

Hemoglobinas em silurídeos da Amazônia Central: I. Análise eletroforética dos hemolisados.

Maria Isabel G. Portus (1)

Elba Lucy Donald (2)

Aldo Focesi Jr. (1)

Resumo

Os hemolisados das espécies de Silurídeos (bagres e cascudos) pertencentes às famílias: **Doradidae**, **Auchenipteridae**, **Pimelodidae**, **Ageneiosidae**, **Callichthyidae** e **Loricariidae**, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados permitiram sugerir que peixes Siluriformes muito ativos que vivem em habitat variável possuem múltiplas hemoglobinas de mobilidade exclusivamente anódica. Por outro lado peixes adaptados a condições mais drásticas de hipoxia inclusive com respiração aérea adicional apresentam maior heterogeneidade eletroforética de suas hemoglobinas com componentes tanto anódicos como catódicos. A multiplicidade de componentes de hemoglobinas bem como suas características de migração no campo elétrico permitiram propor mecanismo para explicar a capacidade dos peixes de viverem em habitat tão variável como o é o do rio Amazonas.

INTRODUÇÃO

Os Silurídeos do rio Amazonas que abrangem os bagres e cascudos fornecem material de alto interesse para estudos sobre hemoglobinas. Esta é talvez a região do globo onde tais espécies são as mais abundantes vivendo num habitat dos mais variados possibilitando por conseguinte detalhados estudos da relação estrutura-função entre hemoglobinas de peixes. A função da hemoglobina deve estar associada às necessidades respiratórias do animal, e estas necessidades ou melhor os níveis de oxigenação no rio Amazonas são os mais diversos e os peixes devem possuir uma ou mais destas proteínas respiratórias adaptadas a tal diversidade na tensão do gás.

Neste trabalho, pretendemos determinar a multiplicidade de componentes de hemoglobinas das diferentes famílias mais comuns e mais facilmente capturados de bagres e cascu-

dos no rio Amazonas. Realizamos eletroforese individuais dos peixes e relatamos nossos resultados procurando relacionar com o meio ambiente predominante das espécies estudadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies mais comuns dos peixes Siluriformes Tabela I foram coletadas no lago Janauacá, rio Solimões. Exemplares adultos foram sangrados individualmente logo após coleta por punção cardíaca com seringa heparinizada, as hemácias separadas por centrifugação e lavadas repetidas vezes com solução de NaCl 1,7% e tris 1 mM pH 8,0 a 4°C. Após lise com solução de tris 1 mM pH 8,0 a 4°C, o material foi centrifugado várias vezes até obter-se solução límpida de hemolisado e era mantido a 4°C.

Os componentes de hemoglobinas dos hemolisados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% pH 8,9 utilizando-se técnicas descritas originalmente por Ornstein 1964 e Davis 1964, com algumas modificações feitas por Fyhn *et al*, 1979, controlando-se cuidadosamente as condições de padronização e concentrações do gel de resolução e de contraste.

As amostras de hemoglobina para eletroforese foram preparadas misturando-se 0,1 ml de solução de hemoglobina 1 mg/ml, 0,4 ml de glicerol, 0,2 ml de B-mercaptoetanol 0,01 M em tampão tris-glicina 0,05 M pH 8,9 equilibrada até saturação com monóxido de carbono. O sistema de tampões tris-glicina 0,05 M pH 8,9 foi usado no ânodo e tris-C1 0,1 M pH 8,1 no cátodo, e a eletroforese foi realizada, mantendo-

(1) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

(2) — Universidade Estadual de Campinas, SP.

se uma intensidade de corrente contínua de 2 mA por gel e o tempo de migração eletroforética de duas horas. Como indicador de migração foram utilizadas algumas gotas de solução de azul de bromofenol 0,05% contendo azida de sódio 0,02% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, adicionadas à cuba superior.

RESULTADOS

Os peixes Siluliformes capturados foram identificados e subdivididos em seis famílias quatro de bagres (Doradidae, Auchenipteridae, Pimelodidae e Ageneiosidae) e duas de cascudos (Callichthyidae e Loricariidae). A tabela I mostra as espécies, comprimento dos animais, peso, número de exemplares, número dos componentes encontrados nos hemolisados e os esquemas dos perfis eletroforéticos típicos a cada espécie. Procuramos descrever sucintamente as características de cada família e os resultados da análise eletroforética das hemoglobinas das espécies estudadas:

i) Os Doradídeos facilmente reconhecidos pelas placas ósseas que cobrem a linha lateral, são geralmente peixes de natação lenta, de fundo e que se alimentam principalmente de insetos aquáticos, (Marlier, 1966). A análise eletroforética de suas hemoglobinas mostra além de migração anódica, ponto isoelétrico muito próximo entre os componentes, em *Oxydoras niger*, cuiú-cuiú, observou-se uma única banda em repetidas análises, indicando um único fenótipo de hemoglobinas; em *Pterodoras granulosus*, bacu, a hemoglobina foi identificada com um padrão de três faixas não bem definidas, tendo dois componentes principais; em *Anadoras cf regani* rabeça, visualizou-se três faixas claramente definidas com um componente levemente predominante;

ii) Os representantes da família Auchenipteridae, o *Auchenipterus* sp., mandi peruano, e o *Trachycorystes* sp., cangati, são peixes pequenos, ativos e de águas rápidas próximas a depósitos arenosos. As análises das hemoglobinas em gel de poliacrilamida revelam em ambos componentes com migração anódica tendo o primeiro uma faixa de hemoglobina difusa e o segundo uma faixa mais concentrada e duas menores;

iii) Os peixes da família Pimelodiidae, geralmente peixes ativos piscívoros, capazes de utilizar qualquer tipo de alimento, plantas e invertebrados, (Fink & Fink, 1979), apresentam em eletroforese em gel de poliacrilamida múltiplos componentes de hemoglobina variando de 1 a 4 todos de migração anódica muito próxima. *Pimelodus blockii*, mandi comum, caracterizou-se sempre com um único fenótipo, exemplares de tamanho uniforme, tendo este padrão dois componentes maiores e um menor difuso. O *Brachyplatystoma* sp., dourada, apresentou quatro componentes, dois maiores e dois menores difusos e outro representante do mesmo gênero *Brachyplatystoma* sp2, piraíba, apresentou três componentes difusos. Os espécimes do gênero *Pseudoplatystoma*, surubim e capari, apresentam três e um componentes respectivamente, apesar de serem espécies filogeneticamente muito próximas. No *Piniranopterus*, piracatinga, apresentou três componentes sendo duas as bandas principais bem definidas. A hemoglobina de *Callophysus macropterus*, piracatinga, apresentou três componentes de hemoglobina, com duas bandas principais e uma pequena difusa, este padrão eletroforético foi semelhante ao *Pinarampus* sp. diferenciando-se contudo na mobilidade eletroforética;

iv) As espécies da família Ageneiosidae são hábeis nadadores adaptados a uma vida pelágica, o único representante analisado foi o *Ageneiosus brevifilis*, mandubé, a sua hemoglobina apresentou-se como um único componente de migração anódica;

v) Os peixes da família Callichthyidae, são extremamente resistentes, possuem placas ósseas, seus habitats são de fundo pantanoso são capazes de locomoção em terra e são resistentes às grandes flutuações de temperatura. Suas hemoglobinas em eletroforese em gel de poliacrilamida apresentaram componentes com migração catódica e anódica. O mais notável desta família foi ter encontrado fenótipos diferentes de hemoglobina em machos e fêmeas de *Hoplosternum throcatum*, acompanhado de dimorfismo sexual observado em sua estrutura externa, em que os machos apresentam placas ósseas espinhosas diferenciando-se das fêmeas com placas lisas;

TABELA 1 — Número de componentes e diagrama de eletroforese de Silurídeos de diferentes espécies. Os nomes, peso e comprimento dos animais bem como o número de análises realizadas estão indicados em colunas.

Família, espécie, nome comum	peso (gramas)	comprimento (cm)	n.º análises eletrof.	n.º componentes de Hc	esquema eletroforético de Hb
Família DORADIDAE					
<i>Oxydoras niger</i> (cuitu-cuitu)	300 — 1400	30 — 50	33	1	
<i>Pterodoras granulatus</i> (bacu)	360 — 1000	29 — 40	9	3	
<i>Anadoras cf regani</i> (rabeca)	100 — 180	17 — 22	7	3	
Família AUCHENIPTERIDAE					
<i>Auchenipterus</i> sp. (mandi peruano)	40 — 50	18 — 20	2	1	
<i>Trachycorystes</i> sp. (cangati)	80 — 120	18 — 20	6	3	
Família PIMELODIDAE					
<i>Pimelodus blockii</i> (mandi comum)	90 — 190	20 — 25	17	3	
<i>Brachyplatystoma flavicans</i> (dourada)	—	—	5	4	
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (piraiaba (filhote))	3525	71	2	3	
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (surubim)	—	—	2	3	
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (caparari)	1100 — 1400	55 — 60	2	1	
<i>Pinirampus pinirampus</i> (piranambu)	—	—	3	3	
<i>Callophrys macropterus</i> (piracatinga)	—	—	3	3	
Família AGENEIOSIDAE					
<i>Ageneiosus brevifilis</i> (mandubé)	—	—	3	1	
Família CALLICHTHYIDAE					
<i>Hoplosternum littorale</i> (tamoatá 1)	80	18	1	2	
<i>Hoplosternum thorocatum</i> (tamoatá 2) ♀	140 — 150	19 — 20	5	2	
<i>Hoplosternum thorocatum</i> (tamoatá 2) ♂	60 — 150	15 — 20	11	2	
Família LORICARIIDAE					
<i>Pterygoplichthys pardalis</i> (cascudo comum)	350 — 900	30 — 55	76	4	
<i>Pterygoplichthys</i> sp. (cascudo jacaré)	550 — 700	35 — 43	37	4	
<i>Plecostomus plecostomus</i> (cascudo pedra)	250 — 560	30 — 40	76	1	
<i>Hemiancistrus scaphyrhynchus</i> (cascudinho)	180	23	2	2	
<i>Ancistrus</i> sp. (cascudinho 2)	70 — 190	15 — 20	4	3	
<i>Canthoporus genibarbis</i> (cascudo preto)	150 — 300	24 — 28	5	2	
<i>Loricariichthys acutus</i> (cachimbo 1)	60 — 100	23 — 27	1	6	
<i>Loricariichthys typus</i> (cachimbo 2)	150 — 190	30 — 34	6	3	
<i>Sturisoma saphyrhynchus</i> (cachimbo 3)	50 — 60	27 — 33	2	2	

vi) Os Loricariídeos, peixes adaptados à vida de fundos lodosos e de habitat variados, apresentaram hemoglobina com componentes de migração catódica e anódica. As espécies estudadas foram duas do gênero *Pterygoplichthys* que apresentaram o mesmo número de componentes em gel de poliácridamida, mas que diferiram entre si em sua migração, principalmente no componente catódico o qual torna-se mais anódico. No *Pterygoplichthys* sp2., cascudo pedra, observamos um único componente de hemoglobina, em sucessivas análises eletroforéticas, o que nos indica um único fenótipo de hemoglobina. As hemoglobinas dos peixes dos gêneros *Hemiancistrus* e *Ancistrus* apresentaram-se na eletroforese em gel de poliácridamida uma e duas faixas principais respectivamente e quanto a hemoglobina de *Canthoporus genibarbis*, cascudo preto, dois componentes principais de migração muito próxima puderam ser evidenciados. As espécies do gênero *Loricariichthys* apresentaram-se com perfis eletroforéticos bastante diferentes tanto quanto ao número de componentes como tipo de migração, apesar de serem espécies morfológicamente semelhantes. A hemoglobina de *Sturisoma* sp. cachimbo, mostrou-se com bandas eletroforéticas nítidas distribuídas equitativamente.

DISCUSSÃO

A presença de vários componentes de hemoglobinas em peixes de modo geral, está perfeitamente estabelecida. Recentemente por análise eletroforética de hemoglobinas de um grande número de espécies da Amazônia Central, constatou-se alto grau de heterogeneidade entre estas proteínas encontrando-se peixes com até sete componentes (Davis *et al.*, 1979). As interpretações desta multiplicidade de hemoglobinas em peixes são as mais diversas e seu possível significado biológico é muito discutido havendo contudo uma tendência dos autores em relacioná-la com uma adaptação da proteína ao meio ambiente variável, (Johnsen, 1979; Sullivan, 1977; Riggs, 1979).

Analisando espécies adultas de peixes siluriformes filogeneticamente próximas observamos que tal tendência se confirmou uma vez

que a multiplicidade de hemoglobinas parece guardar uma relação estreita com o comportamento do animal, assim peixes muito ativos e de hábitos alimentares variados vivendo pois em habitat variável, tais como os pertencentes a famílias Doradidae, Pimelodidae, Auchenipteridae e Ageneiosidae, mostraram componentes de hemoglobinas exclusivamente de mobilidade anódica. É interessante observar que a carpa *Cyprinus carpio* peixe com as mesmas características descritas, possui também múltiplas hemoglobinas de migração anódica relativamente próxima e funcionalmente semelhantes (Weber *et al.*, 1975). Por outro lado peixes adaptados a sobreviverem em condições mais drásticas de hipoxia como àqueles Loricariídeos e Callichthyídeos em que se observa respiração adicional aérea, através do trato digestivo, parece apresentar maior heterogeneidade eletroforética de suas hemoglobinas, tendo ainda componentes catódicos e anódicos, de pontos isoeletrônicos distantes, provavelmente relacionados com estrutura proteica e propriedades funcionais diversas, comportando-se de modo semelhante a truta *Salmo gairdneri* (Brunori *et al.*, 1973).

Os peixes Siluriformes parecem possuir hemoglobinas com propriedades respiratórias que seguem tipos de estratégias adaptativas, condicionadas ao ambiente ou ao tipo respiratório, uma delas é de natureza qualitativa que mantém a plasticidade da hemoglobina no transporte de bases. Deste ponto de vista as hemoglobinas de um mesmo hemolisado possuem propriedades diferentes como por exemplo ausência de efeito Bohr em um ou mais componentes. A outra estratégia adaptativa seria somente de natureza quantitativa mais relacionadas com níveis de efetores heterotrópicos no sangue no animal. Assim peixes com concentração de efetores mais elevados possuiriam hemoglobinas com efeito Bohr mais elevado em certos componentes por exemplo. Neste contexto a razão da multiplicidade dos componentes das hemoglobinas seria no primeiro caso, a incapacidade de uma única hemoglobina responder as várias condições ambientais e metabólicas do animal e duas ou mais proteínas fundamentalmente diferentes conseguiriam níveis de oxigenação tecidual adequados nas várias condições em que são

submetidos os animais. De estratégias adaptativas quantitativas, seriam aquelas hemoglobinas que poderiam se adaptar as diferentes condições respiratória dos peixes, graças a sua "maleabilidade", por exemplo, cuja função estaria condicionada a diferentes concentrações de efetores polifosfatos no sangue. Nestas condições uma única hemoglobina no hemolisado seria suficiente para responder efetivamente as mais variadas condições que é exposto o animal.

Um fato que nos pareceu de relevância mostrado pela análise eletroforética das hemoglobinas foi aqueles dos 11 exemplares machos e 5 fêmeas de *Hoplosternum thrcatum*, que até há pouco eram classificados como espécies distintas, possuem perfis eletroforéticos completamente diferentes mostrando nítido dimorfismo sexual em nível de hemoglobinas. Além disto animais jovens machos e fêmeas apresentavam perfis eletroforéticos semelhantes as das fêmeas adultas.

Se confirmar-se a classificação como animais da mesma espécie tal dimorfismo torna-se evidência inofismável de adaptação estrutura-função das hemoglobinas e a proteína seria exclusivamente "construída" tendo em vista o meio ambiente a que o animal é submetido.

SUMMARY

Silurideos species from the families: **Doradidae**, **Aucheniptaridae**, **Pimelodidae**, **Ageneiosidae**, **Callichthyidae** and **Loricariidae**, were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. The results allow us to suggest that very active fishes which live in different habitat, present hemoglobin with exclusively anodic mobility. On the other hand, fishes adapted to more severe condition such as those of high hypoxia including fishes with aerobic respiration show hemoglobins with electrophoretic pattern highly heterogeneous presenting anodic and cathodic components. A mechanism is proposed to explain the heterogeneity as well as the electrical mobility of the hemoglobin components related to the habitat extremely variable of the Amazon River.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; GIARDINA, B.; BOSSA, F.; ANTONINI, E.
1973 — Hemoglobins from trout: Structural and functional properties. **Molec. Cell. Biochem.**, 1: 189-196.
- DAVIS, U.E.H.; FYHN, H.J.; DAVIS, B.J.; POWERS, D.A.; FINK, W.L.; GARLICK, R.L.
1979 — Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 39-66.
- FINK, W.L. & FINK, S.U.
1979 — Central Amazonia and its fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 13-29.
- KRAMER, D.L. & GRAHAM, J.B.
1976 — Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. **Copeia**, 689-697.
- MARLIER, G.
1967 — Ecological studies of some lakes of the Amazon Valley. **Amazoniana**, 1 (2): 91-115.
- RIGGS, A.
1979 — Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: An Overview. **Comp. Biochem. Physiol.**, 62: 257-272.
- SULLIVAN, B.
1977 — **Hemoglobin variation and its significance in fish**. US-USSR work-shop on physiology and biochemistry of aquatic animals georgetown SC.
1: 189-196.
- WEBER, R.E.; SULLIVAN, B.; BONAVENTURA, J., BONAVENTURA, G.
1976 — The hemoglobin system of the primitive fish *Amia calva*. Isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. **Biochem. Biophys. Acta**, 434: 18-31.
- ORNSTEIN, L.
1964 — Disc electrophoresis. I. Background and theory. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 121: 321-349.
- DAVIS, B.J.
1964 — Disc electrophoresis. I. Background and cations to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 121: 404-427.

(Aceito para publicação em 29/07/82)