



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

**(Na⁺, K⁺)-ATPase branquial e a osmorregulação em
crustáceos: efeito da salinidade na expressão e características
cinéticas da enzima de *Callinectes ornatus* Ordway, 1863
(Crustacea, Portunidae).**

DANIELA PEREIRA GARÇON

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2010



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

**(Na⁺, K⁺)-ATPase branquial e a osmorregulação em
crustáceos: efeito da salinidade na expressão e características
cinéticas da enzima de *Callinectes ornatus* Ordway, 1863
(Crustacea, Portunidae).**

DANIELA PEREIRA GARÇON

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

Ribeirão Preto-SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP**

Garçon, Daniela Pereira

(Na⁺, K⁺)-ATPase branquial e a osmorregulação em crustáceos: efeito da salinidade na expressão e características cinéticas da enzima de *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae).

Ribeirão Preto, 2010.

191 pág.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Leone, Francisco de Assis.

1. (Na⁺, K⁺)-ATPase.
2. *Callinectes ornatus*.
3. Aclimação.
4. Osmorregulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Pereira Garçon

(Na⁺, K⁺)-ATPase branquial e a osmorregulação em crustáceos: efeito da salinidade na expressão e características cinéticas da enzima de *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae).

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de DOUTOR em
CIÊNCIAS.

Área de concentração: QUÍMICA.

Aprovado em: ____/ ____/ ____

Banca examinadora

Profº(a) Drº (a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº(a)Drº(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

*Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.*

*Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.*

*Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...*

*Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.*

*Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.*

*E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.*

*"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura".*

FERNANDO PESSOA

Dedico

A minha filha Emanuele

Meu maior TESOURO!

A princesinha que me torna a pessoa mais feliz,

apenas com um sorriso.

Agradeço a Deus por você existir em minha vida.

Que seu caminho seja repleto de realizações e conquistas.

AMO VOCÊ!

“É um amor pobre aquele que se pode medir”

William Shakespeare

A minha mãe, Nahir

Que com muito amor e carinho

Doou parte de seus sonhos, de forma incondicional para que eu pudesse conquistar os meus Sonhos e ser o “*Ser Humano*” que sou hoje.

Obrigado e que Deus a abençoe.

Ao meu marido Márcio,

Sempre tão presente, estive do meu lado

Apoiando-me e mostrando-me a grandeza da vida em seus gestos e palavras.

Tentando sempre tornar minha vida mais fácil.

Obrigado, *Te Amo!*

Prof. Dr. Francisco de Assis Leone,

Agradeço por seu precioso tempo dedicado a minha formação, também por acreditar no meu potencial e me apoiar nos momentos não tão fáceis.

“Uns são homens;

Alguns são professores;

Poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se;

Aos segundos, respeita-se;

Aos últimos, segue-se.

Se hoje enxergo longe, é porque fui colocada em ombros de gigantes!”

Autor desconhecido

Agradecimentos

A Deus, por nunca me desamparar.

Ao Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder por disponibilizar seu laboratório para a realização das análises moleculares, como também pela co-orientação.

Ao Sergio Vicente de Azevedo, pela orientação na realização e análise dos experimentos moleculares.

Ao Prof. Dr. John Campebell McNamara pela colaboração científica e dosagem da osmolalidade da hemolinfa.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto e seus alunos que contribuíram na coleta dos animais.

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira pela colaboração científica.

A Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes, pela colaboração científica.

Aos colegas e amigos do laboratório Sandra, Kelly, Flávio, César, Raquel, João Carlos, Luana, Rômulo, Malson, Juliana, Douglas e aos colegas dos laboratórios de bioquímica do departamento de química, que conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

A Ivana Ap. Borin, Nilton R. Alves e Victor, tanto pela dedicação e suporte técnico, quanto pela profunda prova de companheirismo recebida durante esse período.

Ao técnico Valdir, pela ajuda na dosagem de íons na hemolinfa.

Aos meus familiares pelo apoio, incentivo, confiança e amor. Muito obrigado por vocês existirem na minha vida, amo todos vocês.

Aos meus amigos Andreza, Daniela Zancanela, Pitião, Carla, Marcela, Mariana e Juliana pela grande amizade e por todos os momentos compartilhados. Sem amigos não há felicidade.

A Lâmia, Isabel, André, Sonia O., Maria Inês, Sonia M. e Denise pela eficiência, atenção e paciência dedicadas.

A todos os Docentes e Funcionários da Universidade de São Paulo do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

A todos que contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (processo nº 06/56759-1).

ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5' difosfato

ATP: adenosina 5' trifosfato

ATPase: adenosina 5' trifosfatase

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

Da: Dalton

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAF: 3-fosfogliceraldeído

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_I : constante de inibição

$K_{0,5}$: constante de dissociação aparente

LDH: lactato desidrogenase

n_H : número de Hill

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NBT: nitroblue tetrazolium

PCR: reação em cadeia da polimerase

P_i : fosfato inorgânico

PQ: piruvato quinase

PNPP: p-nitrofenilfosfato

PNPPase: p-nitrofenilfosfatase

qRT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

U: Unidade de atividade enzimática

v: velocidade inicial

V: velocidade máxima

Resumo

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente no tecido branquial dos crustáceos osmorreguladores é um componente essencial do sistema de regulação iônica e osmótica desses animais, apresentando também um papel relevante no processo de excreção ativa de NH_4^+ através do tecido branquial dos crustáceos.

Uma fração microsomal rica em $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi preparada por centrifugação diferencial a partir de um homogeneizado do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a salinidades de 21 e 33‰. A redistribuição da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em frações de membrana de diferentes densidades, sugere que a aclimação a diferentes salinidades altera a composição da membrana.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes revela que houve uma variação no perfil protéico durante a aclimação. A presença de uma única banda imunorreativa ($\text{Mr} \sim 109 \text{ kDa}$) detectada na análise por Western blot sugere a presença de uma única isoforma da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. A proporção relativa desta subunidade nos microsomas de animais aclimatados a 21‰ é cerca de 2,5 vezes maior que a observada a 33‰.

A atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *C. ornatus* aclimatado à salinidade 21‰ é aproximadamente 2,5 vezes maior comparada ao animais aclimatados a 33‰. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ hidrolisou o PNPP ($V = 69,2 \pm 2,8 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 2,3 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) através de interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). A modulação da enzima pelos íons magnésio ($V = 70,1 \pm 3,0 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,88 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$), potássio ($V = 69,6 \pm 2,7 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,6 \pm 0,07 \text{ mmol L}^{-1}$) e amônio ($V = 90,8 \pm 4,0 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 9,2 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) ocorreu através de interações sítio-sítio. Os íons sódio atuaram como inibidores da atividade K^+ -fosfatase da enzima ($K_i = 9,2 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e a ouabaína inibiu cerca de 70% da atividade PNPPase, independentemente da presença de íons amônio.

A atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ é estimulada pelo PNPP de acordo com uma única curva de saturação monofásica envolvendo interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$), com $V = 29,1 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,30 \pm 0,06 \text{ mmol L}^{-1}$. Os íons magnésio estimularam a atividade até um valor máximo de $V = 27,8 \pm 1,3 \text{ U mg}^{-1}$ com $K_{0,5} = 1,00 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ tendo sido observadas interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). A estimulação pelo K^+ ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,9$),

$V = 28,0 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 2,4 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Uma única curva de estimulação também foi observada para NH_4^+ , com $V = 32,2 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 1,2 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $n_H = 2,2$. Os íons sódio atuaram como inibidores da atividade K^+ -fosfatase da enzima ($K_i = 4,7 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e a ouabaína inibiu cerca de 80% a atividade PNPPase independentemente da presença de íons amônio.

A atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi estimulada sinergisticamente pelos íons potássio e amônio, tanto para *C. ornatus* aclimatado a 21‰ como a 33‰.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente na fração microsomal de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, hidrolisou o ATP de acordo com cinética de Michaeliana apresentando $K_M = 50,0 \pm 2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $V = 187,7 \pm 7,1 \text{ U mg}^{-1}$. A modulação da atividade da enzima pelos íons magnésio ($V = 183,5 \pm 6,7 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,27 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), sódio ($V = 175,9 \pm 6,3 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 4,2 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), potássio ($V = 181,8 \pm 6,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,0 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) e amônio ($V = 240,7 \pm 11,2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 4,4 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) ocorreram através de interações sítio-sítio. Também foi observado que, na presença de concentrações crescentes de íons amônio, a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelos íons potássio acarretou um aumento de 32% na atividade específica da enzima. A ouabaína inibiu cerca de 88% da atividade ATPase com $K_i = 74,5 \pm 0,22 \text{ } \mu\text{M}$, sugerindo a presença de 12% de outras ATPase, sendo 5% de ATPase do tipo F, 3% de K^+ -ATPase e 3% de V-ATPase.

Para *C. ornatus* aclimatado a 33‰ a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial hidrolisou o ATP obedecendo cinética Michaeliana, com $V = 76,2 \pm 3,5 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_M = 46,0 \pm 1,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por Mg^{2+} ($V = 74,5 \pm 3,1 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 0,33 \pm 0,16 \text{ mmol L}^{-1}$), K^+ ($V = 76,4 \pm 3,3 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 1,03 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$), Na^+ ($V = 76,4 \pm 3,0 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 5,3 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e NH_4^+ ($V = 98,9 \pm 3,9 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 4,1 \pm 0,15 \text{ mmol L}^{-1}$) ocorreu de acordo com cinética cooperativa. A ouabaína inibiu cerca de 86% da atividade ATPase total, com $K_i = 114,9 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *C. ornatus* aclimatado em ambas as salinidades foram estimuladas sinergisticamente por K^+ e NH_4^+ em torno de 30%. Na presença de concentrações crescente de NH_4^+ , a afinidade da enzima por K^+ foi aumentada em 187-vezes para o animal aclimatado a 33‰ e 5% para o 21‰.

A atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *C. ornatus* foi inibida na presença de poliaminas e, a espermidina apresentou uma maior inibição quando comparada a espermina. A presença de poliamina no meio reacional afeta não só a

velocidade máxima, como também diminui a afinidade da enzima pelo ATP e aumenta para Na^+ .

C. ornatus hiporregula a osmolalidade da hemolinfa quando aclimatado durante 10 dias em salinidade de 33‰ ($\Delta=192 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) mas é isosmótico depois de aclimatado durante 15 dias a salinidade de 21‰. Além disso, a concentração de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , estimada no animal aclimatado a salinidade de 15‰ durante 15 dias não retorna aos valores iniciais quando o animal está aclimatado à salinidade de 33‰ ($\Delta=65\text{--}80\%$).

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase nas brânquias posteriores de *C. ornatus* diminuem logo após a exposição a meio externo diluído, recuperando a atividade inicial 1 dia após a transferência, onde o máximo de atividade é observado quando o animal permanece nessa nova salinidade por 10 dias.

A expressão relativa da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase é mais significativa 5 horas após a transferência, aumentando em 24 horas, diminuindo até o valor inicial em 48 horas e aumentando novamente. A análise da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase para as brânquias separadas, revelou que a atividade é 2,5 vezes maior nos animais aclimatados a 21‰ e, embora a atividade tenha aumentado na mesma proporção, foi verificado que na 6ª brânquia a atividade é aproximadamente 1,4 vezes maior que a da 7ª brânquia. De maneira interessante, porém contrastante, foi observada uma concentração de (Na^+ , K^+)-ATPase maior na 7ª brânquia comparada a 6ª brânquia em ambas as salinidades.

Abstract

(Na⁺, K⁺)-ATPase present in gill tissue of osmoregulatory crustaceans is an essential component of their osmotic and ionic regulation system, and also have a relevant role in the active excretion de NH₄⁺ through the gill crustacean tissue.

A (Na⁺, K⁺)-ATPase-rich microsomal fraction was prepared by differential centrifugation from *Callinectes ornatus* acclimated to 21 and 33 ‰ homogenized gill tissues. The (Na⁺, K⁺)-ATPase redistributes into membrane fractions of different densities, suggesting that altered membrane composition results from salinity acclimation.

The SDS-PAGE revealed different migration patterns. The use of the $\alpha 5$ monoclonal antibody, against the α subunit, revealed the presence of an unique protein band of Mr around 109 kDa corresponding to the (Na⁺, K⁺)-ATPase, and suggesting the presence of a single isoform. Crabs acclimated to 21‰ shown a relative proportion of this protein is 2.5-fold greater than those acclimated to 33‰.

K⁺-phosphatase activity of microsomal gill tissue of *C. ornatus* showed increase 2.5 fold, for crabs acclimated to 21‰ compared to those acclimated to 33‰ salinity.

(Na⁺, K⁺)-ATPase of *C. ornatus* acclimated to 21‰ hydrolyzed PNPP ($V = 69.2 \pm 2.8 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 2.3 \pm 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$) through site-site interactions ($n_H = 1.7$). The modulation of the enzyme by magnesium ($V = 70.1 \pm 3.0 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 0.88 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$), potassium ($V = 69.6 \pm 2.7 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.6 \pm 0.07 \text{ mmol L}^{-1}$) and ammonium ions ($V = 90.8 \pm 4.0 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 9.2 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1}$) followed cooperative kinetics. On the other hand, sodium ions inhibited PNPPase activity of (Na⁺, K⁺)-ATPase with $K_I = 9.2 \pm 0.4 \text{ mmol L}^{-1}$. Ouabain also inhibited up to 70% the total activity PNPPase independent of the presence of ammonium ions.

(Na⁺, K⁺)-ATPase of *C. ornatus* acclimated to 33‰ hydrolyzed PNPP ($V = 29.1 \pm 1.4 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.3 \pm 0.06 \text{ mmol L}^{-1}$) through site-site interactions ($n_H = 1.4$). The modulation of the enzyme by magnesium ($V = 27.8 \pm 1.3 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.00 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$), potassium ($V = 28.0 \pm 1.4 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 2.4 \pm 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$) and ammonium ($V = 32.2 \pm 1.5 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.2 \pm 0.4 \text{ mmol L}^{-1}$) followed cooperative kinetics. However, sodium ions inhibited PNPPase activity of (Na⁺, K⁺)-ATPase with $K_I = 4.7 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$. Ouabain also inhibited up to 80% the total activity PNPPase independent of the presence of ammonium ions.

K^+ -phosphatase activity was synergistically modulated by K^+ and NH_4^+ ions for *C. ornatus* acclimated to 21 and 33‰. For *C. ornatus* acclimated to 21‰, the hydrolysis of ATP by (Na^+, K^+) -ATPase followed Michaelis-Menten kinetics with $K_M = 50.0 \pm 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $V = 187.7 \pm 7.1 \text{ U mg}^{-1}$, while enzyme modulation by magnesium ($V = 183.5 \pm 6.7 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 0.27 \pm 0.01 \text{ mmol L}^{-1}$), sodium ($V = 175.9 \pm 6.3 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 4.2 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$), potassium ($V = 181.8 \pm 6.9 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.0 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1}$) and ammonium ions ($V = 240.7 \pm 11.2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0.5} = 4.4 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$) occurred through site-site interactions. Interestingly, the stimulation of (Na^+, K^+) -ATPase activity by potassium ions in the presence of increasing concentration of ammonium ions resulted in a 32% higher specific activity. Ouabain inhibited approximately 88% the activity (Na^+, K^+) -ATPase with $K_I = 74.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, suggesting the presence of about 12% of ATPases other than the (Na^+, K^+) -ATPase. Among these other ATPases, around 5% corresponded to a F-type ATPase, 3% to a K^+ -ATPase and 3% to a V-ATPase.

The (Na^+, K^+) -ATPase present in microsomal fractions of gill tissue of 21‰-acclimated *C. ornatus* hydrolyzed ATP according Michaelis-Menten kinetics with $K_M = 50,0 \pm 2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $V = 187,7 \pm 7,1 \text{ U mg}^{-1}$. However, enzyme modulation by magnesium ($V = 183,5 \pm 6,7 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0,5} = 0,27 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), sodium ($V = 175,9 \pm 6,3 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0,5} = 4,2 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), potassium ($V = 181,8 \pm 6,9 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0,5} = 1,0 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) e ammonium ions ($V = 240,7 \pm 11,2 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0,5} = 4,4 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) followed site-site interaction kinetics. In the presence of increasing concentrations of ammonium ions, the stimulation of (Na^+, K^+) -ATPase activity by potassium ions resulted in a 32% increase of enzyme specific activity. Ouabain inhibited around 88% of total ATPase activity with $K_I = 74,5 \pm 0,22 \mu\text{M}$, suggesting the presence of 12% of ATPases other than (Na^+, K^+) -ATPase: 5% of F_0F_1 -ATPase, 3% of K^+ -ATPase e 3% de V-ATPase.

For *C. ornatus* acclimated to 33‰, the hydrolysis of ATP by (Na^+, K^+) -ATPase followed Michaelis-Menten kinetics with $K_M = 46.0 \pm 1.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $V = 76.2 \pm 3.5 \text{ U mg}^{-1}$, while enzyme modulation by magnesium ($V = 74.5 \pm 3.1 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 0.33 \pm 0.16 \text{ mmol L}^{-1}$), sodium ($V = 76.4 \pm 3.0 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 5.3 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$), potassium ($V = 76.4 \pm 3.3 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.03 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1}$) and ammonium ions ($V = 98.9 \pm 3.9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0.5} = 4.1 \pm 0.15 \text{ mmol L}^{-1}$) occurred through site-site

interactions. Ouabain inhibited approximately 86% the activity $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, with $K_i = 114.9 \pm 5.6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

In both salinities studied, the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ was synergistically stimulated by K^+ and NH_4^+ ions, up to 30%. In presence of increasing NH_4^+ concentrations, the affinity of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ by K^+ , increased around 187 fold for crabs acclimated to 33‰ and only 5% for crabs acclimated to 21‰.

Polyamines inhibited $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity of *C. ornatus*, and spermidine is a more efficient inhibitor than spermine. The presence of polyamines affects velocity, increases the affinity for ATP, but decreases that for Na^+ .

Callinectes ornatus hyporegulates hemolymph osmolality when acclimated for 10 days to 33‰ ($\Delta = 192 \text{ mOsm kg H}_2\text{O}^{-1}$), but is essentially isosmotic after 15-days acclimation to 21‰ salinity. Further, hemolymph Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations of crabs acclimated 15-days to 21‰ do not reach the values estimated after 33‰-acclimation ($\Delta = 65\text{-}80\%$).

The relative expression of the α subunit $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ is significant after 5 h the saline change. The analysis of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity in separated 6th and 7th gill pairs showed that the activity increases 2.5 fold in both gill pairs for crabs acclimated to 21‰; the increase being is proportional, but 6^a gill has activity approximately 1,4 fold larger. And the protein concentration is larger in the 7^a gill.

The relative expression of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ α subunit is significantly after 5 hours of transference, increasing up to 24 hours and decreasing to the initial values after 48 hours. Analysis of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity of separated gills revealed that for crabs acclimated to 21‰-salinity is 2,5 fold greater than that estimated for 33‰-salinity. In spite of activity increased in the same ratio, that of 6th gill pairs is around 1,4 fold than that of 7th gill pairs. Interesting but contrasting $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ expression was greater in 7th gill pairs compared to 6th gill pairs independent of acclimation in both salinities.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos primers degenerados e específicos empregados para amplificar a subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase e a seqüência dos primers, baseados na seqüência de <i>Callinectes sapidus</i> e específicos para <i>C. ornatus</i> , para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10, utilizado como controle interno de reação.....	31
Tabela 2	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+	42
Tabela 3	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ de salinidade pelos íons potássio e amônio.....	48
Tabela 4	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰, pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+	56
Tabela 5	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ pelos íons potássio e amônio.....	63
Tabela 6	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> recém-capturado, aclimatado a 21‰ e a 33‰ pelo PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ e ouabaína.....	68
Tabela 7	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. ornatus</i> aclimatado à salinidade de 21‰ pelo ATP, Mg^{2+} , K^+ , Na^+ e NH_4^+	76
Tabela 8	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ pelos íons potássio e amônio.....	80
Tabela 9	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	89
Tabela 10	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. ornatus</i> aclimatado à salinidade de 33‰ pelo ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+	98
Tabela 11	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ pelos íons potássio e amônio.....	103
Tabela 12	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	105
Tabela 13	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> recém-capturado, aclimatado a 21‰ e a 33‰ pelo ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ e ouabaína.....	109
Tabela 14	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ e na presença de espermina e espermidina, pelo ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ e ouabaína.....	118
Tabela 15	Concentração de íons na hemolinfa de <i>C. ornatus</i> aclimatado a 33‰ e transferido para 21‰ de salinidade.....	120
Tabela 16	Atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial posterior (6º, 7º e 8º pares) de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatados a 33‰ e imediatamente transferidos para 21‰ de salinidade.....	122
Tabela 17	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase pelo ATP e ouabaína da 6ª e 7ª brânquias de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21 e 33‰ de salinidade durante 10 dias.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Efeito da concentração de PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	38
Figura 2	Efeito dos íons magnésio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	39
Figura 3	Efeito dos íons potássio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	40
Figura 4	Efeito dos íons amônio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	41
Figura 5	Efeito da concentração dos íons amônio, na modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%, pelos íons potássio.....	43
Figura 6	Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21% pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.....	45
Figura 7	Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%, pelos íons amônio.....	46
Figura 8	Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%, pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.....	47
Figura 9	Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	49
Figura 10	Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%, na presença de íons amônio.....	50
Figura 11	Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNPPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21%.....	51
Figura 12	Efeito da concentração de PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	53
Figura 13	Efeito dos íons magnésio sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	54
Figura 14	Efeito dos íons potássio sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	55
Figura 15	Efeito dos íons amônio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	58
Figura 16	Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33% pelos íons potássio.....	59
Figura 17	Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33% pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.....	60
Figura 18	Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33% pelos íons amônio.....	61
Figura 19	Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33% pelos íons amônio, em função de diferentes concentrações de íons potássio.....	62
Figura 20	Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	65
Figura 21	Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%, na presença de íons amônio.....	66
Figura 22	Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNPPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33%.....	67

Figura 23	Centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰, em gradiente contínuo de sacarose.....	70
Figura 24	Western blot e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33 e 21‰.....	71
Figura 25	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰..	73
Figura 26	Efeito dos íons magnésio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	74
Figura 27	Efeito dos íons potássio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	75
Figura 28	Efeito dos íons sódio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.	77
Figura 29	Efeito dos íons amônio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.	78
Figura 30	Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰, pelos íons potássio.....	81
Figura 31	Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.....	82
Figura 32	Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ pelos íons amônio.....	83
Figura 33	Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.....	84
Figura 34	Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰..	86
Figura 35	Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰, na presença de íons amônio.....	87
Figura 36	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	88
Figura 37	Centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰, em gradiente contínuo de sacarose.....	91
Figura 38	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰..	92
Figura 39	Efeito dos íons magnésio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	93
Figura 40	Efeito dos íons potássio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	95
Figura 41	Efeito dos íons sódio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	96
Figura 42	Efeito dos íons amônio na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	97
Figura 43	Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰, pelos íons potássio.....	99
Figura 44	Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.....	100
Figura 45	Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ pelos íons amônio.....	101

Figura 46	Varição dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.....	102
Figura 47	Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰..	106
Figura 48	Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰, na presença de íons amônio.....	107
Figura 49	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. ornatus</i> aclimatado a 33‰.....	108
Figura 50	Efeito da concentração de espermidina (A) e espermina(B) sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	111
Figura 51	Efeito da concentração de ATP na presença de espermidina (A) e espermina (B) sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	112
Figura 52	Efeito da concentração de MgCl ₂ na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	113
Figura 53	Efeito da concentração de NaCl na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	115
Figura 54	Efeito da concentração de KCl na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰.....	116
Figura 55	Efeito da concentração de ouabaína na presença de espermidina (A) ou espermina (B) na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21 ‰.....	117
Figura 56	Concentração de íons na hemolinfa de <i>C. ornatus</i> aclimatado a 33‰ e transferidos para 21‰ de salinidade.....	121
Figura 57	Atividade ATPase da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ e transferidos para 21‰ de salinidade...	123
Figura 58	SDS-PAGE e Western blot da fração microsomal da 6 ^a e 7 ^a brânquia de <i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33 e 21‰ por 10 dias.....	125
Figura 59	Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação das subunidades α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase e do gene RPL10 tendo como molde o cDNA total, produzido a partir da extração de RNA total das brânquias de <i>C. ornatus</i>	128
Figura 60	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de DNA após digestão com a enzima de restrição <i>EcoRI</i>	129
Figura 61	Sequência parcial específica da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase do tecido branquial do siri <i>C. ornatus</i>	131
Figura 62	Sequência parcial específica da proteína ribossomal L10 do tecido branquial do siri <i>C. ornatus</i>	132
Figura 63	Decurso temporal do efeito da aclimação à salinidade de 21‰ sobre a expressão de RNAm da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase presente na 6 ^a brânquia do siri <i>C. ornatus</i>	134
Figura 64	Decurso temporal do efeito da aclimação à salinidade de 21‰ sobre a expressão de RNAm da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase presente na 7 ^a brânquia do siri <i>C. ornatus</i>	135
Figura 65	Análise da expressão de RNAm da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase entre a 6 ^a e 7 ^a brânquia durante a aclimação à salinidade de 21‰ do siri <i>C. Ornatus</i>	136

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A osmorregulação em crustáceos	1
1.2. A (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase.	4
1.3. O efeito da salinidade	13
1.4. O crustáceo <i>Callinectes ornatus</i> .	15
2. Objetivos.	17
2.1. Objetivos gerais.	17
2.2. Objetivos específicos.	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Coleta e aclimação dos animais.	22
3.2. Coleta da hemolinfa.	23
3.3. Dissecção das brânquias.	23
3.4. Preparação da fração microsomal do tecido branquial.	23
3.5. Determinação da atividade PNPPase.	24
3.6. Determinação da atividade ATPase.	24
3.7. Tratamento das enzima dos sistema de acoplamento.	26
3.8. Preparação da solução de ATP.	26
3.9. Preparação da solução de ortovanadato.	26
3.10. Preparação do gliceraldeído 3-fosfato.	26
3.11. Dosagem de proteína.	27
3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida.	27
3.13. Western blotting	27
3.14. Determinação da dosagem de íons e osmolalidade na hemolinfa.	27
3.15. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.	28
3.16. Tratamento dos dados cinéticos.	28
3.17. Obtenção de brânquias para extração de RNA total de <i>C. ornatus</i> .	29
3.18. Extração de RNA total.	29
3.19. Quantificação da concentração de RNA total.	29
3.20. Confecção do perfil de cDNA (Transcrição reversa).	29
3.21. Sequenciamento parcial dos genes da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase e RPL10.	30
3.22. Desenho de primers específicos.	30

3.23.	RT-PCR (semi-quantitativa).	31
3.24.	Preparo das células quimiocompetentes.	32
3.25.	Clonagem e sequenciamento.	32
3.26.	Análise <i>in silico</i> .	34
3.27.	qRT-PCR (quantitativa).	34
4.	RESULTADOS	36
4.1.	Atividade K ⁺ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de <i>Callinectes ornatus</i>	36
4.1.1.	<i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ de salinidade	36
4.1.2.	<i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ de salinidade	52
4.2.	Atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase branquial de <i>Callinectes ornatus</i>	69
4.2.1.	<i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 21‰ de salinidade	69
4.2.2.	<i>Callinectes ornatus</i> aclimatado a 33‰ de salinidade	90
4.3.	Efeito de poliaminas na atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase	110
4.4.	Efeito do tempo de aclimação na concentração de cátions e osmolalidade da hemolinfa	119
4.5.	Efeito do tempo de aclimação na atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase nas brânquias posteriores de <i>C. ornatus</i>	122
4.6.	Efeito da aclimação a baixa salinidade sobre a concentração e atividade da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase nas brânquias individuais (6 ^a e 7 ^a brânquia)	124
4.7.	Análises moleculares	127
4.7.1.	Identificação dos genes codificadores das proteínas (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase e RPL10 em <i>Callinectes ornatus</i>	127
4.7.2.	Análise da transcrição do gene da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase durante a aclimação	130
5.	DISCUSSÃO	137
5.1.	Estudo da fração microsomal.	137
5.2.	Atividade K ⁺ -fosfatase da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de <i>C. ornatus</i>	139
5.3.	Atividade ATPase da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de <i>C. ornatus</i>	143
5.4.	Efeito de poliaminas na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de <i>C. ornatus</i>	150
5.5.	Efeito do tempo de aclimação	151
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
7.0	CURRICULUM VITAE	167

1. INTRODUÇÃO

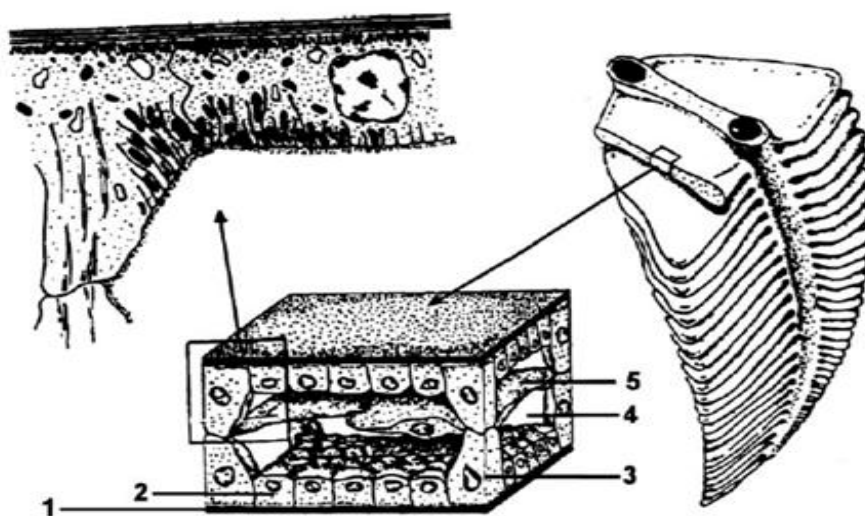
1.1. A osmorregulação em crustáceos

Durante a evolução os crustáceos, que surgiram no mar, invadiram ambientes de menor salinidade (Schubart et al., 1998). A transição para ambientes dulcícolas constitui um grande desafio osmótico e iônico para esses animais, pois eles tendem a perder íons por difusão e ganhar água por osmose (Péqueux, 1995). A sobrevivência desses animais em águas menos salgada é determinada pela capacidade osmorregulatória de cada espécie que é definida como a diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e a do meio externo (Charmantier & Soye, 1994).

Os crustáceos podem ser classificados quanto à capacidade de sobrevivência em ambientes de diferentes salinidades. Os *estenoalinos* toleram pequenas variações na salinidade do meio externo, enquanto os *eurialinos* podem tolerar grandes variações (Péqueux, 1995). Em relação à variação da concentração osmótica da hemolinfa comparada à do meio externo, os crustáceos são denominados *osmoconformadores*, quando mantêm a concentração osmótica da hemolinfa semelhante à do ambiente, ou *osmorreguladores*, a concentração osmótica da hemolinfa é mantida dentro de certos limites que são espécie-específicos e que podem estar abaixo (hiporregulação) ou acima (hiperregulação) daquela encontrada no meio externo (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003). Os crustáceos hiperreguladores podem ser divididos em dois grupos: os reguladores fortes, capazes de hiperregular fortemente em água doce e passar toda a vida adulta neste ambiente, e os reguladores fracos que, embora sejam capazes de viver e hiperregular em meios diluídos, sobrevivem mal em água doce (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000; Freire et al., 2008)

A maioria dos crustáceos que vivem no mar são osmoconformadores e estenoalinos, enquanto os que vivem em águas mais diluídas são hiperreguladores. Quando crustáceos hiperreguladores são colocados em ambiente com menor salinidade, enfrentam a perda de íons por difusão e, nesse caso necessitam energia para a regulação osmótica. O movimento iônico ocorre nas superfícies permeáveis dos crustáceos, tais como a parede do corpo, trato gastrointestinal, órgãos excretores e brânquias. As brânquias têm as membranas mais permeáveis e são consideradas os sítios primários para regulação osmótica e iônica (Bouaricha et al., 1994; Palacios & Racotta, 2007).

Além do controle da osmolalidade da hemolinfa nos crustáceos aquáticos, as brânquias também estão envolvidas na regulação do pH, trocas gasosas e excreção de compostos nitrogenados, principalmente na forma de amônia (Péqueux, 1995; Taylor & Taylor, 1992; Weihrauch et al., 2004). Os estudos realizados até o momento sugerem que, nos caranguejos existe uma diferenciação entre as brânquias anteriores e posteriores. As anteriores apresentam um epitélio fino e são especializadas em trocas gasosas enquanto as posteriores estão envolvidas na absorção ativa de íons a partir de ambientes externos diluídos (Péqueux, 1995; Towle & Weihrauch, 2001; Freire et al., 2008).



Painel 1. Representação esquemática morfológica da brânquia posterior de caranguejo.

1-cutícula; 2-células epiteliais; 3- células pilares; 4- espaço por onde circula a hemolinfa; 5- septo intralamelar. (Modificado de Onken & Riestenpatt, 1998).

Apesar de existirem detalhes que variam de uma espécie para outra, a micro-anatomia e a ultraestrutura das brânquias dos caranguejos, já bem conhecidas, podem ser consideradas como representativas da organização básica das brânquias dos crustáceos em geral (Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Towle, 1997). Estudos preliminares da morfologia das brânquias de caranguejos têm demonstrado a presença de oito pares de brânquias, dispostos lateralmente e apresentando uma grande semelhança com as estruturas já descritas para as espécies de crustáceos relacionadas (Copeland & Fitzjarell, 1968; Onken & Riestenpatt, 1998).

As brânquias são compostas basicamente por estruturas multilamelares (**Painel 1**) onde cada lamela forma um envelope cuticular, cujo exterior está em contato com a água do ambiente e o seu interior preenchido pela hemolinfa através de uma câmara

formada por células epiteliais uniestratificadas que apresentam, na maioria das vezes, um septo intralamelar (Mantel & Farmer, 1983; Barra et al., 1983; Goodman & Cavey, 1990; Maina, 1990; Taylor & Taylor, 1992; Onken & Riestenpatt, 1998). Nas membranas apicais, as células do tecido epitelial branquial apresentam um grande número de invaginações, que aumentam a superfície de contato com o meio ambiente. Já a superfície basolateral dessas células é banhada pela hemolinfa e apresenta um grande número de invaginações associadas a mitocôndrias (Cioffi, 1984; Towle, 1984; Gilles & Péqueux, 1985; Towle & Kays, 1986). Tem sido sugerido que as mitocôndrias associadas às invaginações são características de epitélios transportadores de íons e, desta forma, as mitocôndrias forneceriam ATP para o bombeamento ativo desses íons (Barra & Péqueux, 1986; Towle, 1993, 1997; Péqueux, 1995).

Além das brânquias, a glândula antenal dos crustáceos regula o volume dos fluídos do corpo, a concentração de alguns solutos orgânicos e íons divalentes e, em algumas espécies de crustáceos, a reabsorção de NaCl (Mantel & Farmer, 1983).

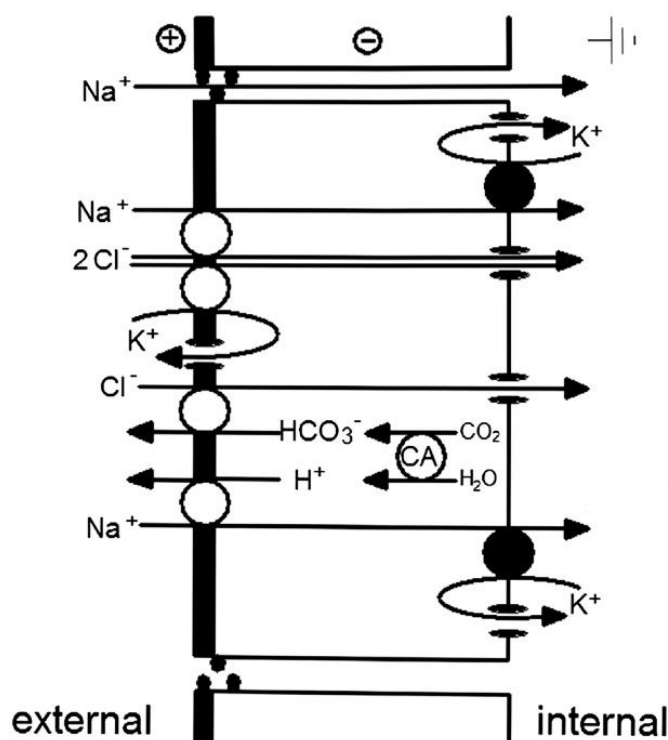
Quando crustáceos osmorreguladores são colocados em meio diluído ocorre a entrada de água no corpo do animal e uma perda passiva de íons, principalmente Na^+ e Cl^- . O movimento líquido de Na^+ mediado pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ocorre do citosol celular para a hemolinfa enquanto outros transportadores mediam o transporte de Na^+ do ambiente através da membrana apical para o citosol (Towle & Weihrauch, 2001). Muitos desses transportadores são passivos e entre eles estão os trocadores Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, onde os movimentos dependem do gradiente químico e eletroquímico, respectivamente (Towle & Weihrauch, 2001; Palacios & Racotta, 2007). Na membrana apical, um mecanismo de troca passiva, $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, pode responder por uma parte muito pequena do influxo de Na^+ total que ocorrem nas brânquias posteriores de caranguejos (Péqueux, 1995; Towle et al., 1997). Conjuntamente com o trocador apical Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ esses mecanismos podem absorver NaCl de ambientes diluídos.

O H^+ trocado por Na^+ na membrana apical das células de osmorreguladores é fornecido pela atividade da enzima anidrase carbônica, que gera HCO_3^- e H^+ a partir de CO_2 e H_2O no citosol (Henry, 1996). A atividade da anidrase carbônica aumenta nas brânquias posteriores, brânquias especializadas no transporte de íons, após adaptação a ambientes diluídos (Henry et al., 2002, 2003).

Na membrana apical existe um canal de K^+ que é importante para garantir um potencial elétrico negativo na célula e que sustenta a saída de Cl^- através do canal de Cl^-

situado na membrana basolateral (Riestenpatt et al., 1996; Freire et al., 2008). Na membrana basolateral, o canal de K^+ permite a reciclagem deste íon bombeado para dentro da célula pela (Na^+, K^+) -ATPase (Palacios & Racotta, 2007). Mais modelos do mecanismo de absorção e excreção de NaCl nas brânquias também foram propostos por Sáez et al., 2009).

O mecanismo que explica o mecanismo de absorção de NaCl nas brânquias de hiperreguladores fracos está mostrado no **Painel 2**.



Painel 2. Modelo da célula epitelial branquial dos crustáceos decápodes, mostrando os transportadores de íons envolvidos na osmorregulação em hiperreguladores fracos. (Freire et al., 2008)

1.2. A (Na^+, K^+) -ATPase

A (Na^+, K^+) -ATPase, ou bomba de sódio é uma proteína integral de membrana que utiliza a energia proveniente da hidrólise do fosfato terminal, ou fosfato γ , da molécula de ATP para transportar três Na^+ para o meio extracelular e dois K^+ para o meio intracelular (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Esse transporte estabelece um gradiente eletroquímico, essencial para a manutenção dos potenciais de membrana responsáveis pela atividade excitável de células musculares e nervosas, proporcionando também a regulação do volume e pH intracelulares bem como a captação de nutrientes

extracelulares, como a glicose, aminoácidos, vitaminas e outros compostos essenciais às células (Crambert et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Horisberger, 2004; Martin, 2005; Dempski et al., 2005).

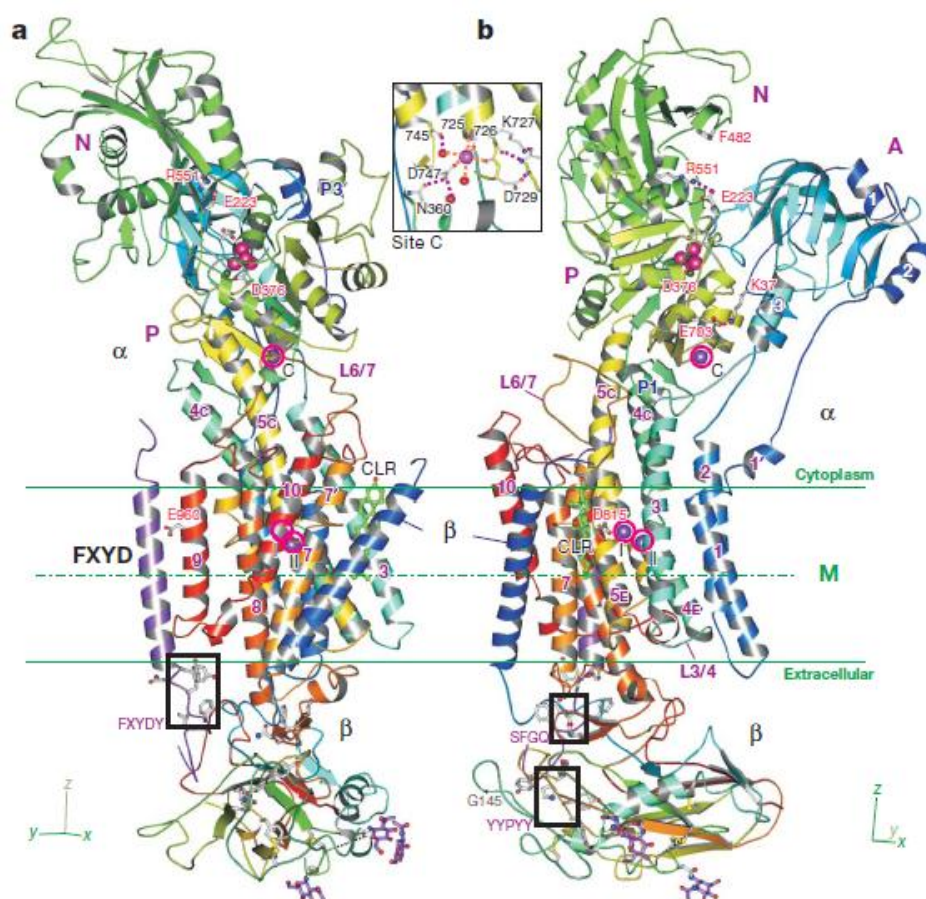
Até o presente momento, quatro classes de ATPases estão bem estabelecidas: as ATPases tipo P (Axelsen & Palmgren, 1998), ATPases tipo F (Ohsumi & Anraku, 1981), ATPases tipo V (Pedersen & Carafoli, 1987) e ATPases tipo ABC (Higgins et al., 1986). Nos eucariotos superiores, as ATPases tipo P, V e F estão acopladas ao ATP através de uma relação dominante-submissa (master-slave relationship), o que torna difícil a sua caracterização cinética em um dado tecido ou organismo (Pedersen & Carafoli, 1987). O ciclo reacional das ATPases do tipo P é caracterizado pela formação de um intermediário fosforilado, onde o fosfato γ da molécula do ATP se liga a um resíduo de aspartato (D376) da enzima. Além disso, as ATPases do tipo P, são divididas em subfamílias e, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por transportar cátions de metais alcalinos é classificada como um $\text{P}_{2\text{C}}$ ATPase, similarmente à $(\text{H}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Axelsen & Palmgren, 1998; Crambert et al., 2000; Kaplan, 2002; Pedersen, 2007).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é um heterodímero, constituído pelas subunidades α e β . A subunidade α contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular da ordem de 110 kDa (Hu & Kaplan, 2000; Donnet et al., 2001; Kaplan, 2002). Considerada a subunidade catalítica da enzima (Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005), na subunidade α estão localizados os sítios de ligação do ATP e de fosforilação, bem como os aminoácidos essenciais para a ligação do Na^+ e K^+ (Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Capendeguy & Horisberger, 2005).

A subunidade β apresenta apenas um segmento transmembrana com a extremidade N-terminal voltada para o citosol. Essa subunidade é composta de aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, com uma Mr da ordem de 50 kDa. A porção extracelular apresenta 3 ligações dissulfeto e é altamente glicosilada, esses açúcares conferem estabilidade à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, já que a torna mais resistente a proteases (Geering, 2001; Laughery et al., 2003; Martin, 2005; Shinoda et al., 2009).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pode estar associada a uma terceira subunidade, uma proteína pertencente a família das FXYD, esse proteolípídeo de cerca de 60 resíduos de aminoácidos e Mr ao redor de 7 kDa se associa à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de maneira tecido-específica nos vertebrados (Crambert et al., 2004; Lubarski et al., 2007) e apresenta apenas um segmento transmembrana (Therien & Blostein, 2000; Füzesi et al., 2005). Sua extremidade N-terminal está voltada para o meio extracelular (**Painel 3**).

Evidências recentes indicam que ela não é um componente essencial da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, embora atue como um regulador, modulando a afinidade da enzima pelo ATP bem como para os íons potássio e sódio (Geering et al., 2003; Li et al., 2004; Garty & Karlish, 2005). Durante aclimação de peixes a diferentes salinidades, ocorre uma variação da expressão desta subunidade, bem como da isoforma expressa (Tipsmark, 2008; Wang et al., 2008). A FXYP se localiza adjacente aos segmentos $\text{M}_2\text{-M}_6\text{-M}_9$ e, embora durante a mudança de conformação de $\text{E}_1\text{-E}_2$ a distância entre essas subunidades não varia, ocorre uma variação da distância entre FXYP e a subunidade β (Dempski et al., 2008).



Painel 3. Arquitetura do complexo $\alpha\beta\gamma$ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da glândula retal de tubarão ligada a K^+ e MgF_4^{2-} .

As cores mudam gradualmente entre a extremidade aminoterminal (azul) e carboxiterminal (vermelho) para a subunidade α e β , a subunidade γ está apresentada em roxo. CLR representa a molécula de colesterol. A linha verde representa o limite hidrofóbico da bicamada lipídica. (Modificado de Shinoda et al, 2009)

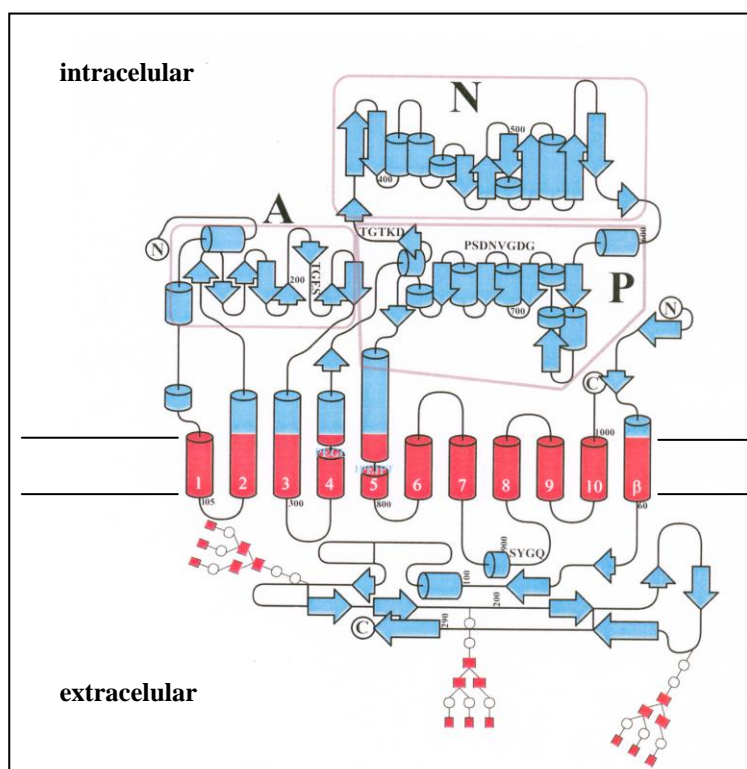
A primeira estrutura cristalina de uma ATPase do tipo P, a Ca^{2+} -ATPase (SERCA), foi relatada por Toyoshima et al. (2000). A partir de então vários outros autores relataram a estrutura da SERCA em diferentes conformações (Sorensen et al., 2004; Toyoshima et al., 2000; Olesen et al., 2004). Recentemente, a estrutura cristalina obtida com resolução de 3,5 Å, da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ isolada da medula externa de rim de porco foi relatada por Morth et al. (2007). Os resultados mostraram que a semelhança estrutural da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ com a da SERCA é alta, inclusive no sítio de ligação dos íons. Apenas duas diferenças conservativas de aminoácidos ocorrem entre a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a SERCA e, segundo os autores, é muito provável que a diferença nas posições das cadeias laterais bem como moléculas de água contribuam para definir a seletividade pelos cátions. Finalmente, a arquitetura definitiva do complexo $\alpha\beta$ da $(\text{Na},\text{K})\text{-ATPase}$ de glândula renal de tubarão foi caracterizada por Shinoda et. al., 2009 e está representada no **Painel 3**.

A subunidade α apresenta as extremidades N- (Felsenfeld & Sweadner, 1988) e C- terminal (Ning et al., 1993) localizadas no meio intracelular e 10 segmentos transmembrana (**Painel 4**), que dão origem às alças intra- e extracelulares (Sweadner & Donnet, 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). Os segmentos transmembranas são nomeados a partir da extremidade N-terminal. A subunidade α está organizada na forma de três domínios globulares distintos, voltados para a região citoplasmática e conectados por hastes estritas a um domínio transmembrana de forma aproximadamente cilíndrica e compacta (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). O domínio atuador, A, constituído pelo segmento N-terminal e a alça citoplasmática que une os segmentos transmembranas $\text{M}_2\text{-M}_3$, contém o motivo TGES que está envolvido no processo de desfosforilação. O domínio de fosforilação, P, localizado na alça citoplasmática entre os segmentos transmembranas $\text{M}_4\text{-M}_5$ contém o motivo DKTGT com o resíduo de aspartato para o qual o fosfato do ATP é transferido transitoriamente. O domínio de ligação do nucleotídeo N, também localizado na mesma alça citoplasmática que o domínio P, contém o sítio de ligação do ATP (Martin, 2005; Morth et al., 2009).

O heterodímero $\alpha\beta$ é a unidade funcional da enzima, pois é sabido que, a subunidade β estabiliza o enovelamento correto da subunidade α , por interagir com a alça extracelular M7-M8 da subunidade α , apresentada no **Painel 4** (Geering, 2001; Jorgensen et al., 2003; Horisberger et al., 2004; Morth et al., 2007). Na ausência da

subunidade β , a subunidade α é retida no retículo endoplasmático, o que comprova o papel de chaperona exercido pela subunidade β (Laughery et al., 2003; Toustrup-Jensen et al., 2009).

Tem sido sugerido também que a subunidade β esteja intimamente envolvida com o transporte ativo de Na^+ e K^+ , uma vez que desestabiliza a oclusão do potássio e altera a afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ para esses íons (Gatto et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Martin, 2005; Shinoda et al., 2009), devido a interação que estabelece principalmente quando a enzima está na conformação E_2 (Toustrup-Jensen et al., 2009). As ligações dissulfeto presentes na subunidade β são importante para o translocamento do heterodímero, porém não afetam sua formação (Laughery et al., 2003), mas a sua redução parece afetar a interação entre a subunidade β e a alça M7-M8 da subunidade α , levando à perda da atividade enzimática (Dempski et al., 2005).



Painel 4. Topologia de membrana das cadeias α e β da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ dos vertebrados. (Modificado de Martin, 2005)

Até o momento, foram identificadas quatro isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ para humanos. (Lingrel et al., 2007). Isoformas homólogas da

subunidade α dos vertebrados ainda não foram descritas nos invertebrados (Emery et al., 1998), além disso, mesmo com a identificação de duas isoformas nos camarões *Artemia salina* e *Artemia franciscana*, nenhuma corresponde às descritas nos vertebrados (Macías et al., 1991; GarciaSaez et al., 1997; Jorgensen & Pedersen, 2001). Também foram identificadas duas isoformas para *Pachygrapsus marmoratus*, a diferença se deve pela inserção de 81 nucleotídeos na porção N-terminal (Jayasundara et al., 2007). Com relação à subunidade β , as três isoformas de vertebrados denominadas de 1-3 diferem apenas no número de sítios de glicosilação (Vagin et al., 2007), contudo apenas uma isoforma foi relatada para os crustáceos e nenhuma isoforma da subunidade γ foi observada para esses animais (Lucu & Towle, 2003). A combinação dessas isoformas dá origem a uma série de isoenzimas com propriedades cinéticas distintas em relação à estimulação por Na^+ , K^+ , ATP e à inibição por ouabaína, além de diferentes respostas a mensageiros secundários (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasheri et al., 2000; Mijatovic et al., 2007). A relevância fisiológica dessa diversidade de isoformas ainda não está esclarecida (Pressley et al., 2005; Pierre et al., 2008).

Embora a hidrólise de ATP e o transporte de cátions sejam atividades coordenadas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, elas ocorrem em domínios diferentes da molécula. Como já foi descrito, o sítio de ligação do ATP à enzima e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o sítio catalítico estão localizados nos domínios citoplasmáticos N e P, respectivamente (Jorgensen & Pedersen, 2001; Jacobsen et al., 2002; Horisberger, 2004; Morth et al., 2009).

Estudos de mutação sítio-dirigida têm sido usados para determinar quais são os aminoácidos importantes para o funcionamento da enzima. No segmento transmembrana M_1 estão presentes duas glicinas, Gli^{93} e Gli^{94} , que são importantes para a interação com o Na^+ e K^+ e também favorecem a forma E_2P , no equilíbrio E_1P - E_2P (Einholm et al., 2005). A cristalização da proteína com o Rb^+ ocluído, mostrou que os resíduos $\text{Glu}^{327}(\alpha M_4)$, Ser^{775} , Asn^{776} , $\text{Glu}^{779}(\alpha M_5)$ e $\text{Asp}^{804}(\alpha M_6)$ estão suficientemente próximos do íon e fornecem ligantes para estabilizá-lo (Morth et al., 2007). Para o transporte de Na^+ , os aminoácidos Thr^{774} , Val^{920} , Glu^{954} , localizados respectivamente nos segmentos transmembranas M_5 , M_8 e M_9 são importantes, já que a variação desses aminoácidos modifica a afinidade aparente da enzima para este íon (Imagawa et al., 2005), do mesmo modo que os resíduos Tyr^{1017} , Tyr^{768} , Arg^{935} e Lys^{768} influenciam na

interação por Na^+ , por favorecem a fosforilação de E_1 (Toustrup-Jensen et al., 2009). Os primeiros quatro segmentos dão origem a uma alça citoplasmática pequena entre M_2 - M_3 , que é responsável pela regulação da atividade da enzima (Daly et al., 1997). A alça extracelular entre M_3 - M_4 possui dois resíduos altamente conservados Glu^{319} e Leu^{318} , que parecem estar envolvidos na seletividade a cátions, principalmente ao potássio (Eguchi et al., 2005). Entre os segmentos M_4 e M_5 existe uma grande alça citoplasmática que é formada por cerca de 430 resíduos de aminoácidos, que representa 30% da cadeia polipeptídica, onde se localiza o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional e o sítio de ligação do ATP (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Entre os segmentos M_7 e M_8 existe uma grande alça extracelular, identificada como uma importante região de contato com a subunidade β , principalmente os aminoácidos intermediários a 63-123 (Kaplan, 2002; Laughery, 2003). O segmento C-terminal parece estar envolvido na transição $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$, constituindo um elemento central no mecanismo de reorientação dos sítios (Toustrup-Jensen et al., 2009).

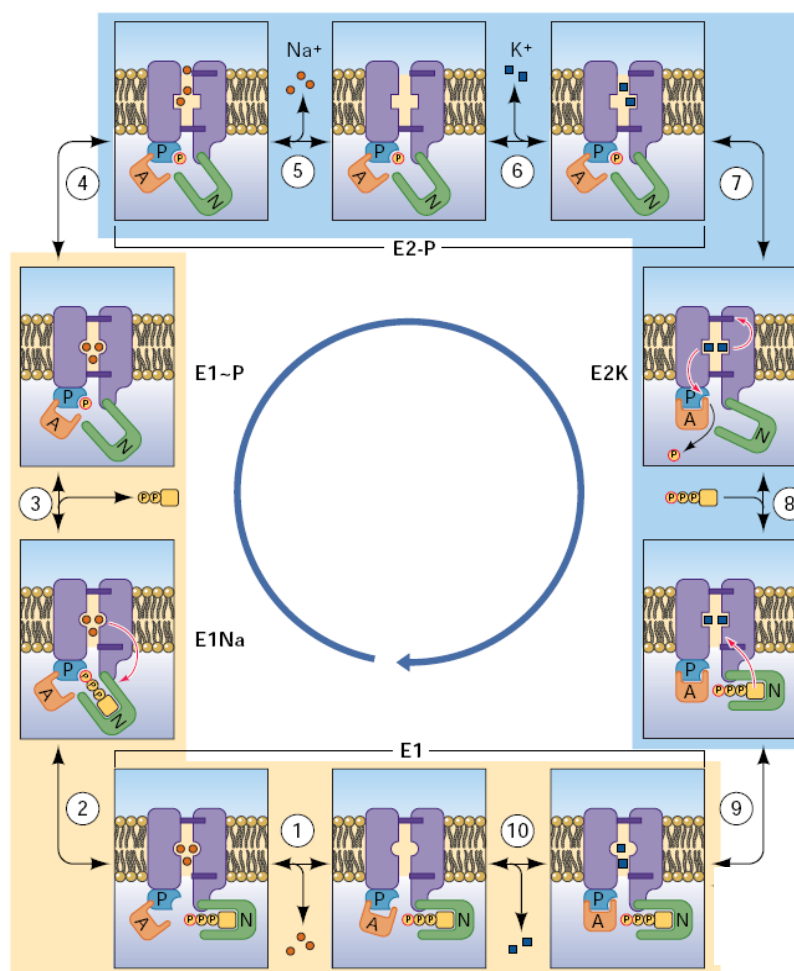
Acredita-se que existe um único sítio para a ligação de Na^+ e K^+ (Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen et al., 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Eguchi et al., 2005). A conversão de um sítio altamente específico para o K^+ , na forma E_2 , para um específico para Na^+ na forma E_1 , está acoplado a mudanças no número de grupos coordenadores e nas distâncias existentes entre eles, possibilitando que um mesmo sítio de ligação se ajuste a íons com diferentes raios atômicos (raio atômico do Na^+ - 1,9Å; raio atômico do K^+ - 2,7Å). Esse ajuste parece ocorrer através de rotações, inclinações e torções das hélices transmembrana (Mense et al., 2002; Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen, 2001). Com relação ao terceiro íon Na^+ transportado, existem evidências de que ele interaja com a conformação $\text{E}_1\text{ATP}2\text{Na}$ em um sítio específico, distinto do mencionado anteriormente (Apell et al., 1998; Schneeberger & Apell, 2001; Hakansson & Jorgensen, 2003).

A cristalização da $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ de glândula retal de tubarão com resolução de 2,4Å identificou os aminoácidos essenciais para os sítios de ligação do K^+ . O sítio I é formado essencialmente por cinco átomos de oxigênio, um oxigênio da cadeia principal do resíduo de Thr^{779} , três da cadeia lateral de Ser^{782} , Asn^{783} , Asp^{811} e um oxigênio de uma molécula de água. O sítio II é coordenado por três grupos carbonil da cadeia principal (Val^{329} , Ala^{330} e Val^{332}), três ou quatro átomos de oxigênio da cadeia lateral

(Asn⁷⁸³, Glu⁷⁸⁶, Asp⁸¹¹ e possivelmente Glu³³⁴) e nenhuma molécula de água (Shinoda et al., 2009).

O mecanismo de bombeamento dos íons pela (Na⁺,K⁺)-ATPase é fundamentado em estruturas de alta resolução encontradas para a Ca²⁺-ATPase em diferentes estados conformacionais e pode ser utilizado para a (Na⁺,K⁺)-ATPase devido ao alto grau de homologia entre as P-ATPases (Toyoshima & Inesi, 2004; Toyoshima et al., 2007). O modelo é baseado em transições conformacionais entre dois estados principais da enzima denominados E₁ e E₂. A forma E₁ expõe o sítio de ligação do cátion para a região intracelular, possuindo alta afinidade por Na⁺ e ATP, já a forma E₂, tem alta afinidade por K⁺ extracelular. (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). De acordo com o modelo proposto por Horisberger (2004), (**Painel 5**), a enzima na forma E₁ATP apresenta seus domínios citoplasmáticos A, N e P afastados (etapa ①). Após a ligação dos três Na⁺ extracelulares aos seus sítios com alta afinidade, ocorre uma mudança de conformação importante. Após uma grande rotação o domínio N posiciona o fosfato γ do ATP próximo ao sítio de fosforilação (etapa ②). A hidrólise do ATP é acoplada a transferência do fosfato γ para o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional, dando origem à forma E₁P(3Na) (etapa ③). Simultaneamente o domínio A também sofre rotação de aproximadamente 30°, (etapa ③), induzindo uma mudança conformacional no interior do domínio transmembrana, resultando no fechamento do canal transiente e oclusão dos Na⁺ ligados à enzima (Toyoshima & Mizutani, 2004; Sorensen et al., 2004). Durante o ciclo catalítico, este estado de alta energia E₁P(3Na) é rapidamente convertido em E₂P (2Na) (etapa ④). Concomitantemente à conversão de E₁ para E₂ ocorre a exposição dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular. A redistribuição dos grupos diminui a afinidade pelo Na⁺ e a liberação do primeiro Na⁺ para o meio extracelular provoca um rearranjo do canal liberando os outros dois Na⁺ (etapa ⑤). O sítio de ligação de cátions da forma E₂P é então ocupado por dois K⁺ extracelulares (etapa ⑥), resultando na desfosforilação do domínio P e na oclusão dos íons ligados, devido ao fechamento do canal transiente voltado para o meio extracelular (etapa ⑦). A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N (etapa ⑧) promove o afastamento dos domínios N e P, que induz uma movimentação dos segmentos transmembrana da molécula, resultando na abertura do canal transiente e liberando o acesso aos sítios de ligação de cátions do meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, traduzido pela diminuição da afinidade da enzima pelo K⁺, caracteriza a transição

conformacional da forma $E_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $E_1\text{ATP}2\text{K}$ (etapa ⑨). A próxima etapa (⑩) é a liberação dos K^+ para o citosol, finalizando o ciclo de bombeamento (Horisberger, 2004). Apesar dos recentes avanços, este mecanismo não está totalmente compreendido (Capendeguy & Horisberger, 2005; Gatto et al., 2005).



Painel 5. Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Modificado de Horisberger, 2004)

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é especificamente inibida por glicosídeo cardiotônicos, que ao se ligar especificamente a enzima atua fisiologicamente como moduladores de atividade. A ouabaína, glicosídeo cardiotônico mais estudado, se liga com alta afinidade à forma $E_2\text{P}$ (Crambert et al., 2004; Nesher et al., 2007), inibindo especificamente a atividade catalítica e de transporte iônico.

A região de interação enzima-ouabaína parece envolver múltiplos resíduos chaves na subunidade α e, em menor extensão, também na subunidade β (Middleton et al., 2000; Post, 2003; Radkov et al., 2007; Mijatovic et al., 2007). Porém um dos

mais relevantes é o Asp¹²¹, localizado no segmento M₁, que ao ser mutado confere à enzima resistência a droga (Sáez et al., 2009). Como todas as P-ATPases, a (Na⁺,K⁺)-ATPase também é inibida pelo vanadato, que se liga ao sítio de fosforilação bloqueando o ciclo catalítico e originando a forma E₂-V (Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998; Rice et al., 2001).

Os mecanismos de regulação da (Na⁺,K⁺)-ATPase ainda não estão completamente elucidados, mas sabe-se que a atividade da enzima responde diretamente às concentrações intra- e extracelulares de seus principais moduladores, ATP, Na⁺ e K⁺ (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 1999, 2000; Kaplan, 2002; Kong & Clarke, 2004). Desta forma, a expressão de diferentes isoenzimas, com características cinética diferentes supre em parte a necessidade de um comportamento específico da enzima em diferentes tecidos ou células (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al., 2000, 2001; Mobasher et al., 2000; Lingrel et al., 2003; Lingrel et al., 2007).

Existem evidências de que a composição lipídica da membrana em que a enzima está inserida modula sua afinidade por ATP, Na⁺ e K⁺ (Else & Wu, 1999; Therien & Blostein, 1999; Cornelius et al., 2003; Else et al., 2003; Almansa et al., 2003).

1.3. O efeito da salinidade

Um dos exemplos mais óbvios da adaptação ecológica dos crustáceos é a tolerância a salinidade. Quando a salinidade do habitat aquático é maior ou menor que o fluído corporal do animal, esse organismo deve transportar sal para manter a osmolalidade em níveis fisiológicos (Sáez et al., 2009). A variação da salinidade afeta a expressão e/ou atividade de algumas enzimas como (Na⁺,K⁺)-ATPase, anidrase carbônica, V-ATPase, arginina quinase, fosfatase alcalina além dos transportadores como Na/K/2Cl, Na/H e Cl/HCO₃ (Evans et al., 2005; Sáez et al., 2009).

Em alguns crustáceos foi observada uma variação das características das brânquias quando os animais são colocados em água com menor salinidade, que incluem, diminuição da permeabilidade da membrana para a água, menor perda de íons como consequência da diminuição da superfície epitelial da brânquia (Lapucki & Normant, 2008). Além do desenvolvimento da membrana basolateral rica em mitocôndrias e aumento do espaço subcuticular (Freire et al., 2008; Genovese et al., 2004).

Durante a aclimação a composição lipídica e a proporção de ácidos graxos também podem variar alterando a permeabilidade da membrana e influenciando a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Shivkamat & Roy, 2005; Palacios & Racotta, 2007; Haviv et al., 2007).

A exposição de animais a meio diluído pode provocar uma diferenciação das células especializadas em trocas gasosas em células ionotransportadoras. Essa diferenciação ocorre pelo aumento da superfície basolateral devido as pregas, com consequente aumento da síntese de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Lovett et al., 2006).

A atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é observada nas brânquias anteriores e nas posteriores, entretanto a atividade é maior nas posteriores, que são especializadas no transporte de íons. No caso específico do *Cyrtograpsus angulatus* foi relatada uma variação de atividade entre as brânquias posteriores, onde a sexta brânquia apresenta uma atividade maior que as outras. Além disso, a oitava brânquia posterior não apresenta variação na atividade durante a aclimação (López Mañanes et al., 2002).

A expressão de RNAm da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores é fortemente afetada pela variação da salinidade, aumentando a expressão em resposta a aclimação a baixa salinidade (Luquet et al., 2005; Lovett et al., 2006). A aclimação também pode acarretar uma variação da isoforma expressa (Jayasundara et al., 2007; Jorgensen & Amat, 2008) bem como a quantidade da enzima presente na membrana (Masui et al., 2005b; Garçon et al., 2009). O grande aumento do RNAm para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pode ser devido a um rápido turnover da proteína $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na membrana plasmática branquial requerendo um alto nível de RNAm para suprir a eficiente substituição da proteína.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados também está sujeita a mecanismos de regulação de curto e longo prazo mediados por hormônios, tais como a aldosterona, dopamina, norepinefrina e insulina (revisto por Vinciguerra et al., 2005). A regulação de curto prazo envolve efeitos diretos sobre o comportamento cinético da enzima ou sobre a translocação de moléculas da enzima entre a membrana plasmática e reservatórios intracelulares, enquanto os mecanismos de regulação de longo prazo geralmente afetam a síntese *de novo* ou a degradação da enzima (Seok et al., 1998; Therien & Blostein, 2000; Dunbar & Caplan, 2001; Vasilets, 2002).

Embora as estratégias osmorregulatórias também incluem a variação dos níveis de aminoácidos livres no músculo para compensar a salinidade alterada, esse aspecto não será aqui abordado.

A variação da salinidade do meio provoca um efeito notável nos mecanismos fisiológicos dos crustáceos eurialinos, permitindo que estes se adaptem a mudanças de ambiente, se tornando alvos de estudo na compreensão dos processos ocorridos durante a alteração da salinidade.

1.4. O crustáceo *Callinectes ornatus*

Os crustáceos são amplamente distribuídos na maioria dos biótopos e apresentam uma série de adaptações ao meio ambiente que lhes permitem o seu estabelecimento em diferentes habitats. Entre as respostas ambientais tem-se o processo de adaptação à salinidade do meio externo, que representa um importante mecanismo para o controle osmo-iônico (Péqueux, 1995).

Entre os crustáceos, os Decápoda representam a ordem com maior número de representantes, totalizando aproximadamente 10.000 espécies descritas, distribuídas em 1.200 gêneros. Os Brachyura, que englobam os siris e caranguejos, apresentam aproximadamente 5.000 espécies descritas e representam um grupo significativo de crustáceos com importante função na cadeia trófica marinha (Melo, 1996). Os Portunidae representam uma das famílias mais conhecidas, quer em função de sua importância ecológica ou então como uma importante fonte de alimento nas águas costeiras (Mantelatto, 1999). A distribuição desta família está relacionada a fatores físicos, químicos e climáticos, sendo a temperatura e a salinidade os fatores mais importantes (Taissoun, 1973; Abreu, 1980; Lacerda & Sawaya, 1986; Costa, 1995; Pinheiro et al, 1996; Guerin & Stickle, 1997; Chacur, 1998). Dessa forma, esses animais podem ser considerados como importantes bioindicadores de massas de água que, juntamente com outros organismos, delimitam certas regiões marinhas (Costa, 1995). Já foram registradas 21 espécies de portunídeos, incluindo *Callinectes ornatus* Ordway, 1863, em águas brasileiras (Melo, 1996; Mantelatto & Dias, 1999).

Callinectes ornatus (**Painel 6**) é um siri eurialino encontrado, principalmente em ambientes de moderada salinidade (28-30‰) a 28-32°C (machos) ou 16-20°C (fêmeas). A ocorrência de formas imaturas tende a aumentar em salinidades entre 30-32‰ (Mantelatto, 1999). Por outro lado, Brues (1927) mencionou a ocorrência desta espécie em águas com 9‰ de salinidade. De grande valor comercial esse animal está distribuído ao longo da costa Atlântica oeste incluindo a costa brasileira (Mantelatto & Fransozo, 2000). Ele pode ser encontrado perto de estuários e em baías habitando areia, lodo ou fundo de conchas e ocorre da zona intertidal até a profundidade de 75 metros (Melo,

1996; Mantelatto & Christofolletti, 2001; Guerra-Castro et al., 2007). Guerra-Castro e colaboradores observaram que *C. ornatus* encontrados no litoral da Venezuela se movimenta a uma velocidade de 74,6m/12h e que habitam uma área de 72.475m², preferindo áreas mais afastadas da praia e com alto conteúdo orgânico.

Recentemente, Pereira et al. (2009) publicaram um importante e minucioso trabalho acerca da biologia das espécies de Callinectes.

Callinectes ornatus tem recebido especial atenção recentemente (Negreiros-Fransozo & Fransozo, 1995; Mantelatto & Fransozo, 1996, 1997, 1999a; Mantelatto & Martinelli, 1999; Negreiros-Fransozo et al., 1999) devido a grande abundância de espécies em Ubatuba (S.P), representando cerca de 60% do total da comunidade brachyuros neste local (Fransozo et al, 1992; Mantelatto & Fransozo, 2000).

A incidência de fêmeas e machos no decorrer do ano indica que *C. ornatus* tem padrão reprodutivo anual ininterrupto, ou seja, mais de um ciclo reprodutivo por ano, com máximo no verão e outono (Mantelatto & Fransozo, 1999). Seu ciclo de vida ainda não é bem conhecido. O desenvolvimento larval parece ocorrer em áreas mais afastadas da praia (Mantelatto, 1999); não existindo evidências do desenvolvimento de qualquer fase em água doce.



Painel 6. *Callinectes ornatus* Ordway 1863

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

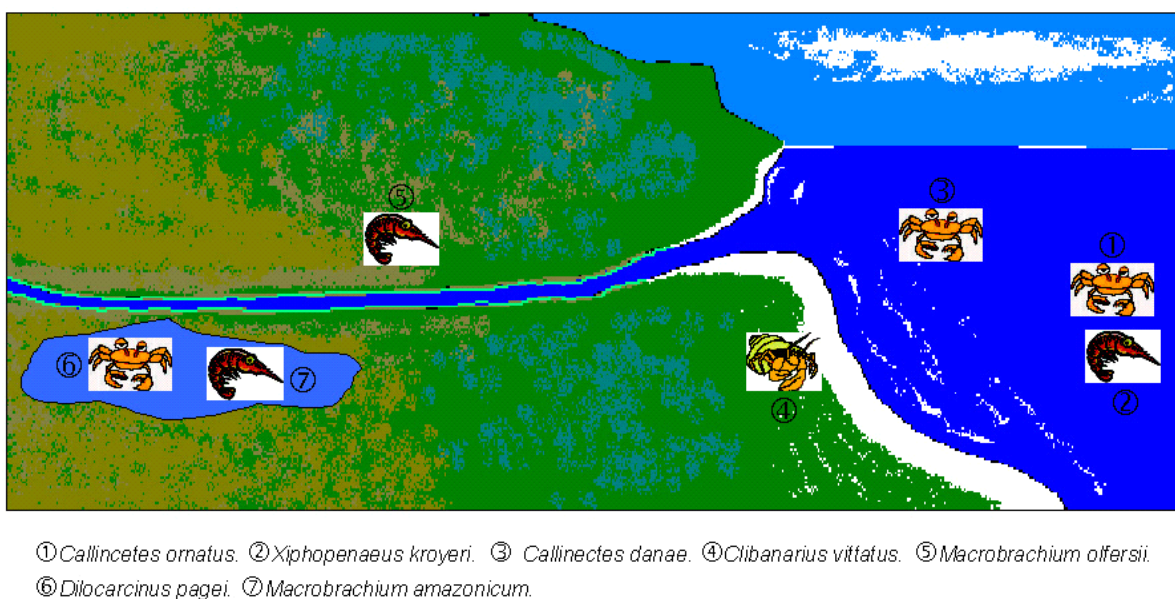
O projeto desenvolvido em nosso laboratório tem como objetivo geral o estudo sistemático e comparativo das propriedades estruturais e cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial de diferentes espécies de crustáceos decápodos (caranguejos, ermitões e siris) habitantes de distintos biótopos de variada salinidade, a fim de estabelecer o papel dessa enzima na adaptação desses animais a ambientes de diferentes salinidades (**Painel 7**). As espécies que atualmente estão sendo estudadas são as seguintes: *Callinectes ornatus* (Garçon et al., 2009; Garçon et al., 2007), *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), *Callinectes danae* (Masui et al., 2009; Silva et al., 2008; Masui et al., 2008; Masui et al., 2005a; Masui et al., 2005b; Masui et al., 2003; Masui et al., 2002), *Clibanarius vittatus* (Gonçalves et al., 2006), *Macrobrachium olfersii* (Mendonça et al., 2007; Furriel et al., 2004; Furriel et al., 2001; Furriel et al., 2000), *Dilocarcinus pagei* e *Macrobrachium amazonicum* (Belli et al., 2009; Santos et al., 2007). A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ será preparada a partir do tecido branquial dos animais capturados em seus habitats ou aclimatados a diferentes salinidades. Com isso, pretende-se estudar a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial no sentido de contribuir para uma melhor compreensão das adaptações fisiológicas e bioquímicas associadas à ocupação desses diferentes ambientes. Na nossa opinião, esse estudo, além de contribuir para a elucidação de importantes aspectos sobre a evolução, relação filogenética e a conquista do ambiente dulcícola/terrestre, poderão contribuir ainda para o estabelecimento de um modelo dos mecanismos de regulação osmótica, a longo prazo, que atuam nos crustáceos decápodes.

Paralelamente, estudos de caracterização cinética da V-ATPase também encontrada no tecido branquial de crustáceos capazes de adaptar-se à água doce poderão contribuir para o esclarecimento do papel desta enzima no processo osmorregulatório de animais deste grupo.

Contribuição do trabalho para o tema em estudo

O trabalho que está inserido no projeto *$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de microssoma de brânquias de crustáceos: um marcador molecular para avaliar a adaptação a*

biótopos de diferentes salinidades foi iniciado em 1997, com a caracterização bioquímica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*. O estudo sistemático realizado com a enzima mostrou que as suas características cinéticas são consistentes com o modelo proposto para a captura de íons Na^+ através do epitélio branquial deste animal em água doce e que, a baixa afinidade aparente da enzima por Na^+ pode refletir a recente invasão desse ambiente por este animal (Furriel et al., 2000).



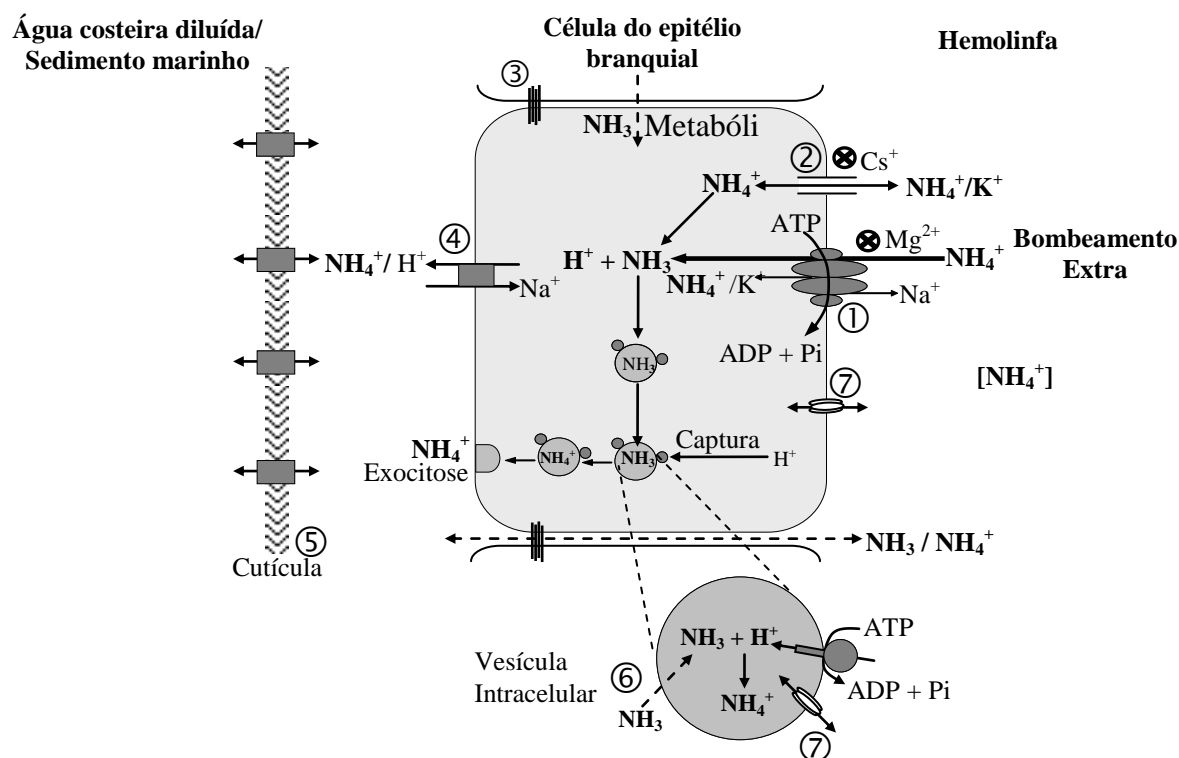
Painel 7. Representação do ambiente aquático e a distribuição de espécies de crustáceos aquático encontrados no Estado de São Paulo que estão sendo estudadas no nosso laboratório.

Foi mostrado também que além da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, no tecido branquial existe uma V-ATPase que corresponde à cerca de 18% da atividade ATPase total. Aparentemente essa V-ATPase desempenha um papel crucial para a captura de íons a partir do meio externo nos crustáceos capazes de adaptar-se à água doce. Resultados recentes de nosso laboratório mostraram que uma V-ATPase também está presente no tecido branquial do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri*, correspondendo a 18% da atividade ATPase total da fração microsomal (Leone et al., 2005b). Este fato sugere que nesse camarão marinho essa V-ATPase pode apresentar uma função distinta daquela proposta para os caranguejos.

A utilização do substrato sintético p-nitrofenilfosfato permitiu caracterizar a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase do tecido branquial de *M. olfersii* demonstrando que ele pode ser usado em estudos comparativos de osmorregulação apresentando uma excelente correlação com a atividade ATPase da enzima (Furriel et al., 2001).

A (Na^+,K^+) -ATPase também foi caracterizada no tecido branquial do siris portunídeo *Callinectes danae* e, ao contrário do que tem sido relatado para as (Na^+,K^+) -ATPases dos invertebrados, a enzima apresenta um sítio de alta afinidade para o ATP similarmente à enzima dos mamíferos e também é estimulada sinergisticamente pelo K^+ e NH_4^+ (Masui et al., 2002). Este fato pode ter um importante significado fisiológico do ponto de vista do processo de excreção de amônio pelos crustáceos, que ocorre através das brânquias (Furriel et al., 2004), e é coerente com o modelo proposto para outros caranguejos estuarinos. O estudo da modulação da atividade da enzima por diferentes cátions revelou que a (Na^+,K^+) -ATPase pode ter um importante papel na excreção de amônia e resultou na proposição de um modelo que é mostrado no **Painel 8** (Masui et al., 2005a). Embora o efeito sinérgico desses íons não tenha sido observado para a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase desses animais (Masui et al., 2005b), a análise por Western blot de preparações de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15‰ revelou um aumento expressivo da (Na^+,K^+) -ATPase comparado com a de animais aclimatados a 33‰ (Masui et al., 2005b).

Finalmente, a caracterização cinética da (Na^+,K^+) -ATPase de siris *C. ornatus* recém capturados, mostrou uma estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ , porém com um mecanismo de excreção diferente do apresentado em *C. danae*, demonstrando possuir um ajuste mais fino para esse mecanismo (Garçon et al., 2007). A estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ também foi observada utilizando PNPP como substrato, um dado inédito na literatura, que pode ter um importante significado fisiológico.



Painel 8. Modelo hipotético para a excreção ativa de amônia através das brânquias do siri eurialino *Callinectes danae*.

① A principal força bombeadora para o transporte de NH_4^+ para fora da célula é a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase localizada na membrana basolateral. Em adição, uma força extra-bombeadora inibida por magnésio para a excreção de NH_4^+ está representada por um segundo sítio de NH_4^+ , o qual aparece quando a bomba é completamente saturada por K^+ . ② Canais de K^+ sensíveis a Cs^+ localizados na membrana basolateral não distinguem entre K^+ e NH_4^+ . ③ Junção Septada. ④ Transportador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+(\text{H}^+)$, particularmente ativo durante a excreção transcelular de NH_4^+ . ⑤ Presumivelmente, estruturas semelhantes a canais, sensíveis a amiloride e permeáveis a cátions na cutícula permitem a difusão de NH_4^+ para o meio externo. ⑥ A NH_3 citoplasmática é difundida para dentro das vesículas contendo uma bomba de prótons (V-ATPase), o qual acidifica seu interior levando a formação de NH_4^+ . A NH_3 é excretada para o espaço subcuticular via exocitose. ⑦ Um tipo de proteína semelhante a encontrada em rhesus, um suposto transportador de amônia de localização desconhecida pode sustentar o mecanismo vesicular de captura ácida. Modificado de Weihrauch et al. (2004).

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- i) preparação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase do tecido branquial de animais mantidos a salinidade de 21‰ e a 33 ‰ (controle);
- ii) caracterização cinética da atividade K^+ -fosfatase com relação aos ligantes: sódio, potássio, magnésio e amônio;
- iii) caracterização cinética da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase com relação aos ligantes: sódio, potássio, magnésio e amônio;
- iv) efeito de poliaminas na atividade da enzima;
- v) medida da concentração iônica e osmolalidade da hemolinfa;
- vi) determinação da sequência de nucleotídeos para a subunidade α ;
- vii) diferença na expressão da subunidade α durante a aclimação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

ATP (sal de Tris), p-nitrofenilfosfato (PNPP), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico (Hepes), imidazol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, ortovanadato de sódio, tapsigargina, aurovertina B, bafilomicina A₁, alameticina, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT), ácido etacrínico, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD⁺, NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 3-fosfogliceraldeído dietil acetal e padrão de peso molecular para eletroforese (30-200 KDa) foram adquiridos da Sigma. Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Merck. O coquetel de inibidores de protease (leupeptina 5 µmol L⁻¹, antipaina 5 µmol L⁻¹, benzamidina 1 mmol L⁻¹ e pepstatina A 1 µmol L⁻¹) foi adquirido da Calbiochem. O anticorpo monoclonal α5 contra a subunidade α da (Na,K)-ATPase de aves (todas as isoformas) foi adquirido do Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA). O anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adquirido da Promega Corporation (USA). A resina AG50WX-8 foi adquirida da Biorad (USA). Trizol, Superscript II e Oligo (dT)₁₂₋₁₈ foram adquiridos da Invitrogen. SYBR Green foi adquirido da Applied Biosystems. DNase foi adquirida da Promega (Madison, USA). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água tratada sucessivamente em aparelhos MilliRO e MilliQ (Millipore Co.,USA).

3.1. Coleta e aclimação dos animais

Machos e fêmeas adultos de siri *Callinectes ornatus* foram coletados na baía de Ubatuba (23°26'S, 45°02'W) no litoral norte do estado de São Paulo. Os animais foram transportados e aclimatados em laboratório por um período de 10 dias em tanques a 25°C, contendo água a salinidade de 33‰ e 21‰. A salinidade da água foi ajustada pela diluição da água do mar (33‰) com água deionizada, sendo monitorada periodicamente com um refratômetro PZO-RL3 (Warszawa, Poland). Os animais foram alimentados em dias alternados com pedaços de camarão.

3.2. Coleta da hemolinfa dos animais.

Amostras da hemolinfa ($\approx 200 \mu\text{L}$) de cada animal aclimatado a salinidade de 21‰ em diferentes intervalos de tempo foram coletadas com uma seringa de insulina.

3.3. Dissecção das brânquias

Para cada homogeneizado foram sacrificados de 5 a 7 animais. Esses animais foram anestesiados por resfriamento em gelo picado e imediatamente sacrificados através da retirada completa da carapaça dorsal. Os 6°, 7° e 8° pares de brânquias posteriores foram removidos, utilizando pinça de ponta curva, e transferidos rapidamente para 10 mL de tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo sacarose 250 mM, EDTA 6 mM e um coquetel de inibidores de proteases contendo benzamidina 1 mM, antipaina 5 μM , leupeptina 5 μM e pepstatina A 1 μM). A solução foi mantida em banho de gelo até o momento do uso.

3.4. Preparação da fração microsomal do tecido branquial

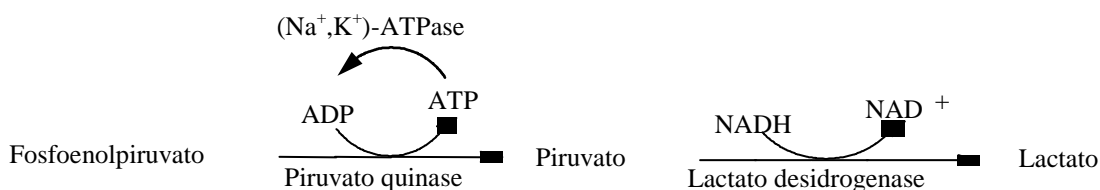
O excesso de tampão foi retirado para a pesagem das brânquias. Após a adição de tampão de homogeneização (Imidazol 20 mM, pH 6,8 contendo sacarose 250 mM, Tris 6 mM e EDTA 6 mM) as brânquias (20 mL/g de tecido úmido) foram cortadas e homogeneizadas em um homogeneizador Potter, ajustado para 600 rpm. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g durante 35 minutos, a 4°C, em uma centrífuga Sorval RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o *pellet* resultante foi novamente homogeneizado em volume de tampão igual ao inicialmente empregado e submetido à nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram misturados e a suspensão resultante foi centrifugada a 100.000 g durante 2 horas, a 4°C em uma ultracentrífuga Hitachi 55P-72. O *pellet* resultante (fração microsomal) foi ressuspenso em um volume adequado de tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo sacarose 250 mM (6 mL/g de tecido úmido). Alíquotas de 0,5 mL foram congeladas em nitrogênio líquido (ou mistura de gelo seco/acetona) e armazenadas a -20°C por um período não superior a 3 meses sem perda significativa da atividade.

3.5. Determinação da atividade PNPPase da fração microsomal

A atividade PNPPase foi determinada continuamente, a 25°C, através da liberação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon_{410\text{ nm, pH }7,5} = 13.160\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas (Furriel et al., 2001). As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 ou 7 mmol L⁻¹ e KCl 5 ou 10 mmol L⁻¹, para *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33% respectivamente, em um volume final de 1 mL. A atividade também foi determinada nas condições descritas acima, porém na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹. A diferença entre os valores obtidos na ausência e na presença de ouabaína representa a atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles sem adição de enzima foram empregados com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em duplicata utilizando-se três diferentes preparações (N= 3). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto.

3.6 . Determinação da atividade ATPase

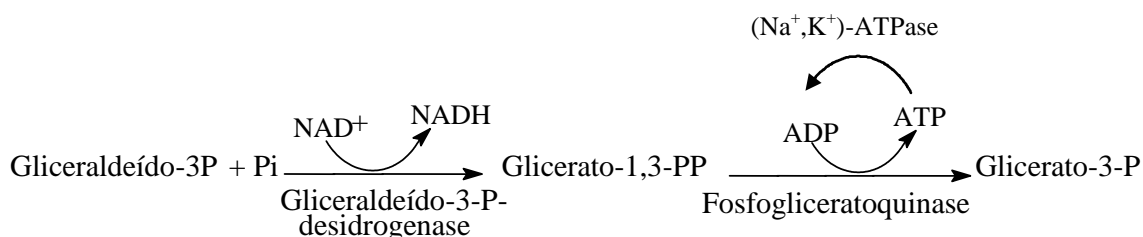
A atividade ATPase foi determinada continuamente, a 25°C, empregando o sistema de associação PQ/LDH, nesse sistema a hidrólise do ATP é acoplada a oxidação do NADH (Rossi et al., 1978).



A oxidação do NADH a NAD⁺ foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{ nm, pH }7,5} = 6200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas. As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 ou 1,0 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 ou 2,0 mmol L⁻¹, KCl 5 ou 10 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U de PQ e

94 U de LDH, para *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ e 33‰, respectivamente, em um volume final de 1 mL.

A atividade enzimática também foi medida utilizando o sistema de associação GAFDH/FGQ e a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD^+ .



A formação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 0,5 ou 1,0 mmol L^{-1} , MgCl_2 0,7 ou 2,0 mmol L^{-1} , KCl 5 ou 10 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , NAD^+ 2,17 mmol L^{-1} , fosfato de sódio 1 mmol L^{-1} , gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1} , 12 U GAFDH e 9 U FGQ, para *Callinectes ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ respectivamente, em um volume final de 1 mL. A atividade ATPase insensível à ouabaína foi determinada nas mesmas condições descritas acima mas em presença de ouabaína em concentração suficiente para inibir completamente a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (3 mmol L^{-1}). A diferença entre a atividade ATPase total (medida na ausência de ouabaína) e a atividade ATPase insensível à ouabaína corresponde à atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal.

A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação e controles sem adição de enzima foram empregados com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por min, em condições padrões. Todos os experimentos sempre foram feitos em duplicata usando-se pelo menos três preparações diferentes. A atividade ATPase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C (Gostimskaya et al., 2003). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se na fração microsomal existem vesículas seladas.

3.7. Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento

Suspensões cristalinas (500 μL) de LDH e PQ foram centrifugadas a 20.000 g, a 4°C, durante 15 min em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O pellet foi ressuspensão em 500 μL de Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5 e após ser transferido para um filtro Microcon YM-10 foi lavado 5 vezes com o mesmo tampão através de centrifugação a 14.000 g, a 4°C, durante 15 min para completar a remoção de íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, o pellet foi ressuspensão em 500 μL de tampão Hepes 50 mM pH 7,5. Para o sistema FGQ e GA FDH, a suspensão foi tratada exatamente como descrito acima exceto que o tampão utilizado foi Trietanolamina 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo DTT 1 mmol L^{-1} .

3.8. Preparação da solução de ATP.

A solução estoque de ATP (100 mmol L^{-1}) foi preparada utilizando ATP sal de Tris. Esta solução foi neutralizada até pH 7,5 com trietanolamina ($d = 1,12 \text{ g mL}^{-1}$) e a sua concentração foi acertada através da determinação da absorbância em 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 7,0} 15.400 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9. Preparação da solução de ortovanadato

A solução estoque de ortovanadato de sódio 1 mM foi preparada de acordo com Gordon (1991). Uma solução de concentração aproximada de 1 mmol L^{-1} , teve seu pH acertado em 10,0 e em seguida foi fervida em banho-maria até ficar translúcida. Após resfriamento, o pH dessa solução foi novamente reajustado em 10,0 e a concentração final da solução foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 10,0} = 3.550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Finalmente, após ajustar a concentração para 1 mmol L^{-1} , alíquotas de 1 mL foram congeladas em frascos plásticos e estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.10. Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada através do procedimento descrito por Read & Northcote (1981), usando soralbumina bovina como padrão.

3.11. Preparação do gliceraldeído-3-fosfato

A solução de gliceraldeído-3-fosfato 20 mmol L^{-1} , foi preparada imediatamente antes do uso através da hidrólise de 12,5 mg de 3-fosfogliceraldeído dietil em 1 mL de água ultrapura, com 75 μL de HCl concentrado ($d = 1,18 \text{ g mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em banho de água fervente durante 2 min e finalmente neutralizada até pH 7,5 com 25 μL de trietanolamina ($d = 1,12 \text{ g mL}^{-1}$).

3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida (5 a 20%) conforme descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, metade do gel foi submetida a uma eletrotransferência e a outra foi corada com nitrato de prata. O padrão de peso molecular empregado foi Full-Range Rainbow GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

3.13. Western blotting

Após a eletroforese (SDS-PAGE), metade do gel foi submetida a eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). A membrana foi incubada por 10h, a 25°C , numa solução bloqueadora de leite desnatado 5 % em tampão TBS-Tween (Tris/HCl 50 mmol L^{-1} , pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol L^{-1} e Tween 20 0,05 %), sob agitação. Terminado este período, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBS-Tween e a seguir adicionou-se o anticorpo monoclonal α -5 (dilução 1:10 na mesma solução), procedendo-se a nova incubação, por 16h a 5°C . Após três lavagens em tampão TBS-Tween a membrana foi incubada por 1h a 25°C com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:7500 no mesmo tampão). A incorporação específica de anticorpo foi revelada em Tris/HCl 100 mmol L^{-1} , pH 9,5, contendo NaCl 100 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NBT $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e BCIP $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$.

3.14. Determinação da dosagem de íons e osmolalidade na hemolinfa dos animais.

Cerca de 10 μL de amostra de hemolinfa foi diluída (1: 1000) em HCl 1%. A dosagem de íons na hemolinfa foi realizada através do método de absorção atômica. Foram utilizadas variadas concentrações conhecidas de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} na construção da curva padrão para cada íon, sendo adicionado em cada padrão CsCl 5 % a

fim de eliminar interferência de ionização. Para a análise dos íons de cada hemolinfa de animais distintos e aclimatados a 21 %, foi adicionado CsCl 5% e houve a adição de Ln 5% com a finalidade de eliminar interferência química. Na determinação da quantidade de íons presente na hemolinfa utilizou-se o espectrômetro de absorção atômica/emissão de chamas Shimadzu A-A680 acoplado a um registrador Shimadzu PR-5 Graphic printer. Para a medida da osmolalidade foram utilizados 10 µL de amostra em um osmômetro de pressão a vapor (Wescor, Modelo 5500). As determinações foram feitas em duplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes, com hemolinfa de diferentes animais mantidos na mesma condição.

3.15. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

Uma alíquota da fração microsomal (0,5 mL) contendo aproximadamente 4 mg de proteína foi aplicada sobre um gradiente contínuo de 10 a 50% (p/p) de sacarose em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8 e centrifugada a 180.000 g em uma centrífuga Hitachi 55P-72 usando um rotor vertical (PV50T2), durante 2 h, a 4°C. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A concentração de proteína presente em cada fração foi determinada e a percentagem de sacarose também foi realizada, empregando um refratômetro de bancada RL3 (PZO, Poland). As análises das atividades foram efetuadas imediatamente após a coleta das frações.

3.16. Tratamento dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos V (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis-Mentem), K_{0,5} (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram calculados empregando o programa Sigraf (Leone et al., 2005a). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_I) foram determinadas graficamente conforme descrito por Dixon (1953). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos empregando-se três diferentes preparações de frações microsomais (N=3). Os parâmetros cinéticos apresentados no texto e nas tabelas são valores calculados e representam a média ± desvio padrão. Cada figura apresentada corresponde a uma curva representativa de cada experimento realizado.

3.17. Obtenção de brânquias para extração de RNA total de *C. ornatus*

Cada animal foi anestesiado por resfriamento em gelo picado e imediatamente sacrificado através da retirada completa da carapaça dorsal. Os 6° e 7° pares de brânquias posteriores foram removidos, e colocados imediatamente em uma solução de Trizol para extração de RNA total (Invitrogen, Califórnia, EUA), mantida em gelo. Todo o procedimento ocorreu com a utilização de luvas e pinça esterilizadas para evitar contaminação do material com RNase.

3.18. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de cada brânquia separadamente. A brânquia foi homogeneizada com o auxílio de uma ponteira de micro-pipeta e armazenada no freezer a -80°C para extração de RNA. A brânquia em TRIzol® mantida no freezer a -80°C foi retirada e deixada na bancada para descongelar, em seguida o material foi centrifugado durante 10 min à 4°C e 12.000 g e a extração foi efetuada de acordo com procedimentos padrões do Laboratório de Biologia e Genética de Desenvolvimento de Abelhas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder (Azevedo & Hartfelder, 2008) e segundo a orientação do fabricante (protocolo TRIzol®-Invitrogen). Esse procedimento é eficiente para a extração de quantidades limitadas de material disponível. O RNA total extraído foi estocado em freezer a -80 °C.

3.19. Quantificação da concentração de RNA total

A concentração do RNA total foi estimada espectrofotometricamente à 260 nm e 280 nm e a pureza do RNA foi considerada adequada quando a relação 260/280 nm atingiu valores entre 1,4 - 1,7.

3.20. Confeção do perfil de cDNA (Transcrição reversa)

Anteriormente a síntese do perfil de cDNA, 1µg de RNA total foi tratado com 1 U de DNase (DnaseI, Invitrogen) por 1h a 37°C e em seguida a 65°C por 15 min, para desnaturar a enzima, seguindo protocolo do fabricante. Os perfis de cDNA de fita simples de cada amostra foram sintetizados a partir do 1 µg do RNA total, tratado com DNase, por incubação com 200 unidades de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) e 0,8 mmol L⁻¹ de primers oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen). Após a confecção

dos perfis os mesmo serviram como molde nas reações de RT-PCR semi-quantitativa e quantitativa.

3.21. Sequenciamento parcial dos genes codificadores da (Na⁺, K⁺)-ATPase e RPL10

Uma vez que as sequências de nucleotídeos correspondentes aos genes (Na⁺, K⁺)-ATPase e RPL10, em *C. ornatus* não estão disponíveis em nenhum banco de dados, as mesmas tiveram que ser obtidas para posteriores análises moleculares.

Para obtenção de uma sequência de nucleotídeo do gene codificador da proteína (Na⁺, K⁺)-ATPase foi sequenciado um fragmento de DNA, produto da amplificação por RT-PCR do perfil de cDNA (da 6ª brânquia do animal aclimatado a 33‰ de salinidade) com primers degenerados baseados em seqüências conservadas da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase, utilizado com sucesso em caranguejos (Towle et al., 2001).

Para obtenção de uma sequência de nucleotídeo do gene codificador da proteína ribossomal L10 (RPL10) foi sequenciado um fragmento de DNA, produto da amplificação do mesmo perfil de cDNA descrito acima com primers específicos para *Callinectes sapidus*, obtidos da literatura (Wynn, et al., 2004) e já utilizado com sucesso para *M. amazonicum* (Faleiros, 2007).

Os fragmentos de DNA obtidos foram submetidos a alinhamentos BLAST contra a assembléia de banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmação das suas respectivas identidades.

3.22. Desenho de primers específicos

Primers específicos para os genes de interesse foram desenhados utilizando dois programas diferentes, a fim de garantir uma boa qualidade dos mesmos. Os programas utilizados foram o Primer3, versão 4.0, disponível na rede <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> e o programa Gene Runner versão 3.05.

Os primers foram desenhados sob as sequências obtidas no item 3.21 e apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers degenerados e específicos empregados para amplificar a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a sequência dos primers, baseados na sequência de *Callinectes sapidus* e específicos para *C. ornatus*, para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10, utilizado como controle interno de reação.

Gene	Primers	Sequência	Temperatura de anelamento
$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$	NaK_10F	ATGACIGTIGCICAYATG	50
$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$	NaK_16R	GGRTGRTCICCI GTIACCAT	50
$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$	NaK_Co_F	GGCATCAGCATCAAAAGGAT	60
$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$	NaK_Co_R	TTGGGATGAGGAGATGAAGG	60
RPL10	RPL10_Cs_F	AAGAACTGCGGCAAGGACCAGTTCC	50
RPL10	RPL10RCs_R	CGGTCAAACCTTGGTAAAGCCCCACTT	50
RPL10	RPL10_Co_F	CAAGGACCAGTTCCATGTCC	60
RPL10	RPL10_Co_R	ATTTGAACCCTGGCTACCG	60

Os primers foram desenhados sob as sequências obtidas no item 3.21. A sequência dos *primers* degenerados e específicos empregados para amplificar a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a sequência dos primers, baseados na sequência de *Callinectes sapidus* e específicos para *C. ornatus*, para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10, utilizado como controle interno de reação.

3.23. RT-PCR (semi-quantitativa)

Para amplificação dos transcritos por RT-PCR utilizamos Taq DNA Polymerase (GE Healthcare), dNTP mix (Promega) e os primers degenerado para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e específico para RPL10 de *C. sapidus*. As reações continham os seguintes componentes, em um volume final de 25 μL :

2,5 μL – 10X PCR buffer (GE Healthcare)

0,5 μL – Nucleotídeo Mix (10 mM cada)

1 μL – Primer NaK_10F ou RPL10_Cs_F (100 pmol/ μL)

1 µL – Primer NaK_10R ou RPL10_Cs_R (100 pmol/µL)

0,2 µL – Taq Polymerase (GE Healthcare)

18,8 µL – H₂O autoclavada

1 µL – cDNA (6ª brânquia aclimatado a 33‰)

A reação de PCR foi efetuada em um termociclador PTC*200 (MJ Research) e o programa de amplificação usado foi:

- 1) 94 °C - 5 minutos;
- 2) 94 °C - 45 segundos;
- 3) 50 °C - 45 segundos;
- 4) 72 °C - 1 minuto;
- 5) vai para 2 (39 vezes)
- 6) 72 °C - 10 minutos;
- 7) 4°C - tempo indeterminado.

3.24. Preparação das células quimiocompetentes.

Células competentes foram obtidas a partir de células bacterianas *E.coli*, da linhagem DH5α, seguindo o protocolo do manual de laboratório de Sambrook et al. (1989). Foram inoculados 5 mL de meio LB (Luria Bertani) com células DH5α (-80°) e crescidas à 37°C sob agitação (250 rpm) durante a noite. Para expansão, uma alíquota de 50 µl do cultivo líquido foi inoculado em 50 mL de meio LB e deixado para crescer à 37°C sob agitação de 250 rpm, até atingir uma absorbância de aproximadamente 0,3 – 0,4 em 595 nm. Após atingir a absorbância desejada a amostra foi alíquotada em tubos estéreis Corex e centrifugada a 6000 rpm durante 5 min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado de um dos tubos ressuspensionado em 5 mL de CaCl₂ 0,1M. Após ressuspender o primeiro tubo, o conteúdo foi passado para o próximo tubo, para ressuspender-lo, e assim por diante até o ultimo tubo. Após ressuspender todos os precipitados, a amostra foi centrifugada a 6000 rpm durante 5 min à 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspensionado com 5 mL de CaCl₂ 0,1M contendo 15% de glicerol. A solução contendo as células competentes foi alíquotada em

tubos de crioproteção (250 µL) e congelada à -80°C. Toda a vidraria e soluções utilizadas foram autoclavadas à 120°C durante 45 min.

3.25. Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos obtidos por amplificação com os pares de primers NaK degenerados e RPL10 foram analisadas em gel de agarose 1,2%. As bandas foram retiradas do gel e o DNA purificado com a utilização do kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante. A inserção dos fragmentos em vetor pGEM-T (kit pGEM-T Easy Vector®, Promega) foi feita de acordo com o protocolo do fabricante. A transformação das células competentes ocorreu por choque térmico (30 min no gelo - 1 min à 42°C - gelo). Após a transformação as células foram incubadas à 37°C durante aproximadamente 2 hs em meio líquido LB sem penicilina. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar (1,5%) contendo Ampicilina (USB; 100 µg/mL), X-Gal (5-Bromo-chloro-3 indolyl-B-D-Galactoside- USB; 4 µg/mL), de maneira que apenas as células transformadas se desenvolveram no meio. As colônias transformadas contendo os fragmentos (colônias brancas) foram selecionadas e cultivadas, em tubos Falcon de 15 mL, overnight à 37°C, sob agitação, em meio LB líquido com ampicilina (40 mg/mL).

Os vetores contendo os fragmentos foram retirados das células competentes utilizando-se o kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Para verificar a presença do inserto o plasmídeo foi clivado com a enzima EcoRI (digestão de 8µl de DNA por 2 horas à 37°C) e analisado em gel de agarose 1,2% com tampão 1x TBE, corado com brometo de etídio.

Os clones que possuíam o inserto foram submetidos à reação de PCR com o mix Big dye terminator (Perkin Elmer) utilizando os primers universais M13 forward (5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') ou M13 reverse.(5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), seguindo o método de Sanger. O DNA resultante da PCR foi transferido para microtubos de 1,5 mL e precipitado por adição de 40 µL de isopropanol 75% para cada volume de 10 µL de reação. Após uma breve agitação os microtubos foram deixados 15 min à temperatura ambiente e em seguida foram centrifugados à temperatura ambiente por 20 min a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e aos precipitados foram adicionados 250 µL de isopropanol 75%. As amostras foram agitadas rapidamente e centrifugadas durante 5 min à 14.000 rpm. Os sobrenadantes

foram retirados e todo o álcool foi evaporado em banho seco à 55°C. Após secagem completa, o DNA foi ressuspensionado em 12 µL da solução Template Suppression Reagent (TSR) (ABI PRISM®, Applied Biosciences). As amostras foram transferidas para tubos de sequenciamento e analisadas em um sequenciador de capilar ABI 310 (Applied Biosciences) e a centrífuga MiniSpin (Eppendorf). As sequências obtidas foram submetidas a análises tipo BLAST contra os bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.26. Análise *in silico*

As sequências obtidas do sequenciamento passaram por um processo de análise VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) que retirou as sequências do vetor pGEN flanked pelos insertos para os genes *rpl10* e (Na⁺K⁺)ATPase.

Em seguida, as sequências isoladas dos insertos foram submetidas a alinhamentos BLASTX, que busca proteínas a partir da sequência de nucleotídeo traduzida, contra os bancos de dados disponíveis no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A confirmação da identidade das sequências foi feita a partir da porcentagem de similaridade, considerando proteínas ortólogas aquelas com mais de 70% de similaridade.

3.27. qRT-PCR (quantitativa)

Estudos de PCR quantitativa foram realizados utilizando a metodologia SYBR Green (Applied Biosystems) em sistema de análise Real-Time PRC 7500 (Applied Biosystems). A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada pela curva de dissociação e por verificação do tamanho predito do fragmento por eletroforese em gel de agarose 1%. A eficiência dos primers foi verificada por diluição serial de amostras de cDNA, sendo considerados eficientes os primers com coeficiente de correlação $r > 0,95$ e com valor de E próximo de 2 [$E = 10^{(-1/\text{slope})}$] (Pfaffl, 2001). Para análise das taxas de expressão relativa do gene (Na⁺, K⁺)-ATPase, os valores obtidos do programa do sistema de análise Real Time PCR foram normalizados pelos valores do gene RPL10 e um valor calibrador predeterminado, média dos ΔCT s das amostras de 0 h da 6ª brânquia, pela fórmula $\text{taxa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001). Todas as amostras foram analisadas

em triplicata experimental e quintuplicata biológica. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes t-student e Anova 2-way com o auxílio do programa GrafPad PRISM, versão 5.0.

Todas as análises foram realizadas no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, no Laboratório de Biologia e Genética de Desenvolvimento de Abelhas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder.

4. RESULTADOS

Callinectes ornatus é um siri eurialino encontrado principalmente em ambientes de salinidade moderada, entre 28 e 30‰ (Mantelatto, 1999). Embora existam relatos que a salinidade limite para essa espécie é próxima a 18‰, altas taxas de mortalidade ocorrem em animais submetidos a essa condição. Assim, foi usada como limite, salinidade de 21‰ e, nessas condições, a aclimação durante 10 dias ocorreu com taxas de mortalidade inexpressíveis. Com o intuito de entender as modificações cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ durante a aclimação desta espécie a ambientes de baixa salinidade, os animais foram mantidos durante um mesmo período de tempo em tanques contendo água a 33‰ e 21‰. Os parâmetros cinéticos da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ e 33‰ foram comparados, eliminando outros fatores interferentes que poderiam influenciar nos resultados se a comparação fosse realizada com o animal recém-capturado.

4.1. Atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}, \text{K})\text{-ATPase}$ branquial de *Callinectes ornatus*

4.1.1. *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ de salinidade

A fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ apresentou uma atividade PNPPase total de aproximadamente 98 U mg^{-1} . A preparação mostrou-se bastante estável quando armazenada a -20°C , não sendo observadas perdas significativas de atividade até 4 meses. No momento do uso, alíquotas foram descongeladas e mantidas em gelo picado e, nessas condições, a atividade manteve-se constante por períodos de até 10 h.

Com o intuito de verificar a existência de vesículas seladas na preparação de membranas, a atividade PNPPase foi determinada na presença e ausência de alameticina. Neste experimento, a enzima foi previamente incubada com o antibiótico durante 10 min a 25°C e a reação foi iniciada pela adição do substrato ao meio reacional. Não foram observadas variações na atividade PNPPase na presença de alameticina o que sugere fortemente a ausência de vesículas na preparação.

O efeito da concentração do PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ está mostrado na Figura 1. Em condições saturantes de Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}) e K^+ (5 mmol

L⁻¹), o aumento da concentração de PNPP resultou em uma única curva de saturação apresentando interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). A atividade específica máxima estimada foi de $69,2 \pm 2,8 \text{ U mg}^{-1}$ e o $K_{0,5} = 2,3 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A inserção da figura mostra que o aumento da concentração do PNPP estimula a atividade PNPPase total até valores próximos a 98 U mg^{-1} e a atividade insensível a ouabaína em aproximadamente 30% da atividade total.

A Figura 2 mostra a modulação da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons magnésio. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}) e KCl (5 mmol L^{-1}), observou-se uma estimulação da atividade K⁺-fosfatase da enzima para concentrações de MgCl₂ entre 10^{-4} e $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, resultando em uma curva de saturação monofásica que apresenta interações sítio-sítio ($n_H = 1,9$). A atividade específica para a estimulação da atividade K⁺-fosfatase foi de $70,1 \pm 3,0 \text{ U mg}^{-1}$ e o $K_{0,5} = 0,88 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. Na inserção da figura observa-se que o aumento da concentração dos íons magnésio estimulam a atividade PNPPase insensível a ouabaína até 29 U mg^{-1} , sugerindo a presença de outra(s) fosfohidrolase(s) na preparação, que são estimuladas por Mg²⁺.

A modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ por K⁺ está mostrada na Figura 3. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}) e MgCl₂ (5 mmol L^{-1}), e na ausência de NH₄⁺, a atividade específica máxima da enzima foi de $V = 69,6 \pm 2,7 \text{ U mg}^{-1}$ e o $K_{0,5} = 1,6 \pm 0,07 \text{ mmol L}^{-1}$. O aumento da concentração dos íons potássio ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) resultou em uma única curva de estimulação com $n_H = 2,0$, sugerindo a ocorrência de interações sítio-sítio. A estimulação da atividade insensível à ouabaína, até valores de $28,6 \text{ U mg}^{-1}$ (4% da atividade K⁺-fosfatase) sugere que outras ATPases diferentes da (Na⁺, K⁺)-ATPase estão presentes na preparação, como a K⁺-ATPase.

A estimulação da atividade K⁺-fosfatase pelos íons amônio está mostrada na Figura 4. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}) e Mg²⁺ (5 mmol L^{-1}) e na ausência de K⁺, a atividade da enzima estimada na presença de NH₄⁺ (10^{-3} a $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) foi de $90,8 \pm 4,0 \text{ U mg}^{-1}$ e a modulação da atividade por meio de interações sítio-sítio ($n_H = 1,9$), com $K_{0,5} = 9,2 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Concentrações de íons amônio superiores a 30 mmol L^{-1} provocaram inibição da atividade enzimática (não mostrado).

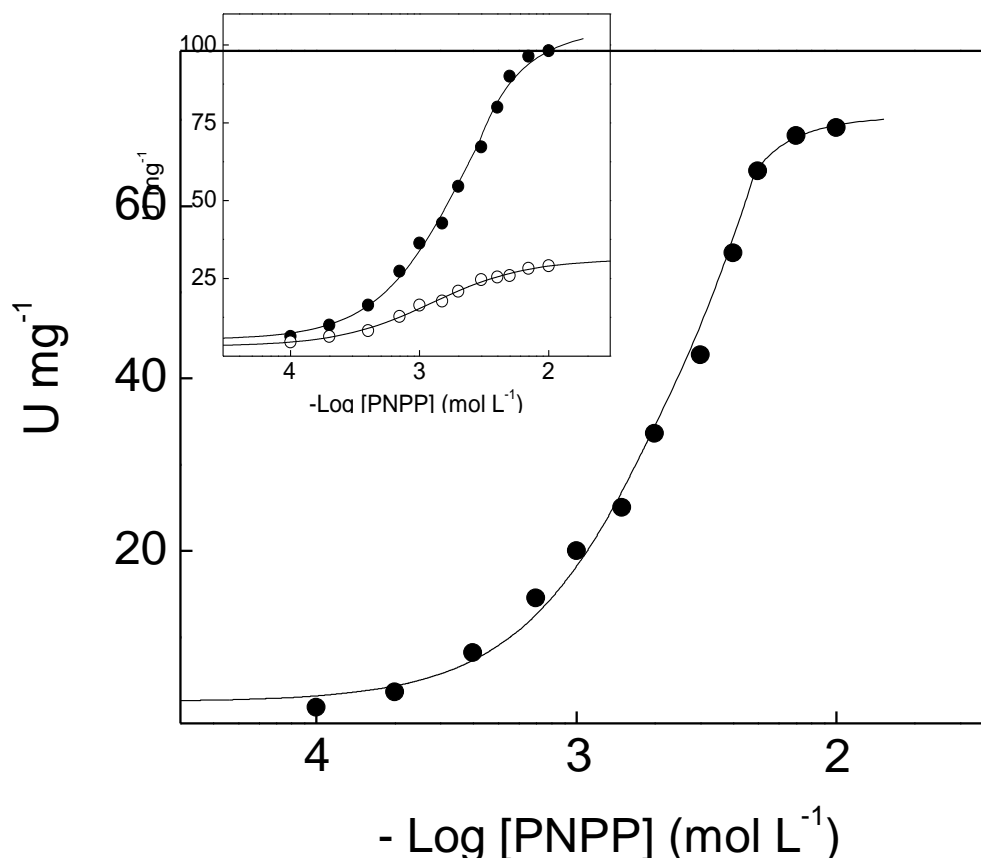


Figura 1. Efeito da concentração de PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 5 mmol L⁻¹ e KCl 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

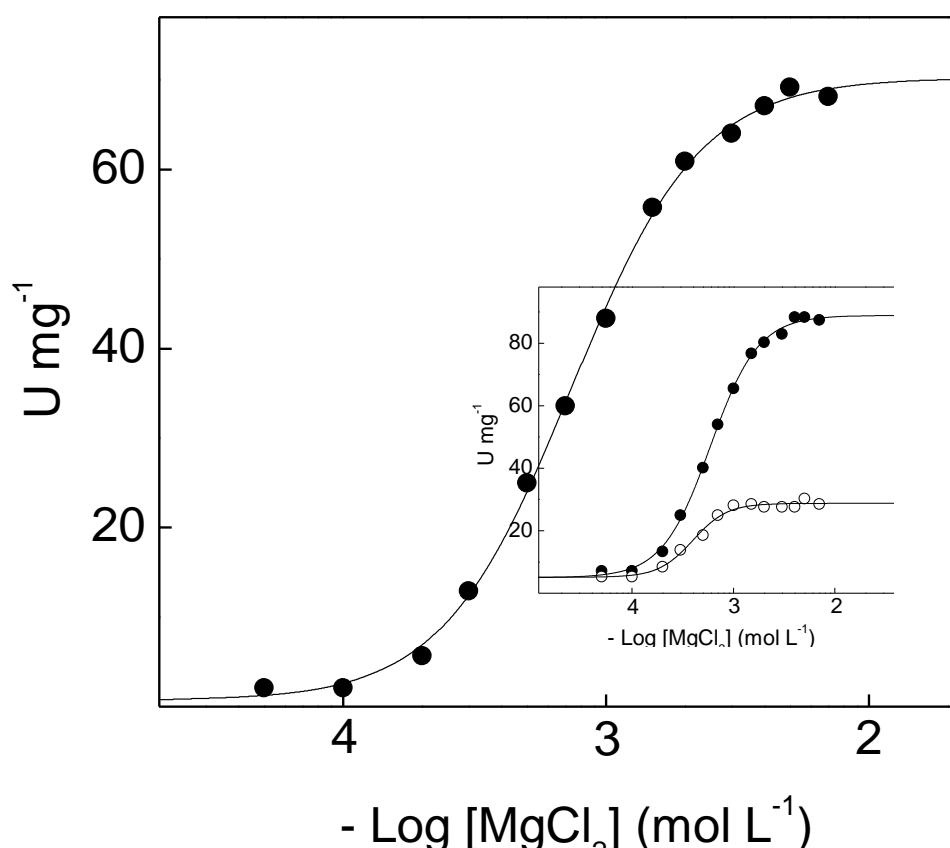


Figura 2. Efeito dos íons magnésio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L^{-1} e KCl 5 mmol L^{-1} . A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

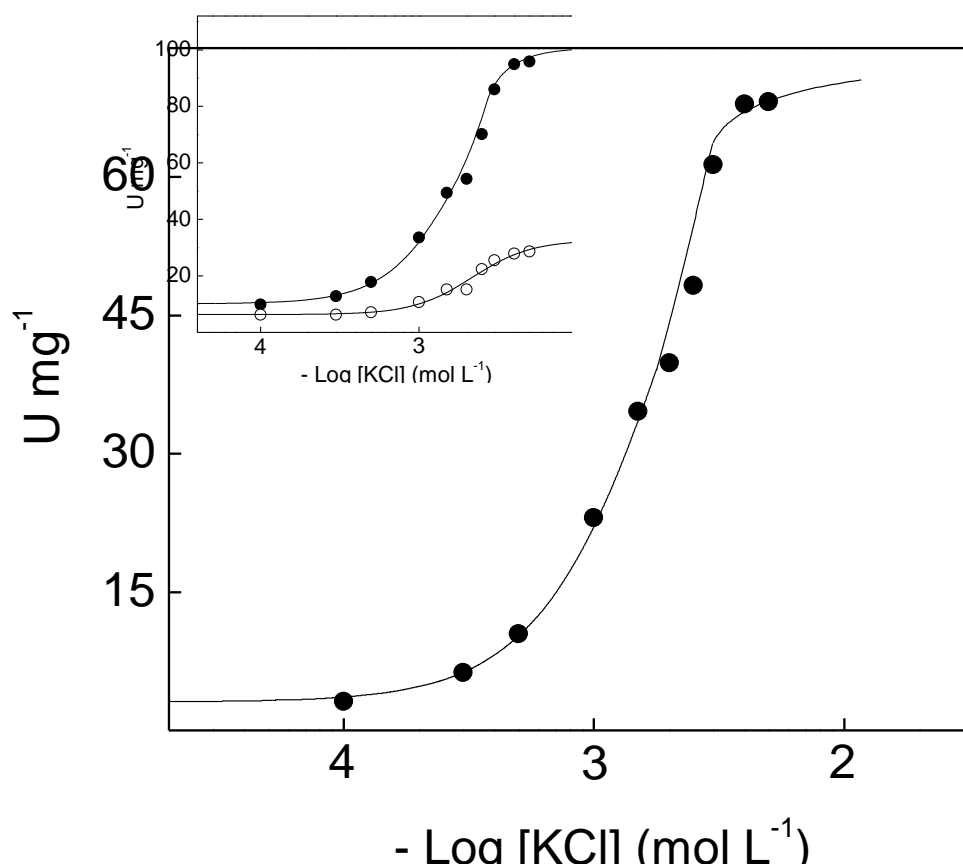


Figura 3. Efeito dos íons potássio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

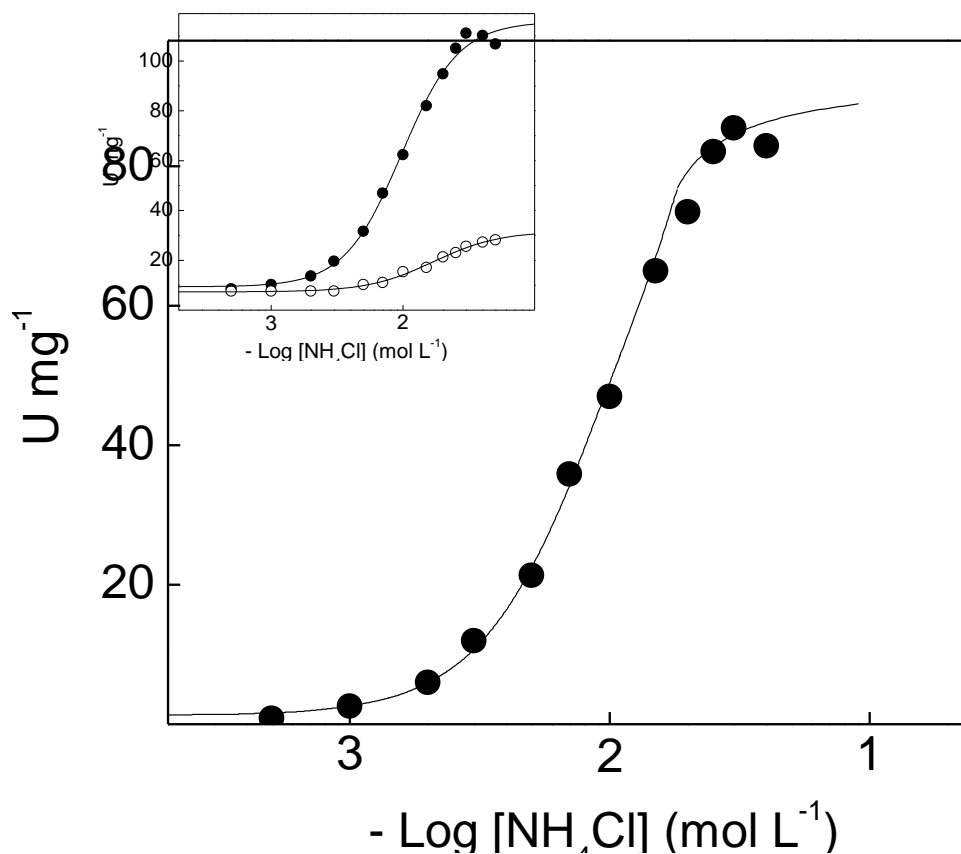


Figura 4. Efeito dos íons amônio na atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

A atividade insensível a ouabaína também foi estimulada por NH_4^+ , na mesma faixa de concentração de NH_4^+ , até valores de $28,2 \text{ U mg}^{-1}$ (inserção da Figura 4), que corresponde a 30% da atividade PNPPase total. Esse resultado sugere a presença de uma ATPase estimulada por NH_4^+ na fração microsomal.

Na Tabela 2 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ de salinidade pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ .

Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ .

Efector	V (U mg^{-1})	$\text{K}_{0,5}$ (mmol L^{-1})	n_H
PNPP	$69,2 \pm 2,8$	$2,3 \pm 0,1$	1,7
Mg^{2+}	$70,1 \pm 3,0$	$0,88 \pm 0,04$	1,9
K^+	$69,6 \pm 2,7$	$1,6 \pm 0,07$	2,0
NH_4^+	$90,8 \pm 4,0$	$9,2 \pm 0,3$	1,9

A modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ por K^+ na presença de concentrações fixas de NH_4^+ está mostrado na Figura 5. Para concentrações fixas de amônio (entre 0 e 30 mmol L^{-1}), a atividade K^+ -fosfatase aumenta cerca de 27%. Isso sugere uma estimulação sinérgica por NH_4^+ e K^+ , uma vez que na ausência de NH_4^+ , a atividade K^+ -fosfatase da ordem de $69,6 \pm 2,8$ aumenta para $88,8 \pm 4,1$ na presença de NH_4^+ 30 mmol L^{-1} . Nessas condições observa-se também uma diminuição importante no valor de $\text{K}_{0,5}$ que passou de $1,60 \pm 0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ para $0,25 \pm 0,01$, embora a hidrólise do substrato ocorra por meio de cooperatividade positiva permaneça como anteriormente.

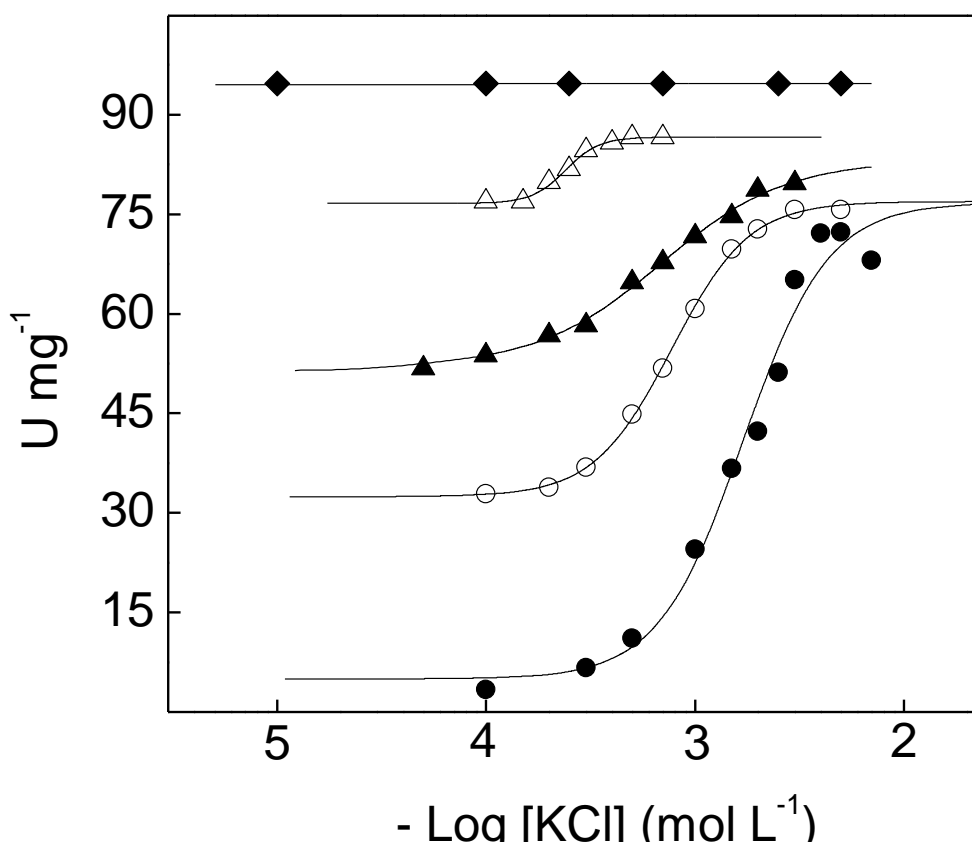


Figura 5. Efeito da concentração dos íons amônio, na modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (n= 3). Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (○) NH₄Cl 5 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (Δ) NH₄Cl 20 mmol L⁻¹. (◆) NH₄Cl 30 mmol L⁻¹.

A análise dos diferentes parâmetros cinéticos determinados para a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ por K^+ , em diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 6. Interações sítio-sítio que apresentavam cooperatividade positiva foram observadas, independente da concentração de NH_4^+ utilizada (Fig. 6A). O aumento da concentração de NH_4^+ no meio de reação provocou uma diminuição de 6,4 vezes no valor do $K_{0,5}$ (Fig. 6B), sugerindo uma maior afinidade da enzima por K^+ na presença de concentrações crescentes de NH_4^+ .

A Figura 7 mostra o efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, na presença de concentrações fixas de íons potássio (0 a 5 mmol L^{-1}). Nestas condições a hidrólise do substrato ocorreu por meio de cooperatividade positiva, com aumento do valor de n_H com o aumento da concentração de K^+ (Fig. 8A). Observa-se também que para concentrações fixas de K^+ , o aumento da concentração dos íons amônio entre 0,1 mmol L^{-1} e 30 mmol L^{-1} , não acarretou variações significativas na atividade específica da enzima: $V = 90,8 \pm 4,0 \text{ U mg}^{-1}$ (para $K^+ = 0$) e $V = 90,1 \pm 4,0 \text{ U mg}^{-1}$ ($K^+ = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) (Fig. 8C). O aumento da concentração de K^+ no meio de reação provocou uma diminuição de aproximadamente 28 vezes no valor de $K_{0,5}$ (Fig. 8B).

Na Tabela 3 foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons potássio e amônio.

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ está mostrado na Figura 9. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}), Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}) e K^+ (5 mmol L^{-1}), a curva obtida sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Observa-se também que para concentrações de ouabaína da ordem de 3,0 mmol L^{-1} a atividade PNPPase da fração microsomal é inibida cerca de 69%. O valor de K_I determinado graficamente foi de $320,0 \pm 9,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da Figura 9).

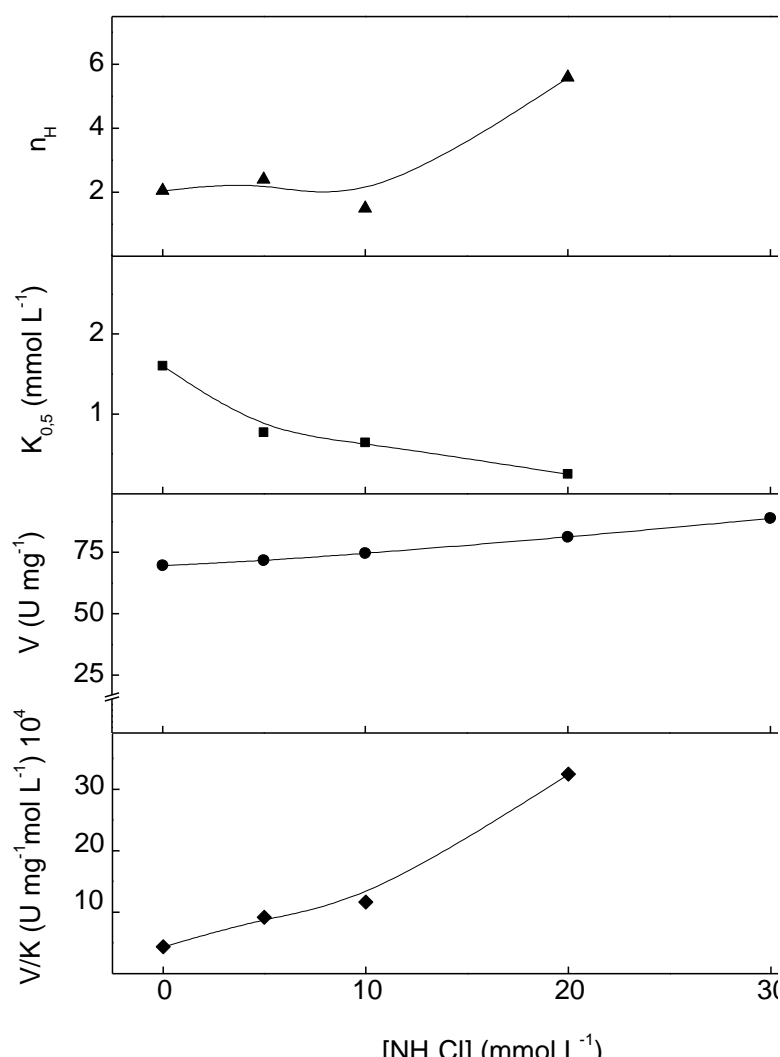


Figura 6. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. Cada ponto da figura corresponde a uma curva de saturação compreendendo pelo menos 10 concentrações do substrato necessários para determinar V , $K_{0.5}$ e n_H . Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

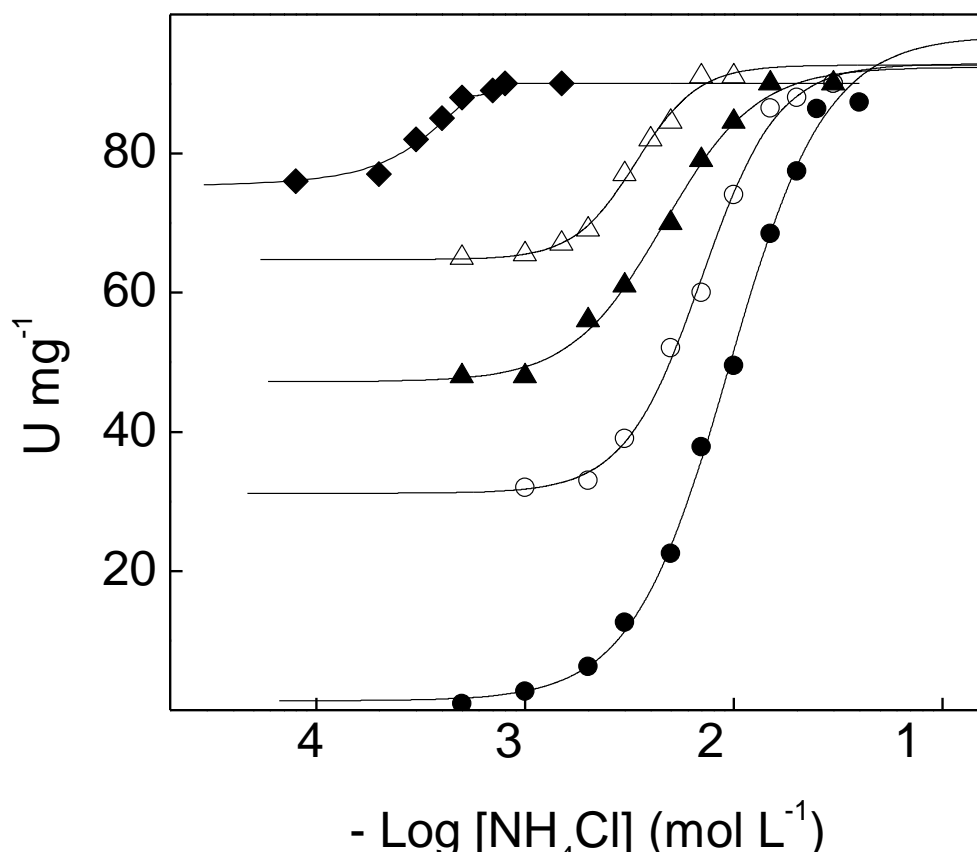


Figura 7. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três (N= 3) diferentes homogeneizados de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (○) KCl 1 mmol L⁻¹. (▲) KCl 2 mmol L⁻¹. (△) KCl 3 mmol L⁻¹. (◆) KCl 5 mmol L⁻¹.

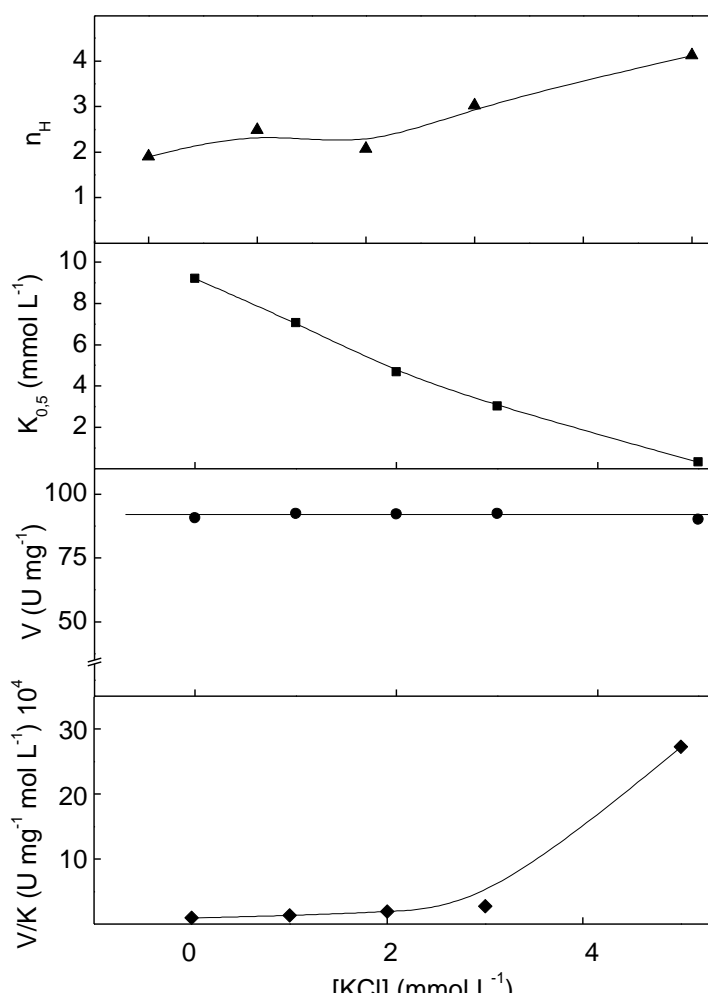


Figura 8. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 5 mmol L⁻¹. Cada ponto da figura corresponde a uma curva de saturação compreendendo pelo menos 10 concentrações do substrato necessários para determinar V , $K_{0.5}$ e n_H . Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ de salinidade pelos íons potássio e amônio.

$[K^+]$ (mmol L ⁻¹)	$[NH_4^+]$ (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mmol L ⁻¹)	n_H	V/K (U mg ⁻¹ mol L ⁻¹)
Variável	0	69,6 ± 2,8	1,60 ± 0,07	2,0	43500
Variável	5	71,8 ± 3,2	0,78 ± 0,03	2,4	92051
Variável	10	74,6 ± 3,5	0,64 ± 0,02	1,5	116562
Variável	20	81,2 ± 3,7	0,25 ± 0,01	5,6	324800
Variável	30	88,8 ± 4,1	-	-	-
0	Variável	90,8 ± 4,0	9,2 ± 0,4	1,9	9869
1	Variável	92,5 ± 4,4	7,0 ± 0,3	2,5	13214
2	Variável	92,2 ± 4,2	4,7 ± 0,2	2,1	19617
3	Variável	92,4 ± 4,3	3,4 ± 0,2	3,0	27176
5	Variável	90,1 ± 4,0	0,33 ± 0,01	4,1	273030

O efeito do aumento da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, na presença de NH_4^+ 30 mmol L⁻¹, é mostrado na Figura 10. Na presença de concentrações saturantes de PNPP (10 mmol L⁻¹), Mg^{2+} (5 mmol L⁻¹), K^+ (5 mmol L⁻¹) e NH_4^+ (30 mmol L⁻¹), a inibição pela ouabaína também ocorreu por meio de uma simples curva, sugerindo a presença de um único sítio de fixação para o inibidor e a inibição foi 73,3%, sugerindo que os NH_4^+ não influenciam a ação da ouabaína. Da mesma forma, o valor do K_I , da ordem de $240,0 \pm 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da Figura 10), não sofreu mudanças significativas na presença de NH_4^+ .

Na Figura 11 é mostrado o efeito da concentração do Na^+ sobre a atividade PNPPase da fração microsomal de tecido branquial *C. ornatus* aclimatado a 21‰. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L⁻¹), K^+ (5 mmol L⁻¹) e Mg^{2+} (5 mmol L⁻¹), os íons sódio inibiram 90,8% da atividade PNPPase total. O valor do K_I calculado para a inibição da atividade PNPPase pelos Na^+ foi de $9,2 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (inserção Figura 11).

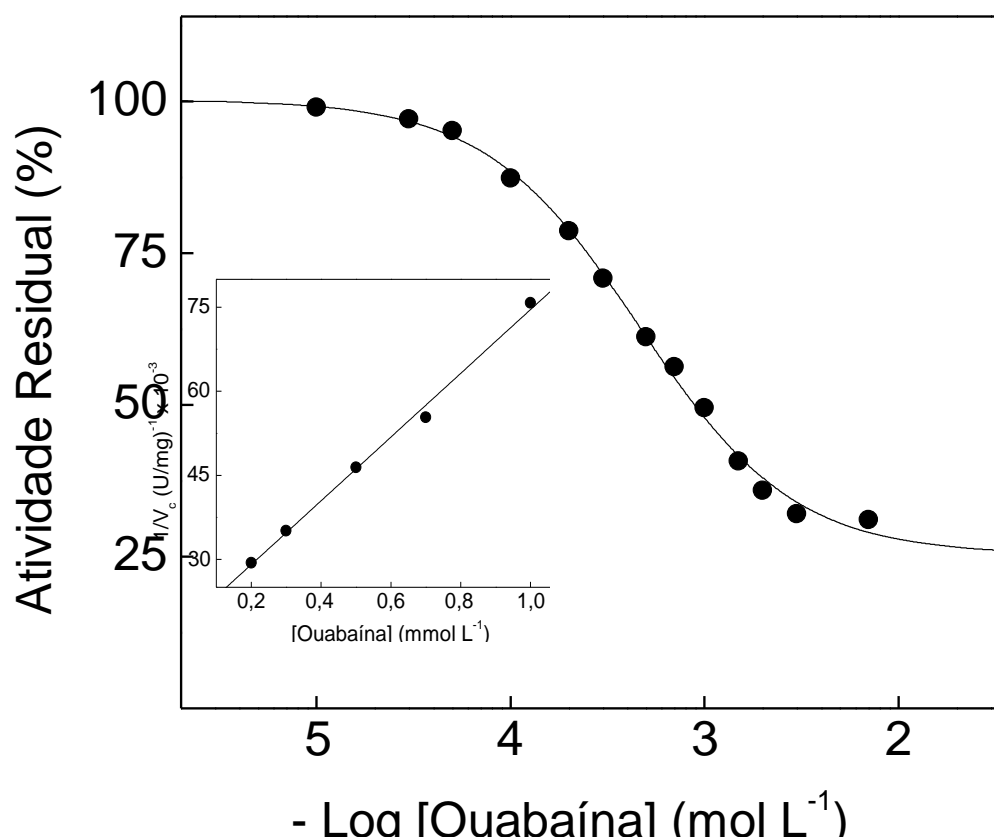


Figura 9. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹ e KCl 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é 69,2 ± 2,8 U mg⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para o cálculo do K_i.

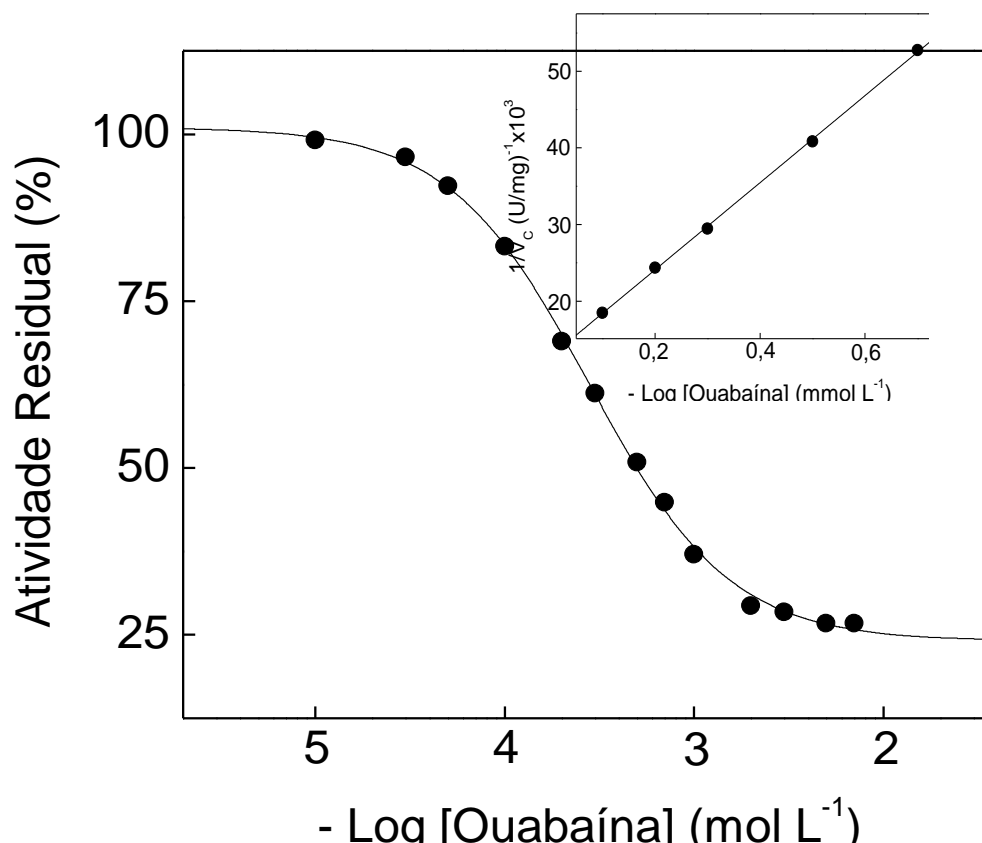


Figura 10. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹ e NH₄Cl 30 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é 90,8 ± 4,0 U mg⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

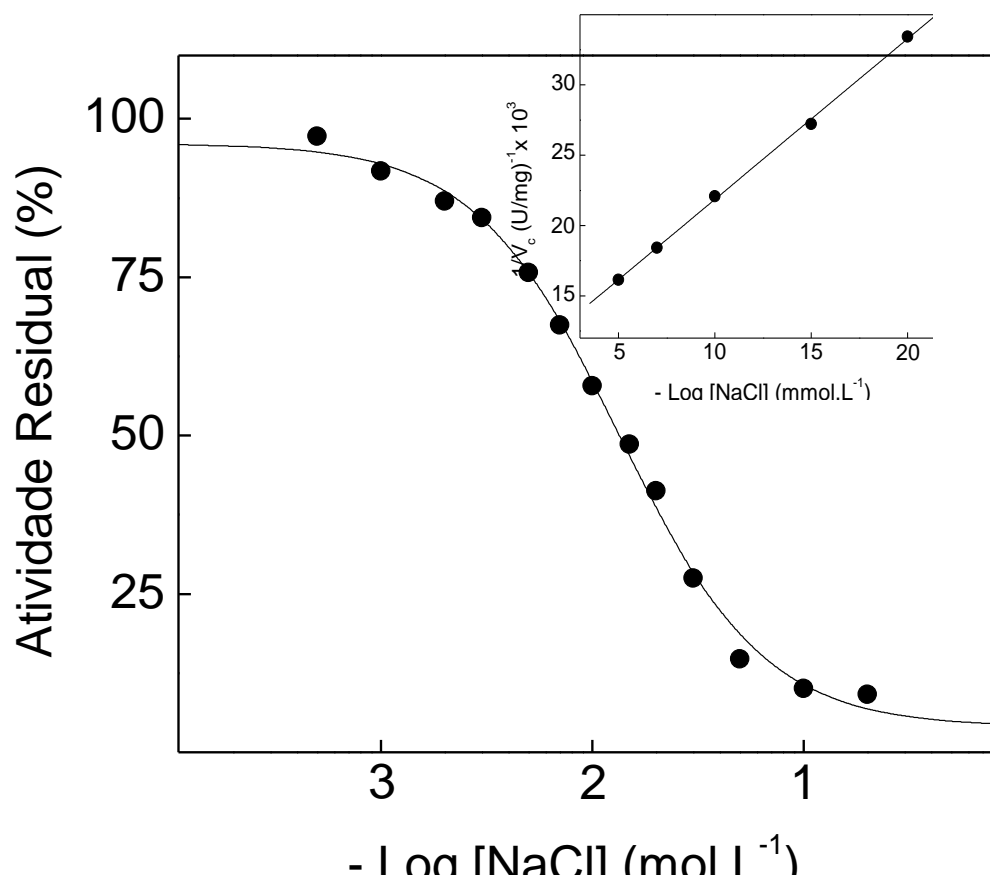


Figura 11. Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNPPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹ e KCl 5 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $69,2 \pm 2,8$ U mg⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Inserção: representação de Dixon para a determinação do K_I.

4.1.2. *Callinectes ornatus* aclimatado a salinidade de 33‰

A fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ foi preparada de acordo com a metodologia usada para os animais aclimatados a 21‰ e, a atividade PNPPase total foi da ordem de 36 U mg^{-1} .

A Figura 12 mostra a modulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a salinidade de 33‰ pelo PNPP. Em condições saturantes de K^+ (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}), concentrações crescentes de PNPP estimularam a atividade por meio de uma única curva de saturação, envolvendo interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$), com uma velocidade máxima de $29,1 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,30 \pm 0,06 \text{ mmol L}^{-1}$. A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada na mesma faixa de concentrações, até valores correspondentes a cerca de 24% da atividade PNPPase total (inserção da Figura 12).

O efeito da concentração dos íons magnésio sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a salinidade de 33‰ é mostrado na Figura 13. Concentrações crescentes de Mg^{2+} , entre $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ e 7 mmol L^{-1} , estimularam a atividade até um valor máximo de $V = 27,8 \pm 1,3 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,00 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação ocorreu por meio de interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$) e para concentrações superiores a 7 mmol L^{-1} foi observada inibição da atividade K^+ -fosfatase (não mostrado). É importante observar que a atividade PNPPase insensível à ouabaína também foi estimulada pelo Mg^{2+} ($9,0 \text{ U mg}^{-1}$), na mesma faixa de concentração (inserção da Figura 13), sugerindo a presença de outro(s) tipo(s) de fosfohidrolase(s).

A Figura 14 mostra a estimulação pelo K^+ da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, na presença de concentrações saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}). Os íons potássio estimularam a atividade da enzima até valores máximos de $V = 28,0 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$. A cooperatividade positiva ($n_H = 1,9$) observada sugere a presença de mais de uma família de sítios para K^+ na molécula da enzima. O valor de $K_{0,5}$ calculado foi $2,4 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$. A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada por K^+ na mesma faixa de concentrações, até valores de $V = 8,9 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ (inserção da Figura 14), correspondendo a cerca de 24% da atividade PNPPase total, sugerindo a presença de uma K^+ -ATPase na preparação microsomal.

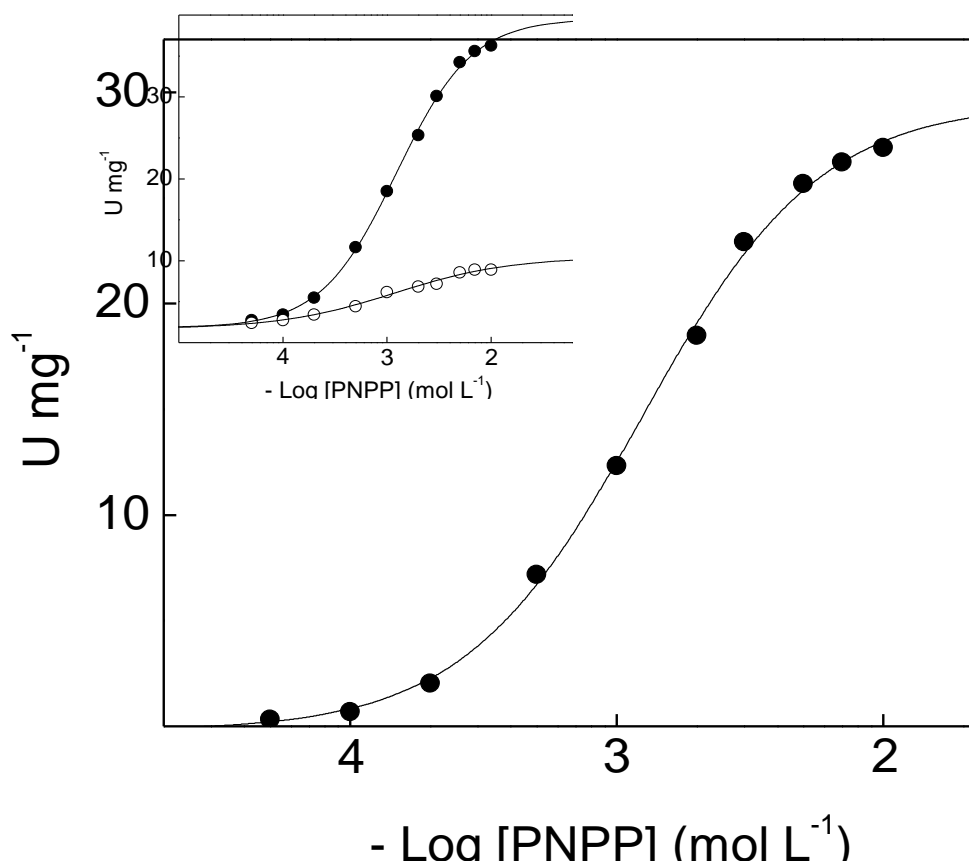


Figura 12. Efeito da concentração de PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

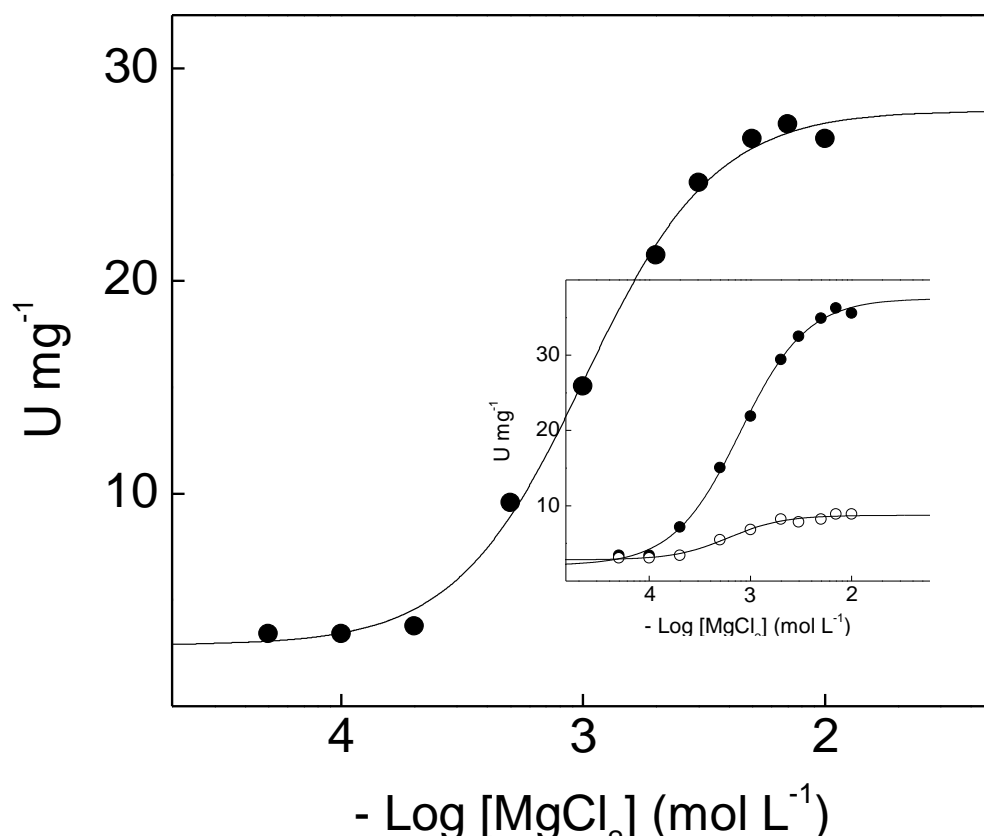


Figura 13. Efeito dos íons magnésio sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase total (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

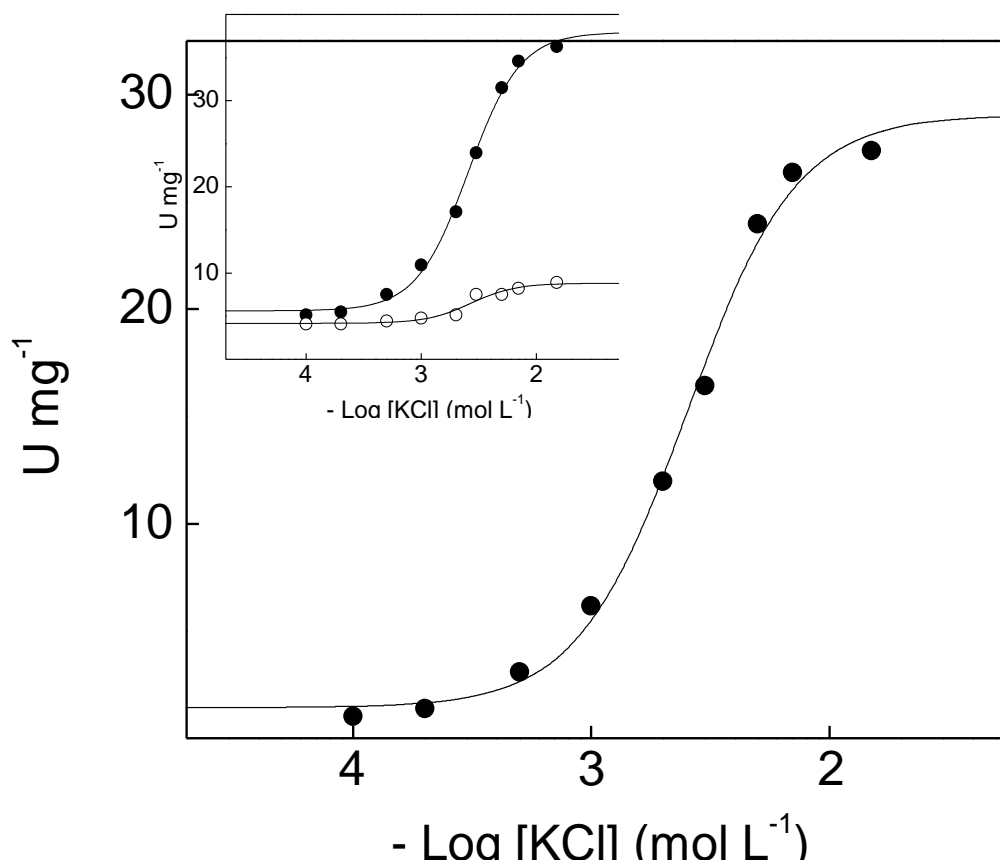


Figura 14. Efeito dos íons potássio sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

A Figura 15 mostra a modulação pelo NH_4^+ da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, na presença de concentrações saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}) e na ausência de K^+ . Observa-se uma única curva de estimulação, com valores máximos de $V = 32,2 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 12,3 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação da atividade ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 2,2$), sugerindo a presença de mais de um sítio de ligação para NH_4^+ na molécula da enzima, tal como observado para K^+ . Uma atividade K^+ -fosfatase desprezível foi observada para concentrações de NH_4^+ menores que 1 mmol L^{-1} , enquanto concentrações superiores a 50 mmol L^{-1} inibiram a atividade da enzima (não mostrado). Os íons amônio estimularam a atividade PNPPase insensível à ouabaína até cerca de $8,9 \text{ U mg}^{-1}$ (inserção da Figura 15).

A Tabela 4 resume os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado à salinidade de 33‰ pelo PNPP, K^+ , Mg^{2+} e NH_4^+ .

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰, pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ .

Efector	V (U mg^{-1})	$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})	n_H
PNPP	$29,1 \pm 1,4$	$1,3 \pm 0,06$	1,4
Mg^{2+}	$27,8 \pm 1,3$	$1,0 \pm 0,04$	1,7
K^+	$28,0 \pm 1,4$	$2,4 \pm 0,1$	1,9
NH_4^+	$32,2 \pm 1,5$	$12,3 \pm 0,4$	2,2

A modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, por K^+ na presença de concentrações fixas de NH_4^+ está mostrada na Figura 16. Observa-se que para concentrações fixas de amônio (entre 0 e 50 mmol L^{-1}), o aumento da atividade específica foi de apenas 11%. Juntos, o NH_4^+ e o K^+ estimularam sinergisticamente a atividade PNPPase, uma vez que sem NH_4^+ a atividade K^+ -fosfatase foi de $28,0 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$, enquanto na presença de

NH_4^+ 50 mmol L⁻¹ esse valor aumentou para $31,0 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$ ($\text{K}^+ = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Nessas condições foi observado uma diminuição no valor de $\text{K}_{0,5}$ que passou de $2,4 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para $0,25 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, sugerindo um aumento da atividade da enzima pelo K^+ quando em presença de NH_4^+ .

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a uma salinidade de 33‰, por K^+ , em diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 17. No intervalo de concentrações utilizado, o valor de n_H aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de NH_4^+ (Fig. 17A). O aumento da concentração de NH_4^+ no meio de reação provocou uma diminuição do valor do $\text{K}_{0,5}$ da ordem de 9,6 vezes (Fig. 17B), sugerindo uma maior afinidade da enzima por K^+ na presença de concentrações crescentes de NH_4^+ .

A Figura 18 mostra o efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, na presença de concentrações fixas de íons potássio (0 a 10 mmol L⁻¹). Observa-se que para concentrações fixas de K^+ , o aumento da concentração dos íons amônio entre 0,1 mmol L⁻¹ e 50 mmol L⁻¹, não acarretou variações significativas na atividade específica da enzima: $V = 32,2 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$ (para $\text{K}^+ = 0$) e $V = 32,5 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$ ($\text{K}^+ = 10 \text{ mmol L}^{-1}$). Nestas condições, as interações heterotrópicas referentes aos íons amônio corresponderam a efeitos de cooperatividade positiva, independentemente da concentração de K^+ , e o valor de $\text{K}_{0,5}$ diminuiu de 12,3 mmol L⁻¹ (para $\text{K}^+ = 0$) para 3,2 mmol L⁻¹ ($\text{K}^+ = 5 \text{ mmol L}^{-1}$).

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a salinidade de 33‰ por NH_4^+ na presença de concentrações fixas de K^+ , é mostrada na Figura 19. Observa-se que n_H permaneceu praticamente constante ($n_H = 1,7$) em todo o intervalo de concentração estudado (Fig. 19A), enquanto a afinidade da enzima aumentou cerca de 4 vezes (Fig. 19B).

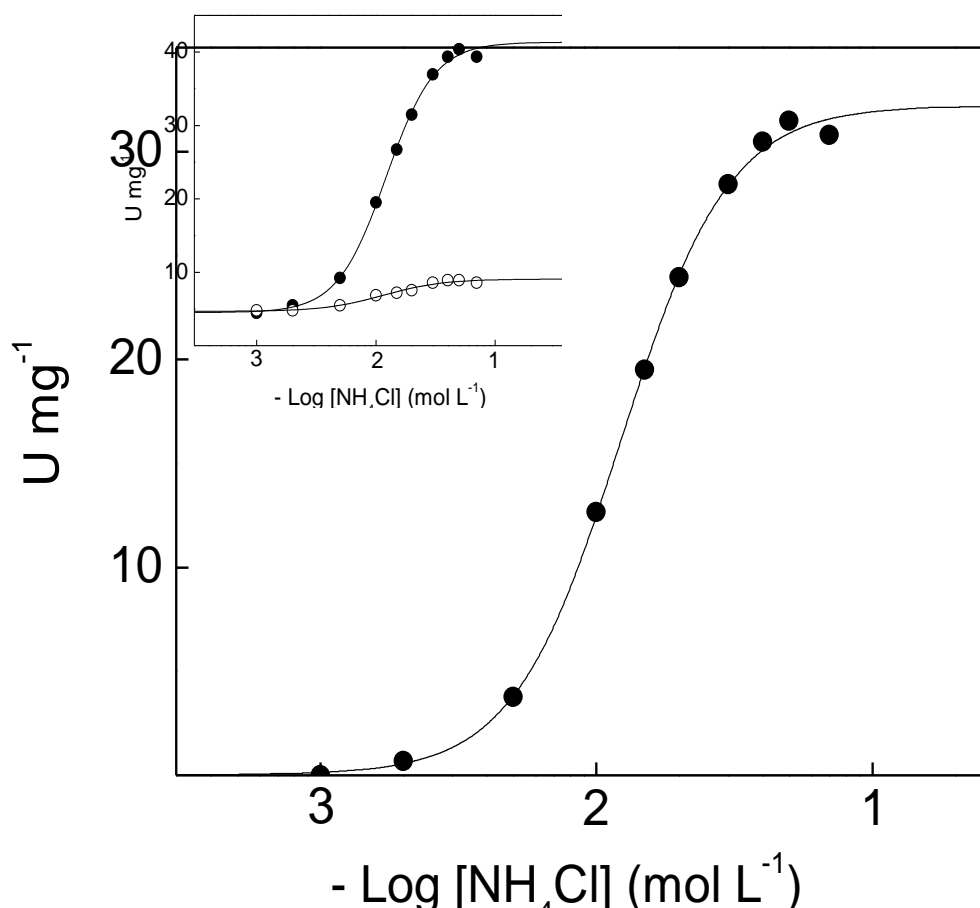


Figura 15. Efeito dos íons amônio na atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L^{-1} e MgCl_2 7 mmol L^{-1} . A reação foi iniciada pela adição de 22,2 μg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

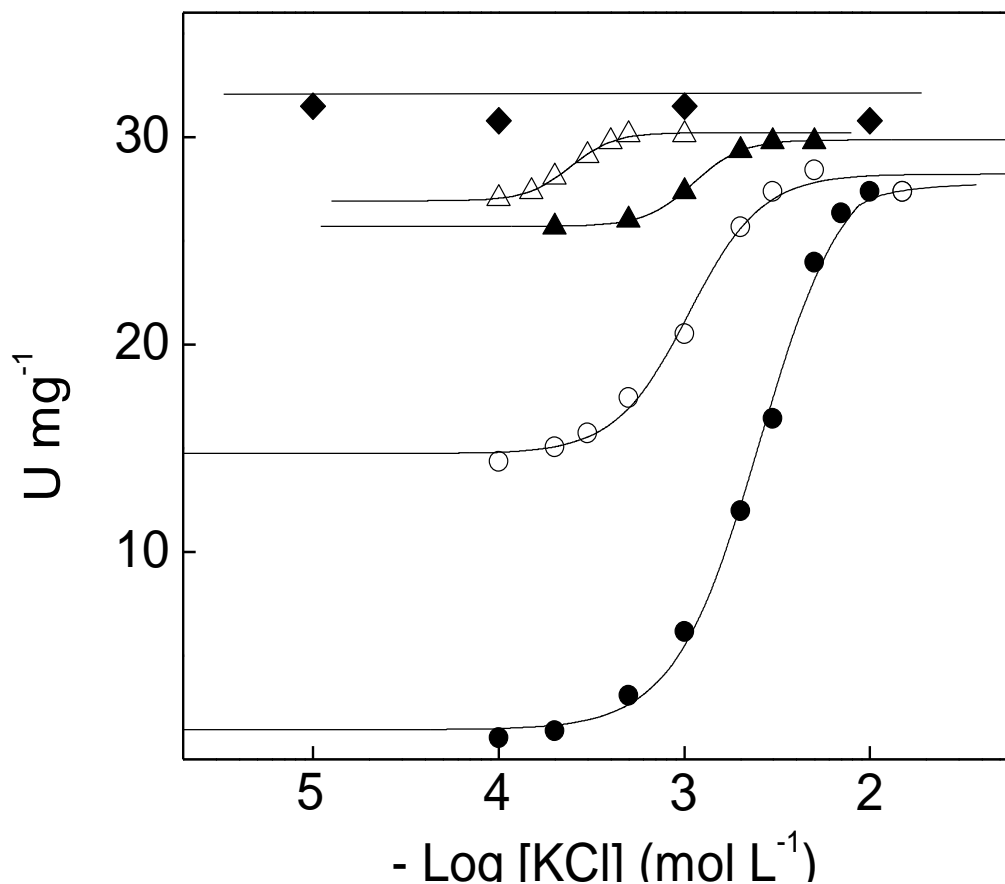


Figura 16. Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* alimentado a 33‰ pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (n= 3). Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (○) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 20 mmol L⁻¹. (Δ) NH₄Cl 30 mmol L⁻¹. (◆) NH₄Cl 50 mmol L⁻¹.

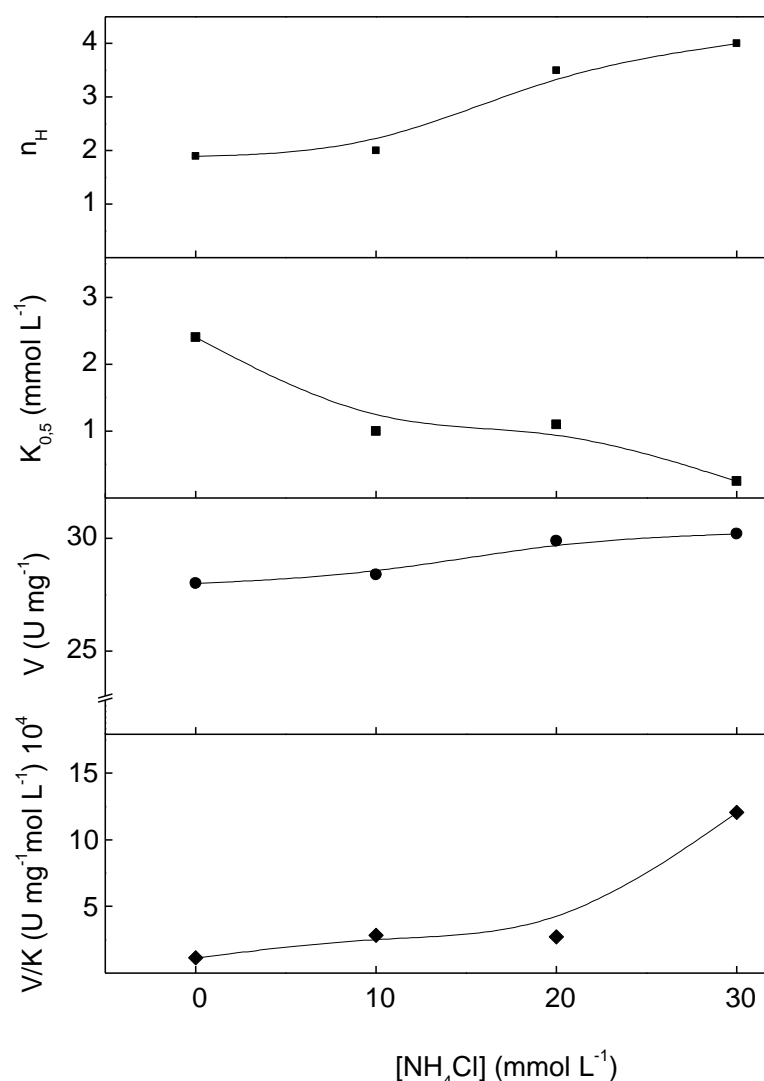


Figura 17. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C , em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L^{-1} e MgCl_2 7 mmol L^{-1} . Cada ponto da figura corresponde a uma curva de saturação compreendendo pelo menos 10 concentrações do substrato necessários para determinar V , $K_{0.5}$ e n_H . Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

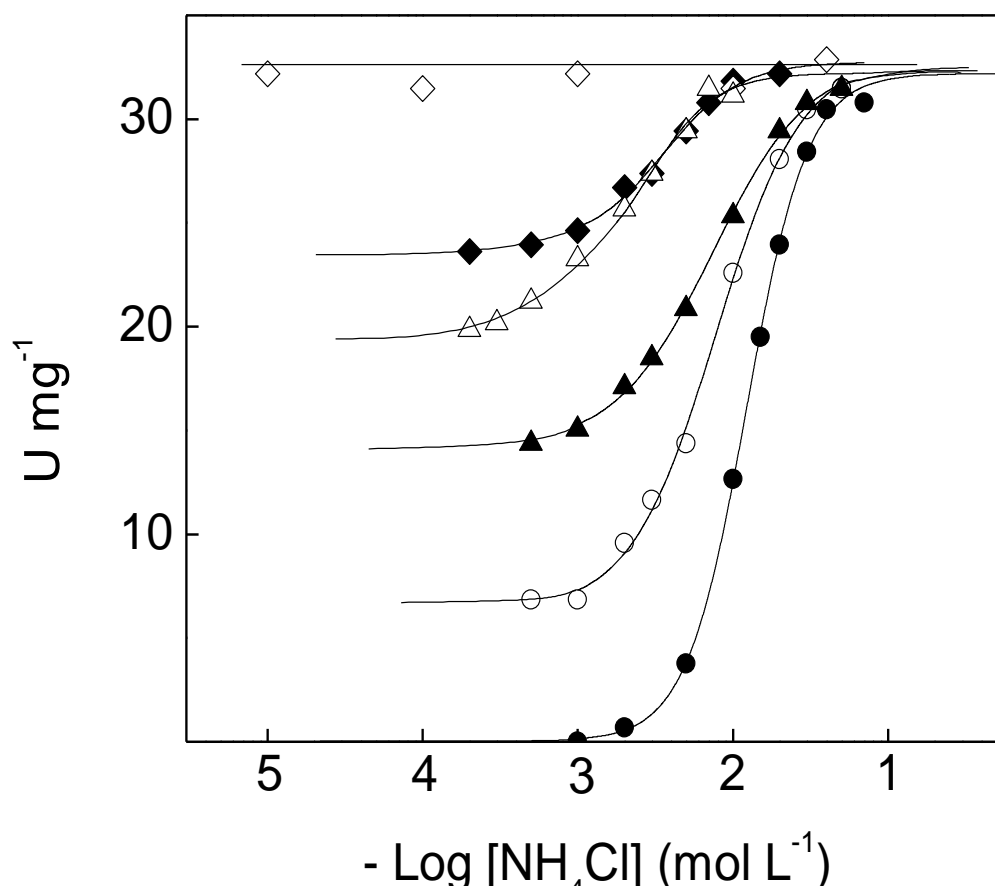


Figura 18. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade K^{+} -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três (N= 3) diferentes homogeneizados de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (○) KCl 1 mmol L⁻¹. (▲) KCl 2 mmol L⁻¹. (Δ) KCl 3 mmol L⁻¹. (◆) KCl 5 mmol L⁻¹. (◇) KCl 10 mmol L⁻¹.

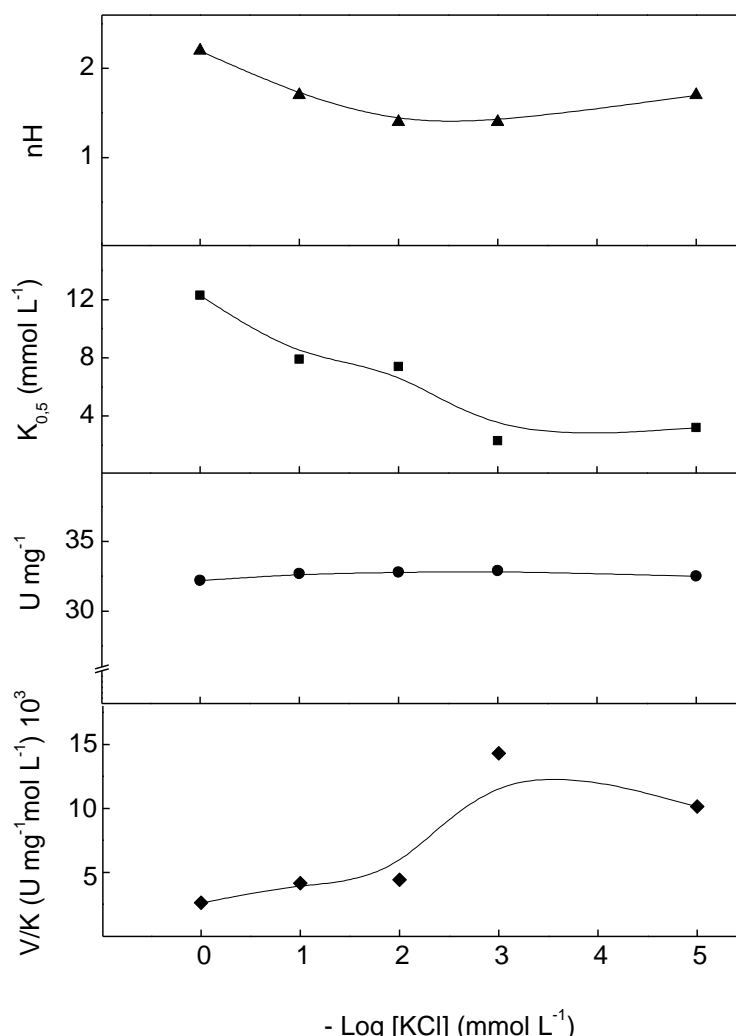


Figura 19. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons amônio, em função de diferentes concentrações de íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹. Cada ponto da figura corresponde a uma curva de saturação compreendendo pelo menos 10 concentrações do substrato necessários para determinar V, K_{0.5} e n_H. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Na Tabela 5 foram resumidos os resultados obtidos no estudo da modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatados a salinidade de 33‰, pelos íons potássio e amônio.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio e amônio.

$[K^+]$ (mmol L ⁻¹)	$[NH_4^+]$ (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mmol L ⁻¹)	n_H	V/K (U mg ⁻¹ mol L ⁻¹)
Variável	0	28,0 ± 1,4	2,4 ± 0,1	1,9	11666
Variável	10	28,4 ± 1,4	1,00 ± 0,05	2,0	28400
Variável	20	29,9 ± 1,5	1,1 ± 0,06	3,5	27182
Variável	30	30,2 ± 1,5	0,25 ± 0,01	3,9	120800
Variável	50	31,0 ± 1,5	-	-	-
0	Variável	32,2 ± 1,5	12,3 ± 0,4	2,2	2618
1	Variável	32,7 ± 1,6	7,9 ± 0,2	1,7	4139
2	Variável	32,8 ± 1,7	7,4 ± 0,1	1,4	4432
3	Variável	32,9 ± 1,7	2,30 ± 0,06	1,4	14304
5	Variável	32,5 ± 1,5	3,2 ± 0,1	1,7	10156
10	Variável	32,5 ± 1,5	-	-	-

O efeito da concentração da ouabaína sobre a atividade PNPPase total da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ é mostrado na Figura 20. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}), Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}), a curva obtida sugere a presença de uma única isoforma de $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ na preparação. A atividade foi inibida 76% para concentrações de ouabaína da ordem de 4 mmol L^{-1} e o valor de K_i , determinado graficamente, foi de $315,0 \pm 15,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da Figura 20).

O efeito do aumento da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da fração microsomal de tecido branquial, em presença de NH_4^+ 50 mmol L^{-1} , é mostrado na Figura 21. Na presença de concentrações saturantes de PNPP, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ , a inibição pela ouabaína também ocorreu por meio de uma simples curva, sugerindo a presença de um único sítio de fixação para o inibidor. A inibição foi de 79% na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} e o valor do K_i igual a $112,9 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ determinado graficamente (inserção da Figura 21). Independente da presença de NH_4^+ , a atividade residual permanece praticamente invariável, sugerindo que o aumento da atividade na presença de NH_4^+ representa de fato um aumento da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Na Figura 22 é mostrado o efeito da concentração do Na^+ sobre a atividade PNPPase da fração microsomal de tecido branquial *C. ornatus*. Em condições saturantes de PNPP (10 mmol L^{-1}), K^+ (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}), os íons sódio inibiram cerca de 88% a atividade K^+ -fosfatase. O valor de K_i calculado para a inibição da atividade PNPPase pelo Na^+ foi de $4,7 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (inserção da Figura 22).

Uma comparação dos parâmetros cinéticos calculados para animais recém-capturados, aclimatados a 21‰ e a 33‰ estão reunidos na Tabela 6.

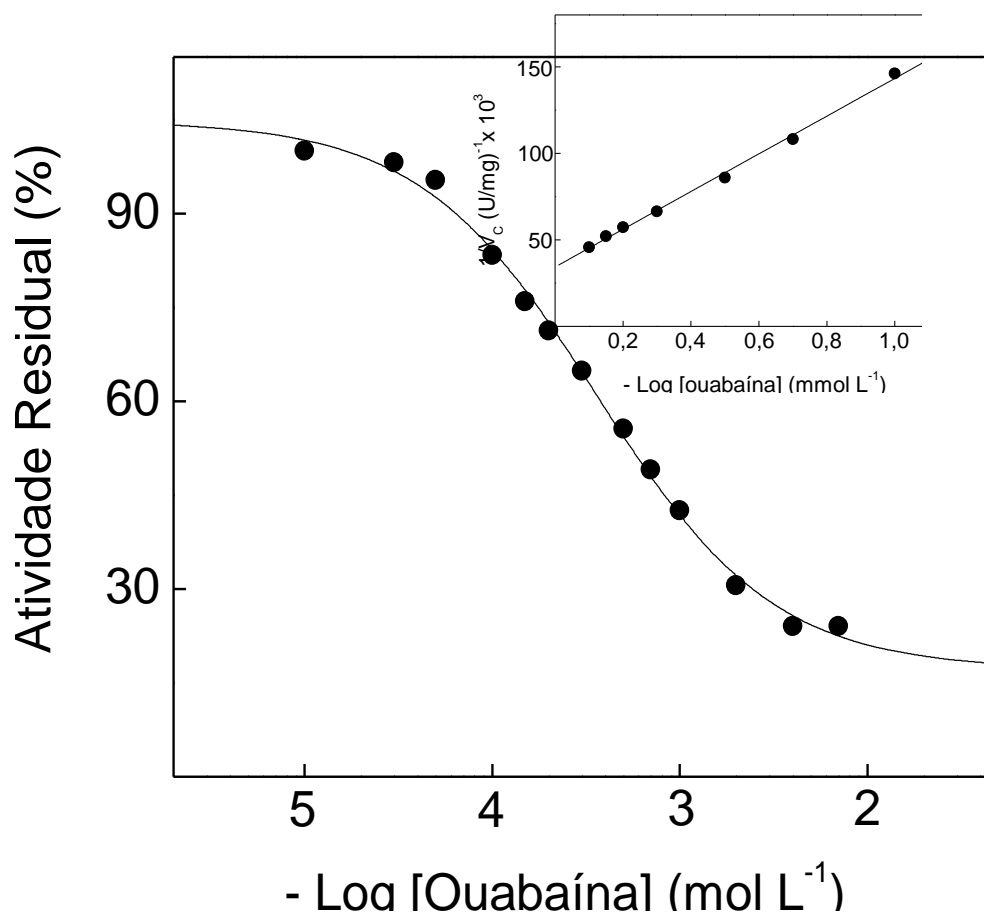


Figura 20. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $29,1 \pm 1,4$ U mg⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para o cálculo do K_I.

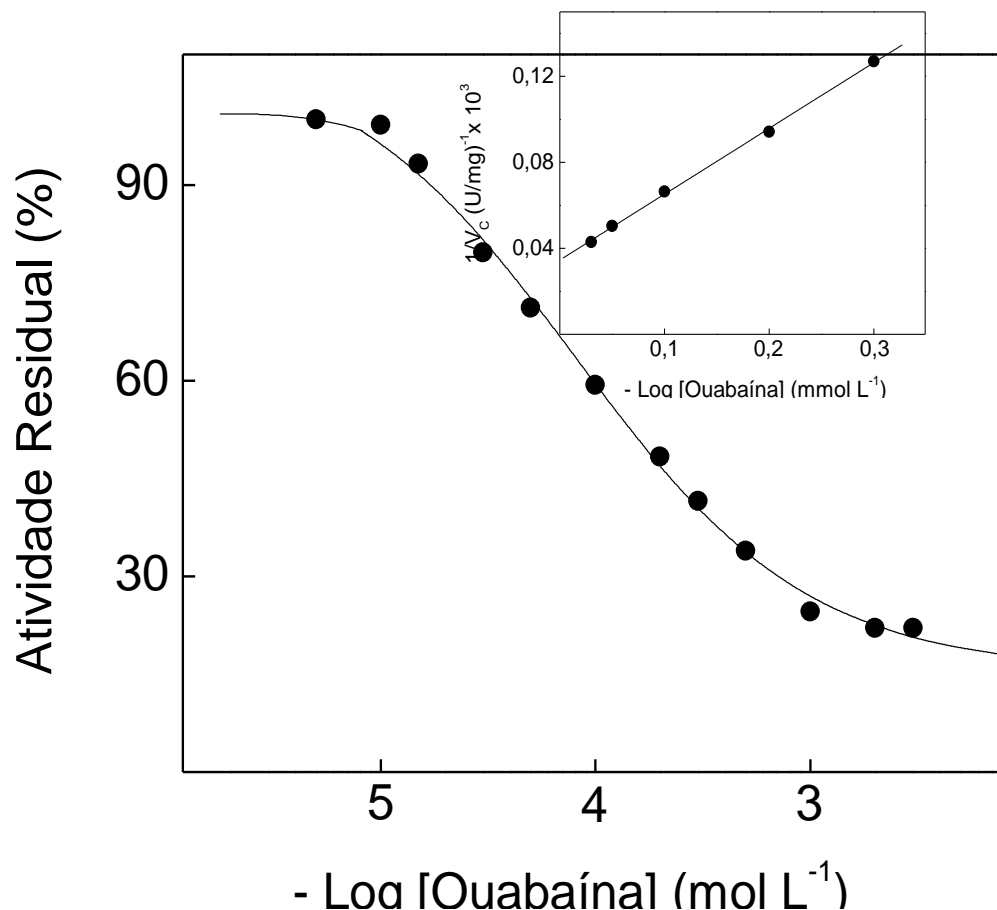


Figura 21. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+ , K^+)-ATPase de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNPP 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹ e NH₄Cl 50 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $32,2 \pm 1,5 \text{ U mg}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

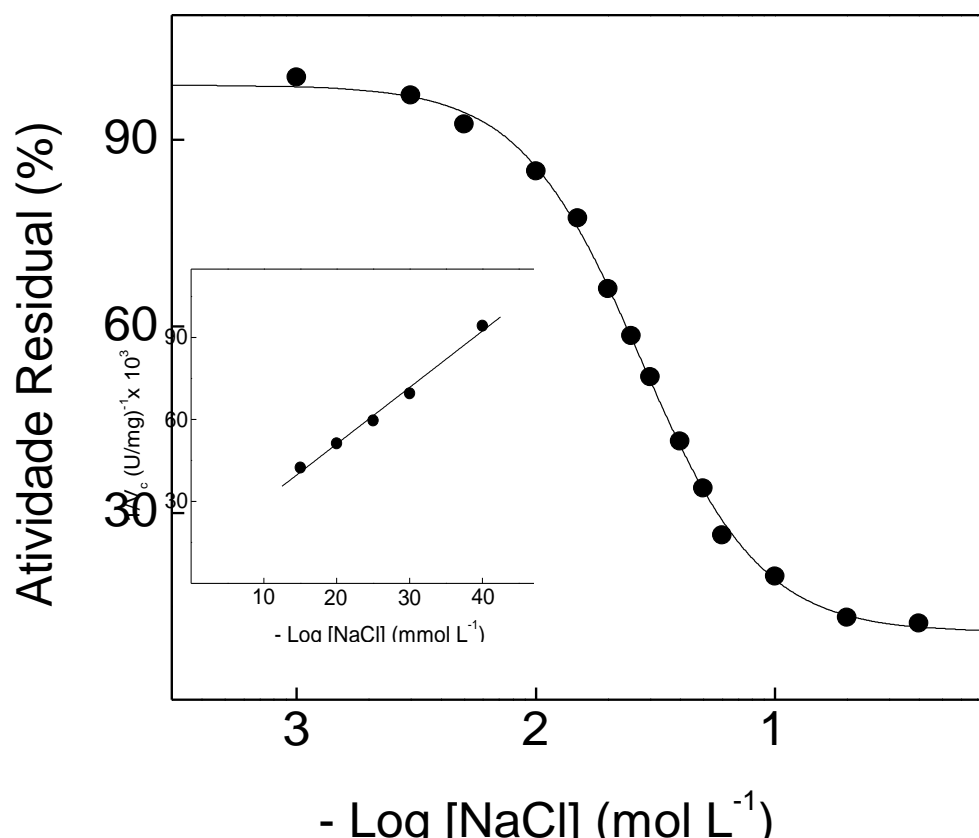


Figura 22. Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNPPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM, MgCl₂ 7 mM e KCl 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $29,1 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* recém-capturado, aclimatado a 21‰ e a 33‰ pelo PNPP, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ e ouabaína.

Efetor	V ($U\ mg^{-1}$)			K ($mmol\ L^{-1}$)			n_H		
	Recém-capturado	21‰	33‰	Recém-capturado	21‰	33‰	Recém-capturado	21‰	33‰
PNPP	$52,0 \pm 2,0$	$69,2 \pm 2,8$	$29,1 \pm 1,4$	$1,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,06$	1,6	1,7	1,4
Mg^{2+}	$52,3 \pm 2,3$	$70,1 \pm 3,0$	$27,8 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,04$	1,4	1,9	1,7
K^+	$51,4 \pm 2,5$	$69,6 \pm 2,7$	$28,0 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,07$	$2,4 \pm 0,1$	2,1	2,0	1,9
NH_4^+	$56,7 \pm 2,6$	$90,8 \pm 4,0$	$32,2 \pm 1,5$	$9,8 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,3$	$12,3 \pm 0,4$	2,4	1,9	2,2
Ouabaína (K^+)				$201,4 \pm 8,1$	$320,0 \pm 9,5$	$315,0 \pm 15,0$			
Ouabaína (NH_4^+)				$194,8 \pm 7,5$	$240,0 \pm 7,5$	$112,9 \pm 5,6$			

4.2. Atividade (Na^+, K^+)-ATPase branquial de *Callinectes ornatus*

4.2.1. *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ de salinidade

A fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ apresentou atividade ATPase total de $207,5 \pm 8,3 \text{ U mg}^{-1}$ e perdas significativas de atividade não foram observadas nas preparações estocadas a -20°C por um período de 4 meses. Somente foram usadas amostras que foram descongeladas imediatamente antes dos experimentos e mantidas em banho de gelo até 10 h.

Com a finalidade de verificar a existência de vesículas seladas na preparação de membranas nas condições de dosagem da atividade ATPase, foram realizados ensaios na presença de alameticina (0-20 μg totais). A preparação foi pré-incubada com o antibiótico durante 10-20 min a 25°C , e a reação iniciada pela adição de substrato ao meio reacional. Não foram observadas variações significativas nas atividades determinadas na presença e ausência dessa droga, sugerindo a inexistência de vesículas seladas nesta preparação.

A análise da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ em gradiente contínuo de sacarose (0-50%) está mostrada na Figura 23. Observa-se a existência de dois picos protéicos, o primeiro compreendido entre 18 e 24% de sacarose não apresentou atividade ATPase. O gradiente mostrou ainda a presença de dois picos de atividade (Na^+, K^+)-ATPase, o pico I (26 a 36% de sacarose) apresentou uma alta atividade ATPase total e uma baixa concentração de proteína. O pico II (39 a 43% de sacarose) apresenta uma atividade ATPase total menor que coincide com o segundo pico de proteína. A atividade ATPase insensível a ouabaína corresponde a aproximadamente 12% da atividade ATPase total. Estes resultados contrastam com o único pico de atividade e proteína encontrado para a fração microsomal das brânquias de animais recém capturados.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes revela que houve uma variação no perfil protéico durante a aclimação (Fig. 24). A transferência de *C. ornatus* para ambiente de menor salinidade acarretou um aumento da quantidade de algumas proteínas ($\cong 32\text{kDa}$ e $\cong 25\text{kDa}$) e diminuição de outras ($\cong 20\text{kDa}$). A presença de uma única banda imunorreativa ($\sim 109 \text{ kDa}$) na análise por Western blot sugeriu a presença de uma única isoforma da subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase.

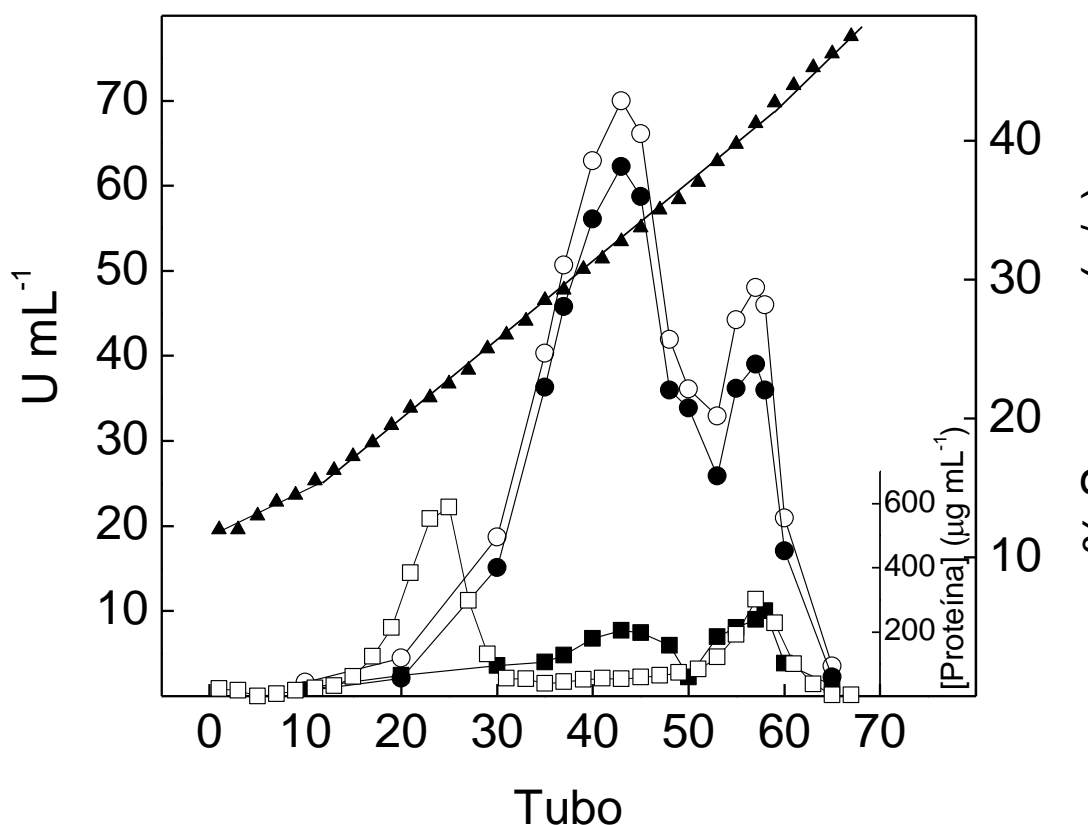


Figura 23. Centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21%, em gradiente contínuo de sacarose.

Uma amostra de 2 mg de proteína foi aplicada no gradiente de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹ pH 6,8, e centrifugada a 180000g durante 3 horas, a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e em cada uma delas foram analisadas: (○) atividade ATPase total; (●) atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase; (■) atividade insensível a ouabaína; (□) dosagem de proteína e (▲) % de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. O experimento foi realizado empregando-se pelo menos três diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

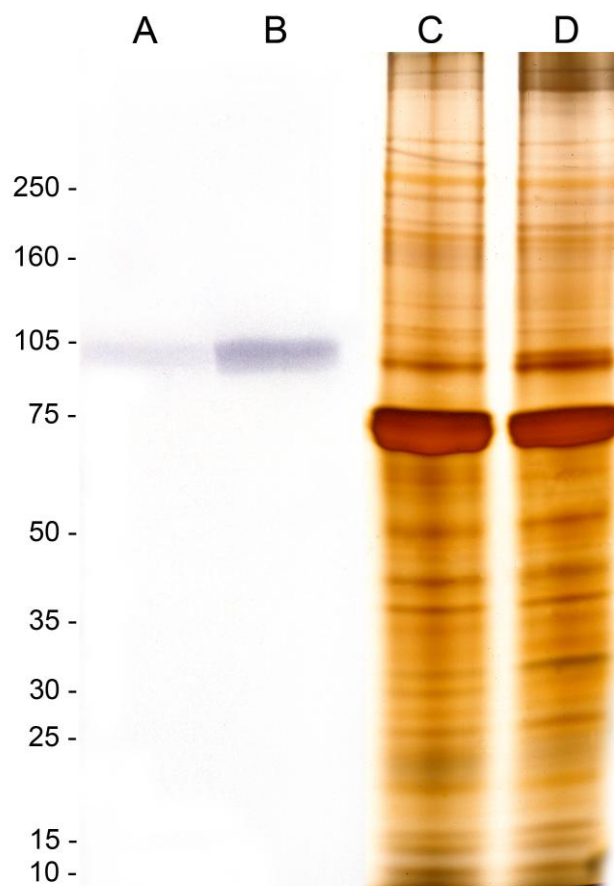


Figura 24. Western blot e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33 e 21‰.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% usando 3 μ g de proteína para a revelação com prata e 60 μ g de proteína para a análise por Western blotting. Após a corrida, uma das metades do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida à eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal α -5 (diluído 1:10) durante 1h, a 25°C, com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado a fosfatase alcalina. Western blotting: **A-** *C. ornatus* aclimatado a 33‰. **B-** *C. ornatus* aclimatado a 21‰. Coloração com nitrato de prata. **C-** *C. ornatus* aclimatado a 33‰. **D-** *C. ornatus* aclimatado a 21‰.

A proporção relativa 2,45 vezes maior desta subunidade nos microsomas de animais aclimatados a 21‰ pode estar relacionada às atividades (Na⁺, K⁺)-ATPase específicas cerca de 2,4 vezes maior, sugerindo que alterações na síntese e/ou degradação da enzima podem estar envolvidas na regulação da sua atividade em resposta à alteração da salinidade do meio externo.

A Figura 25 mostra o efeito do aumento da concentração de ATP sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, em concentrações saturantes de K⁺ (5 mmol L⁻¹), Na⁺ (50 mmol L⁻¹) e Mg²⁺ (0,7 mmol L⁻¹). Nestas condições foi observada uma única família de sítios e a variação da velocidade da reação com a concentração de ATP seguiu uma cinética Michaeliana, com $V = 182,6 \pm 7,1 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_M = 50,0 \pm 2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Nota-se também que a atividade insensível à ouabaína foi estimulada pelo ATP na mesma faixa de concentração (inserção da Figura 25), representando 11,6% da atividade ATPase total e sugerindo a presença de outras ATPases.

A modulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons magnésio está mostrada na Figura 26. Concentrações crescentes de Mg²⁺ entre 0,1 mmol L⁻¹ e 1 mmol L⁻¹, em condições saturantes de ATP (0,5 mmol L⁻¹), K⁺ (5 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), estimularam a atividade até um valor máximo de $V = 178,2 \pm 6,7 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,27 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, com interações sítio-sítio ($n_H = 5,8$). Concentrações de íons magnésio superiores a 2 mmol L⁻¹ inibiram fortemente a atividade ATPase. Na inserção da Figura 26 está mostrado o efeito do aumento dos íons magnésio na atividade ATPase total e na atividade insensível a ouabaína. Pode-se observar uma estimulação de cerca de 9% da atividade insensível a ouabaína pelo Mg²⁺ nessa mesma faixa de concentração.

A Figura 27 mostra o efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰. Na presença de concentrações saturantes de ATP (0,5 mmol L⁻¹), Mg²⁺ (0,7 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), os íons potássio estimularam a atividade da enzima por meio de interações sítio-sítio ($n_H = 1,5$). Na faixa de concentração de K⁺ entre 0,1 mmol L⁻¹ e 10 mmol L⁻¹, a hidrólise do ATP ocorreu com $V = 181,8 \pm 6,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,89 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$. Nesse mesmo intervalo de concentração, a estimulação da atividade ATPase insensível à ouabaína pelos íons potássio, pode ser considerada desprezível (3% da atividade ATPase total, inserção da Figura 27).

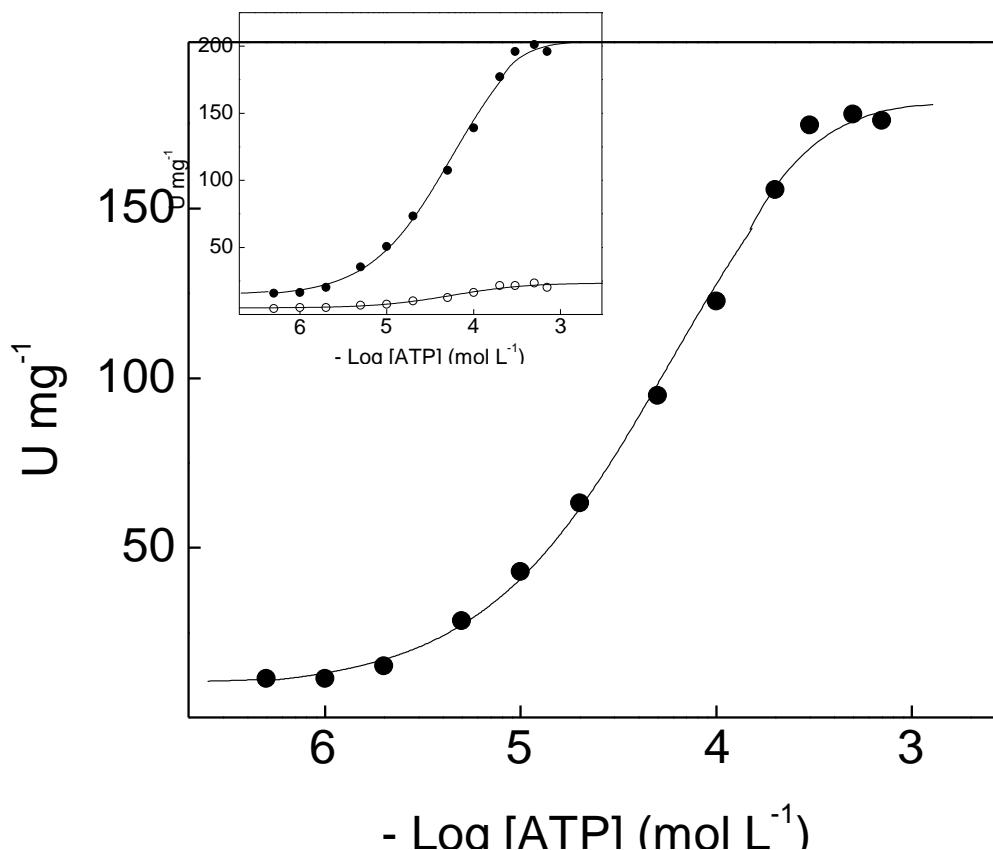


Figura 25. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

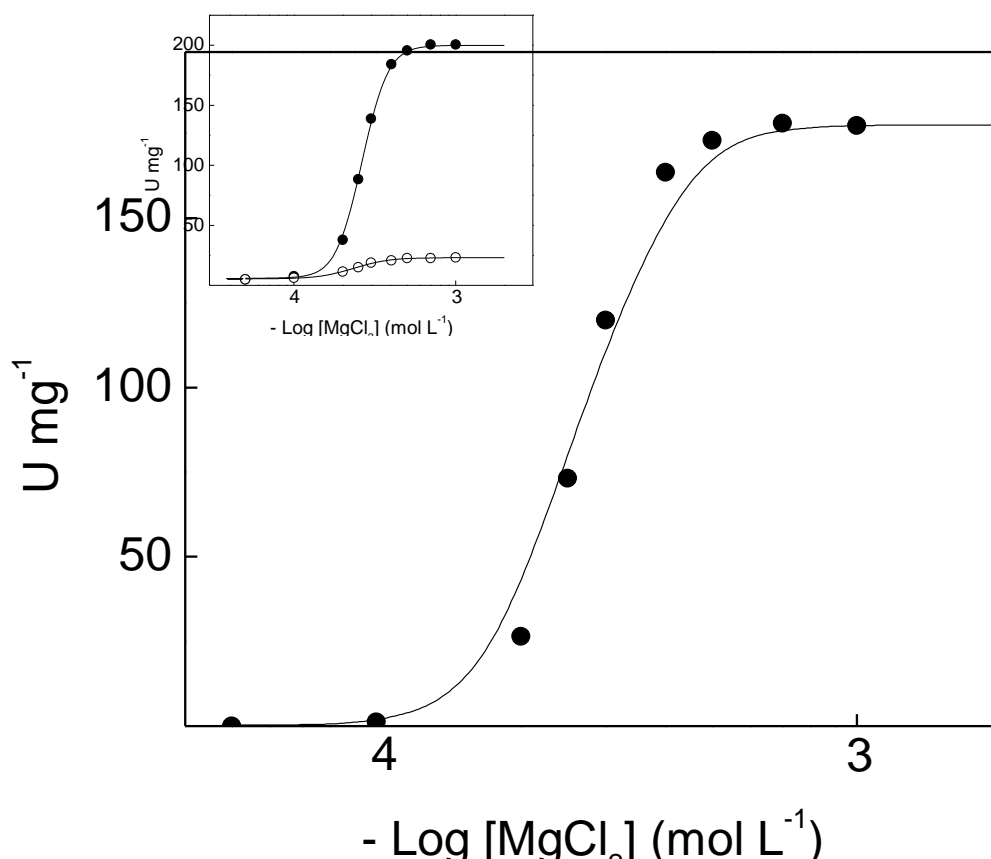


Figura 26. Efeito dos íons magnésio na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

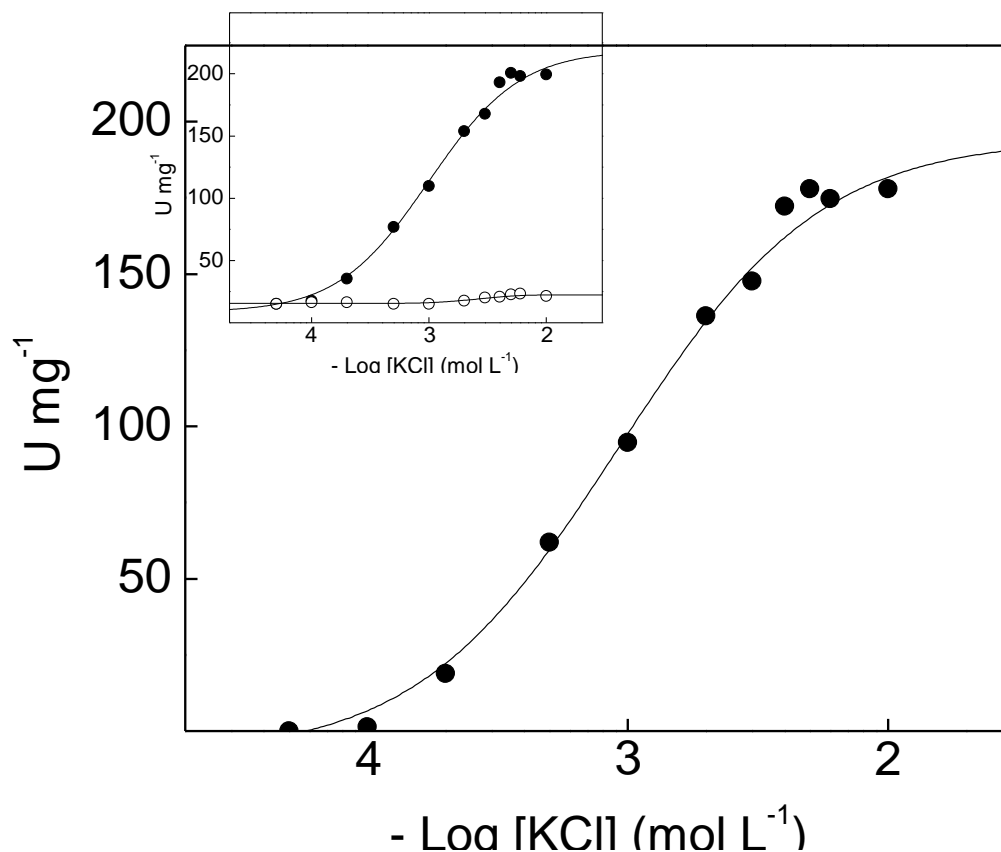


Figura 27. Efeito dos íons potássio na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAAPDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Entretanto, essa pequena estimulação sugere a presença de K^+ -ATPase na fração microsomal.

A dependência da atividade (Na^+,K^+) -ATPase da fração microsomal branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ em relação aos íons sódio (Fig. 28) foi caracterizada por uma única curva de saturação, com $V = 175,9 \pm 6,3 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 4,18 \pm 0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ que apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 2,5$). Todavia, a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada por Na^+ (inserção da Figura 28), o que descarta a presença de Na^+ -ATPase na preparação microsomal.

A Figura 29 mostra a modulação da atividade da (Na^+,K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons amônio. Observa-se que na presença de concentrações saturantes de ATP ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e na ausência de K^+ , a enzima apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$). O aumento da concentração de NH_4^+ entre $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e 50 mmol L^{-1} provocou um aumento na atividade até valores máximos de $V = 240,7 \pm 11,2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 4,44 \pm 0,17 \text{ mmol L}^{-1}$. A atividade ATPase insensível à ouabaína (inserção da Figura 29) é inibida por concentrações de NH_4^+ superiores a 10 mmol L^{-1} .

A Tabela 7 reúne os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+,K^+) -ATPase pelo ATP e íons magnésio, potássio, sódio e amônio.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+,K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado à salinidade de 21‰ pelo ATP, Mg^{2+} , K^+ , Na^+ e NH_4^+ .

Efector	V (U mg^{-1})	$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})	n_H	V/K
ATP	$182,6 \pm 7,1$	$0,050 \pm 0,002$	1,0	3652
Mg^{+2}	$178,2 \pm 6,7$	$0,27 \pm 0,01$	5,8	660
K^+	$181,8 \pm 6,9$	$0,89 \pm 0,03$	1,5	204
Na^+	$175,9 \pm 6,3$	$4,18 \pm 0,16$	2,5	42
NH_4^+	$240,7 \pm 11,2$	$4,44 \pm 0,17$	1,4	54

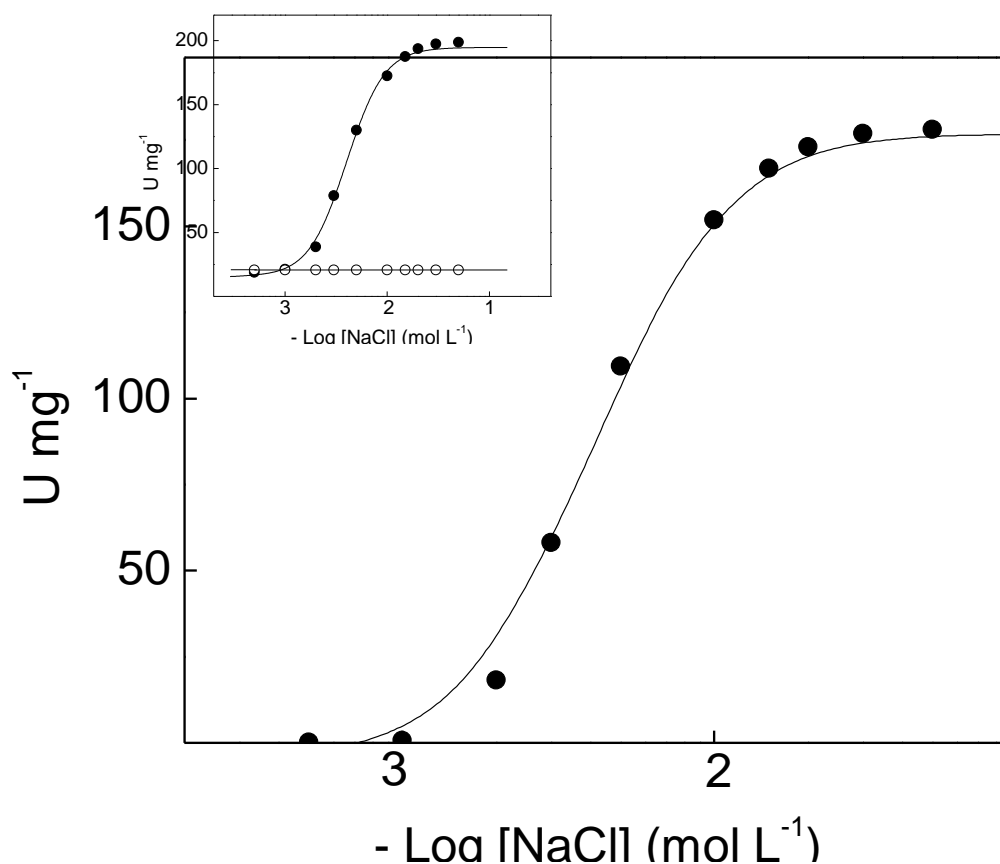


Figura 28. Efeito dos íons sódio na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

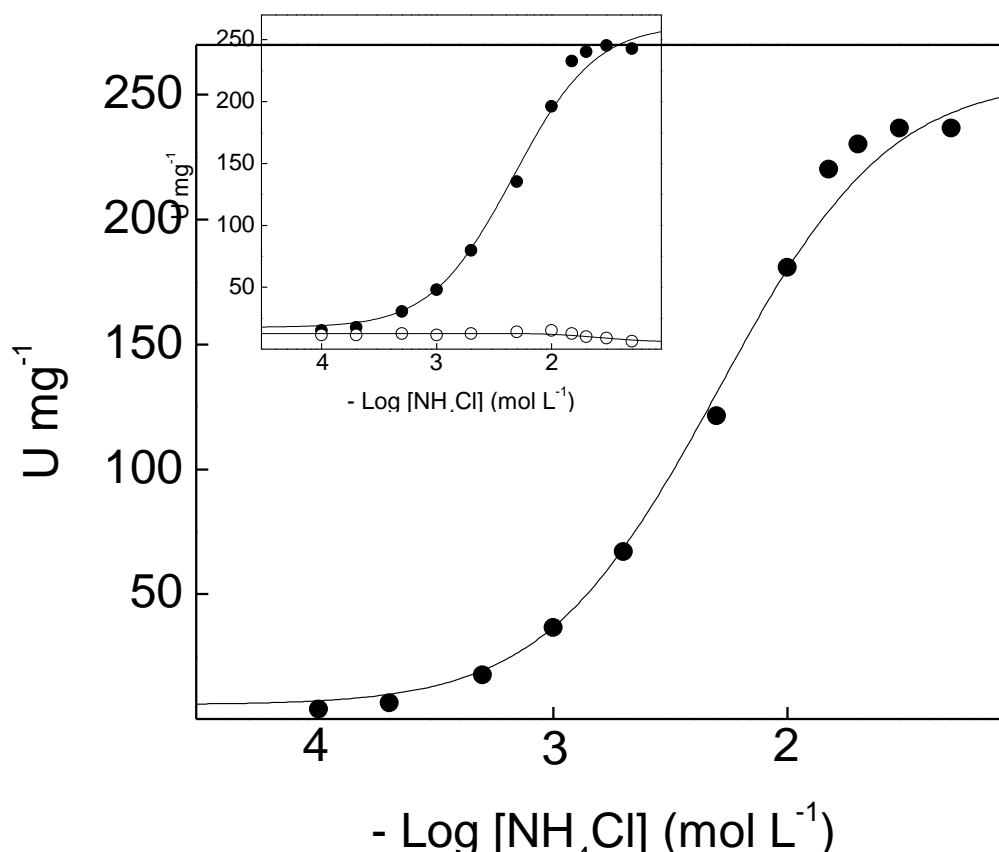


Figura 29. Efeito dos íons amônio na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A Figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

A modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ pelo K^+ , na presença de diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 30. Observa-se que para concentrações crescentes de NH_4^+ , a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo K^+ assume aumento de $181,8 \pm 6,9 \text{ U mg}^{-1}$ ($[\text{NH}_4^+] = \text{zero}$), para $238,3 \pm 9,2 \text{ U mg}^{-1}$ ($[\text{NH}_4^+] = 30 \text{ mmol L}^{-1}$). Os resultados sugerem que quando a enzima está saturada por NH_4^+ , o K^+ consegue deslocar o NH_4^+ de seu sítio e se ligar à enzima. Entretanto, na presença de $\text{NH}_4^+ 30 \text{ mmol L}^{-1}$, o K^+ não consegue mais deslocar o NH_4^+ deste sítio.

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por K^+ na presença de concentrações fixas de NH_4^+ está mostrado na Figura 31. Observa-se que o valor de n_H permaneceu praticamente constante com o aumento da concentração de NH_4^+ , e para todas as concentrações de NH_4^+ foi observada cooperatividade positiva (Fig. 31A). O aumento da concentração de NH_4^+ no meio de reação provocou uma diminuição progressiva e significativa no valor de $K_{0,5}$, passando de $0,89 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ para $0,16 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ quando a concentração de amônio variou de 1 e 10 mmol L^{-1} (Fig. 31B), sugerindo que a enzima apresenta uma maior afinidade pelo K^+ na presença de concentrações crescentes de NH_4^+ .

A modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ pelo NH_4^+ na presença de concentrações crescentes de K^+ está mostrado na Figura 32. Ao contrário do observado anteriormente, na presença de $\text{NH}_4^+ 30 \text{ mmol L}^{-1}$, o K^+ estimula a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ até valores da ordem de 240 U mg^{-1} , sugerindo que o NH_4^+ pode se ligar tanto em seu sítio quanto no sítio para K^+ .

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por NH_4^+ na presença de concentrações fixas de K^+ está mostrada na Figura 33. Observa-se que o aumento da concentração de K^+ no meio de reação não provocou alterações significativas no valor da cooperatividade do sistema (Fig. 33A), nem na velocidade máxima da reação (Fig. 33C).

Na Tabela 8 foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons potássio e amônio. A estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por K^+ em concentrações crescentes de NH_4^+ apresentou um aumento na eficiência catalítica da enzima. Entretanto a estimulação da atividade

(Na⁺,K⁺)-ATPase pelo NH₄⁺ em concentrações fixas e crescentes de K⁺, não apresentou mudanças significativas na eficiência catalítica.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons potássio e amônio.

[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺] (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K
Variável	0	181,8 ± 6,9	0,89 ± 0,03	1,5	205
Variável	1	191,6 ± 8,5	0,92 ± 0,03	2,2	208
Variável	5	203,6 ± 9,2	0,75 ± 0,02	1,6	271
Variável	10	218,9 ± 9,6	0,16 ± 0,01	1,5	1368
Variável	30	238,3 ± 9,2	-	-	-
0	Variável	240,7 ± 11,2	4,4 ± 0,2	1,4	55
1	Variável	240,6 ± 9,6	4,8 ± 0,3	1,6	50
3	Variável	238,3 ± 9,2	4,0 ± 0,2	1,9	59
5	Variável	237,0 ± 9,0	4,9 ± 0,3	2,0	48

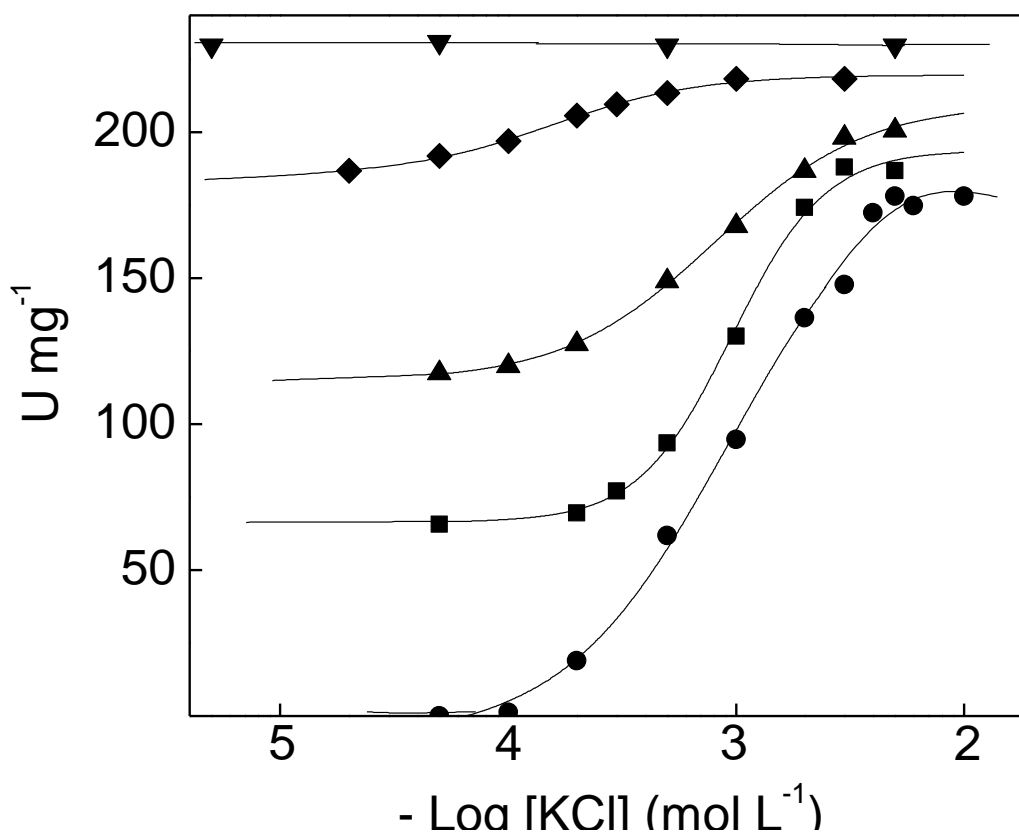


Figura 30. Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três (N= 3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (■) NH₄Cl 1 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 5 mmol L⁻¹. (◆) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (▼) NH₄Cl 30 mmol L⁻¹.

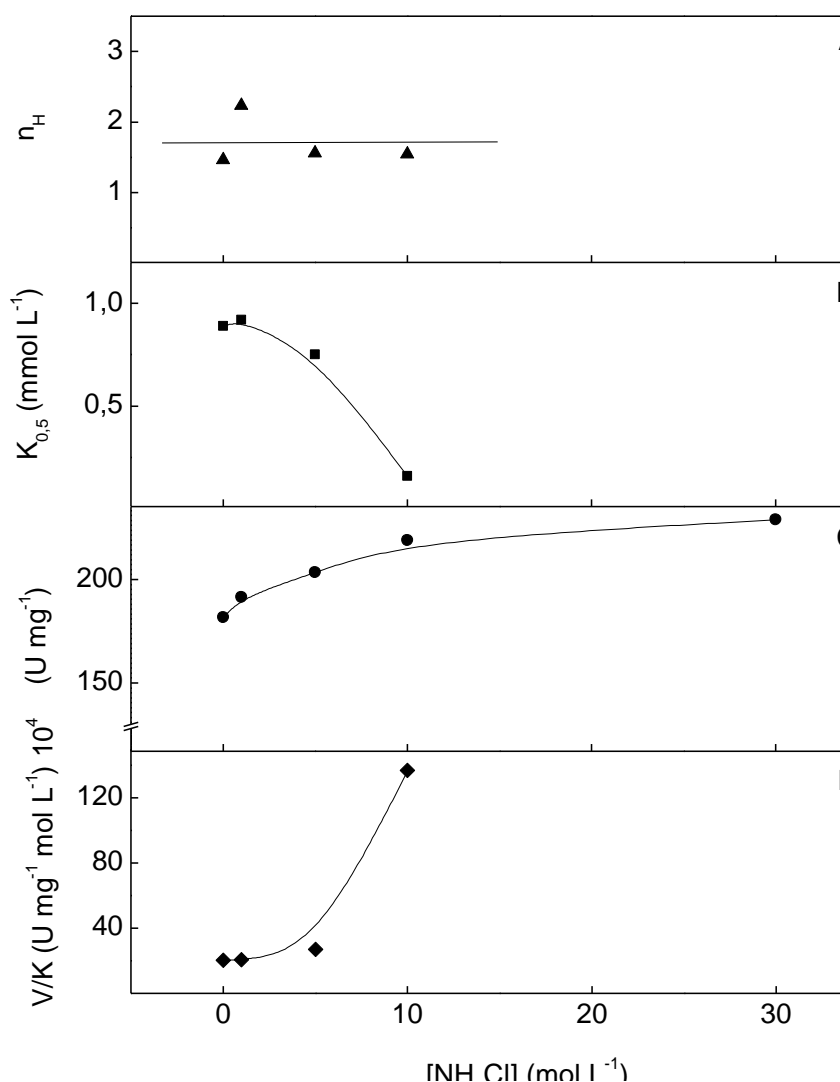


Figura 31. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V, K_{0,5} e n_H.

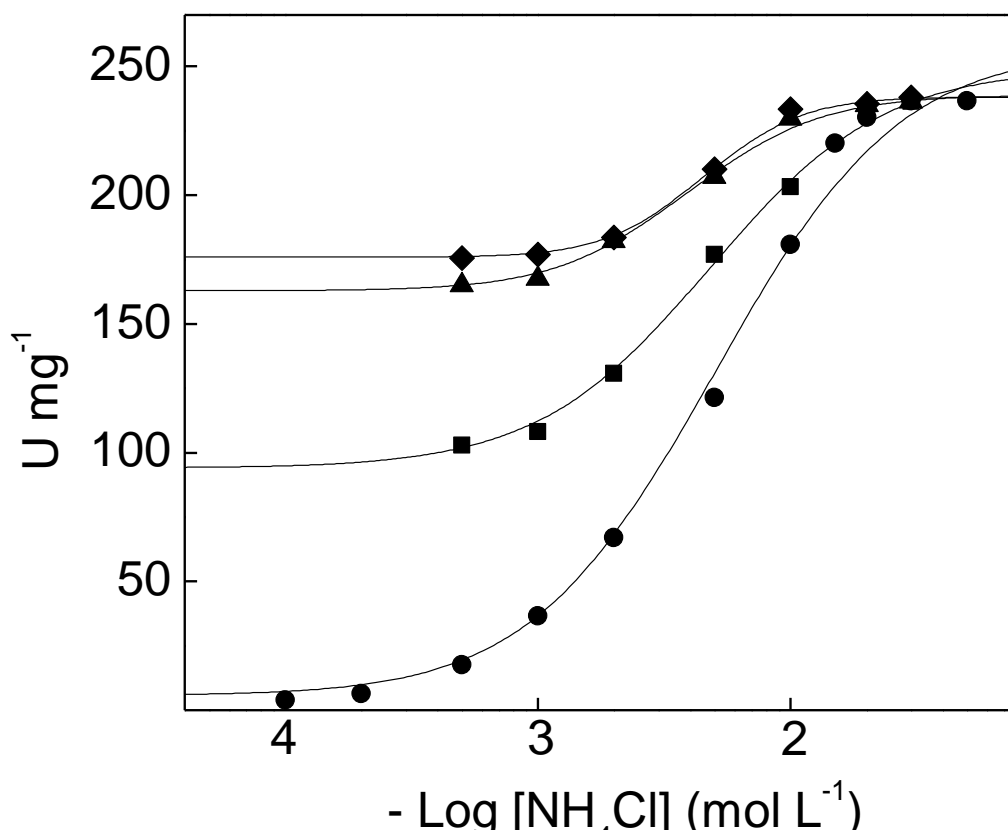


Figura 32. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três (N= 3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (■) KCl 1 mmol L⁻¹. (▲) KCl 3 mmol L⁻¹. (◆) KCl 5 mmol L⁻¹.

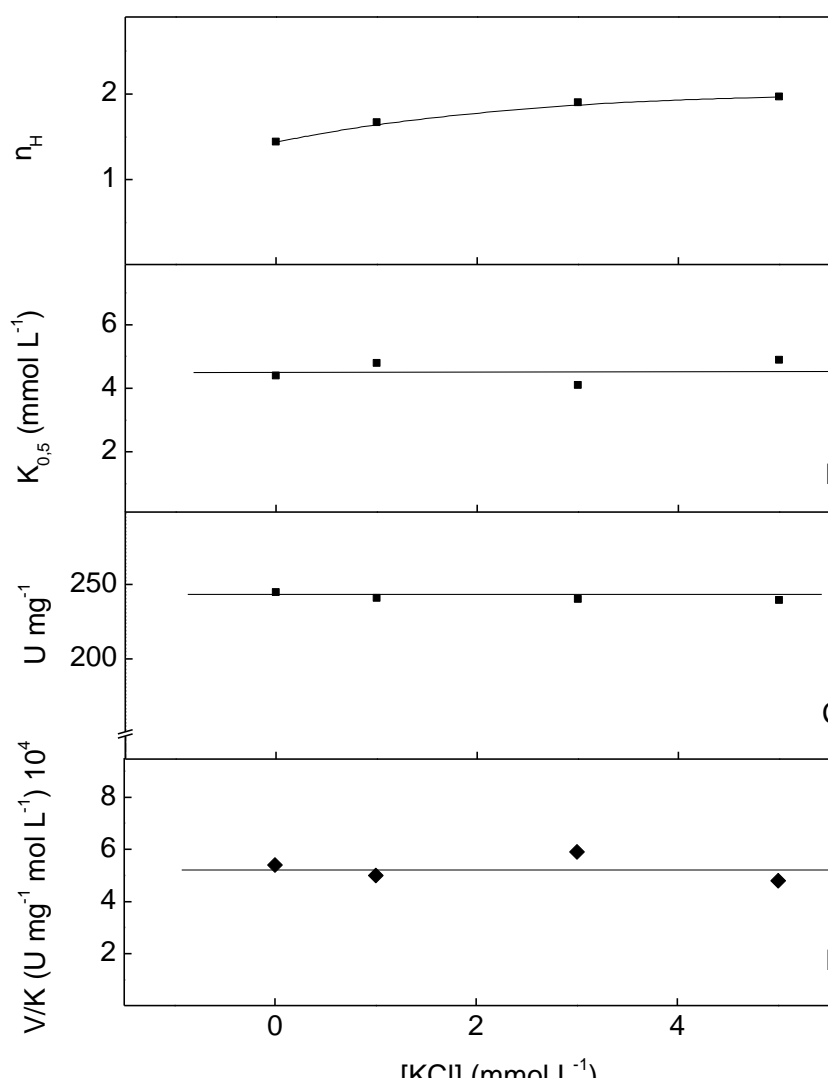


Figura 33. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão TEA 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V, K_{0.5}, n_H e V/K_{0.5}.

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ é mostrado na Figura 34. Em concentrações saturantes de ATP, Mg^{2+} , Na^+ e K^+ , a curva monofásica obtida sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Observa-se também que concentrações de ouabaína da ordem de 3 mmol L^{-1} inibiram cerca de 88% da atividade ATPase. O valor da constante de dissociação calculada para o complexo enzima-ouabaína foi $110,0 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da Figura 34).

O efeito do aumento da concentração de ouabaína sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, na presença de NH_4^+ , é mostrado na Figura 35. Na presença de concentrações saturantes de ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ , a inibição pela ouabaína também ocorreu por meio de uma simples curva, sugerindo a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Na presença de NH_4^+ , o efeito da ouabaína foi mais eficiente, visto que concentrações da ordem de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ inibiram 93% da atividade ATPase da fração microsomal. Na presença de NH_4^+ , a constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína foi estimada em $44,9 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da Figura 35).

Para esclarecer a natureza das demais ATPases (insensíveis à ouabaína) presentes na fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰, foram empregados diferentes inibidores nos ensaios da atividade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 36. A atividade ATPase residual na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} é cerca de 12%, indicando que a (Na^+, K^+) -ATPase é responsável por 88% da atividade ATPase total. Um valor similar foi estimado na presença de ortovanadato, o que elimina a presença de outras ATPases do tipo P. Os valores estimados na presença de ouabaína mais tapsigargina e ouabaína mais EGTA, foram similares aos obtidos para a ouabaína, e portanto, excluem a presença de Ca-ATPase. A inibição parcial da atividade ATPase insensível à ouabaína por oligomicina ou aurovertina sugere fortemente a presença de uma ATPase do tipo F na preparação, correspondendo a cerca de 5% da atividade ATPase total.

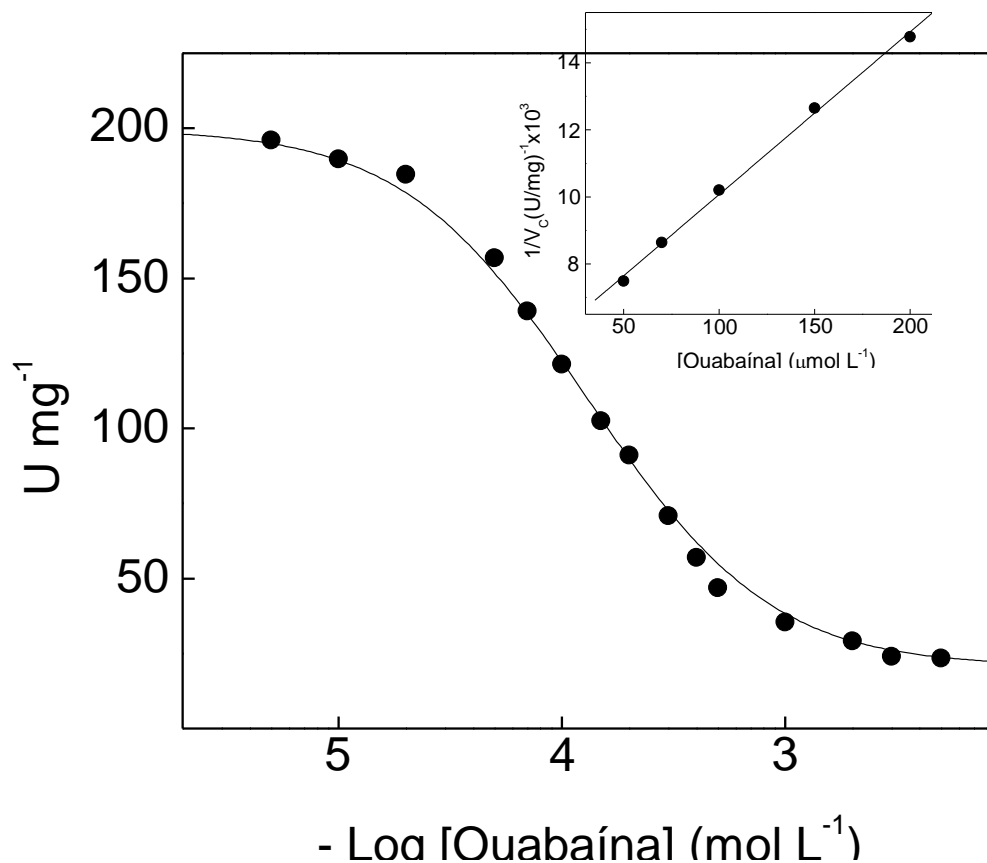


Figura 34. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_i.

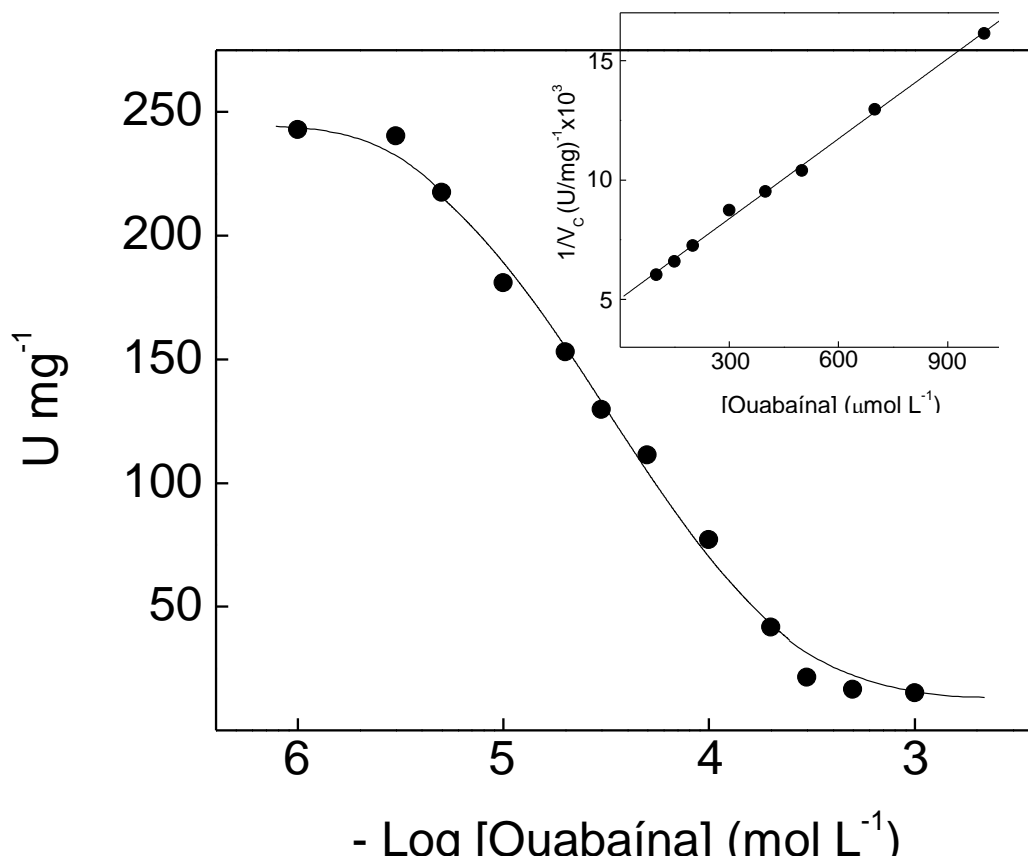


Figura 35. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NH₄Cl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

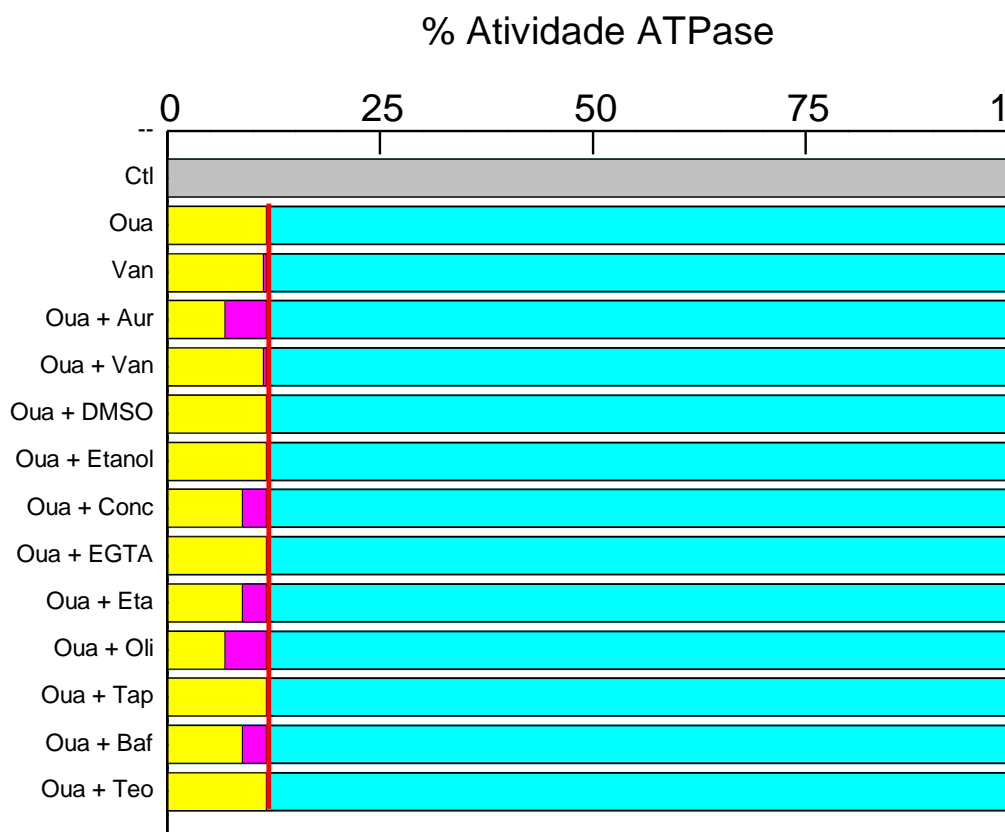


Figura 36. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da fração microsomal foi realizada usando-se 36,2 µg de proteína em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, 50 mmol L⁻¹ NaCl e 5 mmol L⁻¹ KCl num volume final de 1,0 mL. Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão e foram calculados a partir de três preparações diferentes (N= 3). Atividade ATPase total (■); Atividade residual relativa ao(s) inibidor(es) (■); Atividade ATPase contaminante (■) e Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase (■). Ctl: controle, Oua: ouabaína, Van: ortovanadato, Aur: Aurovertina, Eta: ácido etacrínico, Oli: oligomicina, DMSO: dimetilsulfóxido, Tap: tapsigargina, Baf: bafilomicina e Teo: teofilina.

O valor de atividade ATPase estimado na presença de ouabaína mais ácido etacrínico sugere a presença de Na^+ - ou K^+ -ATPase. Entretanto, os dados da inserção da Figura 28 permitem excluir a presença de Na^+ -ATPase, pois a atividade ATPase insensível à ouabaína não foi estimulada por Na^+ . Isso significa que aparentemente a preparação apresenta cerca de 3% de K^+ -ATPase, pois como pode ser observado na inserção da Figura 27, a atividade insensível à ouabaína foi estimulada em 3% por K^+ . Valores de atividade estimados na presença ouabaína e bafilomicina ou concanamicina mostraram uma inibição da atividade insensível a ouabaína (3% da atividade ATPase total), sugerindo a presença de V-ATPase.

Tabela 9. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

Inibidor	V (U mg^{-1})	Atividade residual (%)
Controle	240,7	100
Ouabaína (3 mmol L^{-1})	28,0	11,6
Vanadato ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	27,2	11,3
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + etanol ($10 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$)	26,5	11,0
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + DMSO ($20 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$)	28,7	11,9
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Oligomicina ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)	16,6	6,9
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Aurovertina B ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	15,9	6,6
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Tapsigargina ($0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	28,7	11,9
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + EGTA (1 mmol L^{-1})	28,0	11,6
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Bafilomicina A_1 ($0,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	19,7	8,2
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Concanamicina ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	22,7	9,4
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Ácido etacrínico (2 mmol L^{-1})	21,2	8,8
Ouabaína + Teofilina (5 mmol L^{-1})	27,2	11,3

4.2.2. *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ de salinidade

C. ornatus foram aclimatados em tanques com água a 33‰, durante 15 dias e submetidos às mesmas condições de luminosidade e alimentação que os animais aclimatados a 21‰. A fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ apresentou atividade ATPase total da ordem de 88 U mg⁻¹.

A Figura 37 mostra a análise da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ em gradiente contínuo de sacarose (0-50%). Observa-se a presença de 2 picos de atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase. O pico I (24 a 35% de sacarose) apresentou uma atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da ordem de 15 U mL⁻¹ e uma quantidade muito baixa de proteína. Já o pico II (41 a 47% de sacarose) possui uma maior atividade ATPase total. A presença do pico de atividade ATPase insensível a ouabaína sugere que estão presentes na preparação ATPases diferentes da (Na⁺,K⁺)-ATPase, as quais são capazes de hidrolisar ATP nas condições empregadas. A presença de dois picos de atividade em diferentes regiões do gradiente de sacarose sugere fortemente que na preparação estão presentes frações de membrana de densidade distintas contendo (Na⁺,K⁺)-ATPase.

O efeito do aumento da concentração de ATP sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, em concentrações saturantes de Mg²⁺ (2 mmol L⁻¹), Na⁺ (50 mmol L⁻¹) e K⁺ (10 mmol L⁻¹) está mostrado na Figura 38. Nestas condições foi observada uma única família de sítios para o ATP e a variação da velocidade da reação com a concentração de ATP seguiu uma cinética Michaeliana, com $V = 76,2 \pm 3,5$ U mg⁻¹ e $K_M = 46,0 \pm 2,0$ μmol L⁻¹. Nota-se também que a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada nessa mesma faixa de concentração de ATP (inserção da Figura 38) até valores da ordem de 12,7% (11,6 U mg⁻¹), o que sugere a presença de outras ATPases na preparação.

O efeito da concentração de íons magnésio sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ é mostrado na Figura 39. Concentrações crescentes de Mg²⁺, entre 0,1 mmol L⁻¹ e 2 mmol L⁻¹, estimularam a atividade até um valor máximo de $V = 74,5 \pm 3,1$ U mg⁻¹ e $K_{0,5} = 0,33 \pm 0,02$ mmol L⁻¹. A estimulação envolveu interações sítio-sítio ($n_H = 3,0$). É importante observar que a atividade ATPase insensível à ouabaína também foi estimulada pelo Mg²⁺ até valores de 10,9 U mg⁻¹, na mesma faixa de concentrações (inserção da Figura 39).

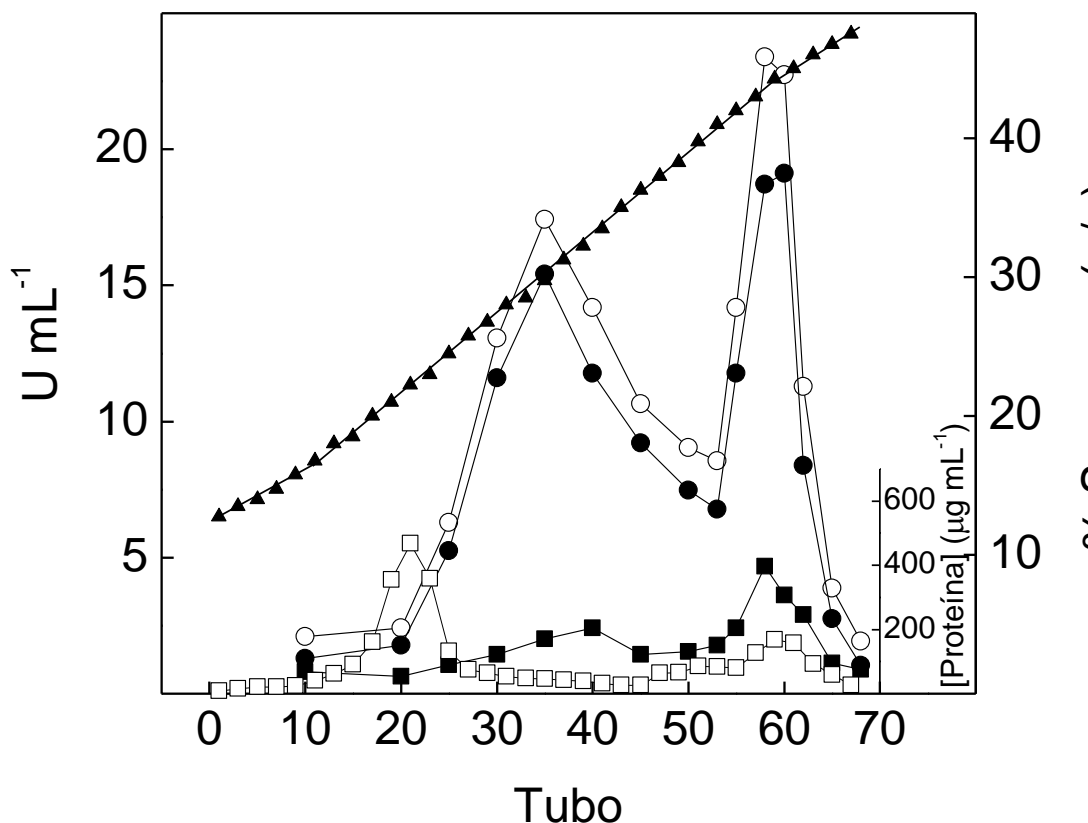


Figura 37. Centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰, em gradiente contínuo de sacarose.

Uma amostra de 2 mg de proteína foi aplicada no gradiente de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹ pH 6,8, e centrifugada a 180000g durante 3 horas, a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e em cada uma delas foram analisadas: (○) atividade ATPase total; (●) atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase; (■) atividade insensível a ouabaína; (□) dosagem de proteína e (▲) % de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. O experimento foi realizado empregando-se pelo menos três diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

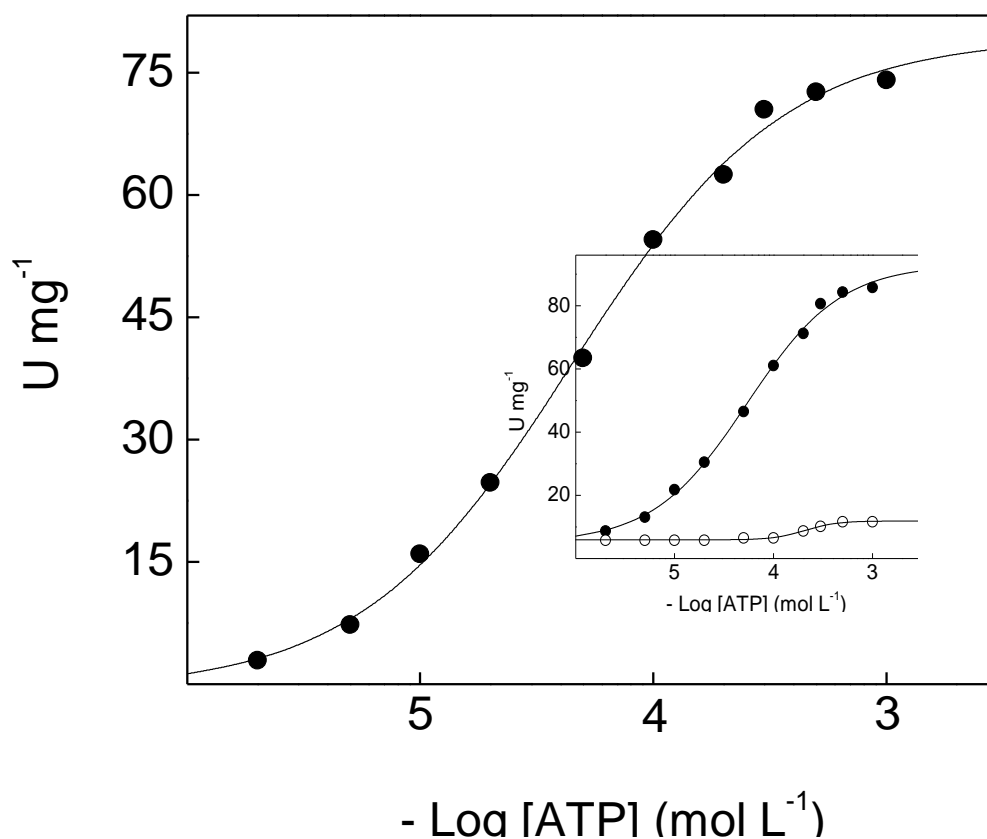


Figura 38. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2,0 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

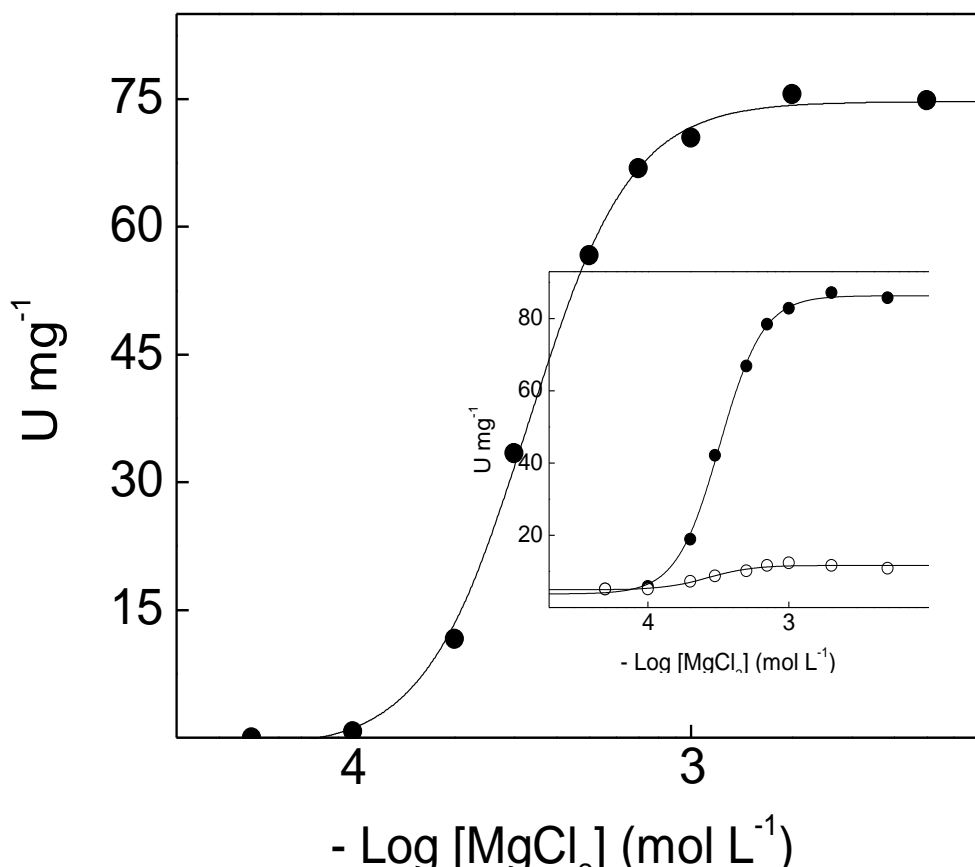


Figura 39. Efeito dos íons magnésio na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

A Figura 40 apresenta a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), MgCl_2 (2 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}), os íons potássio estimularam a atividade da enzima por meio de interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). Na faixa de concentração de K^+ entre $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e 10 mmol L^{-1} , a hidrólise do ATP ocorreu com $V = 76,4 \pm 3,0 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,03 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Para o mesmo intervalo de concentração, a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada cerca de 7% da atividade ATPase total ($V = 11,6 \text{ U mg}^{-1}$), sugerindo a presença de K^+ -ATPase.

A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons sódio, está mostrada na Figura 41. Em concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), MgCl_2 (2 mmol L^{-1}) e KCl (10 mmol L^{-1}), a enzima foi estimulada até valores máximos de $V = 76,4 \pm 3,0 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 5,3 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. No intervalo de concentração de Na^+ entre 1 mmol L^{-1} e 100 mmol L^{-1} a estimulação da enzima ocorreu com interações sítio-sítio ($n_H = 1,9$). Para o mesmo intervalo de concentração, a atividade ATPase insensível à ouabaína não foi estimulada por Na^+ , o que descarta a presença de Na^+ -ATPase (inserção da Figura 41).

A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons amônio está mostrada na Figura 42. Observa-se que na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}) e na ausência de K^+ , a enzima apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). O aumento da concentração de NH_4^+ entre $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e 50 mmol L^{-1} provocou um aumento na atividade até valores máximos de $V = 98,9 \pm 3,9 \text{ U mg}^{-1}$, com $K_{0,5} = 4,1 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. A atividade ATPase insensível à ouabaína representada (inserção da Figura 42) não foi estimulada com o aumento da concentração de NH_4^+ .

Na Tabela 10 estão resumidos os parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase de animais aclimatados a salinidade de 33‰, pelos diferentes efetores estudados.

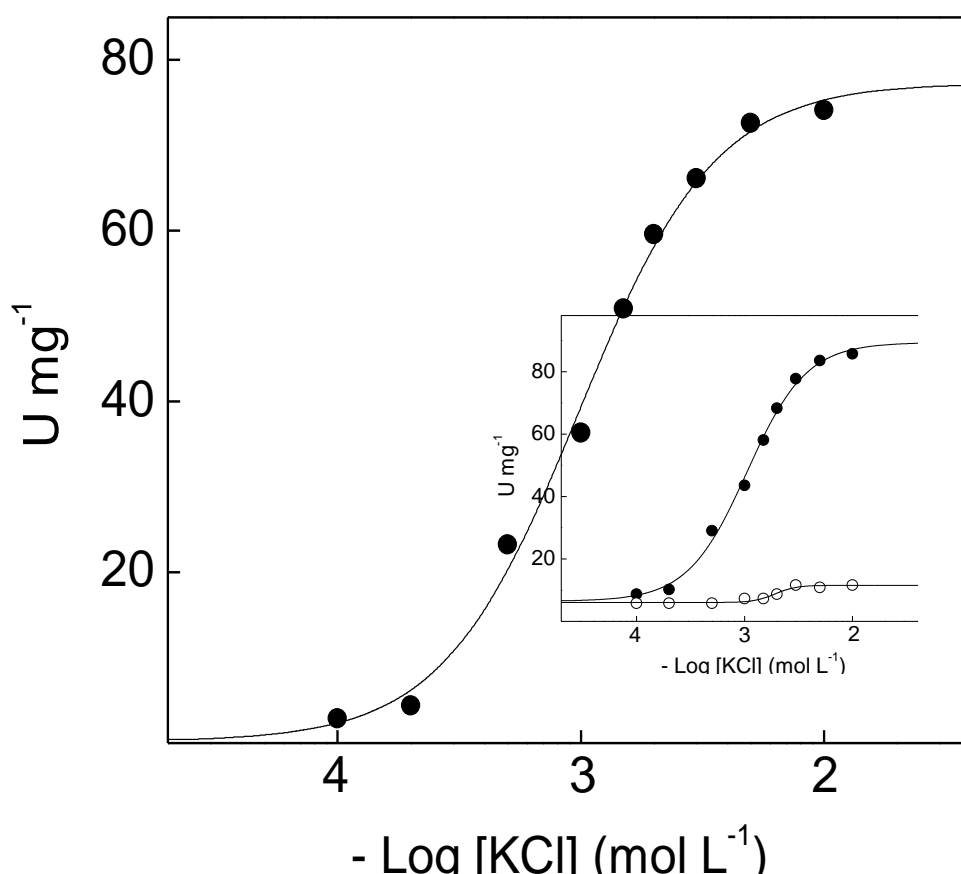


Figura 40. Efeito dos íons potássio na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

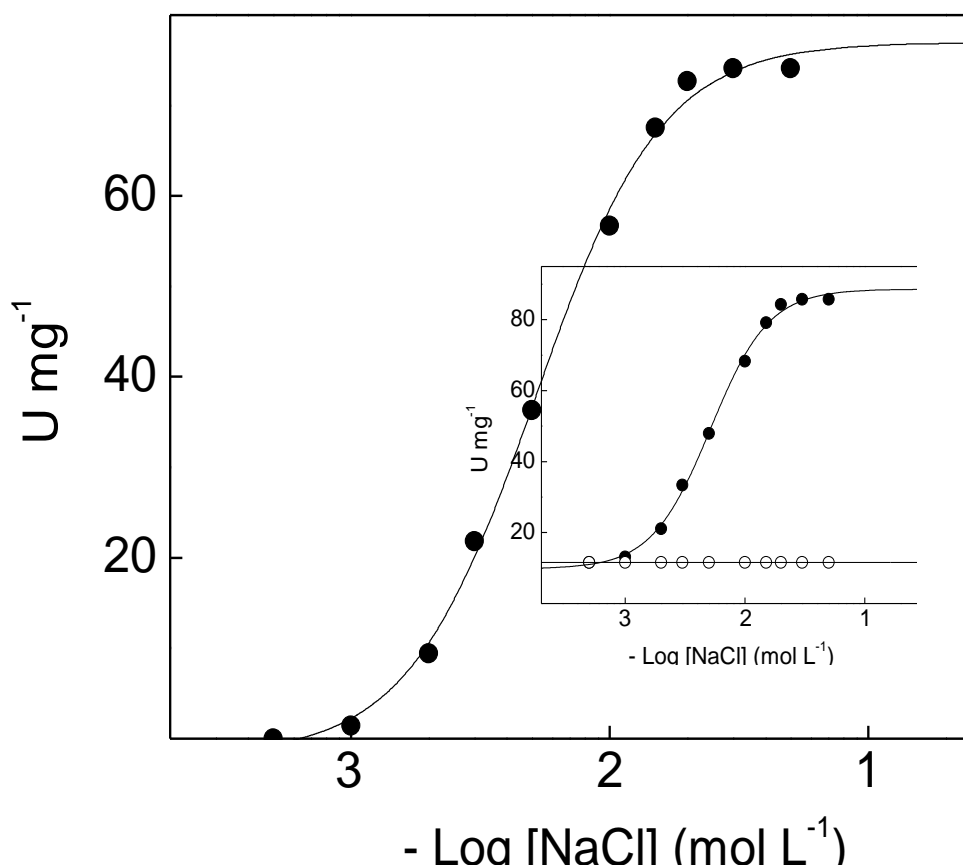


Figura 41. Efeito dos íons sódio na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

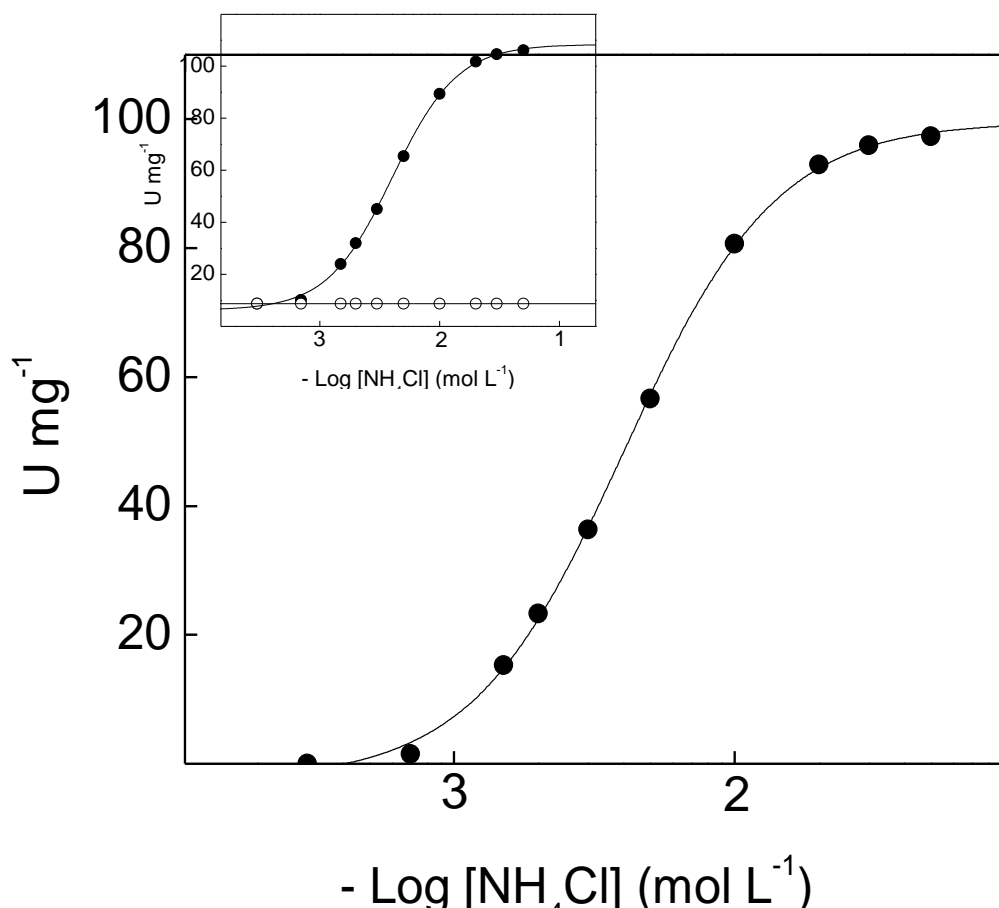


Figura 42. Efeito dos íons amônio na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A Figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

Tabela 10. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado à salinidade de 21‰ pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺.

Efetuor	V (U mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K
ATP	76,2 ± 3,5	0,046 ± 0,002	1,1	1656
Mg ²⁺	74,5 ± 3,1	0,33 ± 0,02	3,0	226
K ⁺	76,4 ± 3,0	1,03 ± 0,05	1,7	74
Na ⁺	76,4 ± 3,0	5,3 ± 0,2	1,9	14
NH ₄ ⁺	98,9 ± 3,9	4,1 ± 0,2	1,7	24

A modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase, da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, por K⁺ em diferentes concentrações de NH₄⁺ está mostrada na Figura 43. Observa-se que para concentrações crescentes de NH₄⁺, a estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase por K⁺ aumenta de 76,4 ± 3,0 U mg⁻¹ ([NH₄⁺] = 0) para 98,8 ± 3,9 U mg⁻¹ ([NH₄⁺] = 50 mmol L⁻¹). Os resultados sugerem que quando a enzima está saturada por NH₄⁺, o K⁺ consegue deslocar o primeiro íon de seu sítio e se ligar à enzima, porém na presença de 50 mmol L⁻¹ de NH₄⁺, o K⁺ não consegue mais deslocar o NH₄⁺ deste sítio.

Independente da concentração de NH₄⁺ adicionada no meio reacional, a estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase por K⁺ apresentou cooperatividade positiva (Fig. 44A). O valor do K_{0,5} diminui progressiva e significativamente de 1,03 mmol L⁻¹ para 0,005 mmol L⁻¹ com (Fig. 44B), sugerindo uma maior afinidade da enzima pelo K⁺ na presença de concentrações crescentes de NH₄⁺. A estimulação sinérgica da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase foi de 29,3% (Fig. 44C), aumentando de 76,4 U mg⁻¹ ([NH₄⁺] = zero) para 98,8 U mg⁻¹ ([NH₄⁺] = 50 mmol L⁻¹).

A modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase, da fração microsomal de *C. ornatus* aclimatado a 33‰, pelos íons NH₄⁺ na presença de concentrações fixas de íons K⁺ está mostrada na Figura 45. Observa-se que na presença de NH₄⁺ 50 mmol L⁻¹, a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase foi estimada em torno de 99 U mg⁻¹, independentemente da presença de K⁺. Isso sugere que o NH₄⁺ pode se ligar tanto em seu sítio, quanto no sítio para K⁺.

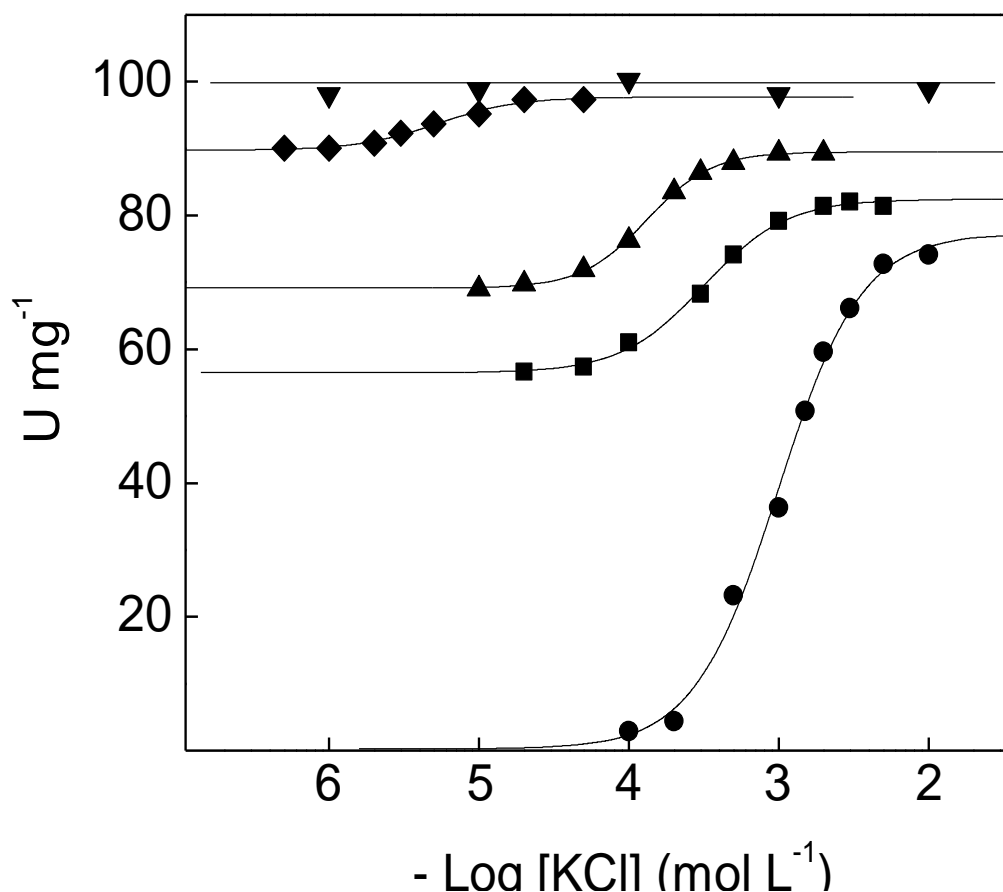


Figura 43. Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰, pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três (N= 3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (■) NH₄Cl 5 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (◆) NH₄Cl 20 mmol L⁻¹. (▼) NH₄Cl 50 mmol L⁻¹.

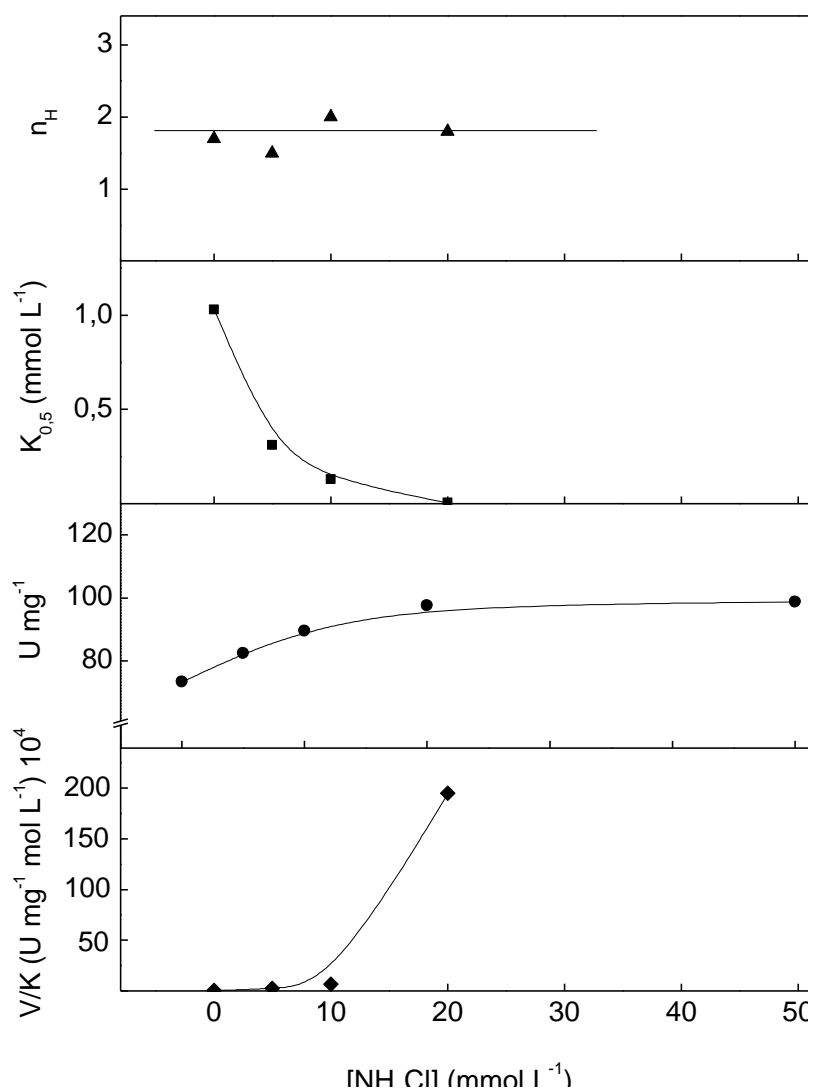


Figura 44. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V, K_{0,5}, n_H e V/K_{0,5}.

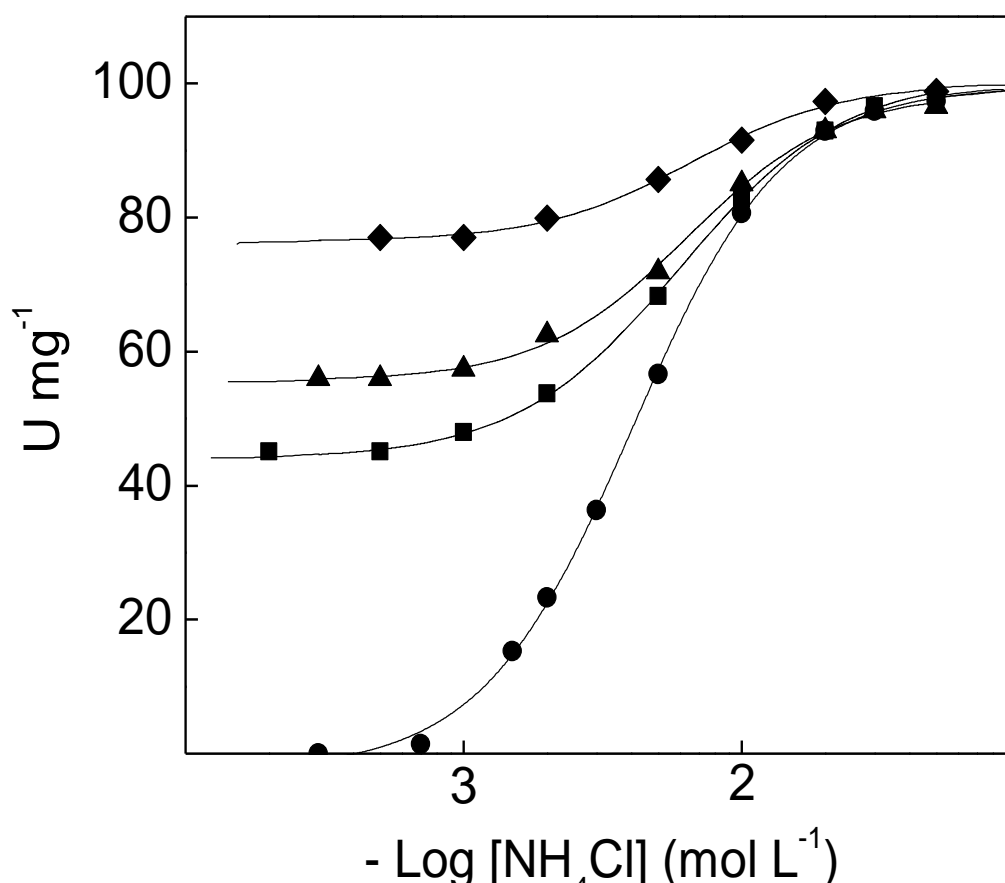


Figura 45. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAPODH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três (N= 3) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (■) KCl 1 mmol L⁻¹. (▲) KCl 3 mmol L⁻¹. (◆) KCl 10 mmol L⁻¹.

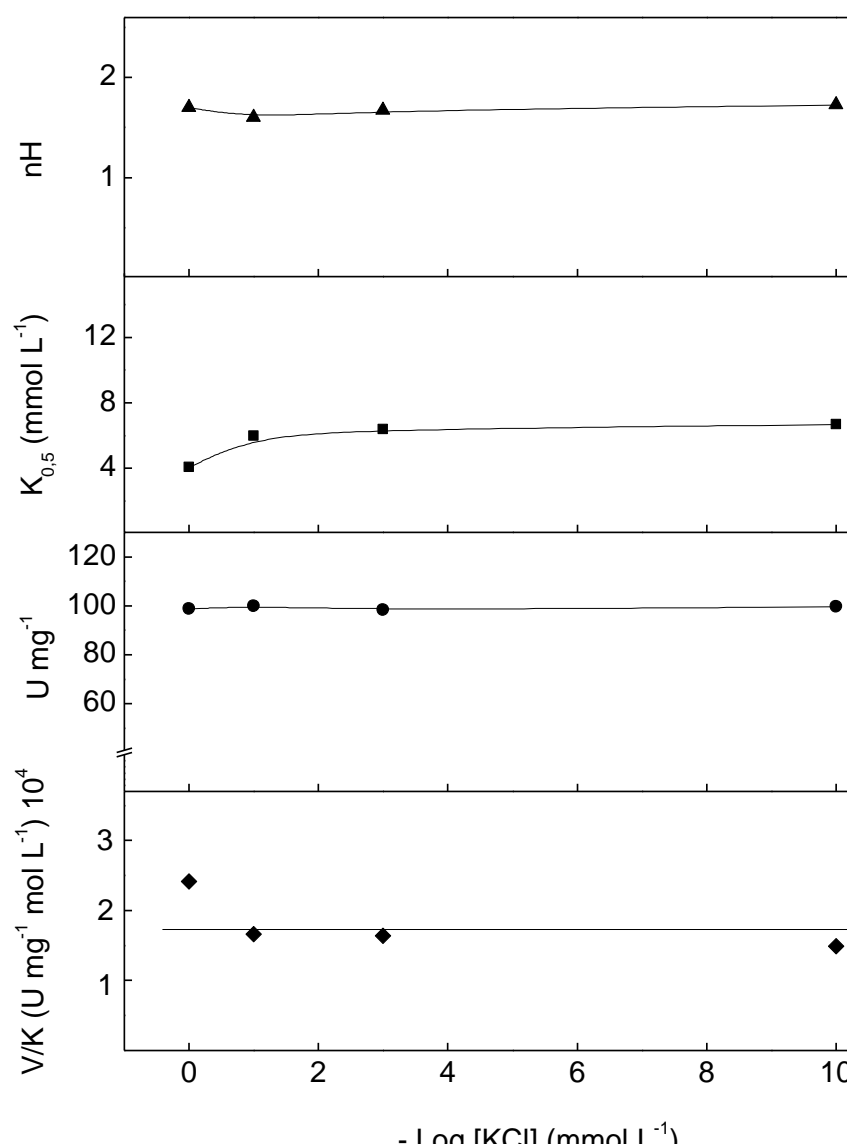


Figura 46. Variação dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da (Na^+,K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,17 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 µg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V, K_{0,5}, n_H e V/K_{0,5}.

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo NH_4^+ na presença de concentrações fixas de K^+ , está mostrado na Figura 46 e é praticamente similar ao relatado para os animais aclimatados a 21‰.

Na Tabela 11 foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio e amônio. A estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por K^+ em concentrações crescentes de NH_4^+ apresentou um aumento na eficiência catalítica da enzima (V/K), embora a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por NH_4^+ em concentrações crescentes de K^+ , não tenha resultado em mudanças significativas na eficiência catalítica.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ pelos íons potássio e amônio.

$[\text{K}^+]$ (mmol L^{-1})	$[\text{NH}_4^+]$ (mmol L^{-1})	V (U mg^{-1})	$\text{K}_{0,5}$ (mmol L^{-1})	n_H	V/K
Variável	0	$76,4 \pm 3,0$	$1,03 \pm 0,05$	1,7	71
Variável	5	$82,5 \pm 3,3$	$0,31 \pm 0,01$	1,5	266
Variável	10	$89,5 \pm 3,5$	$0,13 \pm 0,01$	2,0	688
Variável	20	$97,6 \pm 3,9$	$0,0055 \pm 0,0001$	1,8	19520
Variável	50	$98,8 \pm 3,9$	-	-	-
0	Variável	$98,9 \pm 3,9$	$4,1 \pm 0,2$	1,7	24
1	Variável	$99,9 \pm 4,0$	$6,0 \pm 0,2$	1,6	16
3	Variável	$98,5 \pm 3,8$	$6,4 \pm 0,2$	1,7	16
10	Variável	$99,7 \pm 3,9$	$6,7 \pm 0,3$	1,7	15

Na presença de concentração saturante de K^+ (10 mmol L⁻¹), concentrações crescentes de ouabaína (10⁻⁶ - 10⁻² mol L⁻¹) inibiram a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ até valores em torno de 11 U mg⁻¹ (Fig. 47), o mesmo valor encontrado quando NH_4^+ (50 mmol L⁻¹) é adicionado no meio. Este resultado indica que a estimulação sinérgica da atividade ATPase por íons NH_4^+ e K^+ reflete uma estimulação da própria (Na⁺,K⁺)-ATPase e não de uma das outras ATPases detectadas nesta preparação microsomal, responsáveis pela atividade ATPase insensível à ouabaína (Fig. 48). As curvas obtidas sugerem a presença de um único sítio de ligação para a ouabaína, independentemente da presença de íons NH_4^+ . Entretanto, os valores de K_i , estimados graficamente, foram de $114,9 \pm 5,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $28,8 \pm 1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, na ausência (inserção da Figura 47) e presença de íons NH_4^+ (inserção da Figura 48), respectivamente.

Assim como relatado para *C. ornatus* aclimatado a 21‰, animais aclimatados a 33‰ mostraram uma atividade insensível a ouabaína da ordem de 12%. Com a finalidade de esclarecer a natureza dessas ATPases insensíveis a ouabaína presentes nesta preparação, foi realizado um estudo utilizando diferentes inibidores na presença de ouabaína em concentração suficiente para inibir totalmente a atividade (Na⁺K⁺)-ATPase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12 e Figura 49. A atividade ATPase residual na presença de ouabaína 4 mmol L⁻¹ foi de 12,7%, indicando que a (Na⁺K⁺)-ATPase é responsável por cerca de 87% da atividade ATPase total. Já os valores determinados na presença de ortovanadato e ortovanadato associado à ouabaína (atividade residual de 12,7%) descartam a presença de outras P-ATPases na fração de membranas, diferentes da (Na⁺,K⁺)-ATPase. Considerando que tapsigargina e EGTA não inibiram a atividade insensível à ouabaína podemos desconsiderar esta atividade como sendo de uma Ca²⁺-ATPase de retículo. Por outro lado, a inibição parcial da atividade ATPase insensível à ouabaína por oligomicina e aurovertina indica a presença de uma ATPase do tipo F na preparação, correspondendo a 5% da atividade ATPase total. Os valores estimados na presença de ouabaína e bafilomicina A1 ou ouabaína e concanamicina sugerem a presença de V-ATPase, em uma proporção de 2,12%. A atividade ATPase insensível a ouabaína não foi inibida pela presença de teofilina indicando ausência de fosfatases alcalinas. Finalmente, a inibição da atividade insensível à ouabaína por ácido etacrínico sugere a presença de uma atividade Na⁺- e/ou K⁺-ATPase na preparação microsomal, correspondendo a 6,8% da atividade ATPase

total. Este resultado é consistente com aquele apresentado na inserção da Figura 40, mostrando que a atividade insensível à ouabaína é levemente estimulada por íons K^+ .

Uma comparação dos parâmetros cinéticos calculados para animais recém-capturados, aclimatados a 21‰ e a 33‰ estão reunidos na Tabela 13.

Tabela 12. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

Inibidor	V ($U\ mg^{-1}$)	Atividade residual (%)
Controle	85,73	100
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$)	10,89	12,7
Vanadato ($100\ \mu mol\ L^{-1}$)	10,89	12,7
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + etanol ($10\ \mu L\ mL^{-1}$)	10,89	12,7
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + DMSO ($20\ \mu L\ mL^{-1}$)	11,62	13,6
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Oligomicina ($1\ \mu g\ mL^{-1}$)	7,26	8,5
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Aurovertina B ($10\ \mu mol\ L^{-1}$)	7,26	8,5
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Tapsigargina ($0,5\ \mu mol\ L^{-1}$)	10,89	12,7
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + EGTA ($1\ mmol\ L^{-1}$)	10,89	12,7
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Bafilomicina A_1 ($0,4\ \mu mol\ L^{-1}$)	10,17	11,9
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Concanamicina ($1\ \mu mol\ L^{-1}$)	9,45	11,0
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Ácido etacrínico ($2\ mmol\ L^{-1}$)	5,81	6,8
Ouabaína ($3\ mmol\ L^{-1}$) + Teofilina ($5\ mmol\ L^{-1}$)	10,89	12,7

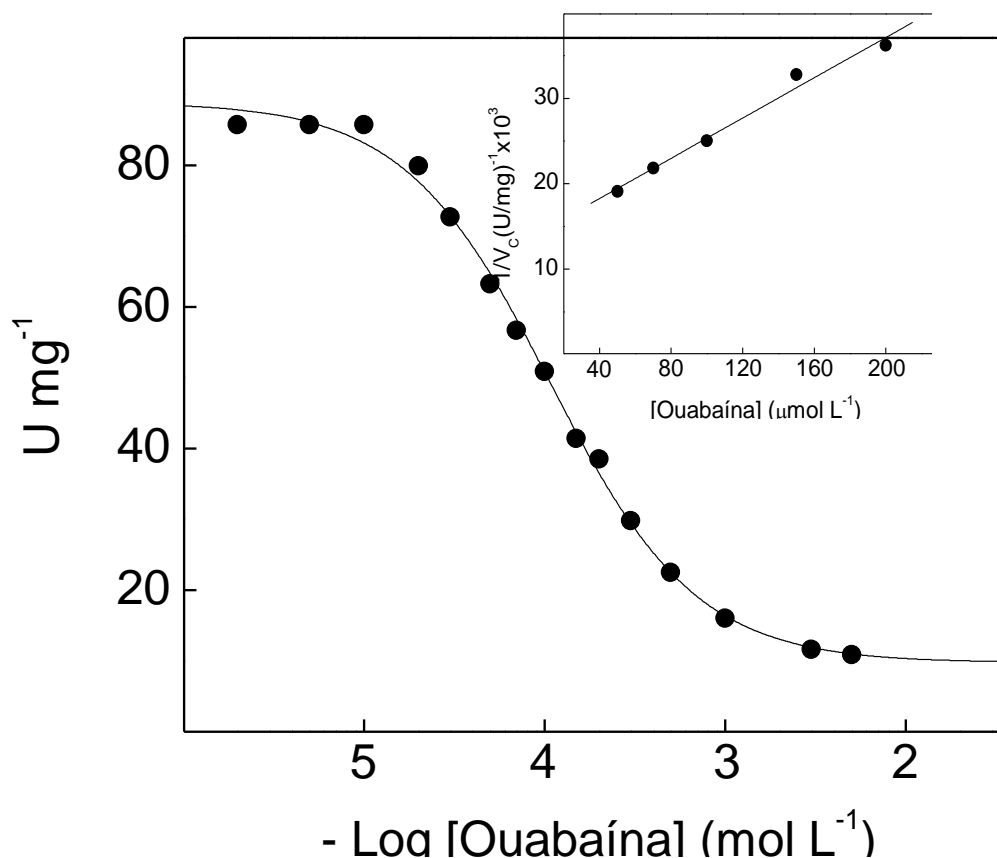


Figura 47. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 μg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

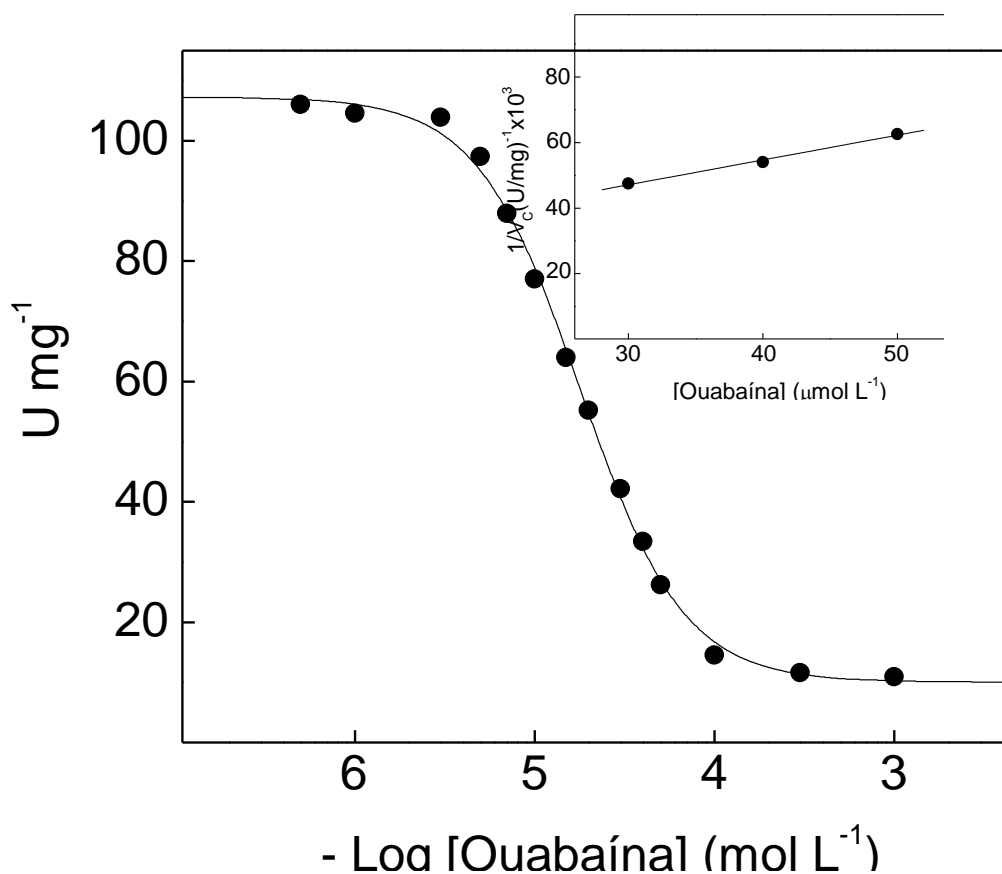


Figura 48. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NH₄Cl 50 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 22,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

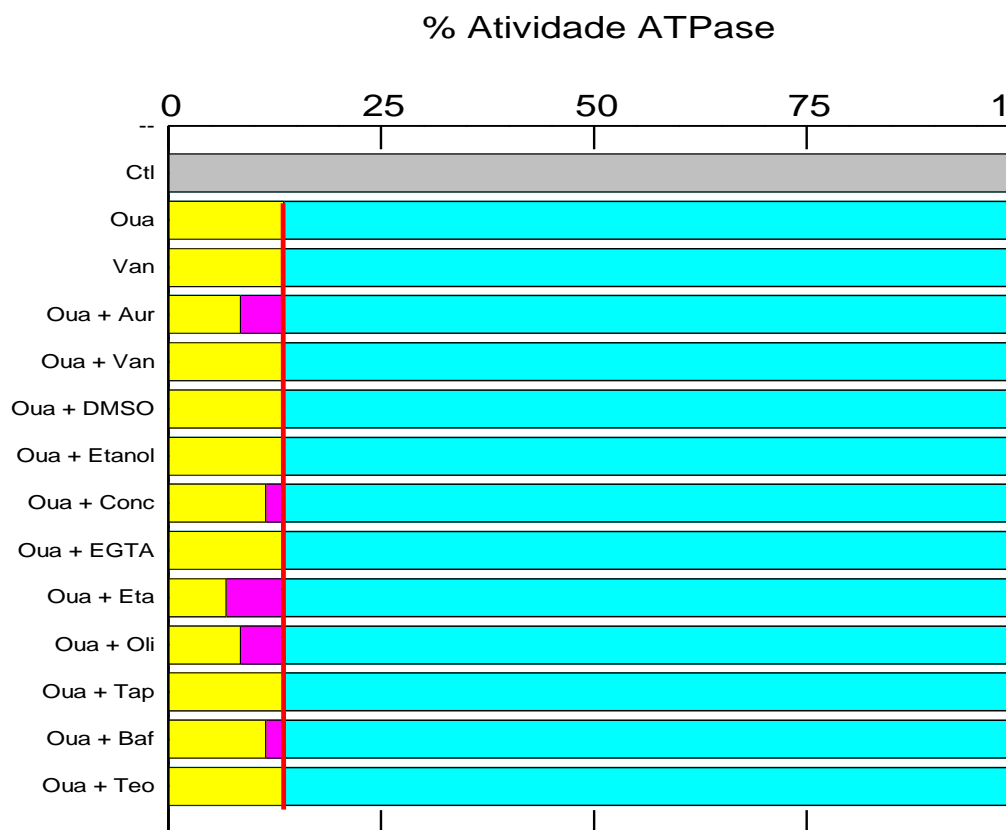


Figura 49. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 33%.

A atividade da fração microsomal foi realizada usando-se 22,2 µg de proteína em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹ num volume final de 1,0 mL. Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão e foram calculados a partir de três preparações diferentes (N=3). Atividade ATPase total (■); Atividade residual relativa ao(s) inibidor(es) (■); Atividade ATPase contaminante (■) e Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase (■). Ctl: controle, Oua: ouabaína, Van: ortovanadato, Aur: Aurovertina, Eta: ácido etacrínico, Oli: oligomicina, DMSO: dimetilsulfóxido, Tap: tapsigargina, Baf: bafilomicina e Teo: teofilina.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* recém-capturado, aclimatado a 21‰ e a 33‰ pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺ e ouabaína.

Efetor	V (U mg ⁻¹)			K (μmol L ⁻¹)			n _H		
	Recém-capturado	21‰	33‰	Recém-capturado	21‰	33‰	Recém-capturado	21‰	33‰
ATP	116,3 ± 5,4	187,7 ± 7,1	76,2 ± 3,5	160,9 ± 10,0	50,0 ± 2,5	46,0 ± 1,9	0,9	1,0	1,1
Mg²⁺	111,0 ± 4,7	183,5 ± 6,7	74,5 ± 3,1	530,0 ± 24,9	266,0 ± 10,1	333,4 ± 16,1	1,7	5,8	3,0
K⁺	116,0 ± 4,9	181,8 ± 6,9	76,4 ± 3,3	1460,0 ± 58,7	996,4 ± 49,5	1028,4 ± 47,2	1,3	1,5	1,7
Na⁺	110,6 ± 6,1	175,9 ± 6,3	76,4 ± 3,0	6300,0 ± 240,0	4180,0 ± 152,0	5272,6 ± 236,8	1,8	2,5	1,9
NH₄⁺	173,3 ± 6,9	240,7 ± 11,2	98,9 ± 3,9	5420,0 ± 170,0	4440,0 ± 170,0	4144,0 ± 153,0	1,4	1,4	1,7
Ouabaína (K⁺)				74,5 ± 1,2	110,0 ± 2,6	114,9 ± 3,8			
Ouabaína (NH₄⁺)				26,6 ± 0,8	44,9 ± 0,8	28,8 ± 0,6			

4.3. Efeito de poliaminas na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ de salinidade

A Figura 50 mostra o efeito da espermina e espermidina na atividade ATPase total da fração microsomal das brânquias de *C. ornatus*. Concentrações crescentes de espermidina ($5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-2} mol L⁻¹) diminuíram a atividade ATPase de 207 U mg⁻¹ para valores inferiores a 1 U mg⁻¹ (Fig. 50A). Entretanto, a variação da concentração de espermina entre 10^{-6} e 10^{-2} mol L⁻¹ provocou uma inibição da hidrólise do ATP até valores de 120 U mg⁻¹ (Fig. 50B)

A modulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelo ATP foi afetada na presença de poliaminas (Fig. 51). Na presença de 10 mmol L⁻¹ de espermidina a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase foi consideravelmente inibida (Fig. 51A). Concentrações crescentes de ATP, entre 10^{-6} e $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, estimularam a atividade até um valor máximo de $88,5 \pm 3,0$ U mg⁻¹, em contraste com o valor de $187,7 \pm 7,1$ U mg⁻¹ estimado na ausência de poliamina (Tabela 14). Na presença de 10 mmol L⁻¹ de espermina, a inibição foi menor que a observada para espermidina, resultando em uma velocidade máxima de $94,3 \pm 4,1$ U mg⁻¹ no mesmo intervalo de concentração de ATP. Os insets das figuras mostram as atividades ATPase total e ATPase insensível a ouabaína. Na presença de poliaminas a enzima hidrolisa o ATP através de interações sítio-sítio, enquanto na ausência de ambos, espermina e espermidina, a hidrólise ocorre obedecendo uma cinética Michaeliana (Tabela 14). Além disso, o valor de K_{0,5} foi 2,5 ($23,0 \pm 1,0$ μmol L⁻¹ para espermina) e 5 vezes ($10,5 \pm 0,4$ μmol L⁻¹ para espermidina) menor que o valor de K_M ($50,0 \pm 2,5$ μmol L⁻¹) estimado na ausência de poliaminas.

A modulação por magnésio da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* também foi afetada pela presença de espermina e espermidina (Fig. 52). A estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase por Mg²⁺ na presença de espermina (Fig. 52A) foi 46,5% daquela estimada na ausência da poliamina. A Figura 52B mostra que a estimulação da enzima na presença de 10 mM de espermidina alcançou uma velocidade de $94,7 \pm 4,4$ U mg⁻¹. Nenhuma mudança significativa foi observada nos valores de K_{0,5} independentemente da presença da poliamina (Tabela 14).

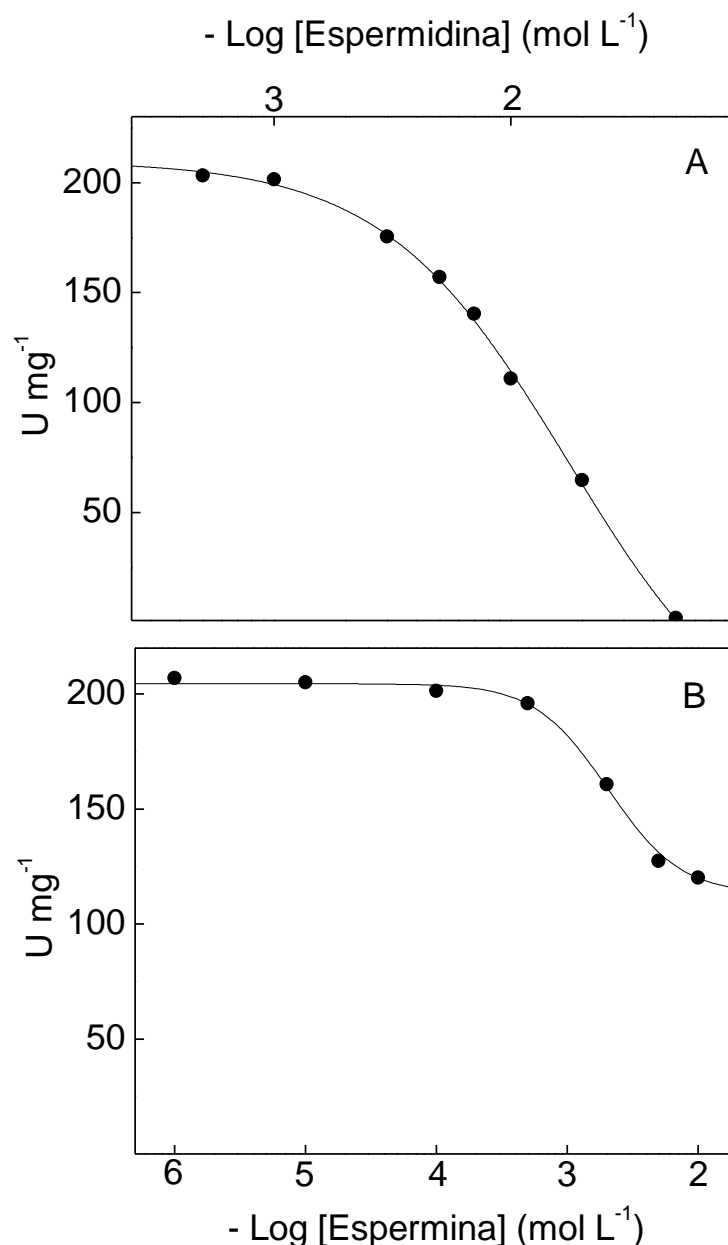


Figura 50. Efeito da concentração de espermidina (A) e espermina(B) sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

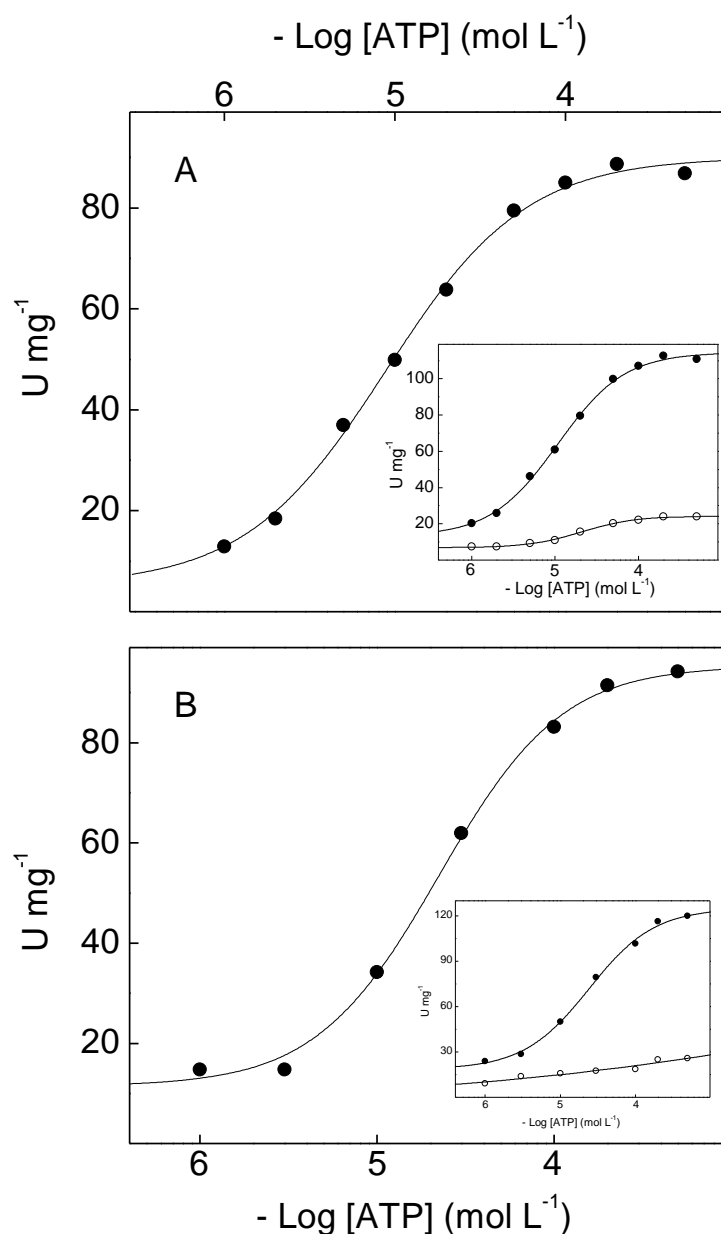


Figura 51. Efeito da concentração de ATP na presença de espermidina (A) e espermina (B) sobre a atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo espermidina ou espermina 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** Atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

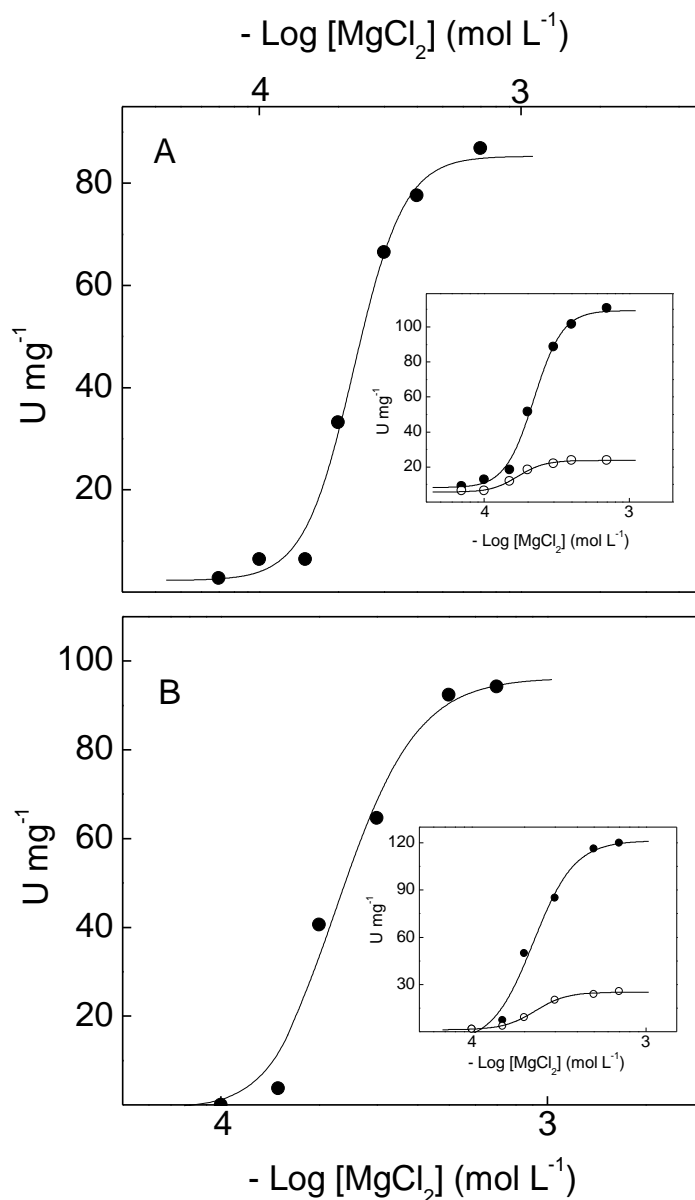


Figura 52. Efeito da concentração de MgCl_2 na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C , em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo espermidina ou espermina 10 mmol L^{-1} , ATP $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl 50 mmol L^{-1} , KCl 10 mmol L^{-1} , NADH $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, FEP $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de $36,2 \mu\text{g}$ de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** Atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

A estimulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase por Na^+ (Fig. 53) e K^+ (Fig. 54) na presença de poliamina resultou em uma mudança significativa nos valores de $K_{0,5}$. Na faixa de concentração de Na^+ entre 1 mmol L^{-1} e 100 mmol L^{-1} os valores calculados para $K_{0,5}$ na presença de espermidina (Fig. 53A) ou espermina (Fig. 53B) foram cerca de 3 vezes menores que o observado na ausência de poliamina (Tabela 14). Para a estimulação por K^+ , a afinidade da enzima aumentou 9 vezes ($107,0 \pm 4,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e 6 vezes ($167,0 \pm 8,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de espermidina (Fig. 54A) e espermina (Fig. 54B), respectivamente. A velocidade máxima estimada para a estimulação por K^+ ($97,5 \pm 4,8 \text{ U mg}^{-1}$ e $91,0 \pm 3,3 \text{ U mg}^{-1}$, para espermina e espermidina, respectivamente) e por Na^+ ($97,5 \pm 4,6 \text{ U mg}^{-1}$ e $89,1 \pm 3,1 \text{ U mg}^{-1}$, para espermina e espermidina, respectivamente) foram similares.

Na presença de 10 mmol L^{-1} de espermidina (Fig. 55A), concentrações crescentes de ouabaína (10^{-5} a $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) inibiram a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* (estimada em $110,9 \pm 3,3 \text{ U mg}^{-1}$) até valores de $24,0 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$. Nessas condições o valor de K_I determinado graficamente foi muito próximo ao calculado na ausência de poliamina (Tabela 14). Na presença de 10 mmol L^{-1} de espermina, o aumento da concentração de ouabaína na mesma faixa de concentração provocou uma diminuição na atividade que passou de $120,1 \pm 3,6 \text{ U mg}^{-1}$ para $28,6 \pm 0,8 \text{ U mg}^{-1}$, porém o valor de K_I foi 2 vezes maior que o calculado na ausência de poliamina (Tabela 14).

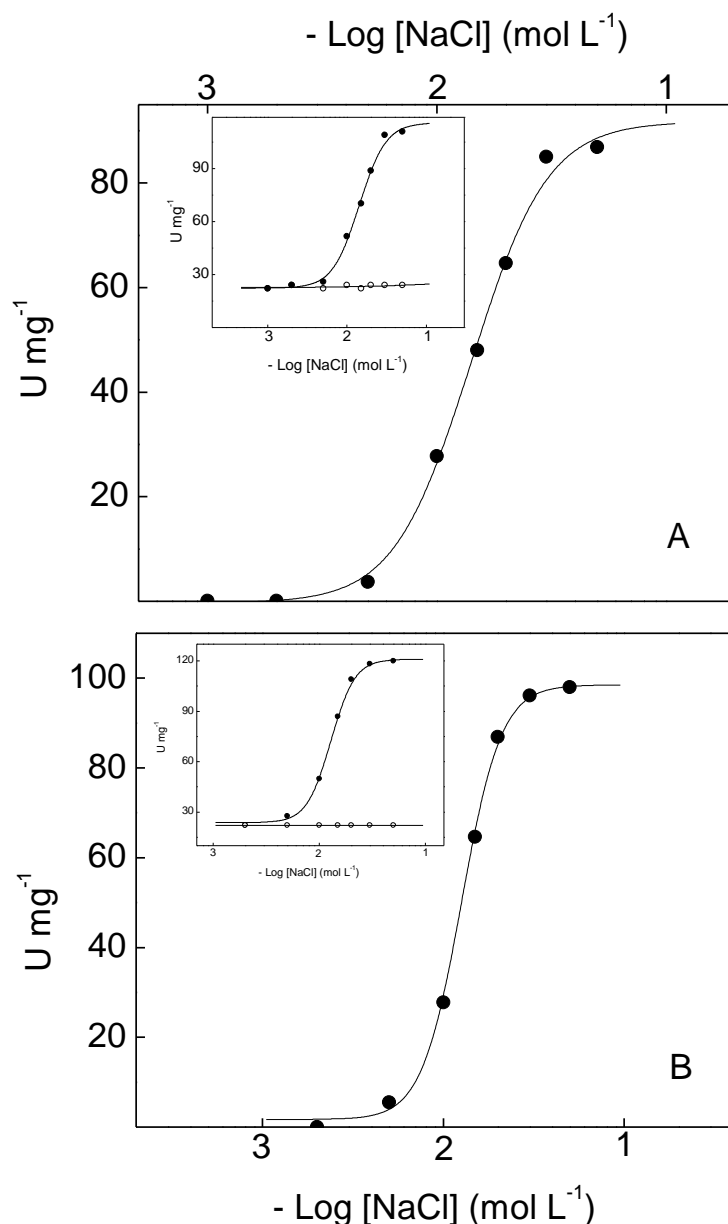


Figura 53. Efeito da concentração de NaCl na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo espermidina ou espermina 10 mmol L^{-1} , ATP 0,2 mmol L^{-1} , MgCl_2 0,7 mmol L^{-1} , KCl 10 mmol L^{-1} , NADH 0,20 mmol L^{-1} , FEP 3,2 mmol L^{-1} , 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** Atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

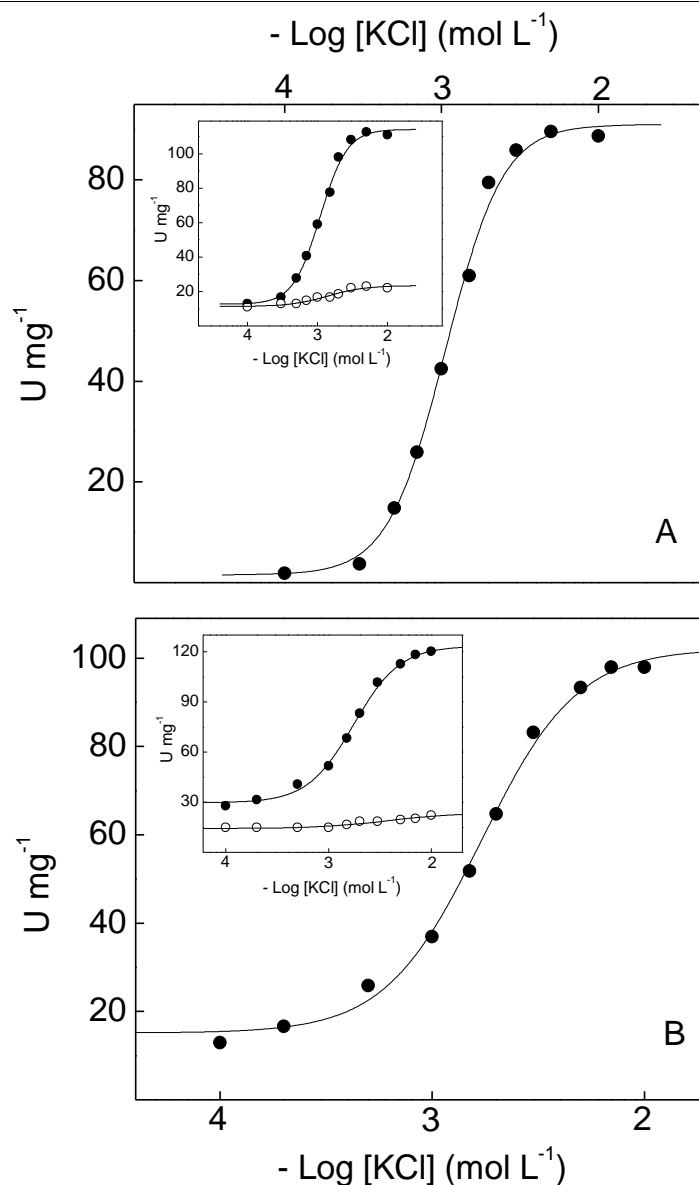


Figura 54. Efeito da concentração de KCl na presença de espermidina (A) ou espermina (B) sobre a atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo espermidina ou espermina 10 mmol L⁻¹, ATP 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** Atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

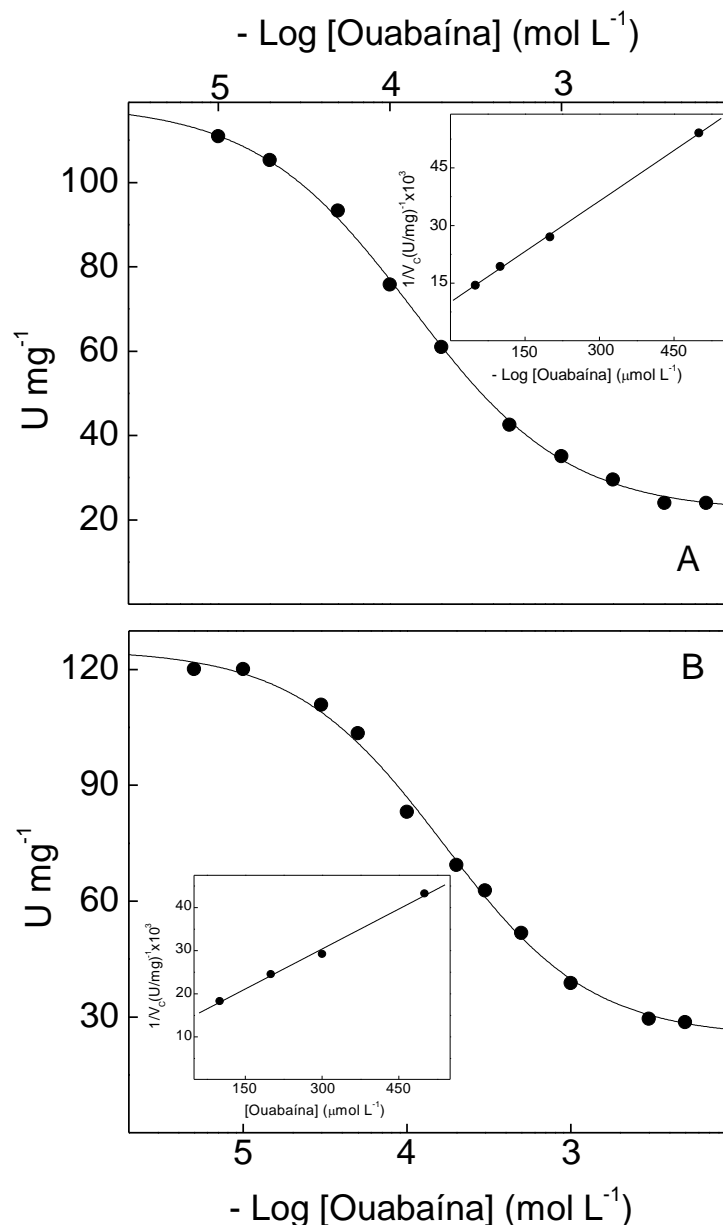


Figura 55. Efeito da concentração de ouabaína na presença de espermidina (A) ou espermina (B) na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21 ‰.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo espermidina ou espermina 10mmol L⁻¹, ATP 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado em duplicata usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21‰ e na presença de espermina e espermidina, pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺ e ouabaína.

Efetor	V (U mg ⁻¹)			K (μmol L ⁻¹)			n _H		
	Controle	Espermina	Espermidina	Controle	Espermina	Espermidina	Controle	Espermina	Espermidina
ATP	187,7 ± 7,1	94,3 ± 4,1	88,5 ± 3,0	50,0 ± 2,5	23,0 ± 1,0	10,5 ± 0,4	1,0	1,4	1,3
Mg²⁺	183,5 ± 6,7	94,7 ± 4,4	85,4 ± 2,8	266,0 ± 10,1	230,0 ± 8,7	230,0 ± 8,5	5,8	4,2	4,8
Na⁺	175,9 ± 6,3	97,5 ± 4,6	89,1 ± 3,1	4180,0 ± 152,0	1230,0 ± 50,1	1380,0 ± 50,3	1,5	4,2	2,8
K⁺	181,8 ± 6,9	97,5 ± 4,8	91,0 ± 3,3	996,4 ± 49,5	167,0 ± 8,0	107,0 ± 4,9	2,5	1,82	2,5
Ouabaína				110,0 ± 2,6	190,8 ± 9,2	115,0 ± 5,2			

4.4. Efeito do tempo de aclimação na concentração de cátions e osmolalidade da hemolinfa

Os animais foram aclimatados por 15 dias em tanques contendo 32 L de água do mar com salinidade de 33‰. Após o período de aclimação os animais foram transferidos para tanques de igual capacidade contendo água a 21‰. A hemolinfa dos animais foi retirada antes da transferência ($t=0$) e após 1h, 5h, 24h, 120h e 360h, utilizando uma seringa de insulina.

A osmolalidade da hemolinfa foi similar entre o animal recém-capturado ($853,7 \pm 1,2$ mOsm kg H_2O^{-1}) e aclimatado a 33‰ ($830,5 \pm 30,8$ mOsm kg H_2O^{-1}), porém houve uma diminuição no valor encontrado após 15 dias de aclimação dos animais a 21‰ ($681,8 \pm 21,6$ mOsm kg H_2O^{-1}).

A concentração de Na^+ na hemolinfa do animal aclimatado a 33‰ é significativamente maior que a concentração deste íon na água a 21‰. A transferência dos animais aclimatados a 33‰ para 21‰ provocou um decréscimo acentuado na concentração de Na^+ 1 h após serem transferidos. Esse valor permaneceu abaixo da concentração do meio externo por um período de 2 dias. A concentração de Na^+ ficou estável 5 dias após a transferência, assumindo um valor próximo a 330 mmol L^{-1} (Fig. 56A).

Independente da condição a que o animal está submetido, a concentração de Ca^{2+} é sempre superior na hemolinfa do animal comparada com a água à salinidade de 21‰. A transferência dos animais aclimatados a 33‰ para 21‰ faz com que a concentração de Ca^{2+} diminua de $18,6 \pm 0,35 \text{ mmol L}^{-1}$ ($t=0$) para $10,7 \pm 0,45 \text{ mmol L}^{-1}$ depois de 1 h de aclimação. A concentração de Ca^{2+} permanece baixa durante 24 h quando o animal começa a recuperar o íon perdido após a transferência, porém não consegue voltar ao valor encontrado no animal aclimatado a 33‰ (Fig. 56B).

A concentração de K^+ na hemolinfa de *C. ornatus* não é regulada durante o período de aclimação, a concentração deste íon diminui continuamente de $14,4 \pm 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ($t=0$) para $9,6 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($t=360 \text{ h}$), ficando estável após 120 h em contato com água a 21‰. Porém mesmo com o declínio na concentração de K^+ na hemolinfa do animal durante a aclimação, a concentração deste íon na hemolinfa é sempre superior a concentração na água a 21‰ (Fig. 56C).

A concentração de Mg^{2+} na hemolinfa do animal assume um valor mínimo 24 h após a transferência para a água a 21‰ ($12,1 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$). Após 360 h de

aclimação ocorre uma recuperação ($14,3 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$). Entretanto a recuperação de Mg^{2+} pelo animal é parcial, não conseguindo atingir a concentração encontrada no animal aclimatado a 33‰ de $19,8 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 56D). Nas condições de estudo a concentração de Mg^{2+} na hemolinfa é sempre inferior a do meio externo a 21‰ de salinidade.

Na Tabela 15 estão resumidos os resultados obtidos para animais recém capturados e aclimatados.

Tabela 15. Concentração de íons na hemolinfa de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ e transferido para 21‰ de salinidade

Tempo (h)	[Na ⁺] (mmol L ⁻¹)	[Ca ²⁺] (mmol L ⁻¹)	[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[Mg ²⁺] (mmol L ⁻¹)
recém-capturado	372,0 ± 16,3	13,6 ± 1,0	12,2 ± 0,7	19,2 ± 0,3
0	405,0 ± 9,9	18,6 ± 0,6	14,4 ± 0,8	19,8 ± 0,3
1	243,0 ± 4,3	10,7 ± 0,8	15,2 ± 0,4	15,7 ± 0,4
5	285,0 ± 10,0	13,1 ± 0,6	12,7 ± 0,3	13,8 ± 0,2
24	250,0 ± 6,8	11,5 ± 0,6	12,5 ± 0,3	12,1 ± 0,3
120	352,0 ± 6,0	14,9 ± 0,4	9,0 ± 0,4	15,5 ± 0,3
360	329,0 ± 8,8	15,6 ± 0,6	9,6 ± 0,2	14,3 ± 0,4

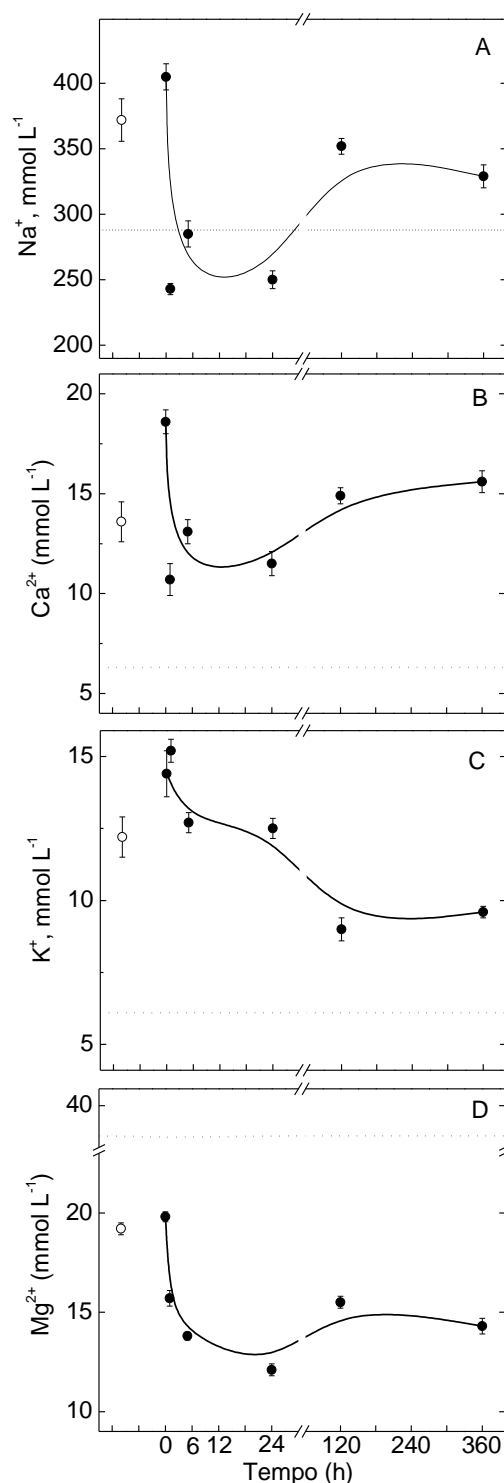


Figura 56. Concentração de íons na hemolinfa de *C. ornatus* aclimatado a 33‰ e transferidos para 21‰ de salinidade.

A- concentração de Na⁺. B- concentração de Ca²⁺. C- concentração de K⁺. D- concentração de Mg²⁺. (○) animais recém-capturados. (●) concentração de íons após a transferência dos animais aclimatados a 33‰ para 21‰ de salinidade. A leitura foi realizada utilizando três diferentes amostras de hemolinfa (N= 3). A linha pontilhada representa a concentração do íon na água a salinidade de 21‰.

4.5. Efeito do tempo de aclimação na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase nas brânquias posteriores de *C. ornatus*

Os animais foram aclimatados durante 15 dias em tanques a 33‰ de salinidade e em seguida transferidos para tanques contendo água a 21‰. Os animais foram sacrificados e as brânquias posteriores foram removidas e o homogeneizado preparado como descrito em Materiais e Métodos. A atividade foi determinada para cada homogeneizado de animais antes da transferência (t= 0) e após 1, 5, 24, 120 e 240 h da mudança de salinidade (Fig. 57).

Podemos observar uma diminuição na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase imediatamente após a transferência dos animais para salinidade de 21‰ (1 h), retomando a atividade inicial (animais aclimatados a 33‰) 24 h após serem submetidos a salinidade menor. A atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase assume valores 2,4 vezes maior quando o animal está aclimatado por 240 h a 21‰, não variando mais após esse período.

A Tabela 16 reúne os valores de atividade ATPase total, insensível a ouabaína e (Na⁺,K⁺)-ATPase para *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ e imediatamente transferidos a 21‰ de salinidade.

Tabela 16. Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial posterior (6º, 7º e 8º pares) de *Callinectes ornatus* aclimatados a 33‰ e imediatamente transferidos para 21‰ de salinidade.

Tempo (h)	ATPase Total (U mg ⁻¹)	Insensível a ouabaína (U mg ⁻¹)	(Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase (U mg ⁻¹)
0	86,9 ± 3,0	10,9 ± 0,3	76,0 ± 2,5
1	63,2 ± 2,2	9,7 ± 0,3	53,5 ± 1,8
5	79,5 ± 2,7	13,6 ± 0,4	65,9 ± 2,1
24	96,0 ± 3,4	9,8 ± 0,3	86,2 ± 3,3
120	129,5 ± 4,0	11,9 ± 0,4	117,6 ± 4,0
240	203,3 ± 6,5	18,3 ± 0,5	185,0 ± 5,9

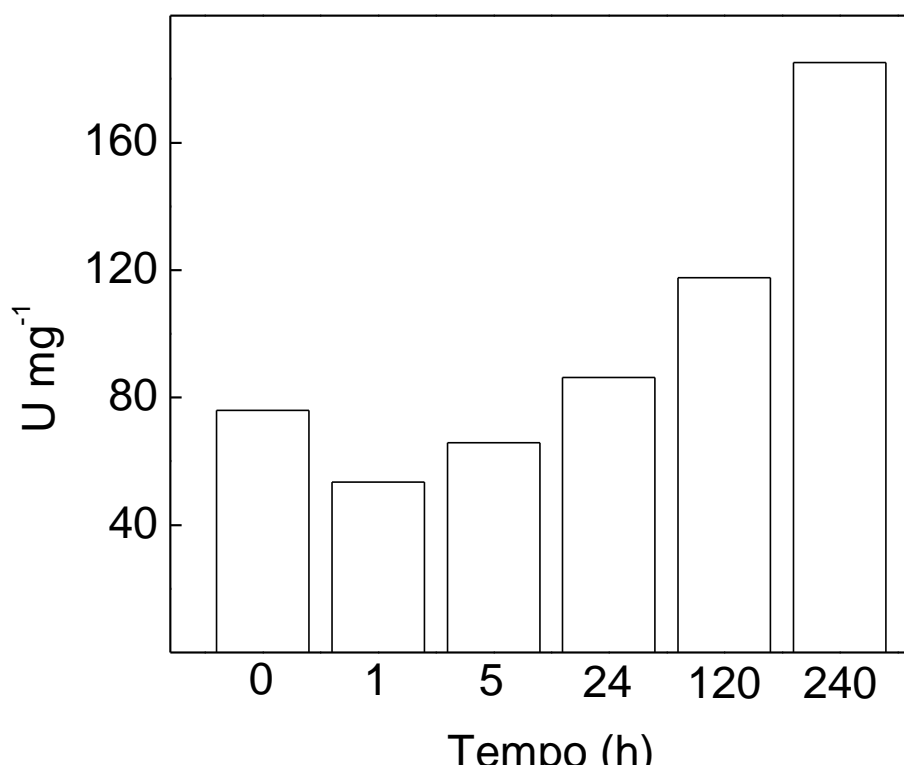


Figura 57. Atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33‰ e transferidos para 21‰ de salinidade.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 0,5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado usando-se diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3).

4.6. Efeito da aclimação a baixa salinidade sobre a concentração e atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase nas brânquias individuais (6^a e 7^a brânquia)

SDS-PAGE revelou que houve uma variação não só no perfil protéico durante a aclimação (Fig. 24), mas também entre as brânquias 6 e 7 de animais submetidos a mesma salinidade externa (Fig. 58). Quando o animal está aclimatado a 33‰, a concentração de proteínas com peso molecular de 225 e 150 kDa é maior na 7^a brânquia (A2) que na 6^a brânquia (A1). Da mesma forma para o animal aclimatado a 21‰, a concentração de algumas proteínas também variam para a 6^a (A3) e 7^a (A4) brânquia. A presença de uma única banda imunorreativa ($M_r \cong 109$ kDa) para ambas as brânquias 6^a (B1 e B3) e 7^a (B2 e B4) e ambas as condições 33‰ (B1 e B2) e 21‰ (B3 e B4), sugere a presença de uma única isoforma da subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase. Nota-se que, independente da brânquia estudada, a quantidade da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase é maior quando o animal está aclimatado a 21‰. Da mesma forma, independente da salinidade, a quantidade da subunidade α também é maior na 7^a que na 6^a brânquia (Fig.58).

A modulação por ATP da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal da 6^a e 7^a brânquia separadas para *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ de salinidade está mostrada na Tabela 17. A variação da concentração de ATP de (10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹), estimulou a atividade por meio de interações sítio-sítio ($n_H > 1,0$) para ambas as amostras. Independente da concentração salina, a atividade da 6^a brânquia é sempre maior que a atividade da 7^a brânquia, em cerca de 30%. Da mesma forma, a aclimação a uma salinidade inferior produz um aumento de 60% no valor de atividade, independente da brânquia testada. A aclimação em meio diluído produz um aumento da afinidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo ATP, porém a 6^a brânquia apresenta um valor de $K_{0,5}$ sempre menor quando comparado com o da 7^a brânquia, tornando a eficiência catalítica maior na 6^a brânquia. Ao contrário do observado para a modulação pelo ATP, a 7^a brânquia apresenta maior afinidade pela ouabaína, de cerca de 40% maior que a da 6^a brânquia, independente da salinidade do meio.

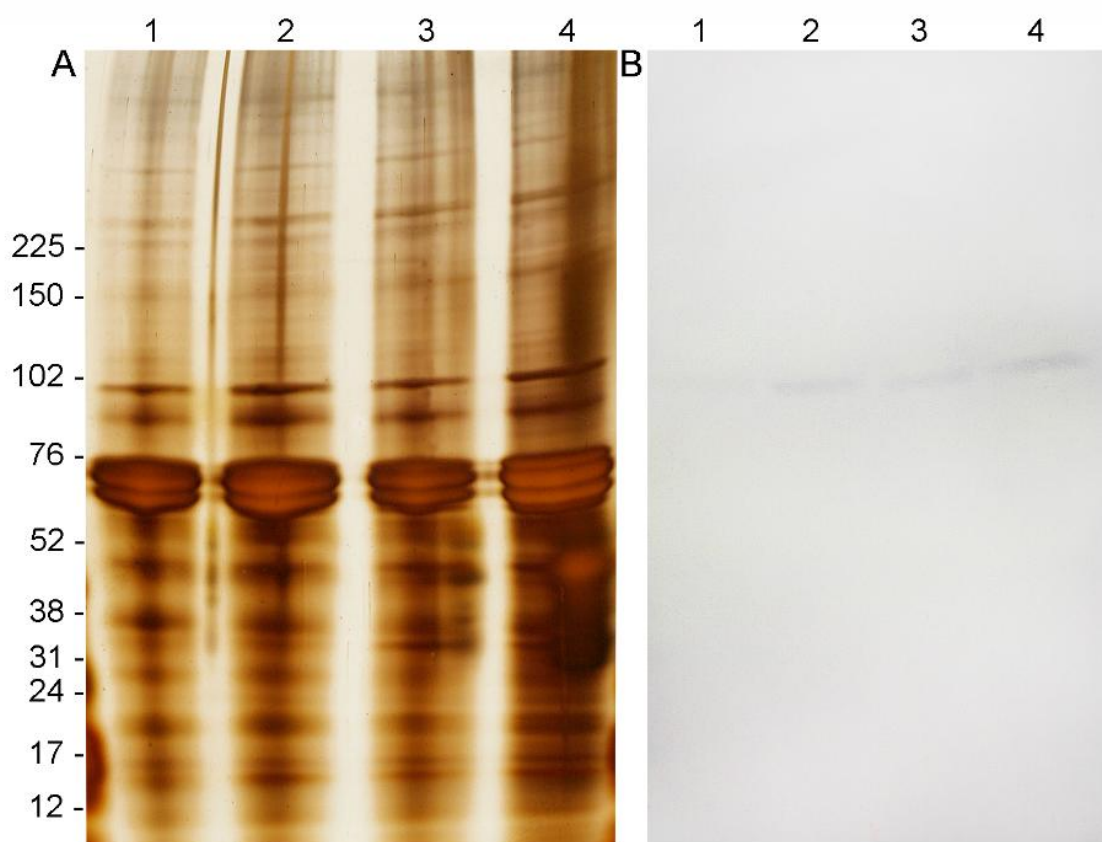


Figura 58. SDS-PAGE e Western blot da fração microsomal da 6ª e 7ª brânquia de *Callinectes ornatus* aclimatado a 33 e 21‰ por 10 dias.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% usando 3 µg de proteína para a revelação com prata e 60 µg de proteína para a análise por Western blotting. Após a corrida, uma das metades do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida à eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 (diluído 1:10) durante 1h, a 25°C, com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado a fosfatase alcalina. **A-** Coloração com nitrato de prata. **B-** Western blotting. 1 e 2: *C. ornatus* aclimatado a 33‰. 3 e 4: *C. ornatus* aclimatado a 21‰. 1 e 3: 6ª brânquia. 2 e 4: 7ª brânquia.

Tabela 17. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo ATP e ouabaína da 6^a e 7^a brânquias de *Callinectes ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ de salinidade durante 10 dias.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 0,7 mmol L⁻¹ (ou 2,0 mmol L⁻¹ para 33‰), KCl 5 mmol L⁻¹ (ou 10 mmol L⁻¹ para 33‰) e NaCl 50 mmol L⁻¹ (ambas as salinidades), NADH 0,20 mmol L⁻¹, FEP 3,2 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3).

Efetor/Inibidor	V (U mg ⁻¹)		K _{0.5} or K _I (µmol L ⁻¹)		n _H		V/K	
	21 ‰	33 ‰	21 ‰	33 ‰	21 ‰	33‰	21 ‰	33‰
ATP 6 ^a brânquia	200,5 ± 7,1	83,5 ± 2,6	26,0 ± 0,9	37,0 ± 1,3	1,3	1,2	7,7	2,3
ATP 7 ^a brânquia	145,2 ± 5,0	55,6 ± 2,0	38,7 ± 1,3	44,0 ± 1,5	1,7	1,2	3,8	1,3
Ouabaína 6 ^a brânquia	-	-	147,5 ± 5,1	117,3 ± 4,0	-	-	-	-
Ouabaína 7 ^a brânquia	-	-	88,8 ± 3,2	62,6 ± 2,2	-	-	-	-

4.7. Análises moleculares

4.7.1. Identificação dos genes codificadores das proteínas (Na⁺, K⁺)-ATPase e RPL10 em *Callinectes ornatus*

Com a finalidade de identificar os genes codificadores das proteínas (Na⁺, K⁺)-ATPase e RPL10 em *Callinectes ornatus* foram feitas análises por RT-PCR utilizando os primers degenerados NaK_10F e NaK_16R [baseados em sequências conservadas da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase de alguns braquiúrus] e os primers RPL10Cs_F e RPL10Cs_R (de *Callinectes sapidus*) das quais foram obtidos um produto de aproximadamente 700pb para a (Na⁺, K⁺)-ATPase e um produto de aproximadamente 300pb para a proteína RPL10 (Fig. 59), as amplificações apresentam os pesos esperados obtidos para outras espécies de crustáceo, como *Chasmagnathus granulatus*, *Eriocheir sinensis*, *Pachygrapsus marmoratus* e *Homarus americanus*.

Os fragmentos de DNA obtidos pelas reações de PCR foram clonados em vetores pGEM-T (Promega), transformados em bactérias *E. coli* quimiocompetentes e os plasmídios contendo os fragmentos de PCR para os genes da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase (~700pb) e da RPL10 (~300pb) foram digeridos com EcoRI a fim de confirmar a presença do inserto. Para a proteína RPL10 o observado foi um único fragmento do tamanho esperado, enquanto para a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi observado a divisão do inserto em dois fragmentos de aproximadamente 550 e 150 pb, que ocorreu devido a existência de um sítio de restrição interno para EcoRI (Fig. 60 e 61), esse sítio de restrição interno já havia sido observado para o gene da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase em *M. amazonicum* (Faleiros, 2007).

As identidades das sequências obtidas através do sequenciamento foram confirmadas por alinhamento BLASTX contra os bancos de dados disponíveis pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase foram observadas altas similaridades com as enzimas de outros crustáceos como: *Callinectes sapidus* (caranguejo estuarino) (número de acesso ao GenBank AAG47843.1|AF327439_1) com similaridade de 84%, *Penaeus monodon* (camarão marinho e estuarino) (número de acesso ao GenBank ABV65906.1) com similaridade de 83%, *Pachygrapsus marmoratus* (caranguejo entremarés) (número de acesso ao GenBank ABA02167.1) com similaridade de 82%, *Carcinus maenas* (siri estuarino e marinho) (número de acesso ao GenBank AAK62046.1) com similaridade

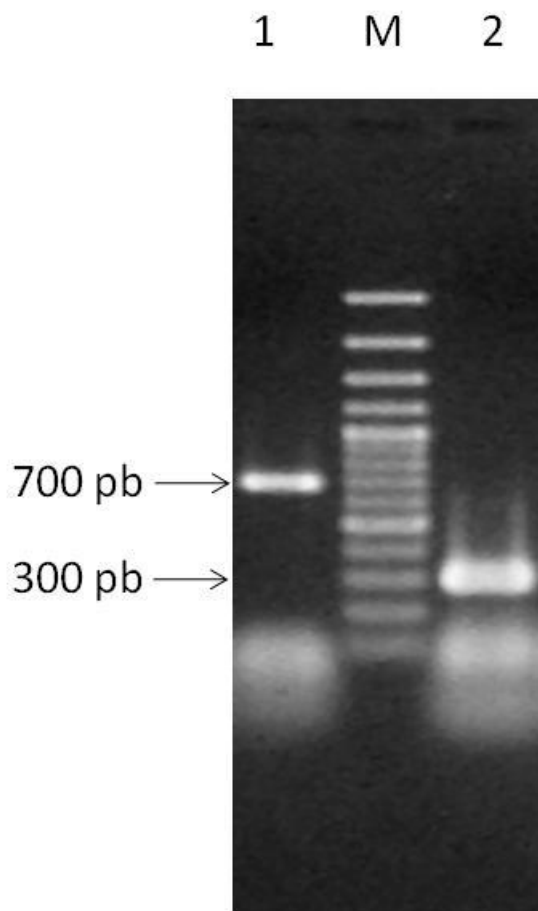


Figura 59. Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação das subunidades α da (Na^+ , K^+)-ATPase e do gene RPL10 tendo como molde o cDNA total, produzido a partir da extração de RNA total das brânquias de *C. ornatus*.

1- Fragmento da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase de ~700 pb, amplificado com os primers degenerados NaK_10F e NaK_16R. **M-** marcador molecular 1 kb. **2-** Fragmento de ~300 pb do gene RPL10 amplificado com os primers para *Callinectes sapidus* RPL10Cs_F e RPL10Cs_R.

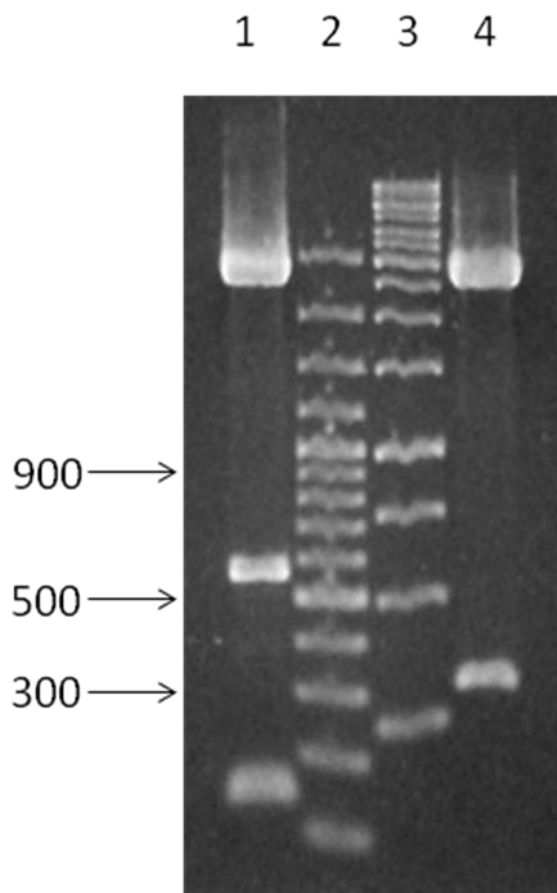


Figura 60. Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de DNA após digestão com a enzima de restrição *EcoRI*.

1- Presença de dois fragmentos de ~150 pb e ~550 pb, que juntos produzem um fragmento de ~700 pb resultado da amplificação do cDNA utilizando os primers degenerados NaK_10F e NaK_16R. **2-** Marcador molecular de 100 pb. **3-** Marcador molecular de 1kb. **4-** Fragmento de ~320 pb amplificado com os primers do gene RPL10 específicos para *Callinectes sapidus*.

de 81% e *Homarus americanus* (lagosta vermelha marinha) (número de acesso ao GenBank AAN17736.1) com similaridade de 80%.

Para obtenção de primers específicos para a subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase de *C. ornatus* foi utilizado como sequencia molde o produto de amplificação dos primers degenerados seqüenciados (Figura 61 e Tabela 1), os primers específicos (NaK_Co_F e NaK_Co_R, para a (Na^+ , K^+)-ATPase; RPL10_Co_F e RPL10_Co_R para a RPL10) amplificam um fragmento de 139 pb.

Uma vez obtido os primers específicos para a subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase de *C. ornatus*, o mesmo foi feito para o gene da proteína RPL10 e para isso um dos clones contendo o fragmento de ~330 pb, obtido a partir da amplificação de cDNA total com os primers baseados na sequência de nucleotídeos do gene RPL10 de *Callinectes sapidus* (RPL10_Cs_F e RPL10_Cs_R), foi seqüenciado (Fig. 62), teve a sequência submetida a alinhamento BLAST, e sua identidade confirmada à partir das similaridades com as sequência da proteína ribossomal L10 de outras espécies como: *Callinectes sapidus* (caranguejo estuarino) (número de acesso ao GenBank AY822650.1) com similaridade de 91%; *Homo sapiens* (espécie humana) (número de acesso ao GenBank AB528224.1) com similaridade de 82%, *Papio anubis* (Babuíno) (número de acesso ao GenBank NM_001168802.1) com similaridade de 81%, *Pongo abelii* (orangotango) (número de acesso ao GenBank NM_001132532.1) com similaridade de 81% e *Rattus norvegicus* (ratazana) (número de acesso ao GenBank NM_031100.1) com similaridade de 80%.

Os primers específicos para a proteína RPL10 de *C. ornatus* foram desenhados baseados utilizando-se como molde a sequência obtida com a utilização dos primers específicos para *C. sapidus* (Figura 62 e Tabela 1), os primers específicos amplificaram um fragmento de 150 pb.

4.7.2. Análise da transcrição do gene da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase durante a aclimação

As análises por qRT-PCR com os primers específicos para a subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase foram realizadas nas amostras de 6ª e 7ª brânquia dos animais aclimatados a salinidade de 33‰ e após serem transferidos a salinidade de 21‰ em tempos predeterminados de 0, 1, 2, 5, 24, 48, 120 e 240h.

Clone NaK

CNATCGCCAGCTATTTAGGTGANANTATAGAAATNNTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTG
 GGATCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGC**GAATTC**ACTAGTGATTGGGTGATC
 GCCNGTGACCATGATGACCTTGATACCAGCAGAACGGCACTTGGCCACGGCGTCGGGCAC
 AGCAGCACGGGGAGGATCAATCATGGACATGAGGCCGACGAATCGAAGACCATGCACGGG
 GAAGTTAAT**GGCATCAGCATCAAAAGGAT**AGCCGAGGGGGTACTTGTCTAGAGGGCAGAAC
 ATAGTCGCAGAAGCCCAGCACACGCTCTCCAGCCCACCCAATTCCAAGTAAGCATTGTT
 GAAAGCTT**CCTTCATCTCCTCATCCCAA**AGGCTTCTCCTCACCATTTCATGAAANATGGGG
 GAGCATCGTTTCAANGGATCCTTCTCTGGANCACCCNTCATCACGAGCAGGTAGCGGNAN
 GTCATTTCTTGGTCCNGGNNCNCNGGAAANAAAAACNTGGGNACTTNGTTGGGTGGAAN
 TGAAANGAANTNCCAAANACCNNTTTATTTGCNNGGAAACCCNNGGCCCCNTCNGTTTC
 CNAATAACAAGTTTCCACNCCNTTCNGCNGAANACANCCCCNAAANNTTCCCCNTT
 TCCCCCTTTTCGTTTTAAANNGGAAAATTNTTCTTAACNTTTTTGAAATTNCNCCCG
 GNTNNAAAAANAGANANTNCNGGNNGNAANCCNTCCTCCCCNAAANNTTNTCTATNGG
 NCACCCTAATGGGCCNCCAAANNACCCCCNACAAGGGGTNTTNAAAAANTNTNGCCCCC
 NNNNNANNATTTCCCGNCCCCNTNGGGGNNGNAATNNAAAAANGCGCATCNCCTTTNA
 NGGAATANNAANANCNGGNTNTTTTANCAGGGTNGANAAACCCGGCCCNCCANNATCNG
 NANCCNCNTNNGGGGGGANGAAGAGCNCCNCCCCC

Figura 61. Sequência parcial específica da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase do tecido branquial do siri *C. ornatus*.

Sequência obtida com a utilização dos primers degenerados NaK_10F e NaK_16R. A sequência em verde representa o primer NaK_Co_F e a sequência em azul representa o primer NaK_Co_R, primers específicos para a sequência de *C. ornatus*. A sequência em vermelho representa o sítio interno de restrição para a enzima *EcoRI* (GAATTC).

Clone RPL10

CNANCGCCAAGCTATTTAGGTGNACTATAGAATNNCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGG
 NTCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTAAGAACTGCG
 NCAAGGACCAGTTCCATGTCCGCGTCCGGCTCCACCCCTTCCACGTGATCCGCATTAACA
 AGATGTTGTCTGTGCTGGGGCTGATAGGCTCCAGACCGGGATGCGCGGAGCCTTTGGCA
 AGCCCCAGGGGACCGGTAGCCAGGGTTCAAATCGGCCAGCCTATCATGTGCGGCTCGCACCC
 ACGACAGGCACAAGGCCACGTCATTGAGGCGCTGAGGAGGGCCAAGTTCAAGTACCCCG
 GCAGGCAGAAGATCTACGTGTCGCGCAAGTGGGGCTTTACCAAGTTTGACCAATCGAATT
 NCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCNGGCCAATTCGCCCTATAGT
 GAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTANACGTCGTGAACTGGAAAANCCTGGGG
 TTACCNACTTNATCCCTTGGAACNATCCCCNTTGGCCAGCTNGGGTANANCNAAAAGCCC
 NCNCNAATCCCCTTCCAAAAATTNCCCACCCTTNATGGCAANNNACCCCCCTTTAAANGG
 NCCATNAACCCGGGGGGGGGNNNGGTTAACCCAAAGGNNACCCTTTAATTTGNNGGGCCN
 TANGCCNGCCCCCTTTGNGTTTTTCCCCTCCTTTTCCNNANTTNCCGGGTTTCCCCCAA
 AATTTNAANNGGGGGGNNCTTTNNGGT

Figura 62. Sequência parcial específica da proteína ribossomal L10 do tecido branquial do siri *C. ornatus*.

Sequência obtida com a utilização de primers específicos para a sequência da proteína para *Callinectes sapidus* (RPL10_Cs_F e RPL10_Cs_R). A sequência em verde representa o primer RPL10_Co_F e a sequência em azul representa o primer RPL10_Co_R, específicos para a sequência de *C. ornatus*.

Para as comparações dos níveis de transcrições entre os diferentes tempos de aclimação a salinidade de 21‰ e as diferentes brânquias, todos os valores do $\Delta\Delta CT$ foram calibrados pela média dos ΔCT s das amostras de 0h da 6ª brânquia.

Para a 6ª brânquia foi observado uma manutenção no nível dos transcritos até 2h após os animais serem transferidos para uma menor salinidade, ocorrendo um súbito aumento 5h após a transferência, mantendo-se alto por um período de 24h. Após 48 horas na salinidade de 21‰ o nível dos transcritos retornou aos valores iniciais (0h), voltando a aumentar após 120 horas e seguindo alto até 240h de aclimação (Figura 63). As variações observadas entre os diferentes tempos de aclimação foram analisadas estatisticamente pelo teste t-student, comparando todas as amostras individualmente à amostra de 0h. As análises estatísticas foram significantes ($p < 0,05$) para as amostras de 5h ($p < 0,0001$), 24h ($p = 0,0313$), 120h ($p = 0,0244$) e 240h ($p = 0,0176$).

Para a 7ª brânquia foi observado a manutenção em níveis baixos até 2h após os animais serem transferidos para uma menor salinidade, seguido por um aumento acentuado em 5h após a transferência. O nível dos transcritos se manteve alto até o período de 24h, caindo aos níveis próximos aos iniciais 48h após a transferência, seguido de um novo aumento após 120h e finalizando com uma queda 240h após a transferência (Figura 64). As variações observadas entre os diferentes tempos de aclimação foram analisadas estatisticamente pelo teste t-student comparando todas as amostras individualmente à amostra de 0h. As análises estatísticas foram significantes ($p < 0,05$) para as amostras de 5h ($p = 0,0356$) e 120h ($p = 0,0291$).

Quando comparados em um mesmo gráfico a 6ª e 7ª brânquia para o mesmo período de aclimação (Figura 65) foi observado que em ambas as brânquias os padrões de transcrição foram parecidos. Uma vez submetidos à análise Anova 2-way os resultados não indicaram diferença nos níveis de transcrição entre as 6ª e 7ª brânquias ($p > 0,05$), porém os níveis de transcritos de ambas as brânquias demonstraram variação ao longo do tempo ($p = 0,0029$).

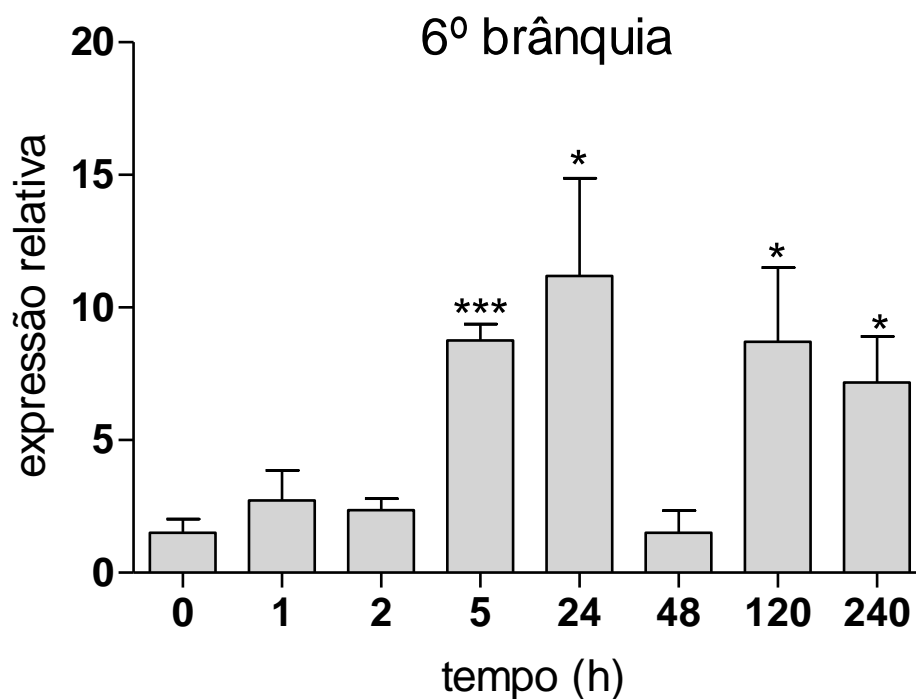


Figura 63. Decurso temporal do efeito da aclimação à salinidade de 21‰ sobre a expressão de RNAm da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente na 6ª brânquia do siri *C. ornatus*.

A análise por qRT-PCR usando o sistema SYBR Green (Applied Biosystems) dos transcritos na 6ª brânquia durante o período de 0h à 240h de aclimação. As amostras foram calibradas para a amostra de 0h e as diferenças verificadas pelo teste t-student.

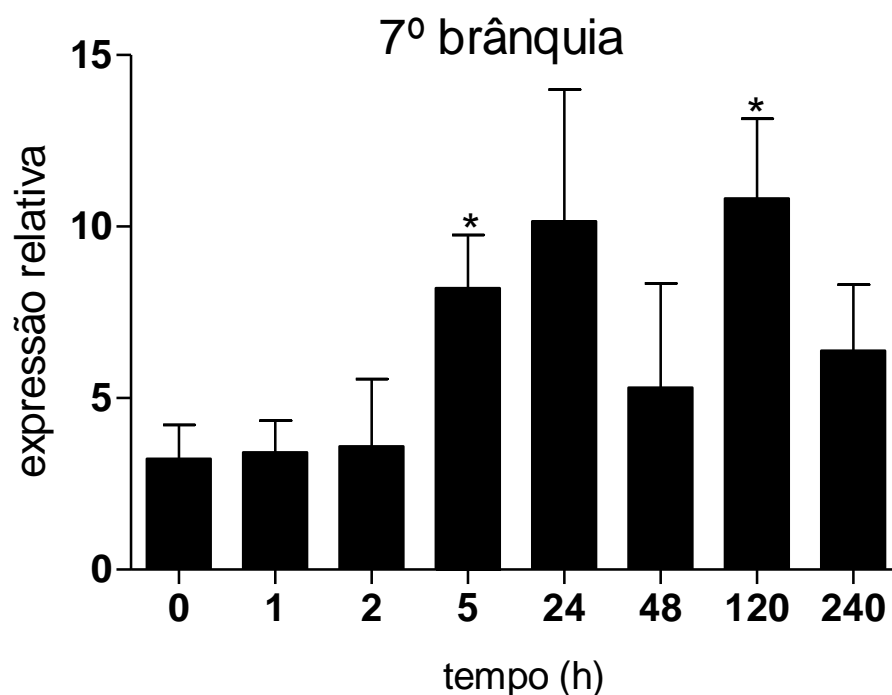


Figura 64. Decurso temporal do efeito da aclimação à salinidade de 21‰ sobre a expressão de RNAm da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase presente na 7^a brânquia do siri *C. ornatus*.

A análise por qRT-PCR usando o sistema SYBR Green (Applied Biosystems) dos transcritos na 7^a brânquia durante o período de 0h à 240h de aclimação. As amostras foram calibradas para a amostra de 0h e as diferenças verificadas pelo teste t-student.

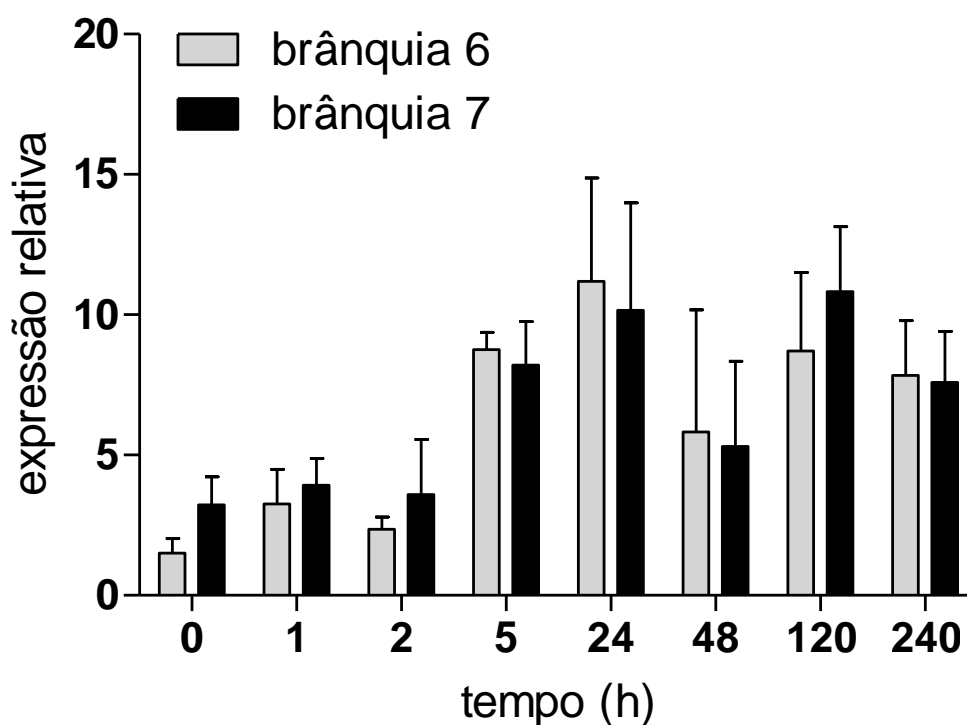


Figura 65. Análise da expressão de RNAm da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ entre a 6^a e 7^a brânquia durante a aclimação à salinidade de 21‰ do siri *C. ornatus*

A análise por qRT-PCR usando o sistema SYBR Green (Applied Biosystems) dos transcritos na 6^a e 7^a brânquia durante o período de 0h à 240h de aclimação. As amostras foram calibradas para a amostra de 0h e as diferenças verificadas pelo teste Anova 2-way.

5. DISCUSSÃO

Tem sido objeto de estudo de alguns autores, a relação entre a variação da salinidade do meio externo e a atividade específica da (Na^+ , K^+)-ATPase presente no tecido branquial dos crustáceos. Sabe-se que essa atividade específica varia grandemente em resposta a alteração na salinidade do meio externo, aumentando quando animais que habitam água salgada são expostos a ambientes mais diluídos (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003). Além de atuar na regulação osmo-iônica dos crustáceos expostos a diferentes salinidades, essa enzima também participa diretamente da excreção de amônia no epitélio branquial (Wiehrauch, 2004).

Embora esses fatores já estejam estabelecidos, ainda não se conhecem os mecanismos utilizados na regulação da atividade em resposta à alteração da salinidade do ambiente, nem os mecanismos moleculares envolvidos no processo de excreção de amônia. A fim de contribuir para o esclarecimento dessas questões, comparamos as propriedades cinéticas e moleculares da (Na^+ , K^+)-ATPase expressa nas frações microsomais do tecido branquial de *Callinectes ornatus* aclimatado em duas diferentes salinidades, 21 e 33‰.

5.1. Estudo da fração microsomal

A alteração do padrão de proteínas presentes nas frações microsomais do tecido branquial de *C. ornatus*, em resposta à aclimação a diferentes salinidades, foi evidenciada tanto pelos perfis de centrifugação em gradiente sacarose (Figs. 23 e 37), quanto pela análise eletroforética comparativa (Fig. 24). Os perfis de centrifugação em gradiente sacarose obtidos para os animais aclimatados a salinidade de 21 e 33‰ são diferentes, inclusive do perfil observado para os animais recém-capturados (Garçon et al., 2007). Para os animais recém-capturados foi observado um único pico protéico, compreendido entre 35 e 45% de sacarose, já para os animais aclimatados em ambas as condições, dois picos protéicos foram observados nas mesmas concentrações de sacarose, apresentando concentrações de proteína semelhante. Uma mudança significativa na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase foi observada no pico II, sugerindo que a aclimação a diferentes salinidades resultou em uma mudança no micro-domínio da membrana, onde essa proteína é distribuída em membranas de maior densidade. Contudo outros estudos são necessários para elucidar a mudança na composição lipídica da membrana.

A presença de apenas uma banda imunorreativa (~109 kDa) na análise por Western blot sugere a presença de uma única isoforma da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase no tecido branquial do animal em ambas as condições salinas, ou que as isoformas presentes não apresentam grande variação de massa e portanto não podem ser separadas nas condições empregadas. A proporção relativa desta subunidade nos microsomas de animais aclimatados a salinidade de 21 ‰ é 2,45 vezes maior quando comparada aos aclimatados a salinidade de 33 ‰, esses resultados coincidem com o aumento da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase. Resultados similares foram encontrados para outras espécies de siris e caranguejos onde um aumento da expressão da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase no tecido branquial foi observado em resposta a aclimação a meios diluídos (Lucu & Flik, 1999; Lovett et al., 2002; Masui et al., 2005b). Em contraste, uma pequena variação da expressão da subunidade α foi observada no tecido branquial do siri *Callinectes sapidus* em resposta à aclimação do animal a diferentes salinidades, a despeito de grandes alterações na atividade enzimática (Towle et al., 2001), enquanto pequenas alterações na atividade específica foram observadas no tecido branquial do caranguejo *C. granulatus* em resposta à aclimação a meios diluídos, a despeito de um aumento de 35-50% no RNAm para esta subunidade (Luquet et al., 2005). A atividade K^+ -fosfatase diminui 2,1 vezes quando *M. olferssi* é transferido da água doce para uma salinidade de 21‰, porém a expressão relativa da subunidade α é muito semelhante (Mendonça et al., 2007). Para *M. amazonicum*, Belli (2009) observou uma diminuição de 2,5 vezes na expressão da subunidade α , coincidindo com a diminuição na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, comparando animais mantidos em água doce e aclimatados a 21‰, porém Faleiros (2007) determinou níveis semelhantes de RNAm para a subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase no tecido branquial de animais mantidos em água doce ou aclimatados por 10 dias a 25‰. Esta diversidade de resultados sugere não só que diferentes espécies podem usar mecanismos distintos de regulação da atividade da enzima, mas torna também evidente a necessidade de um maior número de estudos para avaliar a real importância de alterações na síntese e/ou degradação da enzima para a regulação da sua atividade em resposta à alteração da salinidade do meio externo.

5.2. Atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+) -ATPase branquial de *C. ornatus*

A capacidade da (Na^+, K^+) -ATPase em hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (PNPP), tem sido foco de estudo para vários pesquisadores (Gache et al., 1977; Glynn, 1985; Berberian & Beaugé, 1992; Specht et al., 1997; Furriel et al., 2001; Homareda & Ushimaru, 2005). Entretanto, existem controvérsias a respeito do mecanismo de reação da enzima quando esse substrato não fisiológico é utilizado. Está bem estabelecido que, a atividade PNPPase da enzima é estimulada por K^+ proveniente do lado intracelular da membrana, enquanto a atividade ATPase é estimulada por K^+ extracelular (Drapeau & Blostein, 1980; Glynn, 1985). A forma E_2 aparentemente é a principal conformação envolvida na hidrólise do PNPP, que parece não estar associada ao transporte de íons através da membrana (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Jorgensen et al., 1998). Recentemente, Gatto et al. (2007) sugeriram que a conformação predominante da enzima em presença de K^+ e PNPP corresponderia à forma $E_2(K)PNPP$, na qual os K^+ estariam ocluídos no domínio transmembrana. Por outro lado, há algumas evidências de que o PNPP é capaz de fosforilar a enzima (Yamazaki et al., 1994; Homareda & Ushimaru, 2005), embora este ponto seja alvo de alguma controvérsia (Glynn, 1985).

Estudos de caracterização cinética da enzima em brânquias de crustáceos empregando o PNPP como substrato são muito escassos (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003, 2005b). O estudo da atividade K^+ -fosfatase em frações de membrana do tecido branquial do siri *C. danae* e do camarão *M. olfersii* proporcionaram novos enfoques para utilização do substrato PNPP na caracterização cinética da (Na^+, K^+) -ATPase como uma forte ferramenta para ser empregada em estudos mecanísticos, bem como para estudos comparativos da atividade da enzima nos tecidos branquiais dos crustáceos em condições normais ou aclimatados a diferentes salinidades (Furriel et al., 2001, 2004; Masui et al., 2003, 2005b).

A atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21‰ estimada em 98 U mg^{-1} é aproximadamente 3 vezes maior que a atividade estimada para *C. ornatus* aclimatado a 33‰. Esses resultados são coerentes com dados disponíveis na literatura, comprovando que, quanto menor a salinidade, maior a atividade específica da enzima (Harris & Bayliss, 1988; Corotto & Holliday, 1996; Henry et al, 2002; Lucu & Towle, 2003). Resultados semelhantes onde a atividade K^+ -fosfatase aumenta aclimatando o animal a baixa salinidade foram descritos para *C. danae*. A atividade varia de 55 U mg^{-1} para $102,9 \text{ U mg}^{-1}$ aclimatando o animal a 33 e 15‰,

respectivamente (Masui et al., 2005b). *M. olfersii*, um camarão de água doce, quando aclimatado a uma salinidade mais elevada, apresenta redução de 2 vezes na atividade K^+ -fosfatase (Mendonça et al., 2006). A afinidade aparente (K_m) da enzima pelo PNPP foi da ordem de $2,3 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,06$ mM para o animal aclimatado a 21 e 33 ‰, respectivamente. A afinidade da enzima pelo substrato sintético parece não variar muito com a salinidade. Também, valores similares foram relatados para a enzima do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), *C. danae* (Masui et al., 2002), *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al, 2005b), de membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1976; 1977) e para a enzima de vertebrados (Beaugé & Berberian, 1983; Davis & Robinson, 1988).

Os íons magnésio são essenciais para a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+) -ATPase de diferentes fontes (Rossi et al., 1978; Gache et al., 1979; Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Gatto et al., 2007) e a inibição da atividade em concentrações elevadas destes íons pode ser atribuída à competição com os íons K^+ pela ligação aos sítios de transporte, na molécula da enzima (Gatto et al., 2007). A estimulação da atividade K^+ -fosfatase pelos íons magnésio para a enzima de *C. ornatus* aclimatados a 21 e 33‰ apresentou valores de $K_{0,5}$ iguais a $0,88 \pm 0,04$ mM e $1,00 \pm 0,04$ mM, respectivamente, similares aos observados para a enzima branquial de *M. olfersii* recém coletado (Furriel et al., 2001) ou aclimatado à salinidade de 21‰ (Mendonça et al., 2006); de *C. danae* recém capturado (Masui et al., 2003) ou aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005b) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al, 2005b). Valores próximos também foram relatados para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* obtida de diferentes fontes (Gache et al., 1976, 1979) bem como para a enzima de vertebrados (Robinson, 1981; Beaugé & Berberian, 1983).

Altas concentrações de íons sódio inibem a atividade K^+ -fosfatase aparentemente devido à competição com os íons potássio pelos sítios de ligação (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991), têm sido sugerido que os íons Na^+ em excesso também ocupam o(s) sítio(s) de ligação dos íons Mg^{2+} , contribuindo para a inibição (Drapeau & Blostein, 1980; Robinson & Pratap, 1991). Nenhum efeito inibitório foi observado em controles realizados com cloreto de colina na mesma faixa de concentração, descartando a possibilidade de inibição por efeitos de força iônica. A atividade K^+ -fosfatase da enzima do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ foi inibida por altas concentrações de íons Na^+ , similarmente ao relatado para

enzima de outras fontes (Gache et al., 1976; Glynn, 1985; Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Mendonça et al., 2006).

Os valores de 1,6 mM e 2,4 mM determinados para $K_{0,5}$ devido a estimulação pelo K^+ , da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatados a 21 e 33‰ respectivamente, são similares aos relatados para a enzima obtida do tecido branquial de *M. olfersii* recém capturados ou aclimatados a salinidade de 21‰ (Furriel et al., 2001; 2004; Mendonça et al., 2006), *C. danae* (Masui et al., 2003), *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al, 2005b), de membranas axonais de *C. pagurus* (Gache et al., 1976, 1979), e tecidos de vertebrados (Robinson, 1981; Glynn, 1985).

Está estabelecido que os íons amônio podem substituir os íons potássio na estimulação da atividade da (Na^+, K^+) -ATPase de vertebrados (Robinson, 1970; Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992) e de crustáceos (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Wall, 1996; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2002, 2003; Furriel et al., 2004; Mendonça et al., 2007; Weiner & Hamm, 2007). $K_{0,5}$ = 9,2 e 12,3 mM determinados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+) -ATPase do tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰, respectivamente, é semelhante ao relatado para a enzima de *C. danae* recém capturado (Masui et al., 2003) e aclimatado a 15 ‰ (Masui et al., 2005b); *M. olfersii* capturado em seu habitat natural (Furriel et al., 2004) ou aclimatado a 21‰ (Mendonça et al., 2006); *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al, 2005b); para enzima de membranas axonais de caranguejo *C. pagurus* (Skou, 1960; Rossi & Lazdunski, 1978), e de cérebro de rato (Robinson, 1970).

A (Na^+, K^+) -ATPase de *C. ornatus* aclimatado a salinidade de 21 e 33‰ mostrou uma estimulação sinérgica da atividade K^+ -fosfatase por K^+ e NH_4^+ (ver Figuras 5 e 16). Essa estimulação é um resultado inédito para todas as (Na^+, K^+) -ATPase já descritas. Além disso, este comportamento sugere, que para a (Na^+, K^+) -ATPase de *C. ornatus* um segundo sítio de ligação do NH_4^+ na forma E_2 da enzima está acessível aos íons em solução. Esses resultados não foram observados para *C. danae* (Masui et al., 2002) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al, 2005b), onde o sítio de ligação para o NH_4^+ só é observado utilizando o substrato ATP. Por outro lado, a estimulação da atividade da enzima por NH_4^+ a valores similares, tanto em presença quanto ausência de íons K^+ (ver Figura 6 e 17), sugere fortemente que os íons NH_4^+ podem ocupar tanto seu sítio como o sítio para os íons K^+ . Como não foi observada nenhuma inibição da atividade da enzima por excesso de íons potássio quando na presença de íons amônio, pode-se

sugerir que não ocorre competição entre esses dois cátions (Robinson, 1970; Gache et al., 1976; Masui et al., 2005a).

A estimulação na atividade K^+ -fosfatase da enzima por K^+ com incrementos na concentração de NH_4^+ , promove um aumento na atividade específica simultaneamente a uma significativa diminuição no valor de $K_{0,5}$, esses dados sugerem que o K^+ desloca o NH_4^+ deste sítio e o NH_4^+ se liga ao sítio recentemente exposto pela mudança de conformação, originando uma conformação com alta afinidade por K^+ . Finalmente quando a enzima está completamente saturada com NH_4^+ (30 ou 50 mM para *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33 ‰, respectivamente) não é observado o deslocamento de NH_4^+ por K^+ para concentrações de K^+ compreendidas entre 10^{-6} e 10^{-2} M.

A inibição parcial da atividade PNPPase total pela ouabaína sugere a presença de outras enzimas nos microsomas, diferentes da (Na^+,K^+) -ATPase, capazes de hidrolisar o PNPP nas condições experimentais usadas. Relatos da literatura mostram que o valor da constante de inibição aparente para a inibição da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase pela ouabaína pode variar de 3 μ M (Robinson 1981) a 200 μ M (Gache et al., 1976). Os valores de K_I encontrados para a enzima de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ apresentaram valores pouco discrepantes, porém estudos futuros poderão esclarecer se a variação é significativa. K_I semelhantes foram relatados para *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005b) e aclimatado a 33‰, como também para *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), mas é cerca de 4 vezes menor quando comparado ao valor relatado para a enzima de *C. danae* recém capturado (Masui et al., 2003) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2002).

A caracterização cinética da atividade (Na^+,K^+) -ATPase das frações de membrana do tecido branquial de *C. ornatus* utilizando o substrato PNPP apresenta vantagens em relação à utilização do substrato fisiológico ATP, pois utiliza um método espectrofotométrico contínuo simples e direto, não necessitando o emprego de técnicas indiretas de medida da atividade hidrolítica da enzima como a dosagem do fosfato inorgânico (Heinonen & Lathi, 1981) ou método espectrofotométrico contínuo acoplado indireto (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2000, 2004). Além disso, esses resultados são de grande utilidade para uma rápida comparação entre a enzima de organismos diferentes ou aclimatados a diferentes condições.

5.3. Atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *C. ornatus*

Para os vertebrados, a estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo ATP ocorre através de duas famílias de sítios, uma de alta afinidade, apresentando valores de K_{0,5} entre 0,1 e 1 µM e outra de baixa afinidade, com K_{0,5} entre 0,07 e 0,4 mM (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998). Entretanto, a localização destes sítios na molécula da enzima e a caracterização cinética dos sítios de alta afinidade ainda são controversas (Fedosova & Esmann, 2007). As estruturas de alta resolução obtidas para a enzima e também para o domínio N isolado não incluem o nucleotídeo ligado, ou correspondem à forma de baixa afinidade pelo ATP (Hilge et al., 2003; Hakansson, 2003; Morth et al., 2007). Por outro lado, as atividades máximas correspondentes aos sítios de alta afinidade representam apenas 1-10% das atividades totais (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998; Martin & Sachs, 2000). Igualmente ao reportado para a enzima de vertebrados, algumas enzimas de crustáceos também apresentam dois sítios de ligação para o ATP, como a enzima do siri *C. danae* (Masui et al., 2002), do ermitão entre-marés *Clibanarius vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e do camarão *M. amazonicum* mantido em água doce (Santos et al., 2007) ou aclimatado a 21‰ de salinidade (Belli, 2008). Contudo a enzima do tecido branquial de *C. ornatus* apresentou apenas uma família de sítio, como reportado para as enzimas de membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1977), de brânquias do camarão de água doce *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *C. sapidus* (Wheatly & Henry, 1987) e de certos caranguejos braquiúros eurialinos (Holliday, 1985; D'Orazio & Holliday, 1985; Corotto & Holliday, 1996). Os valores de K_{0,5} para o ATP determinados para a enzima branquial de *C. ormauts* aclimatado a 21 e 33‰ são muito similares, porém cerca de 3 vezes menor que para *C. ornatus* recém-capturado. Os valores de K_{0,5} para o animal aclimatado a 21 e 33‰ (50,0 e 46,0 µM, respectivamente) são similares ao valor de K_{0,5} para o sítio de baixa afinidade de *M. amazonicum* aclimatado a 21‰ [34,1 µM (Belli, 2008)], *C. danae* [55 µM (Masui et al., 2002)] e *C. vittatus* [44,1 µM (Gonçalves et al., 2006)] mantidos em 33‰ de salinidade.

A hidrólise do ATP para a enzima de *C. ornatus*, independente da salinidade, ocorreu segundo uma cinética Michaeliana, assim como observado para o sítio de baixa afinidade das enzimas de *C. danae* (Masui et al., 2002) e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e para outras (Na⁺,K⁺)-ATPases já estudadas (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b).

Na ausência de íons magnésio a enzima não é capaz de hidrolisar o ATP, pois o complexo Mg-ATP é o verdadeiro substrato da (Na⁺,K⁺)-ATPase (Glynn, 1985; Furriel et al., 2000; Karlsh, 2003; Garçon et al., 2007). Porém excesso de ATP ou Mg²⁺ livre, inibem a atividade ATPase, como observado nesse estudo e em diversas fontes (Robinson, 1981; Robinson & Pratap, 1991; Tentes & Stratakis, 1991; Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007). Aparentemente, os íons Mg²⁺ interagem com os domínios N, P e A da enzima, contribuindo para a estabilização e orientação do fosfato γ do ATP e também para a coordenação do fosfato ligado covalentemente à enzima, além de atuarem de forma crucial nas mudanças conformacionais envolvidas no acoplamento entre a hidrólise do ATP e o transporte dos íons K⁺ e Na⁺ através da membrana (Jorgensen et al., 2001,2003; Patchornik et al., 2002; Horisberger, 2004). A afinidade da enzima de tecido branquial de *C. ornatus*, aclimatado a 21 e 33‰ ou recém-capturado, pelos íons magnésio é muito similar aos valores relatados para a enzima de vertebrados (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991), membranas axonais de caranguejo (Gache et al., 1976; Rossi et al., 1978) e tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005). Porém para outros caranguejos braquiúros eurialinos os valores encontrados são maiores, em torno de 2,6 a 3,5 mM (Corotto & Holliday, 1996; Holliday, 1985; Dórazio & Holliday, 1985). Similarmente ao observado para a enzima da membrana axonal de caranguejo (Gache et al., 1976) e para a enzima de tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002), o aumento da velocidade de hidrólise do ATP com o aumento da concentração de íons magnésio ocorre segundo uma cinética cooperativa ($n_H = 1,3$), sugerindo a existência de múltiplos sítios ligantes para os íons magnésio.

As várias isoformas da subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase dos vertebrados apresentam afinidades aparentes diferentes por ATP, Na⁺ e K⁺ (Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al 2001; Lopez et al., 2002). Diferentes afinidades por Na⁺ e K⁺ também foram descritas para isoenzimas constituídas pela mesma isoforma da subunidade α mas associadas a diferentes isoformas da subunidade β (Blanco et al., 1999; Therien et al., 1996; Geering, 2001). Essas diferenças de afinidade aparente parecem ainda ser tecido-específicas e variar conforme o organismo em que a isoenzima é expressa, o que sugere que fatores pós-traducionais ou a composição da membrana também podem modular as

propriedades cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Sweadner, 1989; Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Lopez et al., 2002). Mais recentemente tem sido proposto que a relevância fisiológica desta grande diversidade de isoformas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ encontrada nos vertebrados não está diretamente relacionada às diferenças cinéticas entre elas, que parecem ser sutis, mas a interações isoforma-específicas com diversas proteínas regulatórias (Pressley et al., 2005). Em contraste com os vertebrados, pouco se conhece sobre a ocorrência de isoformas da enzima nos crustáceos e ainda menos sobre diferenças cinéticas e funcionais entre elas.

A afinidade aparente da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, extraída de diversas fontes, para os íons sódio varia entre 0,06 e 41,6 mM (Robinson & Pratap, 1991; Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Specht et al., 1997; Lucu & Towle, 2003). Entre as enzimas branquiais de crustáceos estudadas até o momento, a afinidade aparente por íons Na^+ é bastante variável e até recentemente acreditava-se estar correlacionada com a salinidade do habitat do animal, sendo maior em animais bem estabelecidos em água doce. Com base nos poucos dados disponíveis, propôs-se que a seleção evolutiva de uma $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ com alta afinidade por íons Na^+ no epitélio branquial poderia ser uma adaptação importante para o estabelecimento de diferentes espécies de crustáceos na água doce, contribuindo para o desenvolvimento de um sistema eficiente de captura de íons a partir do meio externo diluído (Harris & Bayliss, 1988; Péqueux, 1995). Entretanto, com o aumento do número de trabalhos sobre o assunto, esta hipótese vem sendo questionada. Analisando os dados atualmente disponíveis para $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPases}$ branquiais de crustáceos marinhos, observa-se que as enzimas de certas espécies, como *C. pagurus* e *Macropipus puber*, apresentam constantes de afinidade aparente para Na^+ de 34,6 mM e 41,6 mM, respectivamente, enquanto outras espécies apresentam valores 7-8 vezes menores (Leone et al., 2005b). Da mesma forma, entre as espécies dulcícolas os valores de $K_{0,5}$ variam entre 0,06 e 6 mM (Leone et al., 2005b), com o agravante de que a disponibilidade de informação é menor, dificultando uma análise mais fundamentada. Certamente, parte destas variações pode ser atribuída a diferenças metodológicas, o que implica na necessidade de outros estudos no sentido de esclarecer este ponto. Os valores de afinidade aparente, para os íons sódio, da enzima das brânquias de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰ ou recém-capturados são muito similares, assim como os relatados para *Carcinus maenas* aclimatado a 10‰, *M. olfersii* e *C. danae* (Lucu & Towle, 2003). A afinidade aparente da enzima de *C. ornatus* para os íons sódio é semelhante às de certos crustáceos estabelecidos em água doce e estuários. Essa

afinidade é significativamente maior quando comparada com a de outras espécies estabelecidas em água salgada, como *Carcinus maenas* (aclimatado a 35‰), *C. pagurus* e *Macropipus puber*, cujos valores de $K_{0,5}$ são 14, 34,6 e 41,6 mM respectivamente (Lucu & Towle, 2003). Já para *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), um camarão marinho, valores semelhantes de afinidade foram relatados.

A afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial dos crustáceos por íons K^+ (1 a 6,5 mM) varia menos que a afinidade por íons Na^+ , nas diferentes espécies estudadas (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b). Não houve mudanças significativas na afinidade aparente por K^+ determinada para a enzima branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰, esse valor é similar ao relatado para o de *C. danae*, aclimatado a salinidade 15‰ (Masui et al., 2002) ou recém-capturado a 33‰ (Masui et al., 2005b), como para a enzima branquial de *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b) e para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* (Gache et al., 1976), sugerindo portanto que a afinidade da enzima pelos íons potássio não varia com a salinidade do meio que o animal habita preferencialmente. Porém, é importante salientar que valores elevados para a constante de afinidade para K^+ foram relatados para *Uca minax* (Wanson et al., 1984) e *Carcinus maenas* (Winkler, 1986). A presença de múltiplos sítios para a ligação de K^+ ($n = 1,3$) também foi relatada para *C. danae* aclimatado a salinidade 15‰ (Massui et al., 2002) ou recém-capturado a 33‰ (Masui et al., 2005b), resultados que contrastam com os relatados para *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005), que apresentam cooperatividade negativa, bem como para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *U. pugnax* (Holliday, 1985) e *U. pugilator* (D’Orazio & Holliday, 1985), que apresentam comportamento michaeliano.

Os raios iônicos dos cátions NH_4^+ e K^+ são bastante próximos (Knepper et al., 1989) e estudos *in vitro* demonstraram que íons NH_4^+ são capazes de substituir íons K^+ na estimulação da hidrólise do ATP pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados (Mallery, 1983; Skou & Esmann, 1992; Robinson, 1970; Wall, 1996; Weiner & Hamm, 2007) e do tecido branquial de crustáceos (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Wall, 1996; Masui et al., 2002, 2005a; Furriel et al., 2004; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007). Existem também evidências de que os íons NH_4^+ são transportados ativamente pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados, em substituição aos íons K^+ (Mallery, 1983; Wall, 1996; Weiner & Hamm, 2007). Entre os crustáceos, estudos empregando vesículas de membrana das brânquias posteriores de *C. sapidus*

demonstraram que os íons NH_4^+ podem substituir os íons K^+ como contra-íons para o transporte de íons Na^+ pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Towle & Holleland, 1987).

Para a enzima presente no tecido branquial de *C. ornatus* aclimatado a 21 e 33‰, o valor de $K_{0,5}$ para os íons NH_4^+ foi estimado em $4,4 \pm 0,2$ e $4,1 \pm 0,2$ mM, respectivamente. Esses valores são similares aos relatados para a enzima do tecido branquial de *C. orantus* recém-capturado (Garçon et al., 2007) e para outras espécies de crustáceos, tais como *C. danae* recém-capturados (Masui et al., 2002) e aclimatados a salinidade de 15‰ (Masui et al., 2005b), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), assim como para a enzima de membrana axonal de caranguejo (Skou, 1960; Rossi et al., 1978). O valor da afinidade aparente da enzima de crustáceos para os íons NH_4^+ também é similar aos valores relatados para a enzima de vertebrados, que varia entre 3 e 6 mM (Landon & Norris, 1963; Robinson, 1970). Fisiologicamente, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ transporta Na^+ e K^+ , assim, mesmo sendo possível a ligação dos íons NH_4^+ ao sítio do K^+ , é de se esperar que a afinidade observada para o amônio seja menor do que a observada para o potássio, o que realmente ocorre para a enzima das brânquias de *C. ornatus*, *C. danae* (Masui et al., 2002), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) bem como para a enzima de vertebrados (Landon & Norris, 1963; Robinson, 1970). No caso do *C. ornatus*, a modulação da atividade pelos íons amônio apresentou cooperatividade positiva ($n_H = 1,4$), similarmente ao descrito para *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005b) e membranas axonais de *C. pagurus* (Rossi et al., 1978), porém diferente da característica michaeliana observada para *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005). Observou-se também que os NH_4^+ estimularam a atividade da enzima até valores cerca de 30% maiores que os determinados em presença de íons potássio, similarmente ao observado para as enzimas branquiais de *C. ornatus* recém-capturado (Garçon et al., 2007), *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002) e aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005b), *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *U. pugnax* (Holliday, 1985), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005), bem como para a enzima obtida de outras fontes (Robinson, 1970; Landon & Norris, 1963; Skou, 1962; Schoner et al., 1967).

Assim como relatado para *C. ornatus* recém-capturado (Garçon et al., 2006) e para outras espécies de crustáceos, como *C. danae* (Masui et al., 2002), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006), a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente nas brânquias de *C. ornatus* aclimatado a diferentes salinidades apresentou uma

estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ . Contudo, o mecanismo de estimulação em *C. ornatus* é aparentemente diferente do reportado para *C. danae*, mas as mudanças são semelhantes tanto para os animais aclimatados a 21 e 33‰, quanto para os animais recém-capturados. Quando o NH_4^+ substitui o K^+ , a atividade específica aumenta em torno de 30% em relação à atividade apenas na presença de K^+ (ver Tabela 2 e 5). Esse resultado pode ser interpretado considerando-se que acima de 10 mM, uma mudança de conformação causada pela ligação do NH_4^+ pode levar a exposição de um sítio adicional e a ocupação desse novo sítio pelo NH_4^+ resulta em um considerável incremento da atividade específica. O aumento na atividade acompanhado a uma diminuição no valor de $K_{0,5}$, sugere que o K^+ desloca o NH_4^+ deste sítio e o NH_4^+ se liga ao sítio recentemente exposto pela mudança de conformação, essa mudança na conformação origina uma enzima com alta afinidade por K^+ . Contudo, saturando-se a enzima com NH_4^+ , o K^+ não consegue deslocar esse íon no intervalo de concentração estudado.

Concentrações saturantes de NH_4^+ provocam uma mudança na conformação da enzima, expondo um segundo sítio de ligação exclusivo para a ligação de NH_4^+ , atingindo os mesmos valores de velocidade independente da concentração de K^+ . A afinidade desse sítio exposto na presença de concentrações elevadas de íons amônio, é muito similar à observada para o sítio acessível na ausência de concentrações saturantes de NH_4^+ . Isso é sustentado pela simples curva de saturação observada para concentrações de NH_4^+ compreendidas entre 10^{-4} a $5 \cdot 10^{-2}$ M (ver Figura 29 e 42). Valores sutilmente diferentes de $K_{0,5}$ para K^+ e NH_4^+ sugerem que ambos os íons se ligam ao sítio de ligação do K^+ inicialmente exposto. A eficiência catalítica da enzima quando a concentração de NH_4^+ aumenta é melhor quando os animais estão aclimatados a 33‰, contudo, quando a concentração de K^+ aumenta, a eficiência catalítica é melhor para a enzima dos animais aclimatados a 21‰.

Em água do mar não poluída, a concentração de amônia raramente excede 5 μ M (Koroleff, 1983; Weihauch et al., 1999), enquanto a concentração deste íon da hemolinfa de caranguejos braquiúros varia em torno 100 μ M (Weihauch et al., 1999; Lucu et al., 1989). Desta forma a excreção ocorreria por difusão passiva, a favor de seu gradiente. Contudo Caranguejos bênticos, principalmente do gênero *Callinectes*, costumam se enterrar em sedimentos, aonde a concentração de amônia chega a 2,8 mM. Nessas condições esse animal deve ser capaz de excretar ativamente amônio contra o gradiente de concentração, mantendo a concentração de íons amônio abaixo do valor considerado letal (Weihauch et al., 1999). A excreção ativa de íons amônio através das

brânquias, contra uma concentração externa elevada foi relatada para *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* e *Cancer pagurus* (Weihrauch et al., 1998 e 1999). Além disso, estudos em brânquias isoladas perfundidas dessas espécies revelaram que o fluxo do transporte ativo transepitelial de NH_4^+ é sensível à ouabaína aplicada do lado basolateral do epitélio, sugerindo fortemente o envolvimento da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ neste processo (Lucu et al., 1989; Péqueux & Gilles, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999).

A atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi inibida por ouabaína na presença ou ausência de íons amônio. Valores de atividades residuais muito semelhantes é uma forte evidência que os íons amônio estimulam a atividade hidrolítica da própria $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. A constante de inibição é sempre menor quando NH_4^+ está presente, porém não foi observada variação significativas nesses valores devido a aclimação de *C. ornatus*. As isoformas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos vertebrados apresentam diferentes sensibilidades à ouabaína. As menos sensíveis apresentam constantes de dissociação aparentes entre 0,2 e 100 μM , enquanto as mais sensíveis, ao redor de 10 nM (Sweadner, 1989; Horisberger et al., 1991; Skou & Esmann, 1992; Doris, 1994; Pedersen et al., 1996; Pressley, 1996; Crambert et al., 1997; Noël et al., 1997). Até o presente momento não foram descritas isoformas da enzima com alta sensibilidade à ouabaína nos crustáceos. Valores de K_i em torno de 50 μM , 250 μM e 70 μM foram encontrados para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *M. rosenbergii* e dos lagostins de água doce *Procambarus clarki* e *Orconectes limosus*, respectivamente (Stern et al., 1984; Horiuchi, 1977; Kosiol et al., 1988), enquanto para as enzimas de crustáceos habitantes de meios mais salinos valores de K_i variando entre 73 μM e 290 μM foram relatados (Neufeld et al., 1980; D'Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Lucu, 1990; Corotto & Holliday, 1996; Postel et al., 1998; Masui et al., 2002; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007).

A aclimação de *C. ornatus* a diferentes salinidades alterou não só a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ como de outras enzimas presentes na brânquia desses animais. A fim de determinar as diferentes ATPases e sua atividade diversos inibidores foram utilizados. Observamos que a aclimação de *C. ornatus* a uma salinidade menor (21‰) resultou em um aparente aumento das enzimas V e $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$, enquanto a concentração de $\text{K}^+\text{-ATPase}$ permaneceu inalterada. Aparentemente a V-ATPase é essencial para a captação de íons em meios diluídos, o que justifica seu aumento quando o animal é aclimado em 21‰ comparado a 33‰.

5.4. Efeito de poliaminas na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase branquial de *C. ornatus*

Poliaminas são moléculas altamente carregadas positivamente e que podem se ligar aos ácidos nucleicos com alta afinidade, sugerindo sua importância na síntese de DNA e/ou regulação (Wu et. al., 2007). As poliaminas inibem a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase de vários tecidos de vertebrados, supostamente pela ligação aos resíduos carregados negativamente da enzima (Robinson et al., 1986; Kuntzweiller et. al., 1995). Enquanto alguns organismos respondem ao stress salino aumentando os níveis de poliamina, dados para crustáceos são escassos. Em *Artemia SP. nauplii* a concentração de putrescina diminui com o aumento da salinidade do meio externo (Watts et al., 1994). Porém a exposição de *Callinectes sapidus* à água do mar (35‰), resulta em um elevado aumento na concentração de putrescina e espermidina nas células da brânquia, principalmente nos 6° e 7° pares (Lovett & Watts, 1995), essa aclimação de *C. sapidus* ao meio de maior salinidade também favorece a redução da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, embora nenhuma correlação direta entre o aumento do nível de poliamina e a diminuição da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase esteja estabelecida.

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de *C. ornatus* foi inibida por espermidina (Fig. 50A) e espermina (50B). A eficiência das poliaminas como inibidor foi maior para espermidina comparada a espermina, o oposto do observado para a enzima branquial de *C. danae* (Silva et al., 2008).

Espermina está localizada geralmente no núcleo das células onde interage primariamente com a cromatina (Tabor & Tabor, 1984). Desde modo parece improvável que a espermina poderia desempenhar um papel fisiológico na (Na^+ , K^+)-ATPase presente na membrana plasmática das brânquias de *C. ornatus*. O que pode justificar a concentração elevada dessa poliamina necessária para inibir a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase.

A presença de poliamina no meio reacional afeta não só a velocidade máxima, como também diminui a afinidade da enzima pelo ATP (2,5 ou 5 vezes em presença de espermina e espermidina, respectivamente), onde a hidrólise do substrato que obedecia uma cinética Michaeliana para a ser cooperativa.

Em presença de espermina e espermidina a afinidade da enzima não varia para Mg^{2+} , no entanto, ela é significativamente aumentada para Na^+ (cerca de 3 vezes) e para K^+ (cerca de 7 vezes). Esses dados contrastam com os obtidos para a enzima branquial de *C. danae* (Silva et al., 2008) e para a enzima de rim de cachorro (Robinson et al.,

1986) onde a afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelos íons em presença de espermidina é diminuída.

A afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pela ouabaína não foi alterada em presença de espermidina, mais na presença de 10 mM de espermina o valor de K_i é aproximadamente 2 vezes maior, sugerindo que essa poliamina pode modular a enzima pela variação de sua afinidade pelo inibidor.

5.5. Efeito do tempo de aclimação

C. ornatus hiporregula a osmolalidade da hemolinfa quando aclimatado durante 10 dias a salinidade de 33‰ ($\Delta=192 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) mas é isosmótico depois de aclimatado durante 15 dias a salinidade de 21‰. Além disso, a concentração de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , encontrada no animal aclimatado a salinidade de 15‰ durante 15 dias não retorna aos valores iniciais, quando o animal está aclimatado à salinidade de 33‰ ($\Delta=65\text{--}80\%$). Esses dados sugerem que *C. ornatus* regula de maneira limitada a concentração osmótica e iônica da hemolinfa quando submetido ao meio externo diluído, particularmente no que se relaciona ao K^+ . Entretanto transcorrido os 15 dias de aclimação a salinidade de 21‰, a concentração de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} está bem acima e a de Mg^{2+} bem abaixo da concentração desses íons no ambiente, revelando uma moderada habilidade anisoionica. Deste modo, devido a essa isosmoticidade, *C. ornatus* parece ser fisiologicamente capaz de penetrar em meio diluído por extensos períodos. O aumento da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ quando *C. ornatus* é aclimatado a salinidade de 21‰ parece estar envolvido nessa habilidade. Quando comparamos *C. ornatus*, um siri que não suporta salinidades tão baixas, com *Cyrtograpsus angulatus*, capaz de sobreviver em salinidade de 2‰, observamos que *C. angulatus* regula a concentração de Na^+ e K^+ na hemolinfa depois de 3 dias de aclimação, mas parece exibir uma baixa capacidade para regular Ca^{2+} e Mg^{2+} depois de uma mudança abrupta para reduzida salinidade (López Mañanes et al., 2002).

Quando o animal é submetido a um desafio osmótico, que pode estar relacionado ao meio externo diluído ou concentrado, os mecanismos de regulação anisomótica extracelular podem agir rapidamente, por exemplo, na regulação da atividade de enzimas pré-existentes como a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Corotto & Holliday, 1996), pelo nível de Na^+ nos tecidos (Harris & Santos, 1993), por mensageiros secundários (Lucu & Flik, 1999; Morris, 2001) e também por via hormonal (Lucu & Towle, 2003). Há também respostas a longo prazo, mediadas pela maquinaria transcricional, geralmente

associada com processos de adaptação estrutural e bioquímica nas células branquiais, e com o aumento ou à diminuição da quantidade de enzimas presentes nas células (Corotto & Holliday, 1996; Lucu & Towle, 2003). Os processos de adaptação celular a meio diluído, por exemplo, incluem o desenvolvimento de um extenso sistema de evaginações apicais associados com o surgimento de numerosas mitocôndrias na região subapical das células pilares do epitélio lamelar branquial dos caranguejos *Eriocheir sinensis* (Gilles & Pequeux, 1986) e *Carcinus maenas* (Compère *et al.*, 1989), e do camarão marinho *Penaeus aztecus* (Foster & Howse, 1978).

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase nas brânquias posteriores de *C. ornatus* diminuem logo após a exposição a meio externo diluído, recuperando a atividade inicial 1 dia após a transferência, onde o máximo de atividade é observado quando o animal permanece nessa nova salinidade por 10 dias (Fig. 57), não variando mais transcorrido esse período (dado não mostrado). Para *C. sapidus* juvenil aclimatado a 1000 mOsm e transferido para 150 mOsm, a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase atinge seu máximo depois de 7 dias de aclimação (Li *et al.*, 2006), enquanto para a espécie adulta, a transferência de animais aclimatados à salinidade de 32‰ para 10‰, provoca um aumento de 300% na atividade 8 dias depois da transferência (Lovett *et al.*, 2006). Já para *Cyrtograpsus angulatus*, o máximo de atividade é observado 1 dia após a transferência para meio diluído, diminuindo 3 dias depois (López Mañanes *et al.*, 2002). Uma das possíveis causas propostas do aumento da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase em agudo stress salino, sugerem relação com a exposição de enzimas sequestradas em vesículas, quando o animal está submetido a ambientes de alta salinidade, e que são transportadas para a membrana basolateral em menores salinidade, ativando a atividade *in vivo* (Lucu & Flik, 1999; Parikh *et al.*, 2005). No entanto, essa exposição da enzima não parece acontecer com *C. ornatus*, já que sua atividade diminui durante agudo stress. Em *Uca pugilator* e *Hemigrapsus nuda*, o aumento inicial na atividade específica da (Na^+ , K^+)-ATPase depois de 3 dias de aclimação a baixa salinidade foi atribuído a ativação da enzima, enquanto o máximo de atividade 7 dias após a transferência foi atribuído a síntese de nova enzima (D'Orazio & Holliday, 1985; Corotto & Holliday, 1996).

Para verificar se o aumento da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, observado após uma queda inicial de atividade, durante a exposição de *C. ornatus* a baixa salinidade, está relacionado à síntese de nova enzima, verificamos a expressão de mRNA. A expressão se torna significativa 5 horas após a transferência (Fig. 65), enquanto o aumento da atividade ocorre depois de 1 dia (Fig. 57). Esse atraso no aparecimento da

atividade enzimática em relação à expressão de mRNA, talvez seja inerente ao próprio processo que ocorre desde a transcrição do mRNA no núcleo, a tradução no citoplasma, o processamento da proteína, o deslocamento até a membrana e a inserção, sujeitas a regulações nas etapas da transcrição do mRNA, na tradução e nas etapas pós tradução até a inserção na membrana.

Chung e Lin (2006) relacionaram o aumento da atividade enzimática específica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ao aumento da expressão de mRNA nas brânquias do caranguejo eurialino *Scylla paramamosain*, quando aclimatado a meio diluído, verificando um atraso de 7 dias na atividade enzimática em relação ao aumento da expressão de mRNA. Aumento nos níveis de mRNA expressos nas brânquias de *C. sapidus* juvenil podem ser notados 2 dias após a transferência da água salgado para 150 mOms, continuando elevado por até 6 dias, enquanto o aumento da atividade só é notado transcorrido 7 dias de aclimação (Li et al., 2006). Quando *Chasmagnathus granulatus* aclimatado a salinidade de 30‰ é transferido para 2‰, a expressão de mRNA da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ aumenta 24 horas e se mantém alta por 96 horas após transferidos, diminuindo com 192 horas (Luquet et al., 2005), no entanto esse aumento nos níveis de mRNA não está acompanhado de um aumento na atividade da enzima (Genovese et al., 2004).

Uma outra característica interessante observada em crustáceos eurialinos é a especificidade das funções nas brânquias, sugerida previamente por estudos de transporte fisiológico e atividade enzimática. Siebers et al. (1982) verificou que em *Carcinus maenas*, as brânquias individuais apresentaram diferentes níveis de atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, sendo que as brânquias posteriores possuíam maior atividade do que as anteriores, nem todas respondem à mudança de salinidade do meio externo. Para o caranguejo *Ucides cordatus* a 5ª brânquia, de um de total de 7, é mais permeável a Na^+ que a 6ª brânquia; que segundo análise do fluxo de Na^+ a 5ª brânquia está associada com a captura deste íon em águas diluídas, enquanto a 6ª brânquia está associada com a excreção em água do mar (Martinez et al., 1998). Para o crustáceo *Eriocheir sinensis* aclimatado foi observado que a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores diminuíram com o aumento da salinidade, embora estudos das 6ª, 7ª e 8ª brânquias separadamente mostraram que elas possuem atividades parecidas (Torres et al., 2007).

Estudos prévios em *C. ornatus* indicaram que a aclimação a ambiente de menor salinidade provocou um aumento na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ das 6ª e 7ª brânquias, sem que nenhuma variação significativa de atividade tenha sido observada na 8ª brânquia (dados não mostrados). Resultado semelhante foi obtido por López

Mañanes et al. (2002), que observaram para *Cyrtograpsus angulatus* que a atividade do 8º par de brânquia não variou com a mudança de salinidade do meio externo, enquanto um aumento foi observado nas 6ª e 7ª brânquias, com maior intensidade na 6ª brânquia.

Para saber se há a participação diferencial das brânquias no processo osmorregulatório de *C. ornatus* foi comparado em um mesmo gráfico as 6ª e 7ª brânquias para o mesmo período de aclimação (Fig. 65), verificando-se padrões de transcrição parecidos para ambas as brânquias, com aumento no nível dos transcritos após 5 horas de aclimação. A análise da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase para as brânquias separadas dos animais aclimatados a salinidade de 33‰ e 21‰ (Tabela 17), revelou que a atividade aumentou em torno de 2,5 vezes em ambas as brânquias quando aclimatados a 21‰ e embora a atividade tenha aumentado na mesma proporção, foi verificado na 6ª brânquia uma atividade aproximadamente 1,4 vezes maior quando comparada a 7ª brânquia (Tabela 17). De maneira interessante, porém contrastante, foi observada uma concentração de proteína maior na 7ª brânquia para o animal aclimatado em ambas as salinidades (Fig. 58). Essa diferença foi observada, também, por Jayasundara et al. (2007) que observaram para *Pachygrapsus marmoratus* um aumento na expressão de mRNA em todas as brânquias estudadas (5ª a 9ª) para animais transferidos da salinidade de 36‰ para 10‰; com uma maior expressão na 7ª brânquia, onde o aumento pôde ser notado após 2h de exposição à nova salinidade, permanecendo por período maior do que 48h e variando, também, quanto a quantidade das isoformas expressas com a salinidade em cada brânquia (Jayasundara et al., 2007).

Esses estudos apóiam a hipótese de que o aumento da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase seja devido à síntese de novas enzimas, desencadeada a partir do contato com um ambiente de menor salinidade. O início da resposta pode ser a diminuição inicial da atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase, que sinalizaria para as células das brânquias a necessidade de uma resposta adaptativa a esse ambiente, manifestando-se com o aumento da síntese do mRNA, que culminaria no aumento de proteínas e consequentemente da capacidade osmoregulatória, explicando o aumento da atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase observado.

Porém a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase presente na 6ª brânquia é maior do que a da 7ª brânquia, contrastando com a concentração de (Na^+ , K^+)-ATPase observada no Western blot que é maior na 7ª brânquia, essa discrepância pode estar atribuída a diferentes isoformas presentes em cada brânquia, a modificações pós-traducionais

diferentes, ou a diferença no microdomínio de membrana onde a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ está inserida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, J. (1980) Distribuição e ecologia dos decápodos numa área estuarina de Ubatuba (SP) Bolm. Inst. Oceanogr. 29 (2), 1-3.
- Almansa, E.; Sanchez, J.J.; Cozzi, S.; Rodriguez, C.; Diaz, M. (2003) Temperature-activity relationship for the intestinal (Na⁺,K⁺)-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? J. Comp. Physiol. 173B, 231-237.
- Apell, H.J.; Schneeberger, A.; Sokolov, V.S. (1998) Partial reactions of the: kinetic analysis and transport properties. Acta Physiol. Scand. 163, 235-245.
- Avezedo, S.V. & Hartfelder, K.H. (2008) The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development — differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. J. Insect Physiol. 54, 1064-1071.
- Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J Mol Evol 46, 84-101.
- Barra, J.A. & Péqueux, A.J.R. (1986) Abstracts of the 8th Conference ESCPB, p.21, ESCPB Publ. Strasbourg, France.
- Barra, J.A.; Péqueux, A.J.R.; Humbert, W. (1983) A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. Tissue Cell 15, 583-596.
- Beaugé, L. & Berberian, G. (1983) The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and the Na⁺ K⁺ pump. Biochim. Biophys. Acta 727, 336-50.
- Belli NM (2008) Osmorregulação e excreção de amônia nos camarões palemonídeos: o papel da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial. Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Belli, N.M.; Faleiros, R.O.; Firmino, K.C.S.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. (2009) Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). Comp. Biochem. Physiol. 152A, 431-439.
- Berberian, G. & Beaugé, L. (1992). Phosphatase-activity and potassium-transport in liposomes with (Na⁺,K⁺)-ATPase incorporated. Biochim. Biophys. Acta 1103, 85-93.
- Blanco, G. & Mercer, R.W. (1998) Isozymes of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. - Renal Physiol. 44, F633-F650.
- Blanco, G.; Melton, R.J.; Sanchez, G.; Mercer, R.W. (1999) Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase. Biochem. 38, 13661-13669.
- Bouaricha, N.; Charmantier-Daures, M.; Thuet, P.; Trilles, J.P.; Charmantier, G. (1994) Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus*. Biol. Bull. 186, 29-40.
- Boxenbaum, N.; Daly, S.E.; Javaid, Z.Z.; Lane, L.K.; Blostein, R. (1998) Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit. J. Biol. Chem. 273, 23086-23092.
- Brues, T.C. (1927) Occurrence of the marine crab *Callinectes ornatus*, in brackish and fresh water, Am. Nat. 61, 566-568.
- Capendeguy, O. & Horisberger, J.D. (2005) The role of the third extracellular loop of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit in a luminal gating mechanism. J. Physiol. 565, 207-218.
- Chacur, M.M. (1998) Distribuição ecológica do siri azul *Callinectes danae* Smith, 1863 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na enseada de Ubatuba (SP) UNESP.
- Charmantier, G. & Soyeux, C. (1994) Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178, 233-246.
- Chung, K.F. & Lin, H.C. (2006) Osmoregulation and Na, K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. Comp. Biochem. Physiol. 144A, 48-57.
- Cioffi, M. (1984) Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. Amer. Zool. 24, 139-156.
- Compe`re, P.; Wanson, S.; Péqueux, A.; Gilles, R.; Goffinet, G. (1989) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. Tissue Cell 21, 299-318.
- Copeland, D.E. & Fitzjarrell, A.T. (1968) The salt absorbing cells in gills of blue crab (*Callinectes sapidus* (Rathbun) with notes on modified mitochondria. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 92, 1-22.
- Cornelius, F.; Turner, N.; Christensen, H.R.Z. (2003) Modulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. Biochemistry 42, 8541-8549.

- Corotto, F.S. & Holliday, C.W. (1996) Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp Biochem Physiol* 113A, 361-368.
- Costa, T.M. (1995) Ciclo reprodutivo de *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região de Ubatuba. 94 pp. UNESP.
- Crambert, G.; Franz, A.; Lelievre, L.G. (1997) Biochemical characterization of the human renal Na⁺,K⁺-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S. A.* 834, 97-100.
- Crambert, G.; Hasler, U.; Beggah, A.T.; Yu, C.L.; Modyanov, N.N.; Horisberger, J.D.; Lelievre, L.; Geering, K. (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human isozymes. *J. Biol. Chem.* 275, 1976-1986.
- Crambert, G.; Li, C.M.; Swee, L.K.; Geering, K. (2004) FXYD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 279, 30888-30895.
- Daly, S.E.; Biostein, R.; Lane, L.K. (1997) Functional consequences of a posttransfection mutation in the h2-h3 cytoplasmic loop of the α subunit of NaK-ATPase. *J Biol Chem* 272, 6341-6347.
- Davis, R.L. & Robinson, J.D. (1988) Substrate sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: pertinence of the adenine and fluorescein binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 953: 26-36.
- Dempski, R.E.; Friedrich, T.; Bamberg, E. (2005) The β -subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *J Gen Physiol* 125, 505-520.
- Dempski, R.E.; Lustig, J.; Friedrich, T.; Bamberg, E. (2008) Structural Arrangement and Conformational Dynamics of the γ Subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem.* 47, 257-266.
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
- Donnet, C.; Arystarkhova, E.; Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the NaK-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and γ subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276, 7357-7365.
- D'Orazio, S.E. & Holliday, C.W. (1985) Gill Na,K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiol Zool* 58, 364-373.
- Doris, P.A. (1994) Regulation of NaK-ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Proc Soc Exp Biol Med* 2051, 202-212.
- Drapeau, P. & Blostein, R. (1980) Interactions of K⁺ with (NaK)-ATPase. Orientation of K⁺phosphatase sites studied with inside-out red cell membrane vesicles. *J Biol Chem* 255, 7827-34.
- Dunbar, L.A. & Caplan, M.J. (2001) Ion pumps in polarized cells: Sorting and regulation of the Na⁺,K⁺- and (H⁺,K⁺)-ATPases. *J Biol Chem* 276, 29617-29620.
- Eguchi, H.; Takeda, K.; Schwarz, W.; Shirahata, A.; Kawamura, M. (2005) Involvement in K⁺ access of Leu³¹⁸ at the extracellular domain flanking M3 and M4 of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit. *Biochemical and Biophysical Research communications* 330, 611-614.
- Einholm, A.P.; Toustrup-Jensen, M.; Andersen, J.P.; Vilven, B. (2005) Mutation of Gly-94 in transmembrane segment M₁ of Na⁺, K⁺-ATPase interferes with Na⁺ and K⁺ binding in E₂P conformation. *PNAS.* 102, 11254-11259.
- Else, P.L. & Wu, B.J. (1999) What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms? *J Comp Physiol* 169B, 296-302.
- Else, P.L.; Wu, B.J.; Storlien, L.H.; Hulbert, A.J. (2003) Molecular activity of Na⁺,K⁺-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Ann NY Acad Sci* 986, 525-526.
- Emery, A.M.; Billingsley, P.F.; Ready, P.D.; Djamgoz, M.B.A. (1998) Insect (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Insect Physiol.* 44, 197-209.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85, 97-177.
- Faleiros, R.O. (2007) Ultraestrutura, atividade enzimática (Na⁺,K⁺)-ATPásica e expressão de RNAm dos ionotransportadores (Na⁺,K⁺)-ATPase e V-ATPase nas brânquias do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) em função da capacidade osmorregulatória. Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Fedosova, N.U.; Cornelius, F.; Klodos, I. (1998) E₂P phosphoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochem.* 37, 13634-13642.
- Fedosova, N.U. & Esmann, M. (2007) Nucleotide binding to Na,K-ATPase: pK values of the groups affecting the high affinity site. *Biochem.* 46, 9116-9122.
- Felsenfeld, D.P. & Sweadner, K.J. (1988) specificity mapping and topography of an isozyme-specific epitope of the catalytic subunit. *J.Biol. Chem.* 263, 10932-10942.

- Foster, C.A. & Howse, H.D. (1978) A morphological study on gills of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Tissue and Cell* 10, 77-92.
- Fransozo, A.; Negreiros-Fransozo, M.L.; Mantelatto, F.L.M.; Pinheiro, M.A.A.; Santos, S. (1992) Composição e distribuição dos *Brachyura* (Crustácea, Decapoda) no sublitoral não consolidado na Enseada da Fortaleza, Ubatuba, SP. *Ver. Brasil Biol.* 52, 667-675.
- Freire, C.A.; Onken, H.; McNamara, J.C. (2008) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 272-304.
- Füzesi, M.; Gottschalk, K.E.; Lindzen, M.; Shainskaya, A.; Küster, B.; Garty, H.; Karlisch, S.J.D. (2005) Covalent Cross-links between the γ Subunit (FXYD₂) and α and β -Subunits of Na,K-ATPase *J Biol Chem* 280, 18291-18301.
- Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Leone, F.A. (2000) Characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B, 303-315.
- Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Leone, F.A., (2001). Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 130A, 665-676.
- Furriel, R.P.M.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Leone FA (2004) Modulation of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J. Exp. Zool.* 301, 63-74.
- Gache, C.; Rossi, B.; Lazdunski, M. (1976) (Na⁺,K⁺)-Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes cooperativity and control. Steady-state analysis. *Eur J Biochem* 65, 293-306.
- Gache, C.; Rossi, B.; Lazdunski, M. (1977) Mechanistic Analysis of the (Na⁺,K⁺)-ATPase using new pseudosubstrates. *Biochemistry* 16, 2957-2965.
- Gache, C.; Rossi, B.; Leone, F.A.; Lazdunski, M. (1979) Pseudo-substrates to analyze the reaction mechanism of the Na,K-ATPase. In: JC Skou (Ed) & JG Norby (Ed) *Na,K-ATPase, Structure and Kinetics*. Academic Press, NY 301-314.
- GarciaSaez, A.; Perona, R.; Sastre, L. (1997) Polymorphism and structure of the gene coding for the alpha subunit of the *Artemia franciscana*. *Biochem. J.* 321, 509-518.
- Garçon, D.P.; Masui, D.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2007) K⁺ and NH₄⁺ modulate gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 145-155.
- Garçon, D.P.; Masui, D.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2009) Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 154A, 44-55.
- Garty, H. & Karlisch, S.J.D. (2005) FXYD Proteins: Tissue Specific Regulators of Na,K ATPase. *Seminars in Nephrology* 198.
- Gatto, C.; McLoud, S.M.; Kaplan, J.H. (2001) Heterologous expression of (Na⁺,K⁺)-ATPase in insect cells: intracellular distribution of pump subunits. *Am J Physiol* 281C, 982-992.
- Gatto, C.; Helms, J.B.; Prasse, M.C.; Arnett, K.L.; Milanick, M.A. (2005) Kinetic characterization of tetrapropylammonium inhibition reveals how ATP and Pi alter access to the (Na⁺,K⁺)-ATPase transport site. *Am J Physiol* 289, C302-C311.
- Gatto, C.; Arnett, K.L.; Milanick, M.A. (2007) Divalent Cation Interactions with Na,K-ATPase Cytoplasmic Cation Sites: Implications for the para-Nitrophenyl Phosphatase Reaction Mechanism. *J. Membrane Biol.* 216, 49-59.
- Geering, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg. Biomemb.* 33, 425-438.
- Geering, K.; Beguin, P.; Garty, H.; Karlisch, S.; Füzesi, M.; Horisberger, J.D.; Crambert, G. (2003) FXYD proteins: New tissue- and isoform-specific regulators of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Ann NY Acad Sci* 986, 388-394.
- Genovese, G.; Luchetti, C.G.; Luquet, C.M. (2004) Na⁺/K⁺ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper- hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal and concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144, 111-118.
- Gilles, R. & Péqueux, A. (1985) Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches. In: R. Gilles and M. Gilles-Baillien (Eds.), *Transport processes, ionic- and osmoregulation*, pp. 136-158, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Glynn, I.M. (1985) The (Na⁺,K⁺)-transporting adenosine triphosphatase. In: AN Martonosi (Ed) *The enzymes of biological membranes*. Vol 3, pp 35-114. Plenum Press, New York.
- Gonçalves, R.R.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Garçon, D.P.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2006). A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in

- the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Vol 145/3, 346-356.
- Goodman, S.H. & Cavey, M.J. (1990) Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res. 260, 495-505.
- Gostimskaya, I.S.; Grivennikova, V.G.; Zharova, T.V.; Bakeeva, L.E.; Vinogradov, A.D. (2003) In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. Anal Biochem 313, 46-52.
- Guerin, L. & Stickle, W.B. (1997) Effect of salinity on survival and bioenergetics of juvenile lesser blue crabs *Callinectes similis*. Marine Biol. 129, 63-69.
- Guerra-Castro, E.; Carmona-Suárez, C.A.; Conde, J.E. (2007) Activity patterns and zonation of the swimming crabs *arenarius cribrarius* and *Callinectes ornatus*. J. Crustacean Biol., 27(1), 49-58.
- Hakansson, K.O. & Jorgensen, P.L. (2003) Homology modeling of - A putative third sodium binding site suggests a relay mechanism compatible with the electrogenic profile of Na⁺ translocation. Ann NY Acad Sci 986, 163-167.
- Hakansson, K.O. (2003) The crystallographic structure of Na,K-ATPase N-domain at 2.6 Å resolution. J. Mol. Biol. 332, 1175-1182.
- Harris, R.R. & Bayliss, D. (1988) Gill (Na⁺,K⁺)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na⁺ regulation. Comp Biochem Physiol 90A, 303-308.
- Harris, R.R. & Santos, M.C.F. (1993) Sodium uptake and transport (Na⁺2+K⁺)ATPase changes following Na⁺ depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab (*Ucides cordatus*) (L.). Comp. Biochem. Physiol. 105A (1), 35-42.
- Haviv, H.; Cohen, E.; Lifshitz, Y.; Tal, D.M.; Goldshleger, R.; Karlsh, S.J.D. (2007) Stabilization of Na⁺,K⁺-ATPase Purified from *Pichia pastoris* Membranes by Specific Interactions with Lipids. Biochemistry 46, 12855-12867.
- Heinonen, S.K. & Lahti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase. Analyt. Biochem. 113, 313-317.
- Henry, R.P. (1996) Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. Annu. Rev. Physiol. 58, 523-538.
- Henry, R.P.; Garrelts, E.E.; McCarty, M.M.; Towle, D.W. (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. J. Exp. Zool. 292, 595-603.
- Henry, R.P.; Weihrauch, D.; Gehrich, S.; Towle, D.W. (2003) Salinity-mediated induction of carbonic anhydrase in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. A 136, 243-258.
- Higgins, C.F.; Haag, P.D.; Nikaido, K.; Ardesir, F.; Garcia, G.; Ames, G.F. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. Nature 298, 723-727.
- Hilge, M.; Siegal, G.; Vuister, G.W.; Guntert P.; Gloor, S.M.; Abrahams, J.P. (2003) ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. Nature Struct. Biol. 10, 468-474.
- Holliday, C.W. (1985) Salinity-induced changes in gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the mud fiddler crab *Uca pugnax*. J. Exp. Zool. 233, 199-208.
- Homareda, H. & Ushimaru, M. (2005) Stimulation of p-nitrophenylphosphatase activity of Na⁺/K⁺-ATPase by NaCl with oligomycin or ATP. FEBS J 272, 673-684.
- Horisberger, J.D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. Physiol. 19, 377-388.
- Horisberger, J.D.; Lemas, V.; Kraehenbuhl, J.P.; Rossier, B.C. (1991) Structure-Function Relationship of Na,K-ATPase. Ann. Rev. of Physiol. 53, 565-584.
- Horiuchi, S. (1977) Characterization of gill Na⁺K⁺-ATPase in freshwater crayfish, *Procambarus clarki* (Girard). Comp. Biochem. Physiol B. 56, 135-138.
- Hu, Y.K. & Kaplan, J.H. (2000) Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein - The topology of the α-subunit. J. Biol. Chem. 275, 19185-19191.
- Imagawa, T.; Yamamoto, T.; Kaya, S.; Sakaguchi, K.; Taniguchi, K. (2005) Thr-774 (Transmembrane Segment M5), Val-920 (M8), and Glu-954 (M9) are involved in Na⁺ transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na,K-ATPase Activity. The Journal of Biological Chemistry 280, 18736-18744.
- Jacobsen, M.D.; Pedersen, P.A.; Jorgensen, P.L. (2002) Importance of Na,K-ATPase residue alpha 1-Arg(544) in the segment Arg(544)-Asp(567) for high-affinity binding of ATP, ADP, or MgATP. Biochemistry 41, 1451-1456.

- Jayasundara, N.; Towle, D.W.; Weihrauch, D.; Spanings-Pierrot C. (2007) Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *J. Exp. Biol.* 210, 2070-2081.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H.; Pedersen, P.A. (1998) Structure-function relationships of E-1-E-2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1365, 65-70.
- Jorgensen, P.L. & Pedersen, P.A. (2001) Structure-function relationships of Na⁺, K⁺, ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 57-74.
- Jorgensen, P.L. (2001) Aspects of gene structure and functional regulation of the isozymes of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Cell Mol Biol* 47, 231-238.
- Jorgensen, P.L.; Jorgensen, J.R.; Pedersen, P.A. (2001) Role of conserved TGDGVND-loop in Mg²⁺ binding, phosphorylation, and energy transfer in Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomemb.* 33, 367-377.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O.; Karlsh S.J.D. (2003) Structure and mechanism of : Functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65, 817-849.
- Jorgensen, P.L. & Amat, F. (2008) Regulation and Function of Lysine-Substituted Na,K Pumps in Salt Adaptation of *Artemia franciscana*. *J Membrane Biol* 221, 39-49.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review Biochemistry.* 71, 511-35.
- Karlsh, S.J. (2003) Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage. *Ann N Y Acad Sci* 986, 39-49.
- Knepper, M.A.; Packer, R.; Good, D.W. (1989) Ammonium transport in the kidney. *Physiol. Rev.* 69, 179-249.
- Kong, B.Y. & Clarke, R.J. (2004) Identification of potential regulatory sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase by kinetic analysis. *Biochemistry* 43, 2241-2250.
- Koroleff, F. (1983) Determination of ammonia, *Methods of seawater analysis*. In: Grasshoff, K., Ehrhart M., Kremling K. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 150-151.
- Kosiol, B.; Bigalke, T.; Graszynski, K (1988) Purification and characterization of gill Na⁺,K⁺-ATPase in the freshwater crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89, 171-177.
- Kuntzweiler, T.A.; Wallick, E.T.; Johnson, C.L.; Lingrel, J. (1995) Glutamic acid 327 in the sheep α 1 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase stabilizes a K⁺-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* 270, 2993-3000.
- Kurtz, I. & Balaban, R.S. (1986) Ammonium as a substrate for Na⁺-K⁺-ATPase in rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* 250, (3) F497-F502 Part 2.
- Lacerda, T.P. & Sawaya, P. (1986) Effects of hypoosmotic conditions on hemolymph glucose-concentration in *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Comp. Biochem. Phys.* 85A, 509-512.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Landon, E.J. & Norris, J.L. (1963) Sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase activity in a rat-kidney endoplasmic reticulum fraction. *Biochim Biophys Acta* 71, 266-276.
- Lapucki, T. & Normant, M. (2008) Physiological responses to salinity changes of the isopod *Idotea chelipes* from the Baltic brackish waters. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A, 299-305.
- Laughery, M.D.; Todd, M.L.; Kaplan, J.H. (2003) Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J Biol Chem* 278, 34794-34803.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*, 3ª edição, Sarvier, 2002.
- Leone, F.A. ; Furriel, R.P.M. ; McNamara, J.C. ; Mantelatto, F.L.M. ; Masui, D.C. ; Rezende, L.A. ; Gonçalves, R.R. ; Garçon, D.P. (2005b) (Na⁺,K⁺)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 11, 1-15.
- Leone, F.A.; Baranauskas, J.A.; Furriel, R.P.M.; Borin, I.A. (2005a) An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Biol Educ.* 33, 399-403.
- Levenson, R. (1994) Isoforms of the Na,K-ATPase – Family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123, 1-45.
- Li, C.M.; Grosdidier, A.; Crambert, G.; Horisberger, J.D.; Michielin, O.; Geering, K. (2004) Structural and functional interaction sites between (Na⁺,K⁺)-ATPase and FXYD proteins. *J Biol Chem* 279, 38895-38902.
- Li, T.; Roer, R.; Vana, M.; Pate, S.; Check, J. (2006) Gill area, permeability and Na⁺-K⁺-ATPase activity as a function of size and salinity in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 305A, 233-245.

- Lingrel, J.; Moseley, A.; Dostanic, I.; Cougnon, M.; He, S.W.; James, P.; Woo, A.; O'Connor, K.; Neumann, J. (2003) Functional roles of the α isoforms of the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. *Ann NY Acad Sci* 986, 354-359.
- Lingrel, J.B.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V.; Moseley, A.E. (2007) $\text{Na}, \text{K}\text{-ATPase}$ and the role of α isoforms in behavior. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 385-389.
- López Mañanes, A.A.L.; Meligeni, C.D.; Goldemberg, A.L. (2002) Response to environmental salinity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 274, 75-85.
- Lopez, L.B.; Quintas, L.E.M.; Noel, F. (2002) Influence of development on $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ expression: isoform- and tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol.* 131A, 323-333.
- Lovett, D.L. & Watts, S.A. (1995) Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathburn. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 110, 115-119.
- Lovett, D.L.; Ricart, T.M.; Tanner, C.A.; Towle, D.W. (2002) Chronic exposure of the blue crab, *Callinectes sapidus*, to low salinity stimulates expression of $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ α -subunit mRNA and protein in gills. *Integrative Comp Biol* 42, 1269-1269.
- Lovett, D.L.; Colella, T.; Cannon, A.C.; Lee, H.; Evangelisto, A.; Muller, E.M.; Towle, D.W. (2006) Effect of Salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* 210, 132-139.
- Lubarski, I.; Karlish, S.J.D.; Garty, H. (2007) Structural and functional interactions between FXYD5 and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. *Am J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F1818-F1826.
- Lucu, C.; Devescovi, M.; Siebers, D. (1989) Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? *J Exp Zool* 249, 1-5.
- Lucu, C. (1990) Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 97, 297-306.
- Lucu, C. & Flik, G. (1999) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ and Na^+ , Ca^{2+} exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am. J. Physiol.* 276, R490-R499.
- Lucu, C. & Towle, D.W. (2003) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol* A 135, 195-214.
- Lucu, C.; Devescovi, M.; Skaramuca, B.; Kozul, V. (2000) Gill $\text{NaK}\text{-ATPase}$ in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J Exp Mar Biol Ecol* 246, 163-178.
- Luquet, C.M.; Weihrauch, D.; Senek, M.; Towle, D.W. (2005) Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* 208, 3627-3636.
- Macías, M.T.; Palmero, I.; Sastre, L. (1991) of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* α -subunit. *Gene* 105, 197-204.
- Maina, J.N. (1990) The morphology of gills of the freshwater African crac *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): A scanning and transmission electron microscopy study. *J. Zool. London* 221, 499-515.
- Mallery, C.H. (1983) A carrier enzyme basis for ammonium excretion in teleost gill- NH_4^+ stimulated Na -dependent ATPase activity in *Opsanus-beta* *Comp. Biochem. Physiol.* 74A, 889-897.
- Mantel, L.H. & Farmer, L.L. (1983) Osmotic and ionic regulation. In: L.H. Mantel (Ed.) and D.E. Bliss (Ed.-in-chief), *The biology of crustacea*, Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation, pp. 53-161, Academic Press, New York, New York.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1996) Size at sexual maturity in *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba Region (SP), Brazil. *Nauplius* 4, 29-38.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1997) Fecundity of the crab *Callinectes ornatus* ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 70, 214-226.
- Mantelatto, F.L.M. & Dias, L.L. (1999) Extension of the know distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1967) (Decapoda, Portunidae) along the western tropical South Atlantic. *Crustaceana* 70, 214-226.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1999) Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Rev. Brasileira Biol.* 59, 23-31.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1999a) Reproductive biology and moulting cycle of the crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Portunidae) from the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 72, 63-76.
- Mantelatto, F.L.M. & Martinelli, J.M. (1999) Carapace width-weight relationships of *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from Ubatuba Bay, Brazil. *Iheringia Ser Zool* 87, 111-116.

- Mantelatto, F.L.M. (1999) Allocation of portunid crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura) in the Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress, Amsterdam, The Netherlands. 431-443.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (2000) Brachyuran community in Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. J. Shellfish Research 19, 701-709.
- Mantelatto, F.L.M. & Chritofolletti, R.A. (2001) Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex size and molt stage. Marine Biology 138, 585-94.
- Martin, D.W. & Sachs, J.R. (2000) Ligands presumed to label high affinity and low affinity ATP binding sites do not interact in an $(\alpha\beta)(2)$ diprotomer in duck nasal gland $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, nor do the sites coexist in native enzyme. J Biol Chem 275, 24512-24517.
- Martin, D.W. (2005) Structure-Function. Relationships in the $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-Pump}$. Seminars in Nephrology 198, 282-291.
- Martinez, C. B.; Harris, R. R.; Santos, M. C. (1998) Transepithelial potential differences and sodium fluxes in isolated perfused gills of the mangrove crab (*Ucides cordatus*). Comp. Biochem. Physiol. 120A, 227-236.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Leone, F.A. (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. Comp Biochem Physiol 132, 471-482.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Leone FA (2003) Characterization of gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of $\text{K}^+\text{-phosphatase}$ activity by potassium and ammonium ions. Comp. Biochem. Physiol. 134B, 631 – 640.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; Silva, E.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Barrabin, H.; Scofano, H.M.; Fontes, C.F.; Leone, F.A. (2005a) Gill microsomal $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2521-2535.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Leone FA (2005b) $\text{K}^+\text{-phosphatase}$ activity of gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from the swimming crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the α -subunit. J. Exp. Zool. 303A, 294-307.
- Masui, D.C.; Silva, E.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Barrabin, H.; Scofano, H.; Fontes, C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2008) The crustacean gill $(\text{Na}, \text{K})\text{-ATPase}$: allosteric modulation of high- and low-affinity ATP binding sites by sodium and potassium ions.. Arch. Biochem. Biophys. 479, 139-144.
- Masui, D.C.; Mantelatto, F.L.M.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Leone, F.A. (2009) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: novel perspectives on ammonia excretion. In press.. Comp. Biochem. Physiol. 153A, 141-148.
- Melo, G.A.S. (1996) Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade Ed, São Paulo 1-603.
- Mendonça, N.N.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Leone, F.A.; Furriel, R.P.M. (2007) Long- term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ α -subunit expression and $\text{K}^+\text{-phosphatase}$ activity. Comp Biochem Physiol A 146, 534-543.
- Mense, M.; Rajendran, V.; Blostein, R.; Caplan, M.J. (2002) Extracellular domains, transmembrane segments, and intracellular domains interact to determine the cation selectivity of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-}$ and gastric $(\text{H}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Biochemistry 41, 9803-9812.
- Middleton, D.A.; Rankin, S.; Esmann, M.; Watts, A. (2000) Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. PNAS 97, (25) 13602-13607.
- Mijatovic, T.; Van Quaquebeke, E.; Delest, B.; Debeir, O.; Darro, F.; Kiss, R. (2007) Cardiotonic steroids on the road to anticancer therapy. Biochem et Biophys Acta. 1776, 32-57.
- Mobasheri, A.; Avila, J.; Cozar-Castellano, I.; Brownleader, M.D.; Trevan, M.; Francis, M.J.O.; Lamb, J.F.; Martin-Vasallo, P. (2000) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci. Reports 20, 51-91.
- Morris, S. (2001) Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapods crustaceans. J. Exp. Biol. 204, 979-989.
- Morth, J.P.; Pedersen, B.P.; Toustrup-Jensen, M.S.; Sorensen, T.L.M.; Petersen, J.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium–potassium pump. Nature. 450, 1043-1050.
- Morth, J.P.; Poulsen, H.; Toustrup-Jensen, M.S.; Schack, V.R.; Egebjerg, J.; Andersen, J.P.; Vilsen, B.; Nissen, P. (2009) The structure of the $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ and mapping of isoform differences and disease-related mutations. Phil. Trans. R. Soc. B 364, 217–227.

- Negreiros-Fransozo, M.L. & Fransozo, A. (1995) On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. *Iheringia Ser Zool* 79, 13-25.
- Negreiros-Fransozo, M.L.; Mantelatto, F.L.M.; Fransozo, A. (1999) Population biology of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Portunidae) from Ubatuba (SP), Brazil. *Sci Mar* 63, 157-163.
- Nesher, M.; Spolansky, U.; Rosen, H.; Lichtstein, D. (2007) The endogenous digitalis- like compounds - A new family of steroid hormones. *Life Sci.* 80, 2093-2107.
- Neufeld, G.J.; Holliday, C.W.; Pritchard, J.B. (1980) Salinity adaptation of gill Na,K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Exp Zool* 211, 215-224.
- Ning, G.; Maunsbach, A.B.; Lee, Y.J.; Moller, J.V. (1993) Toolology of the α subunit epitopes analyzed with oligopeptide-specific antibodies and double-labeling immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* 336, 521-524.
- Noel, F.; Quintas, L.E.M.; Caricati-Neto, A.; Lafayette, S.S.L.; Jurkiewicz, A. (1997) Characterization of an isoform of Na⁺/K⁺-ATPase with high affinity for [H-3]ouabain in the rat vas deferens. *Ann NY Acad Sci USA* 834, 115-118.
- Ohsumi, Y. & Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. biol. Chem.* 256, 2079-2082.
- Olesen, C.; Sorensen, T.L.; Nielsen, R.C.; Moller, J.V.; Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science* 306, 2251-2255.
- Onken, H. & Putzenlechner, M. (1995) A V-ATPase drives active electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* 198, 767-774.
- Onken, H. & Riestenpatt, S. (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperegulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 883-893.
- Palacios, E. & Racotta, I.S. (2007) Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquaculture* 268, 123-135.
- Parikh, P. C.; Tierney, K. J.; Gerber, N. L.; Lovett, D. L. (2005) Na⁺,K⁺-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* may be modulated by membrane trafficking during salinity change. *Integr. Comp. Biol.* 45, 1175.
- Patchornik, G.; Munson, K.; Goldshleger, R.; Shainskaya, A.; Sachs, G.; Karlsh, S.J.D. (2002) The ATP-Mg²⁺ binding site and cytoplasmic domain interactions of Na⁺,K⁺-ATPase investigated with Fe₂⁺-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *Biochem.* 41, 11740-11749.
- Pedersen, P.A.; Rasmussen, J.H.; Jorgensen, P.L. (1996) Consequences of mutations to the phosphorylation site of the α -subunit of Na,K-ATPase for ATP binding and E(1)-E(2) conformational equilibrium. *Biochem.* 35, 16085-16093.
- Pedersen, P.L. (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 349-355.
- Pederson, P.L. & Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.
- Péqueux, A. & Gilles, R. (1981) Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J Exp Biol* 92, 173-186.
- Péqueux, A. (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1-60.
- Pereira, M.J.; Branco, J.O.; Christoffersen, M.L.; Freitas Junior, F.; Francosso, H.A.A.; Pinheiro, T.C. (2009) Population biology of *Callinectes danae* and *Callinectes sapidus* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in the south-western Atlantic. *J. Marine Biolog. Assoc. The United Kingdom.* 89, 1341-1351.
- Pfafft, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002-2007.
- Pierre, S.V.; Sottejeau, Y.; Gourbeau, J.; Sanchez, G.; Shidyak, K.A.; Blanco, V.G. (2008) Isoform-specificity of Na,K-ATPase-mediated ouabain signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294, F859-F866.
- Pinheiro, M.A.A.; Fransozo, A.; Negreiros-Fransozo. (1996) Distributional patterns of *Areneus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Portunidae) in Fortaleza Bay, Ubatuba (S.P.), Brazil. *Rev. Brasileira Biol.* 56(4), 705-716.
- Post, R.L. (2003) How does conformation change ouabain binding from rejection (E₁) to acceptance (E₂)? *Ann NY Acad Sci* 986, 20-21.
- Postel, U.; Petrusch, G.; Riestenpatt, S.; Weihrauch, D.; Malykh, J.; Becker, W.; Siebers, D. (1998) Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase and of active ion-transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium. *Marine Biol.* 130, 407- 416.
- Pressley, T.A. (1996) Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner. Electrol. Metab.* 22, 264-271

- Pressley, T.A.; Duran, M. J.; Pierre, S. V. (2005) Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the Na,K-pump. *Front. in Biosc.* 10, 2018- 2026.
- Radkov, R.; Kharoubi-Hess, S.; Schaer, D.; Modyanov, N.N.; Geering, K.; Horisberger, J. (2007) Role of homologous ASP334 and GLU319 in human non-gastric H,K- and Na,K-ATPases in cardiac glycoside binding. *Biochem. biophysical research communic.* 356(1), 142-146.
- Read, S.M. & Northcote, D.H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-g dye-binding assay for protein. *Analyt. Biochem.* 116, 53-64.
- Rice, W.J.; Young, H.S.; Martin, D.W.; Sachs, J.R.; Stokes, D.L. (2001) Structure of (Na⁺,K⁺)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E₁ and E₂ states. *Biophys. J.* 80, 2187-2197.
- Riestenpatt, S.; Onken, H.; Siebers, D. (1996) Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-flux studies. *J. Exp. Biol.* 199, 1545-1554.
- Robinson, J.D. (1970) Interactions between monovalent cations and the (Na⁺,K⁺)- dependent adenosine triphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 139,17-27.
- Robinson, J.D. (1981) Substituting manganese for magnesium alters certain reaction properties of the Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 642, 405-417.
- Robinson, J.D.; Leach, C.A.; Robinson, L.J. (1986) Cation sites, spermine, and the reaction sequence of the (Na⁺,K⁺)-dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 856, 536-544.
- Robinson, J.D. & Pratap, P.R. (1991) (Na⁺,K⁺)-ATPase: modes of inhibition by Mg²⁺. *Biochim Biophys Acta* 1061, 267-78.
- Rossi, B.; Gache, C.; Lazdunski, M. (1978) Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na⁺,K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. *Eur J Biochem* 85, 561-570.
- Sáez, A.G.; Lozano, E.; Zaldívar-Riverón, A. (2009) Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica.* 136, 479-490.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanchez, G. & Blanco, G. (2004) Residues within transmembrane domains 4 and 6 of the Na,K-ATPase alpha subunit are important for Na⁺ selectivity. *Biochemistry* 43, 9061-9074.
- Santos, L.C.F.; Belli, N.M.; Augusto, A.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. (2007) Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in diadromous, freshwater Palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 148, 178-188.
- Schneeberger, A. & Apell, H.J. (2001) Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the: II. Competition of various cations. *J Membrane Biol* 179, 263-273.
- Schoner, W.; Von Ilberg, C.; Kramer, R.; Seubert, W. (1967) On the mechanism of Na⁺- and K⁺-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1. Purification and properties of a Na⁺- and K⁺-activated ATPase from ox brain. *Eur J Biochem* 1, 334-343.
- Schubart, C.D.; Diesel, R.; Hedges, S.B. (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393, 363-5.
- Segall, L.; Daly, S.E.; Boxenbaum, N.; Lane, L.K.; Blostein, R. (2000) Distinct catalytic properties of the α 1, α 2 and α 3 isoforms of the rat (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Biophys J.* 78, (1) 456.
- Segall, L.; Daly, S.E.; Blostein, R. (2001) Mechanistic basis for kinetic differences between the rat α 1, α 2, and α 3 isoforms of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 276, 31535-31541.
- Seok, J.H.; Kim, J.B.; Hong, J.H.; Sung, J.Y.; Hur, G.M.; Lim, K.; Lee, J.H. (1998) Regulation of Na,K-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 667-672.
- Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4Å resolution. *Nature* 459, 446-450.
- Shivkamat, P. & Roy, R. (2005) Regulation of membrane lipid bilayer structure during salinity adaptation: A study with the gill epithelial cell membranes of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142B, 28-36.
- Siebers, D.; Leweck, K.; Markus, H.; Winkler, A. (1982) Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar. Biol.* 69, 37-43.
- Silva, E.C.C.; Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Barrabin, H.; Leone, F.A.; Scofano, H.M.; Fontes, C.F.L. (2008) Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 149 B, 622-629.
- Skou, J.C. (1960) Further investigations on a Mg²⁺-Na⁺-activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta* 42, 6-23.

- Skou, J.C. (1962) Preparation of mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+ . *Biochim Biophys Acta* 58, 314-325.
- Skou, J.C. & Esmann, M. (1992) The $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. *J. Bioenerg. Biomemb.* 24, 249-261.
- Sorensen, T. L.; Moller, J. V.; Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672-1675.
- Sorensen, T.M.L.; Moller, J.V.; Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672-1675.
- Specht, S.C.; Rodriguez, C.; Quiñones, L.; Velazquez, S. (1997) Effect of high ionic strength and inhibitors of H,K-ATPase on the ouabain-sensitive K-p-Nitrophenylphosphatase activity in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Comp Biochem Physiol* 117B, 217-224.
- Stern, S.; Borut, A.; Cohen, D. (1984) Characterization of Na-K ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 47-50.
- Sweadner, K.J. & Donnet, C. (2001) Structural similarities of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 356, 685-704.
- Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na^+, K^+ -ATPase *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 185-220.
- Sweeney, G. & Klip, A. (1998) Regulation of the Na^+/K^+ -ATPase by insulin: Why and how? *Mol. Cell. Biochem.* 182, 121-133.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
- Taissoun, E.N. (1973) Biogeografía y ecología de los cangrejos de la familia "Portunidae" (Crustáceos, Decapodos, Brachyura) em la costa Atlântica de América. *Bolm. Cent. Invest. Biol.* 7, 7-23.
- Taylor, H.H. & Taylor, E.W. (1992) Gills and lungs: The exchange of gases and íons. In: F.W. Harrison and A.G. Humas (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol 10, *Decapod crustacea*, pp.203-293, Wiley-liss, New York.
- Tentes, I. & Stratakis, E. (1991) Partial purification and properties of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase from *Potamon - potamios*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 619-624.
- Therien, A.G. & Blostein, R. (1999) K^+/Na^+ antagonism at cytoplasmic sites of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase: a tissue-specific mechanism of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 277, C891-C898.
- Therien, A.G. & Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279, C541-C566.
- Therien, A.G.; Nestor, N.B.; Ball, W.J.; Blostein, R. (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271 (12), 7104-7112.
- Tipsmark, C.K. (2008) Identification of FXYP protein genes in a teleost: tissue-specific expression and response to salinity change. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1367-R1378.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H.; Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6Å resolution. *Nature* 405, 647-655.
- Torres, G.; Charmantier-Daures, M.; Chifflet, S.; Anger, K. (2007) Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 460-465.
- Toustrup-Jensen, M. & Vilsen, B. (2005) Interaction between the Catalytic Site and the A-M3 Linker Stabilizes E_2/E_2P Conformational States of Na^+, K^+ -ATPase. *J. of Biolog. Chemist.* 280, 10210-20218.
- Toustrup-Jensen, M.S.; Holm, R.; Einholm, A.P.; Schack., V.R.; Morth, J.P.; Nissen, P.; Andersen, J.P.; Vilsen, B. (2009) The C Terminus of Na^+, K^+ -ATPase Controls Na^+ Affinity on Both Sides of the Membrane through Arg⁹³⁵. *J. Biol. Chemist.* 284, 18715-18725.
- Towbin, H.; Staehelin T.; Gordon, J. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *Proceed. Nation. Acad. Science of USA* 76 (9), 4350-4354.
- Towle, D.W.; Palmer, G.E.; Harris, J.L. (1976) Role of gill $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J Exp Zool* 196, 315-321.
- Towle, D.W. (1984) Membrane-bound ATPases in arthropod íon-transporting tissues. *Amer. Zool.* 24, 177-185.
- Towle, D.W. & Kays, W.T. (1986) Basolateral localization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase in gill epithelium of 2 osmoregulating crabs, *callinectes-sapidus* and *carcinus-maenas*. *J. Exp. Zool.* 239, 311-318.
- Towle, D.W. & Holleland, T. (1987) Ammonium ion substitutes for K^+ in ATP-dependent Na^+ transport by basolateral membrane-vesicles. *Am. Journal. Physiol.* 252R, 479-489.
- Towle, D.W. (1993) Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J. Exp. Zool.* 265, 387-396.
- Towle, D.W. (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *Amer. Zool.* 37, 575-584.

- Towle, D. W.; Paulsen, R. S.; Weihrauch, D.; Kordylewski, M.; Salvador, C.; Lignot, J.H.; Spanings-Pierrot, C. (2001) Na⁺K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity related expression of α -subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* 204, 4005-4012.
- Towle, D.W. & Weihrauch, D. (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am. Zoologist* 41, 770-780.
- Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H.; Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6Å resolution. *Nature* 405, 647-655.
- Toyoshima, C. & Inesi, G. (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 269-292.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430, 529-535.
- Toyoshima, C.; Nomura, H.; Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* 432, 361-368.
- Toyoshima, C.; Norimatsu, Y.; Iwasawa, S.; Tsuda, T.; Ogawa, H. (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19831-19836.
- Vagin, O.; Sachs, G.; Tokhtaeva, E. (2007) The roles of the Na,K-ATPase beta 1 subunit in pump sorting and epithelial integrity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 367-372.
- Vasilets, L.A. (2002) Mechanisms of short-term regulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase by protein kinases. *Biologicheskie Membrany* 19, 77-82.
- Vilsen, B. (1995) Mutant Glu781--Ala of the rat kidney Na⁺K⁺-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochem.* 34, 1455-63.
- Vinciguerra, M.; Mordasini, D.; Vandewalle, A.; Feraille, E. (2005) Hormonal and Nonhormonal Mechanisms of Regulation of the Na,K-Pump in Collecting Duct Principal Cells. *Seminars in Nephrology*. 198, 1-10.
- Wall, S.M. (1996) NH₄⁺ augments net acid secretion by a ouabain-sensitive mechanism in isolated perfused inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol-Renal* 39F, 432-439.
- Wang, P.; Lin, C.; Hwang, H.; Lee, T. (2008) Branchial FXFD protein expression in response to salinity change and its interaction with Na⁺/K⁺-ATPase of the euryhaline teleost *Tetraodon nigroviridis*. *J. of Exp. Biol.* 211, 3750-3758.
- Wanson, S.; Pequeux, A.; Roer, R. (1984) Na⁺ regulation and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte) *Comp Biochem Physiol* 79A, 673-678.
- Ward, D.G. & Cavieres, J.D. (1998) Affinity labeling of two nucleotide sites on Na,K-ATPase using 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) 8-azidoadenosine 5'-[alpha-P-32]diphosphate (TNP-8N(3)-[alpha-P-32]ADP) as a photoactivatable probe - Label incorporation before and after blocking the high affinity ATP site with fluorescein isothiocyanate. *J Biol Chem* 273, 33759-33765.
- Watts, S.A.; Lee, K.; Cline, G.B. (1994) Elevated ornithine decarboxylase activity and polyamine levels during early development in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Exp. Zool.* 270, 426-431.
- Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Riestenpatt, S.; Siebers, D. (1998) Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol.* 168B, 364-376.
- Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Luck-Kopp, S.; Siebers, D. (1999) Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol.* 169B, 25-37.
- Weihrauch, D.; Morris, S.; Towle, D.W. (2004). Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491-4504.
- Weiner, I.D. & Hamm, L.L. (2007) Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Ann. Ver. Physiol.* 69, 317-340.
- Wheatly, M.G. & Henry, R.P. (1987) Branchial and antennal gland Na⁺/K⁺- dependent ATPase and carbonic-anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Exp. Biol.* 133, 73-86.
- Winkler, A. (1986) Effects of inorganic sea-water constituents on branchial Na,K-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Biol* 92, 537-544.
- Wu, F.; Grossenbacher, D.; Gehring, H. (2007) New transition state-based inhibitor for human ornithine decarboxylase inhibits growth of tumor cells. *Mo. Cancer Ther.* 6, 1831-1839.
- Wynn et al., 2004 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/56112340>
- Yamazaki, A.; Kaya, S.; Tsuda, T.; Araki, Y.; Hayashi, Y.; Taniguchi, K. (1994) An extra phosphorylation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by para-nitrophenylphosphate (pNPP): evidence for the oligomeric nature of the enzyme. *J Biochem (Tokyo)* 116, 1360-1369.

CURRICULUM VITAE

Daniela Pereira Garçon

(20/01/1982) Natural de Fernandópolis, SP.

1. Formação

Graduação: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Bacharel em Química, 2004.

Licenciada em Química, 2004.

Mestrado: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Mestre em Ciências- Área de concentração: Química

Título: Caracterização cinética da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae). Março, 2007

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

2. Artigos publicados em revistas de circulação internacional

- 1- Leone, F.A.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M. ; Masui, D.C. ; Rezende, L.A. ; Gonçalves, R.R. ; Garçon, D.P. (2005) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. Trends Comp. Biochem. Physiol. 11, 1-15.
- 2- Gonçalves, R.R.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Garçon, D.P.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2006) A kinetic study of the gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Vol 145/3, 346-356.
- 3- Garçon, D.P.; Masui, D.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2007) K^+ and NH_4^+ modulate gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. Comp. Biochem. Physiol. 147A, 145-155.

- 4- Garçon, D.P.; Masui, D.C.; Furriel, P.M.R.; Leone, F.A. (2008) Removal from the Membrane Affects the Interaction of Rat Osseous Plate Ecto-Nucleosidetriphosphate Diphosphohydrolase-1 with Substrates and Ions. *J. Membrane. Biol.* 224, 33-44.
- 5- Garçon, D.P.; Masui, D.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. (2009) Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 154A, 44-55.
- 6- Leone, F.A.; Masui, D.C.; Garçon, D.P.; Fontes, C.F.L.; McNamara, J.C. (2010) Avoiding Traps and Pitfalls in Enzyme Inhibition Studies: The Crustacean Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase Paradigm. *Comp. Biochem. Physiol.* (submetido).