

Conteúdo citocrômico mitocondrial e atividade da oxidase citocrômica em alguns peixes amazônicos (*)

M. T. Wilson (1)
J. Bonaventura (2)
M. Brunori (3)

Resumo

O conteúdo em citocromo de partículas Keilin-Hartree isoladas de peixes respiradores de água e respiradores de ar facultativos é anotado e comparado com dados para mitocôndrias de mamíferos. Medições cinéticas de "steady state" foram realizadas sobre o sistema de oxidase. Os resultados podem ser interpretados em termos de dois locais de ligação do citocromo C cineticamente significativos associados com o citocromo-oxidase com valores Km de $\sim 1 \times 10^{-6}$ e $\sim 5 \times 10^{-8}$ M. Estes valores são semelhantes aos encontrados em mitocôndrias de boi (Ferguson-Miller et al, 1976). Os valores de "turnover" para os citocromo-oxidases de vários peixes são comparados, encontrando-se que são similares e próximos aos encontrados para a enzima de mamíferos. A constância do conteúdo de citocromo e os parâmetros cinéticos entre espécies sugerem que os processos respiratórios constituem um sistema conservador desde o ponto de vista evolutivo.

INTRODUÇÃO

Os problemas respiratórios que surgem com um meio ambiente aquático e as maneiras como estes problemas têm sido resolvidos por organismos de respiração aquática, têm sido até recentemente a província dos fisiologistas. Porém, as adaptações bioquímicas e moleculares que permitem encaixar os organismos aquáticos no seu meio ambiente têm-se tornado de grande interesse para a pesquisa. A bioquímica comparativa das moléculas transportadoras de oxigênio de espécies aquáticas tem recebido especial atenção em uma série de laboratórios (ver Antonini & Brunori, 1975; Bonaventura et al., 1975; Bonaventura et al., 1977 e Brunori, 1975; para revisões).

Os peixes do rio Solimões enfrentam o problema adicional de morar em águas com um baixo conteúdo de oxigênio dissolvido. Algumas espécies têm enfrentado esta situação desenvolvendo a capacidade para respirar ar e têm evoluído tecidos altamente vascularizados (modificação de estruturas existentes tais como a faringe, bexiga natatória ou o estômago) por cima dos quais pode passar ar. Outros trabalhos neste volume discutem as adaptações da bioquímica do sangue completo e do transportador de oxigênio, a hemoglobina, que permitem a um organismo levar uma vida aquática a baixa tensão ambiental de oxigênio e/ou uma existência de respiração parcialmente aérea.

Também é de interesse, porém, examinar as enzimas responsáveis pela utilização de oxigênio a nível celular, quer dizer a cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria e a enzima citocromo-oxidase e também investigar se os processos respiratórios celulares também sofreriam adaptação. Este trabalho reporta experimentos de "steady-state" monitorando forma de oxigênio por partículas Keilin-Hartree preparadas de espécies de respiração exclusivamente aquática (*Osteoglossum bicirrhosum*, *Hoplias malabaricus*) ou de respiração aérea facultativa (*Arapaima gigas*, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, *Pterygoplychthys pardalis*).

As condições experimentais foram aquelas sob as quais tem sido sugerido que a oxidase citocrômica ligada à mitocôndria de boi apresenta dois locais de ligação para o citocromo C cineticamente ativos (Ferguson-Miller et al., 1976).

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

(1) — Department of Chemistry, University of Essex, Wivenhoe Park, Colchester, Essex, CO4 3SQ.

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

(3) — CNR Center Molecular Biology, Institute of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Rome, Rome, Italy.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS KEILIN-HARTREE

O processo utilizado foi o descrito por Yonetani (1960). Os corações foram retirados de peixes recém-capturados e homogeneizados em um homogenizador de vidro. O lixo celular foi retirado por centrifugação a baixa rotação e o sobrenadante levado a pH 5,6 com ácido acético. Os fragmentos mitocondriais foram precipitados por centrifugação (7000 g durante 20 minutos) e resuspenso em uns poucos ml do tampão do teste. A preparação de partículas resultante foi usada imediatamente ou guardada a 4°C (por um máximo de 4 dias). A concentração protéica das partículas tratadas com deoxicolato foi determinada utilizando o método biuret. O conteúdo de citocromos das partículas foi determinado da diferença do espectros obtidos entre material reduzido e oxidado, usando um Aminco DW-2a a bordo do barco. Os coeficientes de extinção usados foram encontrados por Wilson & Epel (1968) e Van Gelder (1966) e usados por Irving & Watson (1976) para determinar o conteúdo de citocromo de mitocôndrias de peixes tropicais.

TESTE DA CITOCROMO — OXIDASE

A atividade da oxidase foi monitorada polarograficamente utilizando um eletrodo de oxigênio (Rank Brothers, Bottisham, Cambridge). O tampão do teste foi TRIS/CACODILATO 25mM, pH 7.4 conteúdo 250mM de sucrose e 1mM EDTA. Ascobato (2mM) e T.M.P.D (*) (0,3 mM) foram utilizados como agente redutor e medidor de transferência de electron respectivamente, este último facilitando a redução do citocromo c pelo ascobato. Os testes foram conduzidos a 29°C, a temperatura do rio. Estas condições são similares as utilizadas por Ferguson - Miller *et al.* (1976) sendo que eles usaram concentrações menores de ascobato e T.M.P.D. para garantir uma taxa baixa na ausência de partículas mitocondriais e citocromo c. Experimentos controle indicaram que citocromo c adicionado permaneceu no estado reduzido o experimento. Citocromo c de coração de cavalo Sigma Tipo (III) foi usado nestes testes sem mais purificação. As taxas de consumo de oxigênio foram calculadas assumindo 225 n moles de O₂/ml de tampão a 29°C. Este

valor foi obtido de Ferguson-Miller *et al.* (1976) e as Tabelas Críticas Internacionais (Washburn, 1926).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fig. 1 apresenta exemplo dos diferentes aspectos para duas das espécies de peixe (*Osteoglossum bicirrhosum* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*) investigadas. Os aspectos de diferença entre ditionita reduzida e oxidada são típicos de espécies eucariontes exibindo picos a aproximadamente 550, 560 e 605 nm, característicos de citocromos C₁, b e oxidase respectivamente (Lemberg & Barrett, 1973; Paulo & Tappel, 1961). Os espectros de diferença de *Hoplias malabaricus*, *Arapaima gigas* e *Pterygoplychthys pardalis* foram similares. Da região da faixa α destes espectros é possível calcular as concentrações dos citocromos presentes. A tabela 1 apresenta estas concentrações normalizadas com relação à concentração de proteínas das partículas.

Durante a preparação, a maior parte do citocromo C solúvel em água é removido das partículas e assim a absorção a 550nm é resultante em grande parte da presença do citocromo C₁. Não foi feita nenhuma tentativa de distinguir entre citocromo C remanente e citocromo C₁ ligado à membrana, e os dois estão juntos na tabela 1 como C₁. Os valores obtidos para *Osteoglossum bicirrhosum*, *Arapaima gigas* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* concordam bem com os valores reportados por Irving & Watson (1976) para peixes tropicais. Os valores para *Pterygoplychthys pardalis* são baixos, o que provavelmente indica que grandes quantidades de proteína não mitocondrial também foi precipitada com as partículas Keilin-Hartree. Ainda assim, as taxas moleculares dos citocromos são similares às encontradas em outras espécies relacionadas na tabela. *Hoplias malabaricus* parece ser excepcional, apresentando um conteúdo de citocromo B muito alto. Há porém alguma dificuldade em dar um valor à concentração de oxidase na presença de tanto citocromo B sendo que este tem uma considerável contribuição espectral a 605nm. É possível então que o valor de 0,2n moles de citocromo-oxidase/mg de proteína (Tabela 1) seja neste caso uma estimativa alta.

TABELA 1 — Conteúdo citocrômico das mitocôndrias de alguns peixes amazônicos e comparação dos parâmetros cinéticos "steady state" para citocromo-oxidase.

Espécie	Proteína mg ml ⁻¹ de preparação	Conteúdo citocromo n moles mg proteína ⁻¹			Parâmetros cinéticos para citocromo-oxidase		
		cl	b	oxidase	Km (M)		Turnover número + seg ⁻¹
					baixa afinidade sítio (x 10 ⁶)	alta afinidade sítio (x 10 ⁸)	
Osteoglossum (Aruanã) (a)	9	0.23	0.35	0.25	1.4	7.3	27
Arapaima (b)	28.5	0.1	0.15	0.1	1.2	3.7	24
Hoplias (a)	6.5	0.53	2.2	<0.2	2	12.5	> 9
Hoplerythrinus (b)	26	0.2	0.35	0.1	0.7	5	46
Pterygoplychthys (b)	35	0.03	0.035	0.035	1.0	6.1	60
* Boi	40 a 70	0.4	0.5	0.6	0.35 1.0	5	≈ 50

(a) Respirador de água.

(b) Respirador facultativo de ar.

(*) De Ferguson-Miller et al. 1976.

(+) Os números de "turnover" são citados sob condições de saturação de citocromo c e estão expressados em (moles O₂) (moles oxidase)⁻¹ (seg)⁻¹.

TABELA 2 — Relação peso corpóreo a peso de coração para alguns peixes respiradores de água ou respiradores facultativos de ar.

Espécie	Arapaima gigas			Osteoglossum bicirrhosum			Hoplerythrinus untaeniatus	Hoplias malabaricus
	a	b	Média (3)	c	d	Média (9)	Média (8)	Média (9)
	respirador de ar facultativo			respirador de água			respirador facultativo de ar	respirador de água
Peso corporal (kg)	1.54	4.02	2.445	0.537	1.626	0.91	0.234	0.359
Peso do ventrículo (g)	1.65	4.58	2.89	0.150	0.395	0.244	0.245	0.227
Peso do coração completo	2.55	6.41	3.84	0.270	0.953	0.487	0.405	0.315
Peso ventrículo (g)/kg peso corpóreo	1.07	1.14	1.18	0.27	0.242	0.27	1.05	0.63
Coração completo (g)/kg peso corpóreo	1.66	1.6	1.57	0.5	0.585	0.53	1.73	0.88

Os peixes estão agrupados em pares de peso corporal comparável, ex. Arapaima e Osteoglossum; Hoplerythrinus e Hoplias. Cada par contém um respirador de água e um respirador facultativo de ar. a, b, c e d apresentam os valores para quatro peixes individuais que cobrem a faixa de pesos encontrada para Arapaima e Osteoglossum. Os números em parentesis indicam o número de peixes usados para calcular cada média.

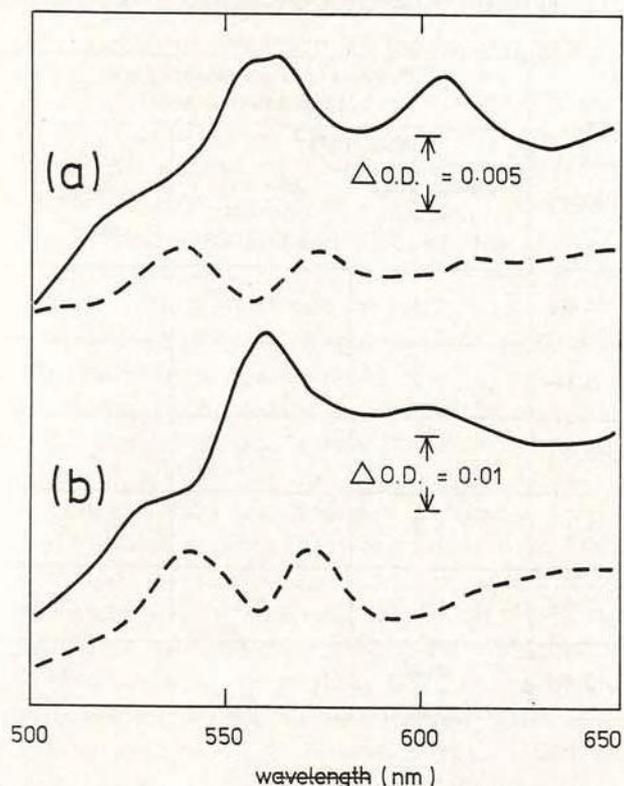


Fig. 1 — Espectros de diferença das partículas Keilin-Hartree. As linhas sólidas representam os espectros (reduzidos) menos (oxidados) e as linhas pontilhadas representam os espectros (reduzidos + CO) menos (reduzidos). a) *Osteoglossum* (Aruanã); b) *Hoplerthrinus*; As suspensões "stock" das partículas foram diluídas 10 vezes com um tampão fosfato de pH 7,4. Percurso = 1cm, Temperatura 25°C.

A fig. 1 também apresenta o espectro de diferença de partículas tratadas com ditionite em ausência e presença de CO. A figura apresenta os pequenos picos esperados perto de 600nm, o que se pode observar mais claramente na Fig. 1 (a) devido à combinação de CO com o citocromo a_3 . Além disto, o espectro de diferença exibe picos marcados a 538nm e 575nm indicando que o CO também está ligando-se a outros citocromos. Observações similares foram feitas para peixes marinhos (Wilson, Bonaventura C., Bonaventura J., Brunori e Lalla-Maharajh, 1976, trabalho não publicado). Um candidato óbvio para este sítio de ligação de CO é o grupo hemo do citocromo B sendo que se sabe que esta hemoproteína, quando parcialmente desnaturada, pode ligar ligandos externos (Lemberg & Barrett, 1973). Porém, as

partículas Keilin-Hartree usadas aqui, foram preparadas por um procedimento relativamente suave que deixa o citocromo B firmemente ligado à membrana mitocondrial e no caso de partículas de boi pelo menos, capaz de precipitar na cadeia de transporte de elétrons de succinato de oxigênio. Podemos concluir então que, ou o citocromo B de peixes é facilmente desnaturado ou que seu grupo hemo na proteína nativa pode ligar CO. Se este último é o caso, isto pode ter importantes implicações para a função *in vivo* da cadeia respiratória em peixes e merece mais pesquisas.

CINÉTICA "STEADY STATE" DO CITOCROMO-OXIDASE LIGADA À MEMBRANA

A fig. 2 apresenta os gráficos Eadie-Hofstee de $V/|S|$ versus V para a enzima citocromo-oxidase. As velocidades são expressadas em termos de nmoles de O_2 consumidos por minuto e as concentrações de substrato (citocromo C reduzido) como μM . A figura claramente indica que tais gráficos são bifásicos para todas as espécies examinadas e são fortemente remissivos dos resultados obtidos por Ferguson-Miller *et al.* (1976) para partículas Keilin-Hartree de boi. Estes autores interpretaram esta natureza bifásica como indicando a presença de dois sítios de ligação de citocromo C cineticamente significantes. Se aceitamos que esta interpretação, podemos assinalar valores K_m aparentes para os dois sítios de ligação baseados nas pendentes dos gráficos da Fig. 2. A tabela 1 dá estes valores e os compara com os obtidos para boi. Os valores K_m aparentes para o sítio de ligação de baixa afinidade variam entre $0,7 \times 10^{-6} M$ a 2×10^{-6} , sendo que os obtidos para aqueles de alta afinidade variam entre $3,7 \times 10^{-8} M$. É claro que há pouca variação entre espécies de peixe nos valores K_m aparentes e que estes são próximos aos encontrados em partículas de mamíferos (Tab. 1).

Dos valores V_{max} derivados dos gráficos na Fig. 2 podemos calcular os valores de "turnover" para as oxidasas citocromicas ligadas às partículas e estes valores também são dados na Tab. 1. Também aqui vemos uma constância extraordinária entre as espécies com os valores de "turnover" só variando em uma fai-

xa de 2,5 vezes. Novamente, *Hoplias malabaricus* é uma exceção, exibindo um valor de "turnover" marcadamente menor mas isto pode ser uma estimativa baixa já que é provável que o conteúdo de oxidase foi sobrestimado (ver acima).

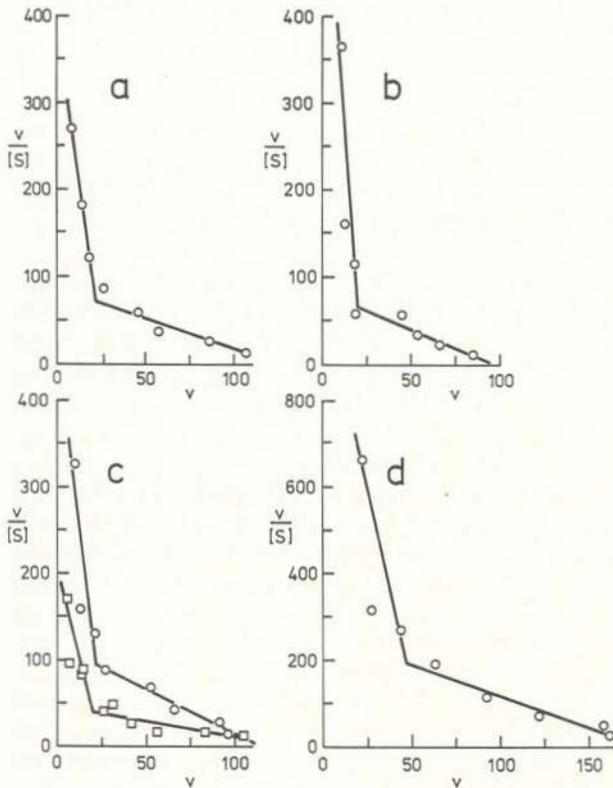


Fig 2. — Gráficos Eadie-Hofstee para a taxa de consumo de oxigênio por partículas Keilin-Hartree usando citocromo C de cavalo como substrato. a) *Osteoglossum* (Aruanã) 0,11mg proteína/ml; b) *Arapaima* 0,23mg proteína/ml; c) *Pterygoplichthys* (O) 0,28mg proteína/ml e *Hoplias* (□) 0,2mg proteína/ml; d) *Hoplerythrinus* 0,22mg proteína/ml. Condições como descritas no texto.

RELAÇÃO ENTRE PESO CORPÓREO E PESO DO CORAÇÃO

Durante este estudo foi medida a taxa de relação entre peso corpóreo e peso do coração de algumas das espécies estudadas. A tabela 2 indica esta taxa para dois respiradores de água (*Osteoglossum bicirrhosum* e *Hoplias malabaricus*) e dois respiradores de ar facultativos (*Arapaima gigas* e *Hoplerythrinus malabaricus*).

Conteúdo...

Nossos dados estão de acordo com observações anteriores que indicam que a relação de peso coração-corpo é consideravelmente menor que para aves (8,2g/kg), mamíferos (5,9g/kg), répteis (5,1g/k) e anfíbios (4,6g/kg) (Schmidt-Nielsen, 1975). A massa do coração normalizada com relação ao peso corpóreo é consideravelmente menor para as duas espécies respiradoras de água que para as duas respiradoras facultativas de ar. Esta diferença pode possivelmente estar correlata com o trabalho extra requerido para que o coração bombeie sangue através de sistemas respiratórios vascularizados (ex. as guelras e o "pseudo pulmão") nas espécies respiradoras facultativas de ar.

CONCLUSÕES

Ainda que existam diferenças marcadas entre mamíferos e peixes e entre espécies de peixes quanto às suas fisiologias respiratórias, isto não parece estender-se aos processos respiratórios celulares. A conclusão geral que pode ser tirada dos experimentos reportados é que as propriedades da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias são extraordinariamente constantes de espécie a espécie. A estequiometria dos citocromos e suas concentrações absolutas não diferem apreciavelmente. Com a interpretação de Ferguson-Miller *et al.* (1976) os estudos cinéticos podem ser utilizados para apoiar o ponto de vista de que dois sítios de ligação do citocromo c estão associados com oxidase de peixe e que a baixa concentração iônica, o citocromo c de cavalo pode ligar-se com ambos. Isto também implica que a distribuição de carga iônica ao redor do sítio de ligação do substrato apresenta semelhanças surpreendentes entre oxidases de espécies muito diferentes. Assim, os parâmetros cinéticos de "Steady state" são aproximadamente os mesmos para organismos explorando habitats diversos.

A cadeia respiratória e a oxidase terminal parecem então constituir um sistema evolutivamente conservador que não sofre maiores adaptações em resposta a mudanças nos requerimentos respiratórios do organismo que estes requerimentos são cumpridos por modificações nos sistemas de toma e transporte de

oxigênio. Esta conclusão é apoiada por estudos recentes feitos em citocromo-oxidase isolada (Bonaventura, C., Bonaventura J., Brunori e Wilson, 1976, trabalho não publicado), onde se confirma a semelhança global entre enzimas de peixes e mamíferos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela bolsa da National Science Foundation PCM 75-06451. Agradecemos ao governo brasileiro pela permissão para que o "Alpha Helix" entrasse em águas amazônicas. M.T. Wilson agradece as bolsas de viagem da Royal Society, Gran Bretanha e Duke University e a bolsa para pesquisas biomédicas do National Institute of Health. M. Brunori agradece ao Conselho Nacional de Pesquisas da Itália pela ajuda de viagem. Auxílio adicional foi dado pelo Contrato ONR ND 0014-75-0190 (a J.B.) a bolsa NIH número HI-15460 (a J.B.).

SUMMARY

The cytochrome content of Keilin-Hartree particles isolated from water-breathing and facultative air-breathing fishes is reported and compared with data for mammalian mitochondria. Steady state kinetic measurements were performed on the oxidase system. The results may be interpreted in terms of two, kinetically significant cytochrome c binding sites associated with cytochrome oxidase with Km values of $\sim 1 \times 10^{-6}$ and $\sim 5 \times 10^{-8}$ M. These values are close to those reported for beef mitochondria (Ferguson-Miller et al 1976). The turnover numbers for the cytochrome oxidases from a variety of fishes are compared, and are found to be similar and close to the value found for the value found for the mammalian enzyme. The constancy of the cytochrome content and the kinetic parameters from species to species suggests that the cellular respiratory processes constitute a conservative system from the stand point of evolution.

BIBLIOGRAFIA

ANTONINI, E. & BRUNORI, M.

- s/d — Transport of oxygen: respiratory proteins in molecular oxygen in biology. *Topics in molecular Oxygen Research*, (Hayashi, O. ed.) pp. 219-274.

BONAVENTURA, J.; BONAVENTURA, C. & SULLIVAN, B.
1975 — Hemoglobins and hemocyanins: Comparative aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.*, 194 : 155-174.

1977 — "Non-heme oxygen transport Proteins" In: *Oxygen and Physiological Function* (Jobsis, F. ed.) Dallas, Texas. pp. 177-220.

BRUNORI, M.

1975 — Molecular adaptations to Physiological Requirements: The Hemoglobin system of trout. *Current Topics in Cellular: Regulation*, 9 : 1-39.

FERGUSON-MILLER, S.; BRAUTIGAN, D.L. & MARGOLIASH, E.

1976 — Correlation of Kinetics of electron transfer activity of Various Eukaryotic Cytochromes c Oxidase. *J. Biol. Chem.*, 251 : 1104-1115.

IRVING, D.O. & WATSON, K.

1976 — Mitochondrial Enzymes of Tropical Fish: A comparison with fish from Cold Waters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B: 81-92.

LEMBERG, R. & BARRETT, J.

1973 — *Cytochromes*. Academic Press.

PABLO, I.S. & TAPPEL, A.L.

1961 — Cytochromes of Marine Invertebrates. *J. Cell. Comp. Phys.*, 58 : 185-194.

SCHMIDT-NIELSEN, K.

1975 — *Animal Physiology, adaption and environment*. Cambridge University Press, p. 133.

VAN GELDER, B.F.

1966 — The extinction Coefficient of Cytochrome a and Cytochrome a and Cytochrome a3. *Biochim. Biophys. Acta.*, 118 : 36-46.

WASHBURN, E.W. (Ed. in Chief)

1926 — *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*.

WILSON, D. & EPFL, D.

1968 — The Cytochrome system of sea Urchin Sperm. *Archs. Biochem. Biophys.*, 126 : 83-90.

YONETANI, T.

1960 — Studies on Cytochrome Oxidase. I. Absolute and Difference Absorption Spectra. *J. Biol. Chem.*, 235 : 845-852.