

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NAS PROPRIEDADES CINÉTICAS DA LACTATO DESIDROGENASE DO MÚSCULO EPAXIAL DE *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta**

CLEONI SANTOS CARVALHO¹; RUBENS ROSA²; KIKUE T. SASSAKI³; METRY BACILA

Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz, Ilha do Rei Jorge, Shetlands do Sul.

¹Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal do Paraná, CEP 80.000-970, Curitiba-Pr-Brasil.

²Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR. ³Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, São Paulo.

ABSTRACT - It has been carried out a comparative study on the kinetic properties of the lactate dehydrogenase (L-lactate NAD⁺ oxidoreductase, E.C.1.1.1.27) purified from the epaxial muscle of the tropical fish *Prochilodus scropha* and the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. The following parameters were studied: a. Effect of pH; effect of temperature and values for energy of activation; effect of substrate concentration and the effect of temperature on the Km values.

KeyWords: Lactate dehydrogenase; *Prochilodus scropha*; *Notothenia neglecta*.

RESUMO - Foi levado a efeito um estudo comparativo das propriedades cinéticas da lactato desidrogenase (L-lactato NAD⁺ oxidorreductase, E.C.1.1.1.27) purificada do músculo epaxial do peixe tropical *Prochilodus scropha* e do peixe antártico *Notothenia neglecta*. Os seguintes parâmetros foram estudados: a. Efeito do pH; efeito da temperatura e valores para a energia de ativação; efeito da concentração de substrato e o efeito da temperatura sobre os valores de Km.

Palavras-Chave: Lactato desidrogenase; *Prochilodus scropha*; *Notothenia neglecta*.

Introdução

A láctico desidrogenase (LDH) (L-Lactato: NADH oxidorreductase, E.C.1.1.1.27), é de fundamental importância em processos envolvendo o metabolismo glicídico. Essa enzima catalisa a transformação reversível do lactato para piruvato, com suporte coenzimático do sistema NAD⁺/NADH + H⁺. É essencial para o suprimento de NAD⁺ para a reação da gliceraldeído-fosfato desidrogenase e, desta forma, direcionar a finalização aeróbica ou anaeróbica da via glicolítica, frente às necessidades metabólicas do tecido.

A LDH é um tetrâmero de PM 140.000. Cada subunidade liga-se a uma molécula de coenzima e reage independentemente com o substrato (HECK, 1969). Dois tipos de subunidades estão presentes na proteína oligomérica de LDH e o padrão isoenzimático está relacionado com o tipo de metabolismo de cada tecido: o tipo H (coração) e o tipo M (músculo), de acordo com os órgãos em que foram obtidos (DAWSON *et al.*, 1964). O tipo H (ou tipo B) predomina em tecidos de metabolismo aeróbico, tal como o músculo cardíaco. É composta de 4 subunidades (H₄), sendo inibida por altas concentrações de piruvato (dentro de uma taxa fisiológica) e com baixo K_M para este

substrato. O tipo M (ou tipo A) predomina em tecidos como o músculo esquelético, o qual deriva grande parte de sua energia da glicólise anaeróbica. A isoenzima do músculo esquelético está adaptada para converter altas concentrações de piruvato a lactato apresentando alto K_M e V_{max} elevado para o piruvato (SIDEELL e BELAND, 1980).

O tipo H₄ oxida lactato a piruvato, sendo este utilizado como combustível pelo coração. O metabolismo aeróbico do coração permite que ele encaminhe o piruvato para o ciclo do ácido cítrico. O tipo M₄ opera na direção oposta, convertendo piruvato em lactato para permitir que a glicólise se processe em condições anaeróbicas. As interconversões entre piruvato e lactato são facilitadas por diferenças nas propriedades catalíticas das isoenzimas de LDH em diferentes tecidos.

Em mamíferos e aves, e em alguns peixes teleosteos, existe um terceiro tipo de LDH, denominada de LDH X ou isoenzima C. Em peixes, ela é encontrada no fígado (REHSE e DAVIDSON, 1985), no cérebro e no olho (FITCH, 1988, COPPES *et al.*, 1992) e em ratos, no espermatozóide (SPIELMANN *et al.*, 1973).

As isoenzimas H e M são similares no peso molecular mas diferem grandemente em propriedades físicas, químicas e imunológicas, como também nas propriedades catalíticas e em sua distribuição nos tecidos (VESELL, 1966; VESELL e YIELDING, 1966 e BAILEY e WILSON, 1968).

Com relação aos fatores físicos que

*Com base na Tese de Mestrado de Cleoni Santos Carvalho, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR.

Com auxílio da Programa Antártico Brasileiro - PROANTAR-CNPq.

¹Bolsista de Pós-Graduação do CNPq.

frequentemente variam no ambiente, a temperatura é importante do ponto de vista fisiológico e bioquímico. Segundo HOCHACHKA e SOMERO (1968); GEREZ DE BURGOS *et al.*, (1973); NARITA e HORIUCHI (1979); FITCH (1988); KLYACHKO e OZERNYUK, (1994) e RODRIGUES *et al.*, (1995) o K_M para a LDH aumenta com a elevação da temperatura e tende a ser maior para a enzima de espécies adaptadas a altas temperaturas (YANCEY e SOMERO, 1978; TSUKUDA, 1975; SOMERO, 1981 e OZERNYUK *et al.*, 1994).

Peixes da família Notothenidae são abundantes e amplamente distribuídos nos mares antárticos, sendo o grupo de peixes mais diversificado em relação à espécie, habitat e distribuição. Evidências sugerem que espécies de peixes antárticos tornaram-se isoladas pela convergência circumpolar Antártica durante o Período Terciário e têm evoluído independentemente de outros grupos de teleostes sob pressão seletiva de glaciações sucessivas desde aquele tempo (De WITT, 1971).

O presente trabalho descreve algumas propriedades da LDH do músculo estriado branco de *Notothenia neglecta* e de curimatá, *Prochilodus scropha*. Assim, o objetivo deste trabalho é o de analisar, a nível molecular, os mecanismos bioquímicos de adaptações biológicas experimentados por peixes antárticos em seu ecossistema antártico em comparação com a de peixes das regiões tropicais.

Material e Métodos

A LDH foi obtida e purificada de acordo com CARVALHO (1997) e CARVALHO *et al.* (1998) a partir de músculo estriado branco de exemplares de *Prochilodus scropha*, curimatá, capturados no Centro de Cultivo de Peixes do IBAMA, Pirassununga, São Paulo. Peixes adultos foram levados para o laboratório do Centro de Cultivo, onde foram sacrificados por secção da coluna vertebral. A seguir, o tecido muscular estriado foi dissecado, lavado em solução fisiológica a 4°C, armazenado e mantido a 4°C, e transportado para o Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em isopor contendo gelo seco. O material biológico de *Notothenia neglecta* foi obtido durante a Operação Verão da XIV Expedição Antártica Brasileira. Peixes adultos foram levados para o Laboratório da Estação, onde foram sacrificados por secção da coluna vertebral. A seguir, o tecido muscular estriado foi dissecado, lavado em solução fisiológica a 4°C, armazenado e mantido a 4°C, e transportado para os nossos laboratórios em isopor contendo gelo seco.

Frações de cerca de trinta gramas de músculo estriado congelado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* foram lavadas em solução salina 0,9% e ressuspensas em tampão fosfato 33mM, pH 6,5, contendo $MgCl_2$ 1mM e β ME 0,5 mM. Os tecidos

foram homogeneizados em tampão fosfato pH 6,5, na proporção de 1:4 de tampão em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada K70D, a 4°C, a 10.000 rpm, durante 30 minutos. Os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes, denominados extrato bruto (EB), foram mantidos em temperatura aproximada de 0-4°C até as etapas seguintes de purificação.

Foi adicionado ao EB, para ambas as preparações, sulfato de amônio sólido, lentamente, sob agitação constante, até atingir 70% de saturação. Após agitação de 10 minutos e repouso de uma hora, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sedimento (EB 70%) foi ressuspense no mesmo tampão de homogeneização, em volume suficiente para tanto. O EB 70% foi dialisado contra tampão fosfato 10 mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10%, durante aproximadamente 15 horas, a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (D70%) utilizado nas etapas seguintes.

Nos experimentos que se seguem indica-se como fração D70% a preparação ativa de LDH obtida por precipitação a 70% de saturação de sulfato de amônio, ressuspensa em tampão de homogeneização e dialisada em tampão fosfato 10 mM, pH 6,5 a contendo β ME 1mM e glicerol 10%.

A atividade da LDH foi medida em meio contendo $NADH+H^+$ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, em volume final de 1,0 ml, segundo BERGMAYER e BERN, 1974. A velocidade de oxidação do $NADH+H^+$ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm e à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre $8,0 \pm 2,0^\circ C$ para *Notothenia neglecta*.

Uma unidade (UI) de LDH é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de piruvato ou de lactato por minuto, nas condições de ensaio especificadas. A atividade específica é expressa em UI/mg de proteína.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et al.*, (1951), utilizando-se como padrão protéico a albumina sérica bovina.

Substratos, coenzimas, lactato desidrogenase e outros produtos químicos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA e produtos inorgânicos utilizados foram todos pró-análise.

Para verificar o efeito do pH, a atividade da LDH da fração D70% foi medida em meio de reação já descrito, porém foram utilizadas, para tanto, diferentes concentrações hidrogeniônicas: tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 3,6, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 7,0; tampão fosfato 0,2 M pH 7,8, 8,0, 8,5; tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 8,6 e 9,0. A velocidade de oxidação do $NADH+H^+$ foi acompanhada a 340 nm em espectrofotômetro

BECKMAN DU 640. O efeito do pH sobre o K_M para o piruvato foi determinado sobre a fração D70%, na presença de diferentes concentrações de piruvato: 0,02 a 2,5 mM. A atividade enzimática foi determinada em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0, 7,0 e 8,0.

A medida da energia de ativação sobre a atividade da LDH da fração D70%, foi analisada em meio de reação saturante de piruvato e $\text{NADH}+\text{H}^+$. Como descrito anteriormente, a amostra de LDH foi pré-incubada nas seguintes temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C durante 5 minutos, determinando-se a atividade enzimática após cada incubação nas temperaturas indicadas.

O cálculo da energia de ativação foi realizado segundo a equação de Arrhenius.

$$\text{Log}K = - \frac{E_a}{2,3R} \frac{1}{T} + \text{Log}A$$

onde, K = constante de velocidade específica da reação para uma dada temperatura; E_a = energia de ativação; A = constante particular de cada reação. Uma vez que a velocidade de determinada reação é proporcional a K, assumiu-se como log K o log da velocidade.

A estabilidade da LDH à temperatura foi determinada em meio de reação contendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, em volume final de 1,0 ml. Alíquotas da fração D70% foram incubadas

nas seguintes temperaturas: 5, 20, 30 e 50°C por 5, 10, 20 e 30 minutos, determinando-se a atividade enzimática após cada incubação. A velocidade de oxidação do NADH^++H^+ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm, à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ para *Notothenia neglecta*.

O efeito da temperatura sobre o K_M da LDH para o piruvato foi determinado sobre a fração D70% frente a concentrações de piruvato de 0,02mM-2,5mM. O meio de reação, contendo a amostra da LDH em diluições adequadas, foi mantido nas seguintes temperaturas, 10, 20 e 30°C durante 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada nessas temperaturas após cada incubação, com adição de piruvato de sódio nas concentrações indicadas.

Resultados

Análise do comportamento cinético da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* obtida a partir de purificação parcial foi realizada pelo estudo dos parâmetros que a seguir são tratados. Lactato desidrogenase de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* mostraram pH ótimo em torno de 6,5-7,5 e 6,6-7,0 respectivamente, usando-se para as determinações, tampão TRIS-HCl 0,2 M, tampão citrato-fosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M, nos diferentes valores de pH, de acordo com as Fig. 1 e 2.

Fig 1. Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O meio de reação continha $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM e piruvato de sódio 1,0 mM nos seguintes tampões: tampão fosfato 0,2 M em pH variando de 6,0 a 8,5, tampão TRIS-HCl 0,2 M em pH de 5,2 a 9,0 e tampão citrato-fosfato 0,1 M em pH variando de 3,6 a 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 μl da preparação de LDH contendo 30,18 mg/ml de proteína. A velocidade da oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ foi acompanhada a 340 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, à temperatura de $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$.

Fig 2. Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O meio de reação continha NADH + H⁺ 0,14 mM e piruvato de sódio 1,0 mM nos seguintes tampões: tampão fosfato 0,2 M em pH variando de 6,0 a 8,5, tampão TRIS-HCl 0,2 M em pH de 5,2 a 9,0 e tampão citrato-fosfato 0,1 M em pH variando de 3,6 a 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH, contendo 10,77 mg/ml de proteína. A velocidade da oxidação do NADH + H⁺ foi acompanhada a 340 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, à temperatura de 8,0 ± 2,0°C.

Com relação ao estudo da influência da temperatura sobre a atividade da LDH da fração D70% verificou-se que a elevação da temperatura até 40 °C resultou em atividade máxima da enzima, porém, a 50°C, houve perda de 30% da atividade da enzima de *Prochilodus scropha*. A LDH de *Notothenia neglecta*, por sua vez apresentou atividade máxima em 30°C e

perda de 50% da atividade em 50°C. Os resultados obtidos foram registrados na forma de gráfico de Arrhenius e a energia de ativação foi de 7.591 cal/mol para *Prochilodus scropha* e de 6.567 cal/mol para *Notothenia neglecta*, a curva estabelecida tendo sido linear no intervalo de temperatura abrangido no experimento (Fig. 3).

Fig 3. Determinação da energia de ativação da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. A atividade da LDH foi medida em meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, NADH + H⁺ 0,14 mM, 10 µl da preparação de LDH, contendo 15,40 e 10,67 mg/ml de proteína/ml, respectivamente para *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* e incubado nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de piruvato de sódio (50mM) ao meio de reação na concentração final de 1,0 mM. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH⁺+H⁺ nas temperaturas indicadas.

Os valores de K_M com relação ao pH, nas distintas situações são mostrados na Tab. 1 e indicam a relação que existe entre o pH em tampão fosfato e a velocidade a ação da LDH preparada de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Os valores de K_M com relação à temperatura são mostrados na Tab. 2 e indicam a relação que existe entre a temperatura e a velocidade de ação da LDH preparada de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Tabela 1. Efeito do pH sobre o K_M para piruvato da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10%, por aproximadamente 15 horas em câmara fria. As preparações, assim obtidas, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%), contendo 10,67 e 15,40 mg/ml de proteína para *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*, respectivamente, foram utilizados para o presente estudo. Para as determinações de atividade foi utilizado sistema contendo tampão fosfato 0,1M, NADH+ H^+ 0,14 mM, 10 μ l de LDH em diluições adequadas, piruvato de sódio 0,02-2,5 mM, em diferentes pH 6,0, 7,0 e 8,0.

Constante	<i>Prochilodus scropha</i>			<i>Notothenia neglecta</i>		
	pH	6,0	7,0	8,0	6,0	7,0
Vmax (U/ml)	371,30 ± 41,67	373,26 ± 28,54	483,24 ± 107,35	262,01 ± 4,54	342,01 ± 2,21	313,39 ± 15,16
K_M (mM)	0,048 ± 0,016	0,046 ± 0,011	0,144 ± 0,062	0,044 ± 0,0034	0,153 ± 0,0148	0,277 ± 0,038

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre o K_M para piruvato na atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%), contendo 10,67 e 15,40 mg/ml de proteína para *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*, respectivamente, foram utilizados para o estudo, em meio contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, NADH+ H^+ 0,14 mM, 10 μ l de LDH em diluições adequadas, piruvato de sódio 0,02-2,5 mM. O meio contendo LDH foi mantido durante 5 minutos nas diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C). A reação foi iniciada com a adição do piruvato e a leitura em espectrofotômetro, a 340 nm, nas temperaturas de estudo.

Parâmetros	<i>Prochilodus scropha</i>			<i>Notothenia neglecta</i>		
	Temperatura (°C)					
	10	20	30	10	20	30
Vmax (U/ml)	953,39 ± 19,44	1.423,05 ± 102,92	1.403,82 ± 110,10	569,39 ± 55,35	858,15 ± 81,40	975,06 ± 38,03
K_M (mM)	0,091 ± 0,006	0,13 ± 0,023	0,13 ± 0,029	0,24 ± 0,054	0,31 ± 0,062	0,33 ± 0,035

Discussão

Vários trabalhos são relatados na literatura com enzimas da via glicolítica em peixes antárticos SOMERO e HOCHACHKA, 1968; LOW e SOMERO, 1976; FITCH, 1988; BACILA *et al.*, 1989; FELLER *et al.*, 1991; ZAMORA *et al.*, 1992. Entretanto, estudos bioquímicos em peixes antárticos, com relação à lactato desidrogenase, são limitados a poucos trabalhos (FITCH, 1988;

BACILA *et al.*, 1989 e FELLER *et al.*, 1991; CARVALHO, 1997; CARVALHO *et al.*, 1998).

BACILA *et al.* (1989), realizaram estudos sobre o metabolismo tecidual do “ice-fish” *Chaenocephalus aceratus*, estabelecendo os níveis das enzimas glicolíticas em músculo estriado, músculo cardíaco e encéfalo. Verificaram que o “ice-fish” possui níveis altos de PK, PFK, HK e em particular de LDH em todos os tecidos analisados. Estes mesmos autores verificaram que o “ice-fish”

Chaenocephalus aceratus possui os níveis enzimáticos, inclusive os de LDH, superiores aos de outros peixes antárticos tais como *Notothenia rossii* e *Notothenia neglecta*.

Estes fatos mostram que um estudo mais aprofundado das enzimas da via glicolítica é de fundamental importância para melhor entender o comportamento bioquímico e fisiológico desses animais.

As diferenças na inibição pelo substrato têm sido sugeridas como a base para se distinguir o desempenho fisiológico de isoenzimas da LDH da maioria dos vertebrados. A LDH tipo H tem atividade máxima em baixas concentrações de piruvato sendo fortemente inibida em altas concentrações. O tipo M mantém sua atividade em altas concentrações de piruvato. A inibição da LDH do músculo cardíaco pelo piruvato favorece a completa oxidação de piruvato e lactato pela via oxidativa na mitocôndria, enquanto a LDH do músculo esquelético permite o suprimento rápido de energia via glicólise, convertendo o piruvato que se forma em lactato e liberando-o para o sangue, para ser metabolizado como fonte de energia pelo músculo cardíaco principalmente durante exercícios vigorosos, hipóxia ou durante a sua recuperação (DAWSON *et al.*, 1964; MENDIOLA e DE COSTA, 1991). O mecanismo proposto para inibição da LDH pelo piruvato é a formação do complexo ternário abortivo, LDH-NAD⁺-piruvato, resultando na interação do NAD⁺ com o piruvato e a enzima. A oxidação do NADH⁺+H⁺ para NAD⁺ durante a redução catalisada pela LDH de piruvato para lactato resulta na formação do complexo ternário. Este complexo inibe competitivamente a redução de piruvato pelo NADH⁺+H⁺. A constante de dissociação para o

complexo ternário da LDH do músculo cardíaco é menor do que para a LDH do músculo esquelético, com o resultado de que a LDH do coração é inibida em condições fisiológicas enquanto que a forma muscular esquelética tem significativa atividade.

As concentrações de substrato e de coenzima são fatores importantes no sistema da LDH. A LDH tem habilidade para formar complexos inativos ternários entre a enzima, a coenzima e o substrato, sendo a inibição da LDH o resultado deste complexo. Altas quantidades de NADH⁺+H⁺, induzem uma dissociação do complexo inativo causando reativação da enzima e oxidação do NADH⁺+H⁺; o efeito contrário ocorre se a concentração de NADH⁺+H⁺ diminuir, levando a formação do complexo inativo e portanto a um bloqueio da oxidação do NADH⁺+H⁺. O complexo ternário tem papel regulador no metabolismo do piruvato-lactato (FROMM, 1963; EVERSE *et al.*, 1971; NARITA e HORIUCHI, 1979; ARRIAGA *et al.*, 1982 e HAMM, 1990).

Os efeitos da temperatura sobre a estrutura das enzimas e a sua função sempre foram do interesse de pesquisadores da área biológica. Na determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da LDH do músculo de *Prochilodus scropha* esta apresentou-se estável em 5^oC aumentando a atividade após 20 minutos de incubação e decrescendo sua atividade em 50^oC após 5 minutos. Em 30^oC houve considerável aumento da atividade da LDH de aproximadamente 50%. Lactato desidrogenase de *Notothenia neglecta* apresentou estabilidade em 5^oC, decrescendo sua atividade com o aumento da temperatura. Na temperatura de 20^oC a LDH apresentou o dobro da atividade em relação a 5^oC (Figs. 4 e 5).

Fig 4. Estabilidade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* em função da temperatura. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1 M, piruvato de sódio 1,0 mM, NADH + H⁺ 0,14 mM em pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH pré-incubada às temperaturas de 5, 20, 30 e 50°C por 5, 10, 20 e 30 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H⁺ a 25,0 ± 2,0°C.

Fig 5. Estabilidade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* em função da temperatura. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1 M, piruvato de sódio 1,0 mM, NADH+H⁺ 0,14 mM em pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH pré-incubada às temperaturas de 5, 20, 30 e 50°C por 5, 10, 20 e 30 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H⁺ a 8,0 ± 2,0°C.

GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973; 1974), com músculo esquelético e cardíaco de cobra *Bothrops neuwiedii* e de bovino, verificaram que em diferentes concentrações de piruvato e temperatura, a atividade da LDH aumenta e chega à atividade máxima em pequenas concentrações de piruvato (0,01-0,05 mM) a 10°C do que em alta temperatura, 35°C. Para ambas as espécies estudadas, os valores de K_M diminuíram com o decréscimo da temperatura, a redução tem sido maior para a LDH de *Bothrops neuwiedii*. Não houve inibição da atividade da LDH-A4 em altas concentrações de lactato (200mM). A 10°C, a atividade com 200mM de lactato foi de 60% para a soenzima LDH-B4 de ambas as espécies e 77% para as isoenzimas de *Bothrops neuwiedii* e 80% para bovino em 35°C. Os valores de K_M para lactato de isoenzimas B4 para ambas as espécies não foram afetados pela temperatura.

SHAKLEE *et al.* (1977), analisaram a atividade da LDH de diferentes tecidos de *Lepomis cyanellus* “green sunfish” aclimatado em 5 e 25°C. A atividade da LDH do músculo cardíaco, olho, cérebro e fígado permaneceu constante nas diferentes temperaturas. Entretanto, a atividade da LDH do músculo esquelético aumentou com a elevação da temperatura.

A energia de ativação para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* foi medida entre 10 e 50°C e calculada de acordo com a equação de Arrhenius.

Outro fator a ser considerado é o efeito da concentração hidrogênionica. A LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* mostra características peculiares a cada uma delas.

A atividade da LDH parcialmente purificada de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, com relação a diferentes pH, foi máxima em torno de 7,5 e 6,5 a 7,0, respectivamente (Fig. 1 e 2). Estes resultados estão de acordo com o observado por THÉBAULT *et al.*, (1981); SASAKI *et al.*, (1989); ALMEIDA-VAL *et al.*, (1991) e SASSAKI *et al.*, (1994). O K_M para piruvato em *Prochilodus scropha* aumentou com o aumento do pH. O valor mínimo do K_M foi determinado em pH 7,0, a atividade máxima tendo sido em torno de 0,15-0,20 mM de piruvato, conforme experimentos observados por HOCHACHKA e LEWIS (1971); GEREZ DE BURGOS *et al.*, (1973); WILSON (1977); DOUMEN *et al.*, (1986) e MARTÍNEZ *et al.*, (1994). Com relação ao K_M para piruvato em *Notothenia neglecta* este decresceu consideravelmente com o aumento do pH. Em pH 6,0 não houve inibição da LDH com crescentes concentrações de piruvato, a atividade da LDH tendo sido máxima com 0,75 mM de piruvato em pH 7,0 e 8,0.

HOCHACHKA (1965), analisou LDH de fígado e de músculo esquelético de “goldfish” *Carassius carassius* em pH 8,0, a velocidade da reação com o nível de substrato mostrou uma hipérbole para a LDH do fígado e músculo. Em pH 7,15, a velocidade da reação aumentou com o aumento de piruvato, mas a forma da curva não se alterou; em pH 9,05 e 10,15 a curva apresentou-se sigmoidal.

GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973), compararam a LDH do músculo esquelético e cardíaco de cobra *Bothrops neuwiedii* com a de bovino (Sigma), em diferentes pHs 6,0, 7,4 e 8,0, o

K_M a velocidade de reação aumentando com a elevação do pH sendo que a LDH de *Bothrops neuwiedii* apresentou-se mais sensível; em temperatura constante, o K_M para a LDH de *Bothrops neuwiedii* foi maior entre 7,4 e 8,0 do que entre 6,0 e 7,4. MENDIOLA e DE COSTA (1991), verificaram o efeito do pH (7,0, 7,4 e 8,0) em função da temperatura (15, 20 e 30 °C) na LDH do músculo cardíaco de *Rana perezi* e *Bufo calamita* de diferentes comportamentos e habitats. O K_M para piruvato de ambas as espécies aumentou com o pH e com a temperatura, sendo que a velocidade máxima variou somente com a temperatura. Com relação ao K_M para lactato este diferiu com a temperatura e variação do pH para ambas as espécies. O K_M para lactato de *Rana perezi* aumentou com relação à temperatura mas decresceu com relação à elevação do pH enquanto que *Bufo calamita* não variou. A velocidade máxima em *Rana perezi* aumentou com a temperatura e em *Bufo calamita* a velocidade máxima variou com a temperatura e com o pH.

COPPEs *et al.*, (1992), verificaram o efeito da temperatura e de pH sobre a LDH do músculo esquelético branco de três espécies da família Scianidae, *Micropogonias furnieri*, *Cynoscion striatus* e *Roncador stearnsii*. O K_M para piruvato permaneceu constante em pH 6,3 a 7,2 nas temperaturas estudadas (20, 25 e 30 °C). Entretanto com o aumento do pH (7,6 e 8,3) os valores de K_M aumentam cerca de oito vezes, nas diferentes temperaturas, para as espécies analisadas.

MARTÍNEZ *et al.*, (1994), estudaram a LDH do músculo branco de duas espécies de peixes euritérmicos *Cynoscion arenarius* e *Cynoscion nebulosus*. O K_M para piruvato na espécie *Cynoscion nebulosus* aumentou com a elevação do pH e da temperatura enquanto que para *Cynoscion arenarius* permaneceu constante em pH 6,3 e 6,8 nas diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C), aumentando consideravelmente em pH 7,6, nas temperaturas acima de 15 °C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SCHWANTES, M.L.B.; VAL, A.L. LDH Isozymes in Amazon fish. II. Temperature and pH effects on LDH kinetic properties from *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae); *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**(1): 79-86, 1991.
- ARRIAGA, D.; SOLER, J.; CADENAS, E. Influence of pH on the allosteric properties of lactate dehydrogenase activity of *Pleycomyces blakesleanus*. *Biochem. J.* **203**:393-400, 1982.
- BACILA, M.; ROSA, R.; RODRIGUES, E.; LUCHIARI, P.H.; ROSA, C.D. Tissue metabolism of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* LOENBERG. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**(2):313-318, 1989.
- BAILEY, G.S.; WILSON, A.C. Homologies between isoenzymes of fishes and those of higher vertebrates. *J. Biol. Chem.* **243**(22):5843-5853, 1968.
- BERGMEYER, H.V.; BERN, T.E. Lactate desidrogenase U.V. assay with pyruvate kinase and LDH. In "Bergmeyer H.V., Ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed. New York, Verlag-Chemie, 1974.
- CARVALHO, C.S. Purificação, características cinéticas e isoenzimas da lactato desidrogenase (L-lactato NAD⁺ oxidorreductase, E.C.1.1.1.27) do músculo epaxial de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) e de *Notothenia neglecta* (Pisces, Teleostei). Tese de mestrado em Fisiopatologia e Comportamento de Organismos Aquáticos, UFPR, 1997.
- CARVALHO, C.S.; ROSA, R.; SASSAKI, K.T.; BACILA, M. Purificação e isoenzimas da lactato desidrogenase do músculo epaxial de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*. *Arch. Vet. Scienc.* **3** (1): 65-72, 1998.
- COPPEs, Z.; MARTÍNEZ, G.; HIRSCHHORN, M. pH and Temperature effects on the Km values of muscle Lactate Dehydrogenase isozyme LDH-A₄ from fishes of the family Scianidae (Perciformes); *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**(4):869-874, 1992.
- DAWSON, D.M.; GOODFRIEND, T.L.; KAPLAN, N.O. Lactic dehydrogenases: functions of the two types. Rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. *Science.* **207**:769-770, 1964.
- DE WITT, H.H. Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. *Am. Geogr. Soc. Antarct. Map Folio Ser.* **15**:1-10, 1971.
- DOUMEN, C.; D'SUZE, G.; VERHEYEN, E.; BLUST, R. Temperature and pH effects on the total white muscle LDH of *Oreochromis niloticus* (Pisces; Cichlidae); *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**(2): 441-444, 1986.
- EVERSE, J.; BARNETT, R.E.; THORNE, C.J.R.; KAPLAN, N.O. The formation of ternary complexes by diphosphopyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**:444-460, 1971.
- FELLER, G.; PAULY, J.P.; O'CARRA, P.; GERDAY, C. The lactate dehydrogenase of the icefish heart: biochemical adaptations to hypoxia tolerance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1079, **3**:343-347, 1991.
- FITCH, N.A. Lactate dehydrogenases in Antarctic and temperate fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 4: 671-676, 1988.
- FROMM, H.J. Determination of dissociation constants of coenzymes and abortive ternary complexes with rabbit muscle lactate dehydrogenase from fluorescence measurements. *J. Biol. Chem.* **238**, 9:2938-2944, 1963.
- GEREZ DE BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; GUTIERREZ, M.; BLANCO, A. Effect of temperature upon catalytic properties of lactate dehydrogenase isoenzymes from a poikilotherm. *Biochim. Biophys. Acta.* **315**:250-258, 1973.
- GEREZ DE BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; BLANCO, A. Effect of temperature upon inhibition by substrate of lactate dehydrogenase isoenzymes from a poikilotherm. *Biochim. Biophys. Acta.* **341**:505-510, 1974.
- HAMM, R. Lactatdehydrogenase und ihre bedeutung in der fleischforschung. *Fleischwirtschaft.* **70**, **11**: 1336-1339, 1990.

- HECK, H. d'A. Porcine heart lactate dehydrogenase optical rotatory dispersion, thermodynamics, and kinetics of binding reactions. *J. Biol. Chem.* **244**:4375-4381, 1969.
- HOCHACHKA, P.W. Isozymes in metabolic adaptation of a poikilotherm: subunit relationships in lactic dehydrogenases of goldfish; *Arch. Biochem. Biophys.* **111**:96-103, 1965.
- HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. The adaptation of enzymes to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* **27**: 659-668, 1968.
- HOCHACHKA, P.W.; LEWIS, J.K. Interacting effects of pH and temperature on the Km values for fish tissue lactate dehydrogenases. *Comp. Biochem. Physiol.* **39B**:925-933, 1971.
- KLYACHKO, O.S.; OZERNYUK, N.D. The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from embryos of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**(4):593-595, 1994.
- LOW, P.; SOMERO, G. Adaptation of muscle pyruvate kinase to environmental temperatures and pressures. *J. Exp. Zool.* **198**:1-11, 1976.
- LOWRY, D.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275, 1951.
- MARTINEZ, G.; BEHRENS, P.; COPPES, Z. pH and temperature influences on the Km values of LDH-A4 from white muscles of two eurythermal Scianidae fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**(4):645-648, 1994.
- MENDIOLA, P.; DE COSTA, J. The effects of temperature and pH on the kinetic properties of heart muscle lactate dehydrogenase from anuran amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**(4): 529-534, 1991.
- NARITA, J.I.; HORIUCHI, S. Effect of environmental temperature upon muscle lactate dehydrogenase in the crayfish, *Procambarus clarki* GIRARD. *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**:249-253, 1979.
- OZERNYUK, N.D.; KLYACHKO, O.S.; POLOSUKHINA, E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* **107 B**(1):141-145, 1994.
- REHSE, P.H.; DAVIDSON, W.S. Purification and properties of a C-type isozyme of lactate dehydrogenase from the liver of the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**:145-150, 1985.
- RODRIGUES, E.; ROSA, R.; BACILA, M. The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from the epaxial muscle of the Antarctic fish. *Notothenia gibberifrons* Lonnberg. *Arq. Biol. Tecnol.* **38**(4):1231-1236, 1995.
- SASAKI, T.; HYODO-TAGUCHI, Y.; IUCHI, I.; YAMAGAMI, K. Purification and partial characterization of the muscle LDH-A4 and -B4 isozymes and the respective subunits of the fish, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**1:11-20, 1989.
- SASSAKI, K.T.; ROSA, C.D.; CERQUEIRA CÉSAR, M.; ROSA, R. Kinetic aspects of rat (*Rattus norvegicus albinus*) submandibular glands lactic dehydrogenase. *Arq. Biol. Tecnol.* **37**, 2:333-343, 1994.
- SHAKLEE, J.B.; CHRISTIANSEN, J.A.; SIDELL, B.D.; PROSSER, C.L.; WHITT, G.S.; Molecular aspects of temperature acclimation in fish: contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. *J. Exp. Zool.* **201**:1-20, 1977.
- SIDELL, B.D.; BELAND, K.F. Lactate dehydrogenase of Atlantic hagfish: Physiological and evolutionary implications of a primitive heart isozyme. *Science.* **207**:769-770, 1980.
- SOMERO, G.N. pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar. Biol. Letters.* **2**:163-178, 1981.
- SOMERO, G.N.; HOCHACHKA, P.W. The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinase of the rainbow trout and the Antarctic fish *Trematomus bernachii*. *Biochem. J.* **110**:395-400, 1968.
- SPIELMANN, H.; ERICKSON, R.P.; EPSTEIN, C.J. The separation of lactate dehydrogenase x from other lactate dehydrogenase isozymes of mouse testes by affinity chromatography. *FEBS.Lett.* **35**, **1**:19-23, 1973.
- STRAUB, F.B. Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. *Biochem. J.* **34**:483-486, 1940.
- THÉBAULT, M.T.; BERNICARD, A.; LENNON, J.F. Lactate dehydrogenase from the caudal muscle of the shrimp *Palaemon serratus*: Purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**:65-70, 1981.
- TSUKUDA, H.; Temperature dependency of the relative activities of liver lactate dehydrogenase isozymes in goldfish acclimated to different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* **52B**:343-345, 1975.
- VESELL, E.S. pH Dependence of lactate dehydrogenase isozyme inhibition by substrate. *Nature.* **5034** **23** : 421-422, 1966.
- VESELL, E.S.; YIELDING, L. Effects of pH, ionic strength, and metabolic intermediates on the rates of heat inactivation of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc. N.A.S.* **56**:1317-1324, 1966.
- WILSON, T.L. Interrelations between pH and temperature for the catalytic rate of the M₄ isozyme of lactate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Arch. Biochim. Biophys.* **79**:378-390, 1977.
- YANCEY, P.H.; SOMERO, G.N. Temperature dependence of intracellular pH: Its role in the conservation of pyruvate apparent Km values of vertebrate lactate dehydrogenases. *J. Comp. Physiol.* **125**:129-134, 1978.
- ZAMORA, J.M.; ROSA, R.; ROSA, C.D.; BIANCONCINI, M.S.C.; BACILA, M. Purification and properties of pyruvate kinase from the striated muscle of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* Loenbergl.; *Int. J. Biochem.* **24**, **11**:1833-1840, 1992.