

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Teresinha Cristina Alvissus Fernandes Cunha Falci

**ESTUDO COMPARATIVO DO METABOLISMO
ANAERÓBICO DA GLICOSE E DO AMINOÁCIDO
ARGININA COMO BIOMARCADOR DE POLUIÇÃO
AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade de Taubaté, para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues.

**Taubaté - SP
2006**

TERESINHA CRISTINA ALVISSUS FERNANDES CUNHA FALCI

**ESTUDO COMPARATIVO DO METABOLISMO ANAERÓBICO DA GLICOSE
E DO AMINOÁCIDO ARGININA COMO BIOMARCADOR DE POLUIÇÃO
AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade de Taubaté, para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.
Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Data: 08 de março de 2006.

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rodrigues

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Arruda Leme

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr^a. Gannabathula Sree Vani

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus filhos Felipe e Flávia.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por permitir a realização de mais uma conquista.

Ao meu orientador e amigo prof. Dr. Edson Rodrigues pelo incentivo e dedicação durante todas as etapas deste trabalho. Obrigada também à sua esposa Fátima e seus filhos, que me acolheram em todos os momentos.

Ao meu marido José Octacílio e a meus filhos Felipe e Flávia pela força, carinho, amor e cumplicidade.

Aos meus irmãos Maria e Arnaldo. Maria, obrigada por tudo, sem você este trabalho não aconteceria. Arnaldo, amante do Rio Paraíba do Sul: seus sonhos de recuperação do rio tornaram-se os meus sonhos.

À minha sobrinha Monica pelo carinho, disponibilidade e alegria.

Minhas amigas do Laboratório de Bioquímica, Domingas e Kelly: agradeço de coração pelo auxílio e pela dedicação.

Ao prof. Dr. Itamar e prof. Dr. Cobo, pelo auxílio na identificação do espécime e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

Enéas, apesar de você não estar entre nós, sua pescaria foi fundamental para a realização deste trabalho. Que Deus esteja sempre com você.

A todos meus familiares e amigos que estão presentes em todos os momentos da minha vida, fazendo-me sentir mais segura e amada.

Obrigada.

ESTUDO COMPARATIVO DO METABOLISMO ANAERÓBICO DA GLICOSE E DO AMINOÁCIDO ARGININA COMO BIOMARCADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL

Autor: TERESINHA CRISTINA ALVISSUS FERNANDES CUNHA FALCI

Orientador: Prof. Dr. EDSON RODRIGUES

RESUMO

A presença de concentrações elevadas de metais pesados em meios aquáticos (efluentes industriais e esgoto doméstico) pode alterar o comportamento metabólico de organismos, comprometendo funções vitais e manutenção da vida das comunidades que compõem o ecossistema. Nesse caso, a toxicidade decorre da interação dos metais com enzimas do metabolismo intermediário, em especial enzimas do metabolismo energético, responsáveis pela manutenção de funções vitais, como osmorregulação e propagação do potencial de ação no tecido nervoso. Com o objetivo de entender os mecanismos adaptativos do peixe *Hoplosternum littorale*, foram conduzidos estudos comparativos sobre o metabolismo anaeróbio e compostos nitrogenados com exemplares de peixes coletados nos ambientes eutrofizados e não-eutrofizados.

As enzimas Lactato desidrogenase e Arginase do teleósteo *Hoplosternum littorale*, coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados foram estudadas com o objetivo de evidenciar os prováveis mecanismos bioquímicos de adaptação. A estabilidade térmica, K_m em pH próximo ao fisiológico e o comportamento cinético na presença do cofator Mn^{2+} , da Arginase hepática, em exemplares coletados em ambiente eutrofizados e não-eutrofizados foram similares, inclusive em relação aos demais teleósteos. A Arginase hepática foi ativada na presença dos cátions metálicos Mg^{2+} ,

Mn²⁺, Co²⁺ e Ca²⁺ e fortemente inibida na presença dos cátions Zn²⁺ e Cd²⁺. Os níveis de Arginase hepática e da Lactato desidrogenase muscular não foram significativamente diferentes entre os exemplares coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados. Os níveis da enzima Lactato desidrogenase hepática do peixe *H. littorale*, coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados foram significativamente diferentes e revelam a potencialidade dessa enzima como provável biomarcadora de ambientes eutrofizados.

PALAVRAS-CHAVE: 1. Metabolismo Anaeróbio. 2. *Hoplosternum littorale*. 3. Biomarcadores. 4. Lactato desidrogenase. 5. Arginase.

**COMPARATIVE STUDY OF ANAEROBIC METABOLISM OF GLUCOSE
AND ARGININA AMINO ACID USED AS A BIOMARKER FOR
ENVIRONMENTAL POLLUTION**

Author: TERESINHA CRISTINA ALVISSUS FERNANDES CUNHA FALCI

Adviser: Prof. Dr. EDSON RODRIGUES

ABSTRACT

The presence of elevated concentrations of heavy metal in aquatic environments (industrial and domestic sewage) could change the metabolic behavior of organisms, affect the vital functions and the maintenance in communities that are a part of the ecosystem. In this case, the toxicity is a consequence from the interaction between metals with intermediate metabolic enzymes, especially energetic metabolic enzymes, responsible for the maintenance of the vital functions, such as regulation of osmosis and the potential spreading in the nervous tissue. With the objective to understand the adaptive mechanisms of the fish *Hoplosternum littorale*, there have been comparative studies about anaerobic metabolism and the opposite nitrogenados, with fish samples collected in eutrophied environments and non eutrophied environments.

The Lactate deshydrogenase and Arginase enzymes from the teleost *H. littorale* were analyzed, in order to highlight the probable biochemical mechanism of adaptation. The thermal stability, K_m in pH close to the physiological and the kinetic behavior in the presence of the cofactor Mn^{2+} , the hepatical Arginase, in samples

collected from the eutrophied environments and non eutrophied environments were similar, including in relation to the other teleosties. The hepatic Arginase was activated in the presence of metallic cations Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Ca^{2+} is strongly inhibited in the presence of Zn^{2+} and Cd^{2+} . The level of hepatic Arginase and muscular Lactate dehydrogenase were not significantly different among the samples collected in the two environments. The levels of hepatic Lactate dehydrogenase of the fish *H. littorale*, collected in eutrophied environments and non eutrophied environments were significantly different and reveal the potentiality of this enzyme as a probable biomarker of eutrophied environments.

KEY WORDS: 1. Anaerobic metabolism. 2. *Hoplosternum littorale*. 3. Biomarkers. 4. Lactate dehydrogenase. 5. Arginase.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Visualização teórica da base molecular dos mecanismos adaptativos a curto e longo prazo.	20
2. Visualização teórica das relações entre relevância ecológica e a escala temporal decorrente da ação de poluentes induzindo respostas biomarcadoras e bioindicadoras. Adaptado de Adams et al. (1989).	22
3. Imagem de satélite da bacia dos rios Una e Paraíba do Sul, com a localização do ponto de coleta (●) de peixes <i>H. littorale</i> , em ambiente eutrofizado (FEHIDRO 280/2002).	27
4. Imagem de satélite do sítio Dom Carmelo, indicando a localização do ponto de coleta (●) do peixe <i>H. littorale</i> em ambiente não eutrofizado (FEHIDRO 280/2002).	27
5. Procedimento esquemático para obtenção de homogenado e extrato mitocondrial do fígado do peixe <i>H. littorale</i> .	29
6. Procedimento esquemático para obtenção de homogenados contendo a fração citosólica do fígado e músculo do peixe <i>H. littorale</i> .	30
7. Efeito da concentração de L-arginina sobre a atividade da arginase hepática do peixe <i>H. littorale</i> .	34
8. Efeito do cátion Mn(II) sobre a atividade da arginase hepática, parcialmente purificada da fração mitocondrial do peixe <i>H. littorale</i> .	35
9. Efeito do cátion Mn(II) sobre a atividade da arginase hepática, parcialmente purificada do fígado do peixe <i>H. littorale</i> .	36
10. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do peixe <i>H. littorale</i> coletado em ambiente não-eutrofizado. A atividade da arginase utilizada para estabelecer os percentuais de atividades na presença dos demais cátions divalentes, foi aquela determinada no meio de reação (MR) contendo MnCl ₂ 5mM.	38
11. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do peixe <i>H. littorale</i> coletado em ambiente eutrofizado. A atividade da arginase utilizada para estabelecer os percentuais de atividades na presença dos demais cátions divalentes, foi aquela determinada no meio de reação (MR) contendo MnCl ₂ 5mM.	38
12. Níveis musculares de LDH do peixe <i>H. littorale</i> coletado em ambientes eutrofizados (E) e não-eutrofizados (NE).	39
13. Níveis hepáticos de LDH do peixe <i>H. littorale</i> coletado em ambientes eutrofizados (E) e não-eutrofizados (NE).	40
14. Níveis hepáticos de arginase do peixe <i>H. littorale</i> , coletados em ambientes não-eutrofizados (NE) e eutrofizados (E). As atividades argininolíticas foram determinadas em pH 9,5.	41
15. Níveis de arginase da fração mitocondrial do peixe <i>H. littorale</i> , coletados em ambientes não-eutrofizados (NE) e eutrofizados (E). As atividades argininolíticas foram	42

determinadas em pH 9,5.	
16. Formas isoenzimáticas da estrutura tetramérica Lactato desidrogenase. A isoforma H ₄ , prevalente no músculo cardíaco e fígado, é formada de quatro subunidades idênticas do tipo H. A forma M ₄ prevalente na musculatura estriada esquelética é constituída de quatro subunidades idênticas do tipo M. As demais formas isoenzimáticas são híbridos decorrentes dos possíveis arranjos entre subunidades H e M.	48

TABELA

Tabela 1 – Etapas do processo de ativação da arginase hepática do peixe <i>H. littorale</i> , coletado no Córrego do Curtume.	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetracético
EROD	-	Etoxiresorfurim- <i>o</i> -dietilase
GPx	-	Glutathione Peroxidase
GST	-	Glutathione – S- transferase
HEPES	-	<i>N</i> -2-Hidroxiethylpiperazina- <i>N</i> -ácido-2-etanossulfônico
KH ₂ PO ₄	-	Fosfato de Potássio Monobásico
K _{cat}	-	Constante catalítica
K _m	-	Constante de Michaelis-Menten
LDH	-	Lactato desidrogenase
μmol	-	μmol/L
mM	-	mmol/L
MnCl ₂	-	Cloreto de Manganês II
MR	-	Meio de Reação
NADH+H ⁺	-	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
<i>P</i>	-	Correlação linear de Pearson (obtida na análise de variância ANOVA ONE WAY)
TC	-	Tampão de Compartimentalização
TDMU	-	Reagente Tiosemicarbazida-Diacetilmonoxima-Uréia
UDPGT	-	Uridina difosfato Glicuronil Transferase
V _{max}	-	Velocidade Máxima

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Espécie em Estudo	26
3.2. Obtenção de Extratos Livres de Células	28
3.3. Métodos Analíticos	30
3.4. Ativação da Arginase	31
3.5. Determinação do valor de K_m	31
3.6. Efeito do Cátion Manganês	32
3.7. Efeito de Cátions Metálicos	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Ativação da Arginase Hepática	33
4.2. Pureza Cinética	34
4.3. Determinação do K_m	34
4.4. Efeito do Cátion Manganês (II) sobre a Atividade da Arginase	35
4.5. Efeito de Cátions Metálicos sobre a Atividade Argininolítica	36
4.5.1 Estudos com Peixes Coletados em Ambiente Não-Eutrofizado	37
4.5.2 Estudos com Peixes Coletados em Ambiente Eutrofizado	37
4.6. Níveis Musculares de LDH	39
4.7. Níveis Hepáticos de LDH	39
4.8. Níveis Hepáticos de Arginase	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A questão central da toxicologia e da ecotoxicologia reside na relação entre a concentração da substância/composto químico, à qual o organismo está exposto, a sua natureza e ao grau do seu consequente efeito tóxico (WALKER et al., 1997).

O aporte ambiental contínuo de compostos orgânicos estranhos (xenobióticos), como bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dentre outros, representam um risco em potencial para ecossistemas terrestres e aquáticos, considerando a sua capacidade de interação com macromoléculas e estruturas supramoleculares, as quais podem alterar o comportamento metabólico dos organismos.

As descargas industriais, agrícolas e de esgoto urbano são as principais fontes antropogênicas de xenobióticos e metais pesados em ambientes aquáticos e são responsáveis pelo envenenamento de peixes em diversos países (SORENSEN, 1991). Contudo, a simples presença do poluente não garante que o ecossistema esteja sendo lesado e evidencia a questão sobre o efeito tóxico dos venenos, o qual é concentração dependente. Esse dilema foi reconhecido por Paracelsus (1493-1541) que, à época, enunciou: “Todas as substâncias são venenos; não há nada que não seja veneno. A dose certa diferencia o veneno do remédio”.

A atividade antropogênica e os fenômenos de ocorrência natural podem afetar a dinâmica das comunidades de animais aquáticos, mediante alteração da concentração de substâncias/compostos químicos, as quais atuam de forma seletiva no metabolismo dos animais. A facilidade dispersiva de substâncias/compostos químicos em ambientes aquáticos tem gerado preocupação em termos de mudanças ambientais, quando comparada com a contaminação em ambientes terrestres (BARBER et al., 2001).

Assim, a eutrofização de ambientes aquáticos altera a composição química e proporciona condições nutricionais para o desenvolvimento acelerado da microbiota, a qual aumenta a demanda bioquímica de oxigênio e reduz a disponibilidade do oxigênio dissolvido para a manutenção das necessidades metabólicas da macrobiota.

Alguns peixes e tartarugas, quando em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, promovem ajustes metabólicos adaptativos com alteração da expressão gênica de enzimas do metabolismo energético. A maioria das células eucarióticas necessita de suprimento contínuo de oxigênio a fim de realizar vários processos bioquímicos e fisiológicos, também obter energia (na forma de ATP) da glicose através do metabolismo aeróbico (respiração). As células podem sentir as reduções críticas de tensão de oxigênio (hipóxia) e responder a essa condição transcrevendo diferencialmente genes necessários para provocar as respostas adaptativas que levem à mudança do estado fisiológico e metabólico da célula, o que, finalmente, permite a elas lidar com o estresse associado com a limitação de oxigênio.

A tolerância prolongada à anóxia é documentada em poucas espécies de tartaruga como as tartarugas de água-doce *Trachemys sp* e *Chrysemys sp* (HICKS; FARRELL, 2000 a, b) e a tartaruga marinha “loggerhead” *Caretta caretta* (LUTZ; NILSSON, 1997). De forma semelhante aos peixes tolerantes à anóxia, essas tartarugas de água-doce têm a capacidade de permanecer em anóxia no leito de lagos congelados durante o inverno enquanto as “loggerhead” são capazes de se enterrarem na lama, durante os períodos frios, em áreas especiais da costa oceânica. Nesse estado fisiológico elas obtêm energia na forma de ATP, regenerando o NAD^+ através do metabolismo anaeróbico, convertendo piruvato em lactato.

Considerando que a atividade metabólica depende, essencialmente, da presença de macromoléculas, principalmente proteínas e ácidos nucleicos, os mecanismos

adaptativos às condições adversas, envolvem basicamente três estratégias bioquímicas: a) Expressão gênica de macromoléculas com vantagens adaptativas; b) Ajustes na concentração ou quantidade de macromoléculas; c) Regulação adaptativa das macromoléculas. A combinação de uma ou mais dessas estratégias, proporciona aos organismos homeostase vetorial e promove o ajuste da função metabólica (HOCHACHKA; SOMERO, 1973).

Níveis elevados de metais pesados em ambientes aquáticos representam risco para a vida dos animais, diante da sua possibilidade de interação com macromoléculas. A forte origem antropogênica dos metais pesados tem sido objeto de discussão e preocupação quanto ao impacto deles sobre a vida animal e as possíveis medidas mitigatórias. O efeito tóxico dos metais pesados está intimamente relacionado à sua disponibilidade no meio, ao tempo de exposição e a diversos fatores abióticos. Os metais pesados podem ser classificados em fisiológicos e não-fisiológicos, considerando a sua essencialidade em processos metabólicos, nos quais atuam como cofatores de diversas proteínas (WILLIAMS; FRAÚSTO, 2000).

A presença de concentrações elevadas de metais pesados em meios aquáticos (ex: efluentes industriais e esgoto doméstico) pode alterar o comportamento metabólico de organismos, comprometendo funções vitais e a manutenção da vida das comunidades que compõem o ecossistema (HEATH, 1995; CARVALHO, 2003). Nesse caso, a toxicidade decorre da interação dos metais com enzimas do metabolismo intermediário, em especial enzimas do metabolismo energético, as quais são responsáveis pela manutenção de funções vitais, como osmorregulação e propagação do potencial de ação no tecido nervoso (HEATH, 1995).

Assim, com o objetivo de entender os mecanismos adaptativos do peixe *Hoplosternum littorale* em ambientes eutrofizados, foram conduzidos estudos comparativos sobre o metabolismo anaeróbico e de compostos nitrogenados, com exemplares de peixes

coletados no córrego do Curtume, o qual recebe esgoto urbano *in natura* e, exemplares coletados no córrego da Bomba, região não-eutrofizada. Espera-se, com isso, esclarecer algumas questões adaptativas envolvendo o metabolismo do *H. littorale*, bem como verificar possibilidade da utilização desses parâmetros bioquímicos como biomarcadores da qualidade ambiental.

Nesse sentido o presente trabalho tem como objetivos específicos: a) avaliar o impacto do ambiente aquático eutrofizado sobre a atividade específica da Lactato desidrogenase (LDH) muscular e hepática e da Arginase hepática do peixe *H. littorale* como prováveis biomarcadores da qualidade ambiental do Córrego do Curtume; b) analisar o efeito de sais de metais pesados sobre o sistema arginínolítico do peixe *H. littorale*, como forma de avaliar a ação deles sobre o metabolismo nitrogenado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A ação de poluentes nos sistemas biológicos envolve diversas substâncias e compostos químicos os quais podem atuar em diferentes níveis hierárquicos do ecossistema. Alterações do comportamento bioquímico e fisiológico dos organismos, as quais representam um desvio da condição metabólica normal, podem ser determinadas mediante técnicas bioquímicas e utilizadas como biomarcadores. Já os efeitos dos poluentes sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de indivíduos, os quais podem ser avaliados mediante experimentos clássicos de ecotoxicologia em laboratório, são denominados de bioensaios. Alterações que envolvem a abundância da população, a sua idade e a variabilidade genética, são denominados de bioindicadores. Finalmente, os indicadores ecológicos são aqueles que refletem mudanças na composição das espécies, bem como sua abundância e diversidade, em uma dada comunidade (OOST et al., 2003).

A presença de xenobióticos em ecossistemas aquáticos não, necessariamente, se reflete de forma lesiva sobre os organismos. O efeito tóxico dos xenobióticos envolve a conexão dos níveis externos de exposição e níveis teciduais de contaminação, bem como a sua capacidade interativa com os sistemas biológicos. Por outro lado, a sobrecarga de ecossistemas aquáticos com poluentes não degradáveis, não nutritivos e de efeito acumulativo, tais como metais pesados, pode afetar a vida de diversos animais e vegetais (SORENSEN, 1991; OOST et al., 2003).

Embora o termo metal pesado seja utilizado com frequência em estudos ambientais de ecotoxicologia, cabe lembrar que o termo é impreciso quanto a sua definição e contempla metais com funções fisiológicas e não-fisiológicas. Vários autores conceituam metais pesados como sendo aqueles que apresentam densidade acima de $3,5\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, embora não exista consenso quanto a esse valor. Outros autores utilizam como critério de

classificação o número atômico superior a 20 ou propriedades químicas comuns (DUFFUS, 2002).

Os efeitos de xenobióticos e metais pesados sobre estruturas moleculares e as suas conseqüentes alterações metabólicas, em resposta a uma dada condição biológica adversa, a qual sinaliza o início do processo de agressão, podem ser detectados com o auxílio de biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade (OOST et al, 2003).

A sobrevivência de organismos expostos a alterações ambientais, sejam antropogênicas ou naturais, envolve mecanismos adaptativos de curto e longo prazo. Alterações na expressão gênica e modulação da atividade de macromoléculas são mecanismos adaptativos de curto prazo os quais possibilitam a sobrevivência dos organismos em ambientes alterados, até o limite da sua capacidade metabólica. Por outro lado, os mecanismos de longo prazo são aqueles decorrentes da evolução e seleção de macromoléculas com vantagens adaptativas (Fig. 1). Esse contexto adaptativo fica evidente em peixes adaptados em condições extremas de temperatura, os quais apresentam estruturas enzimáticas com estabilidade e propriedades cinéticas compatíveis com as suas necessidades metabólicas (FELLER et al., 1997; MIYAZAKI et al., 2000; SOMERO, 2004).

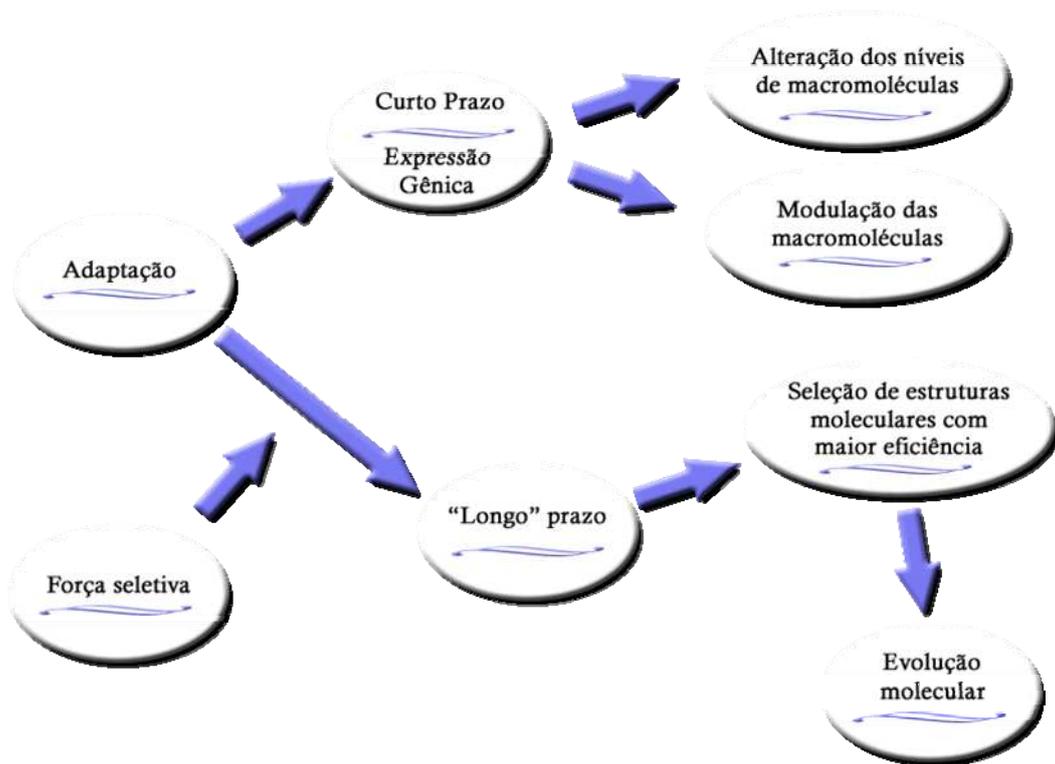


Figura 1. Visualização teórica da base molecular dos mecanismos adaptativos a curto e longo prazo.

Vários grupos de organismos já foram propostos e utilizados como indicadores de mudanças ecológicas e ambientais. Assim, peixes, macroinvertebrados, aves e plantas são os preferidos dos biólogos, embora não exista consenso quanto ao uso de um desses grupos como indicador ideal para o monitoramento da qualidade ambiental, sendo que o uso de peixes apresenta numerosas vantagens, tais como: a) estão presentes em praticamente todos os ambientes aquáticos, com exceção daqueles extremamente poluídos; b) para muitas espécies existe uma variedade de informações sobre respostas ambientais associadas a uma extensa história de vida; c) comparados a muitos invertebrados, a identificação dos peixes é relativamente mais fácil e as amostras, em muitos casos, podem ser processadas em campo; d) as comunidades de peixes usualmente incluem uma faixa de espécies que representam uma variedade de níveis tróficos e são alimentos para animais aquáticos e terrestres; e) a toxicidade aguda e o efeito do estresse podem ser avaliados em laboratório utilizando espécies

selecionadas as quais podem ter desaparecido do ecossistema em estudo (WHITFIELD; ELLIOTT, 2002).

O uso de sinais bioquímicos como biomarcadores de poluentes, seja de exposição ou de efeito, implica no conhecimento prévio das alterações bioquímicas e do comportamento metabólico. A atividade enzimática vem sendo utilizada como ferramenta biomarcadora de extrema importância (EROD, GST, UDPGT, Catalase, GPx, dentre outras). A alocação celular de energia, a qual tem sido descrita como um biomarcador rápido e precoce dos efeitos adversos de efluentes tóxicos, antes mesmo que esses tenham se refletido sobre níveis superiores da organização biológica, também tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico e avaliação ambiental (REGOLI, F., 2000; OOST et al., 2003; SMOLDERS et al., 2004). A relevância ecológica dos biomarcadores e bioindicadores, em relação com a resposta temporal de poluentes, sobre a estrutura de comunidades e sobre o comportamento bioquímico e fisiológico dos organismos pode ser visualizada na figura 2.

Pesquisa realizada com exemplares de *Prochilodus scrofa* revelou que o pH, a temperatura e a presença de cobre interferem com os níveis hepáticos da enzima lactado desidrogenase (LDH). Em pH 4,5 e 8,0 a 20°C, e, na presença de cobre, os níveis hepáticos de Fosfofrutoquinase (PFK) e LDH foram inferiores ao do grupo controle, sugerindo que a capacidade glicolítica diminuiu nesse tecido, provavelmente, devido às necessidades gliconeogênicas do organismo no sentido de manter fonte energética para outros tecidos (CARVALHO, 2003).

O efeito de metais pesados sobre os níveis teciduais da LDH também tem sido objeto de vários estudos, tendo sido constatado aumento da atividade enzimática no fígado, coração e brânquias das espécies *Mugil cephalus* e *Oreochromis niloticus* expostas ao cádmio e da espécie *Carpe carpio*, ao íon cobre (HILMY et al., 1985; TÓTH, et al., 1996; ALMEIDA

et al., 2002). Contudo, Antognelli et al. (2003), trabalhando com *Sparus auratus* expostos a cobre, verificaram diminuição da atividade da LDH no fígado desses exemplares.

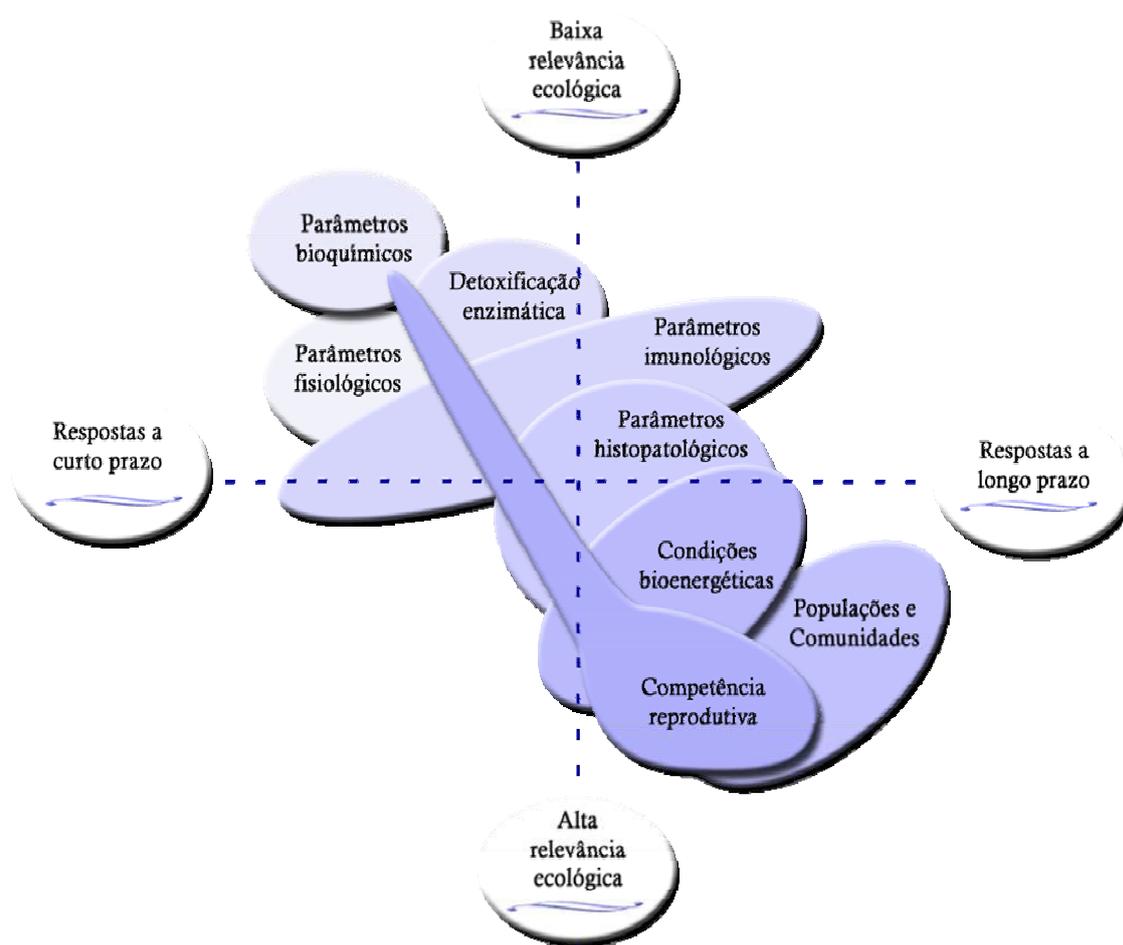


Figura 2. Visualização teórica das relações entre relevância ecológica e a escala temporal decorrente da ação de poluentes induzindo respostas biomarcadoras e bioindicadoras. Adaptado de Adams et al. (1989).

Estudos sobre capacidade tecidual de utilizar o oxigênio molecular, bem como a sua disponibilidade no meio aquoso, tem evidenciado mecanismos adaptativos de tolerância a hipóxia. Nesse caso o metabolismo energético, em especial o da glicose, pode ser direcionado para a aerobiose ou anaerobiose, mediante a alteração dos níveis teciduais de enzimas envolvidas com a respiração e fermentação respectivamente. Peixes adaptados a condições extremas de hipóxia apresentam, normalmente, níveis mais elevados de LDH muscular, que podem ser decorrentes do aumento da concentração da enzima ou de formas enzimáticas com valores de K_{cat} elevados (FELLER, et al., 1991).

A LDH apresenta estrutura quaternária composta de quatro subunidades, as quais podem ser do tipo M (“Muscle”) e H (“Heart”). A associação dessas subunidades origina cinco formas isoenzimáticas nos tecidos. Contudo, a distribuição das formas isoenzimáticas é considerada tecido dependente e guarda relação com a atividade metabólica do tecido. A predominância da forma isoenzimática LDH-H₄ em tecidos favorece a respiração celular, com a canalização do ácido pirúvico para o ciclo de Krebs, em detrimento da redução do ácido pirúvico em ácido láctico. Essa forma isoenzimática apresenta baixa eficácia na redução do ácido pirúvico em ácido láctico quando comparada às demais formas isoenzimáticas. Já a musculatura estriada esquelética apresenta predominância da isoforma LDH-M₄, a qual converte o ácido pirúvico em láctico com maior eficácia, quando comparada às demais isoformas. O ácido láctico produzido pelos tecidos acaba sendo transferido para o sistema circulatório sanguíneo e metabolizado pelo fígado(LEHNINGER, 2000).

Por outro lado, o metabolismo nitrogenado tem sido apontado como um dos sistemas fisiológicos de maior sensibilidade e versatilidade em resposta a alterações ambientais. Diferente do metabolismo de carboidratos e lipídios, o de aminoácidos não apresenta um reservatório específico de compostos nitrogenados, o que implica em degradação contínua das cadeias carbônicas dos aminoácidos e a conseqüente liberação de amônia, que é tóxica. A maioria dos peixes é amoniotélicos e elimina cerca de 10 a 30% do seu nitrogênio na forma de uréia o que, provavelmente, é decorrente da degradação da L-arginina proveniente da dieta, mediante ação das arginases (FLESKIE et al., 1998; POLEZ et al., 1998).

As arginases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e responsáveis pela hidrólise da L-arginina em L-ornitina e úreia. Como enzima terminal do ciclo da uréia, a arginase é encontrada no fígado de animais e tem sido utilizada em estudos filogenéticos. Nos mamíferos a arginase hepática está localizada no citosol, enquanto em tecidos extra-hepáticos

a sua localização é mitocondrial. Peixes apresentam níveis elevados de arginase no fígado e nos rins, a qual está localizada na fração mitocondrial das células, com exceção dos peixes pulmonados, os quais apresentam localização subcelular semelhante a dos mamíferos (CAMPBELL et al., 1987; JENKINSON et al., 1996).

O papel essencial da L-arginina como precursora de proteínas, óxido nítrico, uréia, poliaminas, prolina, glutamato, dentre outros compostos nitrogenados, tem evidenciado a importância das enzimas envolvidas com a sua síntese e degradação, na manutenção dos níveis celulares desse aminoácido. A L-arginina presente nas células pode ser de origem exógena (dieta) ou sintetizada endogenamente a partir da L-ornitina. Nesse caso, a manutenção de níveis intracelulares adequados de L-arginina envolve a sua degradação, a qual depende das arginases. Nos mamíferos, as arginases estão presentes em duas formas isoenzimáticas, sendo uma hepática e outra extra-hepática, as quais estão envolvidas com o controle da velocidade do ciclo da uréia e com a manutenção dos níveis de L-arginina em tecidos extra-hepáticos respectivamente (WU; MORRIS, 1998).

A estrutura quaternária das arginases varia de espécie para espécie, sendo que as mais estudadas são as de mamíferos (RODRIGUES et al., 1996). A atividade catalítica e a estabilidade das arginases sofrem profundo efeito de cátions divalentes e, nesse sentido, o Mn^{2+} tem sido postulado como o provável cátion fisiológico, embora Co^{2+} e Ni^{2+} , em algumas espécies, sejam responsáveis pela atividade máxima da arginase (MAGGINI et al., 1992).

O peixe *Hoplosternum littorale* apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul, habita rios das Guianas até o norte da Argentina, apresenta comportamento de peixe bentônico onívoro, sendo encontrado, preferencialmente, em águas pantanosas e estuários. A sua introdução em ambientes aquáticos pode causar impacto ecológico devido à competição por recursos disponíveis da comunidade nativa e acarretar redução da

biodiversidade

nativa

(http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Hoplosternum_littorale.htm).

Morfofisiologicamente, essa espécie possui corpo revestido de placas ósseas. Atinge comprimento de aproximadamente 20cm e alimenta-se primordialmente à noite. A reprodução acontece durante a estação das chuvas, entre os meses de dezembro e janeiro e o macho, auxiliado pela fêmea, constrói um ninho com bolhas de muco e matéria vegetal. Após o ritual de acasalamento, a fêmea deposita seus ovos no ninho que são fertilizados pelo esperma coletado previamente em sua boca. O macho guarda o ninho e torna-se agressivo durante esse período

(http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Hoplosternum_littorale.htm).

Na região de Taubaté e Tremembé, o peixe *H. littorale* tem sido pescado em efluentes que desembocam no rio Paraíba do Sul e utilizado como alimento pela população local (observação pessoal).

Relatos de pescadores, sobre a diversidade de peixes nos afluentes do rio Paraíba, indicam que era bem maior no passado em relação aos dias de hoje, ficando limitada, praticamente, à presença do peixe *H. littorale*. Assim, o sucesso adaptativo dessa espécie em ambientes eutrofizados certamente envolveu ajustes metabólicos que viabilizaram a sua sobrevivência.

O Rio Paraíba do Sul atravessa o eixo Rio—São Paulo e apresenta importância econômica agrícola e de abastecimento de água para a população, porém recebe esgoto urbano e tem em seu leito várias dragas para extração de areia. O curso do Rio Paraíba do Sul atravessando vários municípios, bem como a localização de coleta do presente trabalho podem ser observados na figuras 3 e 4.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie em Estudo

Foram utilizados 29 exemplares do peixe *H. littorale*, de nome popular vira-morro, tamboatá, tamoatá, tamuatá ou cascudo do lodo (14 exemplares de ambiente não eutrofizado e 15 de ambiente eutrofizado), coletados com o auxílio de rede do tipo tarrafa.

O ambiente eutrofizado escolhido para coleta foi o córrego do Curtume que deságua no Rio Paraíba do Sul, na cidade de Tremembé, ao término da Av. Santa Cruz do Areão (45°34'42,81" W e 22°57'51,35" S), a cerca de 150m do Rio Paraíba do Sul (Fig. 3).

O ambiente não-eutrofizado escolhido para coleta foi o córrego da Bomba que deságua no Rio Una, localizado no Sítio Dom Carmelo (45°30'3,35" e W 23°2'52,51" S), como apresentado na figura 4.

Os peixes foram transportados vivos para o laboratório de bioquímica da Universidade de Taubaté — UNITAU, onde foram imediatamente sacrificados e os tecidos utilizados em estudos bioquímicos.

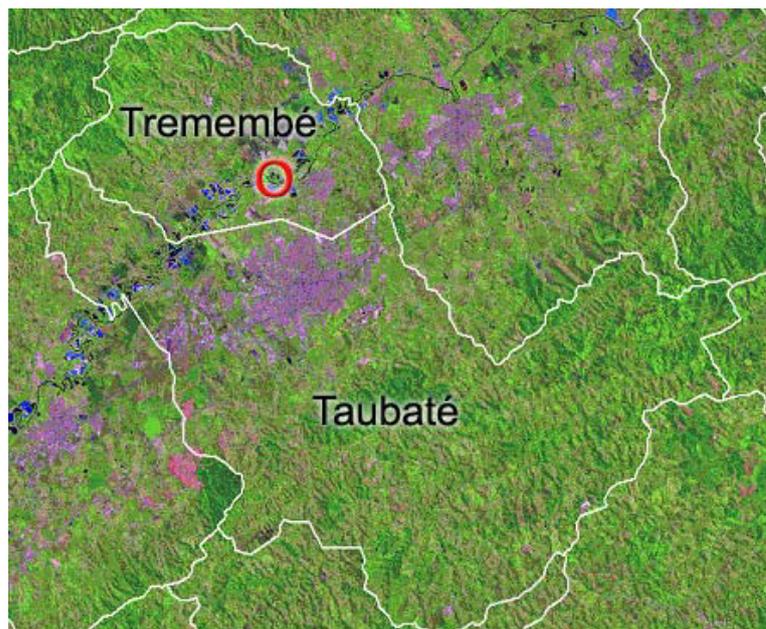


Figura 3. Imagem de satélite da bacia dos rios Una e Paraíba do Sul, com ‘a localização do ponto de coleta (○) de peixes *H. littorale*, em ambiente eutrofizado (FEHIDRO 280/2002).

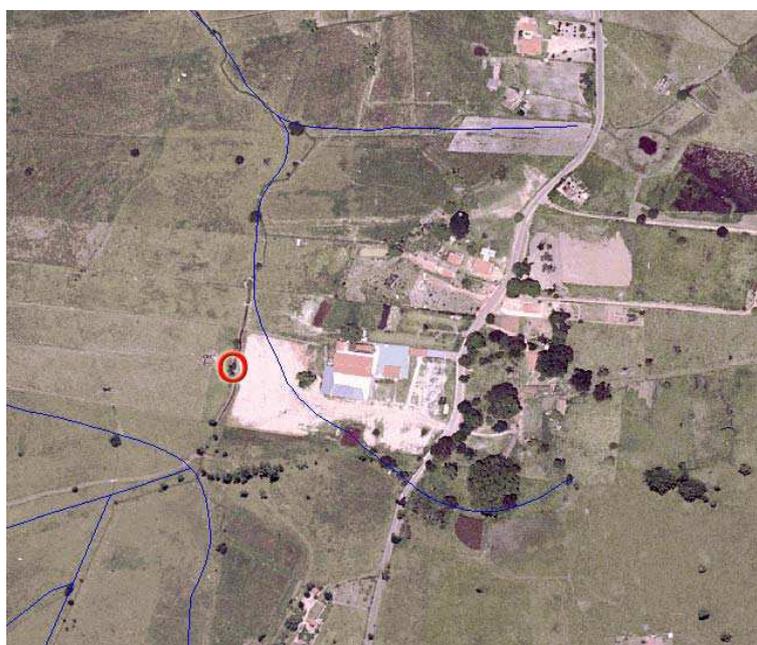


Figura 4. Imagem de satélite do sitio Dom Carmelo, indicando a localização do ponto de coleta (○) do peixe *H. littorale* em ambiente não-eutrofizado (FEHIDRO 280/2002).

3.2 Obtenção de Extratos Livres de Células

Exemplares do peixe *H. littorale* foram espinhalados e dissecados através de incisão ventral. O fígado foi removido, lavado com solução fisiológica 4°C, dividido em duas frações, as quais foram utilizadas para obtenção dos extratos livres de células.

Os homogenizados e extratos mitocondriais, utilizados para determinação dos níveis teciduais de arginase, bem como em experimentos cinéticos, foram obtidos em homogeneizador “Potter-Elvehjem”.

Inicialmente, o fígado foi homogeneizado na proporção de 1g de tecido para 10ml de tampão HEPES 20mM, pH 7,0, contendo Trimetilamina-N-óxido 1,0mM; KH_2PO_4 5,0mM; Sacarose 250mM e EDTA 0,5mM. O homogeneizado foi centrifugado a 1.500g por 10 minutos, o sedimento descartado e uma pequena fração do sobrenadante utilizada para determinação da atividade argininolítica e da concentração de proteínas totais. O restante do sobrenadante foi centrifugado a 14.000g por 10 minutos para obtenção da fração mitocondrial. O sedimento mitocondrial foi lavado duas vezes com o tampão HEPES e, após a última lavagem, o sedimento foi novamente suspenso em tampão HEPES sem EDTA, para obtenção da suspensão mitocondrial.

A suspensão mitocondrial foi utilizada para obtenção de extrato mitocondrial, mediante adição de Triton X-100 para concentração final de 0,1%(v/v), seguido de tratamento com ultra-som durante 30 segundos. O sonicado foi centrifugado a 14.000g durante 10 minutos e o extrato mitocondrial (sobrenadante) separado e congelado a -18°C. A arginase contida no extrato mitocondrial obtido nesta etapa foi posteriormente ativada e utilizada em estudos cinéticos (Fig. 5).

Os níveis hepático e muscular de LDH do peixe *H. littorale* foram determinados em homogenizados livres de células, obtidos em “Potter-Elvehjem”, na proporção de 1 grama de tecido para 10 volumes de tampão fosfato 100mM, pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000g e os sobrenadantes, contendo as frações citosólicas, foram utilizados para determinação da atividade da LDH e a concentração das proteínas totais (Fig. 6).

Todas as etapas de obtenção dos homogenados e extratos mitocondriais foram conduzidas em temperaturas entre 0°C e 4°C, como forma de minimizar a ação de proteases sobre a estrutura protéica das enzimas.

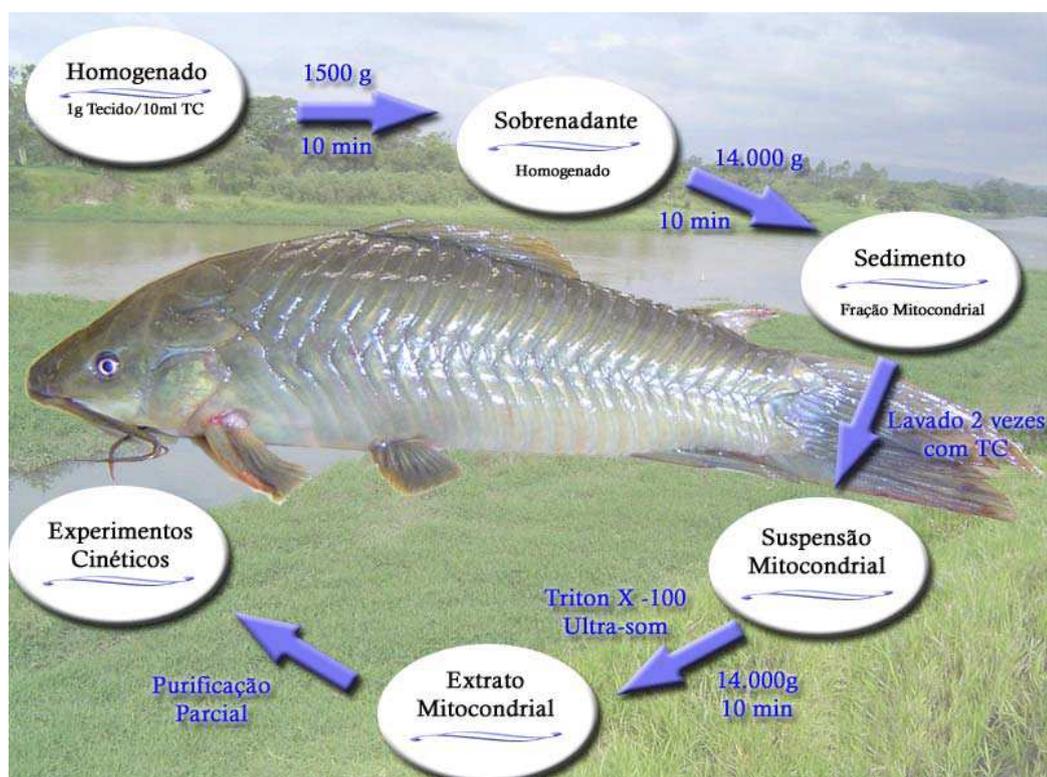


Figura 5. Procedimento esquemático para obtenção de homogeneizado e extrato mitocondrial do fígado do peixe *H. littorale*.

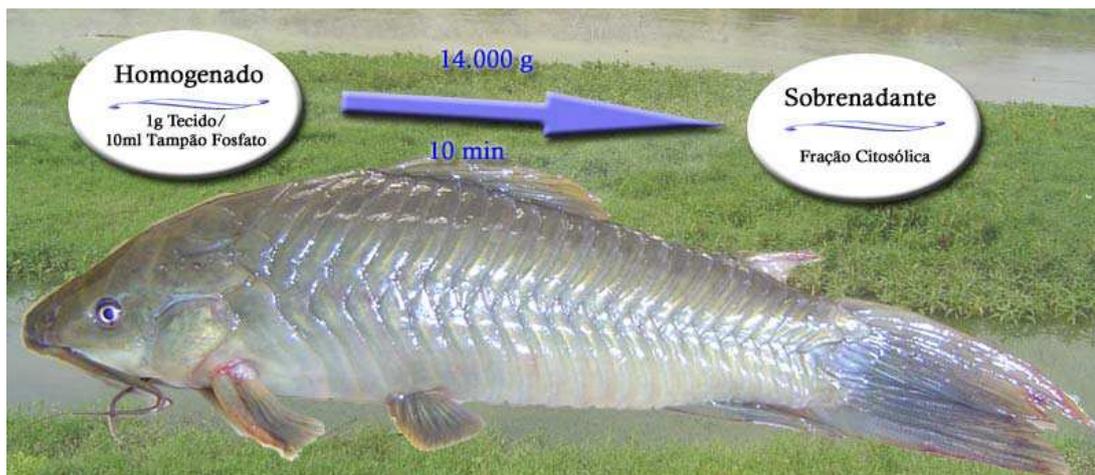


Figura 6. Procedimento esquemático para obtenção de homogeneizados contendo a fração citosólica do fígado e músculo do peixe *H. littorale*.

3.3 Métodos Analíticos

A atividade da arginase foi determinada em tampão HEPES 10mM pH 7,4, contendo L-arginina 100mM e $MnCl_2$ 5mM. A atividade da arginase em pH 9,5 foi determinada em tampão glicina 20mM, contendo $MnCl_2$ 5mM. Todas as determinações de atividade foram conduzidas à 25°C.

A reação catalisada pela arginase teve seu início com adição de pequenas alíquotas do extrato subcelular e, a uréia formada na reação, quantificada pelo método da diacetilmonoxina, como descrito por Geyer & Dabich (1971).

Uma Unidade Internacional (U) foi definida como a quantidade de arginase capaz de catalisar a conversão de 1 μ mol de L-arginina em L-ornitina e uréia no tempo de um minuto à temperatura de 25°C.

A atividade da LDH foi acompanhada pela oxidação do $NADH+H^+$, em comprimento de onda de 340nm, à temperatura de 25°C. O meio de reação foi composto de tampão fosfato 100mM, pH 7,4, piruvato de sódio 1,0mM e $NADH+H^+$ 0,14mM, como descrito por Bergmeyer (1974).

Uma Unidade Internacional (U) foi definida como a quantidade de LDH capaz de converter 1 μmol de piruvato em lactato no tempo de um minuto à temperatura de 25°C.

A concentração de proteínas totais das frações subcelulares foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

3.4 Ativação da Arginase

Os estudos cinéticos foram conduzidos com a arginase ativada na presença de Mn^{2+} . Alíquotas do extrato mitocondrial foram aquecidas na presença de MnCl_2 5mM. As proteínas desnaturadas durante o aquecimento, foram eliminadas mediante centrifugação a 14.000g durante 30 minutos e o sobrenadante utilizado em experimentos cinéticos.

3.5 Determinação do valor de K_m

As curvas de saturação foram conduzidas em tampão HEPES 25mM, pH 7,4, contendo MnCl_2 5mM. As concentrações de L-arginina no meio de reação foram ajustadas para valores entre 0,3 a 80mM. A reação foi conduzida a 25°C.

O valor de K_m foi calculado como descrito por Segel (1993), utilizando a equação de Henri-Michaelis-Menten para enzimas com um único sítio ativo, como apresentado a seguir:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

3.6 Efeito do Cátion Manganês

O efeito do Mn^{2+} sobre a atividade da arginase hepática foi conduzido em tampão HEPES 25mM contendo L-arginina 100mM e, a concentração de Mn^{2+} no meio, foi ajustada para valores entre 2 a 18mM. A temperatura foi mantida em 25°C durante a reação.

3.7 Efeito de Cátions Metálicos

O efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase hepática foi analisado em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 contendo L-arginina 100mM, $MnCl_2$ 5mM e cátions metálicos para concentração final de 1mM, com exceção do cátion manganês. Nestas condições, foi arbitrariamente atribuído o valor de 100% à atividade da arginase no meio de reação contendo $MnCl_2$ 5mM e calculada a atividade relativa da arginase na presença dos demais cátions metálicos.

O efeito do cátion cobalto sobre a atividade da arginase foi avaliado em meio de reação contendo $MnCl_2$ 5mM (Co) e na ausência de manganês (Co/s).

Os experimentos com metais foram conduzidos utilizando-se soluções dos seguintes sais: cloreto de mercúrio (II), acetato de zinco (II), nitrato de prata (I), cloreto de magnésio, cloreto de cobalto (II), cloreto de ferro (III), acetato de cobre (II), cloreto de níquel (II), cloreto de cádmio (II), nitrato de chumbo (II), cloreto de manganês (II) e cloreto de cálcio.

4 RESULTADOS

As medidas de atividade da arginase, em frações subcelulares do tecido hepático do peixe *H. littorale*, revelaram que a atividade argininolítica está localizada, preferencialmente, na mitocôndria. Dessa forma, os estudos cinéticos foram conduzidos com a arginase hepática extraída da fração mitocondrial.

4.1 Ativação da Arginase Hepática

O melhor resultado de ativação da arginase na presença do cátion manganês foi obtido à temperatura de 55°C durante 2 minutos. A perda de atividade observada no processo de ativação foi de aproximadamente 28%. Esse procedimento também proporcionou desnaturação de proteínas com ganho de atividade específica de 3,6 vezes (Tabela 1). Os resultados obtidos com peixes coletados do ambiente eutrofizado foram semelhantes àqueles do ambiente não-eutrofizado.

Etapas	Volume Total (ml)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (mU/mg)
Extrato Mitocondrial	1	0,49	0,10
Aquecimento 55°C	0,75	0,35	0,36

Tabela 1. Etapas do processo de ativação da arginase hepática do peixe *H. littorale* coletado no Córrego do Curtume.

4.2 Pureza Cinética

A pureza cinética da arginase hepática foi avaliada em meio de reação contendo baixa concentração de substrato e baixa concentração do cofator Mn^{2+} . A linearidade da curva de atividade em função da concentração de proteína revelou pureza cinética satisfatória.

4.3 Determinação do K_m

A determinação do valor de K_m da arginase foi conduzida em meios de reação contendo concentrações de L-arginina variando entre 0,3 a 40,0mM. A curva de saturação foi hiperbólica e compatível com aquela descrita para enzimas com um único sítio ativo. O coeficiente de determinação da curva (r^2) foi 0,982. O valor calculado de K_m foi $7,0 \pm 0,9$ mM. (Fig.7).

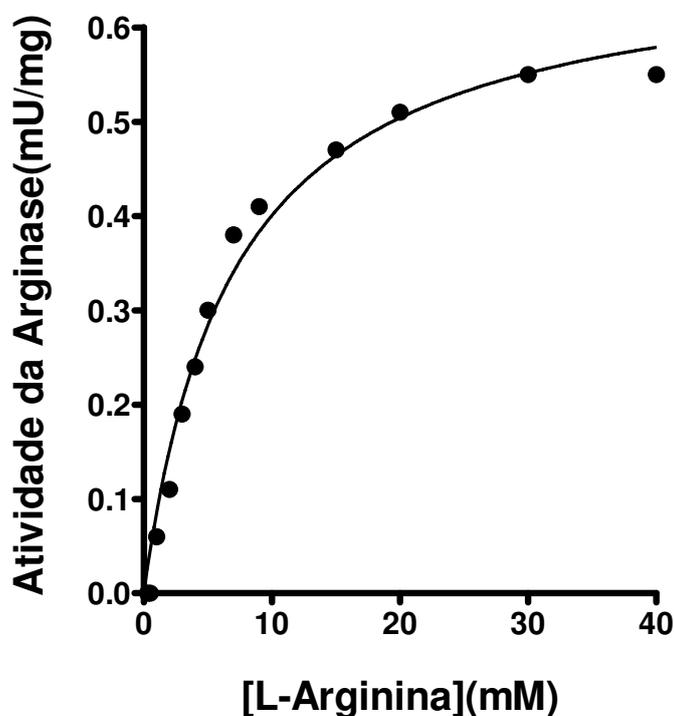


Figura 7. Efeito da concentração de L-arginina sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale*.

4.4 Efeito do Cátion Manganês (II) sobre a Atividade da Arginase

A arginase hepática de peixes coletados em ambiente não-eutrofizado foi estudada em relação ao efeito do cátion Mn(II), na forma de MnCl₂ sobre a sua atividade. Nestas condições, a atividade argininolítica foi parcialmente inibida em concentração de MnCl₂ acima de 4mM (Fig. 8).

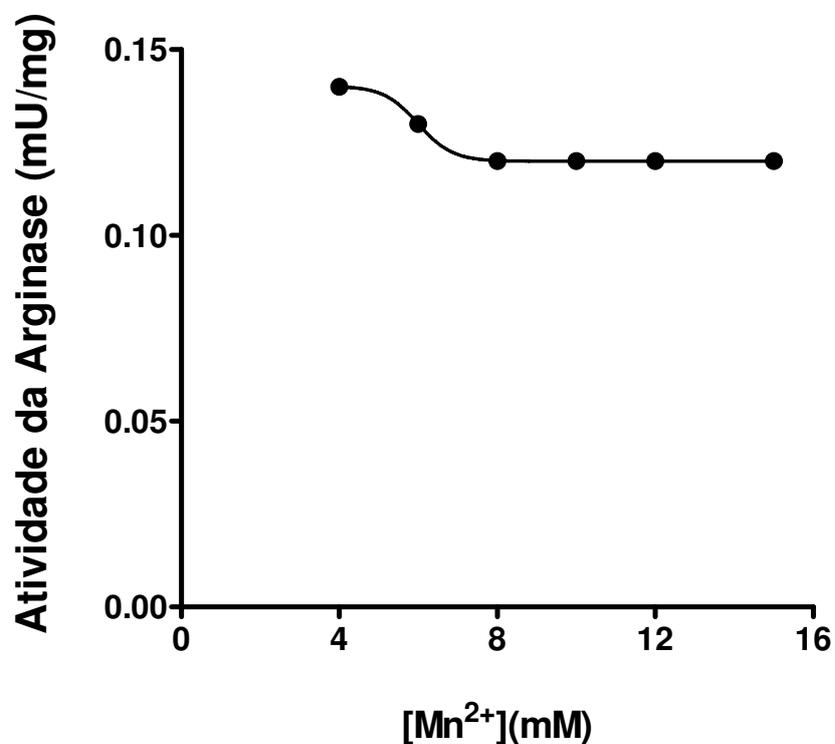


Figura 8. Efeito do cátion Mn(II) sobre a atividade da arginase hepática, parcialmente purificada da fração mitocondrial do peixe *H. littorale*.

Os estudos com arginase hepática de peixes coletados em ambientes eutrofizados revelaram que o cátion Mn(II), na forma de MnCl₂, afeta a atividade da arginase hepática, semelhante ao observado com a arginase hepática de peixes coletados em ambientes não-eutrofizados, promovendo inibição parcial para concentração de manganês acima de 6mM (Fig. 9).

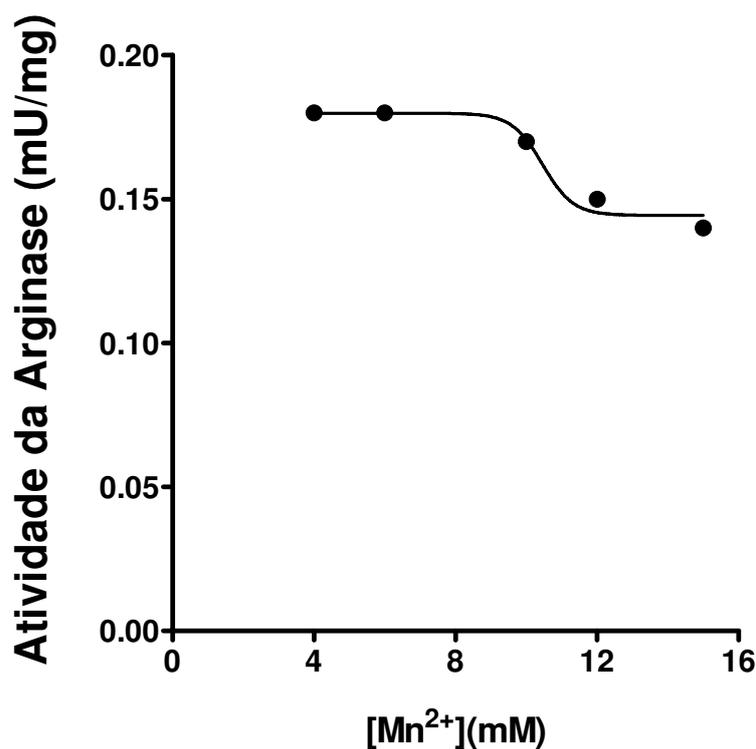


Figura 9. Efeito do cátion Mn(II) sobre a atividade da arginase hepática, parcialmente purificada do fígado do peixe *H. littorale*.

4.5 Efeito de Cátions Metálicos sobre a Atividade Arginólítica

O efeito de cátions metálicos fisiológicos e não-fisiológicos sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale*, coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados, foi conduzido em meio de reação contendo MnCl_2 5mM.

A atividade da arginase, determinada nas condições do meio de reação (MR), foi assumida como referência para os estudos subseqüentes com cátions metálicos, considerando que o cátion manganês tem sido postulado como o provável cátion fisiológico dessa metaloenzima.

4.5.1 Estudos com Peixes Coletados em Ambiente Não Eutrofizado

Os estudos com cátions fisiológicos revelaram o Zn^{2+} como um forte inibidor da atividade da arginase, reduzindo sua atividade a valores abaixo de 10% daqueles observados na presença de manganês.

O cátion Co^{2+} na ausência de manganês (Co/s) determinou a maior atividade à arginase. Na presença do cátion manganês em concentração de 5mM, os cátions Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , adicionados ao meio de reação para concentração final de 1mM, promoveram ativação da arginase, enquanto os cátions Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} inibiram a sua atividade.

Todos os cátions não-fisiológicos estudados inibiram a atividade argininolítica, sendo que o Cd^{2+} inibiu para valores abaixo do limite da detecção.

Os resultados referentes ao efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale* coletado em ambiente não-eutrofizado encontram-se sumarizados na figura 10.

4.5.2 Estudos com Peixes Coletados em Ambiente Eutrofizado

O efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale* coletado em ambiente eutrofizado foi semelhante aquele obtido com exemplares de ambiente não-eutrofizado.

O cátion cádmio e zinco inibiram a atividade da arginase para valores abaixo do limite da detecção. Os resultados encontram-se sumarizados na figura 11.

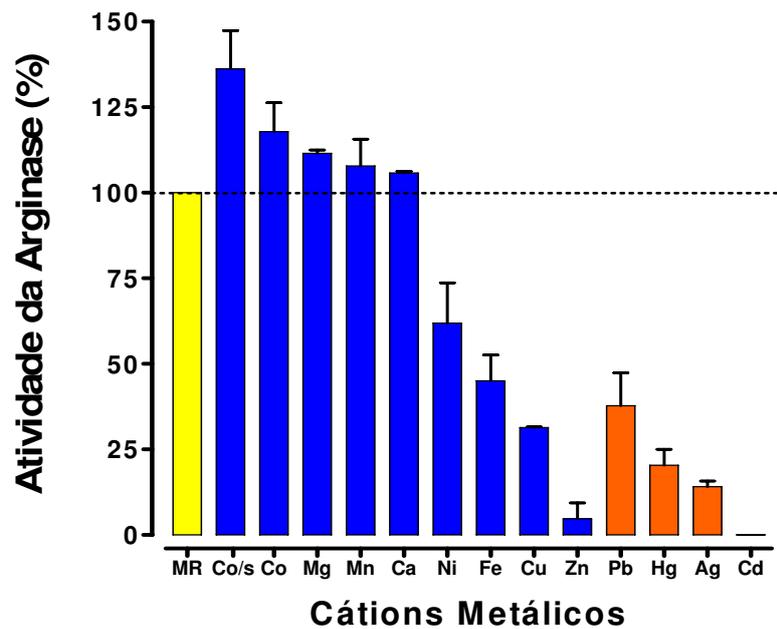


Fig. 10 Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do peixe *H. littorale* coletado em ambiente não-eutrofizado. A atividade da arginase utilizada para estabelecer os percentuais de atividades na presença dos demais cátions divalentes, foi aquela determinada no meio de reação (MR) contendo MnCl_2 5mM.

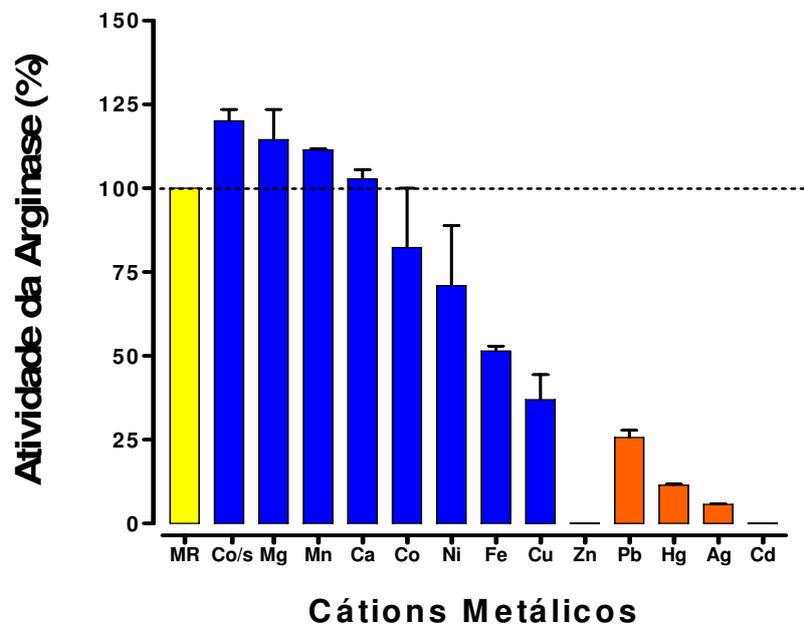


Fig. 11. Efeito de cátions metálicos sobre a atividade da arginase do peixe *H. littorale* coletado em ambiente eutrofizado. A atividade da arginase utilizada para estabelecer os percentuais de atividades na presença dos demais cátions divalentes, foi aquela determinada no meio de reação (MR) contendo MnCl_2 5mM.

4.6 Níveis Musculares de LDH

A atividade específica da LDH foi determinada em homogenados de músculo epaxial do peixe *H. littorale* coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados.

Os níveis médios de LDH no tecido muscular do peixe *H. littorale*, coletado em ambiente não-eutrofizado, foram menores do que aqueles encontrados em ambiente eutrofizado. Contudo, as diferenças não foram significativas ($P= 0,2009$). Os resultados estão apresentados na figura 12.

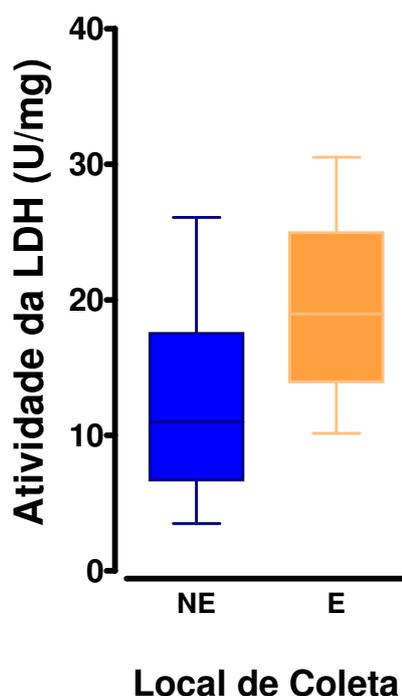


Fig. 12. Níveis musculares de LDH do peixe *H. littorale* coletado em ambientes eutrofizados (E) e não-eutrofizados (NE).

4.7 Níveis Hepáticos de LDH

Os níveis médios de LDH no tecido hepático do peixe *H. littorale*, coletado em ambiente não-eutrofizado, foram maiores do que aqueles encontrados em ambiente

eutrofizado. As diferenças, nesse caso, foram significativas ($P= 0,0017$). Os resultados estão apresentados na figura 13.

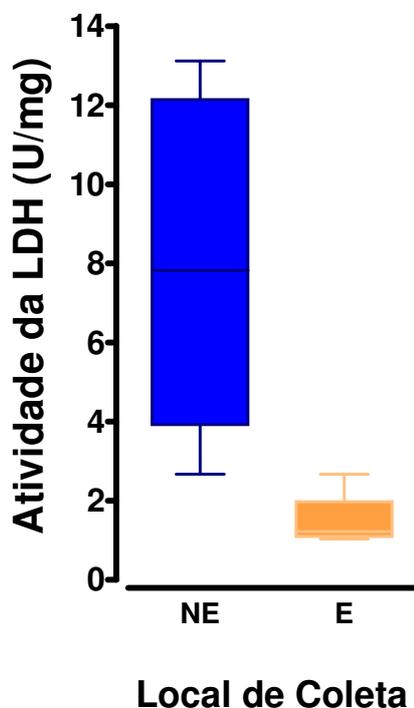


Fig. 13. Níveis hepáticos de LDH do peixe *H. littorale* coletado em ambientes eutrofizados (E) e não-eutrofizados (NE).

4.8 Níveis Hepáticos de Arginase

A atividade específica da arginase hepática do peixe *H. littorale* foi determinada em homogeneizados e extratos mitocondriais, coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados.

A atividade argininolítica média, determinada em homogeneizados hepáticos dos peixes coletados em ambiente não-eutrofizado, foi maior do que aquela encontrada em peixes coletados em ambiente eutrofizado. Contudo a diferença não foi significativa ($P= 0,9633$). Os resultados estão apresentados na figura 14.

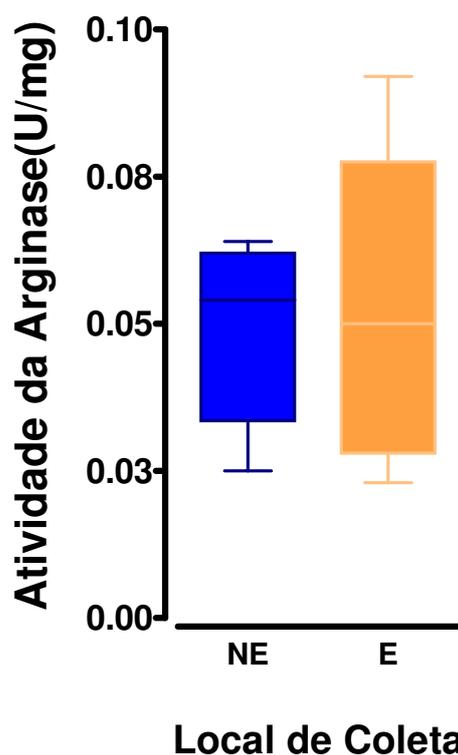


Fig. 14. Níveis hepáticos de arginase do peixe *H. littorale*, coletados em ambientes não-eutrofizados (NE) e eutrofizados (E). As atividades argininolíticas foram determinadas em pH 9,5.

A atividade específica da arginase também foi determinada em extratos mitocondriais como forma de avaliar o possível efeito de constituintes dos ambientes eutrofizados e não-eutrofizados sobre os níveis da arginase hepática. As diferenças entre as médias das atividades argininolíticas dos peixes coletados em ambiente não-eutrofizado e eutrofizado, semelhante ao observado em homogeneizados livres de células, não foram significativas ($P= 0,6606$). Os resultados estão apresentados na figura 15.

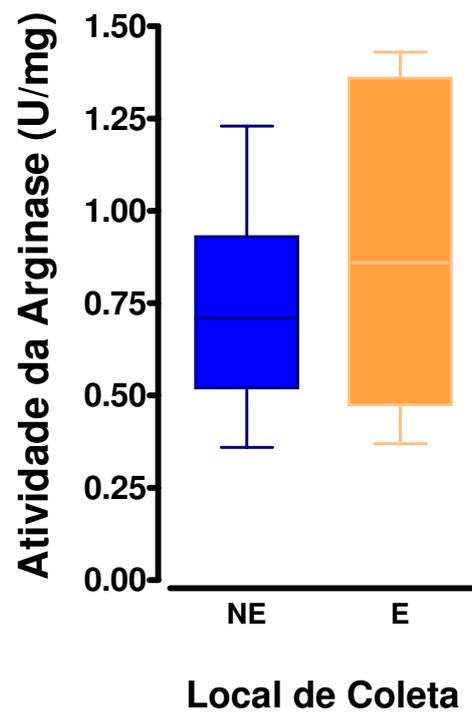


Fig. 15. Níveis de arginase da fração mitocondrial do peixe *H. littorale*, coletados em ambientes não-eutrofizados (NE) e eutrofizados (E). As atividades argininolíticas foram determinadas em pH 9,5.

5 DISCUSSÃO

Níveis teciduais de diversas enzimas vêm sendo utilizados, freqüentemente, como biomarcadores de alterações ambientais. Nesse caso, as alterações ambientais podem interferir com a expressão gênica e proporcionar aumento da concentração celular de uma dada enzima, ou mesmo induzir a síntese de formas isoenzimáticas, as quais normalmente não eram expressas ou expressas em baixas concentrações (HOCHACHKA; SOMERO, 1973, WALKER et al., 1996).

A expressão de formas isoenzimáticas pode ser caracterizada mediante estudos cinéticos envolvendo a determinação de constantes como K_m e K_{cat} , bem como o efeito de co-fatores e inibidores da atividade enzimática (SEGEL, 1993).

A eutrofização do ambiente e as alterações promovidas no curso de afluentes do Rio Paraíba do Sul proporcionou mudanças na biodiversidade da comunidade de peixes da região. Atualmente prevalece no Córrego do Curtume o peixe *H. littorale*, em detrimento de outras espécies as quais coexistiam com o *H. littorale* no passado (Relato de pescadores).

Com o objetivo de estabelecer respostas metabólicas biomarcadoras das alterações ambientais ocorridas no Córrego do Curtume foram levados a efeito estudos sobre os níveis teciduais das enzimas Lactato desidrogenase e Arginase, presentes nos tecidos de peixes *H. littorale*, com aqueles coletados no Córrego da Bomba.

As arginases são enzimas amplamente distribuídas no reino animal, envolvidas com a manutenção dos níveis teciduais de arginina e com a biossíntese de uréia em animais ureogênicos. Nos mamíferos, é normalmente encontrada na fração citosólica do tecido hepático e na fração mitocondrial dos tecidos extra-hepáticos (JENKINSON et al., 1996). Em peixes teleósteos, com exceção dos pulmonados, a arginase apresenta localização subcelular

mitocondrial, indicando um importante ponto de transição metabólica no processo evolutivo dos peixes (MOMMSEN; WALSH, 1989).

As determinações da atividade argininolítica nas frações citosólicas e mitocondriais do tecido hepático do peixe *H. littorale* coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados revelaram que, semelhante aos demais teleósteos, exceto os pulmonados, a arginase reside basicamente na fração mitocondrial.

Estudos comparativos sobre os níveis de arginase em tecidos de peixes marinhos e dulçaqüícolas revelaram atividades argininolíticas significativamente diferentes entre várias espécies. O mesmo foi observado em relação ao transporte de compostos nitrogenados no plasma sangüíneo, em especial amônia e uréia (DOSDAT, et al., 1996).

Semelhante às arginases de outros peixes e de mamíferos, a arginase do peixe *H. littorale* se apresentou relativamente estável durante 2 minutos à temperatura de 55°C. Estudos com peixes, mamíferos e aves revelaram que as arginases são enzimas que apresentam boa estabilidade térmica na presença de manganês, em temperaturas de 50 a 60°C durante 5 a 10 minutos (CARVAJAL et al., 1989; KADOWAKI; NESHEIM, 1979; RECZKOWSKI; ASH, 1994).

Os estudos de pureza cinética conduzidos com a arginase hepática do peixe *H. littorale*, parcialmente purificada a 55°C durante 2 minutos, imputaram confiabilidade aos experimentos cinéticos subseqüentes. O valor de $K_m = 7,0\text{mM}$ determinado em pH 7,4, obedece à mesma ordem de grandeza dos valores descritos na literatura para peixes teleósteos. Carvajal et al. (1987), trabalhando com a arginase hepática do peixe teleósteo marinho *Genypterus maculatus*, encontraram valores de $K_m = 9,1\text{mM}$ e $11,5\text{mM}$ em pH 7,5 e 9,5, respectivamente. Por outro lado, estudos com o teleósteo *Merluccius gayi* revelaram valores de $K_m = 10,3\text{mM}$ e $1,7\text{mM}$ em pH 7,5 e 9,5, respectivamente (CARVAJAL et al., 1989).

Considerando o pH ótimo das arginases, diversos autores conduziram seus experimentos cinéticos em pH 9,5 a 10,0. Por outro lado, o pH fisiológico do plasma sanguíneo e boa parte dos tecidos biológicos encontra-se próximo a 7,4, o que também justifica a determinação das constantes cinéticas neste valor de pH. Isso tem dificultado os estudos comparativos que procuram compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos com a evolução e adaptação dos organismos ao meio em que vivem (JENKINSON et al., 1996).

A atividade e a estabilidade das arginases estão intimamente relacionadas com a ligação de cátions divalentes a estrutura protéica da enzima. Nesse caso, o provável cátion divalente ativador das arginases e que também confere a melhor estabilidade à estrutura protéica é o manganês. Contudo algumas arginases apresentam sua maior atividade na presença de Co^{2+} e Ni^{2+} (JENKINSON et al., 1996).

Os estudos com a arginase hepática do peixe *H. littorale* revelaram que o Mn^{2+} , em baixas concentrações, atua como ativador da enzima. Contudo, em concentrações acima de 6mM o Mn^{2+} inibe parcialmente a atividade da arginase, reduzindo a sua atividade em cerca de 15%. O perfil inibitório da arginase, em concentrações elevadas de Mn^{2+} , foi aproximadamente o mesmo para os peixes coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados.

De forma semelhante, o efeito de cátions divalentes sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale* foi similar em relação ao local da coleta, revelando que o efeito do ambiente eutrofizado sobre a expressão gênica da arginase desse peixe, provavelmente, não envolve a indução de uma forma enzimática distinta.

O comportamento cinético das arginase em relação aos cátions divalentes é espécie dependente. Em ratos, Mn^{2+} e aminoácidos atuam protegendo a arginase contra a inativação promovida por enzimas proteolíticas (BOND, 1973). Por outro lado arginase

hepática humana apresenta valores de K_m para L-arginina que independem a interação com o tipo de íon metálico utilizado, mas a sua atividade sofre profunda influência com atividade decrescente na seguinte ordem $Mn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$ (CARVAJAL et al., 1995).

A capacidade de utilizar diversos cátions divalentes como cofator na reação de hidrólise da L-arginina pode representar uma vantagem metabólica. Enquanto as arginases do *Bacillus anthracis* (SORU, 1983) e do *Rhodobacter capsulatus* (MORENO-VIVIÁN et al., 1992) são fortemente inibidas pelo Zn^{2+} , a arginase de rato não é afetada (BOND et al., 1983).

A arginase hepática do peixe *H. littorale* foi fortemente inibida na presença de Zn^{2+} , ao contrário de outras arginases, a sua atividade na presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} em concentração de 1mM foi elevada, comparado ao comportamento da arginase hepática do peixe teleósteo *Merluccius gayi* (CARVAJAL et al., 1989), a qual apresenta baixa atividade na presença Co^{2+} e Ni^{2+} (cerca de 11% e 1%, respectivamente), quando comparada à atividade da arginase na presença de Mn^{2+} e, na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} , a atividade da arginase foi zero.

Embora a diferença entre os níveis hepáticos da arginase do peixe *H. littorale*, coletados em ambiente eutrofizado e não-eutrofizado, não seja significativamente diferente (Fig. 14 e 15), a ativação da arginase pelo Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} pode representar uma força contrária ao efeito inibitório de metais pesados fisiológicos (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) e não-fisiológicos (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} e Ag^+), os quais podem estar aumentados em ambientes eutrofizados.

O aumento da atividade de LDH e do ácido láctico foi observado nos peixes expostos aos piretróides do grupo II pela inibição da atividade da Succinato desidrogenase (SDH) no Ciclo de Krebs. Isso desloca para a glicólise anaeróbica com reutilização concomitante do ácido láctico (seu produto final) para manter os níveis de energia. A versatilidade metabólica, decorrente da capacidade de operar o metabolismo com vias

alternativas, pode representar um importante mecanismo de adaptação dos peixes submetidos ao estresse tóxico causado por poluentes ambientais (KAMALAVENI et. al. 2003).

O sucesso dos mecanismos de proteção dos organismos que vivem em ambientes aquáticos poluídos depende do nível de toxicidade e dos prováveis efeitos biológicos causados pelos poluentes aos organismos. Desta forma, os mecanismos de proteção em curto prazo envolvem em seu estágio inicial alterações moleculares, em especial, aqueles referentes aos níveis de enzimas e proteínas (OOST et al., 2003).

A avaliação biomarcadora do estresse oxidativo e de alterações metabólicas, tem sido objeto de diversos estudos. Trabalhando com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), expostas ao Cd^{2+} durante um período de 60 dias, Almeida et al. (2002), observaram que a sobrevivência e o ganho de peso corporal estavam relacionados com o deslocamento do metabolismo, com a diminuição do índice de glicogênio do músculo branco, bem como a diminuição da atividade das enzimas Lactato desidrogenase (LDH) e Creatinafosfoquinase (CK), indicando que houve redução da capacidade glicolítica do tecido. Nenhuma alteração foi observada no índice de proteína total no músculo branco, o que sugere um deslocamento do metabolismo de carboidratos, promovendo a manutenção das proteínas musculares.

A diferença entre os níveis de LDH da musculatura epaxial do peixe *H. littorale*, coletado em ambiente eutrofizado e não-eutrofizado, não foi significativa. Contudo a atividade da LDH hepática dos peixes coletados em ambiente eutrofizado foi significativamente menor do que a atividade no fígado dos peixes coletados em ambiente não-eutrofizado.

A presença e a distribuição de formas isoenzimáticas da LDH é tecido dependente e está sob o controle da expressão gênica. Na musculatura estriada esquelética, normalmente prevalece a LDH-M₄, enquanto que o músculo cardíaco tem como isoforma prevalente a H₄, figura 16. O fígado normalmente apresenta as cinco formas isoenzimáticas,

com elevada capacidade de converter lactato em piruvato, promovendo a gliconeogênese e a manutenção da glicemia (DEVLIN, 2003).

Considerando que a atividade da LDH foi determinada no sentido piruvato – lactato, a baixa atividade observada no fígado do peixe *H. littorale*, coletado em ambiente eutrofizado, pode ser decorrente de alteração da expressão gênica das formas isoenzimáticas, favorecendo o metabolismo do ácido láctico, em resposta à provável redução do oxigênio disponível no ambiente eutrofizado do Córrego do Curtume.

Desta forma os níveis hepáticos de LDH do peixe *H. littorale* despontam como um provável biomarcador para ambientes eutrofizados.

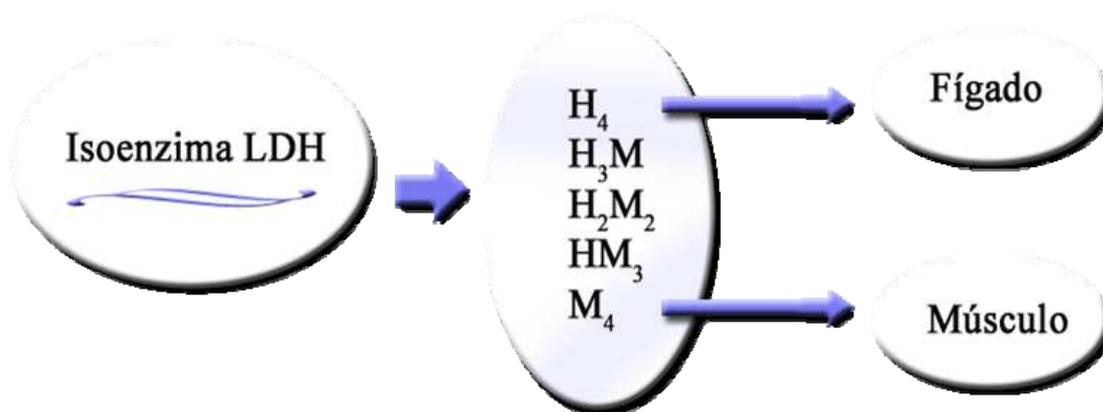


Fig. 16. Formas isoenzimáticas da estrutura tetramérica Lactato desidrogenase. A isoforma H_4 , prevalente no músculo cardíaco e fígado, é formada de quatro subunidades idênticas do tipo H. A forma M_4 prevalente na musculatura estriada esquelética é constituída de quatro subunidades idênticas do tipo M. As demais formas isoenzimáticas são híbridos decorrentes dos possíveis arranjos entre subunidades H e M.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As arginases hepáticas do peixe *H. littorale*, coletado em ambiente eutrofizado e não- eutrofizado, apresentam propriedades físico-químicas semelhantes à dos peixes teleósteos, no que se refere à estabilidade térmica e aos valores de K_m , em pH próximo ao fisiológico.
- ✓ O cátion fisiológico Zn^{2+} e o não-fisiológico Cd^{2+} são fortes inibidores da arginase hepática do peixe *H. littorale*.
- ✓ O efeito ativador dos cátions metálicos Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} sobre a atividade da arginase hepática do peixe *H. littorale* e a disponibilidade dos mesmos em ambientes aquáticos pode representar um importante mecanismo compensatório contra a inibição promovida pelo Zn^{2+} e cátions de metais pesados não-fisiológicos em ambientes eutrofizados.
- ✓ Os níveis de arginase hepática e da Lactato desidrogenase muscular do peixe *H. littorale*, coletados em ambientes eutrofizados e não-eutrofizados, não foram significativamente diferentes. Neste caso, os prováveis ajustes do metabolismo anaeróbio muscular e o da L-arginina no tecido hepático do peixe *H. littorale*, em ambiente eutrofizado, não envolvem o aumento da concentração da atividade enzimática da Lactato desidrogenase e da Arginase.
- ✓ A adaptação do peixe *H. littorale* em ambiente eutrofizado envolve a redução significativa da atividade da Lactato desidrogenase determinada no sentido piruvato – lactato.
- ✓ A baixa atividade da Lactato desidrogenase hepática do peixe *H. littorale*, em ambiente eutrofizado, revela a potencialidade dessa enzima como biomarcadora de ambientes eutrofizados.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.M.; SHEPARD, K. L.; GREELEY, M. S.; JR RYON, M. G.; JIMENEZ, B. D.; SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F.; HINTON, D. E. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. **Marine Environmental Research**, n. 28, p. 459-464, 1989.
- ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F. G.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, n. 27, p. 673-679, 2002.
- ALMEIDA, J.A.; NOVELLI, E.L.B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES, J. R. Environmental cadmium exposure in metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environment Pollution**, n. 114, p. 169-175, 2001.
- ANTOGNELLI, C.; ROMANI, R.; BALDRACCHINI, F.; De SANTIS, A.; ANDREANI, G.; TALESA, V. Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentration. **Chemico-Biological Interactions**, n. 142, p. 297-305, 2003.
- BACILA, M.; ROSA, R.; RODRIGUES, E. Fluoride inhibition of enolase from antarctic organism. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 1, n.1, p. 31-35, 1989.
- BARBER, R.T; HILTING, A.K.; HAYES, M.L. The changing health of coral reefs. **Human And Ecology Risk Assessment**, v. 7, n.5, p. 1255-1270, 2001.
- BAYNE, B. L.; BROWN, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A.; LIVINGSTONE, D. A.; LOWE, D. M.; MOORE, M.N.; STEBBING, A. R. D.; WIDDINGS, J. The effects of stress and pollution on marine animals, **Praeger**, New York, USA, 1985.
- BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. **Verlag Chemie, Weinheim**, FRG, 1974.
- BERNTSSEN, M.H.G.; HYLLAND, K.; LUNDEBYE, A.; JULSHAMN, K. Higher faecal excretion and lower tissue accumulation of mercury in Wistar rats from contaminated fish than from methylmercury chloride added to fish. **Food Chemistry Toxicology**, v.42, n. 8, p. 359-1366, 2004.
- BHAGAVAN, N.V., Biochemistry: A comprehensive review. **Ed. Interamericana**, 1 ed., 964 pp, 1974.
- BOND, S. J. Effect of manganese and amino acids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. **Biochemistry et Biophysica Acta**, n. 327, p. 157-165, 1973.

BOND, S. J.; FAILLA, M. L.; UNGER, D. F. Elevated manganese concentrations and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Biological Chemistry**, n 258, p. 8004-8009, 1983.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248 –254, 1976.

CAMARGO, J.A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. **Chemosphere**, n. 50, p. 251-264, 2003.

CAMPBELL, J.W.; VORHABEN, J. E.; SMITH, D.D. Uricotelic: Its nature and origin during the evolution of tetrapod vertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, n. 243, p. 349-363, 1987.

CARVALHO, C.S. Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa*, (Steindachner, 1881). **Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – SP**, 2003.

CAVARJAL, N.; KESSI, E.; AINOL, L. Subcellular localization and kinetic properties of arginase from the liver of *Genypterus maculatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 88B, n. 1, p. 229-231, 1987.

CAVARJAL, N.; KESSI, E.; JEREZ, D. Studies on the control of arginine hydrolysis in the liver of *Merluccius gayi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94b, n. 1, p. 195-199, 1989.

CAVARJAL, N.; TORRES, C.; URIBE, E.; SALAS, M. Interaction of arginase with metal ions: studies of the enzyme from human liver and comparison with other arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112b, n. 1, p. 153-159, 1995.

COUNTER, S.A.; BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.19, n. 2, p. 209-230, 2004.

DAGHITH, F.; FUKUTO, J.M.; ASH, D.E. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 202, p. 174-180, 1994.

DEVLIN, M. T. Manual de bioquímica com correlações Clínicas. **Ed. Edgard Blucher**, 1 ed, 2003.

DOSDAT, A.; SERRAIS, F.; MÉTAILLER, R.; HUELVAN, C.; DESBRUYÈRES, E. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. **Aquaculture**, n.141, p. 107-127, 1996.

DUFFUS, J.H. "Heavy metals"-A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, vol. 74, n.5, p. 793-807, 2002.

ELIA, A.C.; GALARINI, R.; TATICCHI, M.I.; DÖRR, A. J. M.; MANTILACCI, L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melasunder* mercury exposure. **Ecotoxicology Environmental Safety**, n. 55, p. 162–167, 2003.

FEHIDRO 280/2002. Estruturação e disponibilização do Banco de Dados Ambientais da Bacia do Rio Una, Bacia do Rio Paraíba do Sul.

FELLER, G.; ARPIGNY, J. L.; NARINX, E.; GERDAY, C. Molecular Adaptations of Enzymes from Psychrophilic Organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.118a, n.3, p. 495-499, 1997.

FELLER, G.; PAULY, J.P.; SMAL, A.; O´CARRA P.; GERDAY, C. The lactate dehydrogenase of the icefish heart: biochemical adaptations to hypoxia tolerance. **Biochemistry et Biophysica Acta**, n. 1079, p. 343-347, 1991.

FELSKIE, A.K.; ANDERSON, P.M.; WRIGHT, P.A. Expression and activity of carbamoyl phosphate synthetase and ornithine urea cycle enzymes in various tissues of four fish species. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 119b, n.2, p. 355-364, 1998.

FOSSI, M.C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*. Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, n. 121, p. 321-331, 1998.

GERACITANO, L.A.; BOCHETTI, R.; MONSERRAT, J.M.; REGOLI, F.; BIANCHINI, A. Oxidative stress responsesw in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. **Marine Environmental Research**, n. 58, p. 1-17, 2004.

GEYER, J.W.; DABICH, D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. **Analytical Biochemistry**, n. 39, p. 412-417, 1971.

HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. **Crc Press, Lewis Publishers**, 2. ed., 1995.

HICKS, J.M.; FARRELL, A.P. The cardiovascular responses of the red-eared slider (*Trachemys scripta*) acclimated to either 22 or 5 degrees C. I. Effects of anoxic exposure on in vivo cardiac performance. **The Journal of Experimental Biology**,n. 203, p. 3765-3774, 2000A.

HICKS, J.M.; FARRELL, A.P. The cardiovascular responses of the red-eared slider (*Trachemys scripta*) acclimated to either 22 or 5 degrees C. I. Effects of anoxic exposure on in vivo cardiac performance. **The Journal of Experimental Biology**,n. 203, p. 3775-3784, 2000B.

HILMY, A.M.; SHABANA, M.B.; DAABEES, A.Y. Effects of cadmium toxicity upon the in vivo and in vitro activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of *Mugil cephalus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 81C, n.1, p. 145-153-,1985.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. Strategies of biochemical adaptation. **W. B. Saunders Company**, 1973.

Hoplosternum littorale. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 21 mai. 2004.

Hoplosternum littorale. Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Hoplosternum_littorale.htm>. Acesso em: 26 nov. 2005.

Influência da qualidade do ambiente aquático na higidez dos peixes. Disponível em:<http://www.utp.br/proppe/VIIseminariodepesquisa/Resumos/Meio%20Ambiente%20e%20Desenvolvimento/infl_qual.doc>. Acesso em 26 nov. 2005.

JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D. Comparative properties of arginase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 114B, n. 1, p. 107 – 132, 1996.

JOHNSON, J.L.; ROBERTS, E. Arginine metabolism in mouse brain synaptosomes. **Neurochemistry Journal**, v. 42, p. 1123-1126, 1984.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente.
<<http://www.valeverde.org.br/html/clipp2.php?id=3865&categoria=Pesquisa+Ambienta>>. Acesso em: 26 nov.2005.

KADOWAKI H.; NESHEIM, M. C. Purification and properties of chick kidney arginase. **Biochemistry Journal**, v. 10, p. 303-310, 1979.

KAMALAVENI, K.; GOPAL, V.; SAMPSON, U.; ARUNA, D. Recycling and utilization of metabolicwastes for energy production is an index of biochemical adaptation of fish under environmental pollution stress. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 86, n. 3, p. 255 - 264, 2003.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica. **Ed. Edgard Blucher**, 2 ed., v. 4, 2000.

LUTZ, P.L.; NILSSON, G.E. Contrasting strategies for anoxic brain survival--glycolysis up or down **The Journal of Experimental Biology**, n.200, p. 411-419, 1997.

MAGGINI, S.; STOECKLIN-TSCHAN, F.B.; MÖRIKOFER-ZWEZ, S.;WALTER, P. New Kinetic for rat liver arginase measured at near-physiological steady-state concentrations of arginine and Mn²⁺. **Biochemistry Journal**, n. 283, p. 653-660, 1992.

- MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part a, n. 120, p. 311–315, 1998.
- MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, D.O.; HASDEMİR, E.; TÜZEN, M.; SARI, H.; SUIÇMEZ, M. Determination of trace metal levels in seven fish species in lakes in Tokat, Turkey. **Food Chemistry**, n. 90, p. 175–179, 2005.
- MIYAZAKI, K.; WINTRODE, P. L.; GRAYLING, R. A.; RUBINGH, D. N.; ARNOLD, F. H. Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. **Journal of Molecular Biology**, n. 297, p. 1015-1026, 2000.
- MOL, J.H. Effects of salinity on distribution, growth and survival of three neotropical armoured catfishes. **Journal of Fish Biology**, n. 45, p. 763-776, 1994.
- MOMMSEN, T.P.; WALSH, P.J. Evolution of urea synthesis in vertebrates: the piscine connection. **Science**, n. 248, p. 72-75, 1989.
- MORENO-VIVIÁN, C.; SOLER, G.; CASTILLO, F. Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. Purification and properties of arginase. **European Journal of Biochemistry**, n. 204, p. 531-537, 1992.
- OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 13, p. 57-149, 2003.
- PETHE, S.; BOUCHER, J., MANSUY, D. Interaction of anions with rat liver arginase: specific inhibitory effects of fluoride. **Journal Inorganic Biochemistry**, n. 88, p. 397–402, 2002.
- PETHE, S., BOUCHER, J.; MANSUY, D. Interaction of anions with rat liver arginase: specific inhibitory effects of fluoride. **Journal Inorganic Biochemistry**, n. 13, p. 57-149, 2003.
- POLEZ, V.L.P.; MONZANI, P.S.; MORAES, G. The urea cycle glutamine synthetase, carbomoyl phosphatase synthetase and argininase from the freshwater teleost fish *Hoplerthrinus unitaeatus*, *Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*: comparison and enzyme compartmentalization. **Journal of Comparative Biology**, v. 3, n. 2, p. 185-191, 1998.
- RABITTO, I.S.; COSTA, J.R.M.A.; ASSIS, H.C.S.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, O.C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 60, p. 147-156, 2005.
- RAMNARINE, I. W. Brief communication induction of nest building and spawning in *Hoplosternum littorale*. **Journal of Fish Biology**, n. 47, p. 555–557, 1995.

RECZKOWSKI, S. R.; ASH, D. E. Rat liver arginase: Kinetic Mechanism, alternate Substrates, and Inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.1, p. 31-37, 1994.

REIS, R. E. Anatomy and phylogenetic analysis of the *Neotropical callichthyid*. Catfishes (*Ostariophysi, Siluriformes*). **Zoological Journal of the Linnean Society**, n. 124, p. 105-168, 1998.

REIS, R. E. *Hoplosternum littorale*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=5377>>. Acesso em: 26 nov. 2005.

REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, n. 50, p. 351-361, 2000.

RODRIGUES, E.; ROSA, R.; BACILA, M. Comparative aspects of the nitrogen metabolism in antarctic birds. **Trends Comparative Biochemistry and Physiology**, n.2, p. 447-463, 1996.

RUSSELL, D.H.; McVICKER, T.A. Polyamine biogenesis in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. **Biochemistry Journal**, n. 130, p. 71-76, 1972.

SAHA, N.; RATHA, B.K. Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120A, n. 2, p. 195-208, 1998.

SCOTT, G.R.; SLOMAN, K. A. Review The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, n. 68, p. 369-392, 2004.

SEGEL, I. H. Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, **Wiley**, New York, 1993.

SINGER, M.A. Do mammals, birds, reptiles and fish have similar nitrogen conserving systems? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134B, p. 543-558, 2003.

SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; DE COEN, W.; BLUST, R. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. **Environmental Pollution**, n. 129, p. 99-112, 2004.

SOMERO, N. G. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basis "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology**, part. B, n. 139, p. 321-333, 2004.

SORENSEN, E. M. B. Metal Poisoning in Fish. **CRC-Press**, Flórida, 1991.

SORU, E. Chemical and immunological properties of *B. anthracis* arginase and its metabolic involvement. **Molecular Cellular Biochemistry**, n. 173, p. 173-183.

SURES, B.; TARASCHEWSKI, H.; SIDDALL, R. Heavy metal concentrations in adult acanthocephalans and cestodes compared to their fish hosts and to established free-living bioindicators. **Parassitologia**, n39, p. 213-218, 1997.

TÓTH, L.; JUHÁSZ, M.; VARGA, T.; CSIKKEL-SZOOLNOKIU, A.; NEMCSÓK, J. Some effect of CuSO₄ on carp. **Journal of Environmental Science and Health**, part **B**, v.31, n.3, p. 627-635, 1996.

VAL, A.L Organic phosphates in the red blood cells of fish: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, n. 125, p. 417-435, 2000.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, n. 28, p. 711 – 717, 2003.

VERMA, A.K.; BOUTWELL, R.K. Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Biochemistry et Biophysica Acta**, n. 677, p. 184-189, 1981.

YIP, M.C.M.; KNOX, W.E. Function of arginase in lactating mammary gland. **Biochemistry Journal**, n. 127, p. 893-899, 1972.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Principles of ecotoxicology. **School of Animal and Microbial Sciences**, University of Reading, UK, 1997.

WHITFIELD, A.K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes with estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 61A, p. 229-250, 2002.

WILLIAMS, R.J.P.; FRAÚSTO, S. The distribution of elements in cells. **Coord. Chemical Reviews**, n. 220-202, p. 247-348, 2000.

WU, G.; MORRIS, S.M.J., Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemistry Journal**, n. 336, p. 1-17, 1998.