

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA  
UFSCar/UNESP**

**ESTUDOS HEMATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL  
E FUNCIONAL DAS HEMOGLOBINAS DO PEIXE PULMONADO  
*Lepidosiren paradoxa* (DIPNOI, FITZINGER, 1837) E DO PEIXE DE  
RESPIRAÇÃO AÉREA FACULTATIVA *Hoplerythrinus unitaeniatus*  
(CHARACIFORMES, SPIX, 1829)**

**HUGO RIBEIRO DA SILVA**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCar/UNESP do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

São Carlos - SP  
2011

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

S586eh

Silva, Hugo Ribeiro da.

Estudos hematológicos e caracterização estrutural e funcional das hemoglobinas do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi, Fitzinger, 1837) e do peixe de respiração aérea facultativa *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Spix, 1829) / Hugo Ribeiro da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
157 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Fisiologia. 2. Eritrócitos. 3. Leucócitos. 4. Efeito Bohr. 5. Efeito Root. 6. Trombócitos. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

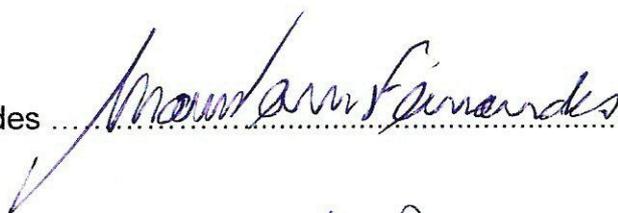
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

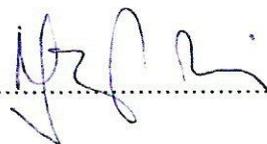
Defesa de Tese de Hugo Ribeiro da Silva

Dia 01/08/2011

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Narciso Fernandes



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José Tavares Ranzani de Paiva



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Kalinin



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleoni dos Santos Carvalho



Prof. Dr. Mogens Lesner Glass



*“Foi castigado por nossos crimes, e esmagado por nossas iniquidades; o castigo que nos salva pesou sobre ele, fomos curados graças às suas chagas.”*

*Isaias 53*

*Dedico Especialmente*

*Aos meus pais Waldemar e Rosa Adelina, pelo exemplo de vida e amor incondicional.*

*À minha esposa Ana Elisa pelo amor, dedicação e apoio, estando presente em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa Narciso Fernandes, minha orientadora, pela oportunidade de trabalho, orientação, amizade e sobretudo pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Arno Rudi Schwantes e a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza B. Schwantes, por terem permitido o uso de seu laboratório para realização de parte dos experimentos e pela amizade.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UFSCar/UNESP.

Ao meu grande amigo Prof. André Cruz, que com dedicação contribuiu diretamente no desenvolvimento deste trabalho, pela sincera amizade, meus profundos agradecimentos.

Aos amigos Prof. Guilherme H. D. Pinheiro, Prof. Wallice Luiz P. Ducan, Prof. Cleverson Agner Ramos que em nenhum momento pouparam esforços, para a concretização deste trabalho, obrigado por tudo.

À amiga Prof<sup>ª</sup>. Diana Monteiro, pela grande ajuda e companheirismo.

Aos amigos de laboratório, Fábio, Marcelo, Fabiano, Marise e Helen.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação, pela colaboração e gentileza.

A todos os professores e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas, pela convivência e cordialidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao meu tio João Américo e minha avó Aparecida (*in memorian*), pessoas especiais que sempre me apoiaram.

A DEUS, Todo Poderoso, que me deu a vida.

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	1
-----------------	---

### INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO .....	1
Considerações sobre as espécies.....	5
<i>Lepidosiren paradoxa</i> – Pirambóia.....	5
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> .....	8
OBJETIVOS.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
CAPÍTULO 2 .....	19

### VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DO PEIXE PULMONADO *Lepidosiren paradoxa* (DIPNOI, FITZINGER, 1837) E DO PEIXE DE RESPIRAÇÃO AÉREA FACULTATIVA *Hoplerythrinus unitaeniatus* (CHARACIFORMES, SPIX, 1829)

Resumo.....	19
INTRODUÇÃO .....	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Animais experimentais.....	26
Sangue .....	27
Análises hematológicas.....	27
Análise biométrica das células sanguíneas.....	27
Hematócrito (Hct).....	28
Contagem de eritrócitos (RBC) .....	28
Concentração de hemoglobinas [Hb] .....	28

Índices hematimétricos.....	29
Contagem de trombócitos e leucócitos.....	29
Análises plasmáticas.....	29
Íons plasmáticos.....	30
Concentração de glicose.....	30
Proteínas totais plasmática.....	31
Osmolalidade .....	31
Análise estatística.....	31
RESULTADOS.....	31
Células sanguíneas.....	31
Variáveis eritrocitárias e pH sanguíneo.....	37
Trombócitos e leucócitos.....	38
Variáveis fisiológicas e bioquímicas.....	40
DISCUSSÃO.....	41
Variáveis eritrocitárias .....	41
Trombócitos e leucócitos .....	50
Variáveis plasmática .....	59
Conclusões.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CAPÍTULO 3.....	84
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DAS HEMOGLOBINAS DO PEIXE PULMONADO <i>Lepidosiren paradoxa</i> (DIPNOI, FITZINGER, 1837) E DO PEIXE DE RESPIRAÇÃO AÉREA FACULTATIVA <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (CHARACIFORMES, SPIX, 1829).	
Resumo .....	84
INTRODUÇÃO.....	85

Hemoglobina .....	85
Hemoglobinas de peixes .....	88
MATERIAIS E MÉTODOS .....	91
Animais experimentais .....	91
Amostras de sangue e obtenção da solução de Hb .....	92
Extração de fosfatos orgânicos intraeritrocitários .....	93
Eletroforese em gel de amido .....	93
Transparentização .....	95
Equilíbrio de oxigenação em sangue: método gasométrico .....	95
Hemoglobina <i>stripped</i> e redução de metahemoglobina .....	96
Equilíbrio de oxigenação: método espectrofotométrico .....	97
Adição de fosfatos orgânicos e NaCl.....	99
Titulação com IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG .....	100
Titulação com NaCl .....	100
Análise espectrofotométrica de curvas parciais de oxigenação - Efeito Root .....	100
Determinação de fosfatos intraeritrocitários .....	101
Fosfatos orgânicos – nucleotídeos .....	101
Determinação de inositolis .....	102
Determinação de 2,3-BPG .....	103
Análise estatística .....	104
RESULTADOS .....	104
Componentes hemoglobínicos.....	104
Estudos funcionais .....	107
<i>Lepidosiren paradoxa</i> .....	107
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> .....	108

Comparação entre o comportamento funcional hemoglobínico de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> .....	108
Efeito das concentrações de fosfatos orgânicos nas Hbs <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> .....	119
Comparação entre os experimentos de titulação das 2 espécies estudadas.....	119
Efeito Root .....	124
Fosfatos intraeritrocitários - dosagem 2,3-BPG, nucleotídeos e inositóis .....	125
DISCUSSÃO .....	127
Padrão eletroforético.....	127
Comportamento funcional das Hbs de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> .....	131
Equilíbrio de oxigenação em sangue total e <i>stripped</i> .....	131
Equilíbrio de oxigenação com adição de fosfatos e NaCl.....	136
Coeficiente de Hill (n).....	142
Efeito Root.....	143
CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Exemplares adultos de *Lepidosiren paradoxa* - Pirambóia (FITZINGER, 1837), no tanque de aclimatação. (Foto: Wallace Luiz P. Ducan).....8
- Figura 2** - Exemplar adulto de *Hoplerythrinus unitaeniatus* - Jeju (SPIX, 1829), no tanque de aclimatação. (Foto: Sandro E. Moron).....10

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Sistema de vetores teste utilizados para marcação dos limites dos núcleos e das células. Os quatro raios marcados a partir das proximidades do centro do núcleo determinam os valores biométricos (volume, diâmetro maior e diâmetro menor), (a) eritrócito e (b) eosinófilo. Barra de 10µm.....28
- Figura 2** – Extensões sanguíneas para contagem de eritrócitos, trombócitos e leucócitos em *L. paradoxa* (A1) e *H. unitaeniatus* (A2). Retículo da câmara de Neubauer para contagem de eritrócitos em *L. paradoxa* (B1) e *H. unitaeniatus* (B2). Objetiva 10x ....33
- Figura 3** - Fotomicrografia das células do sangue periférico de *L. paradoxa*, (a) eritrócitos, (b) eritroblasto, (c) trombócito (d) linfócito, (e) eosinófilo, (f) neutrófilo, (g) monócito e (h) basófilo. Barra de 10µm .....33
- Figura 4** - Fotomicrografia das células do sangue periférico de *H. unitaeniatus*, (a) eritrócito, (b) eritroblasto, (c) trombócitos (d) linfócito, (e) neutrófilo, (f) monócito. Barra de 10µm .....33

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Representação da estrutura da hemoglobina, apresentando suas quatro cadeias polipeptídicas (globinas), cada uma ligada a um grupo heme (MOYES e SCHULTE, 2010).....86
- Figura 2** - Fotografia do gel e representação esquemática dos padrões eletroforéticos das Hbs de *L. paradoxa*, comparativamente a humana (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>). Tampão Tris-Borato EDTA ácido 0,036 M pH 8,60 (gel); Tampão Borato 0,35 M pH 8,6 na ponte (n = 10).....106
- Figura 3** - Fotografia do gel e representação esquemática dos padrões eletroforéticos das Hbs de *H. unitaeniatus*, comparativamente a humana (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>). Tampão Tris-Borato EDTA ácido 0,036 M pH 8,6 (gel); Tampão Borato 0,35 M pH 8,60 na ponte (n = 10).....106

<b>Figura 4</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> na presença de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, à 40°C, 21°C, 4°C e em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	110
<b>Figura 5</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> na presença de IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	110
<b>Figura 6</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> à 40°C, 21°C e 4°C. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	111
<b>Figura 7</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>H. unitaeniatus</i> na presença de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, à 40°C, 21°C, 4°C e em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	111
<b>Figura 8</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>H. unitaeniatus</i> na presença de IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	112
<b>Figura 9</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>H. unitaeniatus</i> à 40°C, 21°C e 4°C. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	112
<b>Figura 10</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> na presença de inositol hexafosfato (IHP).....	113
<b>Figura 11</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> na presença de guanosina trifosfato (GTP).....	113
<b>Figura 12</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> na presença de adenosina trifosfato (ATP).....	114
<b>Figura 13</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> na presença de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG).....	114
<b>Figura 14</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> à 40°C.....	115
<b>Figura 15</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> à 21°C.....	115
<b>Figura 16</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> à 4°C.....	116
<b>Figura 17</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.....	116
<b>Figura 18</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão Hepes-Tris 0,10 M, pH 8,0.....	117

<b>Figura 19</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>H. unitaeniatus</i> e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão Hepes-Tris 0,10 M, pH.....	118
<b>Figura 20</b> - Comportamento funcional das Hbs <i>stripped</i> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão Hepes-Tris 0,10 M, pH 8,0.....	118
<b>Figura 21</b> - Efeito da concentração do IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05M.....	120
<b>Figura 22</b> - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.....	120
<b>Figura 23</b> - Efeito da concentração do IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.....	121
<b>Figura 24</b> - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.....	121
<b>Figura 25</b> - Efeito da concentração do IHP, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.....	122
<b>Figura 26</b> - Efeito da concentração do GTP, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.....	122
<b>Figura 27</b> - Efeito da concentração do ATP, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.....	123
<b>Figura 28</b> - Efeito da concentração do 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.....	123
<b>Figura 29</b> - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao O <sub>2</sub> de <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> . Método espectrofotométrico em Hbs <i>stripped</i> pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.....	124
<b>Figura 30</b> - Valores médios dos nucleotídeos ATP, GTP e inosítois IP <sub>2</sub> , nos eritrócitos <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> , em µM de P/mL de RBC. * Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para <i>L. paradoxa</i> e <i>H. unitaeniatus</i> .....	126

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das dimensões (volume, diâmetro maior e diâmetro menor) de eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, eosiófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos em *L. paradoxo* (n = 10).....34
- Tabela 2** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das dimensões (volume, diâmetro maior e diâmetro menor) de eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos em *H. unitaeniatus* (n = 10).....36
- Tabela 3** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das variáveis eritrocitárias em *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*.....37
- Tabela 4** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) dos trombócitos e leucócitos totais do sangue em *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*.....39
- Tabela 5** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) dos linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos por  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue em *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*.....39
- Tabela 6** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) da % de linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos do sangue em *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*.....39
- Tabela 7** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das concentrações de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), glicose, proteínas totais, osmolaridade plasmáticas e pH em *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*.....40

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** - Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de  $P_{50}$ ,  $P_{50}$  (pH - 7,0), cooperatividade Hill( $n_{Hill}$ ) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* em diferentes condições. Sob o efeito de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, em três temperaturas e sangue não fracionado. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (n = 10).....109

**Tabela 2** - Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de  $P_{50}$ ,  $P_{50}$  (pH - 7,0), cooperatividade ( $n_{Hill}$ ) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e sob o efeito do cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão Hepes-Tris 0,10 M, pH 8,0 (n = 10).....117

**Tabela 3** - Valores de efeito Root em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.....125

**Tabela 4** - Valores médios e desvio padrão (SD) das concentrações de nucleotídeos (ATP, GTP), 2,3 - BPG e inosítois (IP<sub>2</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> e IHP) nos eritrócitos de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, em  $\mu$ M de P/mL de RBC (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.....126

## RESUMO

A composição celular do sangue, em sua expressão quantitativa e qualitativa, bem como as propriedades funcionais das hemoglobinas apresenta aspectos característicos de adaptação ao ambiente aquático, auxiliando a compreensão da adaptabilidade dos peixes ao ambiente. O presente estudo teve como objetivo a análise do sangue periférico e a caracterização estrutural e funcional (*in vitro*) das hemoglobinas do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* e do peixe de respiração aérea facultativa *Hoplerythrinus unitaeniatus* coletados nos arredores de Cuiabá, MT. Para tanto foram determinadas as variáveis hematológicas, as concentrações plasmática de íons, glicose, proteínas e osmolaridade, a análise biométrica e morfológica das células sanguíneas, o padrão eletroforético das hemoglobinas, o efeito Root, a quantificação e o efeito dos moduladores alostéricos (IHP, ATP, GTP, 2,3 - BPG e NaCl) na modulação da afinidade das hemoglobinas ao oxigênio e a afinidade das hemoglobinas em experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue e *stripped* à 4°C, 21°C e 40°C. As células sanguíneas de *L. paradoxa* são excepcionalmente grandes e pouco numerosas comparadas as de *H. unitaeniatus*. Os valores de hematócrito e pH sanguíneo foram similares nas duas espécies. O número de eritrócitos foi mais baixo em *L. paradoxa* ( $52 \cdot 10^3 \pm 17 \mu\text{L}^{-1}$ ) do que em *H. unitaeniatus* ( $2386 \cdot 10^3 \pm 370 \mu\text{L}^{-1}$ ). Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média foram maiores em *L. paradoxa* enquanto que a concentração de hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina foram maiores em *H. unitaeniatus*. Dentre os leucócitos, em *L. paradoxa* os linfócitos ( $65,00 \pm 4,00 \%$ ) foram os mais freqüentes, seguidos dos eosinófilos ( $19,00 \pm 3,00 \%$ ), neutrófilos ( $12,00 \pm 2,00 \%$ ), monócitos ( $2,00 \pm 0,60 \%$ ) e basófilos ( $1,40 \pm 0,40 \%$ ). Em *H. unitaeniatus* os linfócitos também foram os mais freqüentes ( $85,14 \pm 3,21 \%$ ) seguidos dos neutrófilos ( $12,00 \pm 3,00 \%$ ) e monócitos ( $2,90 \pm 1,23 \%$ ). Em *L. paradoxa* os níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , glicose e proteínas totais foram significativamente menores aos observados em *H. unitaeniatus*. Não houve diferenças significativas nos valores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  e osmolaridade plasmática entre as duas espécies. O padrão eletroforético em gel de amido para *L. paradoxa*, mostrou a presença de dois componentes, um maior lento, e outro menor rápido, em *H. unitaeniatus* foram identificados 6 componentes anódicos com diferentes concentrações, sendo 3 componentes lentos e 3 componentes rápidos. Nas espécies estudadas as hemoglobinas *stripped* nas três temperaturas e na presença dos moduladores, mostraram efeito Bohr normal. Em *L. paradoxa* os valores de Hill foram próximos de 2,00 indicando cooperatividade e ausência de efeito Root; em *H. unitaeniatus* os valores de Hill próximos de 1,50, indicaram baixa cooperatividade e presença de efeito Root. A afinidade das hemoglobinas ao oxigênio mostrou-se maior à medida que se diminuiu a temperatura. O 2,3 - BPG foi pouco efetivo na modulação das hemoglobinas de ambas as espécies, já os moduladores IHP, GTP, ATP e NaCl atuaram como moduladores negativos, sendo a modulação mais efetiva em *H. unitaeniatus*. Não detectamos 2,3 - BPG e o ATP foi o principal nucleotídeo intra-eritrocitário para as duas espécies sendo aproximadamente 2 vezes superior ao GTP. Em *L. paradoxa* foi detectado pequena quantidade  $\text{IP}_2$ , em *H. unitaeniatus* não detectamos a presença de inositóis. Os resultados mostram diferenças marcantes entre as células de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e a capacidade de adaptação molecular das hemoglobinas destas espécies às condições fisiológicas e ambientais a que estão sujeitas.

## ABSTRACT

The blood cell composition in their qualitative and quantitative aspects as well as the functional properties of hemoglobin (Hb) shows characteristic of adaptation to the aquatic environment, aiding the understanding of the adaptability of the fish to the environment. The present study aimed to analyze the peripheral blood cells and the structural and functional characterization (*in vitro*) of hemoglobins of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* and facultative air-breathing fish *H. unitaeniatus* collected nearby Cuiaba, MT. The hematological variables, blood cell size, plasma ions, glucose and protein concentrations and the osmolality as well as the electrophoretic patterns of Hbs, the Root effect, quantification and the effect of allosteric modulators (IHP, ATP, GTP, 2,3 - BPG and NaCl) of the affinity of Hb to oxygen and Hb affinity in experiments of oxygenation in the blood *stripped* to and 4°C, 21°C and 40°C. The blood cells of *L. paradoxa* are exceptionally large and not numerous compared to *H. unitaeniatus*. The hematocrit and blood pH were similar in the two species. The erythrocyte number was lower in *L. paradoxa* ( $52 \cdot 10^3 \pm 17 \mu\text{L}^{-1}$ ) than in *H. unitaeniatus* ( $2386 \cdot 10^3 \pm 370 \mu\text{L}^{-1}$ ). The hematimetric indexes mean corpuscular volume and mean corpuscular Hb were higher in *L. paradoxa* while the mean corpuscular Hb concentration and Hb concentration were higher in *H. unitaeniatus*. Among the white blood cells, in *L. paradoxa*, the lymphocytes ( $65.00 \pm 4.00 \%$ ) were the most frequent cells, followed by eosinophils ( $19.00 \pm 3.00 \%$ ), neutrophils ( $12.00 \pm 2.00 \%$ ), monocytes ( $2.00 \pm 0.60 \%$ ) and basophils ( $1.40 \pm 0.40 \%$ ). In *H. unitaeniatus* lymphocytes were also the most frequent cells ( $85.14 \pm 3.21 \%$ ) followed by neutrophils ( $12.00 \pm 3.00 \%$ ) and monocytes ( $2.90 \pm 1.23 \%$ ). In *L. paradoxa* the  $\text{Mg}^{+2}$ , glucose and total protein plasma levels were significantly smaller than in *H. unitaeniatus*. There were no significant differences in the levels of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  and osmolality of plasma and between both species. Two Hb components, one major and another minor band was identified in *L. paradoxa* and another smaller; in *H. unitaeniatus* 6 anode components being 3 slow components and 3 fast component have been identified at different concentrations. In both species the *stripped* Hbs in three temperatures and in the presence of modulators, showed normal Bohr effect. In *L. paradoxa* cooperatively values were near 2.00 indicating cooperatively and absence of effect of Root; in *H. unitaeniatus* the cooperatively values were near 1.50, indicating low cooperatively and presence of Root effect. The affinity of Hb-oxygen proved be higher as decreased the temperature. The 2,3 - BPG was little effective in modulate the Hb in both species. The IHP ATP, GTP, and NaCl acted as negative modulators, being more effective in the modulation of Hb of *H. unitaeniatus*. The 2,3 - BPG was not detected in *H. unitaeniatus* and the ATP was the primary nucleotide intraeritrocitário for the two species being approximately 2 times higher than the GTP. In *L. paradoxa* was detected small amount  $\text{IP}_2$ , but not in *H. unitaeniatus*. Our results show marked differences between the blood cells of *L. paradoxa* and *H. unitaeniatus* and the ability of adaptation of Hbs to environmental conditions to which they living.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

Os organismos não poderiam existir independentemente do ambiente; ao utilizar os recursos ambientais necessitam ser capazes de enfrentar as adversidades que os mesmos podem apresentar (DEJOURS, 1981).

Dentre os vertebrados, os peixes são os que apresentam maior diversidade e número de espécies. Ocupam uma grande diversidade de habitats, que variam amplamente nas adversidades, tanto em relação às condições bióticas (predação, parasitismo, competição, disponibilidade de alimento) quanto abióticas (temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, salinidade e pressão) (WOOTTON, 1990).

Estas características fizeram com que as diferentes espécies de peixes desenvolvessem diferentes estratégias que envolveram ajustes comportamentais, fisiológicos e moleculares, de forma a assegurar a sobrevivência no meio aquático e refletindo a versatilidade destes animais frente às flutuações ambientais (VAL, 1986; FERNANDES et al., 1999; VAL, et al., 2004). Muitos destes ajustes podem ser detectados através dos estudos hematológicos e das propriedades estruturais e funcionais de suas hemoglobinas.

O sangue constitui uma das grandes forças homeostáticas do organismo (SCHMIDT-NIELSEN, 1996) atua na defesa, distribui calor, transporta gases, nutrientes e produtos de excreção promovendo relativa estabilidade interna do organismo e responde sensivelmente a vários fatores tais como pressão osmótica, pH, temperatura, níveis de certos hormônios, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> dissolvido, sazonalidade e estresse (KALASHNIKOVA, 1976; VAL et al., 1996; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Segundo RANZANI-PAIVA e GODINHO (1985) e AZEVEDO et al. (2006) os estudos comparativos da composição e da função dos componentes do sangue são de fundamental importância na avaliação das condições fisiológica, bioquímica e patológica dos peixes, podendo ser utilizados, para a compreensão das variações filogenéticas, do modo de vida e de outros aspectos relacionados às adaptações fisiológicas dos animais (MUNKITTRICK e LEATHERLAND, 1993; RANZANI-PAIVA et al., 1997; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; MELO et al., 2006; FRANÇA et al., 2007; SOSO et al., 2007), fornecendo subsídios importantes para a compreensão da fisiologia comparativa (LARSON et al., 1976; RANZANI-PAIVA et al., 2003; SOUZA e FONTANETTI 2006; TAVARES-DIAS e MORAES, 2007).

Sendo assim os estudos hematológicos que determinam a composição morfológica do sangue, em sua expressão quantitativa e qualitativa bem como suas propriedades funcionais apresentam aspectos característicos de adaptação ao ambiente aquático, auxiliando a compreensão da relação entre as características sanguíneas, a atividade física, os hábitos e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente (RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1983; VAL, 1986; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Estudos relacionados às variáveis da série vermelha, tais como número de eritrócitos (RBC), hematócrito (%), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a caracterização estrutural e funcional de suas hemoglobinas (Hb) tem sido de grande importância na identificação de processos anemiantes (MAHONEY e McNULTY, 1992) e na compreensão da fisiologia respiratória dos peixes.

Um exemplo que podemos citar são as espécies de peixes que vivem em águas doces tropicais, que são caracterizadas por uma combinação de altas temperaturas, baixa

concentração de oxigênio na água e variações de pH. Em tais ambientes instáveis, onde a situação torna-se drástica, tanto os peixes de respiração exclusivamente aquática quanto os de respiração aérea mostram respostas que integram os diferentes níveis de organização biológica (KALININ et al., 1996; FERNANDES et al., 1999), propiciando a manutenção de um suprimento constante de O<sub>2</sub> para os tecidos.

Segundo POWERS (1980), nestes ambientes, o sistema de captação e liberação de O<sub>2</sub> tem que ser bastante ajustados. Para isso os peixes podem utilizar algumas estratégias, tais como: aumentar a concentração de Hb e do RBC (TAVARES-DIAS et al., 2008), apresentar Hb termicamente insensíveis, como ocorre no atum (BRUNORI, 1966); apresentar Hb com diferentes sensibilidades térmicas (BRUNORI, 1975), ou ainda, variar o nível de moduladores alostéricos (GREANEY e POWERS, 1977; OLIANAS et al., 2005) aumentando ou diminuindo a afinidade das Hb ao oxigênio. De acordo com WELLS et al. (1997), as Hb dos peixes exibem grande flexibilidade e, mudanças nos fatores citados podem modificar a afinidade Hb-O<sub>2</sub>, ajustando a transferência desse gás conforme as necessidades fisiológicas e condições ambientais (POWERS, 1980; SOUZA, 2007).

Destacamos ainda os estudos relacionados com as variáveis leucocitárias, que participam do sistema imunológico bem como as variações na concentração iônica plasmática que também têm sido utilizadas como ferramentas úteis para se determinar as características sanguíneas dos peixes (CENTENO et al., 2007; TAVARES-DIAS et al., 2007; TAVARES-DIAS e MORAES 2007).

Estas análises fornecem informações relevantes sobre o indivíduo e sua população, de forma a relacioná-las ao modo de vida dos mesmos, podendo ainda ser empregadas no diagnóstico de processos infecciosos (RANZANI-PAIVA e EIRAS, 1992) e outros estados de desequilíbrio homeostático, fornecendo assim subsídios

importantes para o auxílio do diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (MODRÁ et al., 1998).

Verifica-se que as diferentes espécies de peixes, mesmo que do mesmo gênero, na maior parte dos casos, apresentam variações quanto aos valores quantitativos e qualitativos dos elementos sanguíneos. Tais variações intra-específicas podem ser atribuídas às diferentes características de comportamento, hábitat, hábito alimentar, clima e outros fatores (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Neste contexto o presente estudo analisou as características hematológicas com ênfase nas hemoglobinas de duas espécies, o peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa*, como um representante Sarcopterygii, com respiração aérea obrigatória, e o jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, uma espécie da família Erithrynidae, com respiração aérea facultativa. Estas espécies apresentam diversidade do modo de respiração utilizando os pulmões e as brânquias, respectivamente, como principal órgão respiratório; e utilizam a pele e bexiga natatória como órgãos acessórios para a respiração aérea, sendo consideradas espécies altamente tolerantes a variações ambientais, principalmente em relação à hipóxia e exposição ao ar (MARIANO et al., 2009).

Em seus ambientes naturais, essas espécies de peixes, são encontradas tanto em locais bem oxigenados quanto em regiões com baixas concentrações de oxigênio (CONANT, 1986). Estes ambientes podem ser sazonais e transientes, assim, a progressiva diminuição dos corpos de água, até seu completo desaparecimento faz com que *L. paradoxa* se enterre no lodo estivado por vários meses e que *H. unitaeniatus* migre por terra em busca de novos ambientes (KERR, 1898; LOWE-McCONNELL, 1987) características que tornam as espécies um modelo experimental adequado para o estudo aqui proposto.

A análise comparativa das variáveis hematológicas bem como a caracterização estrutural e funcional de suas hemoglobinas contribuirá para compreensão de possíveis mecanismos reguladores no padrão de vida das referidas espécies frente às variações ambientais, sendo o entendimento deste tipo de indicador em peixes uma poderosa ferramenta complementar nos estudos sobre a biologia destas espécies.

Na literatura, poucos são os estudos hematológicos que abordam a morfologia, a morfometria, a classificação das células sanguíneas e estudos hemoglobínicos destas espécies. Alguns trabalhos referentes às propriedades funcionais das Hbs ao efeito do pH no equilíbrio e cinética de união de oxigênio e monóxido de carbono às hemoglobinas destas espécies foram desenvolvidos na expedição Alpha Helix (RIGGS, 1979), com os espécimes em seu ambiente natural. Outros realizados com os espécimes em cativeiro (JOHANSEN e LENFANT 1967; PERRY et al., 2004; BASSI et al, 2005) estudaram as funções respiratórias e avaliaram as propriedades hemoglobínicas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e RIBEIRO et al. (2007), que analisaram o leucograma de *L. paradoxa*.

Assim, os dados obtidos visam ampliar os conhecimentos biológicos sobre estas duas espécies e servir de subsídios para estudos comparativos posteriores.

## **1.2 Considerações sobre as espécies**

### **1.2.1 *Lepidosiren paradoxa* – Pirambóia (Figura 1)**

Os peixes dipnóicos pertencem à subclasse Sarcopterygii (peixes de barbatanas lobadas), ordem Dipnoi, e constituem atualmente seis espécies de água doce agrupadas em três gêneros, *Lepidosiren*, encontrado na América do Sul, *Protopterus*, na África e *Neoceratodus*, na Austrália. Estes animais foram dominantes durante a era Paleozóica e os primeiros registros fósseis remontam ao período Devoniano. Estes peixes utilizam como órgão primário de respiração um pulmão especializado capaz de captar o oxigênio

diretamente do ar atmosférico e despertaram o interesse por possuírem características intermediárias entre peixes e anfíbios, formando um elo de transição entre os vertebrados de respiração aquática para os de respiração aérea (ROMER 1979; ZARDOYA et al., 1998; TOYAMA et al., 2000).

*L. paradoxa*, tem respiração aérea obrigatória, a superfície branquial é muito reduzida (MORAES et al., 2005) de forma que a absorção de O<sub>2</sub> não atende a demanda metabólica mesmo em águas bem aeradas (ABE e SETFFENSEN, 1996). Entretanto, segundo GRAHAN (1997), apesar do pulmão de *L. paradoxa* ser o principal órgão para a absorção de O<sub>2</sub>, a maior parte do CO<sub>2</sub> respiratório é eliminado pelas brânquias, as quais também exercem um papel importante no equilíbrio iônico (BURGGREN e JOHANSEN, 1986).

Esta espécie é encontrada tanto na região tropical nas bacias dos rios Amazonas e Paraguai como subtropical no Pantanal da América do Sul, geralmente em águas hipóxicas (CONANT, 1986; LOWE-McCONNELL, 1987; POUGH et al., 1999). Apresenta movimentos lentos, é carnívora, costuma alimentar-se de pequenos peixes e moluscos do gênero *Ampullaria* sp.

Durante a estação de seca, quando as lagoas secam, enterram-se no lodo e estivam (KERR, 1898; CARTER e BEADLE, 1930), desenvolvendo estratégias metabólicas para enfrentar as variações que ocorrem periodicamente em seu ambiente de inundações e secas; apresenta uma abundante secreção de muco na fase pré-estival sem, no entanto, formar casulo como pulmonado africano *Protopterus* (MIMURA, 1975; ABE e SETFFENSEN, 1996).

No período estival os animais geralmente perdem peso (MIMURA, 1975), e a tomada de O<sub>2</sub>, tanto através dos pulmões quanto pelo tegumento, diminui (ABE e SETFFENSEN, 1996). Segundo HARDER et al. (1998), há uma fase inicial de

estivação onde ocorre aumento na frequência respiratória. MESQUITA-SAAD et al. (2002) mostraram que os músculos esquelético e cardíaco revelaram alta capacidade anaeróbica no período de estivação, quando as enzimas LDH, MDH e CS mostram níveis bastante inferiores (indicando supressão metabólica) em relação aos animais ativos. Na estação das chuvas, (setembro e dezembro) o peixe cessa a estivação e se reproduz. A larva assemelha-se ao girino de um anfíbio, com cabeça pouco desenvolvida, quatro pares de brânquias externas.

Os juvenis não apresentam respiração aérea obrigatória (GRAHAM, 1977). Durante o desenvolvimento as brânquias externas são perdidas, aumentando gradualmente a dependência pela respiração aérea, que passa a ser nos adultos, responsável por mais de 90 % do O<sub>2</sub> obtido, ficando as brânquias restritas à excreção de CO<sub>2</sub> (OLSON, 1994) e trocas iônicas (LAURENT et al., 1978).

As brânquias de *L. paradoxa* diferem da maioria dos outros peixes, não apresentam células cloreto e cinco pares de arcos branquiais curtos que decrescem de tamanho no sentido antero-posterior (MORAES et al., 2005). Segundo MORAES et al. (2005), uma das poucas similaridades com os outros peixes é a presença de células mucosas no epitélio branquial. Segundo CARTER e BEADLE (1930), as alterações nas estruturas das brânquias de *L. paradoxa* refletem a redução da sua função na respiração, associada à natureza abrasiva e ao alto nível de CO<sub>2</sub> e íons nas águas barrentas onde esses peixes vivem.

*L. paradoxa* possui um par de pulmões situados na linha mediana corpórea com barreira de difusão ar-sangue muito reduzida (MORAES et al., 2005) e produzem um surfactante que funciona como um antiaderente, diminuindo a tensão superficial nas trocas gasosas (DANIELS et al., 1986; ORGEIG e DANIELS, 1995). A epiderme apresenta um epitélio estratificado com 6 a 10 camadas celulares e distância de difusão

142,03  $\mu\text{m}$ . O coração tem o átrio dividido em duas câmaras e o ventrículo parcialmente dividido, apresentando uma divisão maior que de qualquer anfíbio.

As pirambóias, diferentemente dos peixes teleósteos, não possuem quimiorreceptores externos para  $\text{O}_2$ , entretanto, da mesma forma que os vertebrados terrestres, apresentam quimiorreceptores centrais de pH, que participam do controle de seu equilíbrio ácido base e, de suas respostas ventilatórias frente à hipercapnia ambiente (SANCHEZ e GLASS, 2001; SANCHES et al., 2001).



**Figura 1** - Exemplar adulto de *Lepidosiren paradoxa* - Pirambóia (FITZINGER, 1837), no tanque de aclimação. (Foto: Wallace Luiz P. Ducan).

### 1.2.2 *Hoplerythrinus unitaeniatus* - Jeju (Figura 2)

A família Erythrinidae (Characiformes) é uma pequena família de peixes caracídeos predadores considerados primitivos (GODOY, 1975). O grupo é exclusivo da América do Sul e é constituído por 3 gêneros e 17 espécies (OYAKAWA 2003, OYAKAWA e MATTOX, 2009).

No Brasil encontramos os três gêneros (GODOY, 1979) e um número reduzido de espécies: *Erythrinus* com duas espécies (*Erythrinus erythrinus* e *Erythrinus kessleri*), *Hoplerythrinus*, uma espécie (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) e *Hoplias*, incluindo sete espécies (*Hoplias aimara*, *Hoplias australis*, *Hoplias brasiliensis*, *Hoplias curupira*, *Hoplias lacerdae*, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias microcephalus*) (OYAKAWA e NETTO-FERREIRA 2007, OYAKAWA e MATTOX, 2009).

*Hoplerythrinus unitaeniatus* é popularmente conhecido como jeju ou aimara (SMITH, 1979, LEAL et al., 2010), é territorialista (BRITSKI et al., 1999, WEITZMAN e MALABARBA 1998) e um predador ativo alimentando-se de pequenos peixes e insetos (GRAÇA e PAVANELLI 2004, MORAES et al., 2004). A distribuição geográfica do gênero abrange o Equador, Peru, Bolívia, Venezuela, Argentina, Bolívia, Panamá, Guiana Francesa, Paraguai, Trinidad e Tobago e Brasil (GODOY, 1979 e PIIPER, 1989; OYAKAWA 2003, OYAKAWA e NETTO-FERREIRA 2007; OYAKAWA e MATTOX 2009). A espécie tem crescimento rápido; os indivíduos jovens vivem em pequenos cardumes e, em geral, ocorre em áreas de inundação temporária movendo-se correnteza abaixo com a queda do nível da água (LOWE McCONNELL, 1987).

*H. unitaeniatus* possui coloração cinza amarronzada, com ventre claro a amarelado e uma faixa longitudinal escura ao longo dos flancos; ocorrem em águas lânticas onde os fatores abióticos como temperatura, O<sub>2</sub> dissolvido, pH, concentração de íons e CO<sub>2</sub> na água variam consideravelmente (KRAMER, 1978) sendo capazes de se ajustar às mudanças ambientais (NELSON 1984; POLEZ et al., 2003). No Pantanal, é comumente encontrado nos corpos d'água temporários formados durante os períodos de estiagem e, no período de chuvas, pode passar de um rio ao outro através de zonas alagadas (IHERING, 2002) utilizando as nadadeiras para movimentar-se e, conseqüentemente ficam expostos ao ar atmosférico (FINK e FINK, 1978; KRAMER, 1978; JUCÁ-CHAGAS, 2004; OLIVEIRA et al., 2004). A espécie apresenta respiração aérea facultativa utilizando a bexiga natatória ricamente vascularizada para a respiração aérea (AZEVEDO e GOMES, 1943; KRAMER, 1978; VAL e ALMEIDA-VAL 1995; FERNANDES e MORON, 1996; GRAHAM 1997, JUCÁ-CHAGAS 2004; MARIANO et al., 2009). As brânquias possuem filamentos curtos com mais

frequências de lamelas por milímetro de filamentos resultando uma reduzida área branquial (FERNANDES et al., 1994). Durante períodos de hipóxia severa e exposição ao ar o oxigênio é absorvido via bexiga natatória (MARIANO et al., 2009). Tal adaptação lhe confere uma resistência a períodos ocasionais de estiagem (AZEVEDO e GOMES, 1943).



**Figura 2** - Exemplar adulto de *Hoplerythrinus unitaeniatus* - Jeju (SPIX, 1829), no tanque de aclimatação. (Foto: Sandro E. Moron).

### 3 OBJETIVOS

Considerando que as espécies estudadas apresentam diferentes modos de respiração e em seus ambientes enfrentam situações similares de estresse, o presente trabalho teve como objetivo, analisar comparativamente as variáveis hematológicas e principalmente hemoglobínicas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, de forma a evidenciar possíveis relações entre as características sanguíneas e as possíveis respostas fisiológicas frente a diferentes condições impostas pelo ambiente, contribuindo para elucidação de possíveis mecanismos reguladores no padrão de vida das espécies em questão.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar as variáveis hematológicas incluindo série vermelha, série branca, trombócitos, concentrações plasmática de íons, glicose, proteínas e osmolalidade de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

- b) Realizar análise biométrica e morfológica das células sanguíneas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, determinando o volume, o diâmetro maior e o diâmetro menor dos diferentes tipos de células e seus respectivos núcleos.
- c) Caracterizar, estrutural e funcionalmente (*in vitro*), as hemoglobinas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, em relação a sua afinidade ao oxigênio, em sangue e em solução.
- d) Verificar o efeito dos moduladores, trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de guanosina (GTP), inositol hexafosfato (IHP), 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) e da temperatura, na modulação da afinidade da hemoglobina ao oxigênio.
- e) Determinar os fosfatos orgânicos (nucleotídeos e inosítois), presentes nos eritrócitos das espécies estudadas.

No capítulo 2, as células sanguíneas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* foram identificadas, quantificadas, medidas e descritas. Essas análises foram efetuadas concomitantemente à determinação das variáveis eritrocitárias, pH, concentração plasmáticas de íons (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>), glicose, proteínas totais e osmolaridade.

No capítulo 3, foram analisadas as características estruturais e funcionais das hemoglobinas de *L. paradoxa* e *H. unitaenitus* através de estudos eletroforéticos, análise *in vitro* do efeito dos moduladores intraeritrocitários (fosfatos e cloreto), da temperatura e do pH na afinidade das hemoglobinas ao O<sub>2</sub> e a quantificação dos fosfatos intraeritrocitários.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. S., SETFFENSEN, J. F. Bimodal respiration and cutaneous oxygen loss in the lungfish, *Lepidosiren paradoxa* Rev. Brasil. Biol., v. 56(2), p. 211-216, 1996.
- AZEVEDO, P., GOMES, A. L. Contribuição ao estudo da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974). Bol. Ind. Ani., v. 5, p. 15-64, 1943.
- AZEVEDO, T. M. P., MARTINS, M. L., YAMASHITA, M. M., FRANCISCO, C. J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 32(1), p. 41-49, 2006.
- BASSI, M., KLEIN, W., FERNANDES, M. N., PERRY, S. F., GLASS, M. L. Pulmonary oxygen diffusing capacity of the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*: physiological values by the Bohr method. Physiol. Biochem. Zool, the University Chicago, v. 78(4), p. 560-569, 2005.
- BRITSKI, H. A., SILIMON, K. Z. S., LOPES B. S. Peixes do Pantanal - manual de identificação. Embrapa, Brasília, p. 184, 1999.
- BRUNORI, M. Bohr effects in hemoglobin from *Thunnus thynnus*. Arch. Biophys., v. 144, p. 195-216, 1966.
- BRUNORI, M. Molecular adaptation to physiological requeriments: the hemoglobin system of trout. Curr. Topics Cell Reg., v. 9, p. 1-39, 1975.
- BURGGREN, W. W., JOHANSEN, K. Circulation and respiration in lungfish (Dipnoi). J. Morphol. Supplem., v. 1, p. 217-236, 1986.
- CARTER, G. S. E., BEADLE, L. C. Notes on the habits and development of *Lepidosiren paradoxa*. J. Linn. Soc. London Zool., v. 37, p. 197-203, 1930.
- CENTENO, L., SILVA-ACUÑA, R., BARRIOS, R., LUGO, R. S., MATUTE, C., PÉREZ, J. L. Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. Zoo. Trop., v. 25, p. 237-243, 2007.
- CONANT, E. B. Bibliography of lungfishes. J. Morphol. Suppl., v. 1, p. 305-373, 1986.
- DANIELS, C. B., ORGEIG, S., SMITS, A. W. The evolution of the vertebrate pulmonary surfactant system. Physiol. Zool., v. 68(4), p. 539-566, 1986.
- DEJOURS, P. Principles of comparative respiratory physiology. 2.ed. Amsterdam. North Holland Publishing, 1981.
- FERNANDES, M. N., RANTN, F. T., KALININ, A. L., MORON, S. E. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. Can. J. Zool., v. 72, p. 160-165, 1994.

FERNANDES, M. N., MORON, S. E. Respiratory organs in erythrinid fishes. In: VAL, A. L., RANDALL, D. J., MACKINLEY, D. (eds.). Proc. physiol. trop. fishes. San Francisco University, p. 141, 1996.

FERNANDES, M. N., SANCHES, J. R., MATSUZAKI, M., PANEPUCCI, L., RANTIN F. T. Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. In: VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. M. (eds), Biol. trop. fishes. Inpa, Manaus, p. 341-352, 1999.

FINK, W. I., FINK, S. V. Central Amazonia and its fishes. Comp. Biochem. Physiol., v. 62, p. 13-29, 1978.

FITZINGER, L. J. F. J. Vorläufiger bericht über eine höchst interessante entdeckung Dr. Natterer in Brasil. Isis (Oken), v. 30, p. 379-380, 1837.

FRANÇA, J. G., RANZANI-PAIVA, M. J. T., LOMBARDI, J. V., CARVALHO, S., SERIANI, R. Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio associado ao selênio, por meio do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. Bioikos, Campinas, v. 21, p. 11-19, 2007.

GODOY, M. P. Peixes do Brasil: Subordem Characoidei - Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Franc., v. 2, p. 217-379, 1975.

GODOY, M. P. Rio Iguazu, Paraná, Brasil reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios. Florianópolis Editora da UFSC, Eletrosul, 1979.

GRAÇA, W. J., PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes. Editora UEM, Maringá, p. 230, 2004.

GRAHAM, J. B. Air-breathing fishes. Academic Press, p. 203-221, 1977.

GRAHAM, J. B. Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto, p. 299, 1997.

GREANEY, G. S., POWERS, D. A. Cellular regulation of an allosteric modifier of fish hemoglobin. Nature, v. 270, p. 73-74, 1977.

HARDER, V., SOUZA, R. H. S., SEVERI, W. The South American lungfish - adaptations to an extreme habitat. In: VAL, A. L., ALMEIDA - VAL, V. M. (eds). The biology of fishes. INPA. Manaus, 1998.

IHERING, R. V. Dicionário dos animais do Brasil. 1. ed., Editora Difel, 2002.

JOHANSEN, K., LENFANT, C. Respiratory function in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Fitz) J. Exp. Biol., v. 46, p. 205-218, 1967.

JUCÁ-CHAGAS, R. Air breathing of the Neotropical fishes *Lepidosiren paradoxa*, *Hoplerthrinus unitaeniatus* and *Hoplosternum littorale* during aquatic hypoxia. Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 139, p. 49-53. 2004.

KALASHNIKOVA, Z. M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. J. Ichthy., v. 3(16), p. 459-472, 1976.

KALININ A. L, RANTIN F, T, FERNANDES M. N, GLASS M. L. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinidas (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. Biol. Trop. Fishes, INPA, Manaus, 1996.

KERR, R. J. The dry season habits of *Lepidosiren paradoxa*. Proc. Zool Soc. Lond., v. 5, p. 41-44, 1898.

KRAMER, D. L. Ventilation of the respiratory gas bladder in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characoidei, Erythrinidae). Can. J. Zool., v. 56, p. 931-938, 1978.

LARSSON, A., JOHANSSON-SJOBECK, M. J., FANGE, R. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. J. Fish Biol., v. 9, p. 425-440, 1976.

LAURENT, P., DeLANEY, R. G., FISHMAN, A. P. The vasculature of the gills in the aquatic and aestivating lungfish (*Protopterus aethiopicus*). J. Morphol., v. 156, p. 173-208, 1978.

LEAL, M. E., KLEIN1, G. F., SCHULZ1, U. H., ALBORNOZ1, P. First record and ecological aspects of *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae) as introduced species in Rio dos Sinos basin, RS, Brazil. Biot. Neotrop., v. 10(3), 2010.

LOWE-McCONNELL, R. H. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge, Cambridge Univ. Press., p. 382, 1987.

MAHONEY, J. B., McNULT, J. K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. Trans. Amer. Fish. Soc., v. 121, p. 261-268, 1992.

MARIANO, W. S., OBA, E. T., SANTOS, L. R. B., FERNANDES, M. N. Physiological responses in jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) to atmospheric air exposure. Rev. Bras. S. Prod. An., v. 10(1), p. 210-223, 2009.

MELO, J. F. B., TAVARES-DIAS, M., LUNDESTEDT, L. M., MORAES, G. Efeito do conteúdo de proteína na dieta sobre os parâmetros hematológicos e metabólicos do bagre sul americano *Rhamdia quelen*. Rev. Ciênc. Agro., v. 1(1), 2006.

MESQUITA-SAAD, L. S., LEITÃO, M. B., PAULA-SILVA, M. N., CHIPPARI-GOMES, A. R., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Specialized metabolism and biochemical suppression during aestivation of the extant South American lungfish - *Lepidosiren paradoxa*. Braz. J. Biol., v. 62(3), p. 495-501, 2002.

MIMURA, I. O sistema vascular capilar-branquial e pulmonar da tambaki Bóia - *Lepidosiren paradoxa* (Fitz, 1836) (Peixe - Dipnóico) do Amazonas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1975.

- MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., KOLÁROVÁ, J. Comparison of differential leucocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Vet. Brno*, v. 67, p. 215-226, 1998.
- MORAES, G., POLEZ, V. L. P., IWAMA, G. K. Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia, *Braz. J. Biol.*, v. 64(1), p. 92-102, 2004.
- MORAES, M. F. P. G., HOLLER, S., COSTA, O. T. F., GLASS, M. L., FERNANDES, M. N., PERRY, S. F. Morphometric comparison of the respiratory organs of the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiol. Biochem. Zoo.*, v. 78(4), p. 546-559, 2005.
- MUNKITTRICK, K. P., LEATHERLAND, J. F. Haematocrit values in feral goldfish, *Carassius auratus*, as indicator of the health of the populations *J. Fish Biol.*, v. 23, p. 153-161, 1993.
- NELSON, J. S. *Fishes of the world*. Wiley interscience publication John and Sons, London, p. 320, 1984.
- OLIANAS, A., MESSANA, I., SANNA, M. T., CASTAGNOLA, M., MANCONI, B., MASIA, D., COLUCCIA, B., PELLEGRINI, M. Two sites for GTP binding cathodic haemoglobins from Anguilliformes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (B), v. 141, p. 400-407, 2005.
- OLIVEIRA, R. D., LOPES, J. M., SANCHES, J. R., KALININ, A. L., GLASS, M. L., RANTIN, F. T. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A), v. 139, p. 479-485, 2004.
- OLSON, K. R. Circulatory anatomy in bimodally breathing fish. *Am. Zool.*, v. 34, p. 280-288, 1994.
- ORGEIG, S., DANIELS, C. B. The evolutionary significance of pulmonary surfactant in lungfish (Dipnoi). *Am. J. Respirat. Cell and Molec. Biol.*, v. 13(2), p. 161-166, 1995.
- OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America (REIS, R., KULLANDER, S., FERRARIS, C., eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 238-240. 2003.
- OYAKAWA, O. T., NETTO-FERREIRA, A. L. Família Erythrinidae. In: Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (P. A. Buckup, N. A. Menezes & M. S. Ghazzi, eds.). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1-195, 2007.
- OYAKAWA, O. T., MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotrop. Ichthyol.*, v. 7(2), p. 117-140, 2009.

PERRY, S. F., REID, S. G., GILMOUR, K. M., BOIJINK, C. L., LOPES, J. M., MILSOM, W. K., RANTIN, F. T. A comparison of adrenergic stress responses in three tropical teleosts exposed to acute hypoxia. *Comp. Physiol.*, v. 287, p. 188-197, 2004.

PIIPER, J. Factors affecting gas transfer in respiratory organs of vertebrates. *Can. J. Zool.*, v. 67, p. 2956-2960, 1989.

POLEZ, V. L. P., MORAES, G., SANTOS NETO, C. Different biochemical strategies of two neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 36(2), p. 279-285, 2003.

POUGH, F. H., JANIS, C. M., HEISER, J. B. *Vertebrate life*. Prentice Hall. 5ed. 1999.

POWERS, M. A. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *Amer. Zool.*, v. 20, p. 139-162, 1980.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., GODINHO, H. M. Sobre células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 43(4), p. 331-338, 1983.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., EIRAS, A. C. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná - PR. 7º Simp. Bras. Aquicul., 2º Enc. Brasil. Patol. Organ. Aquát., Peruíbe, p. 173-182, 1992.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., GODINHO, H. M. Estudos hematológicos em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Bol. Inst. Pesca*, v. 12(2), p. 25-35, 1985.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., ISHIKAWA, C. M., CAMPOS, B. E. S., EIRAS, A. C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revista. Bras. Zool.*, v. 14(2), p. 329-339, 1997.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., RODRÍGUEZ, E. L., VEIGA, M. L., EIRAS, A. C., CAMPOS, B. E. S. Differential leucokocyte counts in “dourado”, *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, São Paulo, Brazil. *J. Biol.*, v. 63(3), p. 517-525, 2003.

RANZANI-PAIVA, M. T. J., SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI PAIVA, M. J., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. P. (eds). *Sanidade de organismos aquáticos*. Editora Varela, p. 89-120, 2004.

RIBEIRO, M. L. S., DA MATTA, R. E., DINIZ, J. A. P., SOUZA, W., NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, T. M. U. Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 23, p. 178-187, 2007.

RIGGS, A. The Alpha Helix expedition to the Amazon for the study of fish bloods and hemoglobins - A collection of papers. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p. 271, 1979.

ROMER, A. S. The vertebrate body. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1979.

SANCHEZ, A. P., GLASS, M. L. Effects of environmental hypercapnia on pulmonary ventilation of the South American lungfish. *J. Fish Biol.*, v. 58, p. 1181, 2001.

SANCHEZ, A. P., HOFFMANN, A., RANTIN, F. T., GLASS, M. L. Relationship between cerebro-spinal fluid pH and pulmonary ventilation of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* Fitz. *J. Exp. Zool.*, v. 290, p. 421-425, 2001.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente. 5.ed. São Paulo: Ed. Santos, p. 600, 1996.

SMITH, N. J. H. A pesca no Rio Amazonas. Manaus: IMPA, p. 154, 1979.

SOSO, A. B., BARCELLOS, L. J. G., RANZANI-PAIVA, M. J., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, R. M., ANZILIERO, D., LIMA, M., SILVA, L. B., RITTER, F., BEDIN, A. C., FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female jundiá (*Rhamdia quelen*). *Env. Toxic. Pharmac.*, v. 23, p. 308-313, 2007.

SOUZA, P. C., BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Fish hemoglobins. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 40(6), p. 769-778, 2007.

SOUZA, T. S., FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mut. Res.*, v. 605, p. 87-93, 2006.

SPIX, J. B. V., AGASSIZ, L. Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix. Monachii. Selecta Piscium Brasiliam: Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, Pls. 1-48; Part 2: 83-138, Pls. 49-101. Part 1 published June 1829, part 2 Jan. 1831; see Kottelat 1988, Whitehead & Myers 1971, Pethiygoda & Kottelat, 1998.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto - SP. Villimpress Complexo Gráfico, 2.ed. p. 144, 2004.

TAVARES-DIAS, M., BARCELLOS, J. F. M., MARCON, J. L., MENEZES, G. C., ONO, E. A., AFFONSO, E. G. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes, Arapaimidae) in net cage culture. *Elec. J. Ichthyol.*, v. 2, p. 61-68, 2007.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J. Fish Biol.*, v. 71, p. 383-388, 2007.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, Davis, v. 36, p. 49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R., IMOTO, M. E. Hematological parameters in two Neotropical freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). *Bios. J.*, Uberlândia, v. 24, p. 96-101, 2008a.

TOYAMA, Y. T., ICHIMIYA, H., KASAMAYOSHIDA, Y., CAO, M., HASEGAVA, H., KOJIMA, Y., TAMAI, T. Phylogenetic relation of lungfish indicated by the amino acid sequence of myelin DM20. *Mol. Res.*, v. 8, p. 256-259, 2000.

VAL, A. L. Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characoidei, Pices): aspectos adaptativos (ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Tese Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus – AM., p. 112, 1986.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. L. F. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 224, 1995.

VAL, A. L. ALMEIDA-VAL, V. M. F., RANDALL, D. J. Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: INPA, 1996.

VAL, A. L., SILVA, M. N. P. S., ALMEIDA VAL, V. M. F. Estresse em peixes - Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI PAIVA, M. J., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. P. (eds). Sanidade de organismos aquáticos. Editora Varela, p. 75-88, 2004.

WEITZMAN, S. H., MALABARBA, L. R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei, Characiformes). In: MALABARBA, L. R., REIS, R. E., VARI, R. P., LUCENA, Z. M. S., LUCENA, C. S. (eds). Phylogeny and classification of Neotropical fishes EdiPUCRS, Porto Alegre, p. 161-170, 1998.

WELLS, R. M. G., BALDWIN J., SEYMOUR, R. S., WEBER R. E. Blood oxygen transport and hemoglobin function in three tropical fish species from northern Australian freshwater billabongs. *Fish Physiol. Biochem.* v. 16, p. 247-258, 1997.

WOOTTON, R. J. Ecology of teleosts fishes. Chapman and Hall (London), p. 404, 1990.

ZARDOYA, R. Y. HASEGAVA, C. M., MEYER, A. Searching for the closest living relative(s) of the tetrapods through evolutionary analyses of mitochondrial and nuclear data. *J. Mol. Biol. Evol.*, v. 15, p. 506-517, 1998.

## CAPÍTULO 2

### VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DO PEIXE PULMONADO *Lepidosiren paradoxa* (DIPNOI, FITZINGER, 1837) E DO PEIXE DE RESPIRAÇÃO AÉREA FACULTATIVA *Hoplerythrinus unitaeniatus* (CHARACIFORMES, SPIX, 1829)

#### Resumo

Os eritrócitos, leucócitos e trombócitos são os constituintes celulares do sangue e tem importante função na homeostase animal. O presente estudo analisou o sangue periférico do peixe pulmonado *L. paradoxa* e do peixe de respiração aérea facultativa *H. unitaeniatus* coletados nos arredores de Cuiabá, MT. As células sanguíneas de *L. paradoxa* são excepcionalmente grandes e pouco numerosas comparadas as de *H. unitaeniatus*. Os valores de hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e pH sanguíneo foram similares nas duas espécies. O número de eritrócitos (RBC) foi mais baixo em *L. paradoxa* ( $52 \cdot 10^3 \pm 17 \mu\text{L}^{-1}$ ) do que em *H. unitaeniatus* ( $2386 \cdot 10^3 \pm 370 \mu\text{L}^{-1}$ ). O número e tamanho celular e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram maiores em *L. paradoxa* e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi maior em *H. unitaeniatus*. Dentre os leucócitos, em *L. paradoxa*, os linfócitos ( $65,00 \pm 4,00$  %) foram os mais frequentes seguidos dos eosinófilos ( $19,00 \pm 3,00$  %), neutrófilos ( $12,00 \pm 2,00$  %), monócitos ( $2,00 \pm 0,60$  %) e basófilos ( $1,40 \pm 0,40$  %). Em *H. unitaeniatus* os linfócitos também foram os mais frequentes ( $85,14 \pm 3,21$  %) seguidos dos neutrófilos ( $12,00 \pm 3,00$  %) e monócitos ( $2,90 \pm 1,23$  %). Em *L. paradoxa* os níveis plasmáticos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , glicose e proteínas totais foram significativamente menores quando comparados aos observados em *H. unitaeniatus*. Não houve diferenças significativas nos valores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  e osmolaridade plasmática entre as duas espécies. Os resultados obtidos permitem concluir que *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* apresentam variações dos padrões hematológicos.

Palavras chave: Células sanguíneas, índices hematimétricos, análises plasmáticas, concentração de hemoglobinas, contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo VALENZUELA et al. (2003), a ictiohematologia pode ser definida como o estudo morfológico, bioquímico e funcional do sangue dos peixes, sendo ferramenta imprescindível na caracterização fisiológica das espécies em relação ao ambiente (MUNKITTRICK e LEATHERLAND, 1983; ATENCIO-GARCÍA et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2008).

Os estudos hematológicos em peixes tiveram início na tentativa de estabelecer valores normais e de determinar a posição das espécies na escala evolutiva (GLAZOVA, 1976). Posteriormente, contribuíram para o entendimento das relações entre as variações das características sanguíneas com fatores como higidez, metabolismo, modo de vida, condições alimentares, oscilações ambientais e outros parâmetros ecológicos (OMOREGIE, 1998; ROCHE e BOGÉ, 2000; SANCHO et al., 2000; TAVARES-DIAS, 2002; MARTINS et al., 2004 a, b; De PEDRO et al., 2005; FALCON et al., 2007; DRUMOND et al., 2010). Sendo assim, os estudos hematológicos podem auxiliar na elucidação do processo de adaptação dos animais em seu ambiente facilitando a compreensão da fisiologia comparativa (RIOS et al., 2005; RANZANI-PAIVA et al., 2005; ISHIKAWA et al., 2008).

Segundo RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004), a instabilidade da homeostase dos peixes aliada a uma série de outros fatores intrínsecos e extrínsecos causa grande variabilidade dos parâmetros hematológicos. TAVARES-DIAS e MORAES (2004) verificaram que diferentes espécies de peixes mesmo que do mesmo gênero, na maior parte dos casos, apresentam variações morfológicas e quantitativas dos elementos sanguíneos, com diferenças em relação ao seu tamanho, volume, concentração de hemoglobina e hematócrito. Segundo CAMPBELL e MURRU (1990), a variação dos parâmetros sanguíneos, como o tamanho e o número de eritrócitos

circulantes são verificados não apenas entre diferentes espécies, mas também pode ser observada entre indivíduos da mesma espécie habitando diferentes nichos, induzindo-os a adaptações fisiológicas.

De acordo com POUGH et al. (2003) o sangue é um tecido fluido composto de componentes celulares mergulhados em um plasma líquido. Segundo RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004), nos peixes, os elementos figurados do sangue são compostos por eritrócitos, leucócitos e trombócitos cuja origem, desenvolvimento e função, principalmente dos leucócitos e trombócitos, não são ainda conhecidos por completo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Vários autores relataram à necessidade da caracterização dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos sanguíneos e a determinação dos valores basais para as diversas espécies de peixes (TAVARES-DIAS e MATAQUEIRO 2004; AZEVEDO et al., 2006; ATENCIO-GARCÍA et al., 2007).

Os eritrócitos dos peixes são ovais, tem núcleo central acompanhando o formato da célula, com cromatina compacta, exceto os eritrócitos de lampreia, que são bicôncavos, semelhantes aos de mamíferos. O tamanho médio destas células é variável entre os peixes (ELLIS, 1977) e o citoplasma abundante apresenta-se acidófilo. Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue periférico dos peixes, porem é comum à presença de eritrócitos imaturos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES DIAS e MORAES, 2004) havendo um equilíbrio entre os tipos de células. A quebra deste equilíbrio pelo excesso de células imaturas sugere a existência de alguma perturbação na sua maturação (SADO, 2008). A principal função dos eritrócitos é o transporte de  $O_2$  e parte do  $CO_2$ , através do pigmento respiratório a hemoglobina, sendo que qualquer deficiência ou alteração nos eritrócitos será traduzida como deficiência de  $O_2$  nos tecidos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004;

SADO, 2008). Sendo assim a análise de seu eritrograma permite o conhecimento da capacidade respiratória da espécie (TAVARES DIAS et al., 2008).

De acordo com SENS (2009), três dados hematológicos da série vermelha que são considerados primários indicam a capacidade de transporte de oxigênio através do sangue e da utilização do mesmo pelo organismo, são eles: a concentração de hemoglobina ([Hb]), o hematócrito (Hct) e o número de eritrócitos (RBC). Além de mostrarem o estado fisiológico dos peixes, esses dados hematológicos são utilizados no controle de patologias e de estresse de qualquer natureza (MARTINEZ et al., 1994).

Dos dados citados acima derivam os índices: o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O VCM que expressa o volume médio dos eritrócitos é usado para indicar o estado osmorregulatório e esta diretamente envolvida com a dinâmica cardíaca e com o fluxo sanguíneo. O HCM indica o peso médio de hemoglobina por eritrócito e demonstra como está a função respiratória. Por fim, o CHCM é simplesmente a concentração de hemoglobina por 100 mL de eritrócitos (HOUSTON, 1990).

O volume de eritrócitos do sangue pode ser expressa como hematócrito ou número de células por volume sanguíneo e varia de 20 a 40 % na maioria dos peixes. O número de eritrócitos também varia de acordo com o grupo, desde  $60 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  (elasmobrânquios) a  $3870 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$  de sangue em teleósteos (LARSSON et al., 1976). Em teleósteos e elasmobrânquios, a concentração de hemoglobina do sangue está relacionada com o hábito ecológico das espécies havendo espécies com valores abaixo de 3,20 %, e outras com valores acima de 15,40 % (JOHANSEN et al., 1978 b; MOURA, 1994).

Segundo TAVARES-DIAS (2003), existe uma relação inversa entre o tamanho dos eritrócitos e a habilidade natatória de teleósteos marinhos, bem como o porte da espécie. O tamanho e o número dos eritrócitos refletem a posição da escala evolutiva sendo que os maiores eritrócitos, assim como, seu menor número são observados em vertebrados primitivos na escala zoológica (TAVARES-DIAS, 2003).

Os trombócitos são células equivalentes às plaquetas em mamíferos, porém estruturalmente diferentes (TAVARES DIAS e MORAES 2004) podendo ter formas elípticas, arredondadas, ovais ou fusiformes, com núcleo que acompanha o formato da célula (RANZANI PAIVA e SILVA-SOUZA 2004).

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa humoral e celular do organismo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007), os quais utilizam à via sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções causadas por diferentes patógenos. Essas células integram diferentes linhagens celulares nas quais podem ser diferenciados morfológicamente pela presença ou ausência de granulação, assim como, pelas suas características morfológicas, tintoriais e citoquímicas (SATAKE et al., 2009).

Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos são os leucócitos usualmente observados na circulação dos peixes (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Os linfócitos são os leucócitos mais numerosos na circulação sanguínea em diversas espécies de peixes (SADO, 2008). Os linfócitos são predominantemente arredondados, com núcleo ocupando quase toda célula e com citoplasma geralmente apresentando projeções que conferem contorno irregular e coloração basofílica (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Segundo CLEM et al. (1991), os linfócitos de peixes possuem características e funções próximas às determinadas para animais superiores. Essas células são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos e o aumento

da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune como as linfocinas (YOSHINAGA et al., 1994). Os neutrófilos são células geralmente arredondadas o núcleo apresenta grande variação de formas, são os leucócitos mais frequentes no sangue periférico e apresenta elevada sensibilidade a modificações ambientais (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Essas células são as primeiras células envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (MANNING, 1994). Da mesma maneira que os macrófagos, eles podem ser isolados do sangue, tecidos linfóides e da cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996); assemelham-se aos neutrófilos dos mamíferos pelas características morfológicas e histoquímicas. Estas células possuem a capacidade de fagocitar e, no transcorrer da resposta imune, a maioria possui o material ingerido no seu fagossomo (ROBERTS, 1989). Os monócitos são células grandes, sendo as maiores células do sangue periférico (RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1983; RANZANI-PAIVA, 1995 b), quando migram para o foco lesional se diferenciam em macrófagos (SADO e MATUSHIMA, 2007). Dentre as principais características destacam-se a capacidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos. Em sua superfície podem-se encontrar receptores para anticorpos (SECOMBES e FLETCHER, 1992). Os eusínófilos são células geralmente arredondadas com núcleo de formato variado, é escasso ou mesmo ausente no sangue periférico de muitos peixes (RANZANI-PAIVA, 1995 a). A função dessa célula nos peixes não está totalmente esclarecida, estas intervêm nos processos de inflamação e na defesa celular, sendo encontrada na corrente sanguínea quando da infestação por

parasitos (HINE, 1992). Os basófilos são esféricos e também se apresentam em baixa quantidade no sangue dos peixes (HINE, 1992).

As análises qualitativas e quantitativas dos leucócitos auxiliam na compreensão de seu sistema imunológico sendo recomendados não só para diagnósticos e prognósticos de condições mórbidas, mas também, para avaliação de condições de estresse (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007; DAVIS et al., 2008; SHAH et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009). A medida do diâmetro das células sanguíneas nos peixes constitui-se um elemento do quadro hematológico, sendo uma das formas utilizadas para avaliar o aspecto morfológico dessas células, o grau de maturação celular, e método seguro para detectar alterações no tamanho dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos, bem como para comparação entre as espécies (JAIN, 1993).

Outro importante parâmetro são os estudos das variáveis bioquímicas do plasma, estas são ferramentas úteis contribuindo significativamente na compreensão de variações nas características sanguíneas, fornecendo informações relevantes sobre as condições fisiológicas e a saúde do indivíduo ou de sua população em relação a fatores como posição filogenética, hábitos ecológicos, seleção alimentar e meio de vida, ajudando na identificação de estresse e enfermidades (CENTENO et al., 2007; TAVARES-DIAS et al., 2007; TAVARES-DIAS e MORAES 2007; DAVIS et al. 2008; TAVARES-DIAS et al., 2008 a).

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo comparar os valores bioquímicos e hematológicos (eritrograma, trombograma, leucograma), entre o peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* e o peixe de respiração aérea facultativa, *Hoplerythrinus unitaeniatus* mantidos em laboratório, descrevendo a biometria, morfologia e a classificação das células sanguíneas, além da quantificação das variedades celulares responsáveis pela defesa orgânica. Com isso, ressaltamos as

diferenças e as similaridades no quadro hematológico destas espécies que, mesmo compartilhando o mesmo tipo de habitat e enfrentando os mesmos tipos de estresse impostos pelo ambiente, caracterizam-se por ser espécies taxonomicamente distintas e com diferentes tipos de respiração. Estas referências auxiliarão na compreensão das relações entre os parâmetros hematológicos o modo de vida e as possíveis estratégias utilizadas por estas espécies frente às variações ambientais podendo ainda ser utilizadas como parâmetros comparativos quando forem submetidas a condições experimentais em laboratório, permitindo identificar possíveis variações no perfil hematológico destas espécies. Vários autores relataram a necessidade da quantificação e caracterização das células sanguíneas bem como a determinação dos componentes plasmáticos basais para as diversas espécies de peixes (TAVARES-DIAS e MATAQUEIRO, 2004; AZEVEDO et al., 2006; ATENCIO-GARCÍA et al., 2007).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais experimentais**

Espécimes adultos de *Lepidosiren paradoxa* - FITZINGER (1837) [n = 10, massa corporal (Mc) =  $570,03 \pm 198,06$  g; comprimento =  $54,14 \pm 4,38$  cm] e *Hoplerythrinus unitaeniatus* - SPIX (1829) [n = 10, massa corporal (Mc) =  $81,28 \pm 15,26$  g; comprimento =  $19,23 \pm 1,30$  cm] foram coletados nos arredores de Cuiabá, MT e trazidos para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. No laboratório, foram mantidos em tanques de cimento (1000 L), com fluxo de água contínuo e aeração constante a  $23,40 \pm 1,40^{\circ}\text{C}$ , pH =  $7,07 \pm 0,98$ , condutividade  $91,90 \pm 4,35$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ , sódios totais dissolvidos  $50,35 \pm 2,16$   $\text{mg L}^{-1}$ , salinidade  $0,10 \pm 0,0$  ppt, concentração de  $\text{O}_2$   $6,90 \pm 0,47$   $\text{mg L}^{-1}$ , porcentagem de  $\text{O}_2$   $87,33 \pm 1,44$  %, alcalinidade  $41,66 \pm 1,52$   $\text{mg L}^{-1}$ , dureza  $53,50 \pm 7,77$   $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  e amônia  $0,159 \pm$

0,01 mg L<sup>-1</sup>. Os animais foram alimentados com ração e fígado de vaca e frango. A alimentação foi suspensa dois dias antes do início dos experimentos. Durante as análises a pressão barométrica foi de  $701,80 \pm 4,26$  e a umidade relativa do ar  $79,25 \pm 6,39$  %.

## **2.2 Sangue**

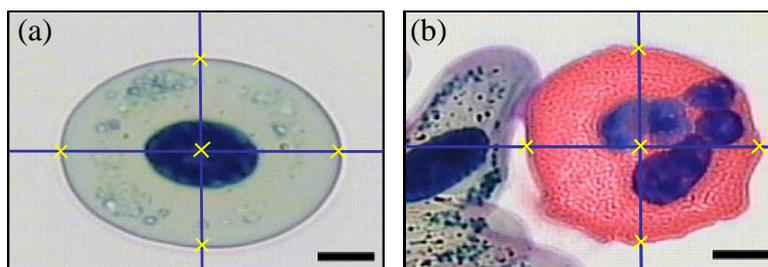
Após aclimatação em laboratório (40 dias) os espécimes foram anestesiados por imersão em recipiente contendo Benzocaína<sup>®</sup> (Synth) 0,10 % e posteriormente amostras de sangue foram retiradas por punção da veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas e processadas para análise das variáveis hematológicas. Após a colheita de sangue a sobrevivência foi de 100 %.

## **2.3 Análises hematológicas**

Imediatamente após a obtenção da amostra de sangue, o pH sanguíneo foi medido utilizando um pHmetro (Quimis<sup>®</sup> Q-400A) calibrado com padrões de precisão. Posteriormente as amostras foram divididas em alíquotas para determinação do hematócrito (Hct), contagem de eritrócitos (RBC) e concentração de hemoglobina ([Hb]). O sangue remanescente foi centrifugado e o plasma removido para análise das variáveis plasmáticas.

### **2.3.1 Análise biométrica das células sanguíneas**

Para análise biométrica das células sanguíneas foram escolhidas extensões sanguíneas com elementos bem distribuídos, sendo considerados o volume, a área, o maior e menor diâmetro das células e dos núcleos, para isso foi utilizado um microscópio de luz Olympus<sup>®</sup> BX-51, utilizando o software CAST System com a função “2 D nucleator IUR” (Figura 1). As imagens foram registradas com câmera JVC TK-C 1380.



**Figura 1** - Sistema de vetores teste utilizados para marcação dos limites dos núcleos e das células. Os quatro raios marcados a partir das proximidades do centro do núcleo determinam os valores biométricos (volume, diâmetro maior e diâmetro menor), (a) eritrócito e (b) eosinófilo. Barra de 10 $\mu$ m.

### 2.3.2 Hematócrito (Hct)

A determinação do Hct (%) foi realizada em duplicatas utilizando o método de microhematócrito em tubo capilar heparinizado de 75 mm, selado em uma das extremidades e centrifugado por 3 minutos a 14.400 x g em uma centrífuga de microhematócrito FANEM<sup>®</sup>, modelo 207/N. A proporção entre a parte sólida (eritrócitos e leucócitos) e líquida (plasma) do sangue de cada amostra foi estimada em porcentagem com o auxílio de um cartão padronizado para micro-hematócrito.

### 2.3.3 Contagem de eritrócitos (RBC)

Para a determinação do RBC ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) alíquota de 10  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue (em duplicata) foi diluída em 2 mL de formol-citrato (3,8 g de citrato formol e 2 mL de formol 40 % para 100 mL de água destilada q.s.p) e a contagem foi efetuada em câmara de Neubauer, em microscópio de luz Olympus<sup>®</sup> CBAK. Cinco campos foram contados e os valores expressos em milhões  $\mu\text{L}^{-1}$ . O valor para cada animal foi à média das duas contagens.

### 2.3.4 Concentração de hemoglobinas [Hb]

A [Hb] (g. dL<sup>-1</sup>) foi determinada segundo o método de formação de cianometahemoglobina onde uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de sangue total foi colocado em 2 mL de solução de Drabkin (0,5 g de KCN; 1,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2 g de K<sub>3</sub>Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>6</sub> em H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1 L). A leitura foi efetuada em  $\lambda = 540$  nm em um espectrofotômetro Biochron<sup>®</sup> - Libra S<sub>32</sub>.

### 2.3.5 Índices hematimétricos

O volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinados a partir dos resultados obtidos do Hct, [Hb] e RBC utilizando as seguintes fórmulas (BROWN, 1976):

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hct (\%)} \cdot 10}{\text{RCB (10}^6 \text{ mm}^3)} \cdot 10^7, \text{ dado em fL}$$

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g)}}{\text{RCB (10}^6 \text{ mm}^3)} \cdot 10^7, \text{ dado em pg célula}^{-1}$$

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb (\%)}}{\text{Hct (\%)}} \cdot 100, \text{ dado em \%}$$

### 2.3.6 Contagem de trombócitos e leucócitos

Extensões sanguíneas em lâminas de vidro foram preparadas imediatamente após a retirada do sangue de cada exemplar e secas à temperatura ambiente. As extensões sangüíneas foram coradas usando kit comercial policromático (Panótico Rápido LB, Laborclin<sup>®</sup>). A contagem total de trombócitos e leucócitos foi efetuada em microscópio de luz Olympus<sup>®</sup> BX-51 de acordo com (PITOMBEIRA e MARTINS, 1966). A classificação morfológica das células sanguíneas foi realizada segundo RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004).

### 2.4 Análises plasmáticas

Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado a 12000 x g, durante 10 minutos. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}^{-1}$  de plasma foi utilizada para medir a osmolalidade. O restante foi dividido em alíquotas (500  $\mu\text{L}^{-1}$ ), congelados e mantidos em congelador a -80°C para análises posteriores de íons, glicose e proteínas totais.

### 2.4.1 Íons plasmáticos

A determinação da concentração plasmática dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi efetuada em um fotômetro de chamas Digimed<sup>®</sup>-DM-61, após diluição de 1:100 do plasma em  $\text{H}_2\text{O}$ -Milli Q. A determinação da concentração de íons  $\text{Mg}^{+2}$  foi feita utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica, Magnésio n<sup>o</sup> 50). A leitura foi efetuada em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES Inc. Serial n<sup>o</sup>. ACXC3191), em  $\lambda = 505$  nm. A dosagem do  $\text{Ca}^{+2}$  foi medida utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica Cálcio Liquiform n<sup>o</sup> 90), cujo princípio é a reação do cálcio com a ftaleína em meio alcalino formando um complexo cor violeta que foi medido em uma leitora de microplacas em  $\lambda = 570$  nm.

A concentração de  $\text{Cl}^-$  foi determinada utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica Cloretos n<sup>o</sup> 49), cujo princípio é a reação do  $\text{Cl}^-$  com tiocianato de mercúrio formando cloreto mercúrico e íons tiocianato. Os íons tiocianato quando combinados com os íons férricos formam tiocianato férrico de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloreto. A leitura foi efetuada utilizando-se uma leitora de microplacas em  $\lambda = 550$  nm.

### 2.4.2 Concentração de glicose

A determinação da concentração plasmática de glicose foi realizada pelo método enzimático da glicose-oxidase utilizando kit comercial (Labtest Glicose PAP Liquiform n<sup>o</sup> 84). A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose formando ácido glucônico e peróxido e hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que por sua vez, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra, com leitura em  $\lambda = 490$  nm em leitora de microplacas.

### 2.4.3 Proteínas totais plasmática

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) utilizando como padrão protéico a albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas em leitora de microplaca em  $\lambda = 595$  nm.

### 2.4.4 Osmolalidade

A osmolalidade plasmática foi determinada por depressão do ponto de congelamento em micro-osmômetro ( $\mu$ OSMETTE - Precision Systems 5004).

### 2.5 Análise estatística

Os dados estão apresentados com média, desvio padrão, erro padrão da média, amplitude de variação e coeficiente de variação. Os resultados foram avaliados utilizando o T (Student's T teste), com 95 % de confiança, verificando a existência ou não de diferenças significativas entre as médias dos parâmetros encontrados em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. A análise foi realizada utilizando o programa GraphPad Instat Versão 3.0 e o nível de significância aceito foi de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS

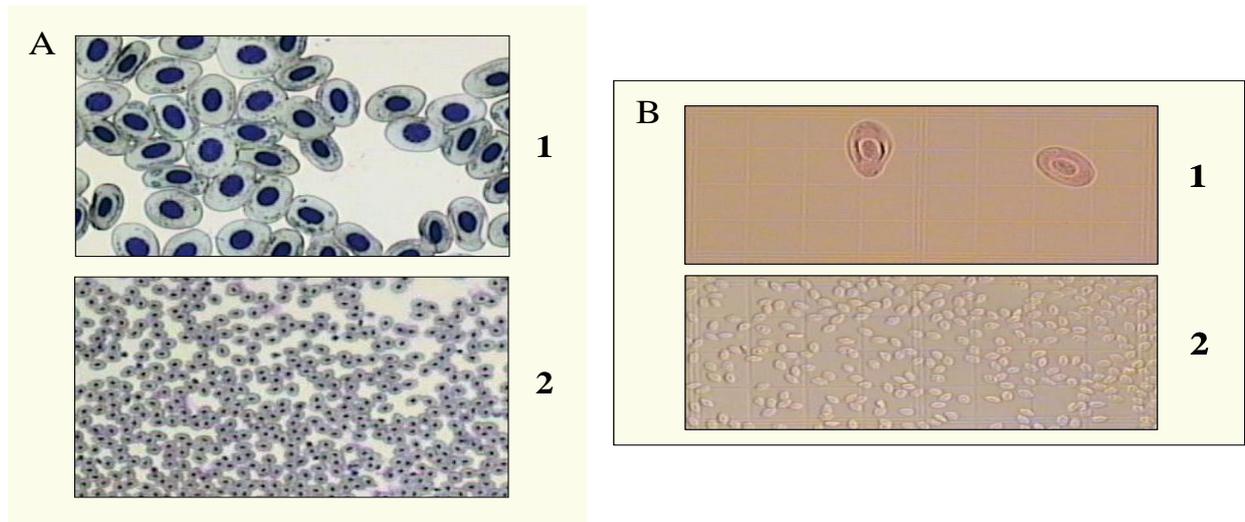
### 3.1 Células sanguíneas

As tabelas 1 e 2 mostram as dimensões das células sanguíneas e seus respectivos núcleos de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. As células sanguíneas de *L. paradoxa* são excepcionalmente grandes e pouco numerosas comparadas as de *H. unitaeniatus* (Figuras 2, 3 e 4). A figura 2 mostra eritrócitos em extensões sanguíneas (A) e na câmara de Neubauer (B) nas duas espécies e as figuras 3 e 4, mostram as células sanguíneas identificadas no sangue periférico dessas espécies. Os eritrócitos de ambas as espécies são elípticos e nucleados e o citoplasma é abundante, acidófilo e possuem inclusões citoplasmáticas; o núcleo é central, acompanha a forma da célula e tem cromatina condensada (Figuras 3A, 4A). Os eritroblastos (eritrócitos imaturos) são predominantemente redondos (células e núcleos) e a cromatina nuclear não é densa

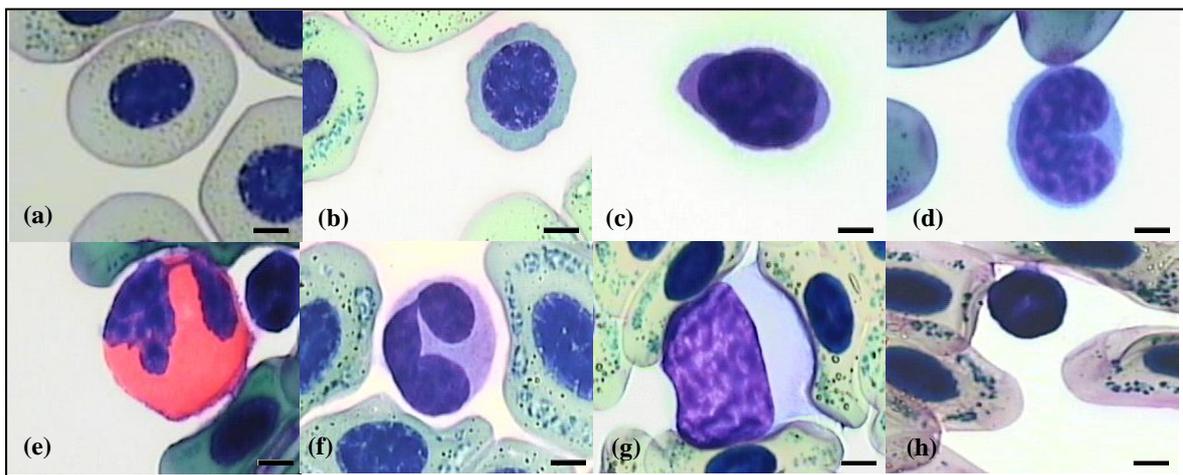
(Figuras 3B, 4B); em *L. paradoxa* constituíram 0,60 % do total de células sanguíneas, este valor foi significativamente maior que o observado em *H. unitaeniatus* onde representaram apenas 0,14 % do total de células sanguíneas.

Os trombócitos são elípticos e ligeiramente alongados; em *L. paradoxa* ocasionalmente apresentam aspecto arredondado e periferia ligeiramente irregular, o núcleo tem a mesma forma da célula ocupando a maior parte desta, o citoplasma é reduzido, ligeiramente basófilo e sem inclusões (Figura 3C) e em *H. unitaeniatus* o citoplasma é mais abundante (Figura 4C).

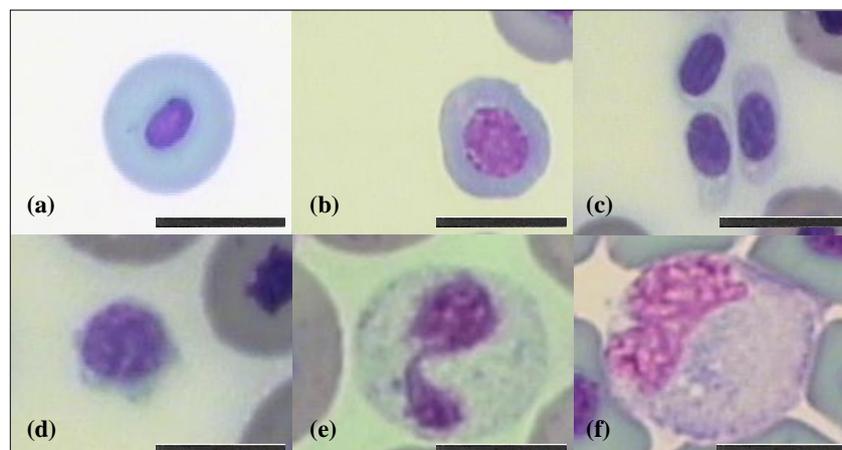
Em ambas as espécies os linfócitos são redondos, apresentam relação núcleo/citoplasma alta, cromatina densa e nucléolo não visível; o citoplasma é ligeiramente basófilo sem grânulos (Figuras 3D e 4D). Em *L. paradoxa*, os eosinófilos são grandes (Tabela 1) e arredondados, citoplasma abundante com projeções citoplasmáticas e grânulos acidófilos fortemente corados de laranja, o núcleo bilobado tem cromatina densa (Figura 3E); em *H. unitaeniatus* não foram encontrados eosinófilos no sangue periférico. Os neutrófilos também apresentaram formato arredondado, citoplasma com numerosos grânulos acidófilos, núcleo segmentado, sendo alguns multilobulados (Figuras 3F, 4E). Os monócitos foram os maiores leucócitos encontrados em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, com forma alongada ou arredondada, núcleo grande e excêntrico, o citoplasma é abundante, ligeiramente basófilo e não possui grânulos (Figuras 3G, 4F). Os basófilos foram as menores células da série branca encontradas em *L. paradoxa*, o núcleo é redondo acompanhando o formato da célula e possui cromatina densa, o citoplasma apresenta granulações que recobrem o núcleo (Figura 3H). Essas células não foram encontradas no sangue periférico de *H. unitaeniatus*.



**Figura 2** - Extensões sanguíneas para contagem de eritrócitos, trombócitos e leucócitos em *L. paradoxa* (A1) e *H. unitaeniatus* (A2). Retículo da câmara de Neubauer para contagem de eritrócitos em *L. paradoxa* (B1) e *H. unitaeniatus* (B2). Objetiva 10x.



**Figura 3** - Fotomicrografia das células do sangue periférico de *L. paradoxa*, (a) eritrócitos, (b) eritroblasto, (c) trombócito (d) linfócito, (e) eosinófilo, (f) neutrófilo, (g) monócito e (h) basófilo. Barra de 10 $\mu$ m.



**Figura 4** - Fotomicrografia das células do sangue periférico de *H. unitaeniatus*, (a) eritrócito, (b) eritroblasto, (c) trombócitos (d) linfócito, (e) neutrófilo, (f) monócito. Barra de 10 $\mu$ m.

**Tabela 1** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das dimensões (volume, diâmetro maior e diâmetro menor) de eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos em *L. paradoxa* (n = 10).

	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
<b>Eritrócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	10911,57	2690,57	850,83	7111,10 – 15714,00	24,65
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	59,04	4,73	0,63	48,49 – 72,48	8,01
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	30,51	4,22	0,47	23,87 – 37,19	13,83
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	705,24	75,35	13,99	556,16 – 839,64	10,68
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	26,02	1,98	0,27	21,56 – 30,83	7,60
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	14,89	2,53	2,53	1,40 – 19,20	16,99
<b>Eritroblastos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	2078,34	572,80	147,90	1221,40 – 3288,40	27,56
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	32,06	3,78	1,26	26,72 – 37,55	11,79
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	28,28	3,41	1,13	23,47 – 34,38	12,05
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	825,94	134,13	40,44	561,97 – 971,77	16,23
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	23,82	1,82	0,55	21,61 – 27,22	7,64
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	21,08	1,21	0,36	19,47 – 22,82	5,74
<b>Trombócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	1181,36	190,45	44,89	889,93 – 1509,80	16,12
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	31,70	1,96	0,61	29,53 – 35,41	6,18
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	21,56	1,58	0,47	18,81 – 24,80	7,32
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	868,89	187,76	44,25	647,87 – 1223,60	21,60
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	29,13	1,37	0,35	26,06 – 31,78	4,70
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	17,90	1,45	0,42	14,65 – 19,27	8,10
<b>Linfócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	1092,87	239,97	66,55	742,47 – 1489,80	21,95
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	27,21	2,61	0,82	22,90 – 32,66	9,59
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	24,87	3,02	0,95	20,67 – 29,99	12,14
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	852,91	157,39	43,65	628,73 – 1102,00	18,45
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	26,02	2,18	0,68	21,93 – 29,73	8,37
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	22,17	2,26	0,71	19,13 – 27,44	10,19
<b>Eosinófilos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	5474,59	1338,00	357,59	3508,20 – 8335,40	24,44
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	48,87	6,53	1,97	37,71 – 56,85	13,36
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	41,15	3,89	1,23	33,67 – 46,68	9,45
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	1397,81	767,50	205,12	618,36 – 3305,20	54,90
<b>Neutrófilos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	3553,37	479,37	109,98	2632,30 – 4327,00	13,49
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	41,97	2,88	0,68	37,54 – 47,47	6,86
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	36,56	2,11	0,48	30,99 – 40,27	5,77
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	920,04	97,09	30,70	766,70 – 1070,40	10,55

Monócitos					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	9639,86	2027,10	641,01	7593,10 – 12994,30	21,02
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	107,08	5,75	1,73	100,26 – 115,15	5,36
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	53,56	5,40	1,62	43,58 – 60,43	10,08
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	3282,53	558,66	176,66	2347,50 – 4472,60	17,01
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	85,93	7,20	2,27	74,04 – 94,72	8,37
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	46,01	5,59	1,68	38,04 – 55,04	12,14
Basófilos					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	321,36	51,06	15,39	234,63 – 396,82	15,89
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	36,52	0,65	0,24	35,52 – 37,48	1,77
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	33,52	0,96	0,33	32,17 – 34,74	2,86

**Tabela 2** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das dimensões (volume, diâmetro maior e diâmetro menor) de eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos em *H. unitaeniatus* (n = 10).

	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV(%)
<b>Eritrócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	738,69	118,13	15,64	570,71 – 1064,50	15,99
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	12,43	0,67	0,09	10,55 – 13,98	5,39
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	10,23	0,55	0,07	8,88 – 11,33	5,37
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	36,24	6,91	0,78	23,65 – 57,75	19,06
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	4,77	0,43	0,10	4,24 – 5,57	9,01
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	3,24	0,30	0,07	2,70 – 3,78	9,25
<b>Eritroblastos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	304,84	28,55	5,95	248,51 – 362,97	9,36
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	9,21	0,40	0,08	8,46 – 9,97	4,34
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	8,99	0,47	0,09	8,06 – 9,86	5,22
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	80,12	19,41	5,19	53,75 – 118,70	24,22
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	6,28	0,42	0,10	5,73 – 6,97	6,68
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	5,63	0,58	0,15	4,59 – 6,60	10,30
<b>Trombócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	299,32	72,81	11,65	191,07 – 419,88	24,32
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	11,25	0,94	0,18	9,12 – 12,84	8,35
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	4,58	0,62	0,12	3,49 – 6,03	12,78
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	108,46	22,83	4,86	70,04 – 151,96	21,04
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	7,02	0,48	0,09	6,00 – 8,01	6,83
<b>Linfócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	310,25	108,38	16,92	137,10 – 592,05	34,93
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	8,86	1,26	0,20	6,94 – 12,93	14,22
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	7,20	0,97	0,15	5,65 – 9,78	13,47
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	146,77	63,02	10,09	63,75 – 320,11	42,93
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	7,15	1,10	0,20	5,46 – 10,44	15,38
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	5,75	0,64	0,12	4,76 – 7,38	11,13
<b>Neutrófilos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	1079,31	304,02	63,396	703,68 – 1946,20	28,16
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	14,07	1,37	0,29	11,81 – 17,58	9,73
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	12,14	1,18	0,25	9,58 – 14,52	9,71
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	143,44	38,45	7,14	90,45 – 243,20	26,80
<b>Monócitos</b>					
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	2434,38	453,62	94,58	1869,20 – 3048,70	18,63
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	17,65	1,70	0,34	15,43 – 20,02	9,63
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	16,54	1,03	0,21	15,15 – 18,37	6,22
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	471,52	74,14	16,18	368,89 – 646,75	15,72
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	11,15	0,72	0,17	9,85 – 13,07	6,45
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	8,30	0,65	0,15	7,25 – 9,70	7,83

### 3.2 Variáveis eritrocitárias e pH sanguíneo

Os valores médios e a amplitude de variação do RBC, [Hb], Hct e os índices hematimétricos: VCM, HCM e CHCM de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* estão apresentados na tabela 3.

Os valores de Hct, Hb e pH sanguíneo foram similares nas duas espécies, entretanto o RBC foi mais baixo em de *L. paradoxa* ( $52 \cdot 10^3 \pm 17 \mu\text{L}^{-1}$ ) do que em *H. unitaeniatus* ( $2386 \cdot 10^3 \pm 370 \mu\text{L}^{-1}$ ). Os índices hematimétricos VCM e HCM foram maiores em *L. paradoxa* enquanto que o CHCM foi maior em *H. unitaeniatus* (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das variáveis eritrocitárias em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

<i>L. paradoxa</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Hematócrito (Hct %)	53,40	8,43	2,66	41,00 – 68,00	15,78
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	10,90*	0,89	0,28	9,28 – 11,89	8,16
RBC (10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup> )	52*	17,00	5,00	32,00 – 85,00	33,00
VCM (fL)	10911,57*	2690,57	850,83	7111,10 – 15714,00	24,65
HCM (pg cel <sup>-1</sup> )	228,19*	70,76	22,37	135,06 – 347,08	31,00
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	20,93*	4,09	1,29	16,87 – 27,51	19,54
<i>H. unitaeniatus</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Hematócrito (Hct %)	51,45	2,31	0,73	48,50 – 55,00	4,48
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	13,41	1,04	0,33	11,01 – 14,54	7,75
RBC (10 <sup>3</sup> μL <sup>-1</sup> )	2386	370	117	1910 – 3070	15
VCM (fL)	219,73	30,28	9,57	162,87 – 253,93	13,78
HCM (pg cel <sup>-1</sup> )	57,00	0,70	0,22	45,00 – 67,90	12,28
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	26,09	2,06	0,65	22,70 – 29,97	7,89

### 3.3. Trombócitos e leucócitos

Os trombócitos e leucócitos foram pouco numerosos na circulação periférica de *L. paradoxa* com valores médios de  $1427 \pm 583 \mu\text{L}^{-1}$  para trombócitos e  $1411 \pm 584 \mu\text{L}^{-1}$  para leucócitos, enquanto que na circulação periférica de *H. unitaeniatus* foram encontrados valores médios de  $66930 \pm 12451 \mu\text{L}^{-1}$  para trombócitos e  $55108 \pm 10800 \mu\text{L}^{-1}$  para leucócitos (Tabela 4).

Os valores médios e a amplitude de variação da contagem linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* estão mostrados na tabela 5 e as percentagens diferenciais estão mostradas na tabela 6. Em *L. paradoxa* os linfócitos foram os leucócitos mais numerosos ( $832 \pm 326 \mu\text{L}^{-1}$ ), seguidos pelos eosinófilos ( $275 \pm 141 \mu\text{L}^{-1}$ ), neutrófilos ( $213 \pm 92 \mu\text{L}^{-1}$ ), monócitos ( $55 \pm 35 \mu\text{L}^{-1}$ ) e basófilos ( $36 \pm 24 \mu\text{L}^{-1}$ ).

Em *H. unitaeniatus* os leucócitos mais numerosos também foram os linfócitos ( $45996 \pm 8859 \mu\text{L}^{-1}$ ) seguidos pelos neutrófilos ( $6910 \pm 2043 \mu\text{L}^{-1}$ ) e monócitos ( $2203 \pm 1583 \mu\text{L}^{-1}$ ). No sangue periférico de *H. unitaeniatus* não foram encontrados eosinófilos, basófilos e células granulocíticas especiais.

Em *L. paradoxa*, dentre os leucócitos, os linfócitos representaram ( $65,00 \pm 4,00$  %), seguidos dos eosinófilos ( $19,00 \pm 3,00$  %), neutrófilos ( $12,00 \pm 2,00$  %), monócitos ( $2,00 \pm 0,60$  %) e basófilos ( $1,40 \pm 0,40$  %). No sangue periférico de *H. unitaeniatus* os linfócitos representaram ( $85,14 \pm 3,21$ %) seguidos dos neutrófilos ( $12,00 \pm 3,00$  %) e monócitos ( $2,90 \pm 1,23$  %) (Tabela 6).

**Tabela 4** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) dos trombócitos e leucócitos totais do sangue em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s.

<i>L. paradoxa</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	1427*	583	184	673 – 2375	41
Leucócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	1411*	584	185	707 – 2501	41
<i>H. unitaeniatu</i> s					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	66930	12451	3937	53522 – 89640	19
Leucócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	55108	10800	3415	43319 – 73745	20

**Tabela 5** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) dos linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos por  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s.

<i>L. paradoxa</i>					
	Media	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	832*	326	103	465 – 1475	39
Eosinófilo ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	275	141	45	107 – 468	51
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	213*	92	30	81 – 342	43
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	55*	35	11	20 – 144	63
Basófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	36	24	8	15 – 84	67
<i>H. unitaeniatu</i> s					
	Media	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	45996	8859	2801	35322 – 63912	19
Eosinófilo ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	6910	2043	646	3974 – 9652	30
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2203	1583	501	945 – 6163	72

**Tabela 6** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) da % de linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos do sangue em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatu*s.

<i>L. paradoxa</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Linfócitos	65,00*	4,00	1,28	58,73 – 73,73	6,21
Eosinófilos	19,00	3,00	1,10	13,82 – 25,24	18,48
Neutrófilos	12,00	2,00	0,47	9,21 – 14,41	12,44
Monócitos	2,00	0,60	0,20	1,80 – 3,98	26,55
Basófilos	1,40	0,40	0,12	0,92 – 1,94	28,77
<i>H. unitaeniatu</i> s					
	Média	SD	SEM	Amplitude de variação	CV (%)
Linfócitos	85,14	3,21	1,01	79,90 – 90,00	3,77
Neutrófilos	11,94	2,74	0,86	7,50 – 14,40	22,94
Monócitos	2,89	1,23	0,39	1,47 – 5,74	42,56

### 3.4. Variáveis fisiológicas e bioquímicas

As concentrações de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ , glicose, proteínas totais e osmolaridade plasmáticas em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, são mostradas na tabela 7.

Foi observado que *L. paradoxa* possuem níveis plasmáticos significativamente menores de  $\text{Na}^+$  ( $101,07 \pm 20,40 \text{ mmol/L}^{-1}$ ),  $\text{Mg}^{+2}$  ( $1,85 \pm 0,44 \text{ mmol/L}^{-1}$ ), glicose ( $68,95 \pm 8,61 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e proteínas totais ( $2,10 \pm 0,37 \text{ g dL}^{-1}$ ) quando comparados aos observados em *H. unitaeniatus* com valores de  $\text{Na}^+$  ( $135,62 \pm 8,73 \text{ mmol/L}^{-1}$ ),  $\text{Mg}^{+2}$  ( $2,50 \pm 0,44 \text{ mmol/L}^{-1}$ ), glicose ( $86,82 \pm 8,10 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e proteínas totais ( $3,17 \pm 0,61 \text{ g dL}^{-1}$ ). Não houve diferenças significativas nos valores de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  e osmolaridade plasmática entre as duas espécies.

**Tabela 7** - Valores médios, desvio padrão (SD), erro padrão da média (SEM), amplitude de variação e coeficiente de variação (CV) das concentrações de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), glicose, proteínas totais, osmolaridade plasmáticas e pH em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* (n = 10). \* Indica diferença estatística (p < 0,05) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

<i>L. paradoxa</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de Variação	CV(%)
Sódio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	101,07*	20,40	5,45	80,00 – 155,00	20,18
Potássio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	3,62	0,65	0,32	2,70 – 4,20	17,95
Cálcio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	1,74	0,39	0,13	1,25 – 2,25	22,41
Cloreto ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	92,56	25,10	7,93	62,30 – 137,86	27,11
Magnésio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	1,85*	0,44	0,13	1,22 – 2,55	23,78
Glicose ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	68,95*	8,61	2,87	56,15 – 84,14	12,48
Proteínas totais ( $\text{g dL}^{-1}$ )	2,10*	0,37	0,14	1,70 – 2,75	17,61
Osmolaridade (mOsmol/Kg)	210,91	12,71	3,67	191,00 – 230,00	6,02
pH	7,43*	0,10	0,03	7,30 – 7,67	1,34
<i>H. unitaeniatus</i>					
	Média	SD	SEM	Amplitude de Variação	CV(%)
Sódio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	135,62	8,73	3,08	126,00 – 150,00	6,43
Potássio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	2,81	1,01	0,32	1,50 – 4,20	35,94
Cálcio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	1,65	0,34	0,11	1,19 – 2,38	20,60
Cloreto ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	103,48	17,21	8,60	81,89 – 119,00	16,63
Magnésio ( $\text{mmol/L}^{-1}$ )	2,50	0,44	0,13	1,51 – 3,31	17,60
Glicose ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	86,82	8,10	2,70	75,38 – 102,12	9,32
Proteínas totais ( $\text{g dL}^{-1}$ )	3,17	0,61	0,18	2,29 – 4,22	19,24
Osmolaridade (mOsmol/Kg)	227,36	26,65	8,03	163,00 – 255,00	11,72
pH	7,17	0,10	0,03	6,95 – 7,29	1,39

## 4 DISCUSSÃO

Várias correlações podem ser estabelecidas entre as variáveis hematológicas, como o número e o tamanho dos eritrócitos e leucócitos, a concentração de Hb, a HCM e a concentração de íons plasmáticos, com a higidez, a filogenia, o modo de vida e a atividade do animal no ambiente em que vive (NUSSEY et al., 1995). Estas informações podem refletir comportamentos fisiológicos distintos entre diferentes espécies, relacionados às possíveis estratégias fisiológicas que dificilmente poderiam ser identificadas por simples observação em seus habitats (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010).

### 4.1 Variáveis eritrocitárias

Como na maioria dos vertebrados os eritrócitos foram as células mais abundantes no sangue periférico de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Em *L. paradoxa* os eritrócitos foram pouco numerosos, predominantemente grandes com volume superior ao observado nos teleósteos (TAVARES-DIAS, 2003), ciclóstomos e elasmobrânquios (WINTROBE, 1934; WILHEM FILHO et al., 1992), sendo semelhantes aos eritrócitos observados nos anfíbios e outros peixes pulmonados (NIKINMAA, 1990; HINE et al., 1990a, b; KOLDKJAER et al., 2002; JENSEN, 2003).

BOSCHINI FILHO (1979) estudando os elementos figurados do sangue periférico do anfíbio ápodo *Typhlonectes compressicaudus*, encontrou eritrócitos grandes, providos de inclusões citoplasmáticas, sendo semelhantes aos observados nos eritrócitos de *L. paradoxa*. A presença de inclusões citoplasmáticas de natureza basofílica, localizados mais frequentemente nos pólos celulares, caracteriza as formas maduras dos eritrócitos (BOSCHINI FILHO, 1979).

Em *H. unitaeniatus* os diâmetros médios dos eritrócitos (célula e núcleo) foram próximos aos encontrados em outros teleósteos de água doce e marinhos, sendo

menores aos encontrados nos ciclóstomos, elasmobrânquios e principalmente em relação aos dipnóicos (PITOMBEIRA et al., 1979).

Eritrócitos menores são associados à maior capacidade de absorção de O<sub>2</sub> devido à maior superfície celular em contato com o meio (PITOMBEIRA, et al., 1979; GRAHAM et al., 1985; LAY e BALDWIN, 1999; BALLARIN et al., 2004) e, em geral, há uma relação inversa entre a atividade do animal, o tamanho dos eritrócitos e o número de eritrócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue (HAWS e GOODNIGHT, 1961; LAY e BALDWIN, 1999).

Estudos demonstram que valores altos de Hct, RBC e [Hb] bem como o menor VCM estão diretamente relacionados a espécies pelágicas e ativas (FAVARETTO et al., 1978; RAMBHASKAR e RAO et al., 1987; LAY e BALDWIN, 1999).

Nas espécies mais ativas onde a taxa metabólica é elevada, a demanda de O<sub>2</sub> é alta e a eficiência da capacidade de locomoção é sustentada por grande massa de músculo vermelho aeróbico, sendo necessário maior número de eritrócitos, maior concentração de hemoglobina e menor volume celular (TANDON e JOSHI, 1976; LAY e BALDWIN, 1999; TAVARES-DIAS et al., 2008 a).

Em contrapartida, espécies sedentárias possuem menor quantidade de eritrócitos, menor concentração de hemoglobina corpuscular média e maior volume de eritrócitos, concomitantemente essas espécies possuem pouco músculo vermelho exaurindo-se rapidamente durante o esforço físico (LAY e BALDWIN, 1999).

Nossos resultados mostraram que *L. paradoxa* exibe características hematológicas de espécies lentas com baixa demanda metabólica, sendo os valores de RBC ( $52 \cdot 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ) e CHCM ( $20,93 \text{ g dL}^{-1}$ ) mais baixos e o VCM ( $10911,57 \text{ fL}$ ) maior que o encontrado na maioria dos peixes teleósteos de respiração puramente aquática (REHULKA, 2000; RANZANI-PAIVA et al., 2002; CAMARGO et al., 2003;

TAVARES-DIAS e MORAES, 2004) e de espécies com respiração aérea facultativa mais ativos como o *Hypostomus regani* (RANZANI-PAIVA et al, 2000 b) e *H. unitaeniatus* estudado no presente trabalho.

O alto valor de VCM encontrado em *L. paradoxa* parece ser uma característica de dipnóicos e de algumas espécies de anfíbios aquáticos. Células sanguíneas gigantes foram identificadas no peixe pulmonado africano *Protopterus aethiopicus* (KOLDKJAER et al., 2002) e australiano *Neoceratodus forsteri* (HINE et al., 1990a, b), como também em algumas espécies aquáticas de anfíbios urodelos e ápodos. Os eritrócitos do anfíbio ápodo *Amphiuma* sp. podem alcançar até 70 µm de diâmetro e VCM de 20,000 fL (NIKINMAA, 1990) e os de *Typhlonectes compressicaudus* podem alcançar até 55 µm diâmetro (TOEWS e MACINTYRE, 1978; BOSCHINI FILHO, 1979), sendo comparável aos encontrados em *L. paradoxa*.

JENSEN et al. (2003) encontraram eritrócitos excepcionalmente grandes no pulmonado africano *Protopterus aethiopicus*, com VCM de 6940,00 ± 293,00 fL. IKECHUKWU e OBINNAYA (2010) estudando os parâmetros hematológicos do pulmonado africano *Protopterus annectens* juvenis e adultos encontraram eritrócitos grandes com 4532,00 ± 176,00 fL e 4500,00 ± 176,00 fL, respectivamente.

Um importante aspecto a ser considerado é a correlação entre tamanho dos eritrócitos com a dimensão do genoma (GREGORY, 2000). Desta forma, GREGORY (2001) observou que existe correlação positiva e significativa entre a medida do diâmetro eritrocitário e o tamanho do genoma nos vertebrados.

Os eritrócitos de *L. paradoxa* contêm 35 vezes mais DNA que os eritrócitos periféricos humanos e o pulmonado *Protopterus aethiopicus* tem o maior genoma entre os vertebrados (GREGORY, 2001), sendo ambos caracterizados por terem eritrócitos muito grandes.

Em *H. unitaeniatus*, que utiliza a bexiga natatória como órgão acessório a respiração, foi observado número significativamente maior de eritrócitos ( $RBC = 2386 \cdot 10^3 \mu L^{-1}$ ) e valores de VCM ( $219,73 \pm 30,28 \text{ fL}$ ), menores do que os encontrados no teleósteo Loricariidae de respiração facultativa *Hypostomus* sp. com  $VCM = 325,20 \text{ fL}$  (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004), no ciclóstomo, o peixe-bruxa *Myxine glutinosa* com  $RBC = 140 \cdot 10^3 \mu L^{-1}$  e  $VCM = 1530,00 \text{ fL}$  (WINTROBE, 1934), nos elasmobrânquios - raias com  $288 \pm 0,09 \cdot 10^3 \mu L^{-1}$  e  $676,5 \pm 194,20 \text{ fL}$  e tubarões com  $403 \pm 0,12 \cdot 10^3 \mu L^{-1}$  e  $686,80 \pm 305,50 \text{ fL}$  respectivamente (WILHEM FILHO et al., 1992) e nos Dipnóicos - *L. paradoxa*  $52 \pm 17 \cdot 10^3 \mu L^{-1}$  e  $10911,57 \pm 10911,57 \text{ fL}$  observados no presente trabalho.

Nossos resultados não corroboram com as observações de PEREZ et al. (1984) e BRILL et al. (1998), que afirmaram que muitas espécies de teleósteos de respiração aérea possuem taxa metabólica elevada apresentando menor RBC e Hct baixo. Essa relação foi observada em cascudos *Hypostomus ancistroides* (MURARI et al. 1992), *Hypostomus regani* (FAVARETTO et al., 1981, SATAKE et al., 1991) e *Hypostomus* sp. (RANZANI-PAIVA et al., 2000 b), peixes de respiração aérea facultativa.

De acordo com FERNANDES et al. (1999) certas espécies de respiração aérea facultativa que vivem em águas correntes e rasas bem oxigenadas e utilizam o estômago como órgão acessório para respiração aérea, não necessitam de número muito alto de eritrócitos para o transporte de  $O_2$ . Entretanto em *H. unitaeniatus* que também é uma espécie de respiração aérea facultativa não observamos tais características, talvez pelo fato de habitarem estuários geralmente em águas hipóxicas.

O valor médio do VCM encontrado para *H. unitaeniatus* foi próximo aos valores observados em muitas espécies de teleósteos de respiração exclusivamente aquática como os da família Characidae - *Salminus maxillosus* e *Piaractus mesopotamicus*

(RANZANI-PAIVA, et al., 1998 b; TAVARES DIAS et al., 1999), Cyprinidae - *Cyprinus carpio* (YOKOYAMA et al., 1996), Prochilodontidae - *Prochloodus lineatus* (SOARES et al., 1994), Cichlidae - *Oreochromis niloticus* (SILVEIRA e RIGORES, 1989), Centrarchidae - *Lepomis macrochirus* (MURRAY, 1984), Erythrinidae - *Hoplias malabaricus* (FRANCISCO, 1995), e superior aos valores encontrados por MARIANO et al. (2009), para esta mesma espécie.

O Hct é um índice hematológico com baixo coeficiente de variação e pode ser um bom indicador dos efeitos causados pelos diversos fatores ambientais a que os peixes estão sujeitos e ao seu modo de vida (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003). Em ambas as espécies analisadas, os valores de Hct foram elevados em relação a maioria dos peixes.

Nos peixes, o Hct é geralmente mais elevado em relação ao encontrado nos mamíferos, explicável pelo maior volume das células e pela presença de núcleo nos eritrócitos. Segundo ETIM et al. (1999), os valores de Hct observados para peixes geralmente são entre 20 % e 35 % raramente observando valores acima de 50 %.

No entanto os valores de Hct encontrados em *L. paradoxo* (53,40%) e *H. unitaeniatus* (51,45%), foram mais altos inclusive em relação aos obtidos por SANCHES et al. (2001) e AMIN-NAVES et al. (2004) em *L. paradoxo*, MARIANO et al. (2009), que estudaram o efeito da exposição ao ar nos parâmetros hematológicos de *H. unitaeniatus* e JOHANSEN et al. (1978 a, b), em *H. unitaeniatus* coletados na região Amazônica (rio Solimões e lagos adjacentes). Segundo HOUSTON et al. (1971) e TAVARES-DIAS e SANDRIN (1998), o uso de anestésico e a metodologia de coleta de sangue podem ser fonte de variação dos resultados hematológicos em peixes. Entretanto nos trabalhos de SANCHES et al. (2001) e AMIN-NAVES et al. (2004) onde

os valores de Hct foram menores que os observados no presente estudo também utilizaram o anestésico benzocaína.

De acordo com RAMBHASKAR e RAO, (1987), valores menores de Hct, ocorrem em peixes mais primitivos na escala evolutiva, nos de ambiente lêntico, nos sedentários, nos bentônicos e nos de respiração aérea enquanto que valores maiores ocorrem em espécies pelágicas e ativas. IKECHUKWU e OBINNAYA (2010), estudando o perfil hematológico do peixe pulmonado africano *Protopterus annectens*, espécie de hábitos sedentários, encontrou valores de Hct de  $28,10 \pm 1,80 \%$  e  $29,20 \pm 2,20 \%$  para espécimes juvenis e adultos respectivamente.

LENFANT et al. (1967), LENFANT e JOHENSEN (1968) e DELANEY e FISHMAN (1977), encontraram respectivamente, para os pulmonados *Neoceratodus forsteri*, *Protopterus dolloi* e *Protopterus aethiopicus*, valores de Hct de  $31,00 \pm 1,20 \%$ ,  $15,00 \pm 2,40 \%$  e  $25,00 \%$ . Nossos resultados não condizem com os valores observados por estes autores, pois *L. paradoxa* que também é pulmonado de hábitos lentos e sedentários apresentou valor médio de Hct =  $53,40 \%$ . O alto valor de Hct observado nesta espécie provavelmente não se deve exclusivamente ao VCM, pois os dipnóicos citados acima que também se caracterizam pelos altos valores de VCM, apresentam baixo Hct.

Da mesma forma, em *H. unitaenitus*, que apresenta VCM próximo ao encontrado em teleósteos de respiração unicamente branquial observamos valores de hematócrito acima do que normalmente se encontra para teleósteos.

Características semelhantes às encontradas em *H. unitaenitus* foram observadas no teleósteo *Amphipnous cuchia* (enguia indiana) com valores médios de Htc =  $55,00 \%$ , hemoglobina =  $13,80$  a  $26,00 \text{ g dL}^{-1}$  e de VCM =  $183,70 \text{ fL}$  como adaptação ao seu habitat. Esta espécie de respiração aérea obrigatória possui brânquias reduzidas e vive

em tocas que podem ser fechadas temporariamente por lama, evitando a entrada de ar (MISHRA et al., 1977). Em decorrência desses fatos essa enguia necessita manter valores elevados do eritrograma para combater a hipóxia. WILHELM FILHO et al. (1992 a) relatam que as diferenças nos valores hematológicos entre os peixes sugerem mecanismos distintos no suprimento de suas respectivas demandas de oxigênio. VAL e ALMEIDA-VAL (1995) relatam que várias espécies de teleósteos da Amazônia mostram alterações nos valores do Hct e do VCM sem qualquer modificação do RBC (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995).

Sendo assim, os altos e semelhantes valores de Hct encontrados nas espécies estudadas provavelmente podem ser: (1) adaptativos (maior eficiência na captação e liberação de O<sub>2</sub>), sendo tais valores uma característica natural desses peixes ao ambiente em que vivem (CADAVID, 1984), pois ficam confinados em lagoas hipóxicas e muitas vezes expostos ao ar (MARIANO, 2006); (2) pela maior [Hb] (FRANKLIN et al., 1993); (3) devido ao volume dos eritrócitos, ou ainda, ao movimento da água do plasma resultando em hemoconcentração ou hemodiluição (FRANKLIN et al., 1993); (4) por terem sido aclimatadas no laboratório num mesmo tipo de ambiente.

Muitas espécies de peixes regulam parâmetros hematológicos de acordo com as condições ambientais (VAL et al., 1990). Alterações nas propriedades físicas e químicas da água, como por exemplo, temperatura e salinidade bem como sazonalidade induzem modificações no eritrograma.

ZANUY e CARRILLO (1985) observaram em *Dicentrarchus labrax* redução da atividade eritropoética no inverno e aumento no verão. SIDDIQUI e NASEEM, (1979) estudando a hematologia do teleósteo dulciaquícola *Labeo rohita*, observaram RBC e Hct mais elevados na estação chuvosa. Contudo, a influência dos fatores físicos e químicos da água e da sazonalidade no quadro hematológico pode diferir entre espécies

idênticas para a mesma característica em espécies diferentes (LUSKOVÁ 1997). SMIT e HATTINGH (1978) estudando o eritrograma de quatro ciprinídeos da África do Sul, oriundos de três localidades com diferenças marcantes de pH, condutividade elétrica e saturação de oxigênio dissolvido, encontraram Hct diferentes para uma mesma espécie de origens distintas.

Devemos considerer ainda, o estado nutricional, maturação gonadal, sexo, variação genética e tamanho corporal, também podendo influenciar significativamente as variáveis hematológicas (KORI-SIAKPERE, 1985; TAVARES-DIAS et al., 2000 b), fatores estes não avaliados no presente estudo.

Outro parâmetro hematológico imprescindível na caracterização fisiológica dos organismos aquáticos é a [Hb]. Vários autores determinaram em peixes de diferentes espécies [Hb] variável entre 4,0 e 17,3 g dL<sup>-1</sup> (VAL et al., 1992; WILHELM FILHO et al., 1992 a; SHIAU e LUNG, 1993; ALLEN, 1994; YOKOYAMA et al., 1996; NAVRÁTIL et al., 1998; TAVARES-DIAS et al., 2000 d; MARTINS et al., 2001 RANZANI-PAIVA et al., 2002; TAVARES-DIAS e MORAES, 2003).

Da mesma forma que as demais variáveis hematológicas, a [Hb] pode estar relacionada com a atividade do animal e modo de respiração. Segundo FAVARETTO et al. (1978), a [Hb] é diretamente proporcional a atividade do animal, sendo esses valores adaptativos, levando em conta as particularidades e necessidades metabólicas do animal.

Valores mais altos de Hb foram encontrados em espécies de hábitos ativos e com respiração branquial, quando comparadas às de baixa atividade e com respiração aéro-branquial (WELLS et al., 1980; PEREZ et al., 1986; RAMBHASKAR e RAO, 1987). IKECHUKWU e OBINNAYA (2010) estudando o pulmonado africano *Protopterus annectens*, espécie relativamente sedentária, encontrou valor mais baixo de [Hb] ( $7,50 \pm 0,40$  g dL<sup>-1</sup>) quando comparado ao teleosteo africano mais ativo *Clarias* sp., cuja [Hb]

foi de  $9,88 \text{ g dL}^{-1}$  (KORI-SIAKPERE e EGOR, 1997). TAVARES-DIAS e MORAES (2004) ressaltam ainda que peixes predadores (carnívoros) possuem maior concentração de hemoglobina quando comparados aos herbívoros e onívoros.

No presente estudo o valor médio da [Hb] determinado em *L. paradoxa* com  $10,90 \pm 0,89 \text{ g dL}^{-1}$  foi maior quando comparado aos valores obtidos por ISAACKS et al. (1978), ( $6,20 \pm 1,50 \text{ g dL}^{-1}$ ) estudando esta mesma espécie em seu ambiente natural e significativamente menor que o observado em *H. unitaeniatus* com  $13,41 \text{ g dL}^{-1}$ . Estes valores são semelhantes aos encontrados em várias espécies de teleósteos ativos e com respiração apenas branquial.

Variações intraespecíficas e interespecíficas ocorrem nos parâmetros sanguíneos dos peixes sendo atribuídas não só a diferentes características de comportamento, mas também, ao habitat, alimentação, clima e outros fatores.

Vale ressaltar que nos estudos hemoglobínicos apresentados no capítulo 3 deste trabalho, *H. unitaeniatus* apresentou hemoglobinas com menor afinidade ao  $\text{O}_2$  quando comparado às hemoglobinas de *L. paradoxa*, talvez por isso a necessidade de maior [Hb] nesta espécie. Sendo assim o estudo da forma e do tamanho dos eritrócitos é de importância para o conhecimento da atividade e hábitos dos peixes, uma vez que indicam a superfície utilizável para as trocas gasosas na função respiratória (HARTMAN e LESSLER, 1964).

Portanto, a importância biológica desta variação consiste essencialmente no aumento da superfície transportadora do oxigênio, elemento de máximo valor nas trocas energéticas do organismo.

Observações dessa natureza levaram HOUSTON (1997) e TAVARES-DIAS e MORAES, (2004) a considerar o Hct, a [Hb] e o RBC bons indicadores da capacidade de transporte de oxigênio dos peixes, permitindo estabelecer relações com a

concentração de oxigênio disponível no habitat de origem do animal. Entretanto tais relações devem ser utilizadas com cautela levando sempre em consideração a grande diversidade de espécies e as diferentes características encontradas entre os indivíduos.

Eritroblastos, eritrócitos imaturos, no sangue periférico também são facilmente identificados devido à forma da célula, menor quantidade de hemoglobina, alta relação nucleoplasmática, presença de núcleo arredondado com cromatina frouxa, e a presença ou não de grânulos citoplasmáticos.

A ocorrência de certa proporção de eritroblastos no sangue periférico dos peixes em todas as fases da vida dos indivíduos não indica disfunção sanguínea, mas a presença de elevado número de eritroblastos podem estar associadas a fatores externos de ordem trófica, física e química (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

DAS et al. (2006) comentam que o efeito do pH da água sobre os parâmetros hematológicos em três espécies de carpas, promove a produção de eritrócitos imaturos, redução da contagem total de eritrócitos e hemoglobina. Em *L. paradoxus* e *H. unitaeniatus* o número de eritroblastos na circulação foram muito reduzidos, 0,53 % e 0,13 % respectivamente.

#### **4.2 Trombócitos e leucócitos**

Os peixes possuem número de leucócitos e trombócitos significativamente mais elevado, quando comparado com outras classes de vertebrados e este número também pode apresentar variações intraespecíficas e interespecíficas (UEDA et al., 1997; RANZANI-PAIVA et al., 1999; TAVARES-DIAS et al., 2000 a, c, d). As variações intraespecíficas são influenciadas por características próprias de cada indivíduo, relacionadas ao caráter migratório dos leucócitos entre a circulação e os órgãos leucopoiéticos (rim e baço), em resposta aos estímulos ambientais (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). As variações interespecíficas podem ser ocasionadas por fatores,

como a sazonalidade (RAIZADA e SINGH, 1981; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004), a reprodução (RAIZADA e SINGH, 1981), o hábito alimentar, as necessidades metabólicas de cada espécie (TANDON e JOSHI, 1976) e as condições ecofisiológicas (RAIZADA e SINGH, 1981; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), as características morfológicas do trombócito e leucócito de peixes teleósteos variam relativamente pouco de espécie para espécie, entretanto nossos resultados mostram diferenças marcantes entre as células de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

Os trombócitos são células do sangue periférico dos vertebrados não mamíferos que correspondem às plaquetas sanguíneas dos mamíferos e podem ser encontradas isoladas ou agrupadas. Em peixes são células multifuncionais, envolvidas na liberação de eicosanóides - mediadores inflamatórios que exercem controle nos processos inflamatórios e na imunidade (LLOYD-EVANS et al., 1994), no processo de coagulação sanguínea, motivo pelo qual seu valor pode ser mascarado após o manejo de confecção de extensões sanguíneas (SENS, 2009) e na defesa orgânica, pois embora não sejam consideradas de linhagem leucocitária, estão envolvidos em processos inflamatórios (MARTINS et al., 2006), além de exercerem atividade fagocitária (TAVARES-DIAS, 2003). A função dos trombócitos como células sanguíneas de defesa orgânica foi proposta por TAVARES-DIAS et al. (2000 a, b); TAVARES-DIAS (2002 a); TAVARES-DIAS e MORAES (2004); TAVARES-DIAS et al. (2004).

Os trombócitos de *Cyprinus carpio* fagocitam partículas de carbono (IMAGAWA et al., 1989) e em *Oncorhynchus mykiss* fragmentos de células, células inteiras e bactérias (HILL e ROWLEY, 1996). MATUSHIMA e MARIANO (1996) relatam que os trombócitos aparecem em maior proporção em tecido inflamatório de *Oreochromis niloticus*, com claras evidências de fagocitose. Estes resultados e a grande

quantidade de glicogênio em trombócitos de *C. carpio* sugerem a participação dos trombócitos na fagocitose.

Os trombócitos, tem sido incluídos erroneamente por vários autores na contagem diferencial dos leucócitos (PARISH et al., 1986; TAVARES-DIAS et al., 2000 a, b). Devido a similaridade dos linfócitos com os protrombócitos em Cyprinodontidae, YOKOYAMA (1947), citado por GARDNER e YEVICH (1969), sugere que os linfócitos são precursores dos trombócitos. Entretanto RIBEIRO (1978) descreveu o trombócito, como elemento de linguagem própria, sem nenhuma ligação com a linfocitária (BLAXHALL, 1972 e ALEXANDER et al., 1980). Utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET), TAVARES-DIAS e MORAES (2007) concluíram que os trombócitos diferem claramente de todas as outras populações de leucócitos porque possuem estruturas vesiculares e microtubulares específicas em seu citoplasma.

RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004) salientam a facilidade de confundir trombócitos com leucócitos durante as contagens, pois, devido à sua fragilidade, os primeiros podem perder citoplasma durante o preparo das extensões ficando apenas o núcleo.

Nas espécies estudadas os números de trombócitos tiveram valores médios superiores à soma de todas as linhagens de leucócitos sendo mais numerosos em *H. unitaeniatus*. Os trombócitos encontrados em *L. paradoxa* geralmente apresentaram-se ovais e fusiformes, com pouco citoplasma aparente e elevada relação nucleoplasmática. Estas células foram similares as encontradas no peixe pulmonado australiano *Neoceratodus forsteri* (HINE et al., 1990 a, b) e no anfíbio ápodo *Typhlonectes compressicaudus* (BOSCHINI FILHO, 1979) em que os trombócitos são maiores do que dos teleósteos, com diâmetro médio de 20  $\mu\text{m}$  e correspondendo a 2,70 % dos eritrócitos. Em *H. unitaeniatus*, os trombócitos foram menores, alongados, com

citoplasma mais aparente e menor relação nucleoplasmática, sendo semelhantes aos observados na maioria dos teleósteos.

Em relação aos leucócitos estes são as células responsáveis pela defesa humoral e celular do organismo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007), sendo que seu significado fisiológico é parcialmente condicionado à capacidade de realizarem migração seletiva e diapedese (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Estas células integram diferentes linhagens celulares nas quais podem ser diferenciados morfológicamente pela presença ou ausência de granulação, assim como, pelas suas características morfológicas, tintoriais e citoquímicas (SATAKE et al., 2009). Em peixes, a identificação das células da série leucocitária, em comparação com aquelas das séries eritrocítica e trombocítica, é bem mais difícil. Segundo RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004), isso ocorre principalmente pela dificuldade em distinguir os trombócitos dos linfócitos e os monócitos dos neutrófilos, sobretudo quando se trata de células jovens das diferentes linhagens. Entretanto nas espécies estudadas os diferentes tipos de leucócitos encontrados apresentaram características bastante peculiares tornando fácil a identificação dos mesmos.

Na contagem diferencial de leucócitos em *L. paradoxa*, a porcentagem de linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos foram semelhantes ao observado por WARD (1969) e HINE et al. (1990 a) em *N. forsteri* e semelhante ao observado em algumas espécies de anfíbios como no anuro *Rana catesbiana* (FENERICK JUNIOR, 2006). Entretanto BIELEK e STRAUSS (1993) estudando o sangue periférico de *L. paradoxa*, observaram a presença de apenas três granulócitos. RIBEIRO et al. (2007) estudando células de defesa nesta mesma espécie, observaram a presença de células polimorfonucleares com raros grânulos citoplasmáticos, considerada pelos referidos autores como um tipo de agranulócito e três tipos de granulócitos.

Entretanto as células polimorfonucleadas observadas por estes autores mostraram-se análogas aos neutrófilos encontrados no sangue humano e são morfológicamente semelhantes aos neutrófilos encontrados por HINE et al. (1990 a) no sangue de *N. forsteri* e aos neutrófilos encontrados em *L. paradoxa* no presente estudo. Já os granulócitos I, II e III observados por RIBEIRO et al. (2007) mostraram-se morfológicamente semelhantes aos eosinófilos observados por BIELEK e STRAUSS (1993) e no presente estudo. Provavelmente os granulócitos I, II e III observados por RIBEIRO et al. (2007) representam eosinófilos em diferentes etapas de desenvolvimento.

Em *H. unitaeniatus* foram observados linfócitos, neutrófilos e monócitos, não sendo encontrado eosinófilos e basófilos, resultados estes similares aos observados em *Hoplias malabaricus* (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004) e em varias espécies de teleósteos de respiração aquática.

Os linfócitos são considerados células hematopoéticas multipotenciais e imunocompetente (ELLIS, 1977; RIBEIRO et al., 2007). Segundo PETRY (2008), essas células geralmente são semelhantes entre as diferentes espécies de peixes. No leucograma de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, os linfócitos foram os que apresentaram menor coeficiente de variação e diferenciaram-se principalmente em relação ao tamanho. Os linfócitos são predominantemente esféricos semelhantes aos encontrados em outros vertebrados e de tamanhos variados, representando provavelmente diferentes estágios funcionais de uma mesma população celular e não populações celulares separadas (VEIGA et al., 2000). Em ambas espécies o núcleo dos linfócitos apresentou-se arredondado geralmente acompanhando o formato da célula e apresentando, algumas vezes, forma levemente reniforme nos linfócitos de *L. paradoxa*. A cromatina mostrou-se compactada sem nucléolos. A relação núcleo-citoplasma foi elevada nos linfócitos de

ambas as espécies, sendo o citoplasma escasso, fortemente basofílico e sem granulações visíveis (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004, TAVARES-DIAS et al., 2002 a).

Significativamente mais numerosos em *L. paradoxa* os linfócitos foram em ambas as espécies os leucócitos predominantes como na maioria dos peixes: *Opisthonema oglinum* (PITOMBEIRA et al., 1968), *Mugil incilis* e *M. curema* (PITOMBEIRA et al., 1969), *Scomberomorus maculatus* (PITOMBEIRA e MARTINS, 1970), *Pimelodus maculatus* (RIBEIRO, 1978), *Rhamdia hilarii* (KAVAMOTO et al., 1983), *Pseudoplatystoma corruscans* (SATAKE et al., 1994; BEELEN et al., 1998), *Mugil platanus* (RANZANI-PAIVA, 1995 a), *Brycon* sp. (RANZANI-PAIVA, 1996), *Oncorhynchus mykiss* (RANZANI-PAIVA et al., 1998 a), *Serrasalmus marginatus*, *Hypostomus* sp. e *Loricariichthys platymetopom* (RANZANI-PAIVA, et al., 2000 a), *Pimelodus maculatus* (SILVA-SOUSA et al., 2000), *Pimelodus maculatus* (JERÔNIMO et al., 2009) e *Oxydoras niger* (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010).

Os neutrófilos, em muitas espécies representam a mais numerosa linhagem de defesa imune (MANNING, 1994). Sendo mais frequentes no sangue periférico de *Prochilodus scrofa*, *Schizodon borelli*, *Pimelodus maculatus*, *S. marginatus*, *Hoplias malabaricus*, *Parauchenipterus galeatus* e *Serrassalmus spilopleura* (RANZANI-PAIVA et al., 2000 a). Possuem capacidade fagocitária e em situações de estresse podem ter seu número aumentado significativamente em 24 horas (SECOMBES, 1996). Com porcentagens semelhantes nas espécies estudadas, representaram a segunda linhagem mais numerosa de leucócitos em *H. unitaeniatus* e a terceira mais numerosa em *L. paradoxa*.

Nas duas espécies estudadas, embora com volume maior em *L. paradoxa*, os núcleos dos neutrófilos foram segmentados, mas não multilobado o que é raro em peixes embora os neutrófilos de *Thymallus arcticus nigrescens* apresente até 5 lóbulos

(RHYZOVA e TUGARINA, 1979). Os grânulos citoplasmáticos foram pouco visíveis e difusos nos neutrófilos de *L. paradoxa* e mais evidentes formando finos grumos em *H. unitaeniatus*.

Sendo excepcionalmente grandes em *L. paradoxa*, os monócitos foram os maiores leucócitos encontrados em ambas as espécies. Segundo RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, (2004), os monócitos normalmente são os maiores leucócitos do sangue periférico dos peixes. Representando aproximadamente 2% dos leucócitos circulantes no sangue periférico das espécies analisadas, estes foram os leucócitos menos numerosos em *H. unitaeniatus*.

Neste estudo, os monócitos apresentaram poucos pseudópodes e foram semelhantes aos de outros vertebrados estando de acordo com DOGGETT e HARRIS (1989). Segundo estes autores em muitas espécies de peixes os monócitos apresentam poucos pseudópodes e moderada propriedade fagocítica. O núcleo destas células apresentou-se predominantemente excêntrico, alongado, semelhante ao observado por TAVARES-DIAS et al. (2002 b).

Em relação aos eosinófilos, estes são escassos ou mesmo estão ausentes no sangue dos peixes, sendo mais abundantes no tecido hematopoético, submucosa intestinal, líquido peritoneal, mesentério e brânquias (HINE e WAIN, 1988; RANZANI-PAIVA 1995 b). Esses granulócitos foram observados em pequeno número em *Oxydoras niger* (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010) e não foram observados no sangue circulante de *Onchorhynchus mykiss* (POWELL et al., 1990; FORERO,1995) e na circulação e em órgãos hematopoéticos de *Pleuronectes platessa* (FIJAN, 2002). Entretanto SAUNDERS (1966) identificou eosinófilos em 65 de 116 espécies de teleósteos e RANZANI-PAIVA e EIRAS, (1992) encontraram eosinófilos em 10 de 13 espécies estudadas no Rio Paraná.

Em peixes as funções dos eosinófilos ainda não são totalmente esclarecidas. O percentual de eosinófilos aumenta em *Tilapia zilli* aclimatadas em água com elevado grau de salinidade (FARGHALY et al., 1973) e alto percentual dessa célula ocorre em *Clupea pallasii* (ZHITENEVA et al., 1986), *Cyprinus carpio* (RANZANI-PAIVA et al., 1987), *Piaractus mesopotamicus* (ALEXANDRINO et al., 1995; RANZANI-PAIVA et al., 1999), *Colossoma macropomum* (RANZANI-PAIVA et al., 1999) e *Leporinus macrocephalus* (TAVARES-DIAS et al., 2000 e) associado a doença. EIRAS et al. (1995) encontraram altas porcentagens de eosinófilos no sangue periférico de pacus e tambaquis, parasitados por protozoários. MOURA et al. (1998) observaram aumento significativo dos eosinófilos circulantes em *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposto a hipóxia e a hipoxia sem acesso a superfície da água e não observaram a presença de eosinófilos em *Hoplosternum littorale* (tamoatá) em qualquer das condições experimentais. Embora aparentemente saudáveis e sem terem sido expostas a qualquer condição experimental, *L. paradoxa* apresentou 275 de eosinófilos por  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue, representando a segunda linhagem mais numerosa de leucócito no sangue periférico desta espécie. Nestas espécies estas células caracterizaram-se pelas numerosas projeções que levam à formação de pseudópodes e muitos grânulos citoplasmáticos. Resultados semelhantes foram observados por RANZANI-PAIVA e EIRAS (1992) que observaram em *Megalancistrus aculeatus* elevado percentual desse granulócito, mas sem indicações de que essa quantidade alta tenha sido influenciada por parasitose ou qualquer outro tipo de patologia.

Os basófilos foram às células de defesa orgânica, menos abundantes e menores encontrados em *L. paradoxa*. A função dos basófilos de peixes também não está definida em peixes e parece estar ligada aos processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (ROBERTS, 1981). Estas células ainda não foram

associadas a nenhum mecanismo de defesa conhecido, em peixes. Segundo ELLIS (1977), a presença de basófilos no sangue periférico de peixes é aceita por alguns autores e discutida por outros. A ausência e a baixa frequência dos basófilos têm sido relatadas em várias espécies de peixes por RANZANI PAIVA e GODINHO (1983), VEIGA et al. (2000) e SILVA-SOUZA et al. (2002).

Nas duas espécies, não foram identificadas as células granulocíticas especiais (CGE), células grandes e muito semelhantes aos neutrófilos. ROUBAL (1986) refere-se a estas células como neutrófilos tipo 1 e BARBER (1978), RIBEIRO (1978) e LORENZI (1999) sugerem a possibilidade de que esses leucócitos sejam células precursoras dos neutrófilos. MARTINS et al. (2000 a) sugerem que estes granulócitos sejam mais um tipo de célula que compõem o leucograma dos peixes, sendo frequentes em animais portadores de parasitas e inflamações, contudo, RANZANI-PAIVA (1996) encontrou elevado percentual dessas células na circulação de *Brycon* sp. aparentemente saudáveis. Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), essas células aparecem em percentual relativamente baixo ou até mesmo ausente em espécies das famílias Characidae, Ciprinidae, Erythrinidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Salmonidae, Ictaluridae, Mugilidae e Cichlidae.

De acordo com BARBER e WESTERMANN (1978), estas células ocorrem frequentemente em certos grupos taxonômicos e estão ausentes em outros. Estes autores estudando 58 espécies de peixes de água salgada e dulciaquícola, sendo a maioria teleósteos, observaram a presença de células granulocíticas em 30 espécies. RANZANI-PAIVA e EIRAS (1992) estudando 13 espécies de teleósteos, do Rio Paraná, verificaram que somente *Prochilodus lineatus*, *Pimelodus maculatus*, *Megalonema platana* e *Hoplosternum littorale* apresentaram células granulocíticas nas extensões. Da mesma forma que em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, essa célula também não foi encontrada

nas extensões sanguíneas de agnatas e cartilagosos (BARBER e WESTERMANN 1978).

Segundo CAMPBELL (2006) e TAVARES-DIAS (2008 a) as variações interespecífica em relação aos trombócitos e leucócitos não se devem apenas às diferentes condições ecofisiológicas. As espécies analisadas no presente estudo apresentam o mesmo tipo de habitat, no entanto apresentaram diferenças em seus leucogramas. Sendo assim deve-se considerar as características imunológicas peculiares de cada espécie de peixe (TAVARES-DIAS e MORAES, 2007; TAVARES-DIAS, 2008 a). Nos peixes parece haver uma resposta sanguínea distinta para as diferentes espécies frente os fatores ambientais (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010).

#### **4.3 Variáveis plasmáticas**

Segundo TAVARES-DIAS et al. (2008), os estudos das variáveis plasmáticas em peixes, merecem grande atenção porque regulam vários processos celulares, conseqüentemente às avaliações bioquímicas podem ser utilizadas para uma variedade de propósitos.

Da mesma forma que as demais variáveis já discutidas, os níveis de eletrólitos plasmáticos podem variar de acordo com a espécie e o ambiente. Geralmente, em teleósteos de clima temperado, os valores basais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) são aproximadamente  $150 \text{ mmol/L}^{-1}$ , cloreto ( $\text{Cl}^-$ )  $130 \text{ mmol/L}^{-1}$ , potássio ( $\text{K}^+$ )  $3,20 \text{ mmol/L}^{-1}$  e cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ )  $5 \text{ mmol/L}^{-1}$  (STOSKOPF, 1993) enquanto que em teleósteos de clima tropical, os níveis plasmáticos de sódio variam de 103 a  $190 \text{ mmol/L}^{-1}$ , cloreto de 58 a  $193 \text{ mmol/L}^{-1}$ , potássio de 0,80 a  $8,50 \text{ mmol/L}^{-1}$ , cálcio de 1,40 a  $5,50 \text{ mmol/L}^{-1}$  e magnésio de 0,50 a  $2,80 \text{ mmol/L}^{-1}$  (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003), entretanto devido a grande variedade de espécies encontradas nestes ambientes os valores iônicos basais do plasma devem ser interpretados com cautela.

MANGUN et al. (1978) estudando a concentração de íons inorgânicos no sangue de espécies amazônicas em seus ambientes naturais (Alfa Helix - RIGGS, 1979), encontraram no plasma de *L. paradoxa* concentrações de sódio com aproximadamente  $105,10 \pm 7,5$  mmol/L<sup>-1</sup>, cloreto  $97,70 \pm 5,20$  mmol/L<sup>-1</sup>, potássio  $3,20 \pm 0,63$  mmol/L<sup>-1</sup>, cálcio  $1,71 \pm 0,13$  mmol/L<sup>-1</sup> e magnésio de  $9,71 \pm 1,16$  mmol/L<sup>-1</sup>, e em *H. unitaeniatus* concentrações plasmáticas de sódio com valor médio de  $112,60 \pm 4,8$  mmol/L<sup>-1</sup>, cloreto  $103,80 \pm 7,90$  mmol/L<sup>-1</sup>, potássio  $2,78 \pm 0,25$  mmol/L<sup>-1</sup>, cálcio  $1,42 \pm 0,10$  mmol/L<sup>-1</sup> e magnésio de  $3,17 \pm 0,40$  mmol/L<sup>-1</sup>.

IKECHUKWU e OBINNAYA (2010) estudando o perfil hematológico do peixe pulmonado africano *Protopterus annectens* juvenis e adultos encontraram valores de sódio  $99,60 \pm 6,20$  mmol/L<sup>-1</sup> e  $100,46 \pm 4,60$  mmol/L<sup>-1</sup> e potássio  $8,20 \pm 1,30$  mmol/L<sup>-1</sup> e  $8,60 \pm 1,10$  mmol/L<sup>-1</sup> respectivamente. No presente estudo os níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e Cl<sup>-</sup> encontrados em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* encontram-se na faixa da maioria das espécies de peixes tropicais, com exceção do valor médio de íons magnésio ( $1,85 \pm 0,44$  mmol/L<sup>-1</sup>) no plasma de *L. paradoxa* que foi menor que o valor obtido por MANGUN et al., (1978), ( $9,71 \pm 1,16$  mmol/L<sup>-1</sup>) para esta mesma espécie vivendo em ambiente natural.

Em relação às concentrações de glicose, o valor médio igual a  $68,95 \pm 8,61$  mg dL<sup>-1</sup> observado em *L. paradoxa* é semelhantes ao descrito em muitas espécies de teleósteos de clima tropical (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003) e ao pulmonado *P. annectens* com  $68 \pm 8,50$  mg dL<sup>-1</sup> (IKECHUKWU e OBINNAYA, 2010). Em *H. unitaeniatus* o valor médio observado de  $86,82 \pm 8,10$  mg dL<sup>-1</sup> foi significativamente maior que o valor médio observado em *L. paradoxa* e em outros teleósteos dulciaquícolas.

É de conhecimento que a glicose é essencial em animais superiores para o funcionamento dos tecidos (sistema nervoso, eritrócitos, gônadas, etc.), sendo assim muitos animais possuem a habilidade de manter a concentração de glicose sanguínea em nível constante (PLISETSKAYA e KUZ'MINA, 1971; HERTZ et al., 1989). Entretanto diversos fatores ambientais e internos podem afetar os níveis basais de glicose em peixes dentre eles a idade, o sexo, fatores genéticos, alterações ambientais, hábitos alimentares, metabolismo e estresse por captura e manuseio (BARTON e IWANA, 1991 e TAVARES-DIAS e SANDRIM, 1998, NUNES et al, 2010). Mudanças nos níveis de glicose plasmática foram observadas por HILMY et al., (1978) em peixes de diferentes estágios de maturação gonadal. As alterações foram atribuídas a mudanças na taxa de insulina ou mudanças na temperatura da água.

RANZANI-PAIVA e GODINHO (1988) observaram diferenças significativas nos valores de glicose até mesmo em peixes de mesma espécie, estes autores descreveram em adultos de *P. mesopotamicus* valor médio para glicose sanguínea de 110 mg dL<sup>-1</sup>, enquanto ZUIM et al., (1988) encontraram para essa mesma espécie mantida em cativeiro e em ambiente natural valores médios iguais a 156,60 mg dL<sup>-1</sup> e 80,50 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente. Neste contexto, várias são as explicações para os maiores valores de glicose observados em *H. unitaeniatatus* em relação a *L. paradoxa* e outros teleósteos de água doce.

Segundo SANTOS e PACHECO (1999) e ACERETE et al. (2004), os maiores valores nas concentrações de glicose observados em peixes podem ocorrer por estresse, causado por mudanças ambientais, que ocasionam maior atividade metabólica e, conseqüentemente, maior necessidade de energia por parte dos organismos o que possibilita ao animal superar os distúrbios causados pelo agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). FAVARETTO et al. (1978 e 1981) estudando o efeito

da exposição ao ar atmosférico sobre os níveis glicêmicos no teleósteo de respiração aérea facultativa *Plecostomus regani*, espécie comum nos rios e pântanos pobres em oxigênio, observaram notável aumento na concentração de glicose plasmática (de 44,28 mg dL<sup>-1</sup> para 85,13 mg dL<sup>-1</sup>) meia hora após terem sido expostos ao ar atmosférico, sendo este aumento acompanhado pela diminuição das concentrações de glicogênio hepático e muscular. Da mesma forma MARIANO et al. (2009) estudando as respostas fisiológicas de *H. unitaeniatus* expostos ao ar atmosférico, observaram aumento significativo nas concentrações de glicose após 1, 6 e 12 horas de exposição ao ar atmosférico com posterior diminuição após o retorno ao ambiente aquático.

Vários autores sugerem que o estresse causado pela captura e a simples manipulação produz significativo aumento na glicemia em teleósteos devido à ação hiperglicemiante do hormônio cortisol (HATTINGH, 1977; BARTON et al., 1986; SALONIUS e IWAMA, 1993; FORSMANN et al., 1998; BARCELLOS et al., 2001). Essa hiperglicemia em condições de estresse repõe a glicose para o sistema nervoso central (BULLIS, 1993) ou, principalmente, para os músculos. MORATA et al. (1982) e HIGUERA e CARDENAS (1985) afirmam que em teleósteos, a gliconeogênese pode ser aumentada em peixes que recebem alimentação contendo altas concentrações de proteínas. CARNEIRO e AMARAL (1979) e BALDISSEROTO (2002) sugerem que a concentração de glicose plasmática está diretamente relacionada à atividade do animal, assim sendo é mais alta em espécies mais ativas e predadores.

Da mesma forma que a glicose, os níveis de proteínas plasmáticas totais variam amplamente entre as diferentes espécies de peixes, podendo ainda ser influenciado por fatores endógenos e ambientais (BRINATI e AMARAL, 1978; SANTOS, 2009), podendo o estresse provocado pelo manuseio também afetá-la (LARSSON et al., 1976).

Em peixes de água doce os valores de proteína plasmática total observados por vários pesquisadores variam de 2,10 a 8,20 g dL<sup>-1</sup>, sendo mais baixos que a média registrada em mamíferos (8,40 g dL<sup>-1</sup>) (BRINATI e AMARAL, 1978), o que implica em menor pressão osmótica coloidal nos capilares (LARSSON et al., 1976). LARSSON et al. (1976) desenvolveram pesquisas com diversas espécies de peixes marinhos, obtendo resultados sobre a média de concentração protéica bem como o intervalo de distribuição dessa variável. Os valores encontrados foram 3,40 a 5,30 g dL<sup>-1</sup> para ciclóstomos, 2,00 a 3,00 g dL<sup>-1</sup> para, holocéfalo (quimeras), 0,90 a 5,10 g dL<sup>-1</sup> para elasmobrânquios (tubarões e raias) e 1,20 a 11,60 g dL<sup>-1</sup> para teleósteos. Em nossos resultados os níveis plasmáticos de proteínas totais em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* encontram-se dentro dos valores da maioria das espécies de peixes de água doce. Entretanto o valor médio observado em *H. unitaeniatus* foi significativamente maior que em *L. paradoxa*.

Por fim, ao comparar os resultados referentes às variáveis plasmáticas de *L. paradoxa* com *H. unitaeniatus*, peixes taxonomicamente distintos que compartilham o mesmo habitat não foi observado diferenças significativas em relação aos íons potássio, cálcio e cloreto, entretanto as concentrações plasmáticas de sódio, magnésio, glicose e proteínas totais foram significativamente mais altas em *H. unitaeniatus*. Estes resultados não nos permitem afirmar que os maiores valores observados em *H. unitaeniatus* são devido ao estresse da manipulação ou ao tipo de alimentação dos peixes. Talvez estas diferenças ocorram provavelmente devido aos diferentes padrões metabólicos das espécies em questão, estando relacionado ao modo particular de vida. Possivelmente, o fato de *H. unitaeniatus* ser uma espécie predadora e mais ativa que *L. paradoxa*, contribua para os maiores valores encontrados nesta espécie. De acordo VILJOEN e VUREN, (1991) e TAVARES-DIAS e MORAES, (2004), os peixes têm necessidades específicas estando às concentrações de eletrólitos, glicose e proteínas plasmáticas

relacionados diretamente ao modo de vida e na manutenção do equilíbrio osmótico dos mesmos.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a) *L. paradoxa* e *H. unitaeniatatus* apresentam variações dos padrões hematológicos.
- b) *L. paradoxa* apresenta características hematológicas de espécies lentas com baixa demanda metabólica, RBC e CHCM mais baixos e o VCM maior que o encontrado na maioria dos peixes teleósteos, ciclóstomos e elasmobrânquios e semelhante ao observado nos anfíbios urodelos, ápodos e em outras espécies de peixes pulmonados.
- c) Em *H. unitaeniatatus*, o número de eritrócitos é maior e o valor de VCM menor do que os observados nos ciclóstomos, elasmobrânquios e dipnóicos e semelhantes aos observados em várias espécies de teleósteos.
- d) Em *H. unitaeniatatus*, os maiores valores de hemoglobina se devem provavelmente a maior atividade da espécie, ou pelo fato de *H. unitaeniatatus* possuir hemoglobinas com menor afinidade ao oxigênio quando comparadas com as hemoglobinas de *L. paradoxa* (ver Capítulo 3).
- d) Em *L. paradoxa* leucócitos e trombócitos apresentaram-se em menor número e maior tamanho em relação ao observado nos teleósteos, e semelhante ao observado em outros pulmonados e em espécies de anfíbios anuros.
- e) Em *H. unitaeniatatus*, a contagem de leucócito foi semelhante ao observado no Erythrinidae *Hoplias malabaricus*, sendo este quadro hematológico possivelmente uma característica desta família.
- f) Em *H. unitaeniatatus*, os níveis plasmáticos de sódio, magnésio, glicose e proteínas totais foram significativamente mais altos em relação ao observado em *L. paradoxa*,

provavelmente devido aos diferentes padrões metabólicos das espécies em questão, estando relacionado ao modo particular de vida.

g) A possibilidade dos parâmetros analisados estarem relacionados à filogenia das espécies não pode ser descartada, havendo a necessidade de ampliar as investigações na tentativa de se estabelecer modelos que possam responder esta questão.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETE, L., BALASCH, J. C., ESPINOSA, E., JOSA, A., TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) subjected to stress by transport and handling. *Aquac.*, v. 237, p. 167-178, 2004.

ACKERS, G. K., SMITH, F. R. The hemoglobin tetramer: a three-state molecular switch for control of ligand affinity. *Ann. Rer. Biophys. Chem.*, v. 16, p. 583-609, 1987.

ALEXANDER, N., LAURS, R. M., MCINTOSH, A., RUSSEL, W. Haematological characteristics of albacore, *Thunnus alalunga* (Bonnaterre), and skipjack, *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus). *J. Fish Biol.*, v. 16(4), p. 383-396, 1980.

ALEXANDRINO, A. C., RANZANI-PAIVA, M. J. T., ISHIKAWA, C. M., ARANA, S., MANDELLI JÚNIOR, J., EIRAS, A. C. Infestação aguda por *Henneguya* sp. (Protozoa, Myxosporea) e Dactylogyridae (Platyhelminthes, Monogenea) em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae). *Bol. Inst. Pesc.*, v. 22(2), p. 115-119, 1995.

ALLEN, P. Changes in the haematological profile of the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) during acute inorganic mercury intoxication. *Comp. Biochem. Physiol.*, (C) v. 108, p. 117-121, 1994.

AMIN-NAVES, J., GIUSTI, H., GLASS, M. L. Effects of acute temperature changes on aerial and aquatic gas exchange, pulmonary ventilation and blood gas status in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Fitzinger). *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 138, p. 133-139, 2004.

ARAÚJO, C. S. O., TAVARES-DIAS, M., GOMES, A. L. S., ANDRADE, S. M. S., LEMOS, J. R. G., OLIVEIRA, A. T., CRUZ, W. R., AFFONSO, E. C. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (eds). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá. p. 389-424, 2009.

ATENCIO-GARCÍA, V., LÓPEZ, A. G., MENDOZA, D. M., CARRASCO, S. P. Hematology and blood chemistry of juveniles rubio (*Salminus affinis*) (Pisces, Characidae) captured in the river Sinú. *Acta Biol. Colomb.* v. 12, p. 27-40, 2007.

AZEVEDO, T. M. P., MARTINS, M. L., YAMASHITA, M. M., FRANCISCO, C. J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. *Bol. Inst. Pesc.*, v. 32(1), p. 41-49, 2006.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, Ed. UFSM, p. 212, 2002.

BALLARIN, L., DALL'ORO M., BERTOTTO, D., LIBERTINI, A., FRANCESCON, A., BARBARO, A. Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 138, p. 45-51, 2004.

BARBER, D. L., WESTERMANN, J. E. M. Occurrence of the periodic acid-Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance. *J. Fish Biol.*, v. 12, p. 35-43, 1978.

BARCELLOS, L. J. G., WOEHL, V. M., WASSERMANN, G. F. KRIEGER, M. H., QUEVEDO, R. M., LULHIER, F. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard), a South American catfishes. *Aqua. Res.*, v. 32, p. 123-125, 2001.

BARTON, B. A., IWAMA, G. K. Physiological changes in fishes from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* v. 10, p. 3-26, 1991.

BARTON, B. A., SCHRECK, C. B., SIGISMONDI, L. A. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v. 115, p. 245-251, 1986.

BEELEN, R., HEIJDEN, T., BOOMS, R., VERDEGEM, M., PAVANELLI, G. C. Blood values of young Brazilian catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Sci.*, v. 20(2), p. 147-150, 1998.

BIELEK, E., STRAUSS, B. Ultrastructure of the granulocytes of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* e morphogenesis and comparison to other leukocytes. *J. Morphol.*, v. 218, p. 29-41, 1993.

BLAXHALL, P. C. The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. *J. Fish Biol.*, v. 4, p. 549-591, 1972.

BOSCHINI FILHO, J. Elementos figurados do sangue periférico de *Typhlonectes compressicaudus*. Descrição das formas eritrocitárias aos níveis óptico e eletrônico. *Bol. Fisiol. Animal.*, Univ. S. Paulo v. 3, p. 33-38, 1979.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRILL, R. W., COUSING, K. L., JONES, D. R., BUSHELL, P. G., STEFFENSEN, J. F. Blood volume, plasma and circulation time in the high energy-demand teleost, the Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 647-654, 1998.

BRINATI, C. B., AMARAL, A. D. Determinação da concentração protéica total e fracionada do plasma de *Pimelodus maculatus* - Teleosteo (Lacépède 1803). *Bol. Fisiol. Animal.*, Univ. S. Paulo, v. 2, p. 99-112, 1978.

BROWN, B. A. Hematology, principles and procedures. Philadelphia: Lea e Febiger, 2.ed. p. 136, 1976.

BULLIS, R. A. Clinical pathological of temperature freshwater and estuarine fishes. In: STOSKOPF, M. K. (eds). Fish medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 232-239, 1993.

- CADAVID G. E. A. O clima no Pantanal Mato-grossense, Corumbá. Corumbá: Embrapa-CPAP, (Embrapa-CPAP. Circular Técnica, 14), p. 39, 1984.
- CAMARGO, S. O., POUHEY, J. L., VAZ, B. S., PIEDRAS, S., MARTINS, C. Hematological parameters of traíra *Hoplias malabaricus* captured under natural conditions - Erythrocytic series. In: WORD AQUACULTURE, Salvador, BA, Anais, p. 605, 2003.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia de peixes In: TRALL, M. A., BACKER, D. C., CAMPBELL, T. W., DeNICOLA, D., FETTMAN, M. J., LASSEN, E. D., REBAR, A., WEISER, G. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Roca: São Paulo. p. 265-276, 2006.
- CAMPBELL, T. W., MURRU, F. An introduction to fish hematology. Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, v. 12(4), p. 525-532, 1990.
- CARNEIRO, N. M., AMARAL, A. D. The normal blood sugar of *Pimelodus maculatus* (Lapépede, 1803) (Pisces-Teleostei). Comparison between O-toluidina and glucose-oxidase methods. Bol. Fisiol. Animal Univ. S. Paulo, v. 3, p. 39-48, 1979.
- CENTENO, L., SILVA-ACUÑA, R., BARRIOS, R. LUGO, R. S., MATUTE, C., PÉREZ, J. L. Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. Zoo. Trop., v. 25, p. 237-243, 2007.
- CLEM, L. W., MILLER, N. W., BLY, J. E. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: WARR, G. W., COHEN, N. Phylogenesis of immune functions, Boca Raton: CRC Press, p. 191-213, 1991.
- DAS, P. C., AYYAPPAN, S., JENA, J. K. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. Aquac., v. 256, p. 80-87, 2006.
- DAVIS, A. K, MANEY, D. L., MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional ecology, Oxford, v. 22, p. 760-772, 2008.
- De PEDRO, N., GUIJARRO, A. L., LÓPEZ-PATINÓ, M. A. Daily and seasonal variations in hematological and biochemical parameters in tench, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758). Aquac Res., v. 36, p. 1185-1196, 2005.
- DELANEY, R. G., FISHMAN, A. P. Analysis of lung ventilation in the aestivating lungfish *Protopterus aethiopicus*. Am. J. Physiol., v. 233, p. 181-187, 1977.
- DOGGET, T. A., HARRIS, J. E. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, J. Fish Biol., v. 33, p. 747-756, 1989.

- DRUMOND, G. V. F., CAIXEIRO, A. P. A., TAVARES-DIAS, M., MARCON, J. L., AFFONSO, E. G. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Am.*, v. 40(3), p. 591-596, 2010.
- EIRAS, J. C., RANZANI-PAIVA, M. J. T., ISHIKAWA, C. M., ALEXANDRINO, A.C., EIRAS, A. C. Ectoparasites of semi-intensively farmed tropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum* in Brazil. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, v. 15(5), p. 148-151, 1995.
- ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, v. 11, p. 453-491, 1977.
- ETIM, L., EKANEM, S. B., UTIN, A. Haematological profile in two species of catfish, *Chrysichthys nigrodigitatus* (Lacepede) and *Chrysichthys furcatus* (Gunther) from the Great Kwa River, Nigeria. *Glob. J. P. App. Sci.*, v. 5(1), p. 1-4, 1999.
- FALCON, D. R., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., VALLE, J. B. Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno para tilápias-do-nilo. *Rev. Bras. de Zoo. / Braz. J. Animal Sci.*, v. 36, p. 1462-1472, 2007.
- FARGHALY, A. M., EZZAT, A. A., SHABANA, M. B. Effect of temperature and salinity changes on the blood characteristics of *Tilapia zilli*. In: Egyptian littoral lakes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 46, p. 183-193, 1973.
- FAVARETO, A. L. V., PENENUSCI, S. O., SAWAYA, P., LOPES, R. A. Effect of exposure to air on hematological parameters in *Hipostomus regani* (Pices, Loricariidae), Teleost with aquatic and aerial respiration. I. Red Cells. *Copeia* v. 4, p. 918- 920, 1981.
- FAVARETTO, A. L. V., SAWAYA, P., PETENUSCI, S. O., LOPES, R. A. Hematologia do cascudo *Pletoscostomus regani*. *Série vermelha. Biol.*, v. 4, p. 12-17, 1978.
- FENERICK JUNIOR, J., STÉFANI M. V., MARTINS M. L. Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentada com diferentes rações comerciais. *Bol. Inst. Pesc, São Paulo*, v. 32(2), p. 173-181, 2006.
- FERNANDES, M. N., SANCHES, J. R., MATSUZAKI, M., PANEPUCCI, L., RANTIN, F. T. Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. In: VAL A. L., ALMEIDA-VAL V. M. (eds). *Biol. Trop. Fish. Inpa, Manaus*, p. 341-352, 1999.
- FIJAN, N. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bleed channel catfish. *J. Fish Biol.*, v. 60, p. 1142-1154, 2002.
- FITZINGER, L. J. F. J. Vorläufiger Bericht über eine höchst interessante Entdeckung Dr. Natterer in Brasil. *Isis (Oken)* v. 30, p. 379-380, 1837.
- FORERO, A. R. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae). *Rev. Biol. Trop.*, v. 43, p. 283-288, 1995.

- FORSMANN, L., PIRHONEN, J., SOIVIO, A. Effect of long-term stress on the smolting of two forms of brown trout (*Salmo trutta*). *Aquac.*, Amsterdam, v. 168, p. 49-55, 1998.
- FRANCISCO, A. M. Aspectos estruturais, funcionais e adaptativos das hemoglobinas de traíra *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1847) (Characiformes, Erythrinidae). Tese, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP. p. 221, 1995.
- FRANKLIN, C. E., DAVISON, W., MCKENZIE, J. C. The role of the spleen during exercise in the antarctic teleost, *Pagothenia borchgrevinki*. *J. Exp. Biol.*, v. 174, p. 381-386, 1993.
- GARDNER, G. R., YEVICH, P. P. Studies of the blood morphology of three stuarine Cyprinodontiform fishes. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, v. 26, p. 433-447, 1969.
- GLAZOVA, T. N. Physiological and biochemical blood characteristics of some species of tropical fish from the Pacific Ocean. *J. Ichthyol.*, v. 1, p. 95-105, 1976.
- GRAHAM, M. S., HAEDRICH, R. L., FLETCHER, G. L. Hematology of three deep-sea fishes: A reflection of low metabolic rates. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A), v. 80, p. 79-84, 1985.
- GREGORY, T. R. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome*, v. 43, p. 895-901, 2000.
- GREGORY, T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood cells, mol. Diseases*. v. 27, p. 830-843, 2001.
- HARTMAM, F. A., LESSLER, M. A. Erythrocyte measurements in fishes, amphibians and reptiles. *Biol. Bull.*, v. 126(1), p. 83-88, 1864.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indication of stress in the freshwater fish, *Labeo capensis* (Smith). *J. Fish Biol.*, v. 10, p. 191-195, 1977.
- HAWS, T. G., GOODNIGHT, C. J. Some aspects of the hematology of two species of cat fish in relation to their habits. *Physiol. Zool.*, v. 35, p. 8, 1961.
- HERTZ, Y., MADAR, Z., HEPHER, B., GERTLER, A. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*): the effects of cobalt and chromium. *Aquac.*, v. 76, p. 255-267, 1989.
- HIGUERA, M., CARDENAS, P. Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-14C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 81, p. 391-395, 1985.
- HILL, D. J., ROWLEY, A. F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Brit. J. Haematol.* v. 92, p. 200-211, 1996.

HILMY, A. M., SHARAMA, M. B., DOMIATY, N. A. Changes in the blood sugar levels of the scombroid fish *Rastrellinger ranagurte* (Russel) in response to changes in maturity, King Abdual Aziz University, v. 2, p. 23-26, 1978.

HINE, P. M., WAIN, J. M. Observations on the granulocyte peroxidase of teleosts: a phylogenetic perspective. *J. Fish Biol.*, v. 33, p. 247-254, 1988.

HINE, P. M., LESTER, R. J. G., WAIN, J. M. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. Ultrastructure of granulocytes, monocytes and thrombocytes, *Aust. J. Zoo.* v. 38(2), p. 131-144, 1990a.

HINE, P. M., WAIN, J. M., LESTER, R. J. G. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. Enzyme, cytochemistry of blood cells, peritoneal macrophages and melano-macrophages. *Aust. J. Zoo.* v. 38(2), p. 145-154, 1990b.

HINE, P. M. The granulocytes of fish. *Fish Shell. Immunol.*, v. 2, p. 79-88. 1992.

HOUSTON, A. H., MADDEN, J. A., WOODS, R. J., MILES, H. M. Some physiological effects of handling and tricaine methanesulphonate anesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish Res. Bd. Canadá*, v. 28(5), p. 625-633, 1971.

HOUSTON, A. H. Review: Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Trans Am. Fish. Soc.*, v. 126(6), p. 879-894, 1997.

HOUSTON, A. H. Blood and circulation. In: SCHRECK, C. B., MOYLE, P. B., *Methods for fish biology*. Am. Fish. Soc., Maryland, p. 273-334, 1990.

IKECHUKWU, O. A., OBINNAYA C. L. Haematological profile of the African lungfish, *Protopterus annectens* (Owen) of Anambra River, Nigeria. *J. Am. Sci.*, v. 6(2), p. 123-130, 2010.

IMAGAWA, T., HASHIMOTO, Y., KITAGAWA, H., KON, Y., KUDO, N., SUGIMURA, M. Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Vet. Sci.*, Tokyo, v. 51, p. 1163-1172, 1989.

ISAACKS, R. E., KIM, H. D., HARKNESS, D. R. Inositol diphosphate in erythrocytes of the lungfish *Lepidosiren paradoxa* and 2,3 diphosphoglycerate in erythrocytes of the armoured cat fish *Pterygoplichthys* sp. *Can. J. Zool.*, v. 56, p. 1014-1016, 1978.

ISHIKAWA, N. M., RANZANI-PAIVA, M. J. T., LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Vet. Sci.*, v. 13(1), p. 54-63, 2008.

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417, 1993.

JENSEN, F. B., BRAHM, J., KOLDKJAER P., WANG T., MCKENZIE D. J., TAYLOR, W. Anion exchange in the giant erythrocytes of African lungfish. *J. Fish Biol.*, v. 62, p. 1044-1052, 2003.

JERÔNIMO, C. T., MARTINS, M. L., BACHMANN, F., CREINERT-GOULART, J. A., SCHIMITT-JÚNIOR, A., CHIRALDELLI, L. Hematological parameters of *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: Pimelodiade) from polluted and non-polluted sites in the Itajaí-Açu river, Santa Catarina State, Brazil. *Acta Sci. Biol. Sci.*, Maringá, v. 31, p. 179-183, 2009.

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

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

KAVAMOTO, E. T., RANZANI-PAIVA, M. J., TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarri* teleósteo, no estado de desenvolvimento gonadal maduro. *Bol. Inst. Pesc.*, v. 10, p. 53-60, 1983.

KOLDKJAER, P., TAYLOR, E. W., GLASS, M. L., WANG, T., BRAHM, J., MCKENZIE, D. J., JENSEN, F. B. Adrenergic receptors,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and volume regulation in lungfish erythrocytes. *J. Comp. Physiol.*, (B) v. 172, p. 87-93, 2002.

KORI-SIAKPERE, O. Haematological characteristics of *Clarias isheriensis*. *J. Fish Biol.*, v. 27, p. 259-263. 1985.

KORI-SIAKPERE, O., EGOR, V. E. Haematological characteristics of the African mudfish, *Clarias buthupugon* (Pisces: Clariidae). *Bull. Sci. Assoc. Nig.*, v. 21, p. 177-185, 1997.

LARSON, A., JOHANSSON-SJOBECK, M. J., FANGE, R. Comparative study of some hematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. *J. Fish Biol.*, v. 9, p. 425-440, 1976.

LAY, P. A., BALDWIN, J. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. *Fish Physiol. Biochem.*, New York, v. 20, p. 31-35, 1999.

LENFANT, C., JOHANSEN, K., GRIGG, G. C. Respiratory properties of blood and pattern of gas exchange in the lungfish *Neoceratodus forsteri* (Kreffft). *Resp. Physiol.* v. 2, p. 1-21, 1967.

LENFANT, C., JOHANSEN, K. Respiration in the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. Respiratory properties of blood and normal pattern of breathing and gas exchange. *J. Exp. Biol.*, v. 49, p. 437-452, 1968.

- LLOYD-EVANS, P., BARROW, S. E., HILL, D. J., BOWDEN, L. A., RAINGER, G. E., KNIGHT, J., ROWLEY, A. F. Eicosanoid generations and effects on the aggregation of trombocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1215, p. 291-299, 1994.
- LORENZI, T. F. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo, MDSI, p. 641, 1999.
- LUSKOVÁ, V. Annual cycles and normal of hematological parameters in fish. *Acta Sc. Nat. Brno*, v. 31, p. 1-70, 1997.
- MANGUM, C. P., HASWELL, M. S., JOHANSEN, K., TOWLE, D. W. Inorganic íons and pH in the body fluids of Amazon animals. *Can. J. Zool.* v. 56, 1978.
- MANNING, M. J. Fishes. In: TURNER (ed.), *Immunology*. Chichester: John Wiley and Sons, p. 69-100, 1994.
- MARIANO, W. S. Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - SP. p. 72, 2006.
- MARIANO, W. S., OBA, E. T., SANTOS, L. R. B., FERNANDES, M. N. Physiological responses in jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) to atmospheric air exposure. *Rev. Bras. S. Prod. An.*, v. 10(1), p. 210-223, 2009.
- MARTINEZ, F. J., GARCI-RIEIRA, M. P., CANTERAS, M., COSTA, J., ZAMORA, S. Blood parameters in rainbor trout (*Oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 107, p. 95-100, 1994.
- MARTINS, M. L., MORAES, F. R., MORAES, J. R. E., MALHEIROS, E. B. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes: Characidae). *Acta Sci.*, v. 22(2), p. 545-552, 2000.
- MARTINS, M. L., ONAKA, E. M., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatius* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitol.*, v. 46(4), p. 332-336, 2001.
- MARTINS, M. L., TAVARES-DIAS, M., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., NOMURA, D. T. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 56, p. 640-646, 2004a.
- MARTINS, M. L., PILARSKY, F., ONAKA, E. M., NOMURA, D. T., FENERICK Jr., RIBEIRO, K., MYIAZAKI, D. M. Y., CASTRO, M. P., MALHEIROS, E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesc.*, São Paulo, v. 30, p. 71-80, 2004b.

- MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., BOZZO, F. R., MORAES, J. R. E. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: characidae) cultured in Brazil. Bol. Inst. Pesc., São Paulo, v. 32(1), p. 31-39, 2006.
- MATUSHIMA, E. R., MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., v. 33(1), p. 5-10, 1996.
- MISHRA, N., PANDEY, P. K., DATTAMUNSHI, J. S., SINGH, B. R. Haematological parameters of and air-breathing mud eel, *Amphipnous cuchia* (Amphipnoidae; Pisces). J. Fish Biol., v. 10, p. 567-573, 1977.
- MORAES, G., POLEZ, V. L. P., IWAMA, G. K. Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia. Braz. J. Biol., v. 64(1), p. 95-102, 2004.
- MORATA, P., VARGAS, A. M., PITA, M. L., SANCHES-MEDINA, F. Hormonal effects on the liver glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., (B) v. 72, p. 543-545, 1982.
- MOURA, M. A. F., FARIAS I. P., VAL, A. L. Effects of temperatura on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). Braz. J. Med. Biol. Res., v. 27, p. 1589-1598, 1994.
- MOURA, M. A. F., OLIVEIRA, M. I., VAL, A. L. Effects of hypoxia on leukocytes of two Amazon fish: *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. Revista da Universidade do Amazonas. Série Ciências Agrárias, v. 1(2), p. 13-22, 1998.
- MUNKITTRICK, K. P., LEATHERLAND, J. F. Haematocrit values in feral goldfish, *Carassius auratus*, as indicators of the health of the populations. J. Fish Biol., v. 23, p. 153-161, 1983.
- MURARI, R., ALMEIDA, S. A., SATAKE, T., OGARAWARA, T. M., LOPES, R. A. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XXVIII. Parâmetros da série vermelha do cascudo *Hypostomus acistroides* (Thering, 1911) (Pisces, Loricariidae). Ciência e Cultura, v. 44, p. 713-714, 1992.
- MURRAY, S. A. Hematological study of the bluegill, *Lepomis macrochirus*. Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 78(4), p. 787-791, 1984.
- NAVRÁTIL, S., PALIKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V. The effects of pure microcystin and biomass of blue-green algae on blood indices of carp (*Cyprinus carpio*). Acta Vet. Brno, v. 67, p. 273-279, 1998.
- NIKINMAA, M. Vertebrate red blood cells. Adaptations of function to respiratory requirements. Springer-Verlag. p. 119-204, 1990.

- NUNES, P. M. Q., FOIZER, E. R., GOMES, L. C., CHIPPARI-GOMES, A. R. Avaliação da toxicidade do cobre para o piaçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1988) por meio de parâmetros leucocitários e enzimáticos. Acta Sci. B. Sci., Maringá, v. 32(1), p. 87-92, 2010.
- NUSSEY, G., VAN VUREN, J. H. J., PREEZ, H. H. Effect of copper on haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 111(3), p. 369-380, 1995.
- OMOREGIE, E. Changes in the haematology of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Trewavas under the effect of crude oil. Acta Hydrobiol., Cracow, v. 40(4), p. 287-292, 1998.
- PARISH, N., WRATHMELL, A., HART, S., HARRIS, J. E. The leucocytes of the elasmobranch *Scyliorhynchus canicula* - a morphological study. J. Fish Biol., v. 28(5), p. 545-561, 1986.
- PÉREZ, J. E., BOADA, A., OJEDA, G. Blood parameters in fishes III. Hemoglobin concentration, hematocrit and the number of red blood cells in some freshwater fishes of eastern Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr., v. 23(1/2), p. 43-47, 1984.
- PÉREZ, J. E., OJEDA, G., RYLANDER, M. K. Blood parameters in fishes V. Activity level and type of respiration in some marine estuarine and freshwater fishes of Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr., v. 25(1/2), p. 163-173, 1986.
- PETRY, A. Comparação entre as características hematológicas de tilápia do Nilo em propriedades de Joinville e Chapecó, Santa Catarina - Florianópolis - SC. Monografia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- PITOMBEIRA, M. S., MARTINS, J. M. Direct method for White blood count in fishes. Arq. Est. de Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará. v. 6(2), p. 205, 1966.
- PITOMBEIRA, M. S., MARTINS, J. M., FURTADO, E. Hematology of the Atlantic thread herring, *Opisthonema oglinum* (Le Sueur). Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará, v. 8(2), p. 111-116, 1968.
- PITOMBEIRA, M. S., GOMES, F. V. B., MARTINS, J. M. Hematological data on the fishes of the genus *Mugil linnaeus*. Arq. Ciên. Mar. v. 9(2), p. 163-166, 1969.
- PITOMBEIRA, M. S., MARTINS, J. M. Hematology of the Spanish mackerel. Copeia, v. 1, p. 182-186, 1970.
- PITOMBEIRA, M. S., GOMES, F. V. B., MARTINS, M. M. Aspectos hematológicos de jovens do Apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier), do Nordeste do Brasil. Ver. Méd. Univ. Fed. Ceará, v. XIX (1/2), p. 3-17, 1979.
- PLISETSKAYA, E. M., KUZ'MINA, V. V. Glycemia level in the organs of cyclostomes and fish. J. Ichthyol., v. 11, p. 948-958, 1971.

- POUGH, H., JANIS, C. M., HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, p. 480, 2003.
- POWELL, M. D., WHIGHT, G. M., BURKA, J. F. Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration? J. Fish Biol. v. 37, p. 495-497, 1990.
- RAIZADA M. N., SINGH, C. P. Seasonal variations in the differential leucocyte counts (DLC) of *Cirrhinus mrigala*. Indian J. Zoo., v. 22(3), p. 147-150, 1981.
- RAMBHASKAR, B., RAO, K. S. Comparative haematology of ten species of marine fish from Visakhapatnam Coast. J. Fish Biol., v. 30, p. 59-66, 1987.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., GODINHO, H. M. Sobre células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatã, *Prochilodus scrofa*, (Steindachner, 1881 - Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Rev. Bras. Biol., v. 43(4), p. 331-338, 1983.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., ISHIKAWA, C. M., PORTELLA, M. C., CELIBERTO, R. J. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de dimetil-oxi-2-tricloroetilo (Neguvon). Bol. Inst. Pesc. São Paulo, v. 14, p. 83-92, 1987.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., GODINHO, H. M. Características do plasma sanguíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) em condições experimentais de cultivo intensivo. Bol. Inst. Pesc. S. Paulo, v. 16(1), p. 117-121, 1988.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., EIRAS, A. C. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleosteos do Rio Paraná - PR. 7º Simp. Brasil. Aquicul., 2º Enc. Brasil. Patol. Organ. Aquát., Peruíbe, p. 173-182, 1992.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* (Gunther, 1880 - Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarina-lagunar de Cananéia - SP. (Lat. 25°00'S - Long. 47°55'W). Bol. Inst. Pesc. São Paulo, v. 22(1), p. 23-40. 1995a.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia de peixes. Células do sangue periférico. In: SANTOS, H. S. L., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. (eds). Histologia de peixes. p. 1-5, 1995b.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos em pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. Ver. Ceres, v. 43(250), p. 685-696, 1996.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., TABATA, Y. A., EIRAS, A. C. Hematologia comparada entre diplóides e triploides de tutra arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). Rev. Bras. Zool, v. 15, p. 1093-1102, 1998a.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., EIRAS, A. C., RODRIGUES, E. L., VEIGA, M. L., SILVEIRA, V. R., FELIZARDO, N. Análises hematológicas em fêmeas de *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840 - Pisces, Characidae) do Rio Mogi Guaçu - SP. In: Cong. Brás. Zool., 22, Recife, Anais p. 223, 1998b.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., SALLES, F. A., EIRAS, J. C., ISHIKAWA, C. M., ALEXANDRINO, A. C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. Bol. Inst. Pesc. São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1999.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., SILVA-SOUSA, A. T., PAVANELLI, G. C., TAKEMOTO, R. M., EIRAS, A. C. Hematological evaluation in commercial fish species in the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. Acta Scient., v. 22(2), p. 507-513, 2000a.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., SILVA-SOUSA, A. T., PAVANELLI, G. C., TAKEMOTO, R. M., EIRAS, A. C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. Acta Scient., v. 22(2), p. 507-513, 2000b.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., VEIGA, M. L., RODRIGUES, E. L., PACHECO, F. J. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836 - Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. Arq. Biol. Tec., Curitiba - PR, v. 45(2), p. 171-175, 2002.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., SILVA-SOUSA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI PAIVA, M. J., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. P. (eds). Sanidade de organismos aquáticos. Editora Varela, p. 89-120, 2004.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., ROMAGOSA, E., ISHIKAWA, C. M. Hematological parameters of "cachara", *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766 - Osteichthyes, pimelodidae), reared in captivity. Bol. Inst. Pesc., São Paulo, v. 31(1), p. 47-53, 2005.

REHULKA, J. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquac., v. 190, p. 27-47, 2000.

RHYZOVA, L. N., TUGARINA, P. Y. The hematologic norm of the kosogol grayling, *Thymallus arcticus nigrescens*. J. Ichthyol., v. 19(3), p. 130-140, 1979.

RIBEIRO, M. L. S., DA MATTA, R. E., DINIZ, J. A. P., SOUZA, W., NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, T. M. U. Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. Fish Shellfish Immunol. v. 23, p. 178-187, 2007.

RIBEIRO, W. R. Contribuição ao estudo de hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoiéticos do mandi amarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803. Ribeirão Preto. Tese, Fac. Med. Ribeirão Preto - USP, p. 110, 1978.

- RIGGS, A. The Alpha Helix expedition to the Amazon for the study of fish bloods and hemoglobins - A collection of papers. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p. 271, 1979.
- RIOS, F. S., OBA, E. T., FERNANDES, M. N., KALININ, A. L., RANTIN, F. T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the Neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 140, p. 281-287, 2005.
- ROBERTS, R. J. *Patología de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa, p. 366, 1981.
- ROBERTS, R. J. The immunology of teleost. In: *Fish pathology*. London: Bailliere Tindall, p. 135-150, 1989.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (C) v. 125, p. 345-353, 2000.
- ROUBAL, F. R. Blood and other possible inflammatory cells in sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *J. Fish. Biol.*, v. 28, p. 573-593, 1986.
- SADO, R. Y., MATUSHIMA, E. R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus* sp.) ao BCG. *Braz. J. Vet. Resear. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007.
- SADO, R. Y. Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). Tese Universidade de São Paulo, p. 136, 2008.
- SALONIUS, K., IWAMA, G. K. Effects of rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance in juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinok salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 759-766, 1993.
- SANCHES, A. P., SONCINI, R., WANG, T., KOLDKJAER, P. TAYLOR, E. W., GLASS, M. L. The differential cardio respiratory responses to ambient hypoxia and systemic hypoxaemia in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 30, p. 677-687, 2001.
- SANCHO, E., FERNANDEZ-VÉGA, C., SANCHEZ, M., FERRANDO, M. D., ANDREU-MOLINER, E. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-Contaminated Water. *Ecotoxicol. Environ. Safety* v. 46, p. 57-63. 2000.
- SANTOS, M. A., PACHECO, M. *Anguilla anguilla*, stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 35, n. 1, p. 96-100, 1999.

SANTOS, N. C. P. Parâmetros hematológicos e metabólicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetidos a diferentes manejos alimentares. Monografia Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências Pesqueiras curso de engenharia de pesca - Manaus, 2009.

SANTOS, R. B. S., TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e respostas hematológicas de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Solimões, Estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. Bol. Inst. Pesc., São Paulo. v. 36(4), p. 283-192, 2010.

SATAKE, T., LOPES, R. A., SANTOS, H. S. L., NUTI-SOBRINHO, M. A., LOPES, O. V., WATANABE, L. S., BAHLS, A. S., SOARES, T. R. S. Haematological study of brazilian fish. I - Blood parameters in male and female armored catfish *Hypostomus regain* (Ihering, 1905 - Pisces Loricariidae). Rev. UNIMAR, v. 13(2), p. 229-235, 1991.

SATAKE, T., OGASAWARA, T. M., LOPES, R. A., BRENTGANI, L. G., WATANABE, L. S., SALA, M. A. Estudos hematológicos de peixes brasileiros. XVIII. Morfologia dos leucócitos de surubim *Pseudoplatystoma corruscana*, (Agassis, 1929 - Pisces: Pimelodidae). Ver. Esc. Odont., Alfenas, v. 16, p. 31-38, 1994.

SATAKE, F., ISHIKAWA, M. M., HOSANO, H., PÁDUA, S. B., TAVARES-DIAS, M. Relação peso-comprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos de dourado *Salminus brasiliensis*. Bol. Pesq. Desenvol. da Embrapa, v. 51, p. 1-22, 2009.

SAUNDERS, D. C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. Trans. Am. Microsc., Soc., v. 85(3), p. 427-449, 1966.

SECOMBES, C. J., FLECHER, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis., v. 2, p. 53-71, 1992.

SECOMBES, C. J. The Nonspecific immune system: Celular Defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The fish immune system. London: Academic Press, p. 63-105, 1996.

SENS, D. R. Efeitos do triclorfom no crescimento e parâmetros hematológicos de tambaquis (*Colossoma macropomum*). Dissertação, Universidade Federal do Tocantins - UFT Campus Universitário de Araguaína - TO. p. 60, 2009.

SHAH, A. W., PARVEEN, M., MIR, S. H., SAWAR, S. G., YOUSUF, A. R. Impact de helminth parasitism on fish haematology of *Anchar lake*. Pakistan J. nutrit., Faisal., v. 8, p. 42-45, 2009.

SHIAU, S. Y., LUNG, C. Q. No dietary vitamin B<sub>12</sub> required for, juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis aureus* Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 105(1), p. 147-150, 1993.

SIDDIQUI, A. Q., NASEEM, S. M. The haematology of rohu *Labeo rohita*. J. Fish. Biol. v. 14, p. 67-72, 1979.

SILVA SOUZA, A. T., MACHADO, P. M., ALMEIDA S. C. Hematology of fish from Tibagi River. I. Differential white blood cell counts in *Pimelodus maculatus* females. Bol. Inst. Pesc, v. 26(1), p. 33-39, 2000.

SILVA SOUZA, A. T., RANZANI-PAIVA, M. J. T., MACHADO, P. M. Hematologia: o quadro sanguíneo de peixes do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, O. A., PIMENTA, J. A. (eds). A bacia do rio Tibagi. Editora-Edição dos Editores, Londrina, PR. p. 449-471, 2002.

SILVEIRA, R., RIGORES, C. Características hematológicas normais de *Oreochromis aureus* em cultivo. Rev. Lat. Acuicul., v. 39, p. 54-56, 1989.

SMIT, G. L., HATTINGH, J. The effect of respiratory stress on carp haemoglobin. Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 59, p. 369-374, 1978.

SOARES, T. R. S., SATAKE, T., LOPES, R. A., BRENTAGANI, L. G., BAHLS, A. S., WATANABE, I., MARZOCCHI, C. M. Estudos hematológicos de peixes brasileiros XXII. Parametros hematológicos do curimbatá *Prochilodus lineatus* (*P. scrofa*) (Valenciennes, 1836 - Pisces, Prochilodontidae), capturado no rio Paraná, PR, Brasil. Rev. Escol. Farm. Alenas, Alenas - MG, v. 16, p. 39-43, 1994.

SPIX, J. B. V., AGASSIZ, L. Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix. Monachii. Selec. Pisc. Bras.: Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, Pls. 1-48; Part 2: 83-138, Pls. 49-101. Part 1 published June 1829, part 2 Jan. 1831; see Kottelat 1988, Whitehead & Myers 1971, Pethiygoda & Kottelat, 1998.

STOSKOPF, M. K. Fish medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 882, 1993.

TANDON, R. S., JOSHI, B. D. Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts. Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkde, v. 37, p. 293-297, 1976.

TAVARES-DIAS, M., SANDRIM, E. F. S. Características hematológicas de teleósteos brasileiros I. Série vermelha e dosagens de cortisol e glicose do plasma sanguíneo de espécimes de *Colossoma macropomum* em condições de cultivo. Acta Scientiarum, v. 20(2), p. 157-160, 1998.

TAVARES-DIAS M, MARTINS M. L, K. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg) (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustácea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. Rev. Bras. Zool., v. 16(2), p. 553-555, 1999.

TAVARES-DIAS, M., SCHALCH, S. H. C., SILVA, E. D., MARTINS, M. L. MORAES, F. R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivada intensivamente em pesque-pague do município de Franca, SP, Brasil. Ars Veterinaria, v. 16(2), p. 76-82, 2000a.

TAVARES-DIAS, M., MARTINS, M. L., MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros V. Variáveis do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) (Garavello & Britski, 1988 - Anostomidae). *Naturalia*, v. 25, p. 39-52, 2000b.

TAVARES-DIAS, M., SCHALCH, S. H. C., MARTINS, M. L., ONAKA, E. M., MORAES, F. R. Hematological characteristics Brazilian teleosts. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 and *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Zool.*, v. 17(4), p. 899-926, 2000c.

TAVARES-DIAS, M., FRASCÁ-SCORVO, C. M. D., NOVATO, P. F. C., MORAES, F. R. Hematological Characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* and *Oreochromis mossambicus* Under Intensive Rearing. Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture, p. 533-541, 2000d.

TAVARES-DIAS, M., MARTINS, M. L., ONAKA, E. M., FUJIMOTO, R. Y., NOMURA, D. T. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária IV. Características do piauçu, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) infectado com anisaquídeos. Florianópolis, abraoa, p. 96, 2000e.

TAVARES-DIAS, M. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *J. Biosc.*, 2002a.

TAVARES-DIAS, M., MELO, J. F. B., MORAES, G., MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. Variáveis do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32(4), p. 693-698, 2002b.

TAVARES-DIAS, M. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal: Centro de Aquicultura, 2003a.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Haematological evaluation of *Tilapia rendalli*. *Biosc. J.*, Uberlândia v. 19, p. 107-114, 2003b.

TAVARES-DIAS, M., MATAQUEIRO, M. I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus*. *Acta Scient. Biol. Scienc.* v. 26, p. 157-162. 2004.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, SP: Villimpress Complexo Gráfico, 2ed. p. 144, 2004.

TAVARES-DIAS, M., BOZZO, F. R., SANDRIN, E. F. S., CAMPOS-FILHO, E., MORAES, F. R. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Scientiarum. Biol. Sci.*, v. 26(1), p. 73-80, 2004.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*), with an assessment of morphological, cytochemical and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, Davis, v. 36, p. 49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M., BARCELLOS, J. F. M., MARCON, J. L., MENEZES, G. C., ONO, E. A., AFFONSO, E. G. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes, Arapaimidae) in net cage culture. *Electronic J. Ichthyol.*, v. 2, p. 61-68, 2007.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R., IMOTO, M. E. Hematological parameters in two Neotropical freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). *Biosc. J.*, Uberlândia, v. 24(3), p. 96-101, 2008.

TOEWS, D., MACINTYRE, D. Respiration and circulation in an apodan amphibian. *Can. J. Zool.* v. 56, p. 998-1004, 1978.

UEDA I. K., EGAMI, M. I., SASSO W. S., MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei), Part I. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 34(5), p. 270-275, 1997.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. L. F., AFFONSO, E. G. Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 97, p. 852-855, 1990.

VAL, A. L., AFFONSO, E. G., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Adaptive features of amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus nagnicans*) (Osteichthyes). *Physiol. Rev.*, Bethesda, v. 65, p. 832-843, 1992.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. L. F. Fishes of the Amazon and their environment: Physiological and biochemical aspects. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 224, 1995.

VALENZUELA, A., OYARZÚN, C., SILVA, V. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): série blanca. *Gayana*, v. 67, p. 130-137, 2003.

VEIGA, M. L., EGAMI, M. I., RANZANI-PAIVA, M. J. T., RODRIGUES, E. L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Ver. Chil. Anat.*, v. 18(2), p. 245-250, 2000.

VILJOEN, B. C. S., VUREN, J. H. J. Physical characteristics of the blood plasma of blood *Labeo ruddi* and *Labeo rosae* (Pisces: Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol.* (A), New York, v. 100, p. 873-875, 1991.

WARD J. W. Hematological studies on Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Copeia*, v. 3, p. 633, 1969.

WELLS, R. M. G., ASHBY, M. D., DUNCAN, S. J., McDONALD, J. A. Comparative study of the erythrocytes and haemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica. *J. Fish Biol.*, v. 17, p. 517-527, 1980.

WENDELAAR BONGA, S. E., The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v. 77(3), p. 59-625, 1997.

WILHELM FILHO, D., EBLE, G. J., KASSNER, G., CAPRARIO, F. X., DAFRÉ, A. L., OHIRA, M. Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 102, p. 311-321, 1992a.

WILHELM FILHO, D., MARCON, J. L., CAPRARIO, F. X., NOLLIS, A. C. Erythrocytes nucleoside triphosphates in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 102, p. 323-331, 1992b.

WINYTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, v. 51, p. 32-49, 1934.

YOKOYAMA, H. O. M. S. Studies on the origin, development, and seasonal variations in the cells of the perch (*Perca flavescens*). Doctoral thesis, University of Wisconsin. 1947.

YOKOYAMA, H., DANJO, T., OGOWA, K., ARIMA, T., WAKABAYAH, H. Hemorrhagic anemia of carp associated with spore discharge of *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxosporidia). *Fish Pathol.*, v. 31(1), p. 19-23, 1996.

YOSHINAGA, K., OKAMOTO, N., KURATA, O., IKEDA, Y. Individual variations of natural killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, v. 29, p. 1-4, 1994.

ZANUY, S., CARRILLO, M. Annual cycles of growth, feeding rate, gross conversion efficiency and hematocrit levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to two different osmotic media. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 44, p. 11-25, 1985.

ZHITENEVA, L. D., GORISLAVSKAYA, M. M. Hematological parameters of herring, *Chupea pallasii*, in relation to its physiological conditions. *J. Ichthyol.*, v. 26(2), p. 106-116, 1986.

ZUIM, S. M. F., ROSA, A. A. M., CASTAGNOLLI, N. Sex and sexual cycle influences over metabolic parameters in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Bull. Can. Aquacult. Assoc. Proc.*, v. 88(4), p. 55-56, 1988.

### CAPÍTULO 3

#### **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DAS HEMOGLOBINAS DO PEIXE PULMONADO *Lepidosiren paradoxa* (DIPNOI, FITZINGER, 1837) E DO PEIXE DE RESPIRAÇÃO AÉREA FACULTATIVA *Hoplerythrinus unitaeniatus* (CHARACIFORMES, SPIX, 1829)**

##### **Resumo**

As Hbs de peixes exibem o maior grau de diversidade estrutural e funcional dentre todas as Hbs de vertebrados. O presente estudo teve como objetivo a caracterização das propriedades estrutural e funcional (*in vitro*) das Hbs do peixe pulmonado *L. paradoxa* e do peixe de respiração aérea facultativa *H. unitaeniatus* coletados nos arredores de Cuiabá, MT. Foram analisados o padrão eletroforético, o efeito Root, a quantificação e o efeito dos moduladores alostéricos (IHP, ATP, GTP, 2,3 - BPG e NaCl) na modulação da afinidade das Hbs ao oxigênio e a afinidade das Hbs em experimentos de equilíbrio de oxigenação em sangue e *stripped* à 4°C, 21°C e 40°C. O padrão eletroforético em gel de amido para *L. paradoxa* mostrou a presença de dois componentes, um maior lento, e outro menor rápido, em *H. unitaeniatus* foram identificados 6 componentes anódicos com diferentes concentrações, sendo 3 componentes lentos e 3 componente rápidos. Nas espécies as Hbs *stripped*, nas três temperaturas e na presença dos moduladores mostraram efeito Bohr normal. Em *L. paradoxa* os valores de cooperatividade foram próximos de 2,00 indicando cooperatividade e ausência de efeito Root, em *H. unitaeniatus* os valores de cooperatividade, próximos de 1,50, indicaram baixa cooperatividade e presença de efeito Root. A afinidade das Hbs ao oxigênio mostrou-se maior à medida que se diminuiu a temperatura. O 2,3 - BPG foi pouco efetivo na modulação das Hbs de ambas as espécies, já os moduladores IHP, GTP, ATP e NaCl atuaram como moduladores negativos, sendo a modulação mais efetiva em *H. unitaeniatus*. Não foi detectado 2,3 - BPG e o ATP foi o principal nucleotídeo intraeritrocitário nas duas espécies, sendo aproximadamente 2 vezes superior ao GTP. Em *L. paradoxa* foi detectado pequena quantidade  $IP_2$  e em *H. unitaeniatus* não foi detectado a presença de inosítois. Os resultados mostram a capacidade de adaptação molecular das Hbs destas espécies às condições fisiológicas e ambientais a que estão sujeitas.

Palavras chave: Afinidade Hb-oxigênio, efeito Bohr, padrão eletroforético, efeito Root, inosítois, cooperatividade, equilíbrio de oxigenação.

## 1. INTRODUÇÃO

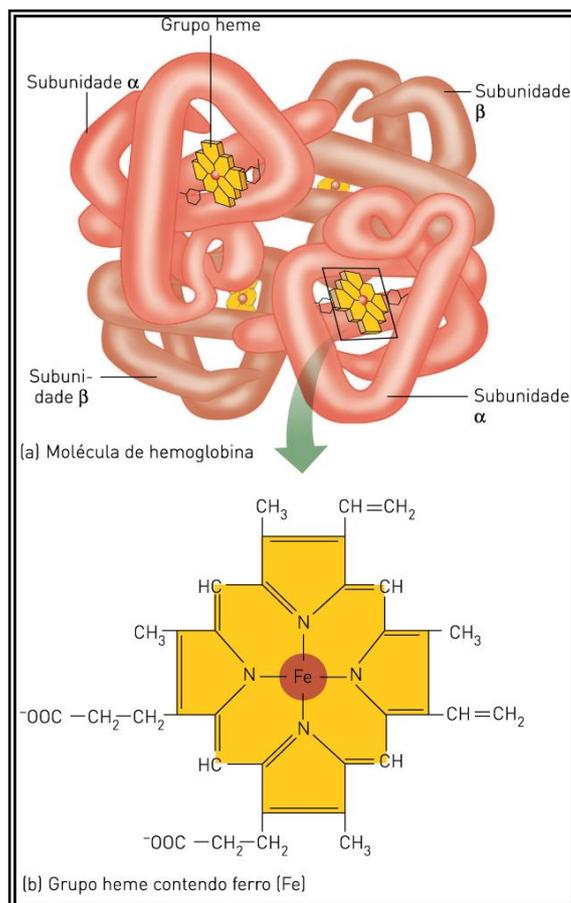
### 1.1 Hemoglobinas

Na maioria das espécies, a capacidade de suprir com oxigênio, o metabolismo celular, é aumentada pela presença de pigmentos respiratórios que permitem a fixação, transporte e liberação deste, de forma mais eficiente, aumentando a velocidade de sua difusão para as células (SILVA, 2003).

A Hb é o principal pigmento respiratório responsável pelo transporte de O<sub>2</sub> em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (SCHWANTES, 1972, GIARDINA et al., 2004). A Hb é uma proteína encontrada nos eritrócitos do sangue que transporta o oxigênio dos órgãos respiratórios para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para os órgãos respiratórios (PERUTZ et al., 1987).

A capacidade da hemoglobina de realizar uma reação reversível com O<sub>2</sub> molecular reside no fato dela conter um grupo heme (ferro-protoporfirina IX), como grupo prostético, ligado a cada uma das suas cadeias polipeptídicas. Esse grupo heme é constituído pela protoporfirina e por um átomo de Fe, sendo este mantido no estado ferroso (Fe<sup>+2</sup>) durante os processos de oxigenação e desoxigenação, para conservar suas propriedades funcionais (KARPLUS, 1982; PERUTZ, 1982; DICKERSON e GEIS, 1983; ACKERS e SMITH, 1987; LESK, 1991).

A molécula de hemoglobina é um tetrâmero composto por dois pares de cadeias distintas: duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ . A cada uma destas cadeias está ligado um grupo heme, de forma que, uma molécula de hemoglobina pode transportar até quatro moléculas de oxigênio (LESK, 1991).



**Figura 1** - Representação da estrutura da hemoglobina, apresentando suas quatro cadeias polipeptídicas (globinas), cada cadeia ligada a um grupo heme (MOYES e SCHULTE, 2010).

A afinidade da Hb ao oxigênio pode ser modificada pelos moduladores alostéricos. A concentração de prótons ( $H^+$ ) modula a afinidade da Hb ao oxigênio, de forma que, quanto menor o pH da solução de Hb, menor será sua afinidade ao oxigênio (GIARDINA et al., 2004). Esse efeito do pH sobre a afinidade Hb- $O_2$  é denominado efeito Bohr ( $\phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$ ), descrito inicialmente por BOHR et al. (1904), como diminuição da afinidade Hb- $O_2$  devido ao aumento da pressão de  $CO_2$ . A elevação na temperatura também reduz a afinidade da Hb pelo oxigênio e a diminuição, aumenta.

Nos glóbulos vermelhos há, durante a glicólise, produção de moduladores como o trifosfato de adenosina (ATP) e o trifosfato de guanosina (GTP) nos peixes e répteis, o 2,3 - bifosfoglicerato (2,3-BPG) em mamíferos, fetos de aves antes da eclosão, anfíbios

anuros e algumas espécies de peixes e, inositóis, em aves e alguns peixes (VAL, 2000; SCHWEITZER, et al., 2001; VILLAR, 2003; PERES et al., 2004). A ligação preferencial destas substâncias a desoxihemoglobina resulta na diminuição da sua afinidade ao oxigênio (ARNONE, 1972 e LANDINI, 2002). Entretanto, existem animais que apresentam Hbs insensíveis aos fosfatos orgânicos, como ovinos, bovinos, gatos e peixes-bruxa (ciclóstomos) e, em algumas espécies de teleósteos, as concentrações de ATP e GTP decrescem durante períodos de hipóxia, aumentando a afinidade das Hbs ao oxigênio (KIND et al., 2002; TAMBURRINI et al., 2001; PELLEGRINI et al., 2003 e WELLS, et al., 2003).

Considerado a variedade de espécies que utilizam as Hbs para o transporte de oxigênio, essas moléculas desempenham suas funções primárias sob condições ambientais extremamente variáveis dependendo do habitat das espécies (BRAUNER e WEBER, 1998; WEBER et al., 2004).

A função da Hb parece ser adaptada às necessidades metabólicas do animal e ao ambiente em que vivem. A adaptação corresponde a variações da capacidade de transporte de oxigênio e, para tanto, o organismo aumenta ou diminui a produção de Hb ou de efetores alostéricos que modulam o transporte de oxigênio (RIGGS, 1976; VAL et al., 1985).

Em condições físicas constantes e na ausência de moléculas moduladoras, a afinidade da Hb ao oxigênio depende, primariamente, da natureza hidrofóbica dos grupos heme e da função ou atividade específica dos resíduos de aminoácidos que, direta ou indiretamente, a afetam. A afinidade Hb-O<sub>2</sub> intrínseca é determinada pelos genes da mesma forma que é a seqüência de aminoácidos (POWERS, 1980; BURMESTER et. al., 2002).

As Hbs são caracterizadas funcionalmente, pela sua afinidade ao oxigênio, através de seu  $P_{50}$ , que corresponde à pressão de oxigênio necessária para que 50% dessa molécula se torne saturada com esse gás, pelo efeito Bohr, pela sua cooperatividade onde, modificações estruturais da molécula de Hb quando esta se liga ao oxigênio, induzem pequenas alterações na conformação de suas subunidades, de forma que, a oxigenação de um grupo heme pode acelerar as dos demais, na mesma molécula.

Essa interação entre as subunidades é expressa pelo coeficiente de Hill ( $n_{Hill}$  /pH) (RIGGS, 1972), onde:

$n_{Hill} > 1$  (cooperatividade positiva ou estabilização das interações heme-heme);

$n_{Hill} = 1$  (cooperatividade nula, os sítios ligantes de  $O_2$  são independentes);

$n_{Hill} < 1$  (cooperatividade negativa ou interação heme-heme negativa).

A afinidade Hb-oxigênio é representada pela curva sigmóide de dissociação Hb- $O_2$ . Os fatores que aumentam a afinidade da Hb ao oxigênio deslocarão a curva à esquerda e diminuirão o  $P_{50}$  e os fatores que diminuem a afinidade da Hb ao oxigênio, deslocarão a curva à direita e aumentarão o  $P_{50}$ .

Análises sistemáticas e os estudos funcionais das Hbs animais permitem relacionar diferenças estruturais com comportamentos bioquímicos, fisiológicos e evolutivos (FADEL, 2000).

## **1.2 Hemoglobinas de peixes**

A maioria dos animais terrestres tem, essencialmente, um suprimento constante de oxigênio o que não acontece com os peixes cujo ambiente aquático sofre alterações sazonais e diurnas de  $O_2$ , assim nenhum outro grupo de vertebrados está sujeito a grandes variações ambientais (HOCHACHKA e SOMERO, 2002). Segundo RIGGS (1979), esse fato levou ao desenvolvimento de muitas estratégias adaptativas, com

relação às Hbs, para aperfeiçoar a captação e o transporte de oxigênio frente às alterações ambientais, como a multiplicidade de componentes e alterações na afinidade das Hbs ao oxigênio.

Estudos de bioquímica e fisiologia comparada mostram que as afinidades das Hbs ao oxigênio em várias espécies de peixes estão adaptadas as variações físicas e químicas de seus ambientes. Assim, peixes que vivem em ambientes com baixo teor de oxigênio possuem Hbs com uma alta afinidade ao O<sub>2</sub>, ao contrário dos que vivem em ambientes ricos em oxigênio, que possuem baixa afinidade Hb-O<sub>2</sub> (GRAHAM, 1997). Peixes que vivem em ambientes onde os parâmetros físicos são periodicamente alterados, necessitam de mecanismos moleculares para sua adaptação (POWERS, 1985).

Uma das estratégias adaptativas adquiridas pelos peixes para a captação de O<sub>2</sub> frente às variações ambientais é a presença de Hbs múltiplas (VAL, 1993). Muitas espécies de peixes possuem isohemoglobinas que mostram diferenças consideráveis na seqüência de aminoácidos, designados como isoformas (DI PRISCO e TAMBURRINI, 1992; TAMBURRINI et al., 2001), que podem ou não apresentar propriedades funcionais diferentes.

Estudadas em várias espécies, as isohemoglobinas revelam dados importantes: em alguns casos elas possuem propriedades funcionais distintas e suas concentrações relativas podem ser reguladas adaptativamente, de acordo com as condições do ambiente, conferindo ao animal maior chance de sobrevivência em ambientes variáveis (BOSSA et al., 1982).

Entretanto, existem espécies que possuem componentes múltiplos, com propriedades similares (OHKUBO et al., 1993; CÉSAR, 1993) e peixes que apresentam

Hbs com um único componente (BORGESSE et al., 1992; DI PRISCO e TAMBURRINI, 1992).

A regulação qualitativa e quantitativa dos fosfatos intra-eritrocitários também representa uma importante estratégia adaptativa para o grupo, já que permite aos peixes compensar, a alteração dos níveis de oxigênio disponível no ambiente (VAL et al 1990). Neste grupo de animais, encontramos uma grande variação não apenas quantitativa como também qualitativa dos fosfatos eritrocitários (BARTLETT, 1980). ATP e GTP são os fosfatos eritrocitários mais comumente encontrados nos peixes. Em algumas espécies foi encontrada alta concentração de ATP, em outras, alta relação ATP/GTP e ainda em outras, uma elevada relação GTP/ATP (VAL et al., 1990, 1992a).

Muitos autores relatam que a afinidade de ligação das Hbs ao O<sub>2</sub> varia com a temperatura (POWERS et al., 1979a). Já que a quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido na água é inversamente proporcional à temperatura, os peixes de modo especial, adaptam-se a essa flutuação térmica. Assim, para a manutenção de um suprimento constante de O<sub>2</sub> para os tecidos, o sistema de liberação de O<sub>2</sub> teve que ser adaptado (POWERS, 1980). Para isso os peixes encontraram algumas formas de adaptação como apresentar Hbs termicamente insensíveis, como ocorre no atum (BRUNORI, 1966); ou apresentar Hbs múltiplas com diferentes sensibilidades térmicas (BRUNORI, 1975), ou ainda, variar o nível de moduladores alostéricos (GREANEY e POWERS, 1977; OLIANAS et al., 2005).

A maioria dos peixes possuem Hbs com efeito Bohr normal. Este fenômeno é de grande importância entre os peixes, pois facilita tanto a captura de oxigênio pelas brânquias quanto à liberação de oxigênio nos tecidos, onde o pH sofre uma grande redução (POWERS, 1980). Em espécies que apresentam componentes hemoglobínicos com migração eletroforética pouco anódica ou catódica, observa-se efeito Bohr nulo e

até reverso (CEPREGANOVA et al., 1992; FEUERLEIN e WEBER, 1994; GRAHAM, 1997).

Muitas Hbs são incapazes de se ligarem 100% ao oxigênio em pHs ácidos, fenômeno este denominado efeito Root. Quando o efeito Root é manifestado, as moléculas de Hbs se ligam aos prótons favorecendo o estado desoxigenado acarretando uma depressão na cooperatividade.

Considerando todos estes mecanismos utilizados pelos peixes para enfrentar as oscilações ambientais, podemos ressaltar o papel fundamental das Hbs na manutenção da homeostase respiratória destes animais.

Nesse contexto o objetivo deste estudo foi estudar as características estruturais e funcionais das Hbs de duas espécies que possuem respiração aérea obrigatória, *Lepidosiren paradoxa* com respiração pulmonar e *Hoplerythrinus unitaenitatus* com respiração aérea facultativa, avaliando o efeito da temperatura e a ação dos moduladores alostéricos em suas Hbs.

Os peixes, em particular, são excelentes modelos para estudos das estratégias de adaptação, a mudanças ambientais (SOMERO, 1983), já que respondem diretamente as variações ambientais como temperatura, oxigênio, pH, salinidade e gás carbônico.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais experimentais**

Espécimes adultos de *L. paradoxa* - FITZINGER (1937) [n = 10, massa corporal (Mc) =  $562,14 \pm 52,01$  g; comprimento =  $56,05 \pm 8,07$  cm] e *H. unitaenitatus* - SPIX (1829) [n = 10, massa corporal (Mc) =  $92,43 \pm 21,14$  g; comprimento =  $19,50 \pm 1,18$  cm] foram coletados nos arredores de Cuiabá, MT e trazidos para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. No laboratório, foram mantidos

em tanques de cimento (1000 L), com fluxo de água contínuo e aeração constante a  $23,40 \pm 1,40^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,07 \pm 0,98$ , condutividade  $91,90 \pm 4,35 \mu\text{S}/\text{cm}$ , sódios totais dissolvidos  $50,35 \pm 2,16 \text{ mg L}^{-1}$ , salinidade  $0,10 \pm 0,0 \text{ ppt}$ , concentração de  $\text{O}_2$   $6,90 \pm 0,47 \text{ mg L}^{-1}$ , porcentagem de  $\text{O}_2$   $87,33 \pm 1,44 \%$ , alcalinidade  $41,66 \pm 1,52 \text{ mg L}^{-1}\text{CaCO}_3$ , dureza  $53,50 \pm 7,77 \text{ mg L}^{-1}\text{CaCO}_3$  e amônia  $0,159 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ . Durante a realização dos experimentos a pressão barométrica foi de  $699,80 \pm 1,48 \text{ mmHg}$  e a umidade relativa do ar  $77,00 \pm 3,16 \%$ . Os animais foram alimentados com ração para peixes e fígado de vaca e frango. A alimentação foi suspensa dois dias antes da colheita de sangue.

## **2.2 Amostras de sangue e obtenção da solução de Hb**

Após aclimação em laboratório (40 dias) cada animal foi anestesiado por imersão em um recipiente contendo Benzocaína<sup>®</sup> (Synth) 0,10 % e o sangue foi retirado, por punção da veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas. Posteriormente, o sangue foi dividido em alíquotas para cada análise a ser realizada e estas colocadas em tubos de ensaio e mantidas a temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$ , em gelo fundente, para extração de fosfato e equilíbrio de  $\text{O}_2$  em sangue. Após a retirada do sangue foi realizada a biometria do animal.

A alíquota de sangue para o estudo da função da Hb em solução era centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$ , em uma centrífuga refrigerada SORVALL, modelo RC-5B, durante 5 minutos a  $1.085 \times g$ , para separação do plasma que foi eliminado. Os eritrócitos foram lavados três vezes consecutivas com solução salina 0,90%. Após este procedimento, o precipitado (eritrócitos) era mantido em congelador, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em tubos de ensaios para serem utilizados em experimentos posteriores.

Quando para uso imediato, após a última lavagem, a amostra era hemolisada adicionando-se Tris HCl (10 mM, EDTA alcalino 0,005 M pH 8,0). Em seguida, a amostra era congelada e descongelada por três vezes para uma hemólise efetiva, e

centrifugada em centrífuga refrigerada SORVALL, modelo RC-5B durante 20 minutos a 20.200 x g.

A solução de Hb assim obtida foi utilizada nas eletroforeses em gel de amido, nos experimentos de equilíbrio de oxigenação da Hb *stripped* e de efeito dos fosfatos intraeritrocitários.

### **2.3 Extração de fosfatos orgânicos intraeritrocitários**

Para o cálculo da quantidade de fosfatos presentes nos eritrócitos foram determinados o volume e hematócrito das amostras. Cada amostra foi centrifugada em centrífuga refrigerada SORVALL, modelo RC-5B, durante 5 minutos a 1.085 x g a 4°C, para a separação do plasma que foi descartado. Às células empacotadas, foi adicionado ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>-7 %) para a lise das células e liberação dos fosfatos intraeritrocitários. Novamente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio plásticos. O precipitado foi lavado duas vezes com ácido perclórico 7 % e o sobrenadante transferido para o mesmo tubo da primeira lavagem (BARTLETT, 1959).

Após a preparação, os extratos foram neutralizados com solução de KOH (hidróxido de potássio) 6 M, usando como indicador *phenol red* e, a seguir, congelados a -20°C para identificação e quantificação dos fosfatos. A extração dos fosfatos foi efetuada imediatamente após a coleta de sangue do animal.

### **2.4 Eletroforese em gel de amido**

Este método físico-químico de separação tem sido utilizado no estudo da estrutura de compostos biológicos. Diferentes proteínas diferem em sua seqüência de aminoácidos e no conteúdo dos mesmos, bem como, na sua carga líquida a um dado pH. A eletroforese utiliza-se dessa diferença para, num campo elétrico, separar proteínas. Assim a eletroforese em gel de amido em sistema horizontal descrito por SMITHIES

(1959) foi utilizada para analisar o padrão eletroforético das amostras hemoglobínicas e verificar a existência ou não de variação intraespecífica.

Na preparação do gel foi utilizado amido de milho, obtido segundo VAL et al. (1981), a uma concentração de 13 %. Nesse sistema, as proteínas são separadas segundo sua carga elétrica, e os poros do gel atuam como um filtro, separando às moléculas segundo seus tamanhos e formas.

Para confecção do gel foi utilizado o tampão Tris-Borato-EDTA ácido pH 8,6 (0,90 M Tris; 0,5 M ácido bórico; 0,02 M EDTA ácido), diluído 40 vezes com molaridade final de 0,036 M. Nesse pH, a concentração do amido 13 % foi suficiente para obter um gel com boa propriedade mecânica e separativa. Nas cubas, foi utilizado o tampão Borato 0,35 M (pH 8,6).

Ao término da cocção e deaeração a vácuo, o gel foi aplicado uniformemente em uma placa de acrílico, untada com óleo mineral para facilitar sua posterior retirada. Após o resfriamento do gel até 4°C, as amostras foram aplicadas através de retângulos de papel WHATMAN 3MM (6 x 4 mm) embebidos nas amostras de Hb e inseridos a uma distância de 7cm de distância da extremidade catódica do gel. As migrações eletroforéticas foram feitas a 4°C, sendo aplicado ao gel, um potencial de 5 V/cm e 1,25 mA/cm durante 6 horas utilizando-se uma fonte de tensão PERMATRON. Após a migração, o gel foi cortado no sentido horizontal, à metade superior foi corada com Amido *Black* (solução saturada de amido black, metanol e água destilada v/v), para proteínas totais, e a inferior, corada com Benzidina [benzidina 1 g, Nitroprussiato de Sódio 1 cristal e Metanol (qsp) - 75 mL] para revelação pela atividade peroxidásica das Hbs.

Na lavagem dos géis, foi utilizada solução de ácido acético 0,20 volumes, metanol 1 volume e água destilada 1 volume, Amido Black e, éter 1 volume, metano 2

volumes, ácido acético (qsp) para baixar o pH a 4,0 e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  20 volumes) 0,5 mL (VAL et al., 1981). Cianeto de potássio (KCN) foi adicionado às amostras e ao gel, já que a forma cianometahemoglobina é mais estável, permitindo a obtenção de uma melhor resolução.

#### **2.4.1 Transparentização**

Após a revelação das bandas em gel de amido, as eletroforeses foram “transparentizadas”, colocando-as entre duas folhas de papel celofane, esticadas num bastidor e, submetidas à desidratação em temperatura ambiente, procedimento que permitiu a conservação dos géis, mantendo-os secos e facilitando a posterior análise dos mesmos.

#### **2.5 Equilíbrio de oxigenação em sangue: método gasométrico**

O método baseia-se na determinação contínua do  $\text{O}_2$  dissolvido em solução tamponada, contendo sangue e fermento biológico. O fermento consome, inicialmente, todo o oxigênio dissolvido na solução, e para manter o equilíbrio da pressão parcial de  $\text{O}_2$ , o sangue cede o  $\text{O}_2$  ligado à Hb, ao meio. O pH pode influenciar na resposta do sangue quando este cede  $\text{O}_2$  ao meio.

As curvas de dissociação da  $\text{HbO}_2$  no sangue foram traçadas em diferentes pHs com tampões Bis-Tris / HCl (0,10 M - pHs 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8 7,0, 7,2 e 7,4) e Tris-HCl (0,10 M - pHs 7,6, 7,8, 8,2, 8,7 e 9,0) e com auxílio de um monitor biológico YSI e um registrador CG, segundo metodologia descrita por MANGUN e KODON (1975) e JOHANSEN et al., (1978 a).

Foram colocados 5 mL de cada tampão, 0,50 g de fermento e 3 gotas de sangue na cubeta do eletrodo polarográfico. Após vigorosa agitação dessa solução, o equipamento foi rapidamente ligado e a curva de consumo de  $\text{O}_2$  foi detectado por um eletrodo polarográfico e registrada num registrador gráfico. Os pHs inicial e final foram

anotados. As curvas obtidas assinalam a variação decorrente do consumo de O<sub>2</sub> do meio pelo fermento e da tentativa de manutenção de um equilíbrio pelo sangue. As pressões parciais de oxigênio necessárias para uma saturação de 20, 40, 50, 60, e 80 % de O<sub>2</sub> do sangue, foram obtidas pela fórmula:

$$PO_2 (n) = \frac{PB \cdot 0,2098 \cdot Ln}{4L_{100}}$$

Onde:

PB = pressão barométrica

Ln = leitura obtida para cada percentagem de saturação

L<sub>100</sub> = leitura em 100%

n = porcentagem de Hb ligada ao O<sub>2</sub>

Os valores de P<sub>50</sub> (pressão de oxigênio necessária, para saturar 50 % da Hb) foram convertidos para a forma logarítmica e plotadas contra o pH final. As curvas de efeito Bohr ( $\phi = P_{50}/\Delta pH$ ) foram traçadas a partir de regressão linear. Os resultados obtidos foram expressos em forma logarítmica, e apresentado por um gráfico Y/1 - Y em função de log PO<sub>2</sub>.

## 2.6 Hemoglobina *stripped* e redução de metahemoglobina

Para obtenção de uma solução de Hb isenta de moduladores (*stripped*) e para a redução da metahemoglobina, geralmente presente, as amostras de hemolisado foram filtradas em coluna de Sephadex G-25, com presença de agente redutor ditonito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). A resina foi acondicionada em uma coluna de 35,0 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro e equilibrada com solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Após a resina ser equilibrada, a coluna foi fechada, retirando-se o eluente que estava acima do topo da resina. A seguir, foi adicionado à coluna, aproximadamente, 1,0 mL de solução de ditonito de sódio a 5 %, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A coluna foi aberta e tão logo a solução de ditonito penetrou na resina, foi aplicado 3 mL

de solução de Hb, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A seguir, a coluna foi ligada a um reservatório contendo Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 de modo a se obter um leito com grau de compactação uniforme.

A Hb não se liga a resina sendo eluída rapidamente pela coluna. Quando Hb passa pelo ditionito de sódio (ligado à resina), reduz-se totalmente, passando a desoxiHb. Ao sair da coluna, a Hb entra em contato com o ar atmosférico, oxigenando-se por completo e conservando o ferro reduzido ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

Para os experimentos sem íons cloro, o tampão utilizado foi o Hepes-Tris 50 mM, pH 8,0. A amostra de Hb (1 mL) foi então passada por uma coluna com resina (Amberlite MB3). A primeira fração de Hb que saiu da coluna foi descartada devido a sua alta diluição. A segunda fração foi coletada em um tubo de ensaio e a amostra de Hb *stripped* utilizada nos experimentos de equilíbrio de oxigenação. Estes procedimentos foram realizados, no máximo 20 minutos antes do início dos experimentos.

## 2.7 Equilíbrio de oxigenação: método espectrofotométrico

De acordo com o seu grau de oxigenação, a Hb expõe diferentemente os átomos de ferro de seus grupos tetrapirrólicos (ANTONINI e BRUNORI, 1971; VILLELA, 1979). Hbs com taxas de oxigenação diferentes possuem diferentes conformações espaciais, com diferentes espectros de absorção medidos entre  $\lambda = 500$  e  $600$  nm. Através da análise desses espectros diferenciais pode-se correlacionar pressão de oxigênio e taxa de oxigenação da Hb.

A afinidade da Hb ao oxigênio foi determinada de acordo com o método descrito por RIGGS e WOLBACH (1956). Foram usados tonômetros cuja parte inferior é uma cubeta de vidro de 1,0 cm de percurso óptico.

Para determinação do volume da solução de Hb no tonômetro foi utilizada a seguinte fórmula:

$$V = \frac{0,85 \cdot 3,0}{L \cdot 60}$$

Onde:

V = volume de Hb para os tonômetros

0,85 = densidade ótica desejada em  $\lambda = 580$  nm

3,0 = volume da cubeta dos tonômetros

L = leitura da concentração de Hb em  $\lambda = 580$  nm

60 = diluição

Ao volume da solução de Hb (determinada pela fórmula acima) foi adicionado 0,30 mL de tampão Bis-Tris / HCl (0,10 M - pHs 6,4, 6,6, 6,8, 7,2 e 7,4), Tris-HCl (0,10 M - pHs 7,6, 7,8, 8,2, 8,6 e 9,2) e de água destilada para completar 3 mL. Nos experimentos de equilíbrio de oxigenação da Hb *stripped* sem cloro e com adição de cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado o tampão Hepes-Tris (0,10 M - pHs 6,0, 6,5, 6,76, 7,0, 7,5, 8,2, 8,6).

A amostra *stripped* de Hb foi desoxigenada por meio de injeções de nitrogênio ( $N_2$ ) e em seguida, submetida á vácuo, com subsequente agitação em banho rotativo. Após a desoxigenação foi traçado um espectro de absorção de  $\lambda = 500$  a 600 nm em um espectrofotômetro HP UV-VIS, modelo G 1107A com unidade óptica 8452A, acoplado a um micro computador IBM compatível com software “General Scanning”. Após a obtenção da primeira curva, foram injetadas quantidades crescentes e conhecidas de ar, e traçados novos espectros. Após um mínimo de 4 injeções de ar, cada tonômetro foi aberto a pressão ambiente de  $O_2$  sobre a amostra, sendo traçada a ultima curva que correspondeu ao espectro de absorção da Hb 100 % oxigenada.

A partir dos espectros de absorção obtidos, as oxigenações parciais da Hb foram calculadas, em três comprimentos de onda ( $\lambda = 540, 560$  e 580 nm) onde foi obtida a média aritmética das oxigenações parciais de cada injeção de ar (Y).

Para cada oxigenação a pressão de  $O_2$  foi calculada pela fórmula:

$$PO_2 = R \cdot V$$

Onde:

$PO_2$  = pressão de oxigênio no interior do tonômetro.

V = volume de ar injetado.

R = constante determinada pela seguinte fórmula:

$$R = \frac{T_b / T_a \{0,2098[PB_c - (P_v \cdot UR)]\}}{V_t - V_a}$$

Onde:

$T_b$  = temperatura do banho em °K

$T_a$  = temperatura ambiente em °K

$PB_c$  = pressão barométrica corrigida

$P_v$  = pressão de vapor da água

UR = umidade relativa do ar

$V_t$  = volume interno do tonômetro

$V_a$  = volume da amostra colocada no tonômetro

Para cada tonômetro foi traçado um gráfico de  $\log PO_2$  x  $\log Y/1-Y$  determinando-se o valor de  $P_{50}$  e o coeficiente de Hill ( $n_{Hill}$ ) pela declividade da reta obtida. O coeficiente de Hill ( $n_{Hill}$ ) mostra a cooperatividade das interações heme-heme, correspondendo ao valor do coeficiente angular da reta de regressão obtida para  $PO_2/\log Y/1-Y$ . A pressão de oxigênio necessária para saturar 50 % de Hb ( $P_{50}$ ), corresponde ao valor zero de  $\log PO_2/\log Y/1-Y$ . Como as curvas foram feitas em diferentes pHs, foi traçada a curva final do efeito Bohr ( $\phi = \Delta \log P_{50}/\Delta pH$ ).

### 2.7.1 Adição de fosfatos orgânicos e NaCl

Desenvolvendo a mesma metodologia descrita em 2.7, foi verificado o efeito dos fosfatos orgânicos ATP, GTP, IHP, 2,3-BPG e cloro numa relação molar de 1:8 (Hb-modulador), na afinidade da Hb- $O_2$ .

O volume necessário de solução de modulador para produzir essa relação molar, foi calculado pela fórmula:

$$\frac{mM \cdot N \cdot \frac{vol \cdot N}{vol \cdot amostra}}{[Hb] / 4} = 8$$

Onde:

mM. N = molaridade da solução de fosfato

Vol. N = volume de solução de fosfato para gerar a relação 1: 8

4 = número de subunidades por tetrâmero de Hb

8 = relação modulador/tetrâmero de Hb desejada

[Hb] = Concentração de Hb lida em  $\lambda = 577 \text{ nm}$  (0,85/14,60)

O volume de modulador, assim determinado, foi adicionado ao tonômetro juntamente com o tampão e a amostra de Hb, mantendo o volume final igual a 3 mL.

### **2.7.2 Titulação com IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG**

Os experimentos de equilíbrio de oxigênio foram realizados pelo método espectrofotométrico (na presença de íons cloro), para a Hb com titulação de IHP, GTP, ATP e 2,3-DPG. As relações molares utilizadas foram calculadas a partir da fórmula do item 2.7.1

#### **2.7.2.1 Titulação com NaCl**

Os experimentos de equilíbrio de  $\text{O}_2$  pelo método espectrofotométrico em Hb *stripped*, em titulação com NaCl. O tampão utilizado foi o Hepes – Tris 0,05 M pH 8,0. Na preparação de Hb para esse experimento foi usado o mesmo tampão acima mencionado em coluna de Sephadex G-25.

### **2.8 Análise espectrofotométrica de curvas parciais de oxigenação - Efeito Root**

A metodologia utilizada foi a descrita por FARMER et al., (1979). O princípio básico dessa metodologia consiste no fato de que a Hb pode estar saturada de  $\text{O}_2$  em diferentes pHs. Dessa forma através de varreduras entre  $\lambda = 500$  e  $600 \text{ nm}$ , é possível verificar a diferença percentual de oxigenação das Hbs nos diferentes pHs.

As Hbs *stripped* foram diluídas em tampão Bis-Tris-HCl 0,10 M - pH 5,5, segundo a fórmula utilizada para equilíbrio de oxigenação. Após a homogeneização da amostra as leituras foram realizadas em cubetas de 3 mL, utilizando um

espectrofotômetro HP UV-VIS, modelo G 1107A acoplado a um micro computador IBM compatível sendo traçado uma varredura entre  $\lambda = 500 - 600$  nm. Posteriormente o pH da amostra foi elevado para 9,0, pela adição de Tris sólido, pra evitar sua diluição, e um novo espectro foi traçado sobre a curva anterior. Ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  - 0,20 g) foi então adicionado para obter a curva desoxihemoglobina, sendo esse espectro traçado sobre as duas curvas anteriores.

Esses resultados foram analisados de acordo com as 4 categorias sugeridas por FARMER et al. (1979), ou seja:

- 0 - menos que 10% de desoxigenação
- + - de 10 a 20% de desoxigenação
- ++ - de 20 a 40% de desoxigenação
- +++ - de 40 a 60% de desoxigenação
- ++++ - mais de 60% de desoxigenação

## **2.9 Determinação de fosfatos intraeritrocitários**

### **2.9.1 Fosfatos orgânicos - nucleotídeos**

Para a análise dos nucleotídeos, extraídos dos eritrócitos, foi utilizada uma coluna cromatográfica, com a resina Q Sepharose *Fast Flow* (trocadora iônica forte).

A cromatografia de troca iônica baseia-se no aprisionamento eletrostático de moléculas com cargas contrárias à da resina. Utilizando um gradiente de tampão é obtida uma troca seletiva das moléculas aprisionadas. A referida coluna foi confeccionada a partir da colagem de duas seringas plásticas de 3 mL cada (DE VITTO 1994). As dimensões internas da coluna foram de 11 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro e foi usado o controlador do *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) da Pharmacia LKB. O sistema de tampões utilizados foi o trietanolamina (TEA) 20 mM,

pH 7,5 (1,35 mL de TEA em 500 mL de água milli-Q e pH acertado com HCl 1,0 N), com gradiente salino de 0 a 1,0 M de KCl de acordo com (BARTLETT, 1978 a).

Os pontos de eluição para cada nucleotídeo da curva padrão (ATP e GTP) foram determinados através da aplicação, primeiramente, de cada substância isolada, para localizar onde cada um destes era eluído e, em seguida, aplicado uma mistura de todos (com um volume final de 50  $\mu$ L), e então a eluição dos mesmos era seguida em espectrofotômetro acoplado ao cromatógrafo em UV a  $\lambda = 254\text{nm}$ .

O extrato de fosfato de cada espécie foi centrifugado a 1500 x g por cinco minutos, e o sobrenadante aplicado na coluna, sendo em média, 10  $\mu$ L de amostra. Os resultados obtidos foram, então, comparados ao padrão anteriormente determinado.

### **2.9.2. Determinação de inositóis**

Uma curva padrão de concentrações conhecidas e crescentes de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foi determinada, a essas soluções foram adicionados 0,50 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10N, 0,20 mL de molibdato de amônio 5%, 0,20 mL de reagente de *Fisk & Subbarow* a 0,25 % (15 g de  $\text{NaHSO}_3$ ; 250 mg de redutor de *Fisk & Subbarow* e 500 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) e água deionizada. Os tubos foram agitados e a coloração azul obtida foi proporcional à concentração de fósforo. As densidades ópticas foram obtidas em  $\lambda = 830\text{nm}$  e convertidas em molaridade. Os fosfatos foram cromatografados segundo a metodologia descrita por BARTLETT (1959). Para isso, foi utilizada a resina DOWEX 1 x 8 (400 *mesh*), acondicionada numa coluna de 1,0 cm de diâmetro interno por 28,0 cm de comprimento previamente tratada com água deionizada, Formiato de amônia / Ácido fórmico 5 M e novamente água deionizada para eliminar os contaminantes.

O extrato de fosfato foi centrifugado a 3.000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante aplicado a coluna. Com a finalidade de retirar os fosfatos que não fossem

inositóis (NAD, AMP, ADP, ATP e DPG), foi aplicada à coluna uma solução de ácido fórmico 5 M / formiato de amônia 5 M, lavando-a posteriormente, com água deionizada.

A seguir, dois vasos comunicantes, um contendo 400 mL de água deionizada e outro contendo 400 mL de HCl 1 N, foram conectados a coluna por intermédio de uma bomba peristáltica. A coluna foi submetida a um fluxo constante de 1,0 mL/minuto e a um gradiente linear de 0 a 1 N de HCl, para a separação dos inositóis acoplada a um coletor de frações Pharmacia LKB RediFrac para obter frações de 5 mL de eluato.

A quantidade de cada inositol fosfatado foi determinada pelo seu conteúdo de fósforo. Para tanto, 0,50 mL de cada fração obtida foi transferida para tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 0,50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 N e colocado em uma estufa FANEN, modelo 320 SG, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionadas a cada tubo, mantidos em estufa a 180°C por uma hora.

Com o auxílio de dispensadores Oxford, foi adicionado aos tubos resfriados, 0,20 mL de molibdato de amônio 5 %, 0,20 mL de reagente de *Fisk & Subbarow* a 0,25 % e 4,60 mL de água deionizada para obter o volume final de 5mL. A seguir, os tubos foram agitados e levados a banho-maria a 100°C, por 10 minutos para obtenção da coloração azul a qual é diretamente proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra. A densidade óptica foi determinada em  $\lambda = 830$  nm e a concentração de fósforo calculada através da curva de calibração conforme descrita anteriormente.

### **2.9.3 Determinação de 2,3-BPG**

A determinação dos níveis de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) intraeritrocitário foi realizada através de um Kit Sigma Diagnostics. Este kit baseia-se na reação de conversão do 2,3-BPG em Gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) com liberação de NAD. O

decréscimo de absorvância em  $\lambda = 340$  nm, causado pela oxidação do NADH a NAD, reflete a quantidade de 2,3-BPG originalmente presente.

## 2.10 Análise estatística

Os dados referentes ao comportamento funcional das hemoglobinas de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatatus* estão apresentados em amplitudes do efeito Bohr ( $\phi = \log P_{50} / \Delta\text{pH}$ ) que foram obtidas por análises de regressão linear em todos os pHs estudados. A análise foi realizada utilizando o programa Microcal Origin 6.0. O teste T (Student's T teste) foi aplicado para confirmar a existência ou não de efeito Bohr (representado pelo b da reta de regressão) e para os valores de cooperatividade ( $n_{\text{Hill}}$ ). A influencia do pH sobre o log de  $P_{50}$ , para as hemoglobinas das espécies estudadas, foi analisada através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

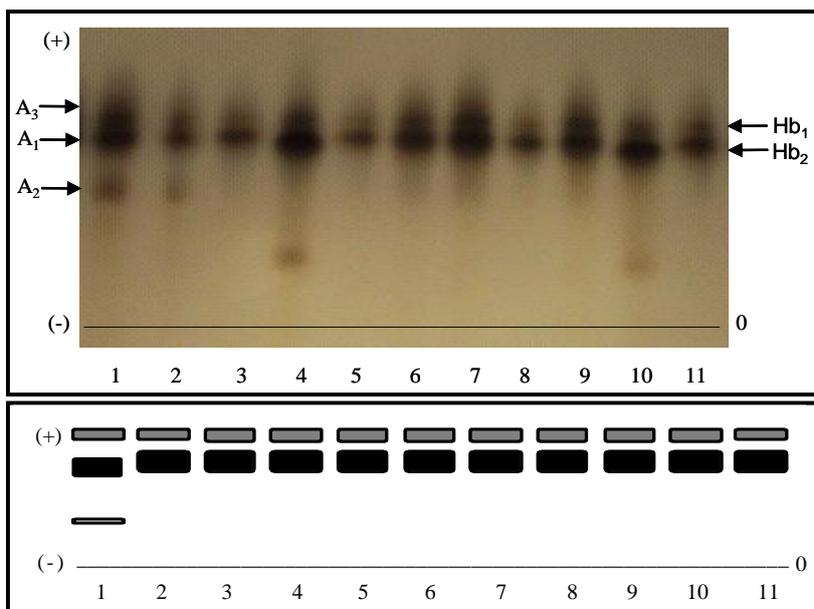
Os dados referentes às concentrações de fosfatos intraeritrocitários estão apresentados como média e desvio padrão. Os resultados foram avaliados utilizando o T (Student's T teste), com 95 % de confiança, verificando a existência ou não de diferenças significativas entre as médias dos valores encontrados em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatatus*. A análise foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat Versão 3.0. O nível de significância aceito nas análises foi de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS

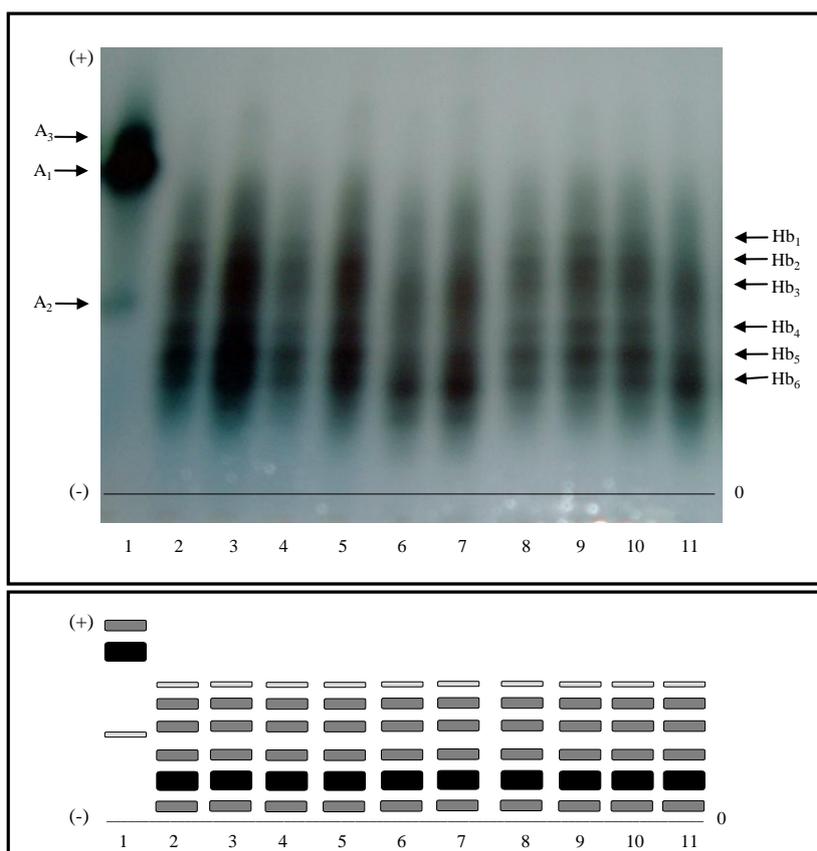
### 3.1 Componentes hemoglobínicos

Dois componentes hemoglobínicos anódicos foram identificados em *L. paradoxa* sendo um componente maior e um menor ambos rápidos similares as hemoglobinas humanas (Figura 1). Em *H. unitaeniatatus* foram identificados 6 componentes anódicos com diferentes concentrações sendo 3 componentes lentos e 3 componentes rápidos mas com mobilidade menor que as Hbs humanas (Figura 2). Não foram detectados componentes hemoglobínicos catódicos nas duas espécies estudadas.

Os padrões eletroforéticos não variaram entre indivíduos da mesma espécie indicando nenhuma diferença polimórfica nos espécimes estudados.



**Figura 2** - Fotografia do gel e representação esquemática dos padrões eletroforéticos das Hbs de *L. paradoxa*, comparativamente a humana (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>). Tampão Tris-Borato EDTA ácido 0,036 M pH 8,60 (gel); Tampão Borato 0,35 M pH 8,6 na ponte (n = 10).



**Figura 3** - Fotografia do gel e representação esquemática dos padrões eletroforéticos das Hbs de *H. unitaeniatus*, comparativamente a humana (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>). Tampão Tris-Borato EDTA ácido 0,036 M pH 8,6 (gel); Tampão Borato 0,35 M pH 8,60 na ponte (n = 10).

### 3.2 Estudos funcionais

As afinidades das Hbs pelo O<sub>2</sub> em função do pH, das espécies analisadas são mostradas na tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

#### 3.2.1 *Lepidosiren paradoxa*

O comportamento funcional das Hbs nos experimentos de equilíbrios de oxigenação em sangue total e Hb *stripped* mostrou efeito Bohr normal ( $p < 0,05$ ), ou seja, valores mais elevados de P<sub>50</sub> à medida que o pH se tornava mais ácido, em todos os tratamentos. Os valores de Hill ( $n_{Hill}$ ) encontram-se próximos de 2,0, com aumento significativo na presença de IHP, GTP, ATP, NaCl e a 40°C em pHs entre 7,0 e 7,5 demonstrando cooperatividade (Tabela 1 e Figura 3).

Em sangue observa-se valor de P<sub>50</sub> = 25,11 mmHg, em pH próximo a 7,0, e efeito Bohr de  $\phi = -0,07$ . Tais valores quando comparados aos valores obtidos em Hb *stripped* indicam maior afinidade ao oxigênio pela Hb na ausência de moduladores (Tabela 1 e Figura 3). A amplitude de efeito Bohr aumentou para  $\phi = -0,32$ ,  $\phi = -0,33$  e  $\phi = -0,32$  e P<sub>50</sub> = 19,50, 9,77 e 8,91 mmHg (pH 7,0) na presença de IHP, GTP e ATP respectivamente, mostrando que o IHP é o modulador mais efetivo na afinidade Hb-O<sub>2</sub>, seguido pelo GTP e ATP. Este efeito não foi observado com adição de 2,3-BPG, onde os valores de Bohr  $\phi = -0,26$  e P<sub>50</sub> = 3,16 mmHg, foram próximos dos valores obtidos com Hb *stripped* (Tabela 1 e Figura 4), sendo assim a ordem de potência dos moduladores fosfatados testados em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatatus* foi IHP > GTP > ATP > 2,3-BPG.

Os valores de P<sub>50</sub> obtidos nos tratamentos *stripped* à 4°C, 21°C e 40°C foram de 1,14, 1,58 e 13,46 mmHg (pH 7,0) respectivamente com amplitudes de Bohr  $\phi = -0,12$ ,  $-0,25$  e  $-0,30$ , mostrando um aumento da afinidade da Hb-O<sub>2</sub> à medida que diminui a temperatura (Tabela 1 e Figura 5). Os íons cloreto também diminuíram a afinidade Hb-O<sub>2</sub> com Bohr  $\phi = -0,15$  e P<sub>50</sub> = 2,63 mmHg (Tabela 2 e Figura 17).

### 3.2.2 *Hoplerythrinus unitaeniatus*

As Hbs de *H. unitaeniatus* apresentaram efeito Bohr normal ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos. Os valores de Hill( $n_{\text{Hill}}$ ) foram próximos a 1,50 indicando baixa cooperatividade entre os grupos heme (Tabela 1 e Figura 6) mantendo-se constante na presença de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG e NaCl.

Em sangue obtivemos efeito Bohr com amplitude igual a  $\phi = -0,12$  e  $P_{50} = 32,36$  mmHg (pH 7,0) demonstrando uma menor afinidade ao oxigênio pela Hb em comparação aos valores obtidos na análise do hemolisado *stripped* a 40, 21 e 4°C, na presença de GTP, ATP e 2,3-BPG (Tabela 1 e Figura 6).

Na presença de fosfatos os valores de efeito Bohr foram de  $\phi = -0,56$ ,  $\phi = -0,54$ ,  $\phi = -0,41$  e  $\phi = -0,33$  e  $P_{50} = 47,86$ , 19,05, 14,45 e 4,17 mmHg (pH 7,0) para IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG respectivamente (Tabela 1 e Figura 7), mostrando que o IHP também é o modulador mais efetivo para *H. unitaeniatus* e que o 2,3-BPG apresenta-se pouco eficiente na modulação das Hbs dessa espécie, com valores de Bohr e  $P_{50}$  próximos a Hb *stripped* a 21°C.

No estudo das características funcionais das Hb de *H. unitaeniatus* novamente ficou evidente o efeito da temperatura na afinidade das Hb ao oxigênio, com valores de  $P_{50} = 20,89$  (pH 7,0) para o tratamento *stripped* à 40°C e  $P_{50} = 3,23$  e 1,90 (pH 7,0) para os experimentos realizados a 21 e 4°C respectivamente (Tabela 1 e Figura 8). Também observamos a diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub> na presença de NaCl com valores de Bohr  $\phi = -0,19$  e  $P_{50} = 2,29$  mmHg (Tabela 2 e Figura 18).

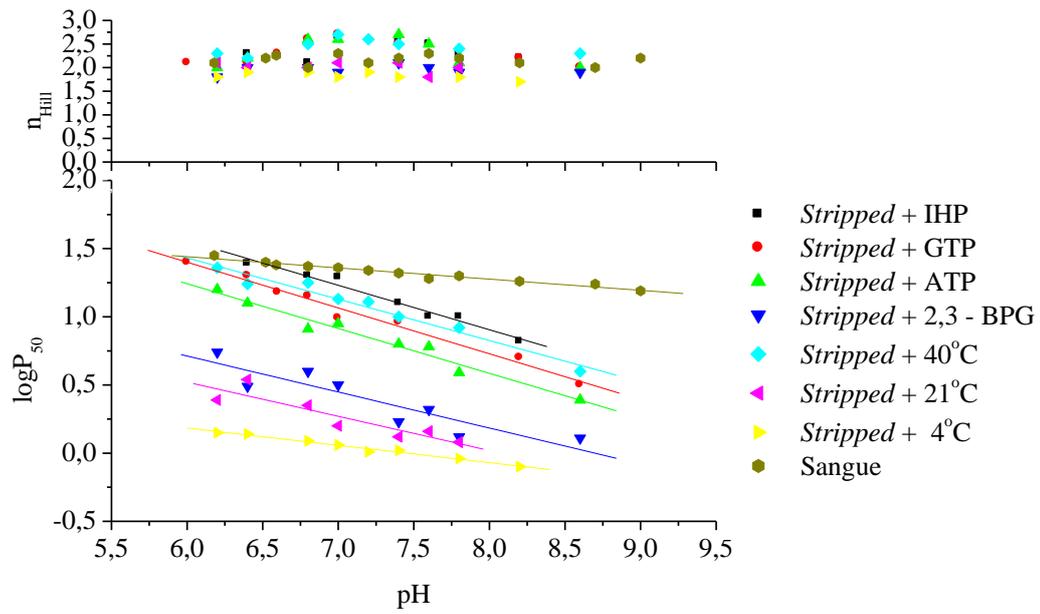
### 3.2.3 Comparação entre o comportamento funcional hemoglobínico de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

As diferenças de comportamento funcional das Hbs das 2 espécies em cada condição experimental estudada: *stripped* a 40°C, 21°C e 4°C, *stripped* + IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, NaCl e sangue são mostradas nas figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e

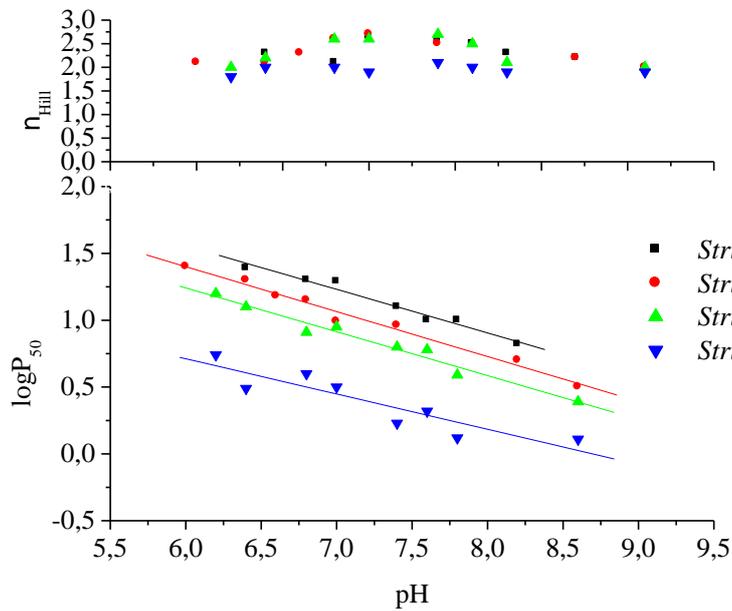
19. Nossos resultados mostram que em todos os tratamentos *H. unitaeniatus* apresentou valores maiores de  $P_{50}$ , caracterizando uma menor afinidade de suas Hbs ao oxigênio em relação ao observado em *L. paradoxa*.

**Tabela 1** - Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de  $P_{50}$ ,  $P_{50}$  (pH - 7,0), cooperatividade Hill ( $n_{Hill}$ ) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* em diferentes condições. Sob o efeito de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, em três temperaturas e sangue não fracionado. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (n = 10).

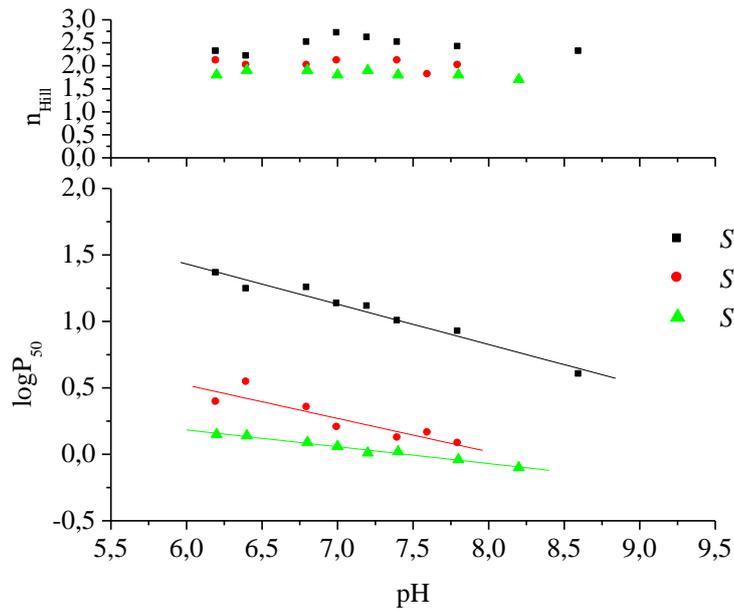
<i>L. paradoxa</i>					
	Bohr $\phi$	Log $P_{50}$	$P_{50}$	Hill-( $n_{Hill}$ )	( $r^2$ )%
<i>Stripped</i> + IHP	-0,32	1,29	19,50	2,65	95
<i>Stripped</i> + GTP	-0,33	0,99	9,77	2,70	94
<i>Stripped</i> + ATP	-0,32	0,95	8,91	2,60	94
<i>Stripped</i> + 2,3-BPG	-0,26	0,50	3,16	2,00	87
<i>Stripped</i> 40°C	-0,30	1,13	13,46	2,70	88
<i>Stripped</i> 21°C	-0,25	0,20	1,58	2,10	77
<i>Stripped</i> 4°C	-0,12	0,06	1,14	1,80	96
Sangue	-0,07	1,40	25,11	2,30	96
<i>H. unitaeniatus</i>					
<i>Stripped</i> + IHP	-0,56	1,68	47,86	1,28	96
<i>Stripped</i> + GTP	-0,54	1,28	19,05	1,32	91
<i>Stripped</i> + ATP	-0,41	1,16	14,45	1,40	98
<i>Stripped</i> + 2,3-BPG	-0,33	0,62	4,17	1,30	96
<i>Stripped</i> 40°C	-0,34	1,32	20,89	1,22	98
<i>Stripped</i> 21°C	-0,32	0,51	3,23	1,40	94
<i>Stripped</i> 4°C	-0,16	0,28	1,90	1,18	95
Sangue	-0,12	1,51	32,36	1,37	61



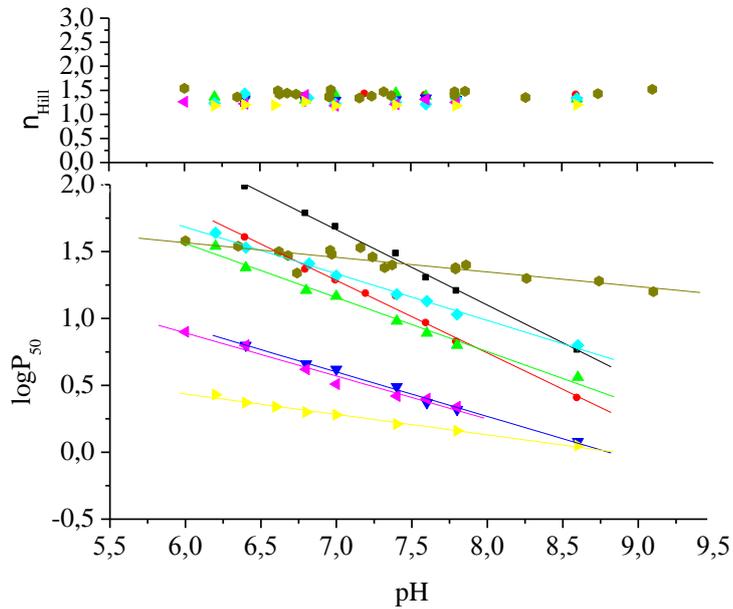
**Figura 4** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxus* na presença de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, à 40°C, 21°C, 4°C e em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



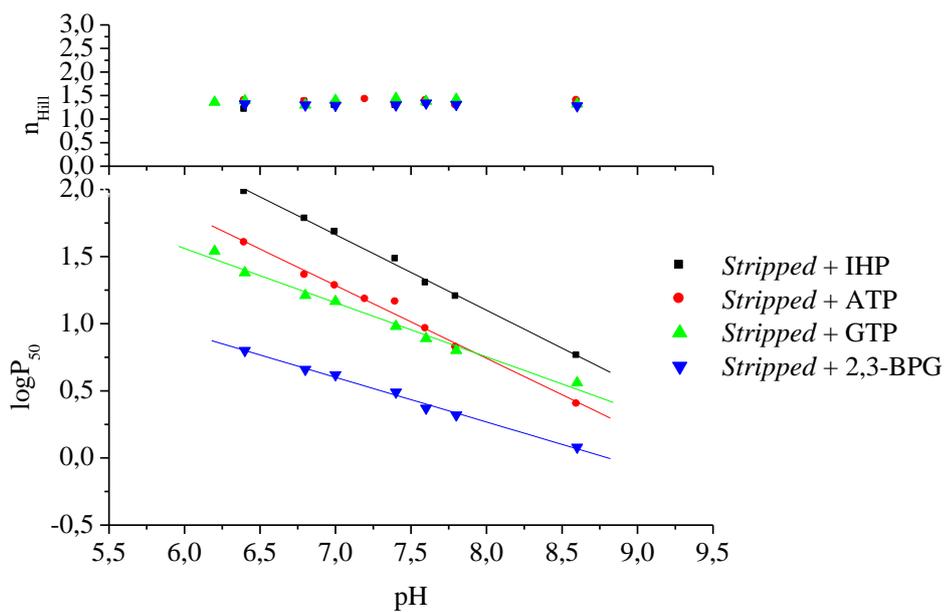
**Figura 5** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxus* na presença de IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



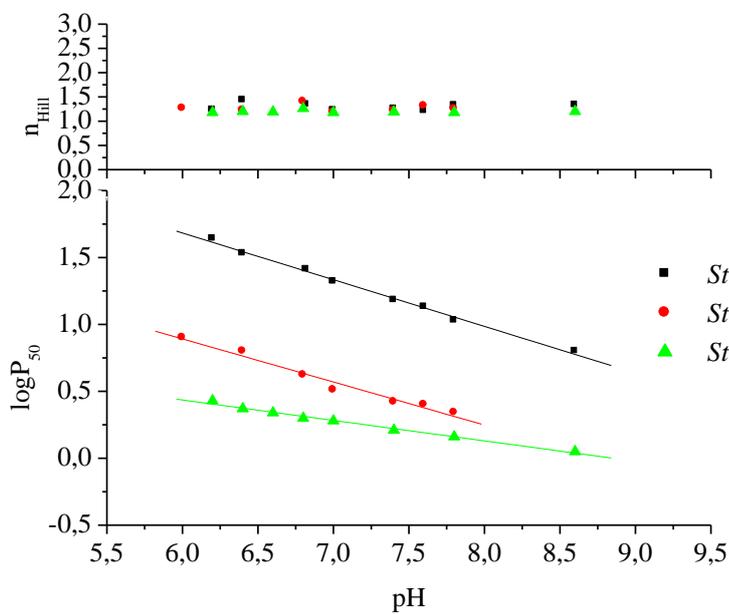
**Figura 6** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* à 40°C, 21°C e 4°C. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



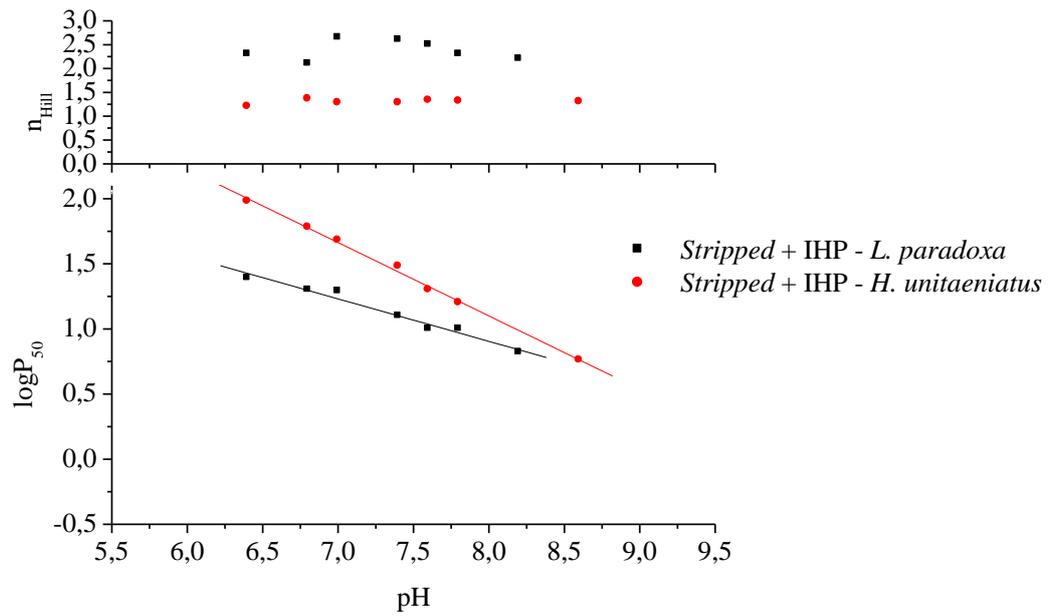
**Figura 7** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *H. unitaeniatus* na presença de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, à 40°C, 21°C, 4°C e em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



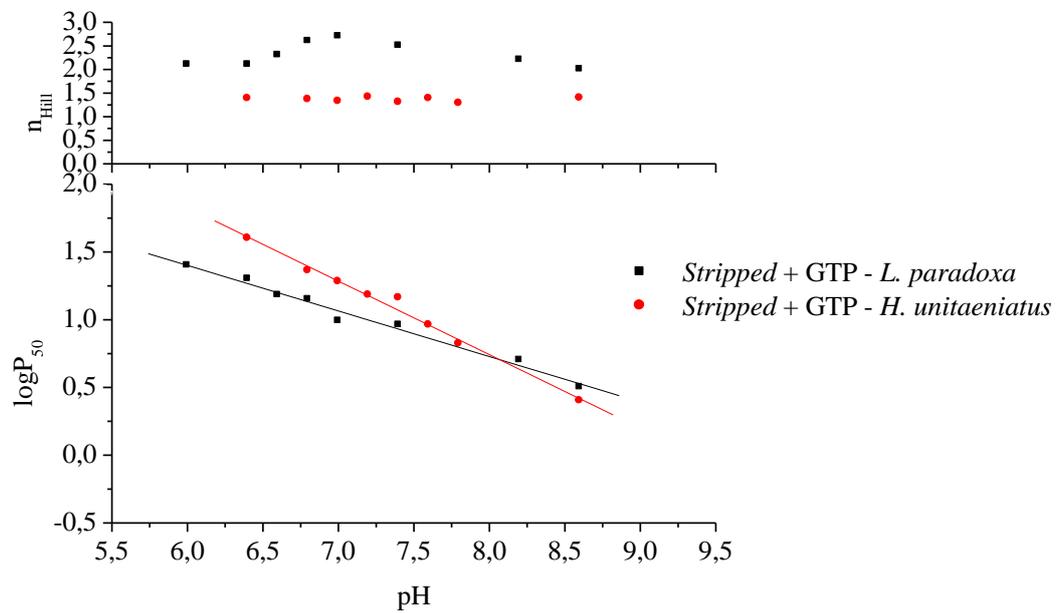
**Figura 8** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *H. unitaeniatus* na presença de IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



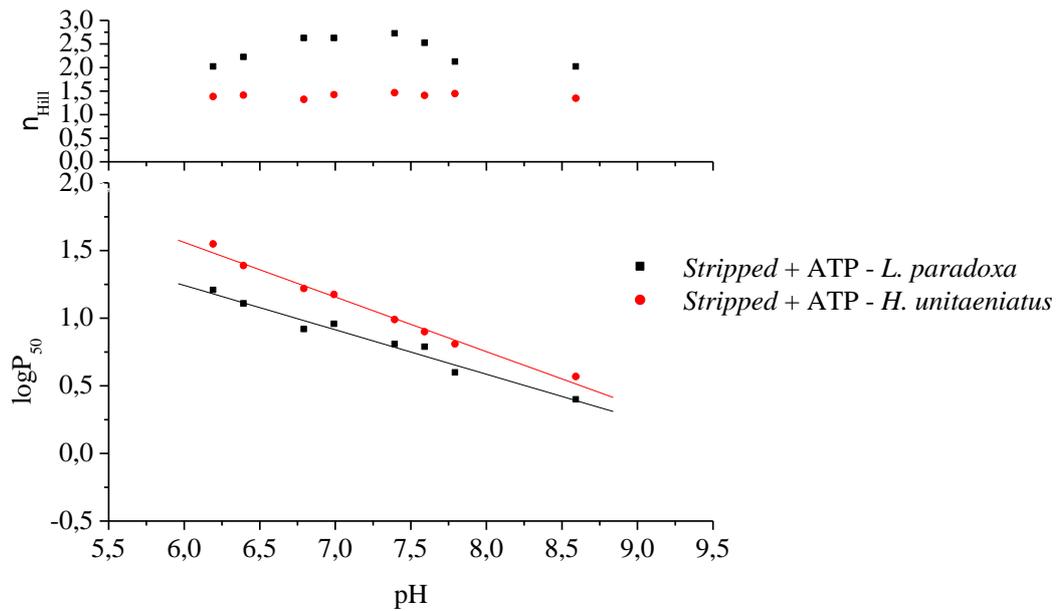
**Figura 9** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *H. unitaeniatus* à 40°C, 21°C e 4°C. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.



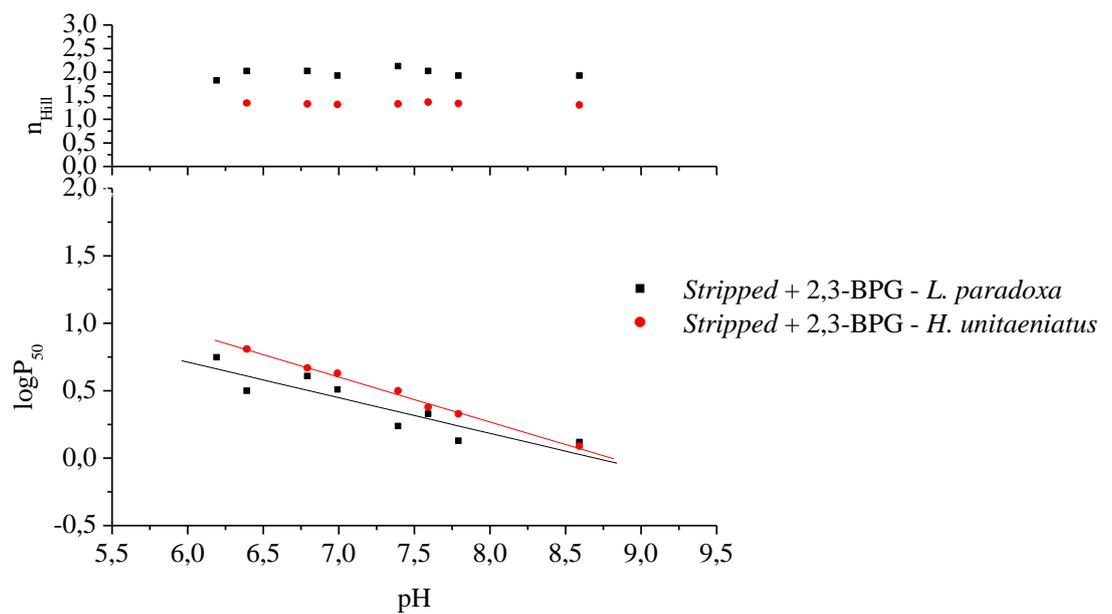
**Figura 10** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* na presença de inositol hexafosfato (IHP).



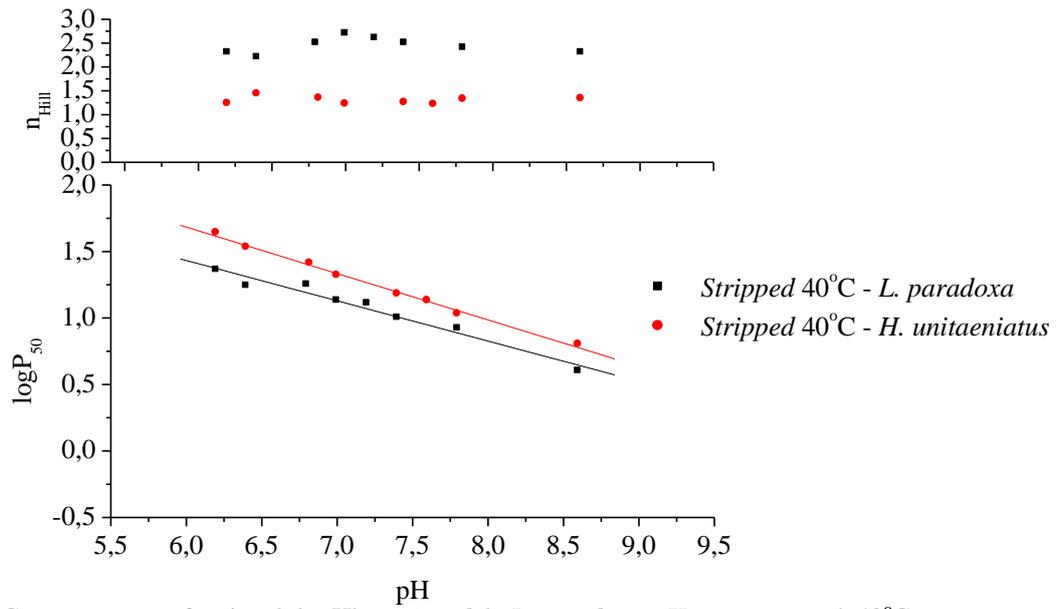
**Figura 11** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* na presença de guanosina trifosfato (GTP).



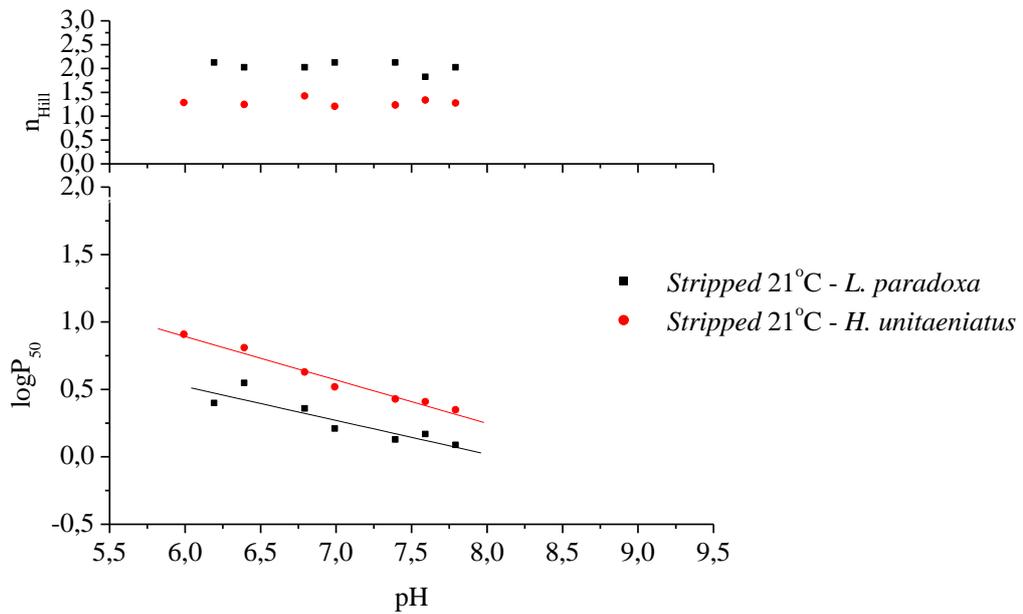
**Figura 12** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* na presença de adenosina trifosfato (ATP).



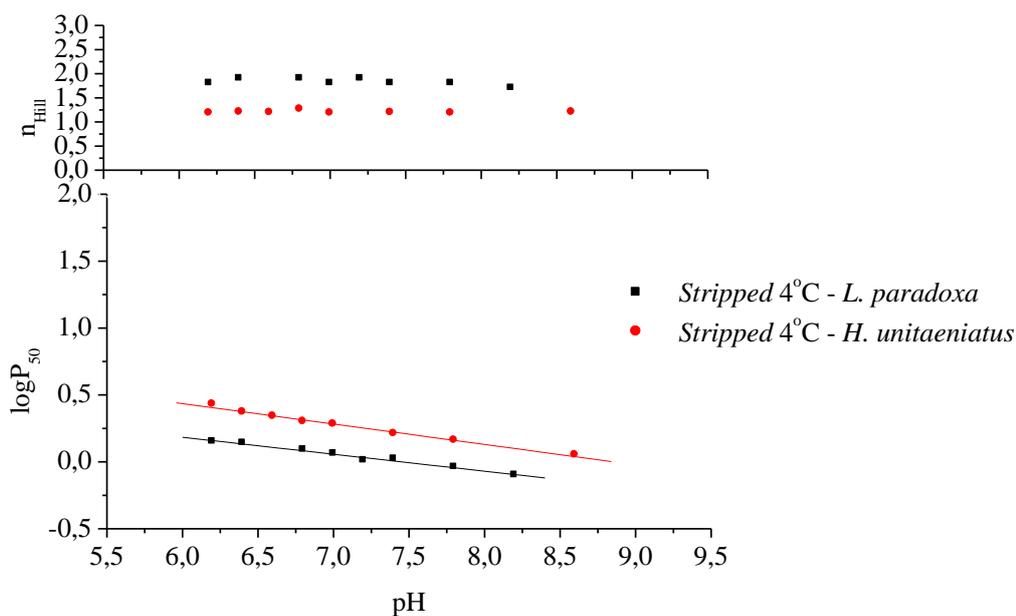
**Figura 13** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* na presença de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG).



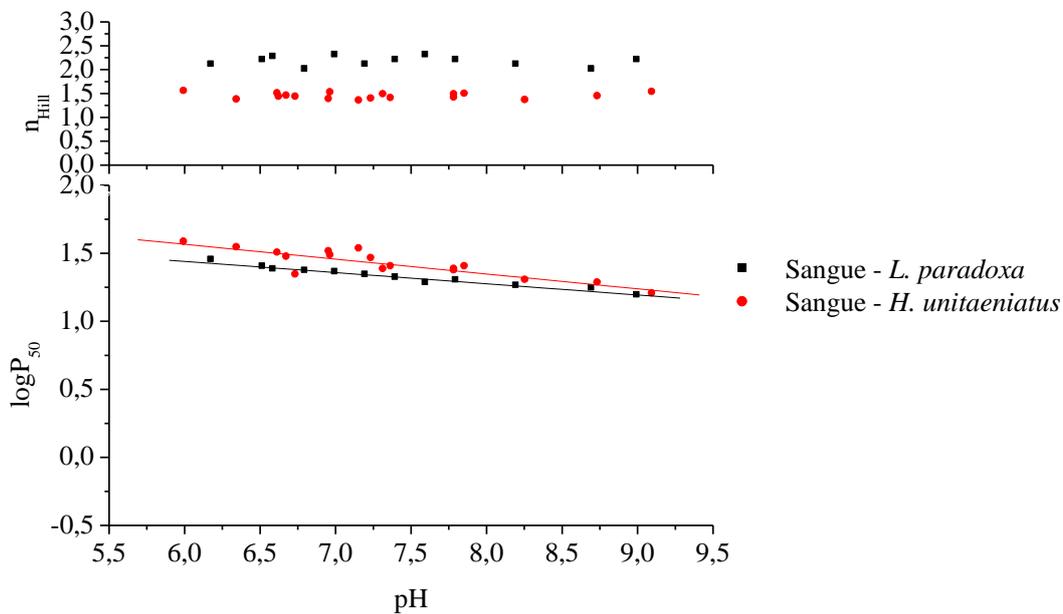
**Figura 14** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* à 40°C.



**Figura 15** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* à 21°C.



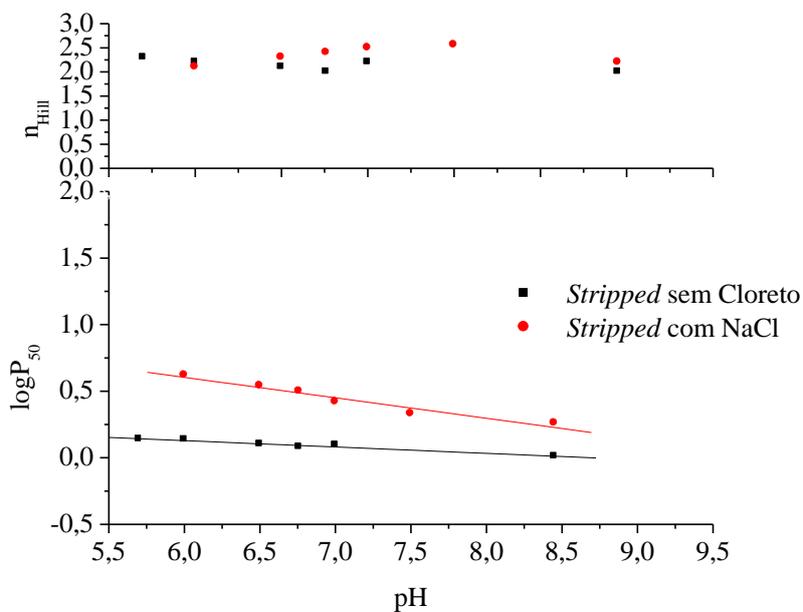
**Figura 16** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* à 4°C.



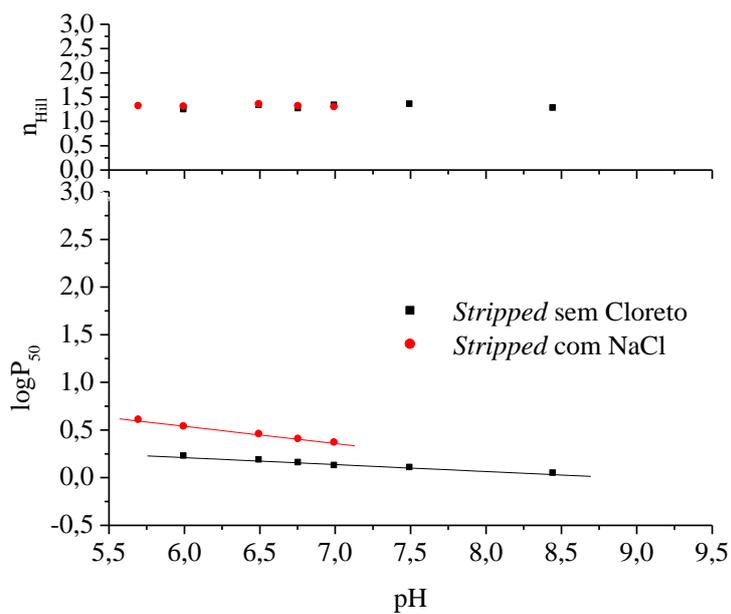
**Figura 17** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* em sangue. Na coluna tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

**Tabela 2** - Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de  $P_{50}$ ,  $P_{50}$  (pH - 7,0), cooperatividade ( $n_{Hill}$ ) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e sob o efeito do cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão HEPES-Tris 0,10 M, pH 8,0 (n = 10).

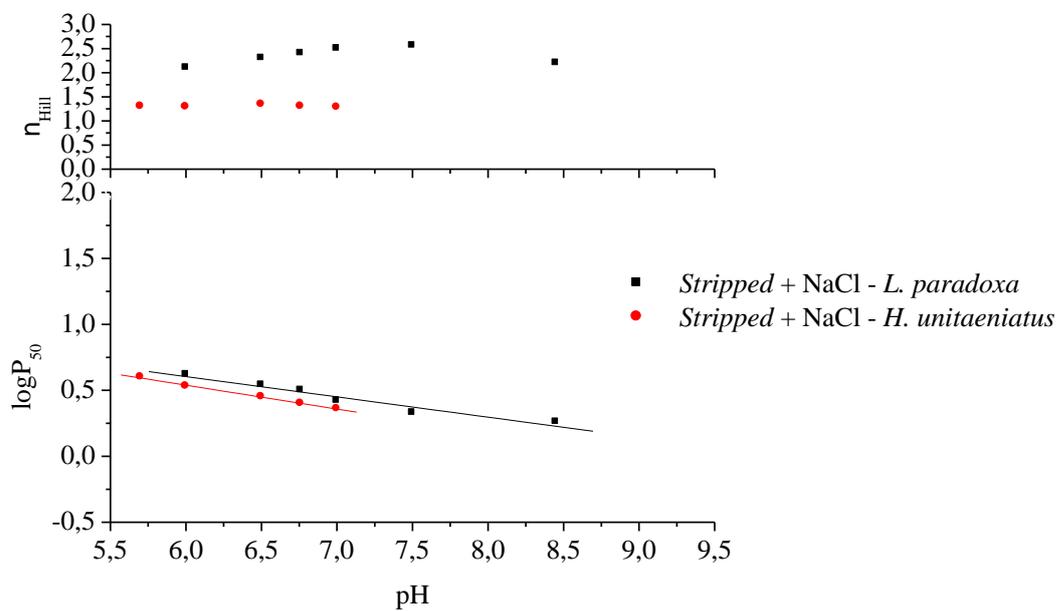
<i>L. paradoxa</i>					
	Bohr $\phi$	Log $P_{50}$	$P_{50}$	Hill - ( $n_{Hill}$ )	$r^2$ (%)
<i>Stripped</i> sem cloro	-0,04	0,10	1,25	2,20	88
<i>Stripped</i> + NaCl	-0,15	0,42	2,63	2,50	99
<i>H. unitaeniatus</i>					
	Bohr $\phi$	Log $P_{50}$	$P_{50}$	Hill - ( $n_{Hill}$ )	$r^2$ (%)
<i>Stripped</i> sem cloro	-0,07	0,12	1,31	1,32	98
<i>Stripped</i> + NaCl	-0,19	0,36	2,29	1,28	68



**Figura 18** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão HEPES-Tris 0,10 M, pH 8,0.



**Figura 19** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *H. unitaeniatus* e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão HEPES-Tris 0,10 M, pH 8,0.



**Figura 20** - Comportamento funcional das Hbs *stripped* de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Na coluna tampão HEPES-Tris 0,10 M, pH 8,0.

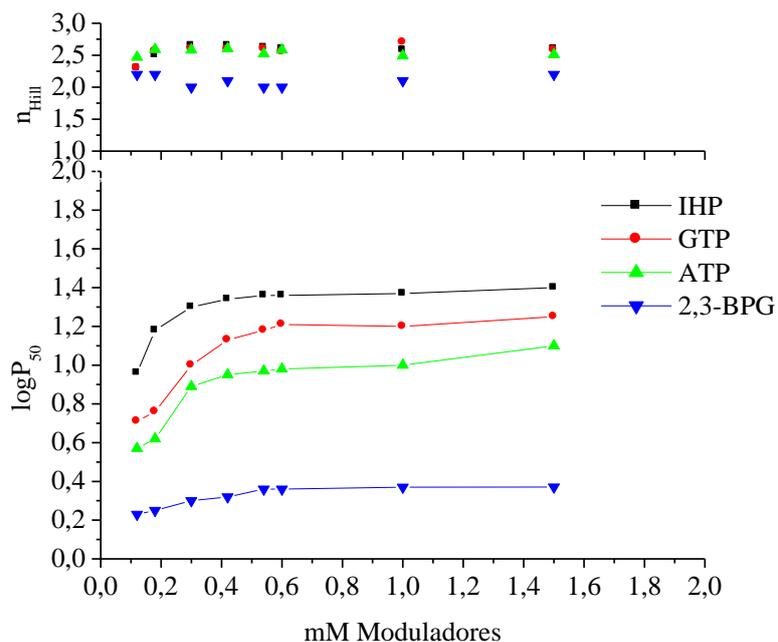
### 3.3 Efeito das concentrações de fosfatos orgânicos nas Hbs *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*

As titulações com concentrações crescentes de fosfato orgânico em pH (7,0) mostraram que IHP, GTP, ATP e íons cloreto aumentaram o  $P_{50}$ . O IHP teve efeito alostérico maior nas Hbs de ambas as espécies, seguido por GTP, ATP, íons cloreto e 2,3-BPG (Figuras 20, 21, 22 e 23). Em *L. paradoxa* foi observado aumento nos valores de Hill( $n_{Hill}$ ) em função dos aumentos das concentrações de IHP, GTP, ATP e NaCl (Figuras 20 e 21). Na presença de 2,3-BPG os valores de Hill( $n_{Hill}$ ) mantiveram-se constantes. Para *H. unitaeniatus* não foi observado mudança significativa nos valores de Hill( $n_{Hill}$ ) em função dos aumentos das concentrações de IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG e NaCl (Figuras 22 e 23).

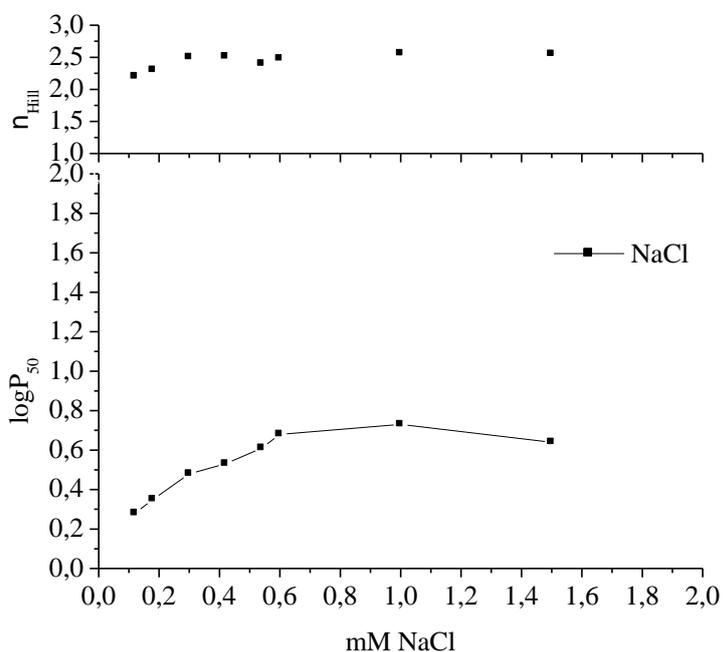
#### 3.3.1 Comparação entre os experimentos de titulação das 2 espécies estudadas

O efeito dos moduladores alostéricos nas Hbs de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* em cada condição experimental de titulação, *stripped* + IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG e NaCl são apresentados nas figuras 24, 25, 26, 27 e 28. Houve aumento crescente dos valores de  $P_{50}$  com aumento das concentrações dos moduladores alostéricos, ou seja, diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub>, isto é verificado tanto para *L. paradoxa* quanto para *H. unitaeniatus*. O IHP foi o modulador mais efetivo seguido do GTP, ATP, 2,3-BPG e NaCl. Quando comparamos as duas espécies, *H. unitaeniatus* apresentou maior sensibilidade aos moduladores IHP, GTP, ATP, 2,3-BPG, ou seja, sofreu modulação maior em menores concentrações. Em relação ao NaCl este foi mais efetivo em *L. paradoxa*.

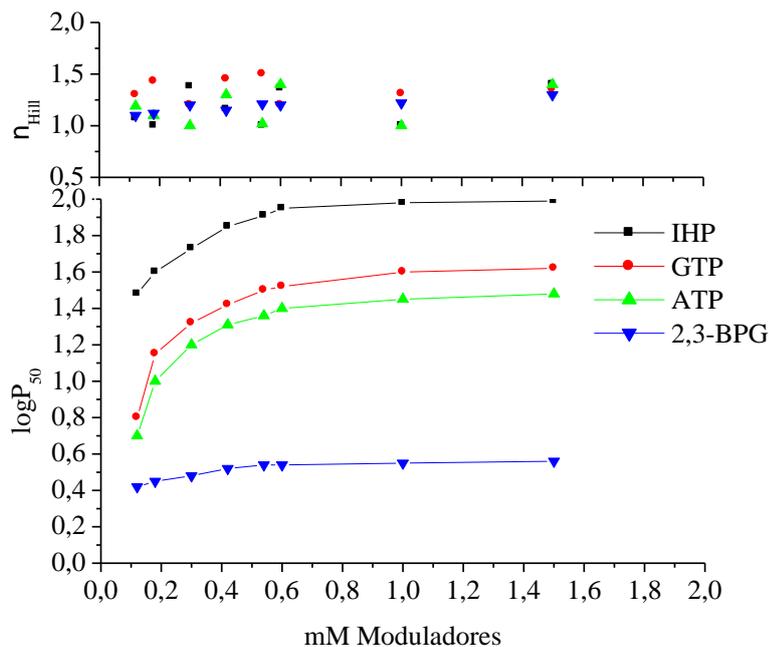
São apresentados gráficos dos valores de Hill( $n_{Hill}$ ) - cooperatividade, para as Hbs de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, nos experimentos de titulação. Não houve mudança nos valores de Hill( $n_{Hill}$ ), em função dos aumentos de concentrações de moduladores.



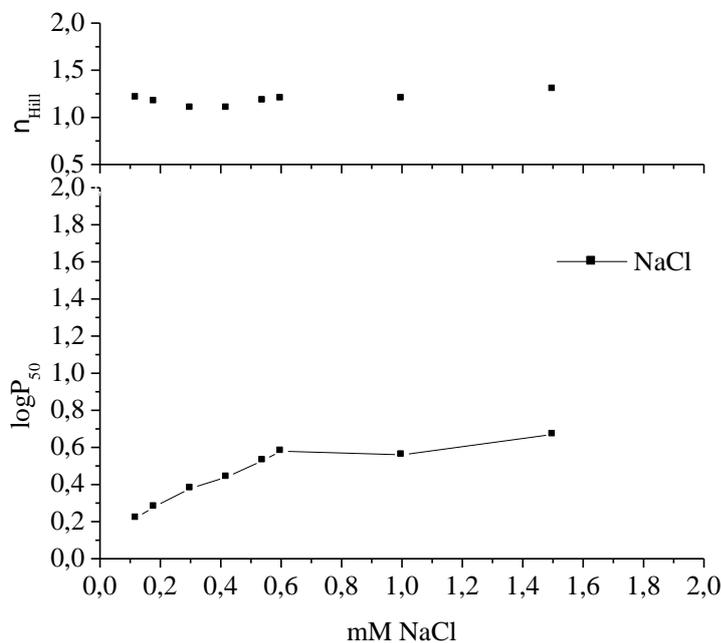
**Figura 21** - Efeito da concentração do IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05M.



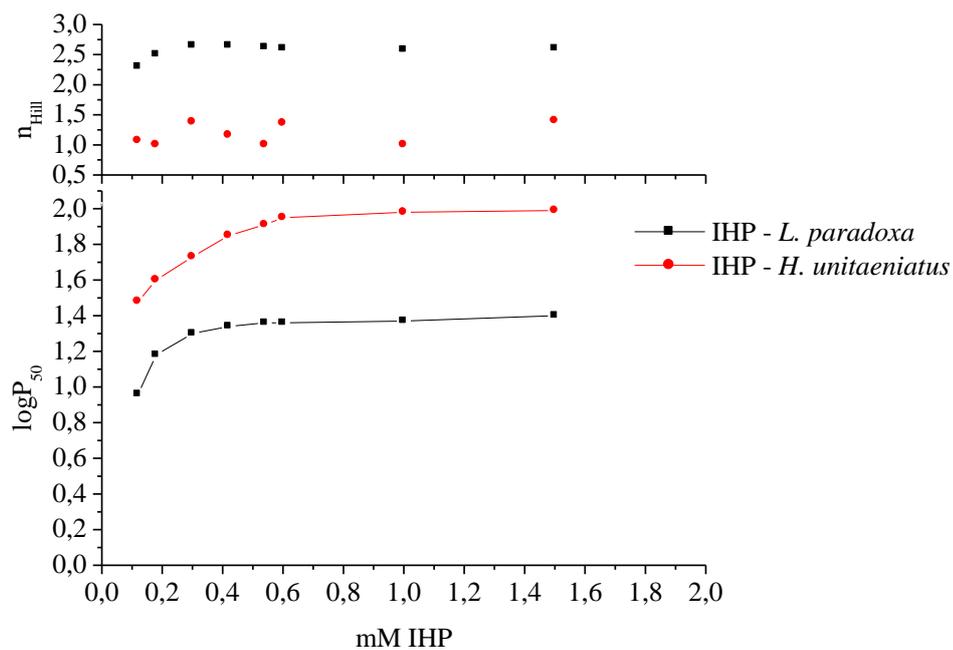
**Figura 22** - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.



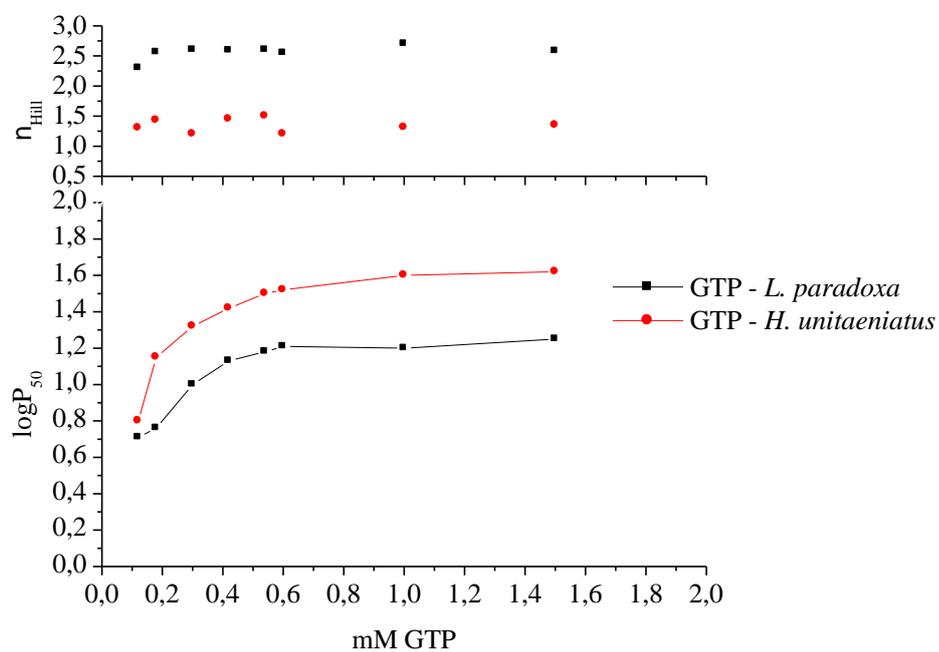
**Figura 23** - Efeito da concentração do IHP, GTP, ATP e 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.



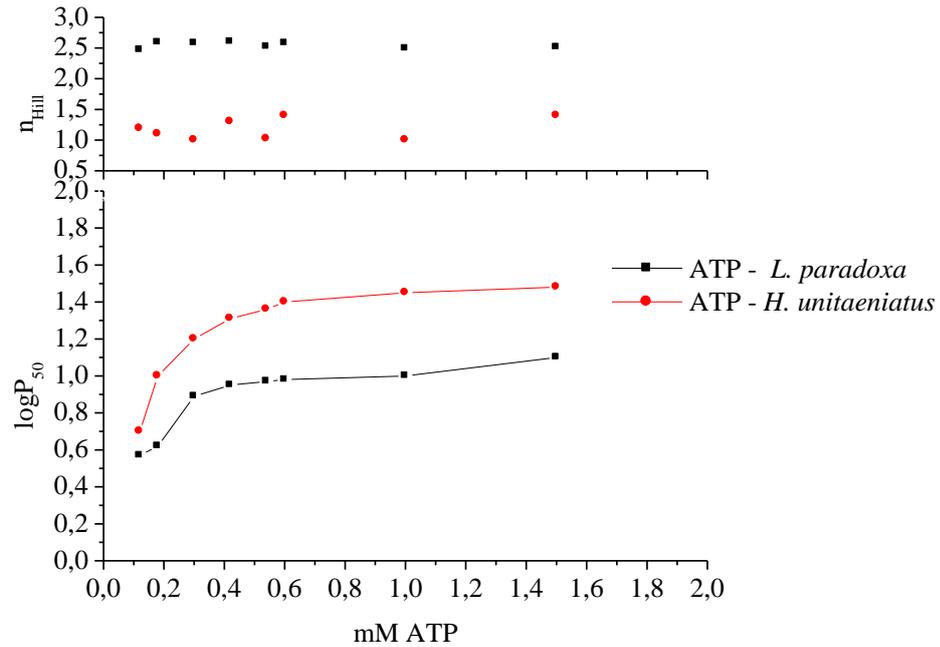
**Figura 24** - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.



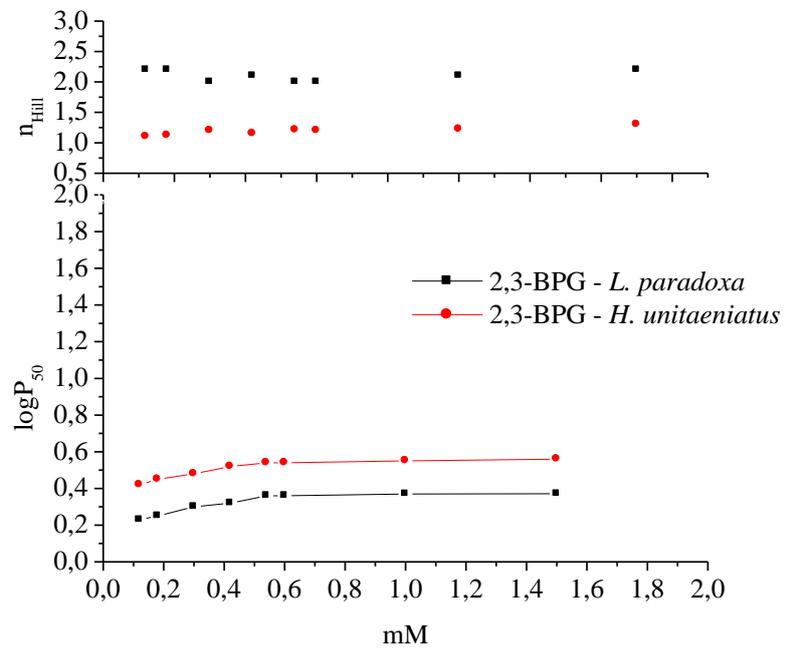
**Figura 25** - Efeito da concentração do IHP, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.



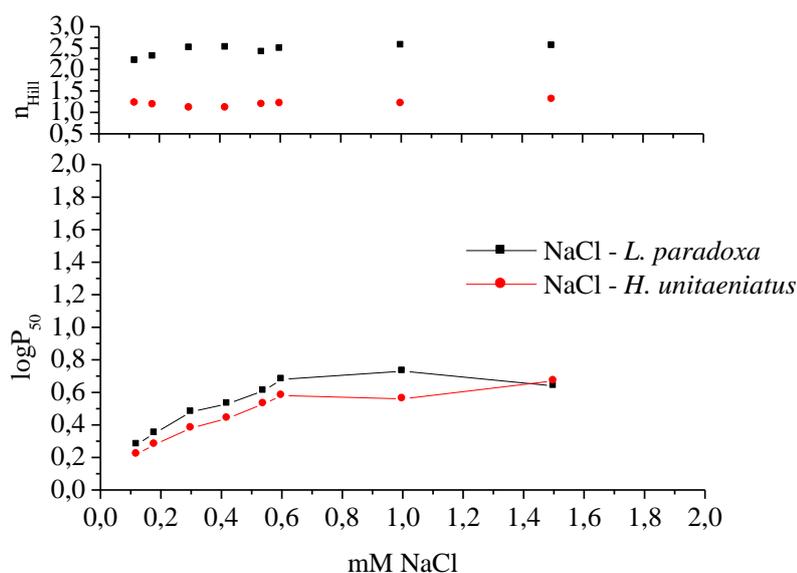
**Figura 26** - Efeito da concentração do GTP, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.



**Figura 27** - Efeito da concentração do ATP, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.



**Figura 28** - Efeito da concentração do 2,3-BPG, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* na presença de íons cloreto, pH 7,0, tampão tris-HCl 0,05 M.



**Figura 29** - Efeito da concentração do NaCl, sobre a afinidade das Hbs ao  $O_2$  de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*. Método espectrofotométrico em Hbs *stripped* pH 7,0, tampão Hepes-Tris 0,10 M.

### 3.4 Efeito Root

Para *L. paradoxa*, em pH 5,5, as Hbs *stripped* e Hbs com fosfatos orgânicos, não apresentaram efeito Root (Tabela 3). As Hb *stripped* e na presença de ATP e 2,3-BPG apresentaram valores abaixo de 8 % de desoxigenação para efeito Root em pH 5,5, ou seja, “0” de acordo com a escala proposta por FARMER et al. (1979). Na presença de IHP e GTP, as Hbs apresentaram valores de 15 % e 12%, respectivamente de desoxigenação para efeito Root em pH 5,5, ou seja, “+” utilizando a mesma escala descrita acima.

Em *H. unitaeniatus* houve 40 % de desoxigenação para efeito Root em pH 5,5 em todos os tratamentos, ou seja, “+++” se utilizarmos a escala FARMER et al. (1979), (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores de efeito Root em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

<i>L. paradoxa</i>		
	Escala Farmer*	Efeito Root
Hemolisado <i>Stripped</i>	0	Ausência
Hemolisado total + IHP	+	Ausência
Hemolisado total + GTP	+	Ausência
Hemolisado total + ATP	0	Ausência
Hemolisado total + 2,3-BPG	0	Ausência
Hemolisado total + NaCl	0	Ausência
<i>H. unitaeniatus</i>		
Hemolisado <i>Stripped</i>	+++	Presença
Hemolisado total + IHP	+++	Presença
Hemolisado total + GTP	+++	Presença
Hemolisado total + ATP	+++	Presença
Hemolisado total + 2,3-BPG	+++	Presença
Hemolisado total + NaCl	+++	Presença

\*FARMER et al., (1979).

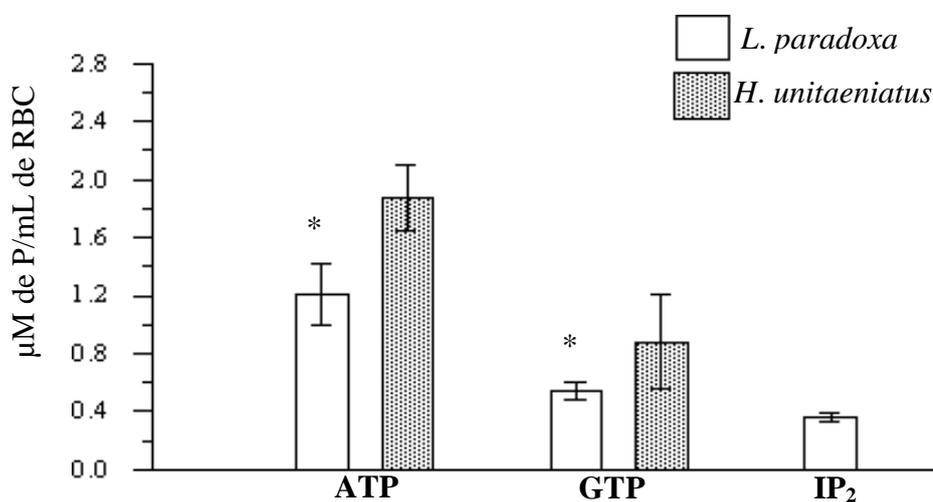
### 3.5 Fosfatos intraeritrocitários - dosagem de 2,3-BPG, nucleotídeos e inosítois.

Nos experimentos de determinação dos níveis de fosfatos não foi detectado 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) nas espécies estudadas (Tabela 4). Em ambas espécies o ATP foi o principal nucleotídeo intraeritrocitário. Em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* os valores de ATP foram respectivamente 2,24 e 2,12 vezes superiores ao GTP (Tabela 4).

As concentrações de inosítois em  $\mu\text{mol}$  de P/mL de RBC para as duas espécies estudadas podem ser visualizadas na (Tabela 4). Em *L. paradoxa* foi detectado pequena quantidade  $\text{IP}_2$  e ausência de  $\text{IP}_4$ ,  $\text{IP}_5$ , e IHP. Em *H. unitaeniatus* não foi detectado a presença de inosítois polifosfatados.

**Tabela 4** - Valores médios e desvio padrão (SD) das concentrações de nucleotídeos (ATP, GTP), 2,3 - BPG e inositóis (IP<sub>2</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> e IHP) nos eritrócitos de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, em  $\mu\text{M}$  de P/mL de RBC (n = 10). \* Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

Nucleotídeos e 2,3-BPG					
	ATP	GTP	NTP ( $\Sigma$ )	ATP/GTP	2,3-BPG
<i>L. paradoxa</i>	1,21 $\pm$ 0,21*	0,54 $\pm$ 0,06*	1,75	2,24	-
<i>H. unitaeniatus</i>	1,87 $\pm$ 0,23	0,88 $\pm$ 0,33	2,75	2,12	-
Inositóis					
	IP <sub>2</sub>	IP <sub>4</sub>	IP <sub>5</sub>	IHP	
<i>L. paradoxa</i>	0,36 $\pm$ 0,025	-	-	-	
<i>H. unitaeniatus</i>	-	-	-	-	



**Figura 30** - Valores médios dos nucleotídeos ATP, GTP e inositóis IP<sub>2</sub>, nos eritrócitos *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, em  $\mu\text{M}$  de P/mL de RBC (n = 10). \* Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas para *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*.

## 4 DISCUSSÃO

A evolução dos animais maiores e metabolicamente mais ativos foi, invariavelmente, acompanhada com o desenvolvimento de estruturas mais especializadas na troca gasosa (MORAES et al., 2005). Adaptações encontradas nas propriedades funcionais da Hb no transporte de oxigênio estão associadas com diferenças na sua estrutura molecular, e são encontradas em diferentes espécies (WEBER, 1996).

O oxigênio transportado por volume de sangue depende, entre outros fatores, da quantidade de Hb e da afinidade desta ao O<sub>2</sub>. Mudanças nas variáveis hematológicas, nível de fosfatos intraeritrocitários e componentes hemoglobínicos, facilitam a adaptação dos peixes a diversos ambientes e diferentes condições em seus habitats (VAL et al., 1985). A Hb, principal proteína situada na “interface” organismo-meio e no transporte de O<sub>2</sub> para os tecidos, é um modelo excelente do complexo respiratório para estudo de estratégias frente a mudanças ambientais (POWERS, 1980; BERENBRINK, 2006).

### 4.1 Padrão eletroforético

Em peixes, a eletroforese é comumente utilizada na caracterização dos padrões estruturais das Hbs, identificando o número de componentes e concentrações relativas dos mesmos.

Nossos resultados mostraram a existência de padrões eletroforéticos distintos entre as espécies analisadas, corroborando a idéia de que os peixes possuam Hbs com alta heterogeneidade (PETERSEN et al., 1989; FYHN e WITHLER, 1991 a). Os dois componentes protéicos anódicos nos padrões eletroforéticos de *L. paradoxa* e os seis componentes anódicos para *H. unitaeniatus* apresentaram-se uniformes em mobilidade e concentração relativa, não demonstrando variação de padrão entre os espécimes

analisados. Entretanto o número de exemplares estudados não nos permite afirmar que não existe variação intraespecífica nas espécies estudadas. Em relação aos componentes catódicos, estes não foram detectados nas espécies estudadas.

HOCHACHKA e SOMERO (2002) categorizaram os peixes segundo suas isoformas hemoglobínicas de tal forma que a classe I compreende espécies que se expressam eletroforeticamente Hbs anódicas, apresentando efeito Bohr normal e efeitos de pH e temperaturas normais; a classe II inclui espécies que expressam Hbs anódicas e catódicas com alta afinidade ao oxigênio e efeito Bohr pequeno ou reverso e com baixa sensibilidade térmica; a classe III inclui espécies que apresentam efeito Bohr normal, mas insensível à temperatura. De acordo com essa categorização em isoformas hemoglobínicas, nossos resultados mostram que *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* pertencem à classe I, apresentando todos os componentes anódicos, efeito Bohr normal e alta sensibilidade térmica.

Com relação à multiplicidade das Hbs, espécies que exploram ambientes diferentes exibem comportamento mais ativo e possuem respiração aérea facultativa tais como *Ancistrus*, *Doras*, *Hypostomus*, *Gymnotus*, *Synbranchus* e no presente estudo *H. unitaeniatus*, possuem hemolizados que variam de um a oito componentes, apresentando maior variação no padrão hemoglobínico (FYHN et al., 1978). Em espécies mais primitivas como *Amia calva* (WEBER et al., 1976 b) e o celacanto - *Latimeria chalumnae* (GORR et al., 1991), que vivem em ambientes estáveis e exibem baixa variedade de comportamento e, as espécies que respiram obrigatoriamente ar atmosférico tais como: *L. paradoxa*, *Arapaima gigas*, *Callichthys* e *Hoplosternum* possuem um ou dois componentes (JOHANSEN e WEBER, 1976; RIGGS, 1979; FYHN, et al., 1979; VAL, 1993). Entretanto, essa multiplicidade pode não estar relacionada aos hábitos respiratórios, pois o pulmonado africano *Protopterus*

*aethiopicus*, que se assemelha muito com *L. paradoxa*, apresenta quatro componentes (DELANEY et al., 1976) e em *Neoceratodus forsteri*, um dipnóico australiano, mais ativo e de respiração aérea facultativa, foram identificados três isoformas de hemoglobínicas (RASMUSSEN et al., 2009).

FYHN et al. (1979) estudando a heterogeneidade de Hbs em 96 espécies de peixes da Amazônia, encontraram um número relativamente alto de espécies com um e dois componentes bem como espécies com múltiplos componentes não encontrando correlação entre a heterogeneidade dos padrões eletroforéticos, o sistema respiratório dos peixes, o nível de atividade dos mesmos bem como os parâmetros físicos do ambiente.

O significado adaptativo da multiplicidade de componentes ainda não está totalmente esclarecido (VAL, 1993). Mesmo com os inúmeros trabalhos realizados com Hbs de peixes, não há uma clara relação entre o número de componentes hemoglobínicos, a atividade da espécie, os hábitos respiratórios e às condições ambientais.

Em *L. paradoxa* os componentes hemoglobínicos mostraram mobilidade similar às hemoglobinas humanas, sendo possível evidenciar claramente dois componentes com diferentes concentrações. Estes resultados diferem dos obtidos por RODEWALD et al. (1984), que utilizando a técnica eletroforética em poliacrilamida encontraram apenas um componente hemoglobínico para esta mesma espécie.

Os resultados eletroforéticos encontrados para *H. unitaeniatus*, também não corroboram os dados obtidos por FYHN et al. (1979), que estudando a heterogeneidade de Hb nos peixes da Amazônia, utilizando gel de acrilamida observaram em *H. unitaeniatus* dois fenótipos de Hb com 3 e 4 componentes, sendo três faixas alinhadas e

por RIGGS et al., (1979) que, utilizando a técnica eletroforese alcalina em gel de disco, também observaram 4 componentes no padrão eletroforético de *H. unitaeniatus*.

O suporte eletroforético, assim como, o sistema de tampões utilizados podem levar a uma variação no número de componentes eletroforéticos (RIGGS, 1970). O suporte de gel de amido foi escolhido pela rapidez, baixo custo e alto grau de definição analítica dos componentes separados dentre os demais suportes eletroforéticos (NAOUM, 1999 e SMARRA, 1997).

De acordo com FRANCISCO (1995), que estudou os aspectos estruturais e funcionais das Hbs da traíra *Hoplias malabaricus*, observou que eletroforeses em gel de acrilamida quanto a bis-acrilamida reduzem o número de componentes quando comparados às eletroforeses em gel de amido. PÉREZ et al. (1995) analisando o hemolisado de centenas de espécies de peixes verificaram que o número de componentes observados em gel de amido foi sempre superior ao número de frações observados em gel de poliacrilamida, confirmando a dependência dos resultados em relação ao método utilizado.

Sendo assim as diferenças entre os resultados do presente estudo e os encontrados na literatura podem ser devido à (1) eletroforese em gel de amido ter um grau de definição analítica maior e mais sensível, ou (2) ao fato de serem populações isoladas uma da outra, dada à distância em que foram coletadas, havendo possibilidade de polimorfismo, uma vez que aparentemente essa espécie não apresenta hábito migratório.

No presente estudo, não foi estudado as isoformas separadamente, o que poderia indicar diferenças funcionais na afinidade das mesmas ao oxigênio.

## 4.2 Comportamento funcional das Hbs de *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*

Moduladores como cloretos ( $\text{Cl}^-$ ), íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e vários tipos de fosfatos orgânicos, além do efeito da temperatura e salinidade regulam as propriedades funcionais das Hbs dos vertebrados (WEBER e JANSEN, 1988; WELLS e WEBER, 1989; VAL, 2000). Em geral, o aumento de qualquer um desses fatores ou parâmetros físicos dentro do eritrócito provoca uma diminuição da afinidade Hb- $\text{O}_2$ .

### 4.2.1 Equilíbrio de oxigenação em sangue total e *stripped*

Em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus*, os valores de  $P_{50}$  obtidos para os hemolisados *stripped* em todos os tratamentos, exceto para o IHP em *H. unitaeniatus*, foram menores do que os valores observados em sangue total, indicando um aumento da afinidade de ligação do oxigênio às moléculas de Hb nos hemolisados *stripped*.

A menor afinidade das Hbs ao oxigênio, observada nos experimentos em sangue, ocorre devido à regulação dos moduladores, tais como prótons ( $\text{H}^+$ ), fosfatos orgânicos, cloretos ( $\text{Cl}^-$ ), dióxido de carbono, bem como o efeito da temperatura (WEBER et al., 2000). Segundo WOOD et al. (1979), outros fatores também contribuem para a menor afinidade das Hbs em sangue, tais como: a) menor pH intraeritrocitário, b) maior concentração de Hbs nos eritrócitos com maior potencial de ligação e c) presença de  $\text{CO}_2$  no sangue que diminui o pH e conseqüentemente a afinidade das Hbs.

Neste estudo, as amplitudes do efeito Bohr e os valores de  $P_{50}$ , detectados nos experimentos *stripped* e na presença de moduladores, foram menores em *L. paradoxa* quando comparados com os valores observados em *H. unitaeniatus*. Estes dados demonstram a princípio, que embora ambas as espécies sejam encontradas nos mesmos habitats, os hábitos de vida e o tipo de respiração podem contribuir para as diferenças

observadas nas propriedades funcionais das suas Hbs, determinando modificações funcionais em relação aos fosfatos orgânicos.

As Hbs de *L. paradoxa*, espécie de respiração aérea obrigatória, apresentam alta afinidade ao oxigênio, sendo provavelmente uma característica que lhe conferem maior resistência às variações ambientais e a baixa disponibilidade de oxigênio ao qual está sujeita durante os períodos de estivação. Característica semelhante também foi encontrada em numerosos anfíbios anuros (BOUTILIER e HEISLER, 1988; ANDERSEN et al., 2001), em outros dipnóicos como *Protopterus aethiopicus* (LENFANT e JOHANSEN, 1968) e *Neoceratodus forsteri* (KIND et al., 2002; RASMUSSEN et al., 2009) e em espécies de teleósteos com respiração aquática que habitam ambientes hipóxicos. As curvas de dissociação das Hbs de *L. paradoxa* em forma sigmóide, semelhante à descrita por JOHANSEN e LENFANT (1967) a 23°C e por BASSI et al. (2005) a 25°C resultam de alta cooperação entre as cadeias hemoglobínicas. Segundo ANDERSEN et al. (2001) que estudou as Hbs de anfíbios anuros, as curvas de Hb sigmóides possibilitam melhor captação e descarregamento de O<sub>2</sub> aos tecidos sistêmicos (BOUTILIER et al., 1986; BOUTILIER e HEISLER, 1988; ANDERSEN et al., 2001).

A presença de receptores de dióxido de carbono encontrados nas vias aéreas distais de *L. paradoxa* (SANCHES e GLASS, 2001), anfíbios (WANG, et al., 1998) e répteis (GLASS et al., 1985; ULTSCH e JACKSON, 1996), o mesmo padrão de resposta quanto ao controle pulmonar dos anfíbios, com capacidade de difusão pulmonar e composição do surfactante pulmonar (WANG, et al., 1998; SANCHES e GLASS, 2001, BASSI et al., 2005), e a semelhança entre as propriedades funcionais das Hbs, sugerem que os dipnóicos podem ter precedido a transição ao ambiente terrestre,

podendo ser considerado grupo irmão dos tetrápodes (MEYER e DOLVEN, 1992; YOKOBORI et al., 1994; POUGH et al., 1999).

A influência do ambiente nas propriedades funcionais das Hbs são evidentes quando se analisa os valores de efeito Bohr dos peixes pulmonados *Neoceratodus forsteri* (-0,62); *Protopterus aethiopicus* (-0,47) e *Lepidosiren paradoxa* (-0,24) (LENFANT e JOHANSEN, 1968) e em duas espécies de peixes pulmonados africanos de diferentes ambientes como *Protopterus aethiopicus* capturados em lagoas profundas cujas Hbs apresentaram maior afinidade ao oxigênio em relação à espécie *Protopterus annectans*, capturados em pântanos (OLDHAM e RIGGS, 1969).

As Hbs de *H. unitaeniatus*, espécie de respiração aérea facultativa, apresentaram menor afinidade ao oxigênio quando comparadas à *L. paradoxa*, com valores de  $P_{50}$  mais elevados em todos os tratamentos (exceto na presença de NaCl) e maior amplitude de efeito Bohr. RIGGS, et al. (1979), estudando as propriedades funcionais das Hbs de peixes da família erithrinidae, observaram menor afinidade das Hbs de *H. unitaeniatus* ( $P_{50} = 63$  mmHg a pH 5,9) quando comparadas com *Hoplias malabaricus*.

O efeito Bohr, comumente encontrado em peixes, contribui para o suprimento de oxigênio nos tecidos, facilitando a captação do oxigênio nas brânquias e a liberação do mesmo para os tecidos (VAL e ALMEIDA-VAL 1995). Entretanto o significado das diferenças na amplitude desse efeito entre as espécies ainda não é clara (CRUZ, 2007).

Segundo POWERS et al. (1979), espécies submetidas à ampla variação de  $pCO_2$  e pH tendem a manter a regulação através de um efeito Bohr reduzido, pois durante a acidose, um efeito Bohr amplo, impediria a captação de oxigênio no epitélio branquial podendo acarretar morte.

Em *H. unitaeniatus* a maior amplitude de efeito Bohr na presença de moduladores, pode ser considerada como uma estratégia frente aos períodos de hipóxia

enfrentados pelo animal, uma vez que torna mais eficiente o suprimento de O<sub>2</sub> aos tecidos. CRUZ, (2007), estudando o comportamento respiratório de *Pterygoplichthys anisitsi*, espécie de respiração facultativa, observou elevação na amplitude do efeito Bohr quando a espécie foi submetida à hipóxia, efeito também observado em *Hypostomus regani* (VAL, et al., 1985), *Gymnotus carapo* (TAIPEIRO, 1993) e *Hoplias malabaricus* (FRANCISCO, 1995). Provavelmente *H. unitaeniatus* utiliza, além das propriedades funcionais de suas Hbs, outros mecanismos fisiológicos para o suprimento de O<sub>2</sub> em situações de baixas concentrações do mesmo.

OLIVEIRA et al. (2004) estudando o efeito da temperatura e da hipóxia na respiração aérea acessória de *H. unitaeniatus*, verificaram que esta espécie ajusta com eficiência o consumo de O<sub>2</sub> aos diferentes regimes térmicos com redução no consumo de O<sub>2</sub> em baixas temperaturas e aumento nas temperaturas mais elevadas.

A espécie compensa as reduções de O<sub>2</sub> do meio através de um acentuado e progressivo aumento na ventilação branquial, resultante principalmente do aumento no volume ventilatório. Esse mecanismo de compensação à hipóxia é característico de peixes que regulam eficientemente a tomada de O<sub>2</sub> do meio e, aparentemente, é o mecanismo de menor custo energético para o animal (OLIVEIRA et al., 2004).

Com a elevação da temperatura, o aumento do P<sub>50</sub> de 1,14 à 4°C para 13,46 mmHg á 40°C em *L. paradoxa* e de 1,90 para 20,89 mmHg em *H. unitaeniatus*, com a diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub>, mostra a influência da temperatura e a termosensibilidade das Hbs das duas espécies.

BASSI et al. (2005) estudando a capacidade de difusão do O<sub>2</sub> pulmonar em *L. paradoxa* também observaram uma diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub> com aumento da temperatura de 25 para 35°C. Entretanto, no presente trabalho, os valores de P<sub>50</sub> e efeito Bohr foram inferiores aos demonstrados por BASSI, et al., (2005), que obtiveram

valores de  $P_{50} = 19 \pm 4,3$  e  $27 \pm 1,8$  à  $25^{\circ}\text{C}$  nas porcentagens de 3 e 6 % de  $\text{CO}_2$  respectivamente e valores  $P_{50} = 30 \pm 3,9$  e  $41 \pm 1,0$  à  $35^{\circ}\text{C}$  também a 3 e 6 % de  $\text{CO}_2$ . Os valores de efeito Bohr encontrados por estes autores foram de -0,66 e -0,44 à 25 e  $35^{\circ}\text{C}$  respectivamente, resultados superiores aos encontrados no presente estudo. A diferença desses resultados dos encontrados no presente trabalho, podem ser devidos à: (1) nossos estudos foram feitos na ausência de  $\text{CO}_2$  enquanto os estudos citados foram feitos na presença de  $\text{CO}_2$ . O aumento das concentrações de  $\text{CO}_2$  diminui o pH sanguíneo deslocando a curva de dissociação Hb- $\text{O}_2$  para a direita, diminuindo a afinidade das Hbs ao  $\text{O}_2$  (efeito Bohr), favorecendo o descarregamento de  $\text{O}_2$  para os tecidos sistêmicos. Além disso, o  $\text{CO}_2$  liga-se diretamente aos grupamentos aminos terminais das moléculas de Hbs, o que também promove o deslocamento da curva para direita, ou (2) nos estudos realizados por BASSI, et al. (2005), utilizou-se sangue total e em nossos experimentos foram utilizados Hb *stripped*, ou seja, Hb isenta de moduladores.

Os valores de  $\log P_{50}$  obtidos a  $40^{\circ}\text{C}$  foram os mais próximos dos encontrados em sangue, apesar desses últimos terem sido realizados a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ). Estes valores são significativos uma vez que essas espécies são encontradas em águas doces tropicais, que se caracterizam por uma combinação de temperaturas que podem chegar a  $36^{\circ}\text{C}$  (HARDER et al., 1999) e baixas concentrações de oxigênio na água.

O aumento da temperatura corporal em peixes acarreta aumento da captação de  $\text{O}_2$  pelos tecidos com deslocamento da curva de saturação Hb- $\text{O}_2$  para a direita. Concomitante a redução do pH sanguíneo (CLAIBORNE e HEISLER 1984), o aumento  $\text{PCO}_2$  (SONCINI e GLASS, 1997, 2000), e o aumento da frequência respiratória (GLASS, 2007), contribuem para o maior suprimento de  $\text{O}_2$  para os tecidos sistêmicos (DEJOURS, 1981) e maior eliminação de  $\text{CO}_2$ .

#### 4.2.2 Equilíbrio de oxigenação com adição de fosfatos e NaCl

A concentração de fosfatos orgânicos dentro das células, influenciando direta ou indiretamente a afinidade Hb-O<sub>2</sub> é uma característica observada nos eritrócitos da maioria dos vertebrados (VAL, 2000).

Devido à ação alostérica dos fosfatos eritrocitários que provoca diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub>, um decréscimo nas concentrações desses fosfatos, pode resultar numa adaptação nas variações de oxigênio ambiental e na acidose interna (VAL, 1993), bem como em altas temperaturas (NIKINMAA et al., 1980) ou durante estivação (WEBER et al., 1977). Em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* como em muitas espécies de vertebrados, foi observado aumento da afinidade Hb-O<sub>2</sub> após a remoção dos fosfatos (Hb *stripped*), os quais agem como moduladores negativos da afinidade Hb-O<sub>2</sub> e, portanto estão envolvidos na regulação do transporte do O<sub>2</sub> (BARTLETT, 1980).

O efeito dos fosfatos orgânicos pode ser explicado: 1) utilizando-se o modelo alostérico, onde esses moduladores se ligam em sítios típicos da molécula de Hb dos vertebrados (na entrada da cavidade central do eixo quelante da molécula) onde eles reagindo com resíduo N-terminal básico das cadeias  $\beta$  (ANTONINI e BRUNORI, 1974) e 2) pela sua influencia no pH eritrocitário. Sendo o GTP um ânion que torna a membrana do eritrócito impermeável, isto leva ao aumento na concentração de prótons, reduzindo o pH intraeritrocitário (SOIVIO e NIKIMA, 1981; JENSEN e WEBER, 1985 b; NIKIMA e JENSEN, 1986; MOTAIS et al., 1992).

Segundo SCHWANTES et al. (1982) e VAL (2000), tanto o ATP quanto o GTP são os principais fosfatos moduladores da afinidade das Hbs ao oxigênio dos peixes.

No presente estudo os valores de P<sub>50</sub> após a adição de ATP e GTP, foram maiores em relação às Hbs *stripped*, ou seja, diminuem a afinidade das Hbs ao oxigênio, sendo o GTP mais efetivo nas duas espécies. Comparando as duas espécies observa-se que *H.*

*unitaeniatus* foi mais sensível tanto na presença do ATP como do GTP, apresentando valores maiores de  $P_{50}$  em relação a *L. paradoxa*. Estes resultados foram confirmados nos experimentos de titulação, onde em uma mesma concentração de fosfato *H. unitaeniatus* apresentou valores maiores de  $P_{50}$  em relação a *L. paradoxa*.

De forma semelhante RASMUSSEN, et al. (2009) observaram em *Neoceratodus forsteri*, peixe pulmonado australiano, aumento dos valores de  $P_{50}$  com a diminuição da afinidade da Hb na presença de ATP e GTP e, FRANCISCO (1995), estudando os aspectos estruturais, funcionais e adaptativos das Hbs de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidade), observou que tanto o ATP como o GTP diminuem, significativamente a afinidade Hb-O<sub>2</sub> nesta espécie levando ao aumento dos valores de  $P_{50}$ .

Muitas espécies de peixes amazônicas são capazes de regular a concentração de moduladores (fosfatos orgânicos), em relação às condições ambientais (VAL, 1986). Estas espécies podem diminuir as concentrações destas substâncias nos eritrócitos, rapidamente, aumentando a afinidade das Hbs ao O<sub>2</sub>, facilitando a captação e o suprimento desse gás aos tecidos, tamponando as variações ambientais e comportamentais (SOUZA-SILVA, 1997).

Segundo SOIVO et al., 1980 a diminuição na concentração de fosfatos orgânicos deve ser um processo relativamente lento, o peixe necessita estar sob condições de hipóxia no mínimo de 1 a 3 semanas. Entretanto, alguns estudos demonstram que esse tempo pode ser mais rápido, logo nas primeiras horas quando o peixe é submetido à hipóxia severa (TETENS LYKKEBOE, 1985; BOUTILIER et al., 1988; FERGUSON e BOUTILIER, 1989).

VAL (1990), estudando o teleósteo de respiração aérea facultativa *Pterygoplichthys multiradiatus*, não observou a presença intraeritrocitária de GTP em

condições de hipóxia. Entretanto, quando indivíduos dessa espécie são aclimatados a condições normóxicas, a concentração de GTP aumenta e passa a ser superior à de ATP.

Nos peixes há uma grande variação não apenas quantitativa como também qualitativa dos fosfatos eritrocitários (BARTLETT, 1980). Em algumas espécies encontrou-se alta concentração de ATP, em outras espécies alta relação ATP/GTP e ainda em outras, uma elevada relação GTP/ATP (VAL, 1992 a).

Os valores obtidos dos fosfatos orgânicos nas duas espécies estudadas mostram que a concentração de ATP foi 2,24 vezes superior ao GDP em *L. paradoxa* e 2,12 vezes em *H. unitaeniatus*, sendo o ATP, neste caso, o principal nucleotídeo intraeritrocitário para essas espécies.

É possível que o ATP predomine quantitativamente nos eritrócitos dessas espécies de peixes devido ao seu papel na provisão da energia celular. É possível também que o ATP seja responsável pela modulação de enzimas que regulam o metabolismo destas espécies.

Estudos mostraram o ATP em maior concentração em várias espécies de peixes sendo esse fosfato orgânico considerado mais importante para esses animais (VAL e ALMEIDA-VAL, 1988; WILHELM FILHO et al., 1992).

Nossos resultados não corroboram os encontrados por ISAACKS et al. (1978), que verificaram concentrações maiores de GTP em relação ao ATP nos eritrócitos de *L. paradoxa*, mas estão de acordo com os resultados de JOHANSEN et al., (1978a) que estudando as propriedades respiratórias e sanguíneas de peixes amazônicos detectou 2,33 vezes mais ATP em relação ao GTP em *L. paradoxa* e 2,25 vezes mais ATP em relação ao GTP em *H. unitaeniatus*.

FRANCISCO (1995) observou no Erythrinidae *Hoplias malabaricus* maiores concentrações de GTP quando comparado com as de ATP, sendo o GTP o principal fosfato orgânico intraeritrocitário para esta espécie.

No presente estudo, embora as concentrações de ATP tenham sido maiores, as Hbs de *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*, foram mais sensíveis ao GTP do que ao ATP apresentando valores maiores de  $P_{50}$ .

FEUERLEIN e WEBER (1994) formularam algumas hipóteses para explicar tal fato: (1) o GTP apresenta uma ligação de hidrogênio a mais que o ATP. Desse modo a modulação mais efetiva do GTP ocorre devido a maior possibilidade de formação de ligações de hidrogênio levando vantagem na competição com o ATP pelo mesmo sítio de ligação, (2) e que o GTP é menos inibido por cátions como o  $Mg^{+2}$ , os quais formam complexos com os fosfatos eritrocitários eliminando o efeito do ATP, mas não o do GTP.

Em muitas espécies o GTP apresenta-se como o modulador mais potente da afinidade Hb-O<sub>2</sub>, em outras seu efeito mostra-se semelhante ou inferior ao ATP (PELLEGRINI et al., 2003).

Considerando-se que ambos os fosfatos podem ter suas concentrações alteradas, suas modulações sobre as Hbs podem representar um importante papel na adaptabilidade imediata (SOUZA-SILVA, 1997).

Sendo assim os resultados obtidos nos experimentos de equilíbrio de oxigenação com adição de fosfatos e a detecção da presença de ATP e GTP nos eritrócitos de *L. paradoxo* e *H. unitaeniatus*, corroboram com a hipótese de que estes fosfatos participam dos mecanismos de modulação das Hbs, influenciando a afinidade Hb-O<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que os fosfatos orgânicos estão provavelmente envolvidos nos mecanismos adaptativos destas espécies frente às flutuações ambientais a que são

expostas, e deixando evidente o importante papel dos eritrócitos na regulação do transporte de oxigênio, através da produção e da regulação da concentração de fosfatos orgânicos, que atuam como moduladores alostéricos das Hbs.

Ao analisarmos o comportamento dessas Hbs na presença de 2,3-BPG, modulador alostérico encontrado nos eritrócitos em mamíferos, fetos de aves antes de eclodir, anfíbios anuros e algumas espécies de peixes, podemos observar que este modulador é o menos efetivo na modulação das Hbs destas espécies com valores de  $P_{50}$  próximos aos observados nas Hb *stripped* a 21°C sugerindo que o 2,3-BPG não atua como modulador das Hbs nas espécies estudadas. Podemos confirmar estes resultados, nos experimentos de quantificação dos fosfatos intraeritrocitários onde não detectamos a presença de 2,3-BPG em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* e nos experimentos de titulação onde o 2,3-BPG, mesmo nas maiores concentrações (1,50 mM), mostrou-se pouco efetivo como modulador.

Entretanto estes resultados não corroboram com JOHANSEN et al. (1978 a) e ISAACKS e KIM (1984), que estudando as propriedades respiratórias de peixes amazônicos e a composição de fosfatos intraeritrocitários no dipnóico australiano *Neoceratodus forsteri*, sugerem o 2,3-BPG como possível modulador hemoglobínico nos peixes pulmonados.

Na presença de inositol hexafosfato (IHP) as Hbs de ambas as espécies estudadas diminuíram a afinidade de ligação Hb-O<sub>2</sub> indicando um efeito modulador negativo. Nos experimentos de titulação, entre todos os moduladores testados, o IHP foi mais efetivo com valores altos de  $P_{50}$  nas menores concentrações (0,12 e 0,18 mM).

Os inositóis polifosfatados (IP<sub>2</sub>, IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> e IHP), potente categoria de moduladores alostéricos presente em aves, estão presentes em inúmeras espécies de peixes como no teleósteo de respiração aérea obrigatória *Arapaima gigas* (IP<sub>5</sub>)

(BARTLETT, 1978b; VAL et al., 1992 a) e nos pulmonados *P. aethiopicus* e *L. paradoxa* (IP<sub>2</sub>) (BARTLETT, 1978 a; ISAACKS et al., 1978) atuando como moduladores negativos.

Em nossas análises observamos a presença de IP<sub>2</sub> nos eritrócitos de *L. paradoxa*. Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos de BARTLETT (1978 a) e ISAACKS et al. (1978), que estudando a presença de fosfatos nos eritrócitos dos pulmonados *L. paradoxa* e *Protopterus aethiopicus* também evidenciaram a presença deste inositol. Entretanto não detectamos a presença de inositóis polifosfatados nos eritrócitos do teleósteo bimodal *H. unitaeniatus*.

Segundo ISAACKS (1985), apesar da presença de inositóis polifosfatados nos eritrócitos e de sua capacidade de modular a afinidade da Hb ao oxigênio, o seu verdadeiro papel na regulação da afinidade do sangue permanece obscura.

O fato de termos confirmado a presença IP<sub>2</sub> em *L. paradoxa*, abre-se possibilidades para novas investigações quanto ao papel deste inositol como modulador e como a sua concentração é regulada nos eritrócitos.

Outra hipótese é que além de influenciar na afinidade da Hb ao oxigênio, os inositóis possam desempenhar outras funções. RODRIGUEZ et al. (1998) sugeriram que nos eritrócitos de aves o inositol pode atuar como um inibidor competitivo pelo sítio de ligação do Mg<sup>+2</sup> na hexoquinase, embora não o faça em relação à glicose e MgATP<sup>-2</sup>, abrindo possibilidades sobre as implicações que a presença dos metabólitos fosfatados possam ter sobre o metabolismo dos carboidratos.

Os íons cloreto, potentes moduladores das Hbs de várias espécies de mamíferos, também modularam negativamente as Hbs de *L. paradoxa*, com aumento acentuado nos valores de P<sub>50</sub>. Estes resultados foram semelhantes ao descrito para o dipnóico australiano *Neoceratodus forsteri* (RASMUSSEN et al., 2009), que na presença de

NaCl tiveram os valores de  $P_{50}$  aumentados com diminuição da afinidade Hb-O<sub>2</sub>. Este modulador mostrou-se mais efetivo na modulação das Hbs de *L. paradoxa* em relação a *H. unitaeniatus*, sendo estes resultados confirmados nos experimentos de titulação, feitos com concentrações crescentes de NaCl. Provavelmente estes moduladores são característicos de peixes dipnóicos.

#### 4.2.3 Coeficiente de Hill ( $n$ )

A cooperatividade exibida pela Hb proporciona uma resposta mais sensível a variações na concentração de oxigênio. Os valores  $n_{Hill}$  encontrados para *L. paradoxa* foram, maiores que os encontrados em teleósteos e próximos aos encontrados para anfíbios anuros estudados por SONCINIE e GLASS (2000) e ANDERSEN et al. (2001), indicando cooperatividade positiva. Os valores  $n_{Hill}$ , com a adição de fosfatos (IHP, GTP, ATP), NaCl e a 40°C aumentaram consideravelmente entre os pHs 7,0 e 7,6, entretanto, na presença 2,3-BPG os valores de  $n_{Hill}$  permaneceram inalterados. GALDAMES-PORTUS et al. (1979), também observaram em *Arapaima gigas*, de respiração aérea obrigatória, valores de  $n_{Hill}$  mais pronunciados em maiores concentrações de fosfatos e em pHs mais alcalinos. RASMUSSEN et al. (2009) estudando as Hbs do pulmonado *Neoceratodus forsteri* observaram aumento considerável dos valores de  $n_{Hill}$  com adição de ATP, GTP, 2,3-BPG e íons cloreto, já o IHP não exerceu efeito.

Semelhante a outras espécies de teleósteos (TAMBURRINI et al., 2001; LANDINI et al., 2002), *H. unitaeniatus* apresentou valores de  $n_{Hill}$  próximos de 1,0, indicando cooperatividade baixa ou ausente. Na presença de moduladores os valores de Hill( $n_{Hill}$ ) mantiveram-se inalterados. RIGGS et al. (1979) e FRANCISCO (1995) observaram resultados semelhantes em *Hoplias malabaricus*, que mantiveram-se inalterados na ausência de moduladores tanto em normóxia quanto em hipóxia.

Provavelmente isto ocorre pela presença de efeito Root encontrado nestes erithrinídeos, resultando na redução na afinidade Hb-O<sub>2</sub> e na cooperatividade, pela inabilidade dos grupos heme de certas Hbs em ligarem-se ao oxigênio. Em termos de estado alostérico (estado “R”, maior afinidade ao O<sub>2</sub> e o estado “T”, maior afinidade aos ligantes heterotrópicos) a diminuição da cooperatividade é acompanhada pela inibição pela inibição da transição alostérica de “T” para “R”.

#### 4.2.4 Efeito Root

Certas Hbs, particularmente de peixes teleósteos, apresentam efeito Bohr acentuado, que em pHs ácidos não se saturam totalmente, podendo o seu nível de desoxigenação chegar a 50% (SCHWANTES et al., 1991). Esse efeito parece ser o principal fator que facilita a secreção de O<sub>2</sub> dentro da bexiga natatória e/ou no suprimento de oxigênio para o globo ocular em espécies que possuem rede “mirabile” na coróide, entretanto esses efeitos não estão totalmente esclarecidos.

Em nossos estudos *L. paradoxa* não apresentou efeito Root, estando de acordo com os resultados de FARMER et al. (1979), que estudando Hbs de peixes amazônicos não encontraram efeito Root para essas espécies. A falta de efeito Root é um dos fatores que provavelmente confere a esse peixe maior resistência à situação de hipóxia, permitindo-lhe permanecer mergulhado por longos períodos de tempo, garantindo melhor suprimento de oxigênio durante a estivação.

As características que podem estar relacionadas com a falta de efeito Root são as constantes variações ambientais a que estão sujeitas, sua bexiga natatória reduzida (ALEXANDER, 1965) e a falta de rede “mirabile” na coróide desta espécie (FARMER et al. 1979), entretanto, tais hipóteses precisam ser melhor investigadas.

LENFANT et al. (1967) e LENFANT e JOHANSEN (1968), estudando os pulmonados *N. forsteri* e *P. aethiopicus* verificaram um padrão similar a de *L. paradoxa*.

Esses resultados não são suficientes para confirmar a hipótese de FARMER et al. (1979) segundo a qual o efeito Root segue um esquema filogenético, pois SOUZA-SILVA (1997), estudando espécies filogeneticamente próximas da família Anostomidae encontrou espécies que exibiram efeitos Root acentuado, moderado, e até mesmo nulo. Segundo Val, 2000 o efeito Root pode ficar mais proeminente com a adição de ATP ou GTP, entretanto, o fato de não encontrarmos efeito Root na Hb *stripped* e na presença de moduladores, sugere que também seus componentes individuais não apresentam esse efeito.

*H. unitaeniatus* apresentou efeito Root acentuado nas Hbs *stripped* e na presença de moduladores. FRANCISCO (1995), estudando os aspectos estruturais, funcionais e adaptativos das Hbs de *Hoplias malabaricus*, encontrou ausência de efeito Root nas Hbs *stripped* e efeito Root acentuado na presença de ATP e GTP. Segundo FARMER et al. (1979), a ocorrência de efeito Root não está correlacionada com a complexidade do padrão eletroforético, embora em várias espécies se tenha encontrado sistemas de Hbs múltiplas, nos quais o efeito Root está restrito a certos componentes e sugeriram que a intensidade real de efeito Root de um componente pode ser mascarada por outros que não possuam esse efeito ou que tenham efeito Bohr reverso. O fato de ter sido encontrado efeito Root na Hb *stripped* leva-nos a supor que também seus componentes individuais apresentem esse efeito.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a) As espécies estudadas apresentam padrões eletroforéticos muito distintos corroborando a idéia de que os peixes possuem Hbs com alta heterogeneidade.
- b) Os componentes uniformes em mobilidade e concentração relativa indicam a não variação de padrão entre os espécimes analisados.
- c) As diferenças eletroforéticas entre os resultados do presente estudo e os encontrados na literatura, para estas mesmas espécies, podem ser devido ao tipo de suporte utilizado (gel de amido) que possui maior grau de definição analítica ou a possibilidade de polimorfismo.
- d) *L. paradoxa* e *H. unitaeniatus* pertencem à classe I, ou seja, apresentam os componentes hemoglobínicos anódicos, efeito Bohr normal e hemoglobinas com alta sensibilidade térmica.
- e) Em *L. paradoxa*, a maior afinidade da Hbs é provavelmente uma característica que lhe confere maior resistência durante os períodos de estivação.
- f) IHP, GTP, ATP e NaCl influenciam negativamente a afinidade das Hbs nas duas espécies analisadas, o 2,3-BPG não foi detectado e não influencia a afinidade das Hbs nas duas espécies. *H. unitaeniatus* foi mais sensível aos moduladores em relação a *L. paradoxa*.
- g) O ATP e o GTP são aos principais fosfatos orgânicos intraeritrocitários detectados em *L. paradoxa* e *H. unitaenitus*.
- h) Nas duas espécies o ATP predomina quantitativamente nos eritrócitos e o GTP apresenta um maior efeito alostérico. Apenas nos eritrócitos de *L. paradoxa* observa-se inositol fosfatados IP<sub>2</sub>.

- i) Em *L. paradoxa*, a presença de uma bexiga natatória reduzida e a falta de rede “mirabile” na coróide são características que podem estar relacionadas com a falta de efeito Root, entretanto, tais hipóteses precisam ser mais investigadas.
- j) A falta de efeito Root em *L. paradoxa* provavelmente confere maior resistência frente às variações ambientais a que estão sujeitas. *H. unitaeniatum*, apresenta efeito Root acentuado nas Hbs *stripped* e na presença de moduladores.
- k) As Hbs de *L. paradoxa* apresentam cooperatividade que é aumentada na presença de moduladores. Em *H. unitaeniatum* a cooperatividade baixa ou nula não sofre influência dos moduladores provavelmente pela existência de efeito Root.
- l) As diferenças na afinidade das Hbs pelo oxigênio, observadas entre *L. paradoxa* e *H. unitaeniatum*, podem estar correlacionadas com a contínua respiração pulmonar em *L. paradoxa* e a respiração aérea facultativa de *H. unitaeniatum*.
- m) As diferenças entre as propriedades funcionais das Hbs destas espécies provavelmente ocorrem em relação aos fosfatos orgânicos.
- n) É possível que em *L. paradoxa* e *H. unitaeniatum* o sistema de fornecimento de oxigênio tenha chegado a uma eficiência tão grande, em partes, pelas propriedades funcionais de suas Hbs, ajustando sua capacidade de transportar e descarregar O<sub>2</sub> para os tecidos através do ajuste nos níveis de fosfatos intraeritrocitários.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXADER, R. M. N. Structure and function in the catfish. *J. Zoo.*, v. 148, p. 88-152, 1965.
- ANDERSEN, J. B., JENSEN, F. B., WANG, T. Effects of temperature and oxygen availability on circulating catecholamines in the toad *Bufo marinus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 129, p. 473-486, 2001.
- ANTONINI, E., BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland Research Monographs. *Fron. Biol.*, p. 435, 1971.
- ARNONE, A. *Nature*, v. 237, p. 146-149, 1972.
- BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Bio. Chem.*, v. 254, p. 466-468, 1959.
- BARTLETT, G. R. Water-soluble phosphates of fish red cells. *Can. J. Zool.* v. 56, p. 870-877, 1978a.
- BARTLETT, G. R. Phosphates in red cells of two South American Osteoglossids: *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum*. *J. Can. Zool.*, v. 56, p. 878-881. 1978b.
- BARTLETT, G. R. Phosphates compounds in vertebrate red blood cells. *Amer. Zool.*, v. 20, p. 103-114, 1980.
- BASSI, M., KLEIN, W., FERNANDES, M. N., PERRY, S. F, GLASS, M. L. Pulmonary oxygen diffusing capacity of the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa*: physiological values by the Bohr method. *Physiol. Biochem. Zool*, The University Chicago, v. 78(4), p. 560-569, 2005.
- BERENBRINK, M. Evolution of vertebrate haemoglobins: Histidine side chains, specific buffer value and Bohr effect. *Resp. Physiol. Neurobiol.* v. 168, p. 1-20, 2006.
- BOHR, C., HASSELBALCH, K. A., KROGH, A. Uber einen in biologischer beziehung wichtigen Einfluss, den die kohlensaurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung ubt. *Scand. Arch. Physiol.*, v. 16, p. 402-412, 1904.
- BORGESE, T. A., HARRINGTON, J. P., DUFFY, L., BOURKE, S. Functional studies in goosefish (*Lophius americanus*) hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 101, p. 535-539, 1992.
- BOSSA, F., SAVI, M. R., BARRA, D., BRUNORI, M. Structural comparison of the hemoglobin componentes of the armoured catfish *Pterygoplichthys padalis*. *Biochem. J.*, v. 205, p. 39-42, 1982.
- BOUTILIER, R. G., GLASS, M. L., HEISLER, N. The relative distribution of pulmocutaneous blood flow in *Lithobates catesbeianus*: effects of pulmonary or cutaneous hypoxia, 1986.

- BOUTILIER, R. G., HEISLER, N. Acid-base regulation and blood gases in the anuran amphibian, *Bufo marinus*, during environmental hypercapnia. J. Exp. Biol., v. 134, p. 79-98, 1988.
- BRAUNER, C. J., WEBER, R. E. Hydrogen ion titrations of the anodic and cathodic haemoglobin components of the European eel *Anguilla anguilla*. J. Exp. Biol v. 201, p. 2507-2514, 1998.
- BRUNORI, M. Bohr effects in hemoglobin from *Thunnus thynnus*. Arch. Biochem. Biophys., v. 144, p. 195-210, 1966.
- BRUNORI, M. Molecular adaptation to physiological requirements: the hemoglobin system of trout. Curr. Topics Cell Reg., v. 9, p. 1-39, 1975.
- BURMESTER, T., EBNER, B., WEICH, B., HANKELN, T. Cytoglobin a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. Mol. Biol. Evol. v. 19, p. 416-421, 2002.
- CEPREGANOVA, B., WILSON, J. B., WEBBER, B. B., KJOVKARESKA, B., EFREMOV, G. D., HUISMAN, T. H. J. Heterogeneity of the hemoglobin of the ohrid trout (*Salmo L. typicus*). Biochem. Genetics, v. 30, p. 385-399, 1992.
- CÉSAR, A. C. G. Resistência à desnaturação alcalina e caracterização funcional das hemoglobinas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae). Dissertação Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - SP, 1993.
- CLAIBORNE, J. B., HEISLER, N. Acid-base regulation in carp (*Cyprinus carpio*) during and after exposure to environmental hypercapnia. J. Exp. Biol. v. 108, p. 25-43. 1984.
- CRUZ, A. L. O comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub> no cascudo de respiração bimodal *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei, Loricariidae). Tese, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - SP. p. 161, 2007.
- DE LANEY, R. G., SHUB, C., FISHMAN, A. P. Hematologic observations on the aquatic and estivating African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. Copeia, v. 3, p. 423-434, 1976.
- DE VITO, A. Propriedades funcionais de hemoglobinas bovinas. Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - SP. p. 82, 1994.
- DEJOURS, P. Principles of comparative respiratory physiology. 2.ed. Amsterdam. North Holland Publishing. 1981.
- DICKERSON, R., GEIS, I. Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. Massachusetts: Benjamin / Cummings Publishing Co., p. 176, 1983.
- DI PRISCO, G., TAMBURRINI, M. The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search for correlations with physiological adaptation. Comp. Biochem. Physiol., (B) v. 102, p. 661-671, 1992.

FADEL, V. Estrutura cristalográfica da hemoglobina isolada do Lobo Guará - *Chrysocyon brachiurus*. Mestrado, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto - SP. p. 42, 2000.

FARMER, M., FYHN, H. J., FYHN, U. E. H., NOBLE, R. W. Occurrence of Root effect hemoglobins in amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p.115-124, 1979.

FERGUSON, R. A., BOUTILIER, R. G. Metabolic-membrane coupling in red blood cells of trout: the effects of anoxia and adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.*, v. 143, p. 149-164, 1989.

FEUERLEIN, R. A., WEBER, R. E. Rapid and simultaneous measurement of anodic and cathodic haemoglobins and ATP and GTP concentrations in minute quantities of fish blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1994.

FITZINGER, L. J. F. J. Vorläufiger Bericht über eine höchst interessante Entdeckung Dr. Natterer in Brasil. *Isis (Oken)* v. 30, p. 379-380, 1837.

FRANCISCO, A. M. Aspectos estruturais, funcionais e adaptativos das hemoglobina de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1847) (Characiformes, Erythrinidae). Tese, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - SP. p. 221, 1995.

FYHN, U. E. H., FYHN, H. J., DAVIS B. J., POWER, D. A., FINK, W. L., GARLIK, R. L. Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p. 39-66, 1978.

FYHN, U. E. H., FYHN, H. J., POWERS, D. A., FINK, W. L., GARLICK, R. L. Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p. 39-66, 1979.

FYHN, U. E. H., WITHLER, R. E. A genetic polymorphism in hemoglobins of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Can Zool.*, v. 69, p. 1904-1910, 1991.

GALDAMES-PORTUS, M. I., NOBLE, R. W., FARMER, M., POWERS, D. A., RIGGS, A., BRUNORI, M., FYHN, H. J., FYHN, U. E. H. Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* and *Arapaima gigas*. *Comp. Biochim. Physiol.*, (A) v. 62, p. 145-154, 1979.

GIARDINA, B., MOSCA, D., De ROSA, M. C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: na axample of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol Scand.*, v. 182, p. 229-244, 2004.

GLASS, M. L., BOUTILIER, R. G., HEISLER, N. Effects of body temperature on respiration, blood gases and acid-base status in the turtle *Chrysemys picta bellii*. *J. Exp. Biol.* v. 114, p. 37-57, 1985.

GLASS, M. L., SANCHES, A. P., AMIN-NAVES, J., BASSI, M., RANTIN, F. T. Respiratory function in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*, In: FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T., GLASS, M. L., KAPOOR, B. G. (eds.), Fish Resp. Env., chapter. v. 15, p. 289-316, 2007.

GOOR, T., KLEINSCHMIDT, T., SGOUROS, J. G., KASANG, L. A. "living fossil" sequence: primary structure of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) hemoglobin-evolutionary and functional aspects. Biol. Chem. Hoppe. Seyler., v. 372(8), p. 599-612, 1991.

GRAHAM, J. B. Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto, p. 299, 1997.

GREANEY, G. S., POWERS, D. A. Cellular regulation of an allosteric modifier of fish hemoglobin. Nature, v. 270, p. 73-74, 1977.

HARDER, V., SOUZA, R. H. S., SEVERI, W., RANTIN, F. T., BRIDGES, C. R. The South American lungfish-adaptations to an extreme habitat. In: VAL, A. L. AND ALMEIDA-VAL, V. M. F. (eds). Biology of tropical fishes. p. 87-98, 1999.

HOCHACHKA, P. W., SOMERO, G. M. Biochemical adaptation mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press, 2002.

ISAACKS, R. E., KIM, H. D., HARKNESS, D. R. Inositol diphosphate in erythrocytes of the lungfish *Lepidosiren paradoxa* and 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes of the armoured cat fish *Pterygoplichthys* sp. Can. J. Zool., v. 56, p. 1014-1016, 1978.

ISAACKS, R. E., KIM, H. D. Erythrocyte phosphate composition and osmotic fragility in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* and osteoglossid, *Scleropages schneichardti*. Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 79, p. 667-671, 1984.

ISAACKS, R. E. The relationship between erythrocyte phosphate metabolism, carbon dioxide and pH on blood oxygen affinity in birds. In: GILLES, R. (ed). Circulation, respiration and metabolism. Spring-Verlag, p. 301-311, 1985.

JENSEN, F. B., WEBER, R. E. Kinetics of the acclimatational responses of tench to combined hypoxia and hypercapnia II extra and intracellular acid-base status in blood. J. Comp. Physiol., (B) v. 156, p. 205-211, 1985.

JOHANSEN, K., LENFANT, C. Respiratory function in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. J. Exp. Biol. v. 46, p. 205-218, 1967.

JOHANSEN, K., LYKKEBOE, G., WEBER, R. E., MALOIY, G. M. O. Respiratory properties of blood in awake and estivating lungfish *Protopterus amphibius*. Resp. Physiol. v. 27, p. 335-345, 1976.

JOHANSEN, K., WEBER, R. E. On adaptability of haemoglobin function to environmental condition. In: DAVIES, P. S. (ed.). Exp. Biol. Pergamon Press, Oxford, p. 219-234, 1976.

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

KARPLUS, M. Heme-iron ligand binding. In: HO, C., EATON, W. A., COLLMAN, J. P., GIBSON, Q. H., LEIGH Jr., J. S., MARGOLIASH, E., MOFFAT, K., SCHEIDT, W. R. Hemoglobin and oxygen binding. New York: Elsevier North Holland, p. 3-11, 1982.

KIND, P. K., GRIGG, G. C., BOOTH, D. T. Physiological responses to prolonged aquatic hypoxia in the queensland lungfish *Neoceratodus forsteri*. *Resp. Physiol. Neurobiol.*, v. 132, p. 179-190, 2002.

LANDINI, G. F. Caracterização estrutural e funcional de hemoglobinas de Skua - *Catharacta maccormicki*. Mestrado, Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - SP. p. 52, 2002.

LENFANT, C., JOHANSEN, K., GRIGG, G. C. Respiratory properties of blood and pattern of gas exchange in the lungfish *Neoceratodus forsteri* (Kreffft). *Resp. Physiol.*, v. 2, p. 1-21, 1967.

LENFANT, C., JOHANSEN, K. Respiration in the african lungfish *Protopterus aethiopicus*. I. Respiratory properties of blood and normal pattern of breathing and gas exchange. *J. Exp. Biol.* v. 49, p. 437-452, 1968.

LESK, A. M. Protein architecture - A practical approach, IRL Press. 1991.

MANGUN, C. P., KONDON, M. The role of coelomic hemerythrin in sipunculid worm *Phylascolopsis gould* *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 50, p. 777-785, 1975.

MEYER, A., DOLVEN, S. I. Molecules, fossils, and the origin of tetrapods. *J. Mol. Evol.* v. 35, p. 101-113, 1992.

MOYES, C. D., SCHULTE, P. M. Princípios de fisiologia animal. 2ª Ed. Artmed, p. 756, 2010.

MORAES, M. F. P. G., HOLLER, S., COSTA, O.T. F., GLASS, M. L., FERNANDES, M. N., PERRY, S. F. Morphometric comparison of the respiratory organs of the South American lungfish *Lepdosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiol. Biochem. Zoo.*, v. 78(4), p. 546-559, 2005.

MOTAIS, R., BORGESSE, F., FIEVET, B., GARCIA-ROMEU, F. Regulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and pH in erythrocytes of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 102, p. 597-602, 1992.

NAOUM, P. C. Eletroforese. 2. ed. São Paulo: Santos, 1999.

NIKINMAA, M., TUURATA, H., SIOVO, A. Thermoacclimatory changes in blood oxygen binding properties and gill secondary lamellar structure of *Salmo gairdnerii*. *J. Comp. Physiol.*, (B) v. 140, p. 255-260, 1980.

NIKIMAA, M., JENSEN, F. B. Blood oxygen transport and acid-base status of stressed trout (*Salmo gairdnerii*): pre and postbranchial values in winter fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 84, p. 319-396, 1986.

OHKUBO, N., WATABE, S., OSHIRO, T., TAKASHIMA, F., NAKAJIMA, H. Subunit structures of multiple hemoglobins in carp. *J. Comp. Physiol.*, (B) v. 163, p. 445-451, 1993.

OLDHAM, J., RIGGS, A. 1969 cited in A. RIGGS. Properties of fish hemoglobins. In: *Fish physiology*, Academic Press, New York, v. 4, p. 245-246, 1970.

OLIANAS, A., MESSANA, I., SANNA, M. T., CASTAGNOLA, M., MANCONI, B., MASIA, D., COLUCCIA, B., PELLEGRINI, M. Two sites for GTP binding cathodic haemoglobins from Anguilliformes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 141, p. 400-407, 2005.

OLIVEIRA R. D., LOPES, M., SANCHES J. R., KALININ A. L., GLASS M. L., RANTIN F. T. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 139, p. 479-485, 2004.

PELLEGRINI, M., GIARDINA, B., VERDE, C., CARRATORE, V., OLIANAS, A., SOLLAI, L., SANNA, M. T., CASTAGNOLA, M., di PRISCO, G. Structural-functional characterization of the cathodic haemoglobin of the conger eel, *Conger conger*: molecular modeling study of an additional phosphate-binding site. *Biochem. J.*, v. 372, p. 679-686, 2003.

PERES, P., AZEVEDO, W. F., BONILLA, G. Allosteric water and phosphate effects in *Hoplosternum littorale* hemoglobins. *Euro. J. Biochem.*, v. 271, p. 4270-4274, 2004.

PÉREZ, J., RYLANDER, K., NIRCHIO, M. The Evolution of multiple haemoglobins in fishes. *Rev. fish Biol. Fish.*, v. 5, p. 304-319, 1995.

PERUTZ, M. F., BRUNORI, M. Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian hemoglobins. *Nature*, v. 299, p. 421-426, 1982.

PERUTZ, M. F., FERMI, G., LUISI, B., SHAANAN, B., LIDDINGTON, R. C. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Acc. Chem. Res.*, v. 20, p. 309-321, 1987.

PETERSEN, C. G., SCHWANTES, A. R., DE LUCA, P. H., SCHWANTES M. L. B. Functional properties of the two major hemoglobin components from *Leporinus friderici* (pisces). *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 94(4), p. 823-827, 1989.

POUGH, F. H., JANIS, C. M., HEISER, J. B. *Vertebrate Life*. Prentice Hall. 5ed. 1999.

POWERS, D. A. FYHN, H. J. FYHN, U. F. H.; MARTIN, J. F. GARLICK, R. L. WOOD, S. C. A comparative study of the oxygen equilibria of blood from 40 genera of Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 62, p. 67-85, 1979.

POWERS, D. A. Molecular and cellular adaptations of fish hemoglobin-oxygen-affinity to environmental changes. In: TRUCHOT, J. L. J., GILLES, R. (eds). Resp. pigment animal - relation, structure-function). Springer-Verlag, Berlin, p. 95-140, 1985.

POWERS, D. A. Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. Amer. Zool., v. 20, p. 139-162, 1980.

RASMUSSEN J. R., RUFUS M. G., WELLS, K. H., TIMOTHY, D. C., THOMAS B. Characterization of the hemoglobins of the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri* (Kreff). Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 152(2), p. 162-167, 2009.

RIGGS, A., WOLBACH, R. A. Sulphydryl groups and structure of the hemoglobin. J. Gen. Physiol., v. 39, p. 585-605, 1956.

RIGGS, A. Properties of fish hemoglobins. In: HOAR, W.S., RANDAL, D. (eds.). Fish physiolog., Academic Press, New York, v. 4, p. 209-250, 1970.

RIGGS, A. Molecular control of hemoglobin function. In KUN, E., GRISOLIA, S. Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells. New York: John Wiley & Sons. Inc., p. 1-31, 1972.

RIGGS, A. Factors in the evolution of hemoglobin function. Fed. Proc Fedn. Am Socs Exp. Biol., v. 35, p. 2115-2118, 1976.

RIGGS, A. Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes. Na overview. Comp. Biochem. Physiol., (B) v. 62, p.257-272, 1979.

RIGGS, A., FYHN, H. J., FYHN, U. E. H., NOBLE, R. W. Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Hoplais malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Comp. Biochem. Physiol., (A) v. 62, p. 189-194, 1979.

RODEWALD, K., STANGL, A., BRAUNITZER. G. Primary structure, biochemical and physiological aspects of hemoglobin from the South American lungfish (*Lepidosiren paradoxa* - Dipnoi). Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiol. Chemie. v. 365, p. 639-649. 1984.

RODRIGUES, E., ROSA, R., CAMPOS, D., ROSA, C. D. Carbohydrate metabolism in antarctic birds erythrocytes: of IP<sub>5</sub> and 2,3-DPG and their effect on chicken hexokinase activity. Antarctic Record., v. 42(1), p. 101-110, 1998.

SANCHEZ, A. P., GLASS, M. L. Effects of environmental hypercapnia on pulmonary ventilation of the South American lungfish. J. Fish Biol. v. 58, p. 1181-1189, 2001.

SCHWANTES, A. R. Hemoglobinas e haptoglobinas de serpentes (Squamata - Reptilia) - Tese Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 168, 1972.

SCHWANTES, A. R., VAL, A. L., FRANCISCO, A. M., SCHWANTES, M. L. B. O efeito do ATP e GTP sobre as propriedades funcionais das hemoglobinas de *Geophagus brasiliensis* (Acará). In: III Sem. Reg. Ecol. UFSCar, 1982.

SCHWANTES, A. R., BARTLETT, G. R., SCHWANTES, M. L. B. The hemoglobin of *Geophagus brasiliensis* (cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 99, p. 157-160, 1991.

SCHWEITZER, M. H., MARSHALL, C. L. A molecular model for the evolution of endothermy in the theropod-bird lineage, *J. Exp. Zool.*, v. 291, p. 317-338, 2001.

SILVA, H. R. Caracterização estrutural e funcional de hemoglobinas de três espécies de aves. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP. p. 87, 2003.

SMARRA, A. L. S. Caracterização parcial das propriedades funcionais e estruturais das hemoglobinas de *Lipossarcus anisitsi* (Pisces). Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 1997.

SMITHIES, O. An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem. J.*, v. 71, p. 585-587, 1959.

SOIVIO, A., NIKINMAA, M., WESTEMAN, K. The blood oxygen binding properties of hypoxic *Salmo gairneri*. *J. Comp. Physiol.*, v. 136, p. 83-87, 1980.

SOMERO, G. N. Environmental adaptation of proteins: strategies for the conservation of critical functional and structural traits. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 76, p. 621-633, 1983.

SONCINI, R., GLASS, M. L. The effects of temperature and hyperoxia on arterial PO<sub>2</sub> and acid-base status in *Piaractus mesopotamicus*. *J. Fish Biology*. v. 51, p. 225-233, 1997.

SONCINI, R., GLASS, M. L. Oxygen and acid-base status related drives to gill ventilation in carp. *J. Fish Biol.* v. 56, p. 528-541, 2000.

SOUZA-SILVA, M. N. Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de espécies da família Anostomidae (Pisces, Characiformes) da Amazônia Central. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP. p. 221, 1997.

SPIX, J. B. V., AGASSIZ, L. Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. colleget et pingendo curavit Dr J. B. de Spix. Monachii. Selecta Piscium Brasiliam: Part 1: i-xvi + i-ii + 1-82, Pls. 1-48; Part 2: 83-138, Pls. 49-101. Part 1 published June 1829, part 2 Jan. 1831; see Kottelat 1988, Whitehead & Myers 1971, Pethiygoda & Kottelat, 1998.

TAMBURRINI, M., VERDE, C., OLIANAS, A., GIARDINA, B., CORDA, M., SANNA, M. T., FAIS, A., DEIANA, A. M., Di PRISCO, G. PELLEGRINI, M. The hemoglobin system of the brown moray *Gymnothorax unicolor*: structure and function relationship. *Euro. J. Biochem.*, v. 268, p. 4104-4111, 2001.

TAPEIRO, E. F. Hemoglobinas de tuvira, *Gymnotus carapo*. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP. 1993.

TETENS, V., LYKKEBOE, G. Acute exposure of rainbow trout to mild and deep hypoxia: O<sub>2</sub> affinity and O<sub>2</sub> capacitance of arterial blood. *Resp. Physiol.*, v. 61, p. 221-235, 1985.

ULTSCH, G. R., JACKSON, D. C. pH and temperature in ectothermic vertebrates. *Bull. Alabama Mus. Nat. Hist.* v. 18, p. 1-41, 1996.

VAL, A. L., SCHWANTES, A. R., SCHWANTES, M. L. B., DE LUCA, P. H. Amido hidrolizado de milho como suporte eletroforético. *Ciência e Cultura*, v. 33, p. 992-996, 1981.

VAL, A. L., SCHWANTES, A. R., ALMEIDA-VAL, V. M. F., SCHWANTES, M. L. B. Hemoglobin, hematology, intrerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostomos regain* populations (São Paulo Brasil). *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 80(4), p. 737-741, 1985.

VAL, A. L. Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characoidei, Pisces): aspectos adaptativos (ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Tese Doutorado - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus - AM. p. 112, 1986.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Adaptive features of Amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon cephalus* and *Brycon erythropterum* (Pisces). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11(1), p. 27-39, 1988.

VAL, A. L. O gigante das águas doces. *Ciência hoje*. v. 11(64), p. 10-12, 1990.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, VAL, V. M., AFFONSO, E. G. Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 97, p. 852-855, 1990.

VAL, A. L., AFFONSO, E. G., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Adaptive features of amazon fishes blood characteristics of curimatã (*Prochilodus nigricans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool.*, v. 65(4), p. 832-843, 1992.

VAL, A. L. Adaptations of fishes to extreme conditions in freshwater. In: *The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life*. CRC Press, boca CRC Press, boca raton, 1993.

VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 224, 1995.

VAL, A. L. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 125, p. 417-435, 2000.

VILLAR, J. L., PUIGBÒ, P., CORDINA, M. R. Análisis of highly phosphorylated inositols in avian and crocodilian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, (B) v. 135, p. 169-175, 2003.

VILLELA, G. C. *Bioquímica para biólogos*. Ed. Interciência 1979.

WANG, T., ABE, A. S., GLASS, M. L. Temperature effects on lung and blood gases in the toad *Bufo paracnemis*: The consequences of bimodal gas exchange. *Resp. Physiol.* v. 113, p. 231-238, 1998.

WEBER, R. E., SULLIVAN, B., BONAVENTURA, J., BONAVENTURA, C. The hemoglobin system of the primitive fish *Amia calva*: isolation and characterization of the individual hemoglobins components. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 434, p. 18-31, 1976.

WEBER, R. E., JOHANSEN K., LYKKEBOE, G., MALOIY, G. M. O. Oxygen-binding properties of hemoglobins from estivating and active African lungfish. *J. Exp. Zool.*, v. 199, p. 85-96, 1977.

WEBER, R. E., JENSEN, F. B. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Ver. Physiol.*, v. 50, p. 161-179, 1988.

WEBER, R. E. Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. In: VAL, A. L. ALMEIDA-VAL, V. M. F., RANDALL D. J. (eds). *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Chapter. v. 7, p. 75-90, 1996.

WEBER, R. E., FAGO, A., VAL, A. L., BANG, A., VAN HAUWAERT, M. L., DEWILDE, S., ZAL, F., MOENS, L. Isohemoglobin differentiation in the bimodal-breathing Amazon catfish *Hoplosternum littorale*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 17297-17305, 2000.

WEBER, R. E., VOELTER, W., FAGO, A., VAL, A. L., ECHENER, H., CAMPANELLA, E., LOW, P. S. Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. *Am. J. Physiol.*, v. 287, p. 454-464, 2004.

WELLS, R. M. G., WEBER, R. E. The measurement of oxygen affinity in blood and haemoglobin solutions. In: BRIDGES, C. R., BUTLER, P. J. (Eds.), *Techniques for Comp. Resp. Physiol.: An Experimental Approach*. Society for Experimental Biology Seminar Series, Cambridge University Press, Cambridge, v. 37 p. 279-303, 1989.

WELLS, R. M. G., BALDWIN, J., SEYMOUR, R. S., BAUDINETTE, R. V., CHRISTIAN, K., BENNETT, M. B. Oxygen transport capacity in the air-breathing fish, *Megalops cyprinoids*: compensations for strenuous exercise. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 134, p. 45-53, 2003.

WILHELM FILHO, D., EBLE, G. J., KASSNER, G., CAPRARIO, F. X., DAFRÉ, A. L., OHIRA, M. Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, (A) v. 102, p. 311-321, 1992.

WILHELM FILHO, D., MARCON, J. L., CAPRARIO, F. X. NOLLIS, A. C. Erythrocytes nucleoside triphosphates in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol., (A)* v. 102, p. 323-331, 1992.

WOOD, S. C., WEBER, R. E., POWERS, D. A. Respiratory properties of blood and hemoglobin solutions from the piranha. *Comp. Biochem. Physiol., (A)* v. 62, p. 163-167, 1979.

YOKABORI, S., HASEGAWA, M., UEDA, T., OKADA, N., NISHIKAWA, K., WATANABE, K. Relationship among coelacanth, lungfishes, and tetrapods: A phylogenetic analysis based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 38, p. 602-609, 1994.