

## ASPECTOS DO METABOLISMO NITROGENADO DE *Piaractus mesopotamicus* (PACU) SOB ESTRESSE AMBIENTAL DE pH

MORAES, G.<sup>1</sup>, MONZANI, P.S.S.<sup>1</sup>, SOUZA, R.H.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução - UFSCar-SP

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura – CEPTA/IBAMA

### RESUMO

O catabolismo de proteínas leva à formação de amônia (NH<sub>3</sub>) que, nos peixes teleósteos, costuma ser eliminada por difusão através das brânquias. A síntese de uréia nos peixes parece estar restrita a um número pequeno de espécies. Sua indução por alterações do meio não é descrita particularmente em teleósteos de água doce no Brasil. Neste trabalho são descritas as respostas metabólicas de *Piaractus mesopotamicus* (pacu), frente a variações ambientais de pH.

Os resultados obtidos sugerem que a espécie em estudo aumenta a excreção de uréia com o aumento de pH, além de se observar uma redução da amônia plasmática. Verificou-se também um aumento das atividades transaminásicas de GOT e GPT nos tecidos hepático e renal, seguido do aumento da atividade arginásica, nas condições experimentais. Estes dados são sugestivos de excreção de uréia neste teleósteo de água doce como resposta ao aumento do pH ambiental.

Palavras chave: Metabolismo nitrogenado, *Piaractus mesopotamicus*, transaminases, excreção nitrogenada.

## ABSTRACT

*Aspects of the nitrogen metabolism in **Piaractus mesopotamicus** (Pacu) under environmental stress of pH*

The protein catabolism results in ammonia production. Teleosts usually excrete this catabolite through the gills by diffusion. Urea excretion seems to be restricted to a short number of species. There is no description of synthesis induction as well as excretion of urea in fresh water teleost species from Brazil. This paper describes some biochemical trends of pacu (***Piaractus mesopotamicus***) facing the environmental pH changes.

Our results suggest that the rising of water pH produces an increase in urea excretion and a decrease in plasmatic urea concentration. Enhance of the transaminases GOT and GPT activities was also observed in liver and kidney. This was followed by an arginase increase under the experimental conditions. These data suggest the urea excretion in this fresh water teleost as a response to environmental pH increase.

Key words: Nitrogen metabolism, ***Piaractus mesopotamicus***, aminotransferases, nitrogen excretion.

## INTRODUÇÃO

O catabolismo de proteínas em peixes parece ser a fonte primária de energia, pois, nesta classe, os carboidratos são dificilmente convertidos em glicogênio ou lipídios, enquanto que as proteínas podem ser convertidas em ambos. Em algumas espécies, como ***Oncorhynchus nerka*** e ***Carassius auratus***, a produção de energia através do catabolismo de proteínas é maior que 40% (Kutty, 1972; Van Den Thillart & Kesbeke, 1978).

O catabolismo de substâncias nitrogenadas leva à formação de produtos intermediários que devem ser eliminados para prevenção de estado tóxico. Algumas reações, tais como as desaminações, podem produzir amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), enquanto que a amônia ( $\text{NH}_3$ ) parece ser produto de um número limitado de reações. O grupo  $\text{NH}_4^+$  provém de  $\text{R-NH}_3^+$  (grupos amino protonados de aminoácidos) e posteriormente reduzidos pela coenzima  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ou outros compostos redutores. O  $\text{NH}_3$  provém do grupo  $\text{R-NH}_2$  não protonado, como aquele do grupo amino da glutamina, ou dos nitrogênios dos anéis de purina.

Peixes de água-doce e teleósteos marinhos excretam predominantemente amônia por difusão através das brânquias, ou trocam

$\text{NH}_4^+$  por  $\text{Na}^+$  (Maetz & Garcia, 1964) com o meio, excretando assim compostos nitrogenados e mantendo o equilíbrio osmótico. Porém, outros compostos nitrogenados como a creatina, o ácido úrico ou o ácido alantóico e a uréia, podem ainda ser excretados como produtos nitrogenados, sendo que este último pode chegar a 20% ou mais do total do produto nitrogenado excretado (Denis, 1913;1914).

Os primeiros pesquisadores a voltarem sua atenção para a biossíntese da uréia foram Krebs e Hanseleit em 1932. Esses autores propuseram a formação cíclica deste catabólito, através de um processo em que havia consumo de amônia, gás carbônico e a utilização de três aminoácidos: ornitina, citrulina e arginina (Krebs & Hanseleit, 1932; Krebs, 1952).

Alguns autores sugerem que a formação de uréia em teleosteos provém ou do catabolismo de arginina, ou da degradação de purinas, desde que o fígado contém todas as enzimas uricotélicas (Cvancara, 1969). Porém, em trabalhos envolvendo carpa de água doce em jejum prolongado, foi observado um aumento na excreção de uréia (Vellas & Sertafy, 1967).

A síntese de uréia, pelo ciclo ornitina-uréia, ocorre em taxas substanciais em vários teleosteos, tais como: *Opsanus tau* (Read, 1971); em teleosteos com órgão para respiração aérea, tais como *Clarias batrachus*, *Anabas testudineuse* *Amphipnous cuchia* (Saha & Ratha, 1989); e *Oreochromis alcalicus grahami*, espécie de tilápia encontrada no lago Magadi, na África, que vive em ambiente extremamente alcalino ( $\text{pH} > 9,5$ ) e que excreta exclusivamente uréia (Randall *et al.*, 1989).

Através de alterações na atividade enzimática de um indivíduo, podemos inferir se estão ocorrendo, ou não, alterações na sua preferência metabólica como reflexo de uma resposta bioquímica a um fator externo. A forma de excreção nitrogenada (amônia ou uréia) está envolvida com questões fisiológicas, podendo ser detectada através da expressão de enzimas relacionadas a tais processos. Esta excreção pode estar ligada à variação de fatores ambientais, tais como o pH e a salinidade. Hochachka & Somero (1973) sugeriram que a excreção de amônia através das brânquias diminui com o aumento do pH da água, o qual implica no aumento do pH sanguíneo do animal (Wedemeyer & Yasutake, 1977). Tais observações e hipóteses nos levam a propor uma alteração nos padrões de excreção nitrogenada de alguns teleosteos quando submetidos a variações de pH ambiental.

Os teleosteos de água doce do Brasil têm sido muito pouco estudados em seus aspectos bioquímicos, particularmente nos que

dizem respeito ao metabolismo nitrogenado. A espécie *Piaractus mesopotamicus* - Holmberg (1887), conhecida popularmente como pacu, é também descrita na literatura como *Colossoma mitrei* - Berg (1895). Esta espécie omnívora encontra-se naturalmente distribuída na América do Sul, sendo considerada "moradora habitual de grandes águas" (Godoy, 1975). O pacu é um peixe migrador e a maior quantidade de informações a seu respeito concentra-se nas técnicas de cultivo (Ferraz de Lima & Chabalin, 1984).

No presente trabalho comparamos as respostas enzimáticas sob diferentes pHs, em *Piaractus mesopotamicus*, relacionando-as à excreção nitrogenada e verificando-se, assim, uma possível adaptação metabólica e ou fisiológica a tal mudança ambiental.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nossos experimentos foram realizados em duas etapas, a saber: 1) a adaptação dos peixes a diferentes pHs, 2) a resposta metabólica destes animais com referência especial à excreção nitrogenada. Esses experimentos foram realizados no CEPTA-IBAMA (Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura), de Pirassununga-SP. e no DGE (Departamento de Genética e Evolução) da Universidade Federal de São Carlos.

### Desenho Experimental

Dezoito animais de  $180 \pm 50$ g foram distribuídos em três lotes de seis em aquários de 60 litros com parede escura para a redução do estresse e aeração constante ( $pO_2 = 130$  mm Hg). O primeiro lote foi submetido a pH ácido, em torno de  $5,5 \pm 0,5$ , sendo este valor atingido gradativamente pelo abaixamento com HCl 10% e permanecendo nesta ordem de grandeza por 48 horas. O abaixamento de pH foi de aproximadamente 0,5 unidades a cada 1,5 horas até atingir o pH desejado. O segundo lote foi submetido a pH neutro ( $7,0 \pm 0,5$ ), por 48 horas, sendo este controlado com NaOH 10%. O terceiro lote permaneceu em pH alcalino ( $9,0 \pm 0,5$ ), por 48 horas, tendo sido este valor controlado pela adição de NaOH 10%. A adição de NaOH, na aclimação, também foi feita de forma gradativa, com aumento de 0,5 unidade a cada 1,5 horas, obedecendo-se também o mesmo padrão de experimentação usado na aclimação ácida. Observou-se maior variação de pH no período noturno (das 24:00 às 7:30 horas).

## Determinações Bioquímicas

Depois do período de adaptação foi coletado o sangue dos animais por punção caudal, utilizando-se seringas de 2 ml, heparinizadas. Os peixes foram pesados e medidos, e então, coletaram-se o fígado, o rim lombar e a brânquia, sendo estes transferidos para nitrogênio líquido por 5 minutos e mantidos em freezer à temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

O sangue coletado foi centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm, e o plasma foi separado para determinação do teor de uréia, amônia e  $\text{Na}^+$ , e das atividades de GPT (glutâmico-pirúvico transaminase) e GOT (glutâmico-oxaloacético transaminase). Os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização  $\text{pH}=7,0$ , na proporção de 100 mg de tecido por ml de tampão (TRIS 10 mM; fosfato 20mM e 50% de glicerol).

Parte do plasma foi separada para determinação de uréia e amônia. Nesta determinação, 300  $\mu\text{l}$  de plasma foram desproteinizados com 1200  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico (PCA) 0,6 N e após, centrifugado por 1,5 minutos. O sobrenadante foi utilizado nas determinações da uréia e amônia. A concentração de uréia foi determinada pelo método de Archibald (1944) e a amônia foi determinada por nesslerização, tendo sido todas as determinações realizadas em duplicata. O sódio plasmático foi medido por fotometria de chama.

As enzimas plasmáticas Glutâmico pirúvico transaminase (GPT) e Glutâmico oxaloacético transaminase (GOT) foram estimadas através do método colorimétrico descrito por Reitman e Frankel (1957) após adaptações. A mistura de reação para a determinação de GPT continha: alanina 200 mM;  $\alpha$ -cetoglutarato 10,5 mM; piridoxal-fosfato 0,025 mM; arseniato de sódio 2,0 mM; TRIS 50 mM ( $\text{pH}=7,5$ ). Todos os componentes eram diluídos em tampão TRIS. Para o ensaio utilizou-se: 50  $\mu\text{l}$  de plasma e 450  $\mu\text{l}$  da mistura de reação, sendo incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos e interrompida pela adição de 250  $\mu\text{l}$  de DNPH (dinitrofenilhidrazina)-HCl, esperando-se 10 minutos, à temperatura ambiente, para estabilização da reação com este último composto. Após este período, era feita a centrifugação por 1,5 minutos a 5000 rpm e transferidos 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante para tubo de ensaio com 3 ml de NaOH 1,3 N. A leitura de absorbância era feita em 440 nm. Nas determinações de GOT a alanina era substituída por D.L-aspartico 40 mM e repetido o mesmo procedimento das determinações de GPT. A determinação destas atividades nos tecidos obede-

ceu o mesmo protocolo de reação, tendo-se substituído o plasma por 50  $\mu$ l de homogeneizado. A atividade transaminásica foi expressa em unidade internacional (UI) por ml de plasma.

A atividade arginásica foi determinada nos tecidos medindo-se colorimetricamente o produto de reação. A mistura de reação continha: 100  $\mu$ l de arginina-60 mM; 10  $\mu$ l de cloreto de manganês 15 mM; 740  $\mu$ l de tampão glicina 200 mM (pH=9,0); 50  $\mu$ l de homogeneizado (fígado, rim ou brânquia). A mistura era incubada por 30 minutos a 37°C em banho maria, e a reação interrompida com a adição de 100  $\mu$ l de PCA 7%. O branco de reação era realizado com a adição prévia de PCA. Após a incubação os tubos eram centrifugados e a uréia determinada no sobrenadante segundo o método de Archibald (1944). A atividade enzimática foi expressa em  $\mu$ moles de uréia por miligramas de tecido por minuto.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH é fator fundamental no equilíbrio da reação de dissociação da amônia  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ . O aumento do pH implica no deslocamento do equilíbrio de reação no sentido de formação de amônia ( $\text{NH}_3$ ). Esta forma nitrogenada é capaz de se difundir livremente através das membranas celulares, o que responde, em parte, por suas características mais tóxicas que o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Esta forma protonada é menos permeável às membranas e tal característica impõe sua excreção através da troca pelo íon sódio, ao nível branquial. Este fato poderia explicar a redução do teor plasmático de sódio observado com o aumento do pH (Fig. 1).

A dificuldade de excreção nitrogenada na forma de amônia, em função da elevação de pH, deve levar o organismo à utilização de outra estratégia bioquímica de detoxificação deste metabólito. A hipótese proposta neste trabalho é de que a dificuldade de excreção de amônia, gerada pelo aumento de pH, deve conduzir o organismo à ativação ou à indução da atividade de enzimas direta ou indiretamente ligadas à produção de uréia. Além disso, o próprio aumento nos teores plasmáticos de uréia poderia ser indicativo do aumento da excreção nitrogenada sob estas circunstâncias. A determinação da concentração de uréia plasmática em exemplares de pacu, submetidos ao aumento de pH, curiosamente resultaram na redução da uréia plasmática (Fig. 1). Entretanto, dado ainda mais interessante foi a

redução significativa do teor de amônia plasmática (Fig.1). Estes dados são indicativos de que, em valores mais altos de pH, as estratégias utilizadas na detoxificação da amônia foram altamente eficazes. A redução observada nos teores de uréia plasmática poderia ser explicada por um aumento na depuração desta substância face ao aumento de pH do meio. Esta hipótese substancia-se na verificação de um aumento significativo da atividade arginásica hepática e renal em função do aumento do pH ambiental (Fig. 2 e 3). O aumento desta atividade poderia ser também explicado pelo simples aumento do catabolismo proteico devido ao estresse ambiental causado pela elevação do pH. Isto seria indicativo desta preferência metabólica face a uma alteração na demanda energética. Entretanto, esta hipótese é pouco provável, tendo-se em vista que o aumento da atividade arginásica é observado apenas nestes dois tecidos, enquanto que no tecido branquial ela não sofre qualquer alteração (Fig. 4). O aumento da demanda energética deveria ser esperado também ao nível branquial, entretanto, o que se observa neste tecido são valores constantes de glutâmico oxaloacético transaminase-GOT (Fig. 4) (enzima estreitamente ligada ao metabolismo oxidativo) e até mesmo a redução de glutâmico pirúvico transaminase-GPT (Fig. 4) (enzima diretamente ligada ao metabolismo dos aminoácidos).

Nos tecidos hepático e renal observou-se um aumento significativo das transaminases GOT e GPT (Fig. 2, 3). Este dado, associado ao aumento da atividade arginásica, é altamente sugestivo de aumento na produção de uréia, como catabólito de excreção nitrogenada em resposta à elevação de pH.

Os valores constantes das atividades transaminásicas plasmáticas (Fig. 5) reduzem a possibilidade de se admitir que as alterações de pH a que foram submetidos os exemplares de *P. mesopotamicus* tenham causado efeitos lesivos sobre as estruturas branquiais.

Os resultados observados sugerem, portanto, que o efeito da redução do pH ambiental sobre *P. mesopotamicus* leva estes animais a alterar sua estratégia de excreção nitrogenada, sendo os tecidos hepático e renal fundamentais neste processo. A reabsorção do sódio parece ser altamente afetada pelas alterações na excreção de amônia e a depuração de uréia parece ser alterado pelo pH externo. As atividades transaminásicas de GOT e GPT desempenham papel preponderante nas respostas adaptativas de *P. mesopotamicus* às variações de pH ambiental. A confirmação de um aumento no cata-

bolismo proteico sob estresse de pH do meio é um dado que deverá ser melhor estudado pois suas implicações na redução de massa muscular são fundamentais nas atividades de piscicultura.

## BIBLIOGRAFIA

- ARCHIBALD, R. M. Determination of citrulline and alantoine and demonstration of citrulline in blood plasma. **J. Biol. Chem.** v. 156, p.121-142, 1944.
- CVANCARA, V. A. Comparative study of liver uricase activity in freshwater teleosts. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 28, p. 725-732, 1969.
- DENIS, W. Metabolism studies on cold-blooded animals. II- The blood and urine of fish. **J. Biol. Chem.** v. 16, p. 389-393, 1913-1914.
- FERRAZ DE LIMA, J. A., CHABALIN, E. **O mercado de peixes de Cuiabá** (Estrutura econômico-social). Cuiabá: Secretaria Municipal de Serviço Público, Prefeitura Municipal de Cuiabá, 1984, 96 p.
- GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**: subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, v. 2, p. 217-397.
- HOCHACHKA, P. W., SOMERO, G. N. (1975) Strategies of Biochemical Adaptation. Philadelphia: Saunders, 1973, p.385.
- KREBS, H. A. **The Enzymes**, v. 2, New York: Academic Press, p.866, 1952.
- KREBS, H. A., HANSELEIT, K. Untersuchungen uber die harnstoffbildung im tierkorper. **Z. Physiol. Chem.** v. 210, p. 33-66, 1932.
- KUTTY, M. N. Respiratory quotient and ammonia excretion in *Tilapia mossambica*. **Mar. Biol.** v. 16. p. 126-133, 1972.
- MAETZ, J., GARCIA ROMEU, F. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish, *Carassius auratus*. III- Evidence for  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanges. **J. Gen. Physiol.** v. 47, p. 1209-1227, 1964.
- RANDALL, D. J., WOOD, C. M., PERRY, S. P. *et al.* Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment. **Nature**, v. 337, p. 165-166, 1989
- READ, L. J. The presence of high ornithine-urea cycle enzyme activity in the teleost *Opsanus tau*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 39B, p. 409-413, 1971.

- REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Amer. J. Clin. Path.**, v. 28, p. 56, 1957.
- SAHA, N. and RATHA, B. K. Comparative study of ureogenesis in freshwater, air-breathing teleosts. **J. Exp. Zool.**, v. 252, p. 1-8, 1989.
- VAN DEN THILLART, G., KESBEKE, F. Anaerobic production of carbon dioxide and ammonia by goldfish *Carassius auratus* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 59A, p. 393-400, 1978.
- VELLAS, F., SERFATY, A. Sur l' excrétion uréique de la carpe *Cyprinus carpio* L. **Arch. Sci. Physiol.**, v. 21, p. 185-192, 1967.
- WEDEMEYER, G., YASUTAKE, W. T. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. **Tech. Pap. U.S. Fish Wildlife Serv.**, v. 89, 1977, 18 p.

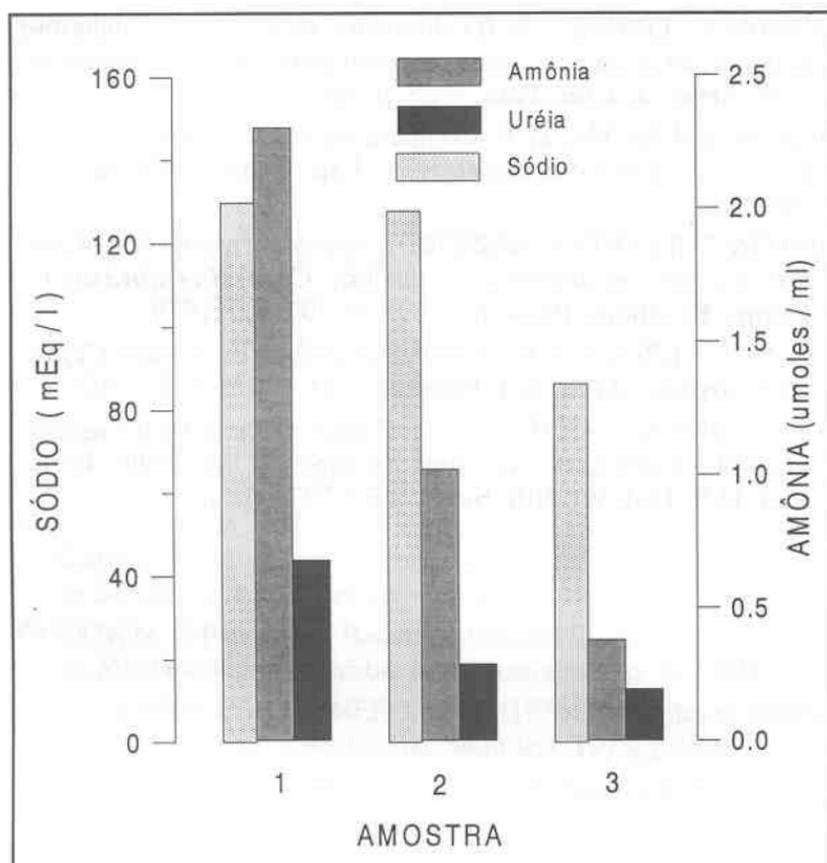


Fig. 1. Variação no teor de  $\text{Na}^+$ , amônia e uréia plasmáticos em *P. mesopotamicus* sob pH 5,0 (amostra 1), pH 7,0 (amostra 2) e pH 9,0 (amostra 3)

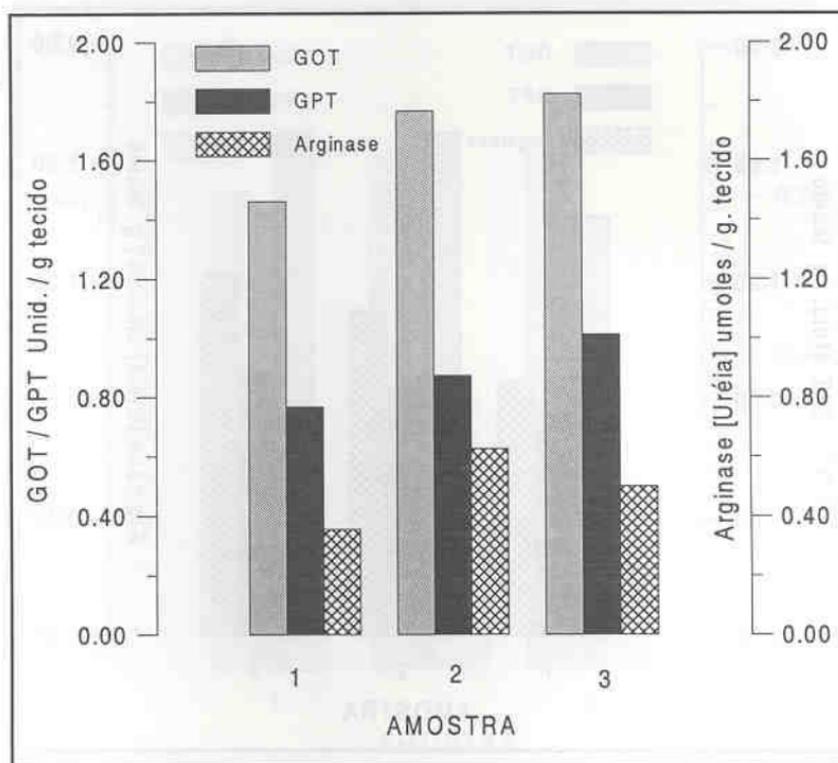


Fig. 2. Atividade da glutâmico oxaloacético transaminase (GOT), glutâmico pirúvico transaminase (GPT) e arginase em fígado de *P. mesopotamicus* sob pH 5,0 (amostra 1), pH 7,0 (amostra 2) e pH 9,0 (amostra 3)

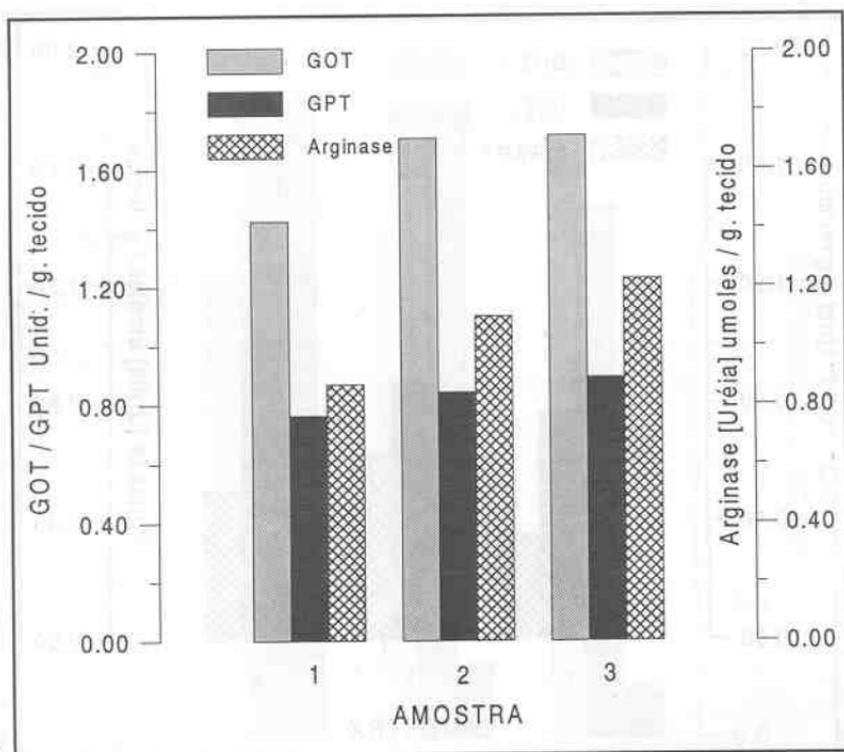


Fig. 3. Atividade da glutâmico oxaloacético transaminase (GOT), glutâmico pirúvico transaminase (GPT) e arginase em rim de *P. mesopotamicus* sob pH 5,0 (amostra 1), pH 7,0 (amostra 2) e pH 9,0 (amostra 3)

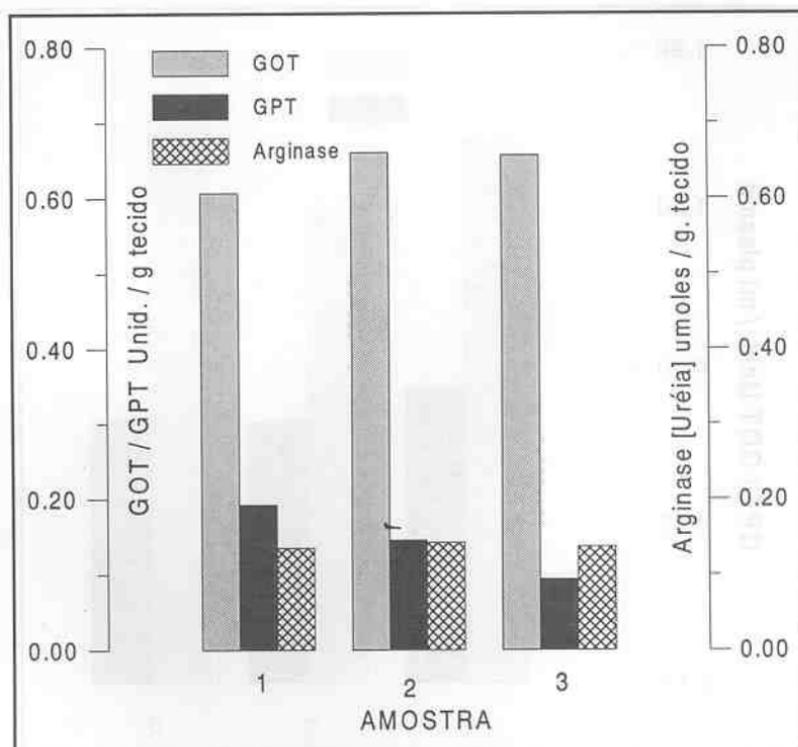


Fig. 4. Atividade da glutâmico oxaloacético transaminase (GOT), glutâmico pirúvico transaminase (GPT) e arginase em brânquia de *P. mesopotamicus* sob pH 5,0 (amostra 1), pH 7,0 (amostra 2) e pH 9,0 (amostra 3)

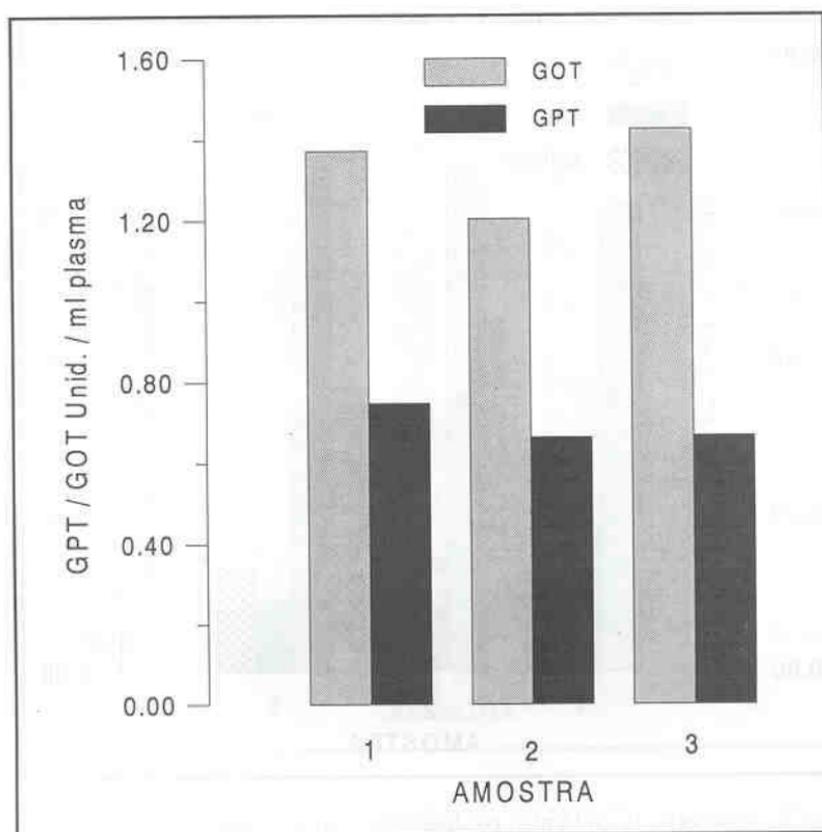


Fig. 5. Atividade da glutâmico oxaloacético transaminase (GOT) e glutâmico pirúvico transaminase (GPT) em plasma de *P. mesopotamicus* sob pH 5,0 (amostra 1), pH 7,0 (amostra 2) e pH 9,0 (amostra 3)