54 ± 13,04	2,13	0,0
<i>G. soricina</i>	40,9 ± 3,41	0,73	0,0
<i>M. ater</i>	45,77 ± 4,40	1,89	0,0
<i>M. molossus</i>	47,14 ± 3,84	1,37	0,0
<i>N. laticaudatus</i>	41,50 ± 2,40	2,04	0,0
<i>E. perotis</i>	51,00	1,07	0,0

5. DISCUSSÃO

5.1 ELETROFORESE

A eletroforese é comumente utilizada como método para determinar o número e os componentes hemoglobínicos e desta forma indicar a presença de variabilidade intraespecífica e/ou interespecífica da Hb. No presente trabalho a escolha dos meios de migração eletroforética foi feita de acordo com o poder de resolução, custo e rapidez. Utilizou-se então o gel de amido, que assim como o de poliacrilamida, separam as moléculas protéicas pelo tamanho e forma, além do pI (ponto isoelétrico). A multiplicidade dos componentes geralmente parece seguir uma proximidade filogenética onde o padrão observado é muito semelhante entre as espécies.

Nas duas famílias estudadas no presente trabalho, Molossidae e Phyllostomidae, subordem Microchiroptera, o número de indivíduos por espécie estudado variou entre 1 (*E. perotis*) e 37 (*G. soricina*). A hemoglobina de todos os indivíduos mostrou dois componentes, uma banda maior, lenta, e uma menor, de mobilidade próxima a da Hb-A humana. A mobilidade das duas bandas foram similares em todas

as espécies estudadas, mostrando assim, ausência de variabilidade tanto intraespecífica como interespecífica. Essa ausência de variabilidade intraespecífica seria esperada uma vez que a maior parte dos grupos animais apresenta monomorfismo hemoglobínico. Entretanto, o fato de todas as espécies aqui estudadas apresentarem esse padrão eletroforético é surpreendente, uma vez que na maioria dos grupos animais existem diferenças nos padrões eletroforéticos de hemoglobinas de espécies diferentes de um mesmo grupo.

MANWELL & KERST (1966) sugerem que hemoglobinas de espécies pertencentes a sub-ordem Microchiroptera apresentam uma característica homogênea no número e mobilidade dos componentes hemoglobínicos. VALDIVIESO *et al.* (1969) sugerem que durante a evolução dos Phyllostomidae e Molossidae, a forma única da molécula de Hb foi retida, enquanto que em Vespertilionidae, evolução levou à presença de duas diferentes moléculas.

Um componente maior lento e um menor rápido em Microchiroptera também são descritos por SINGER *et al.* (1991) em *Macrodemas gigas*; SINGER *et al.* (1992) em *Taphozous georgianus*; SINGER *et al.* (1995) em *Chakinolobus morio*; CONDO *et al.* (1989) em *Myotis myotis*; Kleinschmidt *et al.* (1987) em *Tadarida brasiliensis*, e AREVALO *et al.* (1987) em *Plecotus austriacus*, *M. myotis*, e *M. nattereri*. Entretanto alguns outros autores trabalhando também com espécies de Microchiroptera, como KLEINSCHMIDT e BRAUNITZER (1982 e 1986), em *Myotis velifer*, e SGOUROS *et al.* (1987), em *Cynopterus sphinx*, descrevem a presença de somente um componente de Hb, e AREVALO *et al.* (1987) em *Miniopterus schreibersi* descreve a presença de três, e em *Pipistrellus pipistrellus*, quatro componentes de Hb. Os autores acima não comparam as hemoglobinas desses morcegos com a hemoglobina humana e portanto não podemos precisar suas mobilidades.

5.2 EQUÍLBRIO DE OXIGENAÇÃO

5.2.1 Equilíbrio de oxigenação em Hb “stripped”, Hb “stripped” + 2-3 BPG, HP “stripped” + IHP e em sangue total

Dois métodos de verificação do equilíbrio de oxigenação foram utilizados no presente trabalho. O método gasométrico (JOHANSEN *et al.*, 1978) foi utilizado para verificação do equilíbrio de oxigenação de sangue logo após coleta, no sentido da obtenção de dados funcionais mais próximos ao da situação *in vivo*, ou seja, hemoglobina na presença de seus moduladores naturais. Esses dados puderam ser, então, comparados aos obtidos com Hb ou hemolisado “stripped” (isento desses moduladores) e aos referentes a adição de dois desses moduladores : 2,3-BPG e IHP, através do segundo método, o espectrofotométrico. A soma desses dois métodos nos deu uma idéia da natureza da modulação das hemoglobinas de Chiroptera.

A regulação da ligação Hb-O₂ frente às variações de pH é de vital importância na trocas gasosas que ocorrem no sangue. Dados de seqüência aminoacídicas e de difração de raios X sugerem que, no caso da hemoglobina humana, três grupamentos são responsáveis por grande parte do efeito Bohr: as histidinas 146 β , 122 α e a amina da cadeia - α . Na transição de oxi para desoxi-Hb, a His 146 β adquire maior afinidade por H⁺, tendo em vista que seu ambiente local fica mais carregado, negativamente, em função de mudanças na estrutura quaternária induzida pela liberação de O₂ (STRYER, 1992).

Dados de equilíbrio de O₂ dos hemolisados “stripped” dos morcegos estudados, mostraram um efeito Bohr (ϕ) normal em todos os casos. Quando analisados na faixa de pH 7 - 8, a diferença na amplitude do efeito Bohr entre uma espécie e outra não é grande, com exceção de *D rotundus*, que apresenta um valor de $\phi = -0,62$. O mesmo acontece com o valor de P50 em pH próximo do fisiológico (próximo de 7,5), que mostrou-se ligeiramente

diferente entre as espécies, sendo mais elevado para *N. latycaudatus* (P50 = 3,65 mmHg). Esta similaridade na amplitude de efeito Bohr foi também detectada por CONDÒ *et al.* (1989), estudando os hemolisados "stripped" de duas espécies de morcegos, *Rousettus aegyptiacus* e *Myotis myotis* e por AREVALO *et al.* (1991), em *Rhinolophus ferrumequinum*, *Miniopterus schreibersi* e *Pipistrellus pipistrellus*.

O efeito Bohr normal detectado nas espécies aqui analisadas lhes seria extremamente benéfico, uma vez que suas hemoglobinas possuindo elevada afinidade ao oxigênio em pH alcalino facilitaria a tomada de oxigênio nos pulmões e, em pH ácido, a descarga do gás aos tecidos.

Os resultados dos nossos experimentos de equilíbrio de oxigênio, com a adição dos fosfatos 2,3-BPG e IHP, mostram que esses agem como moduladores negativos da afinidade da Hb, ou seja, diminuem a afinidade da Hb ao O₂ em relação a Hb "stripped" de *A. planirostris*, *P. discolor*, *D. rotundus*, *G. soricina*, *M. ater*, *M. molossus*, *N. laticaudatus* e *E. perotis*. Na presença do modulador, a afinidade da molécula pelo oxigênio diminui quando há ligação Hb-fosfato (esta ligação ocorre mais facilmente em pH ácido, diminuindo assim a afinidade). Já em pH alcalino, a afinidade não se altera tanto porque geralmente não há ligação Hb – fosfato. Assim, a associação destas Hbs pelo modulador teria por objetivo, *in vivo*, assegurar a liberação de O₂ para os tecidos.

O efeito de moduladores alostéricos tem sido discutido em termos da existência de sítios de ligação aos fosfatos na molécula. Assim, na hemoglobina humana, esse sítio, descrito por PERUTZ (1970), fica situado entre as duas cadeias β da hemoglobina e que por ligações eletrostáticas possibilita a ligação de fosfatos orgânicos. Eles fazem ponte salina com Val β1, His β2 e His β143 de uma cadeia β com a Lys β82 da outra cadeia β, o que resulta na diminuição da afinidade da molécula pelo oxigênio.

Em nossa amostra o IHP mostrou-se mais efetivo como modulador negativo. Os resultados dos experimentos de equilíbrio de O₂ para Hb na presença de IHP da maioria das espécies, as curvas e os valores na amplitude de efeito Bohr apresentam-se mais elevados, assim como os

valores de P_{50} próximos do pH fisiológico. Porém, para Hb de *D. rotundus* e *G. soricina*, a amplitude de efeito Bohr na presença de IHP mostra-se ligeiramente menor ou igual a encontrada na presença do 2,3-BPG. Vale a pena ressaltar que *M. ater* parece sofrer uma fraca modulação pelo IHP, pois apresenta valores de P_{50} em todos os pHs usados muito próximos dos demonstrados na presença do 2,3-BPG. Isto é intrigante, uma vez que inositois são fortes moduladores negativos da maioria das Hbs de mamíferos, mesmo não sendo este o modulador presente no sangue *in vivo*.

Estes resultados estão de acordo com os de GIARDINA *et al.* (1990), que estudando o hemolisado de *Rousettus aegyptiacus* verificaram que o mesmo também mostra aumento na amplitude de efeito Bohr quando comparadas a Hb “stripped” e Hb “stripped” + moduladores. CONDÒ *et al.* (1989), trabalhando com indivíduos da mesma espécie, relataram a baixa afinidade da Hb ao O_2 na presença de IHP. KLEINSCHMIDT *et al.* (1987) trabalhando com hemolisado de *Tadarida brasiliensis*, na presença e ausência de 2,3-BPG, verificaram um aumento dos valores de efeito Bohr e de P_{50} , ou seja, uma diminuição da afinidade da Hb ao O_2 . Diminuição na afinidade da hemoglobina ao oxigênio em outros mamíferos na presença do 2,3-BPG, em altitude moderada, também é demonstrado por NIKINMMA (2001).

Entretanto, a modulação pelo 2,3-BPG não ocorre em todas as Hbs de nossa amostra. *C. perspicillata* e *A. lituratus*, aparentemente mostraram um baixo efeito na afinidade ao O_2 pelo 2,3-BPG em alguns pH usados.

CONDÒ *et al.* (1989), estudando *Rousettus aegyptiacus*, relataram esta aparente não modulação pelo 2,3-BPG em quase todos os pHs por eles investigados. GIARDINA *et al.* (1990) obtiveram resultados semelhantes e observaram que a ligação da maioria das Hbs de mamíferos ao 2,3-BPG ocorre em sítios específicos, em pH neutro, envolvendo um conjunto de 8 resíduos de aminoácidos carregados positivamente, localizados nas cadeias β do tetrâmero da Hb. Estes autores sugerem ainda que a troca desses resíduos seria a base para o baixo efeito do 2,3-BPG na afinidade da Hb ao oxigênio nessas espécies.

Ao analisarmos as curvas de afinidade para os hemolisados, na ausência e na presença de moduladores para as dez espécies aqui estudadas, juntamente com os dados obtidos em sangue (método gasométrico), verificamos que a afinidade ao O₂ em sangue não pode ser explicado pelo efeito do 2,3-BPG.

P. discolor, *A. lituratus*, *N. laticaudatus* e *E. perotis* apresentaram efeito Bohr normal (igual aos obtidos *in vitro*, mas com valores diferentes). Apesar de demonstrarem hábito alimentar e estilos de vôo diferentes, as quatro espécies acima apresentam o mesmo comportamento para suas hemoglobinas.

Estes resultados estão de acordo com JOHANSEN & LENFANT (1972) onde relatam que aumento nos valores de logP₅₀, em pHs ácidos, abaixa a afinidade e promove um descarregamento de O₂ eficiente sendo este benéfico aos animais que possuem altas temperaturas corporais e atividades metabólicas. Ainda, a facilidade em liberar oxigênio nos tecidos em pHs mais ácidos é altamente adaptativo, especialmente para os músculos do vôo, pois estes apresentam alta demanda de energia durante a locomoção (VAN AARDT *et al.*, 2002).

Embora consideramos que *P. discolor* e *A. lituratus* efetuam curtos períodos de atividade intensa durante o forrageamento, *N. laticaudatus* e *E. perotis*, considerados forrageadores ativos, são capazes de sustentar esta atividade elevada durante um período maior (porém, diferentes entre eles). É possível que esta afinidade Hb-O₂ poderia servir para conservar energia quando estes animais estão inativos, fator importante para os morcegos quando a sua temperatura corporal também diminui (AREVALO *et al.*, 1991; MAINA, 2000).

G. soricina e *M. ater* apresentaram amplitude de efeito Bohr baixa ($\phi = -0,15$ e $\phi = 0,18$, respectivamente) em sangue, com valores de P₅₀ maiores do que os encontrados para as condições “stripped” e “stripped”+ 2,3-DPG. Este resultado está de acordo com o encontrado por JUNGENS *et al.* (1981) que também observaram, em cinco espécies de morcegos, valores de P₅₀ mais elevados em sangue total do que em Hb “stripped” e Hb

“stripped” + 2,3-BPG. Estes autores tentam explicar esses resultados como sendo uma adaptação a grande quantidade de O₂ requerida para suprir a energia necessária para seu modo de locomoção. Para *G. soricina*, sugerimos que o baixo efeito Bohr teria aqui também efeito benéfico, evitando que a afinidade em pH ácido diminua demais a ponto de prejudicar a afinidade ao O₂ da hemoglobina no sangue, pois estes animais apresentam um tipo de vôo pairado e atividade elevada durante o forrageamento, o que exige esforço físico continuado e com isto níveis de lactato podem aumentar significativamente, quando o oxigênio disponível não é suficiente para atender a todas as demandas do organismo.

Amplitudes semelhante, também foram relatadas por outros autores (SNYDER, 1976; KLEINSCHMIDT *et al.*, 1987; AREVALO *et al.*, 1991 e JUNGENS, *et al.*, 1981) que os relacionam com o peso corporal, ou seja, quanto menor o animal maior seria os valores de P₅₀. Essa relação parece não ocorrer nas nossas amostras. e pode ser observado nas tabelas 3.2 e 4.1.

C. perspicillata, *D. rotundus* e *M. molossus* apresentaram em sangue ausência de efeito Bohr ($\phi = -0,03$, $\phi = -0,05$ e $\phi = 0,08$, respectivamente). Porém, o efeito Bohr para as condições “stripped” e “stripped” + moduladores mostrou uma amplitude de ϕ considerável e baixa afinidade, o que torna difícil explicar o seu comportamento em sangue. Porém estes resultados também podem ser analisados como controles fisiológicos da respiração necessários para sustentar a atividade elevada durante o vôo. No entanto, não são possíveis comparações entre o comportamento obtido em sangue versus estilo de vôo para estas espécies, pois *M. molossus* apresenta um estilo de vôo planar (porém com tempo de forrageamento maior) o que sugere um menor gasto de energia se comparado com as outras duas espécies.

Tentamos correlacionar comportamento da Hb e o tipo de vôo, contudo não foi possível estabelecer nenhuma relação.

Ausência de efeito Bohr em sangue já foi relatada por SCHWANTES *et al.* (1992) em experimentos de equilíbrio de O₂ no sangue de *Geophagus*

brasiliensis, *Leporinus steindachneri* e *Hypostomus regani* (Pisces), provenientes de ambientes bem oxigenados. Quando suas Hbs “stripped” foram submetidas a experimentos de equilíbrio de O₂ apresentaram efeito Bohr normal e a adição de moduladores (ATP e GTP) incrementou este efeito (SILVA, 1987; ALMEIDA-VAL *et al.*, 1985; SCHWANTES *et al.*, 1991). Para explicar este fato, SCHWANTES *et al.* (1992), em *Geophagus brasiliensis*, mostraram que o pH eritrocítico interno (cuja a influência a molécula de Hb realmente responde) não é o mesmo que o pH externo medido e que é plotado contra os valores de P₅₀ para determinação do efeito Bohr.

PETERSEN *et al.* (1989), estudando um componente pouco anódico no peixe *Leporinus friderici*, também detectaram ausência de efeito Bohr sugerindo que Hbs pouco anódicas ou catódicas apresentam afinidades ao oxigênio independentes do pH.

JENSEN & WEBER (1985) argumentam que, fisiologicamente, como o sangue é um sistema de dois compartimentos, podem existir diferenças no sentido e/ou no tempo decorrido entre as trocas ácido – base extra/intracelulares. As reais conclusões com relação ao transporte de O₂ somente poderiam ser feitas levando-se em conta o valor do pH intracelular.

Estas comparações reforçam, para nós, a questão de que a adição de moduladores aumenta a amplitude do efeito Bohr, quando este é detectado como normal na condição “stripped”, e sugerem que um dos moduladores negativos presentes no sangue de morcegos é o 2,3-BPG (discutido a frente). Ainda, a ausência de efeito Bohr pode ser decorrente também da demanda de energia que é compensada por um ajuste na liberação do oxigênio, ou ainda este comportamento em sangue seria devido ao “stress” ao qual o animal foi submetido o que causa uma diminuição na concentração dos moduladores em sangue.

Outro fator intrigante observado nestes animais é com relação a *A planirostris* que mostrou no hemolisado “stripped” e com moduladores, efeito Bohr normal e, em sangue, este mostrou maior afinidade ao O₂, principalmente em pHs ácidos, ou seja, efeito Bohr reverso ($\phi = 0,69$) o que

é surpreendente, uma vez que casos de efeito Bohr reverso são relatados apenas para componentes isolados de Hb “stripped” de peixes. Resultados com *Schizodon nasutus* (Pisces) mostram que os fosfatos orgânicos modulam a afinidade de componentes catódicos, diminuindo assim sua afinidade drasticamente, como também, no caso dos componentes catódicos (efeito Bohr reverso) das enguias *Anguilla rostrata*, *A japonica* e *A anguilla* e em algumas espécies de peixes da Amazônia – *Pterygoplichthys pardalis*, *Haplosternun littorale* e *Millossoma sp* (GILLEN & RIGGS, 1973 ; BREEPOEL *et al*, 1980; BRUNORI *et al*, 1979; WEBER & WOOD, 1979; GARLICK *et al*, 1979; MARTIN *et al*, 1979 a ; SHIMADA *et al*. 1980; RIZZOTTI *et al*, 1987).

Este efeito Bohr reverso foi observado em sangue de 2 indivíduos coletados em ocasiões diferentes. Várias tentativas foram feitas para capturar outros indivíduos dessa espécie, porém sem sucesso. Esforços deverão ser realizados no sentido de esclarecer os fatores que determinaram esta situação e, assim, obtermos subsídios para entendermos a inversão do comportamento funcional do sangue em *A. planirostris*.

Segundo THOMAS (1987), a fração de oxigênio inspirado que é removido dos pulmões para propósitos metabólicos é influenciado não só pelas propriedades respiratórias do sangue, mas também pelo sistema de ventilação por vários parâmetros cardiovasculares, pelos batimentos cardíacos e a habilidade do sangue em transportar oxigênio para os tecidos. O mesmo autor, entretanto, afirma que estas considerações são especulativas e que estudos mais detalhados são necessários antes que possamos entender melhor a adaptação cardiorespiratória e os ajustes que permitam para estes animais satisfazer as altas exigências metabólicas requeridas para o voo.

Assim, como pudemos observar em sangue, todas as espécies, com exceção de *D. rotundus*, *C. perspicillata*, *M. molossus* e *A. planirostris*, apresentam efeito Bohr normal, porém com amplitudes e afinidades diferentes. Pequenas diferenças funcionais também são observadas para a Hb “stripped” das espécies estudadas. Com base nesses resultados, mais as

semelhanças de comportamento funcional da Hb e a ausência de variabilidade intraespecífica e interespecífica, apresentada em eletroforese, sugerimos que a diferença encontrada entre as espécies esteja presente nos sítios de ligação da Hb aos moduladores.

5.3 VALORES DE “n” PARA AS Hbs “STRIPPED”, Hbs “STRIPPED”+ MODULADORES E EM SANGUE TOTAL

Ao avaliarmos os valores de “n” em todos os pHs nas hemoglobinas, sem e com modulador, das dez espécies em estudo constatamos uma nuvem de pontos que hora demonstra valores de “n” próximos de 1 e hora próximos de 2. Entretanto, em todos os casos, os valores de “n” foram acima de 1,0 ($n > 1,0$) indicando presença de cooperatividade.

Para a condição Hb “stripped”+2,3-BPG, *A. lituratus* e *G. soricina*, apresentou valor de $n < 1,0$ o que indica uma não cooperatividade entre os sítios ligantes da molécula. Para as demais espécies, os valores de “n” foram acima de 1,0 ($n > 1,0$) indicando presença de cooperatividade para condição “stripped” + 2,3-BPG (Tabela 4.1). Porém, se compararmos os valores de “n” para estas espécies na condição “stripped” e “stripped +2,3-BPG verificamos que, apesar de serem todos acima de 1, os valores de “n” encontrados para *P. discolor*, *D. rotundus*, *M. ater*, *N. laticaudatus* e *E. perotis* demonstram-se menores que os encontrados na condição “stripped” (Tabela 4.1).

Os valores de “n” para a condição Hb “stripped” + IHP foram acima de 1,0 ($n > 1,0$) indicando presença de cooperatividade (Tabela 4.1). Apenas *A. planirostris*, *D. rotundus* e *M. ater* apresentaram valores de “n” menores que o encontrado para a condição “stripped”+2,3-BPG. Para as demais espécies, os valores de “n” foram acima de 1,0 ($n > 1,0$), conforme Tabela 4.1.

É interessante observar que, em pH fisiológico, com exceção de *A. planirostris*, o 2,3-BPG parece diminuir os valores de “n”, em relação à Hb “stripped”. Somente em *C. perspicillata* o IHP parece aumentar a

cooperatividade quando comparado com o valor encontrado em sangue, Hb “stripped” e Hb “stripped” + 2,3-BPG. CONDÒ *et al.* (1989), estudando *Rousettus aegyptiacus*, também obtiveram valores de “n” maiores que 1,0 para a condição “stripped”. Ainda, suas Hbs também mostraram valores de “n” maior que 1,0 na condição Hb “stripped” + moduladores, o que também é verdade para alguns de nossos indivíduos. KLEINSCHMIDT *et al.* (1987), em *Tadarida brasiliensis*, também haviam demonstrado valores de “n” maior que 1,0 nas condições Hb “stripped” e Hb “stripped” + 2,3-BPG.

A dependência da cooperatividade no sangue em relação a faixa total de pHs e ao pH fisiológico nas espécies estudadas, com exceção de *M. ater*, apresentou $n > 1,0$ indicando presença de cooperatividade para tal condição e coincidindo com os resultados encontrados por JUNGERNS, *et al.* (1981).

5.4 FOSFATOS ORGÂNICOS (2,3-BPG) E Ht

A afinidade Hb-O₂ é regulada também por fosfatos orgânicos, como o 2,3-BPG, que diminui a afinidade Hb-O₂. O 2,3-BPG fosfato orgânico muito aniônico, está presente nas hemácias de todos os mamíferos, aproximadamente na mesma concentração molar da Hb. Ele liga-se a desoxihemoglobina permitindo que a Hb libere O₂ ao nível de tecidos.

Nas células vermelhas dos animais aqui estudados, demonstramos níveis de 2,3-BPG, embora algumas espécies apresentam pouco efeito do modulador sobre sua Hb “stripped”, este foi o único fosfato encontrado no sangue destes animais. Então, para explicar o comportamento da Hb no sangue de algumas de nossas espécies, desconfiamos que outro modulador esteja presente nas células vermelhas destes animais, embora não conseguimos identificá-lo.

Concentração de 2,3-BPG nos eritrócitos destes morcegos são altos, porém valores semelhantes são também demonstrados por JUNGERNS *et al.* (1981) para outras espécies de morcegos e também para mamíferos terrestres de tamanhos similares.

Níveis altos de 2,3-BPG no sangue de morcegos podem ser considerados adaptativas pois esse modulador reduz a afinidade ao oxigênio, não somente por satisfazer a alta demanda relativa de O₂ associado ao pequeno peso corporal e a alta taxa metabólica massa-específica, mas também realçando a transferência de oxigênio para a alta performance dos tecidos como o músculo das asas durante vôo sustentado (VAN AARDT *et al.*, 2002; NIKINMAA, 2001).

Valores de hematócrito também foram observados para estes animais. A determinação deste dado hematológico foi feita para que cálculos sobre a concentração de fosfatos pudessem ser realizados.

Porém para podermos discutir os valores aqui demonstrados, outros dados hematológicos deveriam ter sido realizados, mas como a quantidade de sangue aqui obtida foi pequena, ficamos impossibilitados de realizar outros estudos.

No entanto, os valores de hematócritos encontrados para nossas espécies é semelhante àqueles encontrados para outras espécies de morcegos. VAN AARDT *et al.* (2002) apresentam 10 indivíduos de *Tadarida aegyptiaca* com uma média de valores de Ht de 56,9%. BUFFENSTEIN *et al.* (1999) demonstram valores de Ht de 47 - 63% para o molossideo *Mops condylurus*. AREVALO *et al.* (1987) relatam variação de Ht de 48 - 70% para 5 diferentes espécies de morcegos insetívoros e JUNGENS *et al.* (1981) que também demonstram Ht para 5 espécies de morcegos, numa variação de 51 - 63%. Mas o valor mais alto, até o momento, relatado para morcegos foi encontrado por BLACK & WINEDERHIELM (1976) para *T. brasiliensis*, com um valor de Ht de 75%.

Entretanto, estes autores também determinam outros dados hematológicos e com base neste sugerem que o aumento nos valores de hematócrito causa uma redução no consumo de oxigênio e que pode ser uma estratégia adaptativa adequada para o suprimento de oxigênio (AREVALO *et al.*, 1987; VAN AARDT *et al.*, 2002). Ainda, alto hematócrito associado com aumento na concentração de hemoglobina e conteúdo de eritrócitos pode aumentar a capacidade de transportar o oxigênio quando

comparado com a alta demanda de oxigênio em vôos prolongados de morcegos (VAN AARDT *et al.*, 2002). Este mesmo autor também sugere que a liberação adequada de oxigênio para os tecidos com alta demanda metabólica durante o vôo é facilitada primeiramente pelo hematócrito que é feito possivelmente por uma circulação periférica única em morcegos, e a redução do pH do sangue é aumentado em resposta com níveis elevados de metabolismo assim como de 2,3-BPG e CO₂.

Hemoglobinas de morcegos parecem ser um interessante modelo e, embora nenhuma diferença no número e mobilidade dos componentes puderam ser observadas na eletroforese, as afinidade aos efetores alostéricos mostraram-se diferentes nas Hb destas 10 espécies estudadas.

CONCLUSÕES

1. Todos os exemplares estudados mostraram o mesmo padrão eletroforético, ou seja, não foi mostrada variação intraespecífica e interespecífica.

2. Em experimentos com Hb “stripped” na ausência de moduladores, foi encontrado efeito Bohr normal para todas as espécies e alta afinidade Hb-O₂, havendo pouca diferença de comportamento funcional entre as espécies estudadas.

3. 2,3-BPG, não mostrou-se efetivo como modulador negativo para todas as espécies, havendo casos (*C. perspicillata* e *A. lituratus*) em que a Hb apresentou baixa sensibilidade a este modulador. Ao contrário, o IHP mostrou-se efetivo em todas as espécies onde, efeito Bohr foi normal e sua amplitude aumentou na presença desse modulador, com exceção de *M. ater*.

4. Em sangue foi detectado efeito Bohr normal em *P. discolor*, *A. lituratus*, *N. latycaudatus* e *E. perotis*, amplitude baixa de efeito Bohr em *G. soricina* e *M. ater*, efeito Bohr nulo em *C. perspicillata*, *D. rotundus* e *M. molossus*, bem como, efeito Bohr reverso em *A. planirostris*. Em todos os casos, suas Hbs stripped mostraram efeito Bohr normal na ausência e na

presença de moduladores reforçando para nós a questão de que a adição de moduladores modificam a forma e a amplitude do efeito Bohr e sugerindo para a presença de efeito Bohr nulo que, uma diferença de pH interno e externo deva existir, onde o pH interno não é o mesmo que o pH externo medido e usado para determinar o efeito Bohr

5. Resultados obtidos em equilíbrio de oxigenação da Hb “stripped” na presença de 2,3-BPG, para as dez espécies estudadas, não explicam satisfatoriamente os resultados encontrados em sangue.

6. A dosagem de 2,3-BPG intraeritrocitário mostrou valores superiores encontrada na maioria dos mamíferos. Não foi detectada a presença de inositois polifosfatados nos eritrócitos das dez espécies estudadas.

7. Nossos dados não mostraram correlação entre estilos de vôo e hábito alimentar com as propriedades funcionais das Hb estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G.M. Bats. Cambridge: Massachusetts, Harvard University. Press. p 368, 1939.

ALMEIDA-VAL, V.M.F., SCHWANTES, A.R., and VAL, A.L. Eletrophoretic patterns of hemoglobin and oxygen binding properties of blood of Anostomidae fishes from Paraná-Pardo-Grande basin (São Paulo State, Brazil). *J. Exp. Zool.*, v. 235; p. 21-26, 1985.

ANTONINI, E. and BRUNONI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland Research Monographs. Fronties of Biology. North-Holland Publ. Co. Amsterdan-London. p 435, 1971

ARÉVALO, F., PÉREZ-SUÁREZ, G. and LÓPEZ-LUNA, P. Hematological data and hemoglobin components in bats (Vespertilionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A.(3): p.447 – 450, 1987.

ARÉVALO, F., PÉREZ-SUÁREZ, G. and LÓPEZ-LUNA, P. Oxygen-binding properties of bat hemoglobins. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. v. 99: p. 77-81, 1991.

AYALA, F. J. Evolution of fitness in experimental populations of *Drosophila serrata*. *Science*. v. 150: p. 903-905, 1965.

AYALA, F. J. Genotype, environment and populations number. *Science*. v. 162: p. 1453-1459, 1968

AYALA, F. J. Evolutions of fitness. V. Rate of evolution in irradiated populations of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. v. 63 (3): p. 790-793, 1969.

AYALA, F. J., GILPIN, M. E. Gene frequency comparisons between taxa: support for the natural selection of protein polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 71: p. 4847-4849, 1974.

AYALA, F. J. The mechanism of evolution. *Scientific American*, v. 9: p. 48-61, 1978

BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466 – 468, 1959.

BARTLETT, G. R. Phosphate compounds in red cells of reptiles, amphibians and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 55A: p. 211-214, 1976.

BARTLETT, G. R. Phosphate compounds in reptilian e avian red blood cells developmental changes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 61A: p. 191-202, 1978.

BARTLETT, G. R. Phosphate compounds in vertebrate red blood cells. *Amer. Zool.*, v. 20: p. 103-114, 1980

BARTLETT, G. R. Phosphates in red cells of a Hagfish and Lamprey. *Comp Biochem. Physiol.* v.73A: p. 141-145, 1982 a.

BARTLETT, G. R. Diphosphoglycerate in vertebrate red cells - where and how. Reunião Anual da Federation of American Societies for Experimental Biology, N. Orleans, Lo., 1982 b.

BARTLETT, G. R. Developmental changes of phosphates in red cells of the Emu and the Rhea. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 73A: p. 129-134, 1982 c.

BLACK, L.L. & WIEDERHIELM, C.A. Plasma osmotic pressures and haematocrit in the intact, anaesthetized bat. *Microvascular Research.* 12: p.55 – 58. 1976.

BOHR, C., HOASSELBALCH, K. A., KROGH, A. Über einen in biologischer Begiehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ubt. *Skand. Arch. Physiol.*, v. 16: p. 402-412, 1904.

BREEPOEL, P. M.; KREUZER, F. & HAZEVOET, M. Studies of the hemoglobins of the eel (*Anguilla anguilla* L.) II. Proton binding of a component with a negative Bohr effect. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65:225-230, 1980.

BRUNORI M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI JR., A. ; GALDAMES PORTUS, M. T. & WILSON, M. T. Separation and characterization of the hemoglobin components of *Pterygloplichthys paradlis*, the acaribodo. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 62A : 173-177. 1979.

BUFFENSTEIN, R., BRONNER, G.N. & MALONEY, S.K. Seasonal and daily variation in blood and urine concentrations of free-ranging Angolan free-tailed bats (*Mops condylurus*) in hot roosts in southern Africa. *South African Journal of Zoology.* 34: p. 11 – 18, 1999.

BUNN, H. F. Differences in certain interaction of 2,3 Diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science*, v. 172: p. 1049-1050, 1971.

CONDÒ, S.G. EL-SHERBINI, S., SHFHATA, Y.M., CORDA, M., PELLEGRINI, M.G., BRIX, O. and GIARDINA, B. Hemoglobins from bats (*Myotis myotis* e *Rousettus aegyptiacus*): A possible example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 370: p. 861-867, 1989.

DAVIS, W. B. Geographic variation in the fishing bat, *Noctilio leporinus*. *J. Mamm.*, v. 54: p. 862-874, 1973.

DAVIS, W. B. Geographic variation in the lesser Noctilio, *Noctilio albiventris* (Chiroptera). *J. Mamm.*, v. 57: p. 687-707, 1976.

GARDNER, A. L. Feeding habits. *Spec. Publ. Mus.*, v. 13: p. 293-350, 1977.

GARLICK, R. L.; BUNN, H. F.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; MARTIN, J. P.; NOBLE, R. W. & POWERS, D. A .. Functional studies on separated hemoglobin components of air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.62A: p219-226, 1979.

GIARDINA, B., COLOSIMO, A., PETRUZZELLI, R., CERRONI, L. and CONDÒ, S.G. Interaction of hemoglobin with chloride and 2,3-bisphosphoglycerate. *Eur. J. Biochem.*, v. 194: p. 61-65, 1990.

GILLEN, R. G. & RIGGS, A. Structure and function of isolated hemoglobins of the American eel, *Anguilla rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 248: p.1961-1969, 1973..

GLASS, B. P. Feeding mechanisms of bats. In: "About bats". (Bob H. Slaughter and Dan W. Walton, eds). Southern Methodist University Press. Dallas, p. 84-92, 1970.

GREANEY, G.S & POWERS, D.A. Allosteric modifiers of fish hemoglobins: in vitro and in vivo studies of the effect of ambient oxygen and pH on erythrocyte ATP concentrations. *J. Exp. Zool.* v 203: p 339 – 350, 1978.

HOCHACHKA, P.W. and SOMERO, G.N. Strategies of biochemical adaptation. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1973.

HOCHACHKA, P.W. and SOMERO, G.N. Biochemical adaptation. Princeton, University Press, New Jersey, 1984. 537 p.

IMAI, K. Analysis of ligand binding equilibria. *Meth. Enz.*, v. 76: p. 470-486, 1981.

ISAACKS, R. E. and HARKNESS, D. R. 2,3 Diphosphoglycerate in erythrocytes of chick embryos. *Science*, v 189: p. 393-394, 1975.

ISAACKS, R. E., HARKNESS, D. R., COLLIER, J. L., KIM, C. Y., GOLDMAN, P. H. and ROTH, S. Studies on avian erythrocyte metabolism. V. relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and whole blood oxygen affinity in embryos and adults of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). *Poultry Sci.*, v. 55: p. 1788 - 1794, 1976 .

JENSEN, F.B. and WEBER, R.E.. Kinetics of acclimational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia. II. Extra and intracellular acid-base status in the blood. *J. Comp. Physiol.* v.156B: 205 – 211. 1985.

JEPSEN, G.L.. Bat origins and evolution. In: "Biology of bats" vol I. (William A. Winsatt, ed). Academic Press, New York, p.01 - 62, 1970.

JOHANSEN, K. and LENFANT, C.A. Comparative approach to the adaptability of Hb-O₂ affinity of hemoglobin and red cell acid-base status. In: Astrup, P. and Routh, M. (eds). Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid-base status. *Acad. Press. Munksgaard*, Copenhagen, Denmark. p.750-780. 1972.

JOHANSEN, K., MANGUN, C.P. and LIKKEBOE, G. Respiratory properties of the blood of Amazonian fishes. *Can. J. Zool.* v. 56: p. 898-906, 1978

JONES, JÚNIOR, J. K. & CARTER, D. C. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. *Spec. Publ. Mus.*, v. 10: p. 7-38, 1976.

JUNGENS, J.D., BARTELS, H. & BARTELS, R. Blood oxygen transport and organ weights of small bats and small non-flying mammals. *Respiration Physiology* 45: p. 243 – 260, 1981.

KILMARTIN, J. V. & ROSSI-BERNARDI, L. Inhibition of CO₂ combination and resolution of the Bohr effect in haemoglobin chemically modified at its α -amino groups. *Nature* v.222: p.1243 – 1246. 1969.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, v. 217: p. 624-626, 1968.

KIMURA, M. and OHTA, T. Protein polymorphism as phase of molecular evolution. *Nature*, v. 229: p. 467-469, 1971.

KLEINSCHMIDT, T. and BRAUNITZER G. Die primärstruktur des hamoglobins vom agyptischen fleyhund (*Rousettus aegyptiacus*, Chiroptera). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* v. 363, p. 1209-1215, 1982

KLEINSCHMIDT, T., KOOP, B. and BRAUNITZER, G. The primary structure of a mouse-eared bat (*Myotis velifer*, Chiroptera) hemoglobin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 367: p. 1243-1249, 1986.

KLEINSCHMIDT, T., RUCKNAGEL, K. P., WEBER, R. E., KOOP, B. F. and BRAUNITZER, G. Primary structure and functional properties of the hemoglobin from the free-tailed bat *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 368: p. 681-690, 1987.

KOOPMAN, K. F. A synopsis of the families of bats. *Bat. Res. News*, v. 25: p. 25-29, 1984.

MAINA, J.N. What it takes to fly: the structural and functional respiratory refinements in birds and bats. *J. Exp. Biol.* 203: p. 3045 – 3064, 2000.

MANWELL, C. and KERST, K. V. Possibilities of biochemical taxonomy of bats using hemoglobin, lactate dehydrogenase, esterases and other proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* v 17: p. 741 – 754, 1966.

MARKERT, C. L., SHAKLEE and J. B., WHITT, G. S. Evolution a gene. *Science*, V. 188: p. 102-114, 1975.

MARTIN, J. P.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; GARLICK, R. L.; POWERS D. A. and WILSON, M. T. The isolation and characterization of the hemoglobin components of *Mylossoma sp.*, na Amazonian teleost. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: p.207-212, 1979

McFARLAND, W.N. and WINSATT, W.A. Renal function and its relation to the ecology of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 28: p. 985-1006. 1969.

NIKINMAA, M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Resp. Physiol.* 128: p. 317 – 329, 2001.

NOWAK, R.M. “*Walker’s mammals of the world*”. vol. I, 5 th ed. The Johns Hopkins Press Ltd., London, p.641, 1991.

OHNO, S. *Evolution by gene duplication*. Springer - Verlag. New York. 1970

ORR, R.T. Development: prenatal and posnatal. In: “Biology of bats” vol. I. (William A. Winsatt, ed). Academic Press, New York, p.217 - 230, 1970.

PADIAN, K. A comparative phylogenetic and functional approach to the origin of vertebrate flight. In *Recent Advances in the Study of bats* (M.B. Fenton, P. Racey & J.M.V. Rayner, eds). Cambridge Univ. Press. , Cambridge. I- xii+470, p. 3 - 22.,1987.

PERUTZ, M. F. A molécula de hemoglobina. In: *A base molecular da vida. Scientific American*. Ed. USP e Ed. Polígono. p. 37-50, 1964.

PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.G.; MATHEWS, F.S.; MACGANDY, D.L. and WEBB, L.E. Three dimensional fourier synthesis of horse oxyhemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature*, v 219, p.131 - 156. 1968a.

PERUTZ, M. F.; MUIRHAD, H.; COX, J. M.; GOAMAN, L. C. G.; MATHEWS, F. S.; MACGANDY, D. L. and WEBB, L. E. Three dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: (1) x- ray analysis. *Nature*, v 219, p. 29 – 46, 1968 b.

PERUTZ, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* v. 228, p.726 – 734, 1970.

PETERSEN, C.G., SCHWANTES, A. R., DE LUCA, P. H. and SCHWANTES, M.L.B. Functional properties of the two major hemoglobins components from *Leporinus friderici* (Pisces). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 94B: p.823-827, 1989.

POWERS, D.A. Structure, function e molecular ecology of fish hemoglobins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 241: p. 472-490, 1974

REINOSO, S.S. hemoglobinas de Chiroptera (Mammalia). Universidade Federal de São Carlos. Dissertação de Mestrado. p. 60, 1998.

RIGGS, A. and WOLBACK, R. A. Sulfhydryl groups and structure of hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, v. 39: p. 585-605, 1956

RIGGS, A. Molecular control of hemoglobin function. In: Kun, E. & Grisolia, S (eds). *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells*. John Wiley & Sons. Inc. p. 1-31, 1972

RIGGS, A. Factors in the evolutions of hemoglobin fuction. *Fedn. Proc*, v. 35: p. 2115-2118, 1976.

RIGGS, A. F. Hemoglonins. *Current Opnion in structural Biology*. v.1: p 915 – 921. 1991.

RIZZOTTI, M.; PAGNI, S.; PAVANI, M.; PRETO, P. and RODINÓ, E. The hemoglobins of *Anguilla anguilla* (L.) II . Polipeptide constitution. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B: 15-21, 1987.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia animal*. Edgar Blucher Ltda, 1972

SCHWANTES, A.R. *Hemoglobinas e Haptoglobinas em serpentes (Squamata - Reptilia)*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, 1972.

SCHWANTES, A.R. BARTLETT, R.G. and SCHWANTES, M.L.B. The hemoglobin of *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* v.99b.: p. 157 – 160, 1991.

SCHWANTES, A.R., LIMA, I.B.T. and SCHWANTES, M.L.B. Functional properties of fish hemoglobins in erythrocytes and in solution. In “*The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life*”. CRC PRESS, INC., p. 188 –193, 1992

SELANDER, R.K. Genic variation in natural populations in *Molecular Evolution* by Francisco J. Ayala. Sinauer Ass. in Publishers. Sunderland, Massachussets, 1977.

SGOUROS, G.J., KLEINSCHMIDT, T., and BRAUNITZER, G. The primary structure of the hemoglobin of an indian flying fox (*Cynopterus sphinx*, Megachiroptera). *Biol. Chem. Hoppe - Seyler.*, v. 386: p. 675-680, 1987.

SHIMADA, T.; OKIHAMA, Y.; OKAZAKI, T. & SHUKUIA, R. The multiple hemoglobins of the japanese eel, *Anguilla japonica*. Molecular basis for hemoglobin multiplicity and the subunit interactions. *J. Biol. Chem.*, 225: 7912-7917, 1980.

SILVA, A. T. Ecologia Molecular de Hemoglobinas de *Leporinus steindachnei* (Ergnmann, 1907) (Anostomidae Characiformes) de lagos do Vale do Rio doce, M.G. Universidade Federal de São Carlos, 1987. Dissertação de Mestrado.

SINGER, G.A.M., KLEINSCHMIDT, T. PETTIGREW, J. and BRAUNITZER, G. The primary structure of the hemoglobin from the Australian ghost bat (*Macroderma gigas*, Microchiroptera). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* v. 372: p.1089 – 1095, 1991.

SINGER, G.A.M., KLEINSCHMIDT, T. PETTIGREW, J. and BRAUNITZER, G. The primary structure of the hemoglobin from the Australian ghost bat (*Taphozous geogianus*, Microchiroptera) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, v. 373: p.937-942, 1992.

SINGER, G.A.M., KLEINSCHMIDT, T. and BRAUNITZER, G. The primary structure of the hemoglobin from the lobe-lipped bat (*Chalinolobus morio*, Microchiroptera). *Biol.Chem. Hoppe-Seyler.* v378, p. 603 – 609, 1995.

SMITH, J.D. Chiroptera evolution. *Spec. Publ. Mus.*, Texas Tech Univ., v. 10: p. 49-69, 1976

SMITHIES, O. An improved procedure for starch gel eletrophoresis. *Bio.Chem. J.*, v. 71: p. 585-87, 1959.

SNYDER, G.K. Respiratory characteristics of whole blood and selected aspects of circulatory physiology in the common short-nosed fruit bat, *Cynopterus brachyotis*. *Respiration Physiology*, v. 28: p. 239-247, 1976.

SOSKIC, V., KLEINSCHMIDT, T., BRAUNITZER, G. The primary structure of the hemoglobin from the bat *Macrotus californicus* (Chiroptera). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 368: p. 199-204, 1987.

STRYER, L. Bioquímica. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro- R.J. p.861, 1992.

TADDEI, V. *Phyllostomidae da região Norte-ocidental do Estado de São Paulo*. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de São José do Rio Preto. 1973. 249 p. Tese de Doutorado

TADDEI, V. A. Morcegos. Algumas considerações sistemáticas e biológicas. *Bol. Tec. Cati.*, Campinas, v. 172: p. 1-30, 1983.

THOMAS, S. P. The physiology of bats flight. In *Recent Advances in the Study of bats* (M.B. Fenton, P. Racey & J.M.V. Rayner, eds). Cambridge Univ. Press. , Cambridge. I-xii+470, p. 75 - 95, 1987.

VAL. A. L., *et al.* Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. *Ciência e cultura*, v. 33 (7): p. 992-96, 1981.

VALDIVIESO, D., TAMISITT, J.R. Eletrophoretic properties of neotropical bat hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 117 – 122, 1969.

VAN AARDT, W.J., BRONNER, G. N. and NECKER, M.L de. Oxygen dissociation curves of whole blood from the Egyptian free-tailed bat, *Tadarida aegyptiaca*. E. Geoffroy, using a thin-layer optical cell. *African Zool.*, 37(1), p. 109 – 113, 2002.

VARELLA-GARCIA, M. V.; TADDEI, V. A. Citogenética de quiropteros: métodos e aplicações. *Rev. Brasil. Zool.*, v. 6: p. 297-323, 1989.

VAUGHAN, T.A.. Adaptations for flight in bats. In: "About bats". (Bob H. Slaughter and Dan W. Walton, eds). Southern Methodist University Press. Dallas, p. 127 - 143, 1970a.

VAUGHAN, T.A.. Flight patterns and aerodynamic. In: "Biology of bats" vol I. (William A. Winsatt, ed). Academic Press, New York, p.195 – 215, 1970.

VIZOTTO, L. D. & TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Bol. Ciênc.*, v. 1: p. 1-72, 1973.

WEBER, R. E. & WOOD, S. C. Effects of erythrocytic nucleoside triphosphates on oxygen equilibria of composite and fractionated hemoglobins from the facultative air-breathing Amazonian catfish, *Hypostomus* and *Pterygoplichthys*. *Comp. Biochem. Physiol.*v62A:179-183, 1979.

WINTROBE, M.M. *Clinical hematology*, 17^a ed., Lea and Febriger, Philadelphia, v.1, p.1896, 1974