

ESTUDO PRELIMINAR SOBRE O SISTEMA RNA-RNase EM HEPATOPÂNCREAS DE JOVENS DA LAGOSTA *PANULIRUS LAEVICAUDA* (LATREILLE)

Alexandre Holanda Sampaio
Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira⁽¹⁾
Silvana Araújo Saker

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza — Ceará — Brasil

Não obstante as lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laevicauda* (Latreille) constituírem-se no principal produto pesqueiro de exportação do Brasil, é rara a literatura nacional sobre a fisiologia e bioquímica destes crustáceos.

O conhecimento da fisiologia e as relações bioquímicas de um organismo vivo é de importância fundamental para a compreensão das atividades naturais deste organismo, bem como facilita o entendimento das interações com o habitat, fornecendo ainda subsídios para o aprimoramento biológico da espécie estudada.

A literatura pesquisada sobre o sistema RNase em crustáceos aborda, principalmente, os aspectos ligados à síntese de RNA e proteína em condições fisiológicas normais e sob a ação de estimulantes (Skinner, 1966 e 1968; Gorel & Gilbert, 1969; Gilgan & Zink, 1975; McCarthy *et al.*, 1976; Dall & Barclay, 1979; Wormhoudt & Sellos, 1980; Chang & Bruce, 1980; Spindler — Barth *et al.*, 1981).

O principal órgão de reserva em crustáceos é o hepatopâncreas, o qual estoca as substâncias que devem ser usadas para a alimentação e demanda especial de

materiais e energia durante o processo de muda (Passano, 1960). Em consequência disto, ocorre uma intensa mobilização dessas reservas para suprir as necessidades de outros tecidos (Travis, 1955).

O presente trabalho é um estudo preliminar sobre a fisiologia e bioquímica de lagosta, abordando a caracterização do sistema RNA-RNase e seu comportamento em relação ao ciclo de muda em indivíduos jovens de *Panulirus laevicauda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* foram coletados nas praias do Meireles e Titanzinho (Fortaleza — Ceará — Brasil), estocados nos aquários do Laboratório de Ciências do Mar e retirados quando necessários, utilizando-se então o hepatopâncreas para preparação dos extratos.

O método usado para determinação dos estágios de muda foi o de Drach (1939), segundo Travis (1955) e Aiken (1980).

Os ensaios para determinação e caracterização do sistema enzimático foram feitos em lagostas no estágio C do ciclo de muda.

O hepatopâncreas isolado foi pesado em balança Mettler P 1200, homogeneizado em tampão fosfato 0,1M, pH 5,7

(1) Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

na proporção de 1: 10 (p: v), sob banho de gelo. O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada, modelo PR-J International Equipment Company, por 10 minutos, 4°C a 3.000 rpm. O sobrenadante foi levado a pH 5,1 com ácido clorídrico 0,5N e colocado em geladeira por uma noite. Em seguida, foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo desprezado o precipitado (Tuve & Anfinsen, 1960).

Para o ensaio enzimático usou-se uma solução de RNA (ICN — Pharmaceuticals, Inc.) a 0,1% em tampão citrato pH 5,2.

A reação enzimática, quando não referida de outra maneira, foi feita através de 0,2 ml do extrato, 1,5 ml do tampão citrato 0,1M, pH 5,2 e 0,8 ml de RNA, atingindo um volume final de 2,5 ml. A reação processou-se à temperatura de 45°C durante 30 minutos, sendo parada por adição de 0,5 ml de acetato de uranila a 0,75% em HCl 25%, com um repouso de 10 minutos.

Do sobrenadante, obtido por centrifugação a 3.000 rpm em centrífuga International Clinical Centrifuge modelo A 4487 x — 5, por 10 minutos, foram retirados 0,2 ml e adicionados 4,8 ml de água destilada, sendo a absorbância lida a 260 nm em espectrofotômetro Varian Techtron, modelo 635. O branco, ou tempo zero da reação, obteve-se pela adição de acetato de uranila a 0,75% em HCl 25% (Tuve & Anfinsen, 1960). A unidade de atividade enzimática correspondeu à variação de 0,1 de densidade ótica, sendo esta atividade expressa em unidade de atividade por ml (U.A./ml).

A atividade ribonucleásica foi determinada em lagostas jovens nos diversos estágios de muda. A determinação do pH ótimo da ribonuclease efetuou-se utilizando-se tampão citrato 0,1M nos pHs 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0.

Para determinação do tempo e temperatura ótimos, procedeu-se à reação do extrato com o substrato, nas condições de reação já descritas, nas temperaturas de 40 e 45°C, com os tempos de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

A relação enzima-substrato foi definida variando-se o RNA de 0,2 a 1,0 mg, conservando-se o volume final de 2,5 ml.

Para determinação da termo-estabilidade, o extrato foi submetido à temperatura de 50°C em tempos variados. Findo cada tempo era determinada no extrato a atividade ribonucleásica.

Os resultados das atividades enzimáticas relativos à determinação do pH ótimo, tempo e temperaturas ótimos de reação, relação enzima-substrato e termo-estabilidade foram expressos em U.A./ml, sendo que aqueles encontrados para a termo-estabilidade foram transformados em percentagem, considerando 100% a atividade do extrato não submetido ao aquecimento.

Na determinação do pH ótimo de extração usou-se o tampão acetato de sódio 0,1M, pHs 4,0 e 5,0, tampão fosfato de sódio nos pHs 6,0 e 7,0 e tampão borato de sódio nos pHs 8,0 e 9,0. O homogenato foi centrifugado em centrífuga IEC modelo HT a 20 000 g, com temperatura em torno de 4°C. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína pelo método do microbiureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina (Sigma), sendo os resultados expressos em mg de proteína por ml. A atividade ribonucleásica determinada no extrato obedeceu o procedimento já descrito, sendo os resultados expressos em U. A./ml Proteína (atividade específica).

Os extratos de hepatopâncreas preparados com tampão acetato pH 5,0 foram usados para o fracionamento com sulfato de amônia. Este foi sendo gradualmente adicionado ao extrato para uma saturação de 20%, sendo o precipitado removido por centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga modelo HT da IEC. O sobrenadante resultante foi usado para as próximas precipitações a 40, 60, 80 e 100%. Os precipitados obtidos foram suspensos em tampão acetato pH 5,2 e dialisados contra água destilada à temperatura de 4°C, durante um período suficiente para

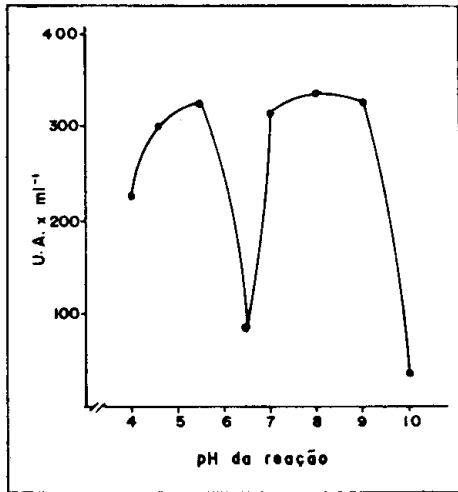


Figura 1 — Variação da atividade ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função do pH da reação.

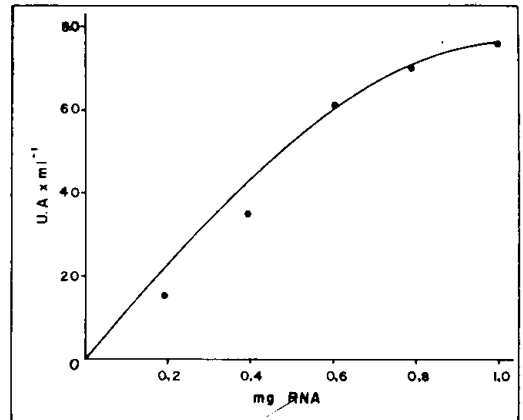


Figura 2 — Variação da atividade ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), em função da concentração do substrato.

tornar negativa a reação entre água e hidróxido de bário.

A atividade ribonucleásica foi determinada nas frações, procedendo-se como já descrito anteriormente, sendo os resultados expressos em U.A./mg Proteína.

Em relação aos diversos estágios de muda, foram determinados os ácidos nucléicos (Cherry, 1962), atividade ribonucleásica e proteína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade ribonucleásica apresentou dois picos nos pHs 5,2 e 8,0, com maior intensidade no primeiro (figura 1). Isto sugere a presença de duas enzimas em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laevicauda*, cada uma, logicamente, com uma função fisiológica bastante definida.

Wilson (1971) encontrou três enzimas em milho que degradam RNA, as quais foram denominadas de RNase I, RNase II e Nuclease I.

Anfinsen & White Jr. (1961) citam duas enzimas encontradas no pâncreas bovino e em espinafre, as quais hidrolizam o RNA, sendo que o pH ótimo de reação parece depender da fonte original do RNA.

Kunitz, 1946 (*in* Anfinsen & White Jr., 1961) encontrou um pH ótimo de 7,6 para RNA de rato, quando a fonte de enzima é levedura, enquanto que Mave & Greco (1956) determinaram que a ribonuclease pancreática tem um ótimo de atividade no pH 6,5.

A saturação enzima-substrato foi alcançada com a relação de 0,8 mg de RNA para 0,2 ml do extrato preparado na proporção 1: 10 (p: v) (figura 2).

Observando-se a figura 3, verifica-se que há um acréscimo na atividade ribonucleásica com o aumento da temperatura de incubação. Na temperatura de 45°C e no tempo de 30 minutos, a atividade ribonucleásica apresentou um incremento percentual mais elevado, quando comparada com os outros valores, razão pela qual foram escolhidos este tempo e temperatura para os ensaios enzimáticos.

A temperatura e o tempo de ensaio, bem como a relação enzima-substrato, foram basicamente semelhantes aos usados para outras ribonucleases (Shuster, 1957 *in* Shuster *et al.*, 1959; Tuve & Anfinsen, 1960; Kessler & Engelbert, 1962).

A estabilidade da enzima RNase em relação a temperatura é verificada na

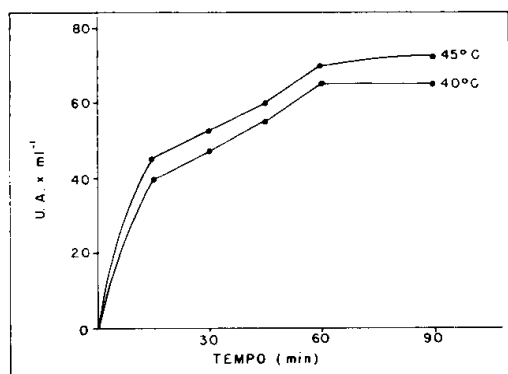


Figura 3 — Variação da atividade ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função da temperatura e do tempo de incubação.

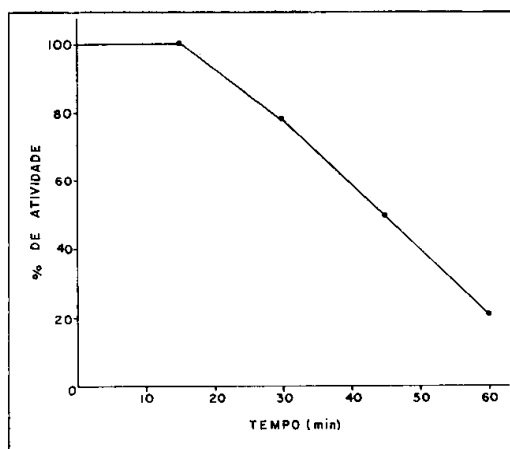


Figura 4 — Variação da porcentagem de atividade ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função do tempo e temperatura de aquecimento do extrato.

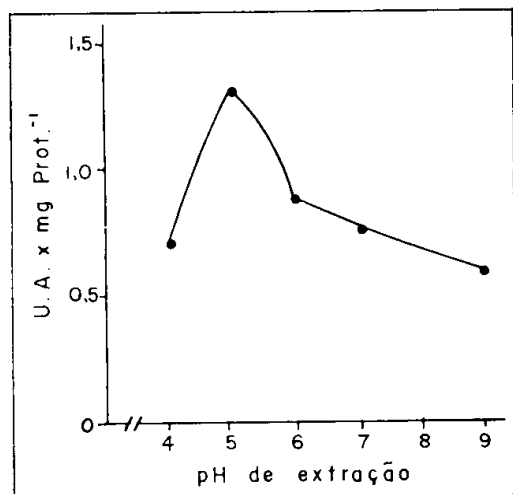


Figura 5 — Variação da atividade específica ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função do pH da solução de extração.

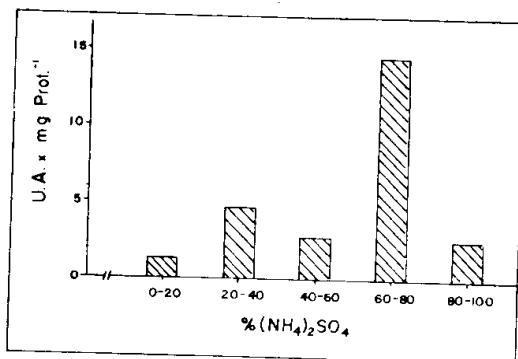


Figura 6 — Variação da atividade ribonucleásica de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função da porcentagem de saturação de sulfato de amônia.

figura 4. Nos primeiros 15 minutos de incubação do extrato a 50°C, não houve alteração na atividade; isto passou a ocorrer a partir de 30 minutos e atingindo o valor máximo em 60 minutos, quando a enzima perdeu 79% de sua atividade.

O tampão acetato 0,1M pH 5,0 foi o que mais eficientemente extraiu o sistema RNase do hepatopâncreas (figura 5), superior ao tampão citrato 0,1M pH 5,2, preconizado por Tuve & Anfinsen (1960).

A purificação do sistema ribonucleásico com sulfato de amônia mostrou atividade máxima na fração 60-80% de saturação, seguindo-se os valores correspondentes a 20-40% e 40-60% de saturação (tabela I; figura 6). Nestas frações houve um incremento na atividade específica de 18 vezes para 60-80%, 5,9 vezes para a fração 20-40% e de 3,5 vezes para a fração 40-60% de saturação, em relação ao extrato bruto. Estes dados indicam que o uso do sulfato de amônia poderá ser a primeira fase para a purificação deste sistema enzimático.

Na tabela II encontram-se os valores da concentração de RNA, proteína e atividade ribonucleásica, relativos aos extratos de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda*, nos diversos estágios de muda. Observa-se que a atividade ribonucleásica máxima ocorrida no estágio C coincide com a máxima concentração de RNA. Isto sugere que nesse estágio há uma intensa síntese e degradação de RNA, ou seja, um intenso *turnover* do sistema RNA-RNase, favorecendo a produção de proteína, cuja concentração máxima ocorreu no estágio imediatamente seguinte, estágio D, estando de acordo com os estudos de Travis (1955), Passano (1960) e Skinner (1965 e 1966).

CONCLUSÕES

1 – O pH ótimo de reação da enzima RNase apresentou dois valores máximos

(5,2 e 8,0), indicando provavelmente a presença de duas enzimas.

2 – A relação enzima-substrato foi de 0,8 mg de substrato (RNA 0,1%) para 0,2 ml do extrato de hepatopâncreas.

3 – O tempo de reação ótimo foi de 30 minutos de incubação a 45°C.

4 – A enzima RNase apresentou estabilidade em relação a temperatura de incubação (50°C) do extrato, até 15 minutos, decaindo gradativamente até o tempo de 60 minutos, quando atingiu 79% de perda de atividade.

5 – A eficiência de extração, em função ao pH ótimo da enzima RNase, foi verificada em tampão de acetato de sódio pH 5,0.

6 – O ótimo de saturação de sulfato de amônia para purificação da enzima, foi de 60-80% de concentração, com aumento de 18 vezes na atividade em relação ao extrato bruto.

7 – A maior atividade específica da

TABELA I

Dados relativos a purificação com sulfato de amônia de ribonuclease de hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille). No ensaio usou-se RNA como substrato, sendo a incubação à temperatura de 45°C, durante 30 minutos e pH 5,2.

% de sulfato de amônia	U.A./ml	mg P/ml	U.A./mg P	Recuperação (%)	Veze de purificação
0	75,0	95,4	0,79	100,0	1,0
0 – 20	5,0	4,4	1,14	4,6	1,4
20 – 40	25,0	5,4	4,63	5,7	5,9
40 – 60	37,5	13,4	2,80	14,0	3,5
60 – 80	10,0	0,7	14,29	0,71	18,1
80 – 100	5,0	1,9	2,63	2,0	3,3

TABELA II

Varição de proteína, RNA e atividade ribonucleásica em hepatopâncreas de jovens da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille), em função dos estágios de muda.

Estágio do ciclo de muda	U.A./ml			mg Proteína/ml			U.A./mg Proteína			RNA mg/g
	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄	Mi	Ma	M̄	
A	60,0	70,0	66,7	45,5	50,0	71,7	0,49	1,48	1,17	0,12
B	65,0	74,0	69,5	62,6	66,9	64,8	0,97	1,18	1,07	–
C	50,0	105,0	69,9	36,2	72,9	52,9	0,99	1,87	1,36	0,81
D	62,5	77,5	70,0	61,7	91,7	74,5	0,68	1,13	0,97	0,28

Convenção: Mi – valor mínimo; Ma – valor máximo; M̄ – valor médio.

atividade ribonucleásica, em relação a classe de comprimento, foi no intervalo de 12 a 13 cm e o menor em 8 e 9 cm.

8 — A quantidade de proteína por ml apresentou seu máximo no intervalo de classe de 8 a 9 cm e seu mínimo, de 12 a 13 cm.

9 — A atividade específica da enzima, quanto aos estágios de muda, teve seu valor máximo no estágio C e seu mínimo no estágio D.

10 — A concentração máxima de proteína no hepatopâncreas foi obtida no estágio D e seu mínimo no estágio C.

11 — A concentração em mg de RNA por grama de hepatopâncreas, foi máxima no estágio C e mínima no estágio D.

SUMMARY

English title: Preliminary study of the RNA-RNase system of hepatopancreas of juveniles of lobster *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

This paper is a preliminary study of the RNA-RNase system in the lobster *Panulirus laeviscauda*, based on samples taken at Fortaleza (Ceará State, Brazil).

The main results of this work can be summarised as follows:

1. The optimum reaction pH of RNase enzyme had two peak values (5.2 and 8.0), which might stand for the presence of two enzymes.
2. The enzyme-substrate relationship was 0.8 mg of substrate (RNA 0.1%) to 0.2 mg of hepatopancreas extract.
3. The optimum reaction time was 30 min. of incubation, at 45°C.
4. The RNase enzyme remained stable in relation to incubation temperature (50°C) until 15 min., decreasing gradually down to 60 min., when a 79% loss of activity was reached.
5. The efficiency of extraction, relative to the optimum pH of RNase enzyme, was measured in sodium acetate buffer, pH 5.0.
6. The optimum value for saturation of

ammonia sulphate for purification of the enzyme occurred at 60-80 per cent concentration, with an 18-time increase of activity in relation to the raw extract.

7. The specific activity of the ribonucleatic activity, as far as individual length is concerned, was higher at 12-13 cm and lower at 8-9 cm total length.
8. The amount of protein per ml had its maximum value at the 8-9 cm length class and its minimum at 12-13 cm total length.
9. The specific activity of the enzyme, as to stage of molting cycle, had its highest value at stage C and its lowest, at stage D.
10. The maximum protein concentration on the hepatopancreas was attained at stage D and its minimum, at stage C.
11. The concentration in mg of RNA per gram of hepatopancreas was highest at stage C and lowest at stage D.

BIBLIOGRAFIA

- Aiken, D. E. — 1980 — Molting and growth, pp. 91 — 163, in *The biology and management of lobsters*. Academic Press, New York.
- Anfinsen, C. B. & F. H. White, Jr. — 1961 — The ribonucleases: occurrence, structure, and properties, pp. 95-122, in Boyer (ed.), *The enzymes*, Academic Press, New York.
- Chang, J. E. & M. J. Bruce — 1980 — Molt induction. *J. Exp. Zool.*, London, 214 : 157-160.
- Cherry, J. H. — 1962 — Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. *Plant. Physiol.*, 37: 670-678.
- Dall, W. & M. C. Barclay — 1979 — The effect of exogenous 20 — hydroxyecdysone on levels of epidermal DNA e RNA in the Western rock lobster. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, 36 : 103-110.
- Drach, P. — 1939 — Mue et cycle d'intermue chez les crustacés. *Ann. Inst. Oceanogr.*, 19 : 103-391.
- Gilgan, M. W. & M. E. Zink — 1975 — Response of the adult lobster (*Homarus*

- americanus*) to graded and multiple doses of ecdysterone. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, **52A**: 261-264.
- Goa, J. — 1953 — A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5** : 218-222.
- Gorrel, A. T. & L. I. Gilbert — 1969 — Stimulation of the protein and RNA synthesis in the crayfish hepatopancreas by crustecdysone. *Gen. Comp. Endocr.*, **13** : 308-310.
- Kessler, B. & N. Engelberg — 1962 — Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, **55** : 70-82.
- McCarthy, J. F.; A. N. Sastry & G. C. Trambly — 1976 — Thermal compensation in protein and RNA synthesis during the intermolt cycle of the American lobster, *Homarus americanus*. *Biol. Bull.*, London, **151** : 538-547.
- Passano, L. M. — 1960 — Molting and its control, pp. 473-536, in T. H. Waterman (ed.), *The physiology of crustacea, vol. I*. Academic Press, XVII + 670 pp., New York.
- Shuster, L.; H. G. Khorana & L. A. Heppel — 1959 — The mode of action of ryegrass ribonuclease. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, **33** : 452-461.
- Spindler — Barth, M.; U. Bassemir; P. Kuppert & K. D. Spindler — 1981 — Isolation of nuclei from crayfish tissues and demonstration of nuclear ecdysteroid receptors. *Z. Naturforsch.*, Tubigen, **36C** : 326-332.
- Skinner, D. M. — 1965 — Amino acid incorporation into protein during the molt cycle of the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Zool.*, London, **160** : 225-234.
- Skinner, D. M. — 1966 — Macromolecular changes associated with the growth of crustacean tissues. *Am. Zool.*, **6** : 235-242.
- Skinner, D. M. — 1968 — Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid from the crustacean *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Zool.*, London, **169** : 347-356.
- Travis, D. F. — 1955 — The molting cycle of spiny lobster, *Panulirus argus* (Latreille). II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol. Bull.*, London, **108** : 88-112.
- Tuve, T. W. & C. B. Anfinsen — 1960 — Preparation and properties of spinach ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, **235** : 3437-3441.
- Wilson, C. M. — 1971 — Plant nucleases. III — Polycrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. *Plant. Physiol.*, **48** : 64-68.
- Wormhoudt, A. van & D. Sello — 1980 — Modification of synthesis and acetylation of hepatopancreas chromatin components in *Palaemon serratus* during the intermolt cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, **68B** : 49-56.