



**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial do siri *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15‰**

**Douglas Chodi Masui**

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

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2006**



**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial do siri *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15‰**

**Douglas Chodi Masui**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone**

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

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2006**

Masui, Douglas Chodi.

Caracterização cinética da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial do siri *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15‰. Ribeirão Preto, 2006.

107 pág.

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

Orientador: Leone, Francisco de Assis.

1.  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. 2. *Callinectes danae*. 3. Aclimação a salinidade de 15‰. 4. Osmorregulação.

**Se eu pudesse...**

**Se eu pudesse deixar algum presente a você,**

**deixaria aceso o sentimento de amar  
a vida dos seres humanos.**

**A consciência de aprender tudo  
o que foi ensinado pelo tempo a fora.**

**Lembraria os erros que foram cometidos  
para que não mais se repetissem.**

**A capacidade de escolher novos rumos.**

**Deixaria para você, se pudesse,  
o respeito àquilo que é indispensável:**

**Além do pão, o trabalho.**

**Além do trabalho, a ação.**

**E, quando tudo mais faltasse,**

**um segredo:**

**O de buscar no interior de si mesmo  
a resposta e a força para**

**encontrar a saída."**

**(Mahatma Gandhi)**

**Aos meus pais, João e Sonia,**

Que desde o início desta caminhada sempre estiveram ao meu lado... apoiando e me incentivando a sempre alcançar meus ideais.

**Minha irmã, Deise,**

Mostrando sempre nós podemos vencer todos os obstáculos.

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leone, que acreditando em meu potencial, tornou possível o desenvolvimento e a realização deste trabalho, cultivando tanto o espírito crítico e científico, como também a amizade, o respeito e o crescimento pessoal, lapidados ao longo desta longa jornada.**

**A Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel-Inocentes, pela amizade construída ao longo desses anos, de presença marcante e cativante, dando sempre o apoio e o incentivo para alcançar todos os objetivos.**

**Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela oportunidade de contribuir tanto para meu desenvolvimento profissional, como também pelos laços de amizade criados desde longe.**

**Ao Prof. Dr. Fernando Luís Medina Mantelatto, e seus alunos Renata, Andrea, Ivana, Mariana e outros, pela amizade e colaboração científica na realização deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara, e seus alunos Antônio, Alessandra e outros, pela amizade e discussões científicas para realização deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Roy Edward Larson, e seus alunos, por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos essenciais para realização deste trabalho.**

**A Profa Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli e seu aluno Luciano Caseli, pela amizade confiança, permitindo-me ampliar meus conhecimentos.**

**A Luciana Rezende, pela incondicional prova de amizade e confiança, dada durante todos esses anos de caminhada.**

**Aos colegas e amigos, especialmente a Daniela P. Garçon, Sérgio, Rubia, Flávio H., Carlos, Lílían, Kelly, Adriana, Kátia Perez, Tony, Ana Maria, Carolina**

**R., Carolina F., Arthur, Roberto, Elisangela, Luis H., Renata Andrade C., e outras que, de alguma forma, sempre estiveram comigo, apoiando e incentivando para que este trabalho fosse realizado.**

**A Ivana Ap. Borin, Nilton R. Alves e a Domingos E. Pitta, tanto pela dedicação e suporte técnico, quanto pela profunda prova de amizade recebida durante esse período.**

**A Lâmia, Isabel, Emerson, 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: Departamento de Química e Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.**

**A FAPESP, pela bolsa concedida (Proc. No: 02/13063-6) e ao CNPq, que tornaram possível a realização deste trabalho.**

**E a todas as pessoas que contribuíram para minha formação e realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.**

## ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5' difosfato

ATP: adenosina 5' trifosfato

ATPase: adenosina 5' trifosfatase

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

Da: Dalton

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acidoacético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAF: 3-fosfogliceraldeído

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Hepes: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanolsulfônico

$K_M$ : 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

$P_i$ : fosfato inorgânico

PQ: piruvato quinase

PNFF: p-nitrofenilfosfato

PNFFase: p-nitrofenilfosfatase

Tris: tris-(hidroxiethyl)aminometano

U: Unidade de atividade enzimática (1 nmol de substrato hidrolisado/minuto).

v: velocidade inicial

$v_c$ : velocidade inicial corrigida

V: velocidade máxima

## RESUMO

As propriedades bioquímicas da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial do siri eurialino *Callinectes danae* aclimatado à salinidade de 15‰ foram estudadas.

A análise do gradiente de centrifugação em sacarose revelou a presença de um único pico entre 30–35% de sacarose, com uma boa correlação entre as atividades PNFFase a ATPase totais e (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. A atividade residual observada na presença de ouabaína 3 mM sugere a presença de outros sistemas de enzimas atuantes.

A eletroforese em condições desnaturantes nos microsomas de brânquias de *C. danae* em animais recém-coletados em salinidade de 33 ‰ (não aclimatados) e de aclimatados a salinidades de 15 e 33‰ por um período de 10 dias mostrou a presença de pequenas diferenças nos padrões eletroforéticos das diferentes amostras. A análise por Western blot mostrou um aumento significativo da proporção relativa da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em relação à proteína total na fração microsomal do tecido branquial de animais aclimatados à salinidade de 15‰ quando comparados aos animais aclimatados a 33‰. Entretanto, proporções similares de subunidade  $\alpha$  foram observadas para amostras de animais recém-coletados a salinidade de 33‰ e aclimatados a 15‰.

A estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase pelo ATP ocorreu através de uma curva de saturação monofásica apresentando interações sítio-sítio ( $n_H=1,2$ ), com  $V=298,8 \pm 16,7$  U/mg, com  $K_{0,5}$  de  $174,2 \pm 9,8$   $\mu$ M. A estimulação da atividade ATPase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por íons Mg<sup>2+</sup> ( $V=299,16 \pm 14,06$  U/mg;  $K_{0,5}=767,31 \pm 36,06$   $\mu$ M), íons Na<sup>+</sup> ( $V=309,0 \pm 15,8$  U/mg;  $K_{0,5}=7,8 \pm 0,4$  mM), íons K<sup>+</sup> ( $V=300,6 \pm 15,3$  U/mg;  $K_{0,5}=1,63 \pm 0,08$  mM) e íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $V=345,1 \pm 19,0$  U/mg;  $K_{0,5}=6,0 \pm 0,3$  mM) ocorreu através de interações sítio-sítio.

A atividade da enzima foi modulada sinergisticamente pelos íons K<sup>+</sup> com atividade máxima variando de  $300,6 \pm 15,3$  U/mg para  $514,6 \pm 26,2$  U/mg, na ausência e na presença 50 mM de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente. Além disso, foi observado um significativo aumento na afinidade aparente da enzima pelo íon K<sup>+</sup> da ordem de 10 vezes (diminuiu de  $1,6 \pm 0,08$  mM para  $0,157 \pm 0,008$  mM).

Similarmente ao observado para os íons K<sup>+</sup>, o íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estimulou sinergisticamente a atividade da enzima na presença de diferentes concentrações de íons K<sup>+</sup>. A estimulação da atividade da enzima pelo íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> também ocorreu através de interações cooperativas entre os sítios. Embora tenha sido observado um aumento da atividade específica da enzima de  $345,1 \pm 19,0$  U/mg para  $516,8 \pm 27,9$  U/mg, não

foram observadas variações significativas nos valores de  $n_H$  e  $K_{0,5}$  com o aumento da concentração de íons  $K^+$ .

A ouabaína inibiu cerca de 90% da atividade ATPase total. A inibição pela ouabaína apresentou valor de  $K_I$  de  $45,09 \pm 2,51 \mu M$ . O ortovanadato também inibiu atividade  $(Na^+, K^+)$ -ATPase na mesma faixa (90%) através de uma curva de inibição monofásica, com valor de  $K_I$  da ordem de  $1,31 \pm 0,06 \mu M$ . O emprego de bafilomicina  $A_1$ , tapsigargina e teofilina, juntamente com a ouabaína, na atividade ATPase total descartam a presença de V-ATPase,  $Ca^{2+}$ -ATPase ou fosfatase, respectivamente. Apesar da inibição por oligomicina corresponder a menos de 3,7%, esse valor aparentemente sugere a presença de uma  $F_0F_1$ -ATPase. Além disso, a inibição por ácido etacrínico, em conjunto com os experimentos de estimulação por da atividade ATPase da enzima por íons  $Na^+$  sugere fortemente a presença de uma  $K^+$ -ATPase.

A  $(Na^+, K^+)$ -ATPase hidrolisou o substrato PNFF obedecendo à cinética Michaeliana com velocidade de  $V = 102,9 \pm 4,3 U/mg$  e  $K_M = 1,7 \pm 0,1 mM$ . Já a estimulação da atividade  $K^+$ -fosfatase da enzima por íons  $Mg^{2+}$  ( $V = 93,7 \pm 2,3 U/mg$ ;  $K_{0,5} = 1,40 \pm 0,03 mM$ ),  $K^+$  ( $V = 94,9 \pm 3,5 U/mg$ ;  $K_{0,5} = 2,9 \pm 0,1 mM$ ) e  $NH_4^+$  ( $V = 106,2 \pm 2,2 U/mg$ ;  $K_{0,5} = 9,8 \pm 0,2 mM$ ) seguiu uma cinética cooperativa, sugerindo a presença de múltiplos sítios de ligação. Entretanto, a atividade  $K^+$ -fosfatase não foi estimulada sinergisticamente na presença de íons  $K^+$  mais  $NH_4^+$ .

Os íons sódio ( $K_I = 22,7 \pm 1,7 mM$ ) e ortovanadato ( $K_I = 28,1 \pm 1,4 nM$ ) inibiram completamente a atividade fosfatase total através de uma única curva de inibição.

## ABSTRACT

The biochemical properties of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the gill microsomal tissue of the euryhaline, marine, swimming crab *Callinectes danae*, acclimated to 15‰ salinity, were investigated.

Sucrose gradient centrifugation analyses revealed a unique peak, between 30–35% sucrose, coincident with the total PNPPase, ATPase, and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activities. The residual activity observed in the presence of 3 mM ouabain suggests the existence of other enzyme systems.

Electrophoresis under denaturing conditions, using material from fresh-caught crabs (33 ‰ salinity, not acclimated), and from crabs acclimated to 15 or 33‰ salinity, for 10 days, revealed differences in migration pattern. Western blot analyses showed a significant increase in the amount of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit relative to total protein, for crabs acclimated to 15‰ compared to those acclimated to 33‰ salinity. However, the proportion of  $\alpha$ -subunit in samples from fresh-caught crabs acclimated to 33‰ and those acclimated to 15‰ salinity was similar.

(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity was stimulated by ATP and showed a single saturation curve, exhibiting site-site interactions ( $n_H=1.2$ ), with  $V= 298.8 \pm 16.7$  U/mg, and  $K_{0.5}= 174.2 \pm 9.8$   $\mu$ M. Stimulation of the ATPase activity by Mg<sup>2+</sup> ( $V= 299.16 \pm 14.06$  U/mg;  $K_{0.5}= 767.31 \pm 36.06$   $\mu$ M), Na<sup>+</sup> ( $V= 309.0 \pm 15.8$  U/mg;  $K_{0.5}= 7.8 \pm 0.4$  mM), K<sup>+</sup> ( $V= 300.6 \pm 15.3$  U/mg;  $K_{0.5}= 1.63 \pm 0.08$  mM) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions ( $V= 345.1 \pm 19.0$  U/mg;  $K_{0.5}= 6.0 \pm 0.3$  mM) occurred through site-site interactions.

(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity was synergistically modulated by K<sup>+</sup> ions, maximum activity varying from  $300.6 \pm 15.3$  U/mg to  $514.6 \pm 26.2$  U/mg, in the absence and presence of 50 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions, respectively. K<sup>+</sup> ions induced a 10-fold increase in enzyme apparent affinity (from  $1.6 \pm 0.08$  mM to  $0.157 \pm 0.008$  mM).

As for K<sup>+</sup> ions, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> synergistically stimulated enzyme activity in the presence of variable K<sup>+</sup> concentrations. The stimulation by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions exhibited cooperative, site-site interactions. Although an increase in specific activity from  $345.1 \pm 19.0$  U/mg to  $516.8 \pm 27.9$  U/mg was seen, no significant changes in  $n_H$  and  $K_{0.5}$  were observed.

Ouabain inhibited total ATPase activity by about 90%, showing a  $K_I= 45.09 \pm 2.51$   $\mu$ M. Orthovanadate also inhibited the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase with a  $K_I$  of  $1.31 \pm 0.06$   $\mu$ M. Although the inhibitory effect of oligomycin was minimal (<3.7%), this inhibition

may suggest  $F_0F_1$ -ATPase activity. The inhibition by ethacrynic acid, in association with  $Na^+$  ion stimulation of the ATPase activity, suggests the presence of a  $K^+$ -ATPase.

The  $(Na^+,K^+)$ -ATPase hydrolyzed PNPP ( $K^+$ -phosphatase activity) obeying Michaelian kinetics, with  $V= 102.9 \pm 4.3$  U/mg and  $K_M= 1.7 \pm 0.1$  mM. The stimulation of  $K^+$ -phosphatase activity by  $Mg^{2+}$  ( $V= 93.7 \pm 2.3$  U/mg;  $K_{0.5}= 1.4 \pm 0.03$  mM),  $K^+$  ( $V= 94.9 \pm 3.5$  U/mg;  $K_{0.5}= 2.9 \pm 0.1$  mM), and  $NH_4^+$  ions ( $V= 106.2 \pm 2.2$  U/mg;  $K_{0.5}= 9.8 \pm 0.2$  mM) following cooperative kinetics, suggests multiple binding sites.  $K^+$ -phosphatase activity, however, was not synergistically stimulated by  $K^+$  and  $NH_4^+$ . Sodium ions ( $K_I= 22.7 \pm 1.7$  mM), and orthovanadate ( $K_I= 28.1 \pm 1.4$  nM) totally inhibited the total phosphatase activity.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 A (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase.	1
1.2 A osmorregulação nos crustáceos.	16
1.2.1 A (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase e a osmorregulação.	16
1.2.2 O siri <i>Callinectes danae</i> .	23
1.2.3 Contribuições do projeto em relação ao tema em estudo.	25
1.5 Objetivos.	29
1.5.1 Objetivos gerais.	29
1.5.2 Objetivos específicos.	30
<b>2.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
2.1 Coleta e aclimatação dos animais.	31
2.2 Dissecção das brânquias.	31
2.3 Preparação da fração microsomal do tecido branquial.	32
2.4 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.	32
2.5 Eletroforese em condições desnaturantes e análise por Western blot.	32
2.6 Determinação da atividade ATPase da fração microsomal.	33
2.7 Determinação da atividade <i>p</i> -nitrofenilfosfatase da fração microsomal.	34
2.8 Tratamento dos sistemas de associação PQ/LDH e FGQ/GAFDH.	35
2.9 Preparação da solução de gliceraldeído 3-fosfato.	35
2.10 Preparação da solução de ortovanadato.	35
2.11 Preparação da solução de Oligomicina.	35
2.12 Preparação da solução de Bafilomicina A <sub>1</sub> .	35
2.13 Preparação da solução de Tapsigargina.	36
2.14 Dosagem de proteína.	36
2.15 Tratamento dos dados cinéticos.	36
<b>3.0 RESULTADOS</b>	37
3.1 Estudo da fração microsomal.	37
3.2 Caracterização da atividade ATPase da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase.	42
3.3 Caracterização da atividade K <sup>+</sup> -fosfatase da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase.	60

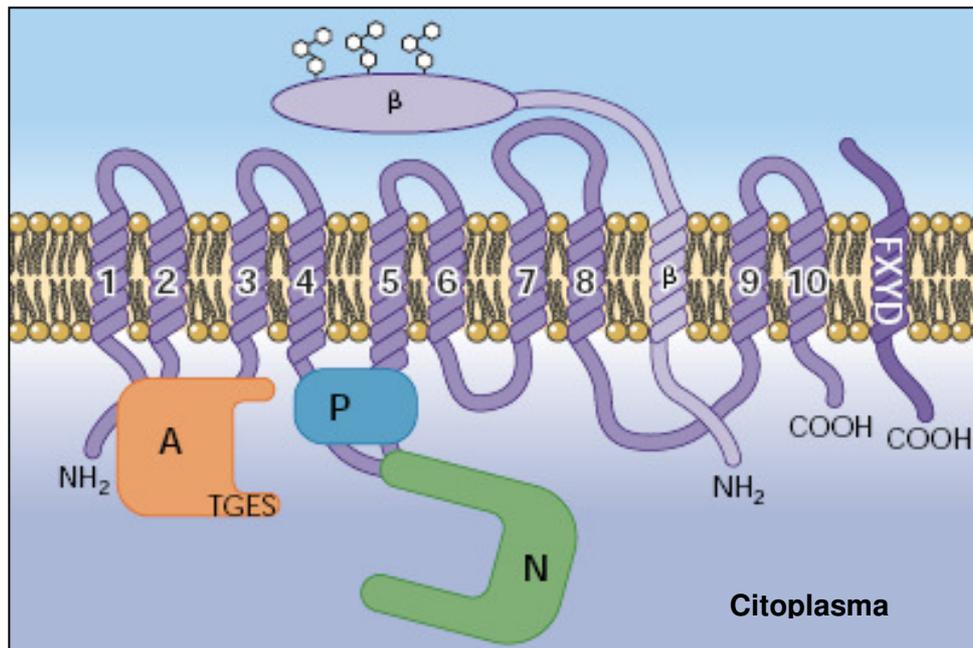
<b>4.0</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	73
4.1	Estudo da fração microsomal.	72
4.2	Caracterização da atividade ATPase da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase.	74
4.3	Caracterização da atividade K <sup>+</sup> -fosfatase da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase.	83
<b>5.0</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	86
<b>6.0</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	105

## 1.0 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (E.C.3.6.1.37) é uma enzima pertencente à família das ATPases do tipo P, transportadoras de cátions caracterizadas pela formação de um intermediário fosforilado através da transferência do fosfato  $\gamma$  da molécula do ATP para o resíduo de aspartato na molécula da enzima durante o seu ciclo catalítico (Post, 1999; Crambert et al., 2000; Geering, 2000; Kaplan et al., 2001; Glynn, 2002; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Apell, 2004; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005; Dempski et al., 2005). Ela é uma proteína integral, presente na membrana plasmática de praticamente todas as células animais e acopla a hidrólise de uma molécula de ATP ao transporte de 2 íons K<sup>+</sup> para dentro e 3 íons Na<sup>+</sup> para fora da célula, contra seus respectivos gradientes eletroquímicos. Desta forma, a concentração do íon K<sup>+</sup> no meio intracelular permanece alta enquanto a do íon Na<sup>+</sup>, baixa, o que é crucial para a atividade excitável dos músculos e do tecido nervoso, bem como para a regulação do volume celular. Além disso, o gradiente de íons Na<sup>+</sup> criado pela (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é capaz de energizar a atividade de muitos transportadores secundários, que suprem a célula de diversos nutrientes e regulam o pH e as concentrações intracelulares de outros íons (Jorgensen et al., 1998a, b, 2003; Skou, 1998; Blanco & Mercer, 1998; Blostein, 1999; Therien & Blostein, 2000; Crambert et al., 2000; Kaplan et al., 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004; Capendeguy & Horisberger, 2005; Dempski et al., 2005).

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é um heterodímero, constituída por duas subunidades, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$ , considerada a subunidade catalítica da enzima, contém cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e Mr da ordem de 110 kDa, e nela estão presentes os sítios de ligação de ATP e de fosforilação, além dos aminoácidos essenciais para a coordenação dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (Lingrel et al., 1998; Blostein, 1999; Hu & Kaplan, 2000; Blanco & Mercer, 1998; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Jorgensen, 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Su & Scheiner-Bobis, 2004; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005). Desde seu sequenciamento e clonagem, os estudos sobre a subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase sugerem a presença de 10 segmentos transmembrana (Geering, 2000; Mobasher et al., 2000; Rice et al., 2001; Donnet et al.,



**Painel 1 – Topologia de membrana proposta para as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (FXYP) da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .**

O modelo proposto mostra a presença de dez segmentos transmembrana para subunidade  $\alpha$  da enzima apresentando os domínios citoplasmáticos “A”, “N” e “P”. A sequência “TGES” localizada no domínio citoplasmático “A” da subunidade  $\alpha$  está envolvida na desfosforilação da enzima. Na subunidade  $\beta$ , estão representadas três glicosilações localizadas na porção extracelular da proteína. A subunidade  $\gamma$  está representada pela família de proteínas denominadas “FXYP”. (Modificado de Horisberger, 2004).

2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005; Capendeguy & Horisberger, 2005), onde suas extremidades N-terminal e C-terminal (**Painel 1**) estão voltadas para o citoplasma (Felsenfeld & Sweadner, 1988; Ning et al., 1993; Rice et al., 2001; Donnet et al., 2001; Sweadner & Donnet, 2001; Feraille & Doucet, 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). Grande parte da subunidade  $\alpha$  está localizada no citoplasma sob a forma de alças que dão origem a 3 domínios: o domínio “N” ou de ligação de nucleotídeos, o domínio “P” ou de fosforilação, formados pela alça citoplasmática entre os segmentos M4-M5 da subunidade  $\alpha$  que contém o sítio de ligação do ATP e de fosforilação da enzima (Blostein et al., 1998; Goldshleger & Karlish, 1999; Toyoshima et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Salgado-Comissariat et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Hebert et al., 2003; Hakansson, 2003; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005; Capendeguy & Horisberger, 2005). Um terceiro domínio, denominado “A” (ou domínio atuador), é formado pela união entre o segmento N-terminal e a alça citoplasmática entre os segmentos transmembrana M2 e M3 (**Painel 1**) (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Hebert et al., 2003; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005; Capendeguy & Horisberger, 2005). Os estudos a respeito dos domínios citoplasmáticos da subunidade  $\alpha$  da enzima se baseiam na grande similaridade estrutural com os domínios já identificados para a Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo sarcoplasmático (Toyoshima et al., 2000; Sweadner & Donnet, 2001; MacLennan & Green, 2000; Hebert et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005; Cohen et al., 2005; Dempski et al., 2005). Estes domínios citoplasmáticos estão arranjados de maneira a se conectar por uma haste estreita a um domínio transmembrana formando uma estrutura aproximadamente cilíndrica e compacta onde se localizam os sítios de ligação dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (Rice et al., 2001; Sweadner & Donnet, 2001; Hebert et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005).

A subunidade  $\beta$ , composta por cerca de 300 resíduos de aminoácidos e Mr da ordem de 50 kDa, apresenta apenas um domínio transmembrana cuja extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma (**Painel 1**). Ela é altamente glicosilada e está praticamente voltada para o meio extracelular (Bar-Shimon et al., 1998; Geering, 2000, 2001; Hasler et al., 2001; Rice et al., 2001; Hebert et al., 2001; Kaplan, 2002; Laughery et al., 2003; Horisberger, 2004; Deane & Woo, 2005; Cohen et al., 2005; Dempski et

al., 2005). A presença de três pontes dissulfeto na subunidade  $\beta$  da enzima é necessária para o direcionamento na membrana plasmática e são resistentes a redução (Lutsenko & Kaplan, 1993; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Laughery et al., 2003; Dempski et al., 2005). A redução das pontes S-S pode afetar a interação entre a subunidade  $\beta$  e a alça formada entre os segmentos M7 e M8 da subunidade  $\alpha$  da enzima, resultando em perda da atividade (Kawamura & Nagano, 1984; Kirley, 1990; Lutsenko & Kaplan, 1993; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Cohen, 2005).

A subunidade  $\gamma$  é um proteolípídeo de cerca de 60 resíduos de aminoácidos e Mr ao redor de 7 kDa que se associa à  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  de maneira tecido-específica nos vertebrados (Therien & Blostein, 2000; Arystarkhova et al., 2002a, b; Fuzesi et al., 2005). Ele faz parte de uma família de proteínas denominadas FXYD (Béguin et al., 2002; Crambert et al., 2002, 2003, 2004; Geering et al., 2003; Sweadner et al., 2003; Cornelius & Mahmmoud, 2003; Garty et al., 2003; Feschenko et al., 2003; Li et al., 2004; Horisberger, 2004; Frasen et al., 2005; Fuzesi et al., 2005; Jones et al., 2005; Zouzoulas et al., 2005), caracterizadas por apresentar apenas um único segmento transmembrana (**Painel 1**). Sua extremidade N-terminal está voltada para o meio extracelular e considera-se que essa subunidade seja uma terceira subunidade da enzima (Béguin et al., 1997; Blanco & Mercer, 1998). 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, e os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  (Therien et al., 1999; Therien & Blostein, 2000; Wetzel & Sweadner, 2001; Crambert et al., 2002, 2004; Arystarkhova et al., 2002a, b; Blostein et al., 2003; Farman et al., 2003; Geering et al., 2003; Li et al., 2004; Horisberger, 2004; Fuzesi et al., 2005; Zouzoulas et al., 2005).

O heterodímero  $\alpha\beta$  é necessário para a enzima funcionalmente ativa e, já está bem estabelecido que a subunidade  $\beta$  atua como uma chaperona específica, estabilizando o enovelamento correto da subunidade  $\alpha$ , facilitando o direcionamento do dímero para a membrana plasmática (Noguchi et al., 1990; Béguin et al., 1998, 2000; Abriel et al., 1999; Martin et al., 2000; Geering, 2000, 2001; Mobasheri et al., 2000; Hasler et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Laughery et al., 2003). Além disso, a subunidade  $\beta$  pode modular a atividade catalítica da enzima e o transporte pelos íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  (Kaplan et al., 1998; Abriel et al., 1999; Mobasheri et al., 2000; Hasler et al., 1998, 2001; Kaplan et al., 2001; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Estruturalmente, a porção extracelular da subunidade  $\beta$  em sua porção mais próxima à

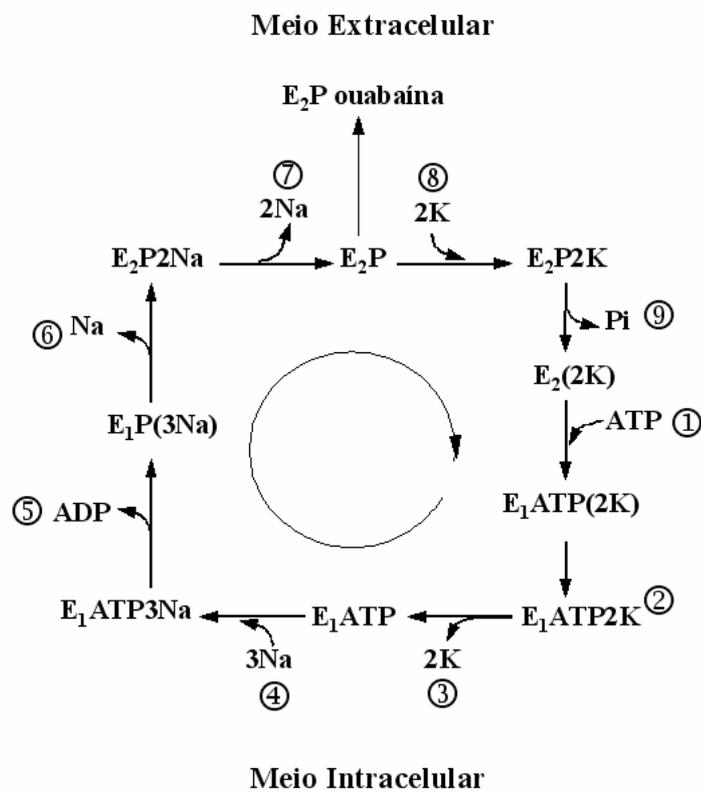
superfície da membrana interage com a alça extracelular da subunidade  $\alpha$  entre os segmentos M7 e M8, estabilizando-a (Or et al., 1998; Bar Shimon et al., 1998; Wang & Farley, 1998; Béguin et al., 2000; Rice et al., 2001; Hasler et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Laughery et al., 2003; Horisberber, 2004; Cohen et al., 2005). Além disso, a outra porção maior desta subunidade, mais próxima da extremidade C-terminal, aparentemente interage com a alça M3-M4 da subunidade  $\alpha$ , recobrando a cavidade que leva aos sítios de coordenação de cátions e modulando a interação entre estes e a molécula da enzima (Rice et al., 2001). As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  também interagem através de seus segmentos transmembrana e domínios citoplasmáticos e estas interações parecem ter relevância estrutural e funcional, embora ainda pouco compreendidas (Ivanov et al., 2000; Shainskaya et al., 2000; Hasler et al., 2000, 2001; Horisberger, 2004).

Está bem estabelecido que o protômero  $\alpha\beta$  é capaz de hidrolisar ATP e realizar transporte ativo (Ward & Cavieres, 1993; Martin & Sachs, 1999; Martin et al., 2000; Takeda & Kawamura, 2001; Donnet et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Entretanto, existem controvérsias quanto ao fato da enzima existir normalmente na membrana na forma de um protômero  $\alpha\beta$  (Martin et al., 2000; Takeda & Kawamura, 2001; Jorgensen et al., 2003), de um diprotômero  $(\alpha\beta)_2$  (Linnertz et al., 1998a; Antolovic et al., 1999; Laughery et al., 2003; Homareda & Ushimaru, 2005) ou um tetrâmero  $(\alpha\beta)_4$  (Yamazaki et al., 1994; Tsuda et al., 1998a, b; Yokoyama et al., 1999; Donnet et al., 2001; Taniguchi et al., 2001; Teramachi et al., 2002; Hayashi et al., 2003).

Quatro isoformas para a subunidade  $\alpha$  e três para a subunidade  $\beta$  para a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de vertebrados foram identificadas, sendo que cada subunidade é codificada por diferentes famílias de genes (Levenson, 1994; Blanco & Mercer, 1998; Blanco et al., 1999; Woo et al., 1999; Crambert et al., 2000; Mobasher et al., 2000; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Lingrel et al., 2003; Horisberger, 2004). Seu padrão de expressão é tecido e espécie-específicos, está sujeito à regulação hormonal e também depende do estágio de diferenciação celular (Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Mobasher et al., 2000). Cada isoforma da subunidade  $\alpha$  apresenta propriedades cinéticas distintas em relação à estimulação por Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP e à inibição por ouabaína (Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al., 2000; Mobasher et al., 2000; Lingrel et al., 2003). Homólogos diretos das isoformas da subunidade  $\alpha$  dos vertebrados ainda não foram descritos nos invertebrados

(Emery et al., 1998; Okamura et al., 2003). Embora duas isoformas da subunidade  $\alpha$  tenham sido identificadas nos camarões *Artemia salina* e *Artemia franciscana*, nenhuma delas corresponde diretamente as isoformas encontradas nos vertebrados (Cortas & Edelman, 1988; Baxter-Lowe et al., 1989; Cortas et al., 1989; Macías et al., 1991; GarciaSaez et al., 1997; Jorgensen & Pedersen, 2001). Além disso, somente uma isoforma da subunidade  $\beta$  foi relatada para a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  de crustáceos e nenhuma isoforma da subunidade  $\gamma$  foi relatada para esses animais (Lucu & Towle, 2003). Nos insetos foi relatada a existência de uma única isoforma de  $\alpha$ , similar as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  dos mamíferos (Lebovitz et al., 1989; Reeves & Yamanaka, 1993; Emery et al., 1995, 1998) e três isoformas da subunidade  $\beta$  que apresentam uma grande similaridade com as equivalentes dos vertebrados (Emery et al., 1998; Sun et al., 1998; Xu et al., 1999; Sun & Salvaterra, 1995a, b; Lucu & Towle, 2003; Okamura et al., 2003).

O mecanismo da reação de hidrólise do ATP acoplada ao transporte de íons pela  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  envolve grandes mudanças conformacionais entre duas formas da enzima (**Painel 2**): a primeira, denominada  $E_1$ , é caracterizada por apresentar uma alta afinidade por íons  $\text{Na}^+$  citoplasmáticos; enquanto a outra,  $E_2$ , é caracterizada pela alta afinidade por íons  $\text{K}^+$  extracelulares (Jorgensen et al., 1998a, 2003; Post, 1999; Vilsen, 1999; Jorgensen & Pedersen, 2001; Béauge, 2001; Kaplan., 2002; Scheiner-Bobis, 2002; Apell, 2004; Horisberger, 2004). De acordo com esse modelo, a etapa inicial do ciclo reacional consiste na ligação de uma molécula de ATP (etapa ①) à forma  $E_2(2\text{K})$ , com uma baixa afinidade aparente. Nesta conformação, os dois íons  $\text{K}^+$  estão ocluídos no interior da enzima (Nielsen et al., 1998; Jorgensen et al., 1998a, 2003; Post, 1999; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). A ligação do ATP ao seu sítio acelera a mudança conformacional  $E_2\text{ATP}(2\text{K})$  para a forma  $E_1\text{ATP}2\text{K}$  (etapa ②), em que os íons  $\text{K}^+$  estão desocluídos, ocorrendo simultaneamente a reorientação dos sítios de ligação de cátions do lado extracelular para o citoplasma. A liberação dos íons  $\text{K}^+$  (etapa ③) para o citoplasma e a sua substituição por dois íons  $\text{Na}^+$  dá origem à forma  $E_1\text{ATP}2\text{Na}$  (não mostrado). A ligação de um terceiro íon  $\text{Na}^+$  citoplasmático a enzima dá origem à forma  $E_1\text{ATP}3\text{Na}$  (etapa ④) provocando um rearranjo dos segmentos transmembrana da subunidade  $\alpha$  (Domaszewicz & Apell, 1999; Schneeberger & Apell, 1999; Kaplan, 2002) que é propagado para os domínios citoplasmáticos induzindo o posicionamento adequado do resíduo de aspartato que será fosforilado pelo ATP já ligado à enzima (Jorgensen et al., 1998; Apell et al., 1998; Schneeberger & Apell, 1999; Rice et al.,



**Painel 2 – Modelo proposto para o mecanismo da reação de hidrólise do ATP pela (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.**

Os estados (Na) e (K) indicados no modelo correspondem as formas ocluídas dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> na enzima. A seta circular no centro da figura indica a direção do mecanismo de reação (Modificado de Kaplan, 2002).

2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). A fosforilação da enzima, bem como a liberação de ADP (etapa ⑤), provoca uma transição para a forma  $E_1P(3Na)$ , na qual os íons  $Na^+$  permanecem ocluídos. A enzima sofre então uma rápida isomerização passando para a forma  $E_2P2Na$  liberando simultaneamente um íon  $Na^+$  (etapa ⑥) para o meio extracelular (Apell et al., 1998; Vilsen, 1999; Domaszewicz & Apel, 1999; Holmgren et al., 2000; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). As etapas de fosforilação e isomerização ocorrem de maneira acoplada à reorientação dos sítios de ligação de cátions do meio citoplasmático para o meio extracelular. A desocclusão dos dois íons  $Na^+$  (etapa ⑦) restantes provoca a passagem para a forma  $E_2P$  e a liberação dos íons para fora da célula. Finalmente, a ligação de dois íons  $K^+$  (etapa ⑧) extracelulares à forma  $E_2P$  catalisa a desfosforilação da enzima (etapa ⑨), que volta à forma  $E_2(K)$ , reiniciando assim o ciclo catalítico.

Os resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o ATP ou desempenham um papel importante para sua ligação à  $(Na^+,K^+)$ -ATPase estão localizados na alça citoplasmática entre os segmentos M4-M5 da subunidade  $\alpha$  da enzima (Jorgensen et al., 1998a, 2003; Scheiner-Bobis & Schreiber, 1999; Ettrich et al., 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001; Rice et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Jacobsen et al., 2002; Hofbauerova et al., 2002; Kaplan, 2002; Costa et al., 2003; Kubala et al., 2002, 2004). Além do resíduo de aspartato que sofre a fosforilação durante o ciclo catalítico, um resíduo de arginina também parece ser essencial para a ligação do ATP à enzima (Ettrich et al., 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001; Jacobsen et al., 2002; Kubala et al., 2002, 2003; Jorgensen et al., 2003; Hilge et al., 2003). Resíduos de lisina, fenilalanina, glicina, serina, aspartato, cisteína e glutamato localizados na mesma região da molécula parecem contribuir para essa ligação (Tsuda et al., 1998a; Linnertz et al., 1998, 1999; Gatto et al., 1999; Scheiner-Bobis & Schreiber, 1999; Ettrich et al., 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan, 2002; Kubala et al., 2003; Hofbauerova et al., 2003; Jorgensen et al., 2003; Lansky et al., 2004; Su & Scheiner-Bobis, 2004). Entretanto, as características das estruturas secundária e terciária envolvidas na coordenação de nucleotídeos permanecem ainda a ser esclarecidas (Linnertz et al., 1999; Tran & Farley, 1999; Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Costa et al., 2003).

Nos segmentos transmembrana M4, M5 e M6 da subunidade  $\alpha$  da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase estão localizados os sítios de ligação dos cátions (Lingrel et al., 1998; Vilsen & Andersen, 1998; Vilsen, 1999; Shainskaya et al., 2000; Feraille & Doucet, 2001; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan et al., 2001; Guennoun & Horisberger, 2000,

2002; Kaplan, 2002; Mikhailova et al., 2002; Ogawa & Toyoshima, 2002; Jorgensen et al., 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Horisberger, 2004). Acredita-se que estes segmentos transmembrana compõem um domínio móvel e flexível que fica sujeito às mudanças conformacionais associadas ao transporte dos cátions através da membrana (Lutsenko et al., 1995; Geering, 2000; Kaplan et al., 2001; Mikhailova et al., 2002; Ogawa & Toyoshima, 2002; Li et al., 2005; Gatto et al., 2005). Existem controvérsias a respeito dos resíduos de aminoácidos que estariam diretamente envolvidos na coordenação de cátions, mas um número crescente de evidências sugere que dois resíduos de aspartato, localizados na região mediana de M6, e dois resíduos de glutamato, um em M4 e outro em M5, bem como um resíduo de glutamina em M8, são essenciais para a ligação de dois íons K<sup>+</sup> e dois íons Na<sup>+</sup> (Lingrel et al., 1998; Jorgensen et al., 1998a, b, 2003; Nielsen et al., 1998; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan et al., 2001; Arguello et al., 1999a, b; Koenderink et al., 2000, 2003; Ogawa & Toyoshima, 2002; Kaplan, 2002; Jorgensen, 2003). Aparentemente, a enzima não apresenta sítios separados com especificidades diferentes para a ligação destes dois íons ligados à enzima, embora alguns autores destaquem que resíduos de asparagina, glutamato, aspartato, serina, tirosina e treonina localizados principalmente em M4 e M5, o resíduo de leucina localizado na alça entre os segmentos M3 e M4 e o resíduo de treonina localizado em M8 parecem estar envolvidos na seletividade entre os cátions nas conformações E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> da enzima (Lingrel et al., 1998; Jorgensen et al., 1998a, b; Pedersen et al., 1998; Vilsen, 1999; Arguello et al., 1999a; Mense et al., 2000, 2002; Jorgensen & Pedersen, 2001; Ogawa & Toyoshima, 2002; Jorgensen, 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Eguchi et al., 2005). Em relação ao terceiro íon Na<sup>+</sup> transportado por molécula de ATP hidrolisada, há evidências de que ele interage com a forma E<sub>1</sub>ATP<sub>2</sub>(Na) em um sítio diferente, exclusivamente seletivo e que contém apenas grupos não carregados (Apell et al., 1998; Schneeberger & Apell, 2001; Jorgensen et al., 2003; Hakansson & Jorgensen, 2003). Estudos recentes têm proposto que um resíduo de glutamato localizado em M9, outro de tirosina localizado em M5, resíduos de glicina e de treonina em M6 e um resíduo de valina localizado em M8 seriam cruciais na ligação e estabilização do terceiro íon Na<sup>+</sup> na enzima (Ogawa & Toyoshima, 2002; Horisberger, 2004; Imagawa et al., 2005; Li et al., 2005).

A oclusão dos cátions na (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é um passo importante para a eficiência do transporte iônico, garantindo o transporte de 3 íons Na<sup>+</sup> e 2 íons K<sup>+</sup> através da membrana para cada molécula de ATP hidrolisada (Scheiner-Bobis, 1998; Vilsen &

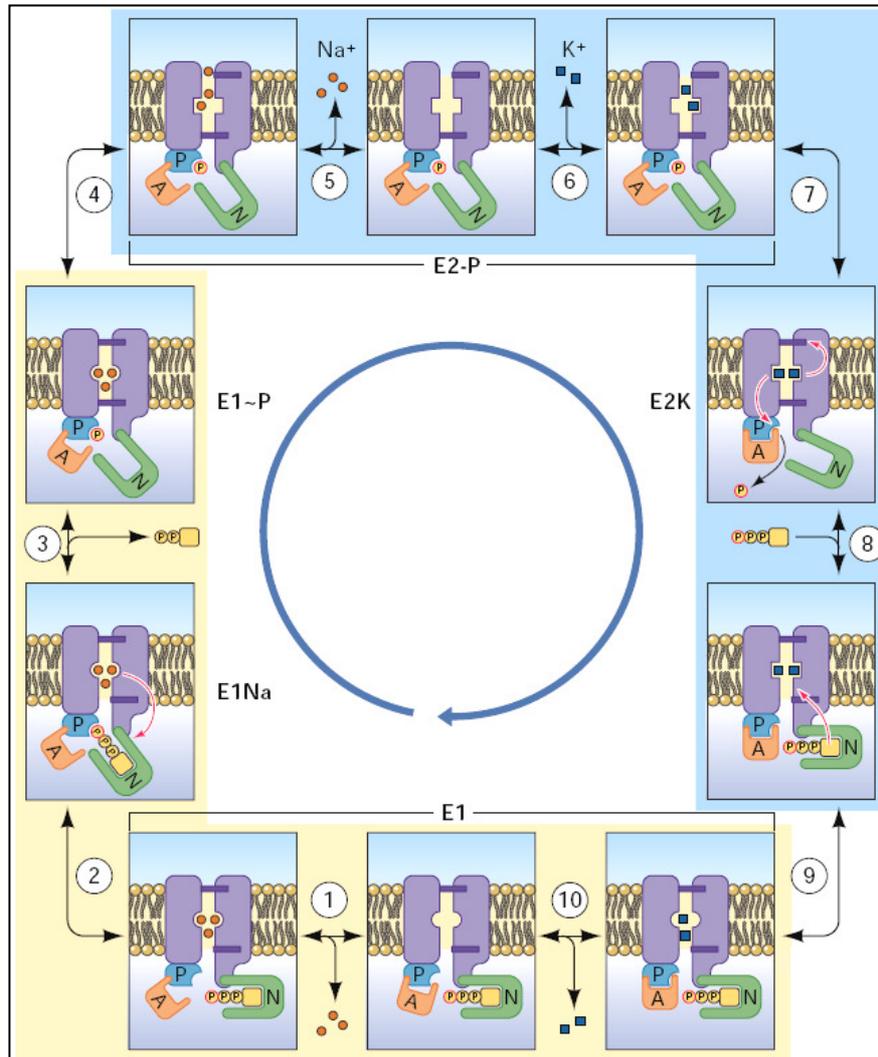
Andersen, 1998; Apell et al., 1998; Post, 1999; Schneeberger & Apell, 1999, 2001; Kaplan, 2002; Ogawa & Toyoshima, 2002; Jorgensen et al., 2003; Apell, 2003; Horisberger, 2004; Li et al., 2005) seguido de reconhecimento do íon acompanhado de uma mudança conformacional para o estado ocluído (Jorgensen et al., 1998; Post, 1999; Schneeberger & Apell, 1999; Shainskaya et al., 2000; Holmgren et al., 2000; Horisberger, 2004). Somente após a oclusão dos dois primeiros íons  $\text{Na}^+$ , o sítio de ligação do terceiro íon  $\text{Na}^+$  torna-se acessível (Schneeberger & Apell, 2001; Ogawa & Toyoshima, 2002; Apell, 2003), o que representa um ponto chave no processo de oclusão e transporte dos íons eficientes, garantindo o transporte de 3 íons  $\text{Na}^+$  e 2 íons  $\text{K}^+$  através da membrana para cada molécula de ATP hidrolisada (Scheiner-Bobis, 1998; Vilsen & Andersen, 1998; Apell et al., 1998; Post, 1999; Schneeberger & Apell, 1999, 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). A estrutura e localização dos sítios de reconhecimento de íons bem como a natureza das transições conformacionais envolvidas na sua oclusão/desocclusão permanecem a serem esclarecidas (Jorgensen et al., 1998a; Post, 1999; Schneeberger & Apell, 1999, 2004; Shainskaya et al., 2000; Holmgren et al., 2000; Apell, 2004; Horisberger, 2004; Li et al., 2005; Gatto et al., 2005; Imagawa et al., 2005).

As estruturas secundária e terciária dos domínios da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  ainda permanecem a serem esclarecidas (Donnet et al., 2001; Sweadner & Donnet, 2001; Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Entretanto, estudos da estrutura tridimensional dos domínios citoplasmáticos da subunidade  $\alpha$  da  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  de retículo sarcoplasmático nas conformações  $E_1$  e  $E_2$  (Toyoshima et al., 2000, 2003; MacLennan & Green, 2000; Toyoshima & Nomura, 2002; Ogawa & Toyoshima, 2002) mostraram uma grande similaridade com a subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (Rice et al., 2001; Sweadner & Donnet, 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Hakansson, 2003; Hebert et al., 2003; Karlsh, 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Apell, 2004; Horisberger, 2004). Apesar da estrutura tridimensional da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  ainda não estar estabelecida com alta resolução (Rice et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002), os dados comparativos obtidos entre essas enzimas sugerem uma semelhança entre suas mudanças de conformação, sugerindo um mecanismo comum para todas as ATPases do tipo P (MacLennan & Green, 2000; Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Karlsh, 2003; Apell, 2004; Horisberger, 2004).

O mecanismo pelo qual a hidrólise do ATP é acoplada ao transporte de íons está intimamente associado às modificações conformacionais que ocorrem na transição entre

as formas E1 e E2 da enzima (Post, 1999; Goldshleger & Karlsh, 1999; Patchornik et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003; Horisberger, 2004). A ligação do ATP ao seu sítio bem como a fosforilação/desfosforilação da cadeia  $\alpha$  desencadeiam modificações conformacionais que são transmitidas aos sítios de ligação/oclusão de cátions no interior da membrana (Goldshleger & Karlsh, 1999; Pedersen et al., 2000; Rice et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Toustrup & Vilsen 2005). Da mesma maneira, a ligação dos íons aos seus sítios provoca modificações conformacionais que são transmitidas ao sítio de ligação de ATP (Apell et al., 1998; Kaplan et al., 1998; Goldshleger & Karlsh, 1999; Rice et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Assim, a transmissão destas mudanças conformacionais à distância permite que a energia química liberada pela hidrólise do ATP seja usada para alterar a orientação e a especificidade dos sítios para Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, propiciando o transporte dos íons através da membrana (Jorgensen et al., 1998a, 2003; Post, 1999; Gatto et al., 1999; Schneeberger & Apell, 1999; Pedersen et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan et al., 2001; Kaplan, 2002; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003; Horisberger, 2004). Contudo, o exato mecanismo de acoplamento ainda não está bem estabelecido (Jorgensen et al., 2003; Mandal et al., 2003; Horisberger, 2004).

Em relação à movimentação dos domínios citoplasmáticos, na conformação E<sub>2</sub>, eles estão aparentemente organizados de forma compacta (Rice et al., 2001, Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Karlsh, 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003). A ligação do ATP à forma E<sub>2</sub>2K provoca movimentos de rotação e inclinação dos domínios “N”, “P” e “A”, que induzem o afastamento do domínio citoplasmático “A” em relação aos outros domínios. De acordo com o modelo proposto por Horisberger (2004), a enzima na forma E<sub>1</sub>ATP (**Painel 3**) apresenta os domínios citoplasmáticos “A”, “N” e “P” afastados entre si (etapa ①). Os domínios “N” e “P” se rearranjam de forma a interagir fortemente entre si e estabilizam a conformação E<sub>1</sub>ATP (Kaplan, 2002; Patchornik et al., 2002; Jorgensen et al., 2003; Pedersen et al., 2000; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003). Simultaneamente ao afastamento do domínio “A”, ocorre uma reorientação dos sítios de ligação de cátions do meio extracelular para o meio intracelular, com a desocclusão dos íons K<sup>+</sup> para o citoplasma e ligação de dois íons Na<sup>+</sup> (Goldshleger & Karlsh, 1999; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003; Horisberger, 2004). A ligação do terceiro íon Na<sup>+</sup> à forma E<sub>1</sub> provoca mudanças conformacionais onde o domínio “N” sofre rotação em relação ao domínio “P” posicionando o resíduo de aspartato e o fosfato  $\gamma$  do ATP (etapa ①), favorecendo a



### Painel 3 – Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .

A seta circular no centro mostra a direção do ciclo fisiológico dirigido por uma alta razão ATP/ADP, mas todas as etapas são reversíveis e sob condições apropriadas o ciclo pode caminhar na direção reversa. O estado  $\text{E}_1\text{Na}$  corresponde ao estado da SERCA cristalizada. (Modificado de Horisberger, 2004).

fosforilação da conformação E<sub>1</sub>, induzindo posteriormente a mudança de conformação para E<sub>2</sub> (Apell et al., 1998; Schneeberger & Apell, 1999; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Ogawa & Toyoshima, 2002; Horisberger, 2004). A fosforilação do resíduo de aspartato na molécula da enzima, através da hidrólise do ATP, dá origem a forma E<sub>1</sub>P(3Na) (etapa ③). O domínio “A” sofre simultaneamente um movimento de rotação de 30°, propagando uma mudança conformacional para a interface transmembrana da enzima resultando no fechamento do canal e oclusão dos íons Na<sup>+</sup> ligados à enzima (Toyoshima & Mizutani, 2004; Sorensen et al., 2004), durante a etapa ③. Durante o ciclo catalítico, este estado de alta energia E<sub>1</sub>P(3Na) é rapidamente convertido na forma E<sub>2</sub>P(2Na) (etapa ④). Na mudança dos estados E<sub>1</sub> para E<sub>2</sub> ocorre a abertura dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular e a redistribuição dos grupos importantes diminuindo a afinidade pelo Na<sup>+</sup>. Além disso, após a liberação do primeiro Na<sup>+</sup> para o meio extracelular ocorre o rearranjo do canal levando à liberação dos dois íons Na<sup>+</sup> restantes (etapa ⑤) (Mikhailova et al., 2002; Patchornik et al., 2000, 2002; Jorgensen et al., 2003; Goldshleger & Karlsh, 1999; Kaplan, 2002; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003; Horisberger, 2004). Dessa forma, dois íons K<sup>+</sup> podem ocupar o sítio de ligação de cátions da forma E<sub>2</sub>P (etapa ⑥), catalisando a desfosforilação do domínio “P” e a oclusão dos íons K<sup>+</sup>, que rearranja a molécula da enzima fechando o canal de acesso para o meio extracelular (etapa ⑦) (Goldshleger & Karlsh, 1999; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003; Horisberger, 2004). A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio “N” (etapa ⑧) promove o afastamento dos domínios “N” e “P”, induzindo a movimentação dos segmentos transmembrana da molécula. Esse movimento resulta em abertura do canal de acesso aos sítios de ligação de cátions para o meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, que se traduz numa diminuição da afinidade da enzima por íons K<sup>+</sup>, caracteriza a transição conformacional da forma E<sub>2</sub>ATP(2K) para a forma E<sub>1</sub>ATP2K (etapa ⑨). Finalmente, ocorre a liberação dos íons K<sup>+</sup> para o citosol (etapa ⑩), finalizando o ciclo (Horisberger, 2004). Entretanto, ainda existem detalhes acerca deste mecanismo que permanece a ser esclarecido (Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan et al., 2001; Hebert et al., 2001; Apell, 2003; Horisberger, 2004; Li et al., 2005; Gatto et al., 2005).

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é especificamente inibida por esteróides cardiotônicos, dos quais a ouabaína é o mais representativo (Emery et al., 1998; Kasturi et al., 1998; Koenderink et al., 2000b; Crambert et al., 2004; Paula et al., 2005). Já está bem

estabelecido que ela interage com a porção extracelular da enzima ligando-se com maior afinidade à forma  $E_2P$  (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Croyle et al., 1997; Lingrel et al., 1998; Middleton et al. 2000; Farr et al., 2002; Crambert et al., 2004; Keenan et al., 2005). Vários resíduos de aminoácidos, localizados nas alças extracelulares da cadeia  $\alpha$  bem como nos segmentos transmembrana são importantes para a interação enzima-ouabaína (Feng & Lingrel, 1994; Askew & Lingrel, 1994; Palasis et al., 1996; Croyle et al., 1997; Keenan et al., 2005). Aparentemente, a cadeia  $\beta$  também está envolvida na interação da enzima com a ouabaína (Hasler et al., 1998). Entretanto, o sítio de ligação da ouabaína ainda não é conhecido (Kasturi et al., 1998; Coppi et al., 1999; Koenderink et al., 2000b; Middleton et al., 2000; Kaplan, 2002; Paula et al., 2005). Como característica compartilhada por todas as ATPases do tipo P, a  $(Na^+,K^+)$ -ATPase também é fortemente inibida por vanadato, que mimetiza o estado de transição para a fosforilação/desfosforilação da enzima na forma  $E_2$  e  $E_2(K)$ , formando uma ligação estável entre o inibidor e a molécula da enzima bloqueando dessa forma seu ciclo catalítico (Cantley et al., 1978; McGregor & Walker, 1993; Dafnis & Sabatini, 1994; Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998; Rice et al., 2001; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2003, 2005).

A  $(Na^+,K^+)$ -ATPase dos vertebrados está sujeita a uma complexa regulação, capaz de conferir às células a habilidade de coordenar precisamente a atividade da enzima com as suas necessidades fisiológicas num determinado instante (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 1999; Pedemonte & Bertorello, 2001; Cornelius & Mahmmoud, 2003). Entretanto, os mecanismos pelos quais esta regulação ocorre ainda não estão bem estabelecidos (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 2000; Mobasheri et al., 2000; Cornelius, 2001). A expressão de diferentes isoformas com características cinéticas intrínsecas distintas e em abundâncias relativas apropriadas é capaz de suprir parcialmente a necessidade de comportamentos específicos da enzima em diferentes tecidos e células (Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al., 2000, 2001; Mobasheri et al., 2000; Lingrel et al., 2003). Por outro lado, os fatores que modulam mais diretamente a atividade da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase são as concentrações intra e extracelulares de ATP,  $Na^+$  e  $K^+$  (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 1999, 2000; Efendiev et al., 2002; Kaplan, 2002). Embora ainda não estejam bem estabelecidos, outros fatores tecido-específicos, como diferenças no microambiente constituído pela membrana, parecem também modular a afinidade relativa da enzima por  $K^+$  e  $Na^+$ , embora de maneira pouco compreendida

(Else & Wu, 1999; Therien & Blostein, 1999; Cornelius, 2001; Wu et al., 2001; Else et al., 2003).

Nos vertebrados, a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase está sujeita a mecanismos de regulação de curto e longo prazo mediados por hormônios, tais como aldosterona, dopamina, norepinefrina e insulina (Sweeney & Klip, 1998; Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 2000; Mobasheri et al., 2000; Dunbar & Caplan, 2001; Vasilets, 2002; Summa et al., 2001; Teixeira et al., 2003; Feraille et al., 2003). 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; Budu et al., 2002; Cornelius & Mahmmoud, 2003; Feraille et al., 2003). As cascatas de sinalização envolvidas na regulação hormonal são variadas, complexas e as alterações da atividade da enzima resultam muitas vezes de modificações postraducionais, tais como a fosforilação/desfosforilação da subunidade  $\alpha$ , o que envolve a ação de diferentes proteínas quinases e proteínas fosfatases (Therien & Blostein, 2000; Sweadner & Feschenko, 2001; Kazanietz et al., 2001; Dunbar & Caplan, 2001; Lopina, 2001; Vasilets, 2002; Cornelius & Mahmmoud, 2003; Duran et al., 2004; Wang & Yu, 2005). Além disso, a regulação hormonal ocorre através de mecanismos isoforma específicos (Blanco & Mercer, 1998; Pfeiffer et al., 1999; Therien & Blostein, 2000; Mobasheri et al., 2000). Resta mencionar que a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase também pode ser modulada por alguns inibidores endógenos homólogos da ouabaína (Doris & Bagrov, 1998; Kramer et al., 1998; Therien & Blostein, 2000; Lichtstein & Rosen, 2001; Schoner, 2002; Hansen, 2003; Keenan et al., 2005).

Nos invertebrados, os mecanismos osmorregulatórios e de neurosecreção estão associados na modulação da regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos crustáceos com a participação do sistema neuroendócrino como órgão X da glândula do sino, o cérebro e o gânglio torácico, atuando na manutenção osmo-iônica (Mantel & Farmer, 1983; Sommer & Mantel, 1988; Kamemoto, 1991; Morris & Edwards, 1995; Mo et al., 1998; Dirksen et al., 2001; Lucu & Towle, 2003). Fatores do gânglio torácico, cAMP, monoaminas, dopamina, octopamina, bem como ação de proteína quinase, regulam a concentração de sais na hemolinfa dos crustáceos afetando a osmorregulação, ainda de maneira pouco compreendida no âmbito da identificação dos fatores reguladores e seu

modo de ação na  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , bem como outros transportadores atuantes no processo osmorregulatório (Bianchini & Gilles, 1990; Kamemoto, 1991; Sommer & Mantel, 1988, 1991; Riestenpatt et al., 1994; Eckhardt et al., 1995; Lucu & Flik, 1999; Spanings-Pierrot et al., 2000; Dirksen et al., 2001; Towle et al., 2001; Lucu & Towle, 2003).

## **1.2 – A osmorregulação nos crustáceos.**

### **1.2.1 – A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a osmorregulação.**

A  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  presente no tecido branquial dos crustáceos desempenha um papel fundamental para a regulação osmótica nesses animais, formando uma interface seletiva entre o meio ambiente externo e o meio interno (Péqueux, 1995; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003; Martinez et al., 2005). O processo de osmorregulação nos crustáceos aquáticos, intimamente ligado às respostas à salinidade do meio ambiente, envolve vários sistemas de controle que regulam o teor de água e de osmólitos intra e extracelulares (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003).

A colonização de ambientes de salinidade variável, tais como estuários e regiões sujeitas à ação das marés, representa um desafio particular; implicando no desenvolvimento de características fisiológicas muito adaptadas. Uma característica particularmente essencial desses animais é a capacidade de manter a concentração osmótica dos fluidos extracelulares relativamente constantes, independentemente da salinidade do meio externo. Com isso, o animal preserva os tecidos internos da exposição a mudanças drásticas e bruscas de salinidade, que poderiam inviabilizar os seus processos celulares vitais (Péqueux, 1995; Mo & Greenaway, 2001; Castilho et al., 2001).

Fundamentalmente, a regulação osmótica (ou osmorregulação) compreende o conjunto das estratégias desenvolvidas pelas diversas espécies animais para controlar o teor de água e osmólitos (orgânicos e inorgânicos) a nível intra e extracelular. Nos animais aquáticos, inclui um conjunto de respostas à salinidade do meio externo, variável ou não (Péqueux, 1995). A maioria das espécies aquáticas de crustáceos habita o ambiente marinho e, grande parte delas são osmoconformadoras (não apresentam nenhum mecanismo de osmorregulação dos fluidos extracelulares). Esses animais mantêm a osmolalidade de sua hemolinfa praticamente igual à da água do mar, diminuindo a difusão de íons e água aos quais são altamente permeáveis (Péqueux,

1995; Lucu et al., 2000). A nível celular, apresentam reduzida capacidade de adaptação a mudanças na composição dos fluidos extracelulares, o que resulta em baixa tolerância a alterações de salinidade do meio externo resultando em sensível redução de sua sobrevivência em ambientes diluídos ou de salinidade variável (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004; Tsoi et al., 2005).

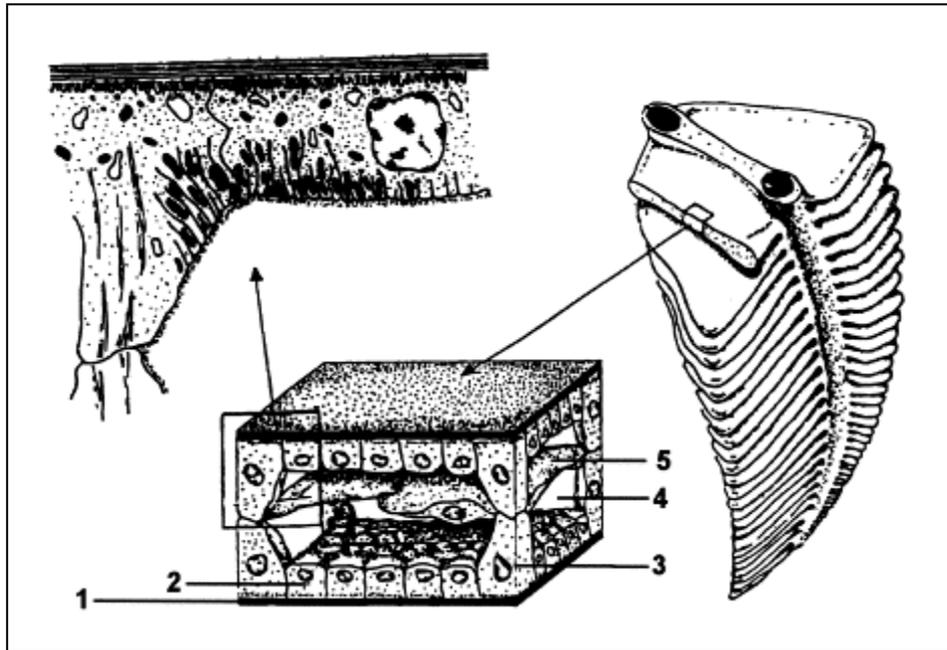
Entretanto, ao longo da evolução, diversos grupos de crustáceos têm invadido ambientes de salinidades inferiores à da água do mar (estuários, águas salobras, rios e lagos) e o sucesso do seu estabelecimento nesses ambientes está condicionado ao desenvolvimento de mecanismos fisiológicos eficientes, que permitem manter o volume celular e a concentração iônica e osmótica dos fluidos intra e extracelular em níveis compatíveis com as funções vitais desses animais (Péqueux, 1995; McLusky & Elliott, 2004).

As espécies de crustáceos habitantes de águas salobras e estuarinas possuem uma grande capacidade osmorregulatória, são eurialinas (toleram a exposição a salinidades variáveis) e hiperosmorreguladoras, pois mantém a concentração osmótica da hemolinfa maior que a do meio circundante diluído, às custas de energia (Moreira et al., 1983; Péqueux, 1995; Rathmayer & Siebers, 2001; Guerin & Stickle, 1997; Lovett et al., 2001; Henry et al., 2002; Genovese et al., 2004). O desafio evolutivo dos crustáceos que habitam os ambientes de salinidade variável, como os estuários, foi o desenvolvimento de mecanismos fisiológicos muito adaptados para sobrevivência neste habitat (Péqueux, 1995; Mo & Greenaway, 2001; Onken & McNamara, 2002; Lucu & Towle, 2003). Uma das estratégias mais relevantes é a capacidade de manter a concentração osmótica dos fluidos extracelulares relativamente constantes, independentemente da salinidade do meio externo e dessa maneira preservar os tecidos internos da exposição a mudanças drásticas e bruscas de salinidade que poderiam inviabilizar os seus processos celulares vitais (Péqueux, 1995; Mo & Greenaway, 2001; Castilho et al., 2001; Lucu & Towle, 2003).

Por serem hiperosmóticos em relação ao meio externo, os crustáceos que invadem habitats diluídos tendem a sofrer hidratação e perda de íons por difusão. Em função disso, uma capacidade osmorregulatória eficiente representa para estes animais, um mecanismo fisiológico fundamental, preservando seus fluidos intra e extracelulares hiperosmóticos em relação ao meio externo (Péqueux, 1995; Mo & Greenaway, 2001; Onken & McNamara, 2002; Weihrauch et al., 2004b). Ao longo do processo evolutivo, os crustáceos melhor adaptados ao ambiente de água doce diminuiram o custo

energético envolvido na hiperregulação osmótica reduzindo o gradiente osmótico hemolinfa/meio externo bem como a permeabilidade da superfície corporal à água e/ou íons (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Weihrauch et al., 2004b). Paralelamente, certas espécies de camarões e lagostins desenvolveram sistemas de excreção capazes de compensar o ganho de água através da eliminação de grandes volumes de urina hiposmótica, reduzindo assim a perda de sais envolvida no controle do volume celular (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998; Lucu et al., 2000; Onken & McNamara, 2002; Lucu & Towle, 2003; Thurman, 2003; Weihrauch et al., 2004b). Do ponto de vista adaptativo-evolutivo estas características parecem ser extremamente importantes na conquista do ambiente de água doce por certas espécies de crustáceos. De modo geral, em ambientes de menor salinidade, a concentração iônica e a osmolalidade da hemolinfa dos crustáceos refletem um equilíbrio dinâmico entre a perda de sais por difusão e pela urina e a sua absorção do meio externo. A perda de eletrólitos é compensada pela captura de íons por um epitélio transportador presente nas brânquias (Péqueux, 1995; Towle, 1997; Lima et al., 1997; Onken & Riestenpatt, 1998, 2002; Rathmayer & Siebers, 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Mo & Greenaway, 2001; Lovett et al., 2001; Henry et al., 2002).

A micro-anatomia e a ultraestrutura das brânquias de várias espécies de caranguejos braquiúros já são bem conhecidas (**Painel 4**) e, embora existam detalhes que variam de uma espécie para outra, essencialmente consistem de estruturas multilamelares onde cada lamela forma um envelope cuticular banhado externamente pela água do ambiente e com o seu interior preenchido pela hemolinfa, que flui através de uma câmara formada por células epiteliais uniestratificadas que, dependendo da espécie, apresenta um septo intralamelar completo ou parcial (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Mantel & Farmer, 1983; Barra et al., 1983; Towle & Kays, 1986; Goodman & Cavey, 1990; Maina, 1990; Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). As superfícies apicais das células epiteliais estão voltadas para o meio externo e são amplificadas por microvilos, enquanto as membranas basolaterais, altamente invaginadas, associadas a numerosas mitocôndrias e onde está localizada a  $(Na^+,K^+)$ -ATPase, são banhadas pela hemolinfa (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Towle & Kays, 1986; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). Estas invaginações de membrana associadas a mitocôndrias, denominadas "bombas mitocondriais", são características de epitélios transportadores de íons (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Cioffi, 1984; Towle, 1984; McConnell, 1987; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998).



**Painel 4 – Representação esquemática geral da morfologia das brânquias dos caranguejos.**

Estão representados na figura: 1. Cutícula; 2. Célula principal; 3. Célula pilastra; 4. Espaço da hemolinfa. 5. Septo intralamelar. A figura é baseada em estudos de microscopia em *Uca sp.* (Modificado de Onken & Riestenpatt, 1998).

A maior contribuição para a osmolalidade da hemolinfa dos crustáceos provém do cloreto de sódio. Desse modo, a regulação dos fluxos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  é fundamental para a capacidade osmorregulatória desses animais (Towle, 1997; Péqueux, 1995; Castilho et al., 2001; Henry et al., 2002; Kirschner, 2004). O processo de captura ativa de íons  $\text{Na}^+$  que ocorre nas brânquias dos crustáceos hiperreguladores em meios diluídos tem sido intensamente estudado, particularmente nos caranguejos e lagostins (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998, 2002;; Zare & Greenaway, 1998; Castilho et al., 2001; Wilder et al., 2000; Towle & Weihrauch, 2001; Towle et al., 2001; Schleich et al., 2001; Mo & Greenaway, 2001; Luquet et al., 2002a, b; Henry et al., 2002; Onken et al., 2003; Lucu & Towle, 2003; Weihrauch et al., 2004b). Aparentemente, este processo envolve a participação coordenada de vários sistemas transportadores, distribuídos assimetricamente na membrana das células do epitélio branquial, voltados para o meio externo ou para a hemolinfa (Péqueux, 1995; Zare & Greenaway, 1998; Onken & Riestenpatt, 1998; Ahearn et al., 1999; Towle & Weihrauch, 2001; Henry et al., 2002; Grosell et al., 2002; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004). Já está bem estabelecido que a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , presente no tecido branquial da maioria das espécies de crustáceos, desempenha um papel central nesse mecanismo de captura iônica, transportando os íons sódio das células do epitélio branquial para a hemolinfa, diminuindo localmente a sua concentração. Nesse sentido, existe uma estreita relação entre a atividade específica da enzima e a magnitude do transporte ativo transepitelial de sódio (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998; Ahearn et al., 1999; Towle & Weihrauch, 2001; Schleich et al., 2001; Mo & Greenaway, 2001). O mecanismo pelo qual os íons sódio são retirados do meio ambiente através da membrana apical das células do epitélio branquial dos crustáceos hiperreguladores permanece a ser esclarecido. Entretanto, uma das forças que dirigem a passagem destes íons para o interior das células é, inequivocamente, o seu transporte ativo subsequente para a hemolinfa pela  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998; Ahearn et al., 1999; Furriel et al., 2000; Towle & Weihrauch, 2001; Luquet et al., 2002b; Henry et al., 2002; Grosell et al., 2002; Lucu & Towle, 2003; Tresguerres et al., 2003; Kirschner, 2004; Lignot et al., 2005). Existem evidências da participação de diversos transportadores apicais neste processo, como trocadores dos tipos  $2\text{Na}^+/\text{H}^+$  (ou  $2\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ ) e  $\text{Na}^+, \text{K}^+/2\text{Cl}^-$ , um canal de  $\text{Na}^+$  e uma V-ATPase (Péqueux, 1995; Ahearn et al., 1999; Zare & Greenaway, 1998; Onken & Riestenpatt, 1998; Weihrauch et al., 2001, 2004b; Towle & Weihrauch, 2001; Onken et al., 2003; Kirschner, 2004).

Aparentemente, a afinidade pelos íons sódio é o parâmetro cinético mais variável entre as (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPases de tecido branquial de diferentes espécies de crustáceos hiperreguladores e está diretamente relacionada ao grau de adaptação do animal à salinidade do meio que habita.

Assim, afinidades maiores para os íons Na<sup>+</sup> têm sido relatadas para as enzimas de animais bem adaptados à água doce enquanto para animais que habitam os estuários ou águas salobras tem sido relatada uma afinidade menor (Harris & Bayliss, 1988; Furriel et al., 2000; Castilho et al., 2001; Lucu & Towle, 2003). Entretanto, os valores das afinidades por íons K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e pelo ATP variam pouco entre as espécies estudadas e não parecem apresentar nenhuma correlação com a salinidade do habitat do animal (Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002; Lucu & Towle, 2003). Além disso, a afinidade da enzima pela ouabaína nos crustáceos é menor em relação aos vertebrados (Lucu & Towle, 2003; Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002). Por outro lado, já está bem estabelecido que a resposta osmorregulatória dos crustáceos é modulada, a curto e longo prazo, por fatores neuroendócrinos (McNamara et al., 1990, 1991; Freire & McNamara, 1992; Péqueux, 1995; Santos & McNamara, 1996; Spanings-Pierrot et al., 2000; Lovett et al., 2001; Mo & Greenaway, 2001).

As informações sobre a estrutura da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial dos crustáceos ainda são escassas. Contudo, igualmente às outras (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPases, a enzima dos crustáceos possui uma subunidade  $\alpha$  com Mr entre 95 e 104 KDa e uma subunidade  $\beta$  de peso molecular de 38 a 40 KDa (Lucu & Flik, 1999; Furriel et al., 2000; Towle et al., 2001; Masui et al., 2002, 2005a; Lignot et al., 2005). Ainda permanece a ser esclarecida a presença de proteínas reguladoras da família FXYD nos crustáceos e do papel da subunidade  $\beta$  para a estrutura e a atividade da enzima (Lucu & Towle, 2003). Os estudos da estrutura primária da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase revelaram uma grande homologia entre as subunidades  $\alpha$  de *A. franciscana*, *C. sapidus* e *H. americanus* e que apresentam também uma grande homologia com a isoforma  $\alpha_3$  dos vertebrados; os genes para a expressão das duas isoformas desta subunidade nos crustáceos foram descritos somente em camarões do gênero *Artemia* (Baxter-Lowe et al., 1989; Macías et al., 1991; Pressley, 1992; Towle et al., 2001; Parrie & Towle, 2002). Para *Artemia*, a subunidade  $\alpha$  apresenta somente 8 segmentos transmembrana, com a enzima nativa sob a forma de um diprotômero ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> (Peterson & Hokin, 1981; Lucu & Towle, 2003). Somente uma

sequência homóloga às subunidades  $\beta$  dos vertebrados foi relatada para a subunidade  $\beta$  desses animais (Bhattacharyya et al., 1990).

A fim de esclarecer o papel da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  branquial na resposta osmorregulatória dos crustáceos a longo prazo, bem como a regulação desta resposta, a atividade desta enzima tem sido intensivamente estudada em animais experimentalmente aclimatados a salinidades diferentes. Apesar de alguns resultados contraditórios (Wilder et al., 2000), geralmente tem sido relatada uma atividade significativamente menor em animais adaptados a meios de maior salinidade (Harris & Bayliss, 1988; Piller et al., 1995; Corotto & Holliday, 1996; Mo et al., 1998; Zare & Greenaway, 1998; Lucu & Flik, 1999; Lucu & Devescovi, 1999; Flik & Haond, 2000; Castilho et al., 2001; Mo & Greenaway, 2001; Towle et al., 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003). A diminuição da atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  branquial em resposta à aclimação a meios de salinidades mais elevadas é um componente importante da resposta osmorregulatória a longo prazo nos crustáceos, induzindo a captura ativa de íons sódio e o gasto energético a ela associado (Péqueux, 1995; Lima et al., 1997; Lucu & Towle, 2003). Entretanto, esses mecanismos ainda são pouco compreendidos (Lovett et al., 2001; Mo & Greenaway, 2001; Towle et al., 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003). Tem sido proposto que esta resposta envolva a regulação da atividade da enzima preexistente, a degradação e/ou remoção de moléculas da enzima das membranas das células do epitélio branquial, mudança da composição lipídica da membrana ou ainda uma redução na sua taxa de síntese através de mecanismos mediados por neurohormônios (Chapelle & Zwingelstein, 1984; Péqueux, 1995; Lima et al., 1997; Mo et al., 1998, 2002; Lucu & Flik, 1999; Spanings-Pierrot et al., 2000; Mo & Greenaway, 2001; Lovett et al., 2001; Towle et al., 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003). Para o tecido branquial de peixes, todavia, foi relatada a expressão de duas isoformas diferentes da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  em proporções relativas que variam em resposta à salinidade do meio externo (Pagliarani et al., 1991; Lee et al., 1998). Nas brânquias posteriores e anteriores do caranguejo estuarino *Chasmagnatus granulata* (Castilho et al., 2001) também foi identificada a presença de duas isoformas da enzima com diferentes afinidades por íons  $\text{Na}^+$  sugerindo que nos crustáceos, a expressão de isoformas diferentes da enzima também possa estar envolvida na resposta osmorregulatória a longo prazo. Num sentido mais amplo, a expressão de diferentes isoformas da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  no tecido branquial, em resposta à exposição a meios de diferentes salinidades, poderia

representar um importante mecanismo evolutivo envolvido na invasão de ambientes mais diluídos por estes animais.

Embora seja indiscutível a importância do estudo do papel da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de diversas espécies de crustáceos osmorreguladores na resposta à aclimação a diferentes salinidades, somente alguns poucos relatos descrevem a caracterização cinética da enzima expressa em animais mantidos em diferentes condições de salinidade. Segundo Furriel et al. (2000, 2001), muitos dos resultados da literatura foram obtidos sem uma prévia caracterização cinética da enzima, empregando condições iônicas arbitrariamente escolhidas, o que pode ter levado a conclusões errôneas. Desse modo, a caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de crustáceos osmorreguladores aclimatados a diferentes salinidades é relevante para o esclarecimento do papel desta enzima na resposta osmorregulatória desses animais, particularmente nas espécies encontradas na costa brasileira, ainda pouco estudadas. Estes estudos podem contribuir também para uma maior compreensão dos mecanismos que estão envolvidos na regulação da atividade da enzima a longo prazo, podendo evidenciar a expressão de isoformas diferentes da enzima em resposta à adaptação dos animais a salinidades diferentes, contribuindo assim para uma melhor caracterização da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial desses animais.

### **1.2.2 – O siri *Callinectes danae*.**

*Callinectes danae* Smith, 1869 é um caranguejo portunídeo eurialino de grande valor comercial que está distribuído desde a Flórida até o sul da costa brasileira (Melo, 1996; Chacur, 1998; Weber & Levy, 2000; Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001). Esta espécie pode ser encontrada em estuários lodosos, mangues, praias arenosas e lodosas e até mesmo em mar aberto até 75 metros de profundidade, habitando biótopos cuja salinidade varia desde a água salobra até a água do mar (Williams, 1974; Gaspar, 1981; Guerin & Stickle, 1997). Embora *C. danae* tolere a exposição a uma ampla faixa de salinidades, semelhantemente a outros membros do gênero, sua capacidade osmótica e osmorregulatória tem sido pouco investigada (Guerin & Stickle, 1997). Espécies relacionadas como *C. sapidus* e *C. similis* hiperregulam bem acima da linha de isosmoticidade em meio de baixa salinidade, e hiporregulam fracamente ou hipoconformam acima da salinidade da água do mar (Guerin & Stickle, 1997; Aguilar et al., 2005; Rome et al., 2005). Na baía de Ubatuba (SP), aproximadamente 95% dos animais adultos são encontrados em áreas de salinidade média ao redor de 33 ‰ ao

longo de todo o ano, mas que sofrem influência da água doce proveniente dos rios que desembocam na região (Mantelatto & Fransozo, 1999, 2000).

Os animais do gênero *Callinectes* têm seu ciclo reprodutivo associado à migração entre ambientes de salinidade variável. Embora certos estudos mostrem que machos e fêmeas de *C. sapidus* são freqüentemente encontrados em áreas de baixa a alta salinidade respectivamente (Aguilar et al., 2005). Em *C. danae* foram relatados apenas a presença de um movimentos migratórios de fêmeas adultas ovígeras para águas mais salinas para a desova (Costa & Negreiros-Fransozo, 1998; Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001), e dessa forma, a falta de um estudo completo do seu ciclo de vida. Além disso, não está bem estabelecida a sua dependência em relação tanto aos estuários quanto à água do mar para a reprodução e a sobrevivência dos estágios larvais e juvenis (Weber & Levy, 2000; Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001).

Estudos da morfologia das brânquias de *C. danae* demonstraram a presença de oito pares de brânquias, dispostos lateralmente e apresentando uma grande semelhança com as estruturas já descritas para espécies de crustáceos relacionadas (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Onken & Riestenpatt, 1998). As brânquias são compostas basicamente por estruturas multilamelares onde cada lamela forma um envelope cuticular com o seu exterior em contato com a água do ambiente e o seu interior preenchido pela hemolinfa que circula através de uma câmara formada por células epiteliais uniestratificadas que, dependendo da espécie, apresenta um septo intralamelar completo ou parcial (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Mantel & Farmer, 1983; Barra et al., 1983; Towle & Kays, 1986; Goodman & Cavey, 1990; Maina, 1990; Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken et al., 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). Nas membranas apicais, as células do tecido epitelial branquial apresentam um grande número invaginações, que aumentam a superfície de contato com o meio ambiente. Já a superfície basolateral dessas células, onde está localizada a  $(Na^+,K^+)$ -ATPase, é banhada pela hemolinfa e apresenta um grande número de invaginações associadas a mitocôndrias (Copeland, 1968; Barra et al., 1983; Copeland & Fitzjarrell, 1968; Cioffi, 1984; Towle, 1984; Gilles & Péqueux, 1985; Towle & Kays, 1986; McConnell, 1987; Maina, 1990; Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). Estas invaginações de membrana associadas a mitocôndrias, denominadas "bombas mitocondriais", são características de epitélios transportadores de íons (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Cioffi, 1984; Towle, 1984; McConnell, 1987; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998).

Embora esteja bem estabelecida a importância adaptativa da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial dos crustáceos osmorreguladores, existem poucos estudos relacionados com sua caracterização bioquímica (Péqueux, 1995; Furriel et al., 2000). Dentro do gênero *Callinectes*, algumas características cinéticas da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial foram relatadas para *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980; Savage & Robinson, 1983; Towle & Holleland, 1987; Lucu, 1990; Towle, 1993; Piller et al., 1995), entretanto, para a enzima do siri *C. danae*, apenas alguns dados cinéticos e estruturais foram relatados recentemente (Masui et al., 2002, 2003, 2005a, b).

### 1.2.3 – Contribuições do projeto em relação ao tema em estudo.

O projeto (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de microsoma de brânquias de crustáceos: um marcador molecular para avaliar a adaptação a biótopos de diferentes salinidades (**Painel 5**), começou a ser desenvolvido em 1997 com a caracterização bioquímica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*, e os resultados foram reunidos na tese de doutorado de Rosa P. M. Furriel, intitulada “Caracterização Bioquímica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da Fração Microsomal do Tecido Branquial do Camarão de Água Doce *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda)”. Esse estudo sistemático, usando ATP como substrato, mostrou que as características cinéticas da enzima são consistentes com o modelo proposto para a captura de íons Na<sup>+</sup> através do epitélio branquial deste animal em água doce e que, a baixa afinidade aparente da enzima por Na<sup>+</sup> pode refletir a recente invasão desse ambiente por este animal (Furriel et al., 2000). Ficou evidente também que, além da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, está presente no tecido branquial de *M. olfersii* uma V-ATPase, que corresponde à cerca de 18% da atividade ATPase total. Recentemente, baseados em evidências moleculares e fisiológicas, outros autores confirmaram a presença desta V-ATPase no tecido branquial de certos caranguejos (Towle & Weihrauch, 2001) sugerindo que ela desempenharia um papel crucial para a captura de íons a partir do meio externo nos crustáceos capazes de adaptar-se à água doce, o que é coerente com os resultados encontrados por nós para *M. olfersii*. Entretanto, 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 do tecido branquial deste animal (Rezende, 2006). Este fato sugere que nos camarões, essa V-ATPase pode apresentar uma função distinta aparentemente daquela proposta para os caranguejos.



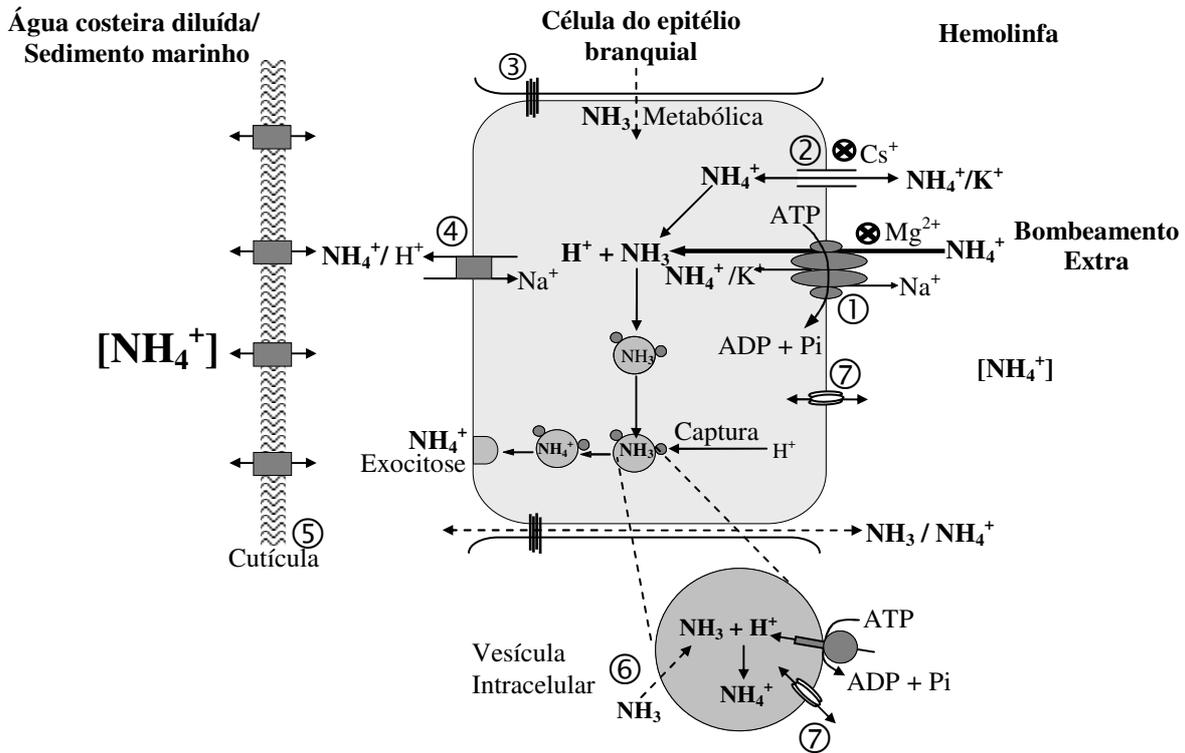
① *Callinectes ornatus*. ② *Xiphopenaeus kroyeri*. ③ *Callinectes danae*. ④ *Clibanarius vittatus*. ⑤ *Macrobrachium ofersii*.  
⑥ *Dilocarcinus pagei*. ⑦ *Macrobrachium amazonicum*.

**Painel 5 – Representação do ambiente aquático e a distribuição de algumas espécies de crustáceos aquáticos encontrados no estado de São Paulo.**

O estudo comparativo-evolutivo entre o processo osmorregulatório nas diversas espécies de crustáceos aquáticos e a participação da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase do tecido branquial de cada espécie está sendo realizado, a fim de estabelecer o papel dessa enzima na adaptação desses animais a ambientes de diferentes salinidades. A seta amarela indica a variação de salinidade do habitat aquático: do ambiente menos salino (água doce) para o ambiente mais salino (mar).

Além dos resultados obtidos com o ATP, o substrato sintético p-nitrofenilfosfato foi usado para caracterizar a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), demonstrando que ele pode ser usado em estudos comparativos de osmorregulação apresentando uma excelente correlação com a atividade ATPase da enzima.

Alguns resultados deste trabalho com *C. danae* já foram publicados por se tratar de informações inéditas na literatura. Assim, foi mostrado pela primeira vez que a enzima desse animal, ao contrário do que tem sido relatado para as (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPases dos invertebrados, apresenta um sítio de alta afinidade para o ATP, similarmente à enzima dos mamíferos (Masui et al., 2002). Outro aspecto relevante e inédito na literatura é que essa (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é estimulada sinergisticamente pelos íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Masui et al., 2005b). Estudos posteriores mostraram que a enzima de *M. olfersii* apresenta um comportamento similar (Furriel et al., 2004). Esta característica pode ter um importante significado fisiológico do ponto de vista do processo de excreção de amônio pelos crustáceos, que ocorre através das brânquias, e é coerente com o modelo recentemente proposto por Weihrauch et al. (2001, 2002, 2004) para o caranguejo estuarino *Carcinus maenas*. Masui et al. (2005b) propuseram um modelo hipotético para a excreção ativa de amônia através das brânquias do siri eurialino *Callinectes danae* baseado dos resultados obtidos na caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase desse animal com as observações realizadas por Weihrauch et al. (2002). Neste modelo (**Painel 6**), o processo de excreção ativa de amônia através das brânquias ocorre via participação direta da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase localizada na membrana basolateral das células que compõem o tecido branquial. Existem evidências da presença de uma força extra-bombadora da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase inibida por magnésio para a excreção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> está representada por um segundo sítio de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, aparecendo quando a enzima está completamente saturada por íons K<sup>+</sup>. Além disso, canais de K<sup>+</sup> sensíveis a Cs<sup>+</sup> localizados na membrana basolateral não distinguem entre os íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e acabam contribuindo para entrada de NH<sub>3</sub> para dentro da célula. Conseqüentemente, a NH<sub>3</sub> citoplasmática é difundida para dentro das vesículas contendo uma bomba de prótons (V-ATPase), o qual acidifica seu interior levando a formação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é excretado para o espaço subcuticular via exocitose. Uma proteína tipo rhesus, um suposto transportador de amônia de localização desconhecida pode sustentar o mecanismo vesicular de captura ácida.



**Painel 6 - 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 íon  $\text{NH}_4^+$  para fora da célula é a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  localizada na membrana basolateral. Em adição, uma força extra-bombeadora inibida por magnésio para a excreção de  $\text{NH}_4^+$  está representada por um segundo sítio de  $\text{NH}_4^+$ , o qual aparece quando a bomba é completamente saturada por íons  $\text{K}^+$ . ② Canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a  $\text{Cs}^+$  localizados na membrana basolateral não distinguem entre os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ . ③ Junção Septada. ④ Transportador  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+(\text{H}^+)$ , particularmente ativo durante a excreção transcelular de  $\text{NH}_4^+$ . ⑤ Presumivelmente, estruturas semelhantes a canais, sensíveis a amiloride e permeáveis a cátions na cutícula permitem a difusão de  $\text{NH}_4^+$  para o meio externo. ⑥ A  $\text{NH}_3$  citoplasmática é difundida para dentro das vesículas contendo uma bomba de prótons (V-ATPase), o qual acidifica seu interior levando a formação de  $\text{NH}_4^+$ . A  $\text{NH}_3$  é excretada para o espaço subcuticular via exocitose. ⑦ Uma proteína tipo rhesus, um suposto transportador de amônia de localização desconhecida pode sustentar o mecanismo vesicular de captura ácida. Modificado de Masui et al. (2005b).

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase também pode hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (PNFF) sem estar associado ao transporte de cátions ou fosforilação da enzima (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992). Interessantemente, o efeito sinérgico observado entre os íons potássio e amônio, não foi observado para a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de *C. danae* (Masui et al., 2003). A explicação para o mecanismo de hidrólise do PNFF através da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é que aparentemente, a forma E<sub>2</sub> é a principal conformação envolvida na hidrólise do PNFF, que é estimulada por íons K<sup>+</sup> e inibida por íons Na<sup>+</sup>. O uso do substrato sintético PNFF confere vantagens para os estudos cinéticos uma vez que a hidrólise desse substrato pode ser facilmente determinada, além de apresentar menos complicações em estudos mecanísticos. Entretanto, uma desvantagem do PNFF é a impossibilidade de caracterizar a afinidade da enzima pelos íons Na<sup>+</sup> (Furriel et al., 2001, 2004; Masui et al., 2003). Mais recentemente foram iniciados estudos de caracterização da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase expressa no tecido branquial de *C. danae* aclimatado por um período de 10 dias a uma salinidade relativamente baixa (15‰) em relação àquela do seu habitat natural (33‰). Estes estudos, realizados empregando o substrato sintético PNPP, mostraram que a aclimação a baixas salinidades estimula a expressão da subunidade α da enzima. Além disso, estão presentes no tecido branquial dos animais aclimatados outras ATPases, diferentes da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, em contraste com o observado anteriormente para o caranguejo não aclimatado (Masui et al., 2004). Este fato pode ser relevante para uma melhor compreensão das enzimas envolvidas na aclimação dos crustáceos eurialinos a baixas salinidades.

Atualmente diferentes espécies de crustáceos (ermitão, siris e camarões) estão sendo estudadas comparativamente a fim de se tentar estabelecer um modelo para o mecanismo de adaptação a ambientes de diferentes salinidades (Leone et al., 2005).

### **1.3 – Objetivos**

#### **1.3.1 – Objetivos gerais**

O projeto tem como objetivo o estudo sistemático e comparativo das propriedades estruturais e cinéticas da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *Callinectes danae* aclimatado a uma salinidade de 15‰.

### 1.3.2 – Objetivos específicos

A fim de se obter informações que permitam contribuir para uma melhor compreensão das adaptações fisiológicas e bioquímicas associadas à ocupação desses diferentes ambientes foram realizados os seguintes estudos: 1) preparação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de animais mantidos a salinidade de 15‰. 2) caracterização cinética da atividade da enzima em relação aos ligantes ATP, sódio, potássio, magnésio e amônio. 3) caracterização cinética da atividade da enzima em relação aos ligantes PNFF, sódio, potássio, magnésio e amônio. 4) caracterização da existência de isoformas da enzima através de imunoblotting.

Além disso, espera-se que esses estudos possam elucidar importantes aspectos sobre a evolução, relação filogenética e a conquista do ambiente dulcícola/terrestre bem como contribuir para o estabelecimento de um modelo dos mecanismos de regulação osmótica, a longo prazo, que atuam nos crustáceos.

## 2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tris, ATP (sal de Tris), p-nitrofenilfosfato (PNFF), ouabaína, ortovanadato de sódio, ácido etacrínico, imidazol, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanolsulfônico (Hepes), fosfoenolpiruvato (FEP), NAD<sup>+</sup>, NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAFDH), 3-fosfogliceraldeído dietil acetal e alameticina foram adquiridos da Sigma Chem. Co (USA). Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck. Bafilomicina A<sub>1</sub>, tpsigargina, oligomicina e os inibidores de protease (benzamidina 1 mM, antipaína 5 μM, leupeptina 5 μM e pepstatina A 1 μM) foram adquiridos da Calbiochem. Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico. O anticorpo monoclonal α-5 para subunidade α da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi obtido do Developmental Studies Hybridoma Bank/University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura apirogênica tratada em equipamentos MilliRO e MilliQ (Millipore Co., USA).

### 2.1 - Coleta e aclimação dos animais.

Os animais, de ambos os sexos, foram coletados na baía de Ubatuba (23°26'S, 45°02'W) e transportados para o laboratório em tanques contendo 100 L de água do local da coleta, permanentemente aerada. Para a aclimação, os animais permaneceram durante um período de pelo menos 10 dias nos tanques, a 25°C, contendo água de salinidade 15‰ e expostos a um fotoperíodo natural de luminosidade. A salinidade da água dos tanques foi ajustada pela diluição da água do mar (33‰) com água deionizada e monitorada periodicamente usando-se um refratômetro PZO-RL3 (Warszawa, Poland). Os animais foram alimentados em dias alternados com pedaços de camarão.

### 2.2 - Dissecção das brânquias.

Para cada homogeneizado preparado, 2 a 5 animais foram anestesiados por resfriamento em gelo picado, imediatamente antes da dissecção. A dissecção foi realizada através de remoção completa da carapaça dorsal. As brânquias foram dissecadas rapidamente, colocadas em 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, antipaína 5  $\mu$ M, leupeptina 5  $\mu$ M e pepstatina A 1  $\mu$ M) e mantidas em gelo picado.

### **2.3 - Preparação da fração microsomal do tecido branquial.**

Após a retirada do excesso de tampão, as brânquias foram pesadas, rapidamente cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas com o tampão de homogeneização (20 mL do tampão/g de tecido úmido) em um homogeneizador Potter. O homogeneizado foi centrifugado a 20000 g durante 35 min, a 4°C, em uma centrífuga Sorval RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em gelo picado e o *pellet*, ressuspenso em um volume de tampão de homogeneização igual aquele inicialmente empregado, e finalmente submetido a nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes resultantes das duas centrifugações foram misturados e a suspensão centrifugada a 100000 g durante 2 h, a 4°C. O *pellet* resultante (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo sacarose 250 mM (15 mL de tampão/g de tecido úmido). Alíquotas de 0,5 mL foram congeladas em nitrogênio líquido ou mistura gelo seco/acetona e armazenadas a -20°C. Não foram observadas perdas significativas na atividade da enzima durante pelo menos 4 meses.

### **2.4 - Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.**

Uma alíquota da fração microsomal contendo 900  $\mu$ g de proteína foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p) em tampão Imidazol 20 mM, pH 6,8. Após centrifugação a 180000 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 sendo imediatamente analisadas quanto a suas atividades ATPase e PNFFase totais e (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, concentração protéica e índice de refração.

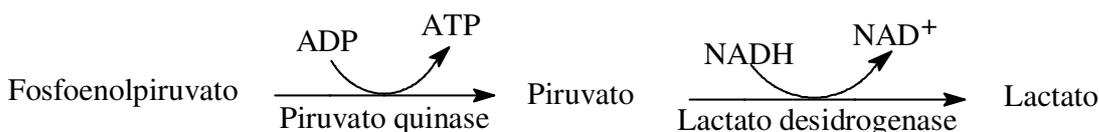
### **2.5 – Eletroforese em condições desnaturantes e análise por Western blot.**

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e a análise por Western blot foram realizadas conforme descrito por Furriel et al. (2000). Após eletroforese, o gel foi seccionado em duas partes: a primeira contendo aproximadamente 4  $\mu$ g de proteína foi revelada com nitrato de prata e a segunda parte do gel, contendo 45  $\mu$ g de proteína foi eletrotransferida para membrana de nitrocelulose usando o sistema Hoefer SE200. A

membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 h, a 25°C, com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -5 na diluição de 1:10. Após lavagem (3 vezes) em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM e Tween 20 0,1 %, a membrana foi incubada por 1 hora a 25°C com anticorpo antimouse IgG, conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:7500. A incorporação anticorpo específica foi revelada em Tris.HCl 100 mM, pH 9,5, contendo NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NBT 0,2 mM e BCIP 0,8 mM. Os padrões de proteína utilizados foram: miosina (200 KDa),  $\beta$ -galactosidase (116 KDa), fosforilase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa) e anidrase carbônica (29 KDa).

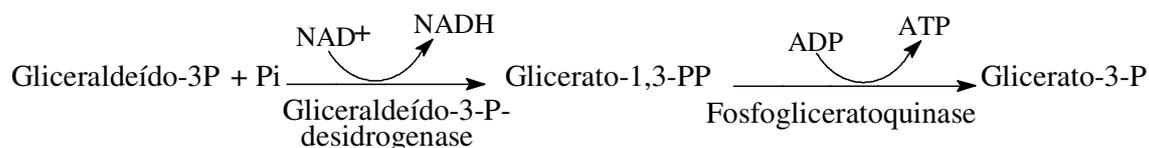
## 2.6 – Determinação da atividade ATPase da fração microsomal.

A atividade ATPase foi determinada continuamente, a 25°C, empregando-se o sistema de associação piruvato quinase/lactato desidrogenase (PQ/LDH), onde a hidrólise do ATP é acoplada a oxidação do NADH (Masui et al., 2003).



A oxidação do NADH foi acompanhada a 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostalizadas. As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 100 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, em um volume final de 1 mL. A atividade também foi determinada nas mesmas condições na presença de ouabaína 3 mM. A diferença entre os valores obtidos para a atividade ATPase na ausência e na presença de ouabaína representa a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.

A atividade enzimática também foi medida continuamente, a 25°C, utilizando o sistema de associação gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/fosfoglicerato quinase (GAFDH/FGQ), onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD<sup>+</sup>.



A formação do NADH foi acompanhada a 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 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, e KCl 10 mM, NaCl 100 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1mM, fosfato de sódio 0,5 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ em um volume final de 1 mL. A atividade também foi determinada nas mesmas condições na presença de ouabaína 3 mM. A diferença entre os valores obtidos para a atividade ATPase na ausência e na presença de ouabaína representa a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .

A reação sempre 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 minuto, em condições padrões. Todos os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ( $N = 3$ ). As figuras apresentadas correspondem à curvas representativas de um dos homogeneizados de brânquias. A atividade ATPase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C (Bonnafous et al., 1982). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se na fração microsomal existem vesículas seladas.

## **2.7 –Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatase da fração microsomal.**

A hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (PNFF) foi determinada continuamente, a 25°C, acompanhando-se a liberação do íon *p*-nitrofenolato ( $\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 13160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas (Masui et al., 2003). As condições padrão foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e KCl 15 mM em um volume final de 1 mL. A atividade também foi determinada nas mesmas condições na presença de ouabaína 3 mM. A diferença entre os valores obtidos para a atividade PNFFase na ausência e na presença de ouabaína representa a atividade da  $\text{K}^+$ -fosfatase. Todos os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ( $N = 3$ ). As figuras apresentadas correspondem à curvas representativas de um dos homogeneizados de brânquias. A atividade PNFFase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C (Bonnafous et al., 1982). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se na fração microsomal existem vesículas seladas

## **2.8 – Tratamento dos sistemas de associação PQ/LDH e FGQ/GAFDH.**

Suspensões cristalinas de LDH e PQ em sulfato de amônio foram centrifugadas a 14000 rpm, a 4°C, por 15 min, numa centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5810. O pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão Hepes 50 mM pH 7,5, e transferidos para filtros micrones Microcon-Amicon YM-10 e lavados 5 vezes com o mesmo tampão a 10.000 rpm a 4°C para completa eliminação dos íons amônio (testado com reagente de Nessler). Finalmente, o pellet foi ressuspendido no seu volume original. Para o sistema de associação FGQ/GAFDH, a suspensão foi tratada conforme descrito acima utilizando a solução tampão trietanolamina 50 mM pH 7,5 contendo ditioneitol 1 mM.

## **2.9 –Preparação da solução de gliceraldeído 3-fosfato.**

O gliceraldeído 3-fosfato foi preparado a partir do 3-fosfogliceraldeído dietil acetal, sal de bário (12,5 mg/mL), tratado inicialmente com 150 µL de HCl concentrado (d= 1,18 g/mL) em banho fervente durante 2 min. Em seguida, o pH da solução foi acertado em 6,0 empregando trietanolamina (d= 1,12 g/mL). A solução resultante foi tratada com resina trocadora de íons Biorad AG50W-X8, e após centrifugação a 5000g o pH do sobrenadante foi ajustado em 7,5 com trietanolamina.

## **2.10 –Preparação da solução de ortovanadato.**

A solução estoque de ortovanadato de sódio foi preparada de acordo com Gordon (1991). Alíquotas de 1 mL foram congeladas em frascos plásticos e descongeladas no momento do uso.

## **2.11 – Preparação da solução de Oligomicina.**

A solução estoque de oligomicina (100 µg/mL) foi preparada através de dissolução em etanol. A solução resultante foi estocada a -20° C em frascos plásticos e descongeladas no momento do uso.

## **2.12 - Preparação da solução de Bafilomicina A<sub>1</sub>.**

Uma solução estoque de bafilomicina (20,07 µM) foi preparada através de dissolução de 10 µg do inibidor em 0,8 mL de DMSO. A solução resultante foi alíquotada e estocada a -20° C em frascos plásticos e descongeladas no momento do uso.

### **2.13 - Preparação da solução de Tapsigargina.**

A solução estoque de tapsigargina (2,0 mM) foi preparada através de dissolução de 1,0 mg do inibidor em 0,75 mL de DMSO. A solução resultante foi alíquotada e estocada a -20° C em frascos plásticos e descongeladas no momento do uso.

### **2.14 - Dosagem de proteína.**

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

### **2.15 - Tratamento dos dados cinéticos.**

Os parâmetros cinéticos  $V$  (velocidade máxima),  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten),  $K_{0,5}$  (constante de dissociação aparente) e  $n_H$  (coeficiente de Hill) foram calculados empregando-se o software SigrafW (Leone et al., 2005a). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_I$ ) foram determinadas graficamente de acordo com Dixon (1953). Os valores dos parâmetros cinéticos mostrados nas tabelas representam a média  $\pm$  desvio padrão e foram calculados a partir de dados de três preparações diferentes ( $N= 3$ ). As curvas apresentadas são aquelas onde se obteve o melhor ajuste dos dados e cada figura é uma curva representativa de uma preparação microsomal de brânquias.

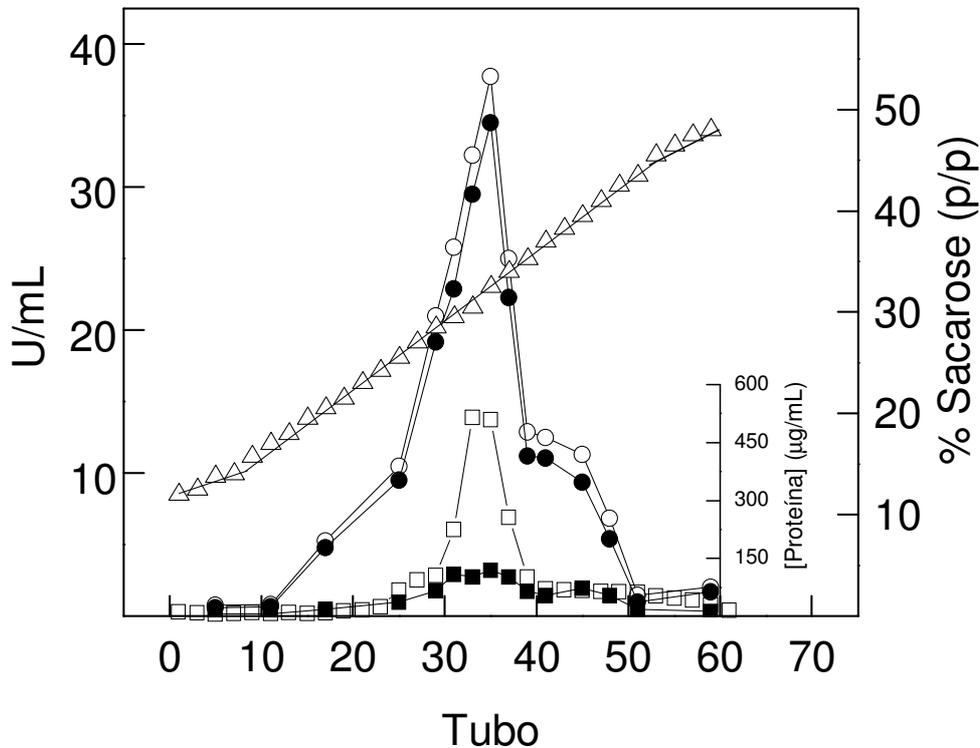
### 3.0 – RESULTADOS

#### 3.1 – Estudo da fração microsomal.

Os microsomas obtidos dos pares de brânquias posteriores do siri eurialino *Callinectes danae* aclimatado à salinidade de 15‰ mostraram uma atividade ATPase total de aproximadamente  $319,78 \pm 17,68$  U/mg. Para a atividade PNFFase total esse valor foi cerca de 2,4 vezes menor ( $131,8 \pm 75,7$  U/mg). A atividade ATPase residual ao redor de 10% ( $29,99 \pm 1,77$  U/mg) determinada em presença de ouabaína 3,0 mM, sugere que aproximadamente 90% da atividade medida ( $289,79 \pm 16,02$  U/mg) corresponde à (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Os 10% restantes, representando a diferença entre as atividades ATPase total e ATPase insensível à ouabaína, sugerem a presença de outras ATPases. A análise da atividade PNFFase da preparação de membrana na presença de ouabaína 3,0 mM mostrou uma atividade residual de  $32,97 \pm 1,4$  U/mg, mostrando que a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase corresponde a aproximadamente 75% da atividade PNFFase total medida, sugerindo a presença de outras fosfatases na fração microsomal de tecido branquial de *C. danae*.

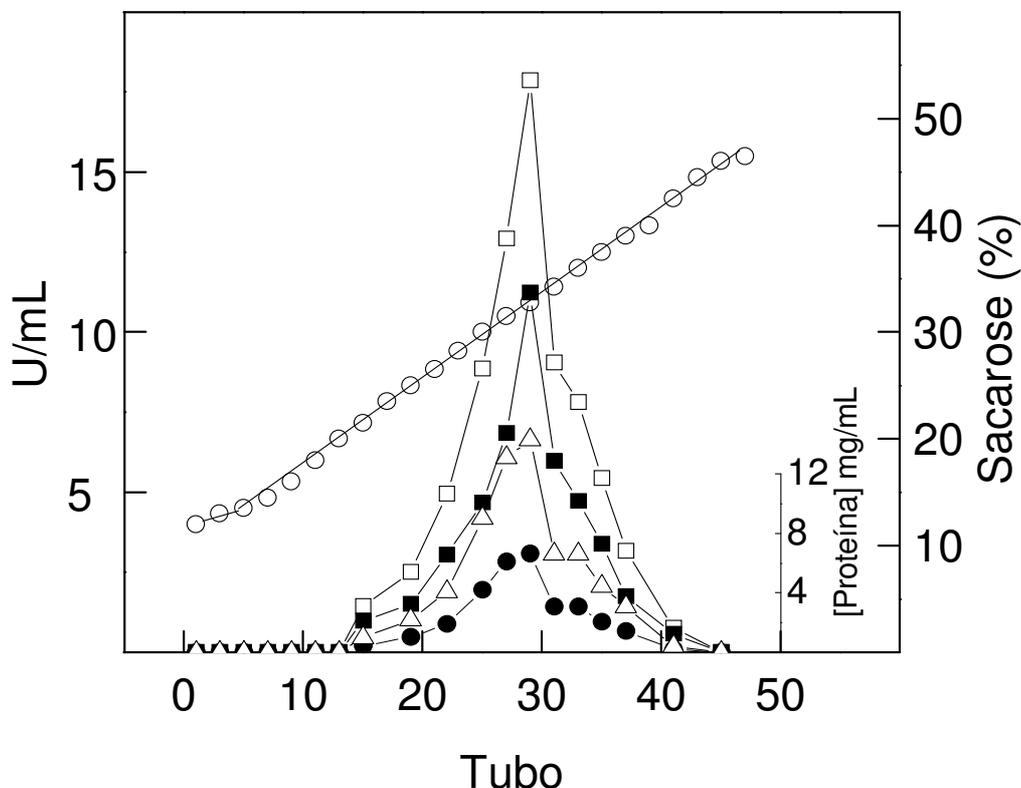
A análise da atividade ATPase da fração microsomal de animais aclimatados à salinidade de 15 ‰, por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (10 a 50%), revelou a presença de um único pico protéico, coincidente com as atividades (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase e ATPase insensível à ouabaína (Figura 1). A inibição parcial da atividade ATPase total por ouabaína indica de fato que além da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase estão presentes outras ATPases.

Na Figura 2, está mostrado o resultado da centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (10 a 50%) da fração microsomal de animais aclimatados a 15 ‰. Em condições saturantes de PNFF e de íons Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>, a atividade PNFFase da enzima revelou também a presença de um único pico de proteína com atividade fosfatase total da ordem de  $17,8 \pm 0,89$  U/mL. A inibição pela ouabaína sugere fortemente que este pico corresponde a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima. Além disso, a presença de uma atividade PNFFase insensível a ouabaína sugere a presença de fosfatases contaminantes na preparação.



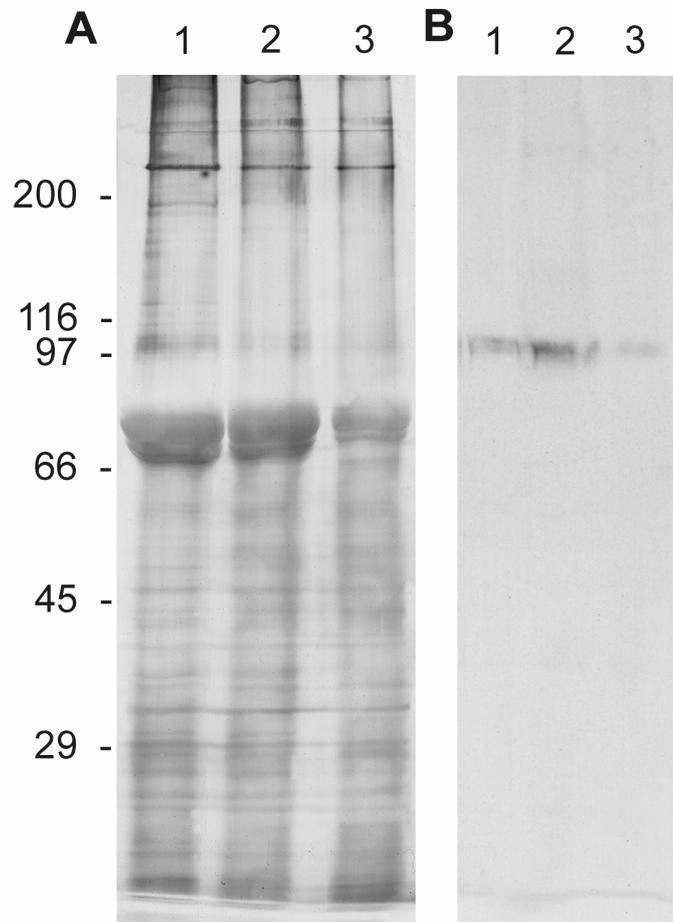
**Figura 1 – Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A fração microsomal (0,9 mg de proteína) foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p), em tampão Imidazol 20 mM, pH 6,8. Após centrifugação a 180000g durante 2 h, a 4°C, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação à atividade ATPase total (○); atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (■); concentração de proteína (□) e concentração de sacarose (△). A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH, num volume final de 1,0 mL. 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.



**Figura 2 – Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A fração microsomal (0,9 mg de proteína) foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p), em tampão Imidazol 20 mM, pH 6,8. Após centrifugação a 180000g durante 2 h, a 4°C, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação à atividade PNFFase total (□); atividade K<sup>+</sup>-fosfatase (■); atividade insensível à ouabaína (△); concentração de proteína (●) e concentração de sacarose (○). A atividade de cada alíquota foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1,0 mL. 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.



**Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blot de frações microsomais do tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida (5% a 20%) usando 4  $\mu\text{g}$  de proteína para revelação com nitrato de prata e 45  $\mu\text{g}$  de proteína para eletrotransferência em papel de nitrocelulose. Após a corrida, metade do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo monoclonal alfa-5 (diluição 1:10) durante 1h, a 25°C, e com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado a fosfatase alcalina (diluição 1:7500) durante 1h, a 25°C. **A-** coloração com nitrato de prata. **B-** Western blot de animais. **1)** Recém-coletados. **2)** aclimatados a 15 ‰. **3)** aclimatados a 33 ‰.

A Figura 3 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Figura 3A) e o Western blot (Figura 3B) das frações microsomais de brânquias de *C. danae* obtidas a partir de animais recém-coletados em salinidade de 33‰ (não aclimatados) e aclimatados a salinidades de 15 e 33‰ por um período de 10 dias. Além de pequenas diferenças nos padrões eletroforéticos, observa-se um aumento significativo da proporção relativa da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em relação à proteína total na fração microsomal do tecido branquial de animais aclimatados à salinidade de 15‰ quando comparados aos animais aclimatados a 33‰. Entretanto, proporções similares de subunidade  $\alpha$  foram observadas no tecido branquial de animais recém-coletados a salinidade de 33‰ e aclimatados a 15‰.

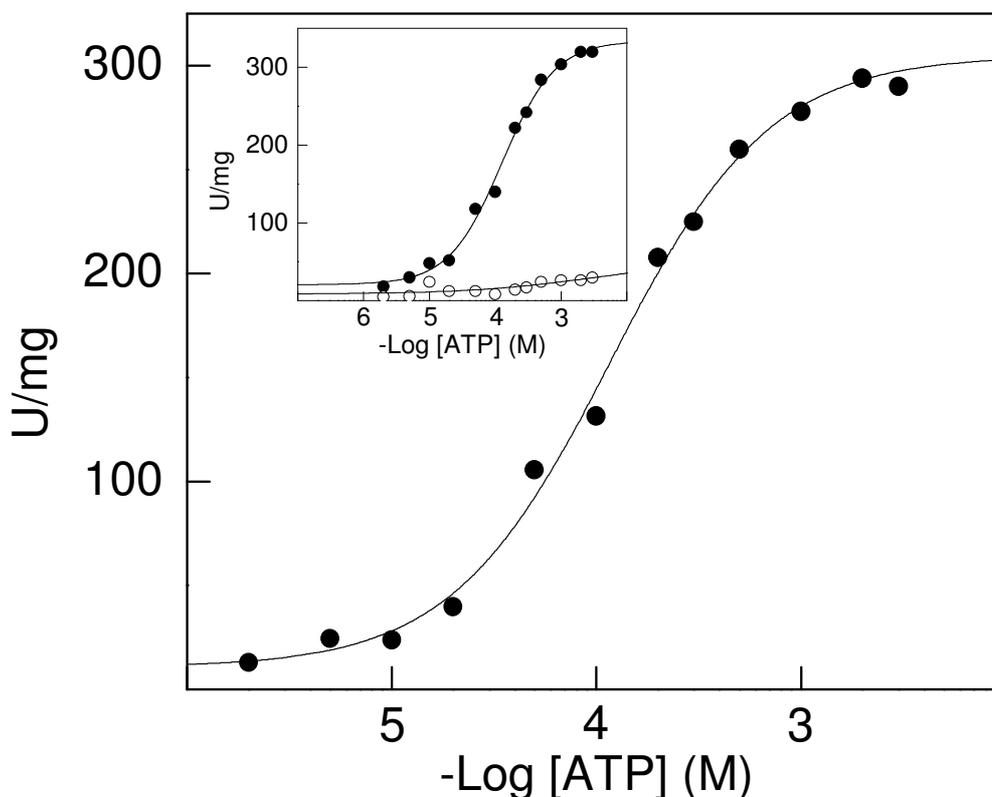
### 3.2 – Caracterização da atividade ATPase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase

O efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase microsomal de brânquias de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ está apresentado na Figura 4. A estimulação da atividade da enzima pelo ATP, em condições saturantes de Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, ocorre através de uma curva de saturação monofásica apresentando interações sítio-sítio ( $n_H = 1,2$ ). Concentrações de ATP variando de 10<sup>-5</sup> a 5.10<sup>-3</sup> M estimularam a atividade da enzima até valores da ordem de 298,8 ± 16,7 U/mg, e com K<sub>0,5</sub> de 174,2 ± 9,8 μM. Nesse caso, a atividade basal foi da ordem de 12,9 ± 0,7 U/mg. A atividade ATPase insensível à ouabaína também foi estimulada pelo substrato na mesma faixa de concentrações (inserção da Figura 4), indicando a presença de ATPases diferentes da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase na preparação, em perfeita concordância com o resultado da análise em gradiente de sacarose (ver Figura 1).

A Figura 5 mostra o efeito da concentração dos íons Mg<sup>2+</sup> sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰. Na presença de ATP e de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em concentrações saturantes, os íons Mg<sup>2+</sup> estimularam a atividade da enzima numa faixa de concentrações entre 10<sup>-4</sup> M e 10<sup>-3</sup> M, com V= 299,2 ± 14,1 U/mg e K<sub>0,5</sub>= 767,3 ± 36,1 μM. A estimulação ocorreu através de uma simples curva de saturação, que obedece a uma cinética cooperativa ( $n_H = 1,8$ ). Concentrações de Mg<sup>2+</sup> acima de 7 mM inibiram a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (resultado não mostrado). É importante destacar que a atividade insensível à ouabaína também foi estimulada 9,4 % por íons Mg<sup>2+</sup>, na mesma faixa de concentrações (inserção da Figura 5).

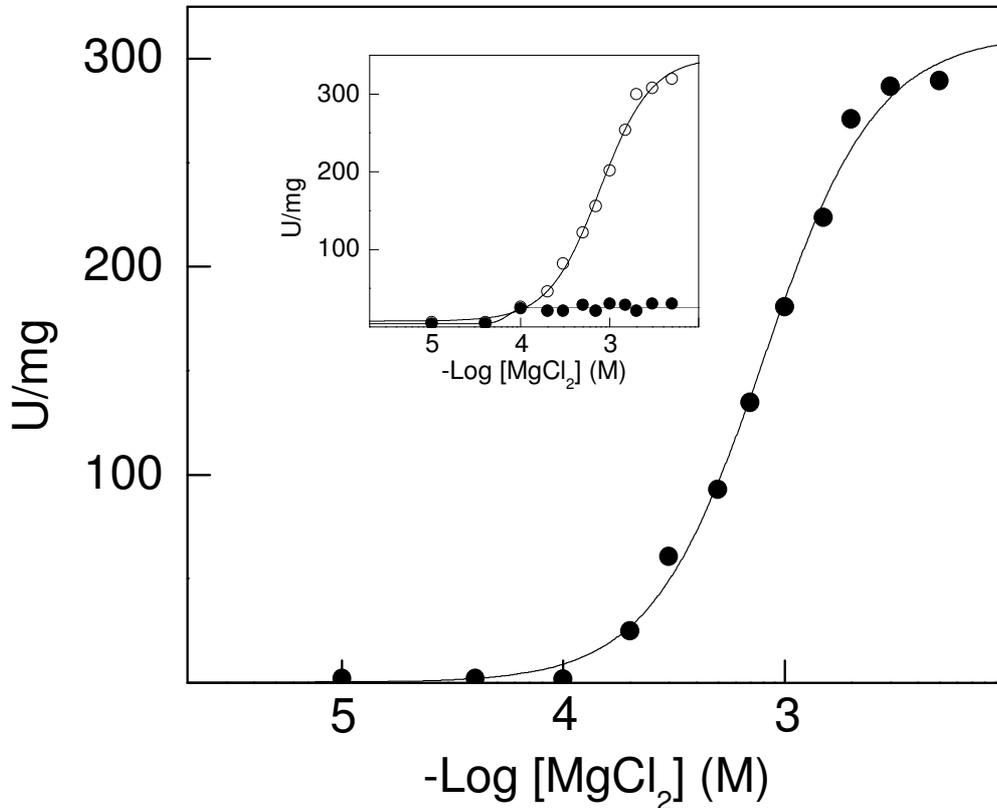
A modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ por íons Na<sup>+</sup> está mostrada na Figura 6. Em condições saturantes de íons Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> e de ATP, a estimulação da atividade da enzima ocorreu através de uma simples curva de saturação, sendo observados efeitos cooperativos ( $n_H = 1,4$ ). A atividade específica determinada foi de 308,9 ± 15,7 U/mg, com uma constante de afinidade aparente para os íons Na<sup>+</sup> de K<sub>0,5</sub>= 7,8 ± 0,4 mM. Interessantemente, a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada por íons Na<sup>+</sup>, mantendo-se constante em torno de 20,8 ± 0,9 U/mg (inserção da Figura 6), o que aparentemente descarta a presença de Na<sup>+</sup>-ATPases na preparação microsomal de brânquias de *C. danae*.

O efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ está representado na Figura 7. Na presença de concentrações saturantes de ATP e de íons Mg<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>, o íon K<sup>+</sup> estimu-



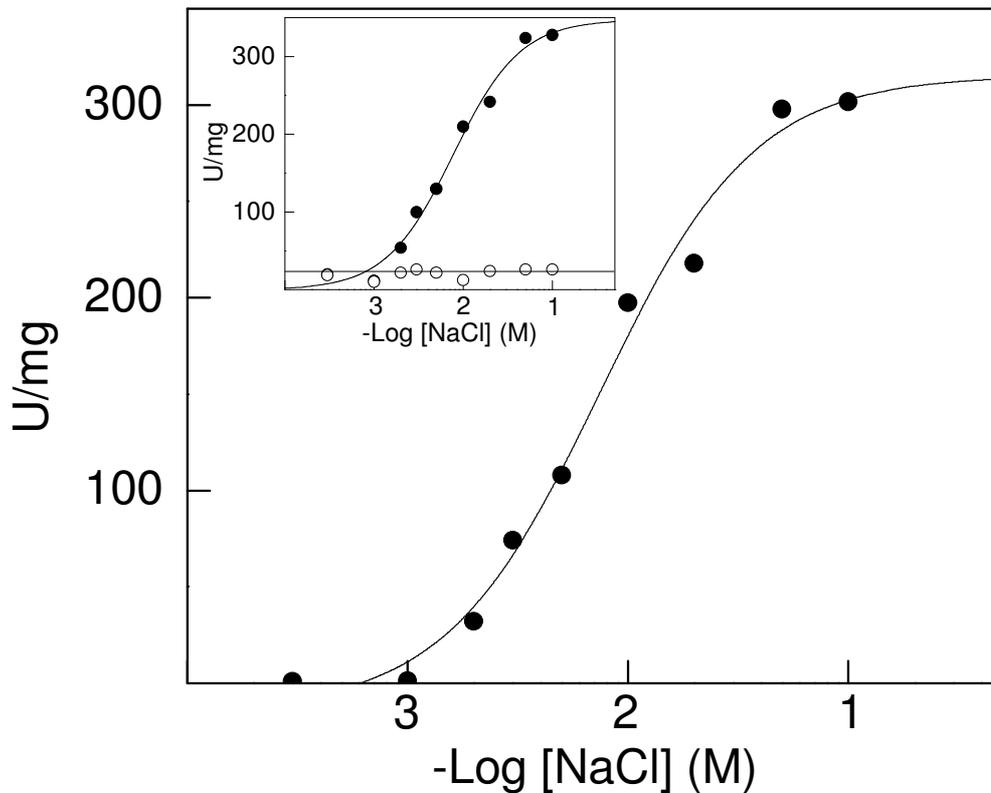
**Figura 4 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelo ATP em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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 ATPase total (●) e insensível à ouabaína (○).



**Figura 5 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons magnésio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, NaCl 100mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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 ATPase total (○) e insensível à ouabaína (●).



**Figura 6 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons sódio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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 ATPase total (●) e insensível à ouabaína (○).

lou a atividade da enzima através de interações sítio-sítio ( $n_H = 1,6$ ) através de uma simples curva de saturação até valores da ordem de  $300,6 \pm 15,3$  U/mg, com  $K_{0,5} = 1,6 \pm 0,08$  mM. Ao contrário dos íons  $\text{Na}^+$ , os íons  $\text{K}^+$  estimularam 9,8 % a atividade ATPase insensível à ouabaína no intervalo de concentração entre 1 e 10 mM (inserção da Figura 7), sugerindo portanto a presença de atividade de  $\text{K}^+$ -ATPases contaminantes.

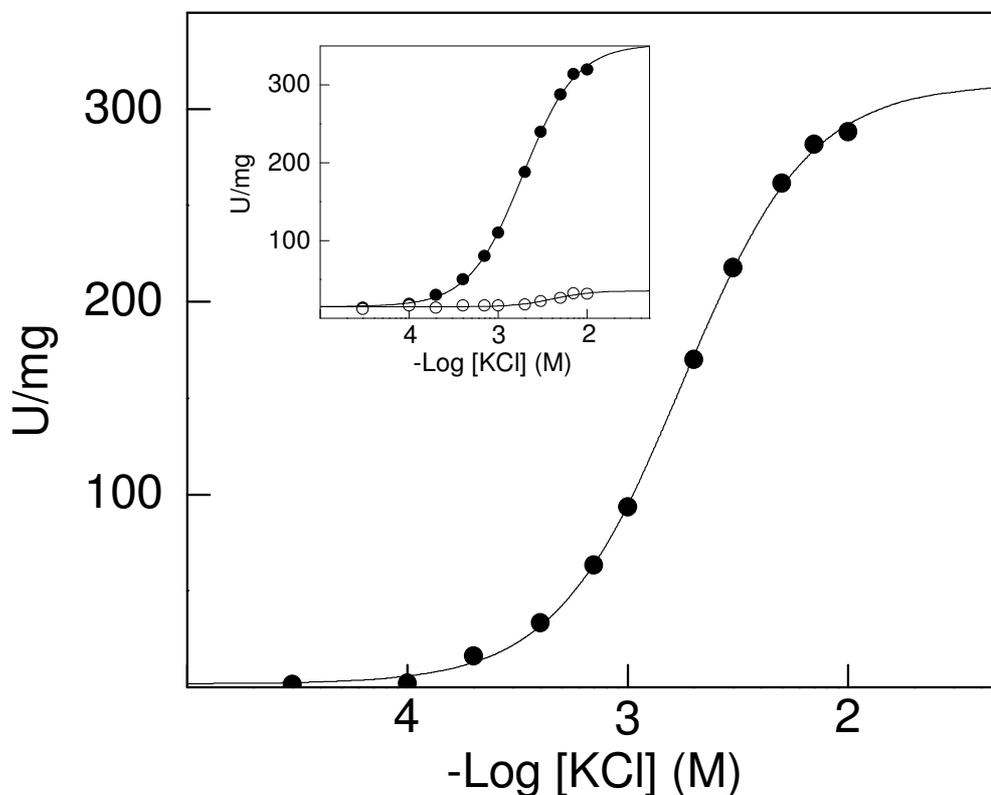
A modulação da atividade ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ pelos íons  $\text{NH}_4^+$  na presença de concentrações saturantes de ATP e de íons  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  é mostrada na Figura 8. A estimulação ocorreu através de uma curva de saturação monofásica apresentando efeitos cooperativos ( $n_H = 1,3$ ), com valores máximos de atividade específica de  $345,1 \pm 19,0$  U/mg, e valor de  $K_{0,5} = 6,0 \pm 0,3$  mM. A atividade insensível à ouabaína não foi estimulada pelos íons  $\text{NH}_4^+$ , e a atividade específica permaneceu constante, em torno de  $8,64 \pm 0,47$  U/mg em toda a faixa de concentrações estudada.

Na Tabela 1 estão resumidos os parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ por ATP e pelos íons  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ .

**Tabela 1 - Parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ por ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.**

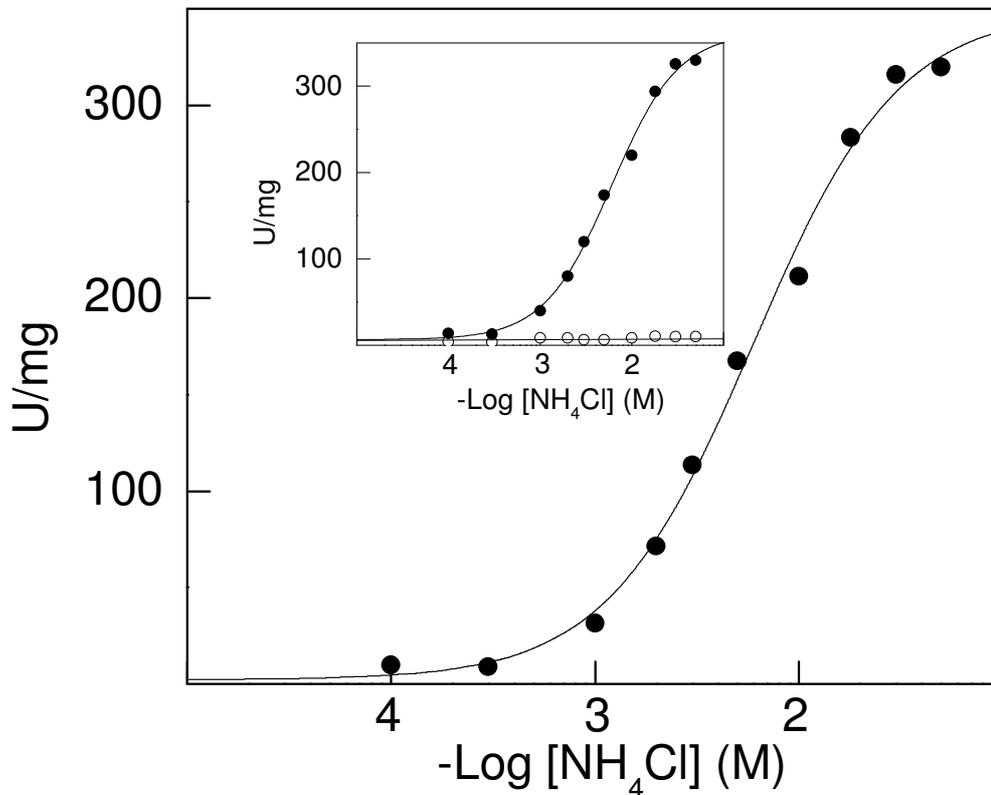
A atividade da enzima foi medida usando 17,4  $\mu\text{g}$  de proteína em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, num volume final de 1,0 mL. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão e foram calculados usando-se três preparações diferentes ( $N = 3$ ).

Efector	V (U/mg)	$K_{0,5}$	$n_H$
ATP	$298,8 \pm 16,7$	$174,2 \pm 9,8 \mu\text{M}$	1,2
$\text{Mg}^{2+}$	$299,2 \pm 14,0$	$767,3 \pm 36,1 \mu\text{M}$	1,8
$\text{Na}^+$	$308,9 \pm 15,7$	$7,8 \pm 0,4 \text{ mM}$	1,4
$\text{K}^+$	$300,6 \pm 15,3$	$1,6 \pm 0,08 \text{ mM}$	1,6
$\text{NH}_4^+$	$345,1 \pm 19,0$	$6,0 \pm 0,3 \text{ mM}$	1,3



**Figura 7 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons potássio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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 ATPase total (●) e insensível à ouabaína (○).

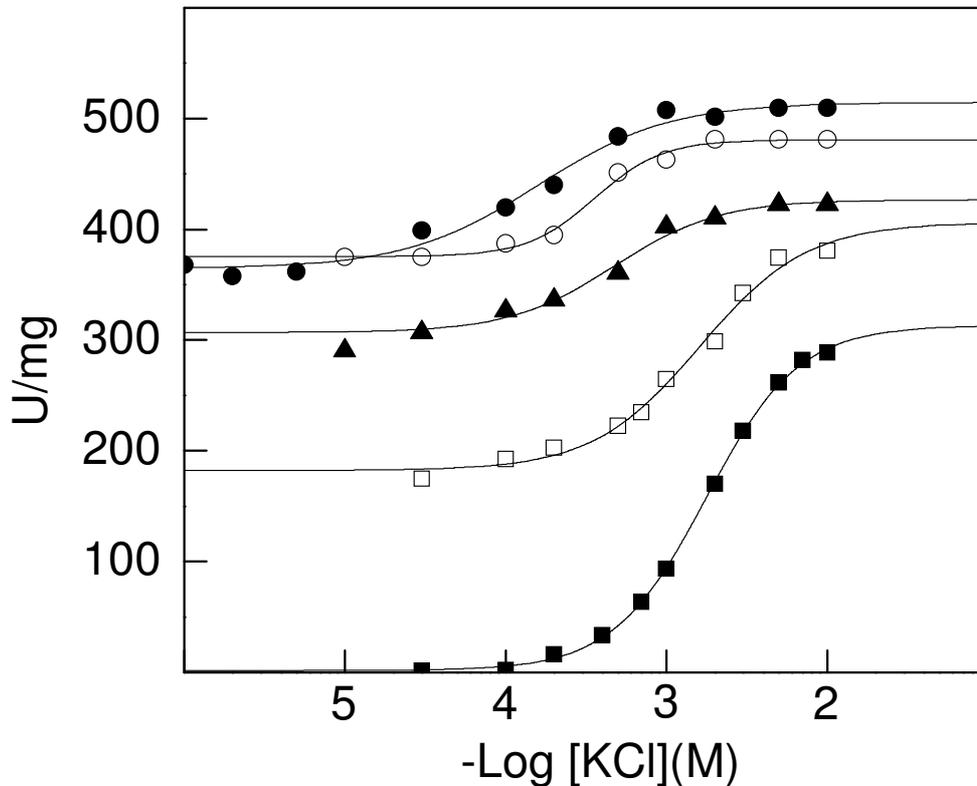


**Figura 8 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons amônio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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 ATPase total (●) e insensível à ouabaína (○).

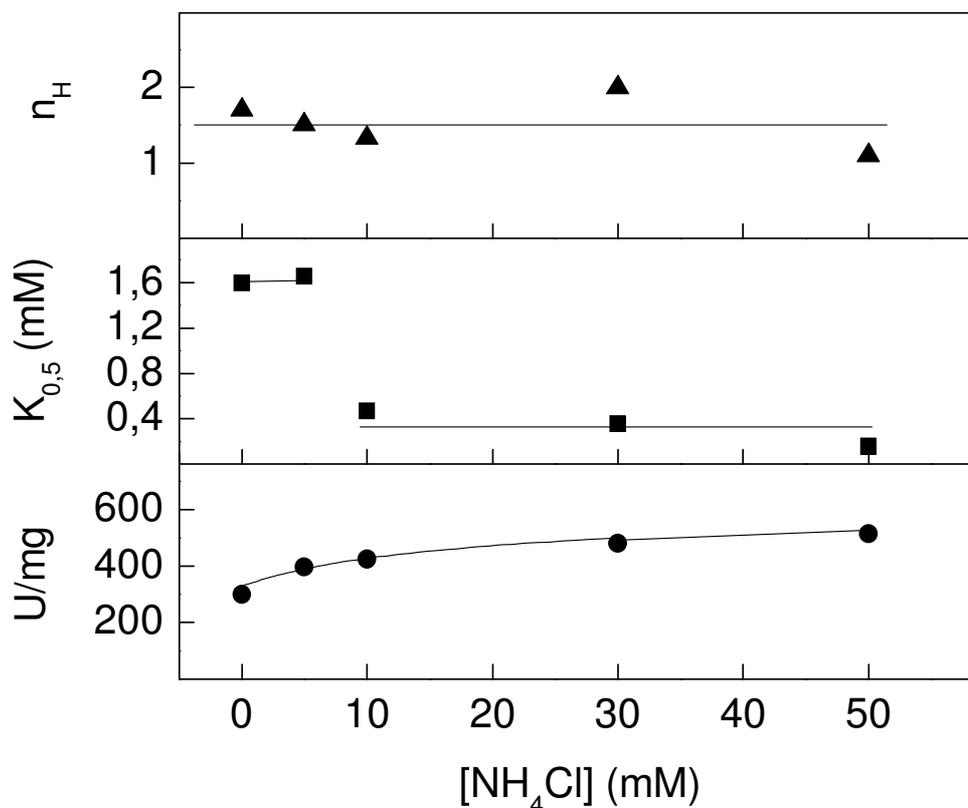
Na Figura 9 é mostrada a estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos microsomas de tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ por íons K<sup>+</sup> em presença de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Na presença de concentrações saturantes de íons Na<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e de ATP, e na presença de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0 a 50 mM), o aumento da concentração dos íons K<sup>+</sup> estimulou a atividade da enzima em até 44%. A estimulação da atividade pelo íon K<sup>+</sup>, modulada pela presença de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ocorreu através de curvas de saturação monofásicas, tendo sido observados efeitos cooperativos (Figura 9). É interessante notar que a atividade da enzima foi modulada sinergisticamente pelos íons K<sup>+</sup> na presença de diferentes concentrações fixas de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e que a atividade específica aumentou de 300,6 ± 15,3 U/mg para 514,6 ± 26,2 U/mg (Figura 9). Além disso, foi observado um significativo aumento na afinidade aparente da enzima pelo íon K<sup>+</sup> da ordem de 10 vezes (diminuiu de 1,6 ± 0,08 mM para 0,157 ± 0,008 mM) (Figura 10). As atividades ouabaína insensíveis não foram estimuladas por íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (resultados não mostrados). Concentrações crescentes do cloreto de colina até 50 mM não exerceram nenhum efeito estimulatório sobre a atividade da enzima, o que descarta a possibilidade da estimulação da atividade da enzima por íon K<sup>+</sup> em presença de concentrações fixas de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ser devida a efeitos de força iônica (resultados não mostrados).

O efeito de concentrações crescentes de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sobre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos microsomas de tecido branquial de *C. danae* aclimatado a 15‰ de salinidade na presença de íons K<sup>+</sup> é mostrado na Figura 11. Similarmente ao observado para os íons K<sup>+</sup>, observa-se uma estimulação da atividade da enzima pelo íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mesmo em condições saturantes de ATP e de íons Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> com a utilização de diferentes concentrações de íons K<sup>+</sup>. A estimulação da atividade da enzima pelo íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> também ocorreu através de curvas de saturação monofásicas bem como foram observadas interações cooperativas entre os sítios. Embora tenha sido observado um aumento da atividade específica da enzima de 345,1 ± 19,0 U/mg para 516,8 ± 27,9 U/mg, não foram observadas variações significativas nos valores de n<sub>H</sub> e K<sub>0,5</sub> com o aumento da concentração de íons K<sup>+</sup> (Figura 12). Não foram observados efeitos estimulatórios do íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sobre a atividade insensível à ouabaína. Além disso, a utilização de cloreto de colina em substituição aos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> descartam a possibilidade da estimulação da enzima ser resultante de efeitos da força iônica (dados não mostrados).



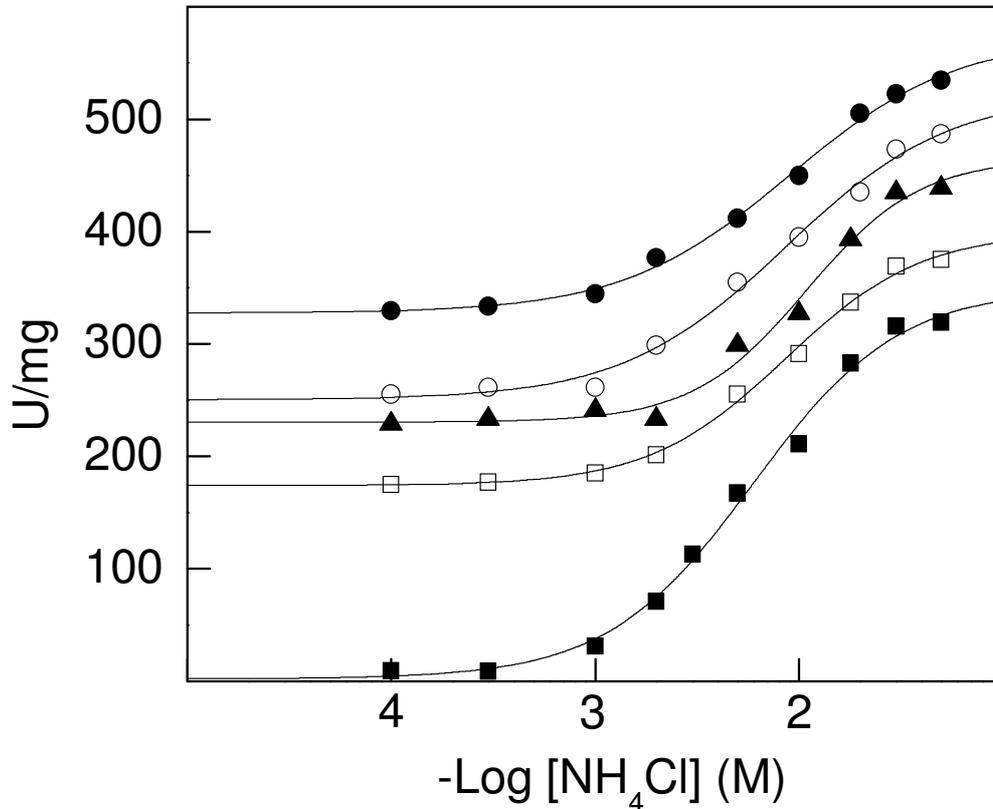
**Figura 9 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons potássio na presença de íons amônio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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. Concentrações de NH<sub>4</sub>Cl empregadas: 0 mM (■), 5 mM (□), 10 mM (▲), 30 mM (○) e 50 mM (●).



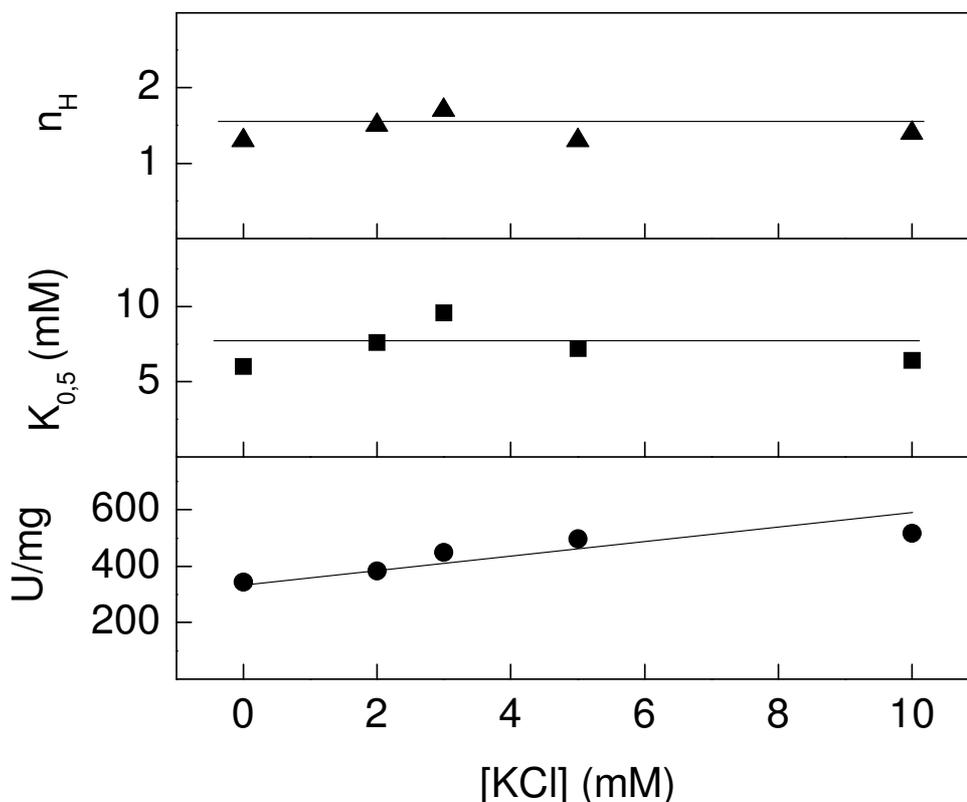
**Figura 10 – Variação dos parâmetros cinéticos para a modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons potássio na presença de íons amônio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFDH, 9 U FGQ e de concentrações fixas de íons amônio. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Todos parâmetros cinéticos foram obtidos de experimentos realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias.



**Figura 11 – Modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons amônio na presença de íons potássio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 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. Concentrações de KCl empregadas: 0 mM (■), 2 mM (□), 3 mM (▲), 5 mM (○) e 10 mM (●).



**Figura 12 – Variação dos parâmetros cinéticos para a modulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons amônio na presença de íons potássio em animais aclimatados a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U GAFDH, 9 U FGQ e de concentrações fixas de íons potássio. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Todos parâmetros cinéticos foram obtidos de experimentos realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias.

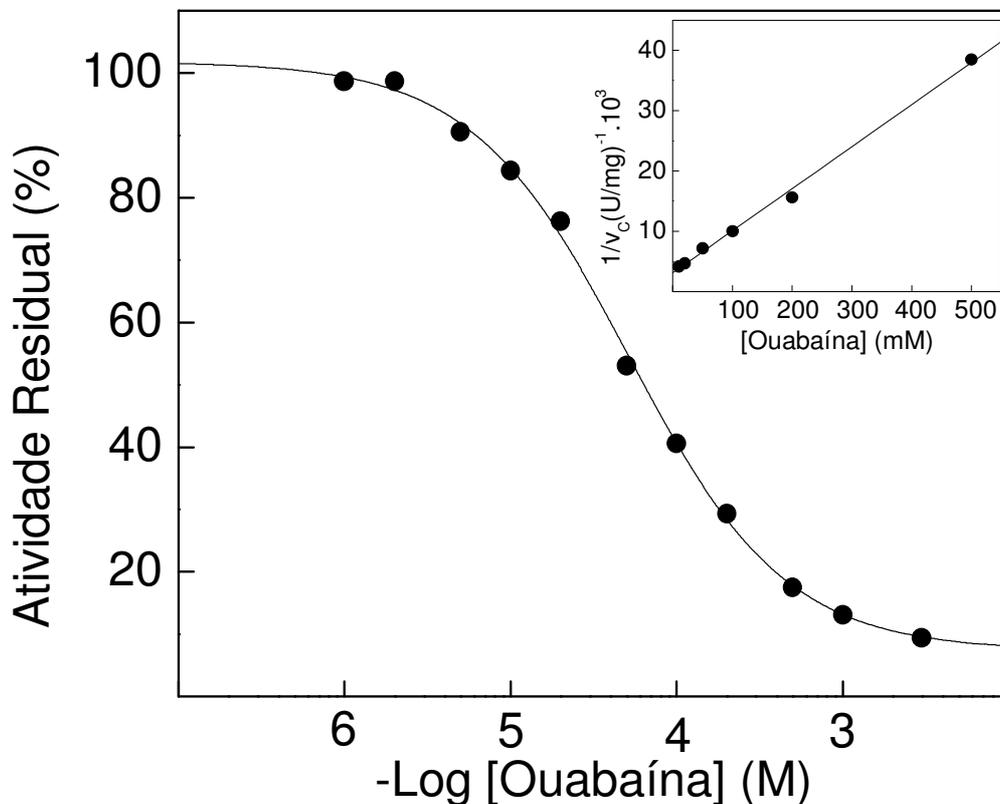
Os parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ pelos íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estão reunidos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ por íons potássio e amônio.**

A atividade da enzima foi medida usando 17,4 µg de proteína em tampão trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 100 mM, num volume final de 1,0 mL. Os dados representam a média ± desvio padrão e foram calculados usando-se três preparações diferentes (N= 3).

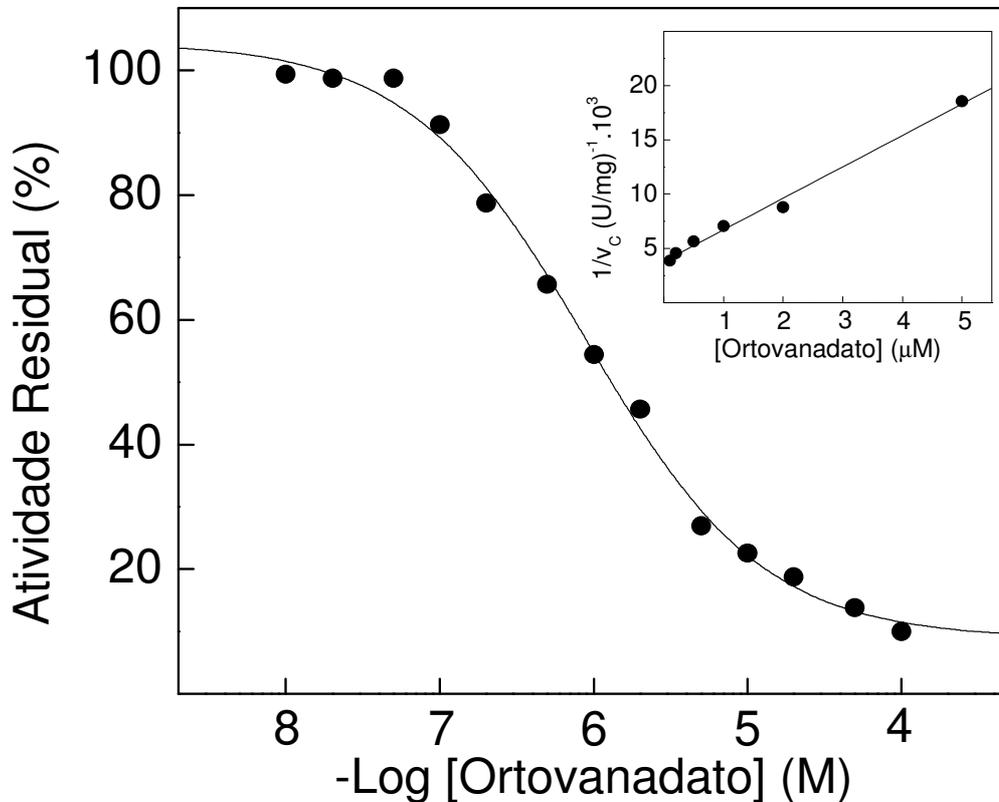
[KCl] (mM)	[NH <sub>4</sub> Cl] (mM)	V (U/mg)	K <sub>0,5</sub> (mM)	n <sub>H</sub>
Variável	0	300,6 ± 15,3	1,6 ± 0,1	1,7
Variável	5	398,7 ± 19,1	1,7 ± 0,1	1,5
Variável	10	426,7 ± 21,2	0,469 ± 0,023	1,3
Variável	30	480,9 ± 22,9	0,355 ± 0,017	2,0
Variável	50	514,6 ± 26,2	0,157 ± 0,008	1,1
0	Variável	345,1 ± 19,0	6,0 ± 0,3	1,3
2	Variável	384,5 ± 18,3	7,6 ± 0,36	1,5
3	Variável	448,9 ± 22,3	9,6 ± 0,5	1,7
5	Variável	496,9 ± 24,7	7,2 ± 0,4	1,3
10	Variável	516,8 ± 27,9	6,4 ± 0,3	1,4

A Figura 13 mostra o efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰. Concentrações de ouabaína da ordem de 3 mM inibiram cerca de 90% da atividade ATPase. O padrão de inibição corresponde ao modelo de um único sítio de ligação do inibidor à enzima e o valor de K<sub>I</sub>, estimado graficamente, foi de 45,1 ± 2,5 µM (inserção da Figura 13). Na presença de 50 mM de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, o valor de K<sub>I</sub> foi de 22,7 ± 1,1 µM (dados não mostrados).



**Figura 13 – Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade específica correspondente a 100% foi de 319,8 ± 17,7 U/mg. O experimento foi realizado 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.



**Figura 14 – Efeito da concentração de ortovanadato na atividade ATPase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15‰.**

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 17,4 μg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade específica correspondente a 100% foi de 319,78 ± 17,68 U/mg. O experimento foi realizado 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.

A inibição da atividade ATPase total dos microsomas de tecido branquial de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ por concentrações crescentes de ortovanadato é mostrada na Figura 14. Concentrações de ortovanadato da ordem de 100 µM inibiram a atividade em cerca de 90%, similarmente ao observado para a ouabaína. O valor de K<sub>I</sub> calculado a partir da representação de Dixon (inserção da Figura 14) foi da ordem de 1,31 ± 0,06 µM.

A fim de se estimar a porcentagem relativa dos diferentes tipos de contaminações presentes, a preparação microsomal foi ensaiada na presença de diferentes inibidores. Na Tabela 3 está representado o efeito desses vários inibidores sobre a atividade ATPase total dos microsomas de tecido branquial de *Callinectes danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰.

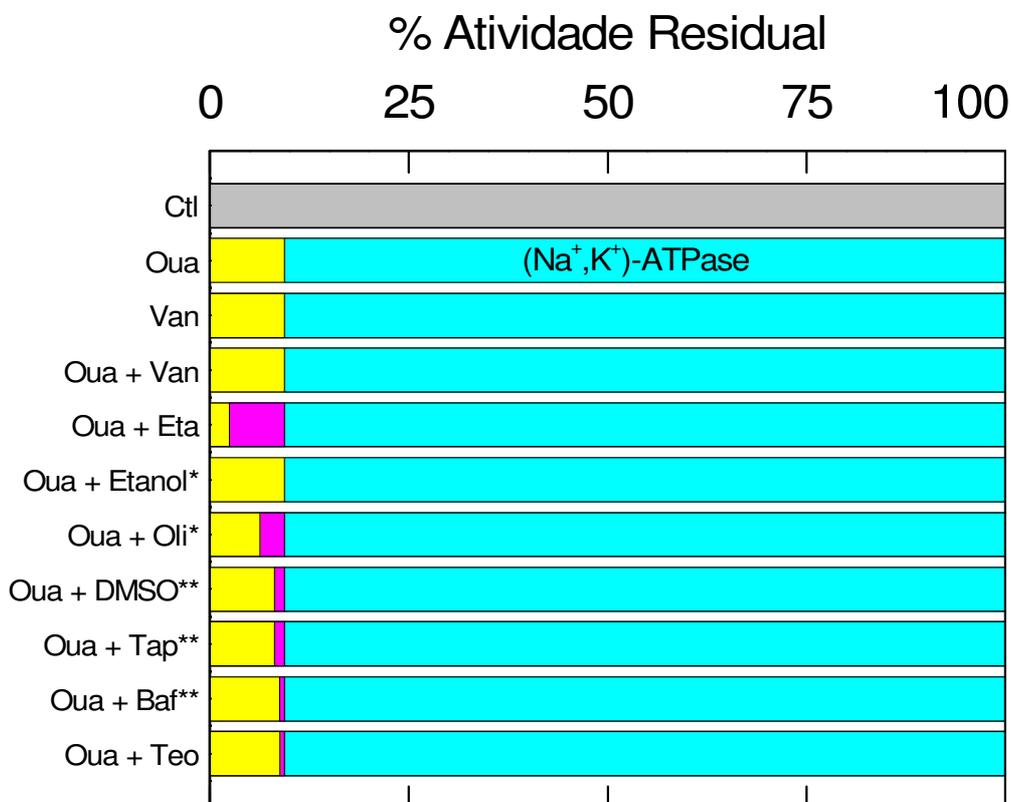
**Tabela 3 - Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15‰**

A atividade da fração microsomal foi realizada usando-se 17,4 µg de proteína em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM e KCl 10 mM 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).

<b>Inibidor</b>	<b>Atividade residual (%)</b>	<b>V (U/mg)</b>
Controle	100	319,8 ± 17,7
Ouabaína (3 mM)	9,4	29,9 ± 1,8
Ortovanadato (0,1 mM)	10,0	31,9 ± 1,5
Ouabaína (3 mM) + Ortovanadato (0,1 mM)	9,4	30,9 ± 2,1
Ouabaína (3 mM) + Teofilina (5mM)	8,8	28,2 ± 1,4
Ouabaína (3 mM) + Ácido etacrínico (2 mM)	2,5	7,9 ± 0,43
Ouabaína (3 mM) + Oligomicina (1 µg/mL)	6,2	19,9 ± 1,2
Ouabaína (3 mM) + Tapsigargina (0,5 µM)	8,1	25,9 ± 1,3
Ouabaína (3 mM) + Bafilomicina A <sub>1</sub> (0,4 µM)	8,7	27,9 ± 1,7
Ouabaína (3 mM) + Etanol	8,1	25,9 ± 1,4
Ouabaína (3 mM) + DMSO	9,4	29,9 ± 1,7

Em condições saturantes de ATP e de íons  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  e na ausência de inibidores, a atividade da enzima foi de  $319,78 \pm 17,68$  U/mg. Comparado com o valor da atividade residual obtida na presença de  $100 \mu M$  de ortovanadato ( $31,98 \pm 1,91$  U/mg), sugere que aproximadamente 90% da atividade ATPase medida corresponde a uma ATPase do tipo P. Por outro lado, a atividade insensível à ouabaína (atividade residual em presença de ouabaína  $3$  mM) corresponde a  $29,99 \pm 1,77$  U/mg, sugerindo fortemente que a atividade P-ATPase inibida por ortovanadato corresponde à atividade da própria  $(Na^+, K^+)$ -ATPase. Já os inibidores bafilomicina  $A_1$ , a tapsigargina, a teofilina e a oligomicina não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade insensível a ouabaína, sugerindo que a fração de membranas não apresenta atividade V-ATPase,  $(Ca^{2+})$ -ATPase, fosfatases ou  $F_0F_1$ -ATPase, respectivamente. Embora a inibição de cerca de 7,5% da atividade insensível a ouabaína pelo ácido etacrínico  $2,0$  mM, sugere a presença de uma  $(Na^+)$ -ATPase e/ou  $(K^+)$ -ATPase, os dados das figuras 6 e 7, descartam inequivocamente a possibilidade da preparação estar contaminada por uma atividade ATPase estimulada por  $Na^+$ .

A Figura 15 resume de uma maneira bastante clara os efeitos dos diferentes inibidores na preparação microsomal de brânquias de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰.



**Figura 15 – Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15‰.**

A atividade da fração microsomal foi realizada usando-se 17,4 µg de proteína em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 2 mM de ATP, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl e 10 mM 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (■). Ctl: controle, Oua: ouabaína, Van: ortovanadato, Eta: ácido etacrínico, Oli: oligomicina, DMSO: dimetilsulfóxido, Tap: tapsigargina, Baf: bafilomicina e Teo: teofilina.

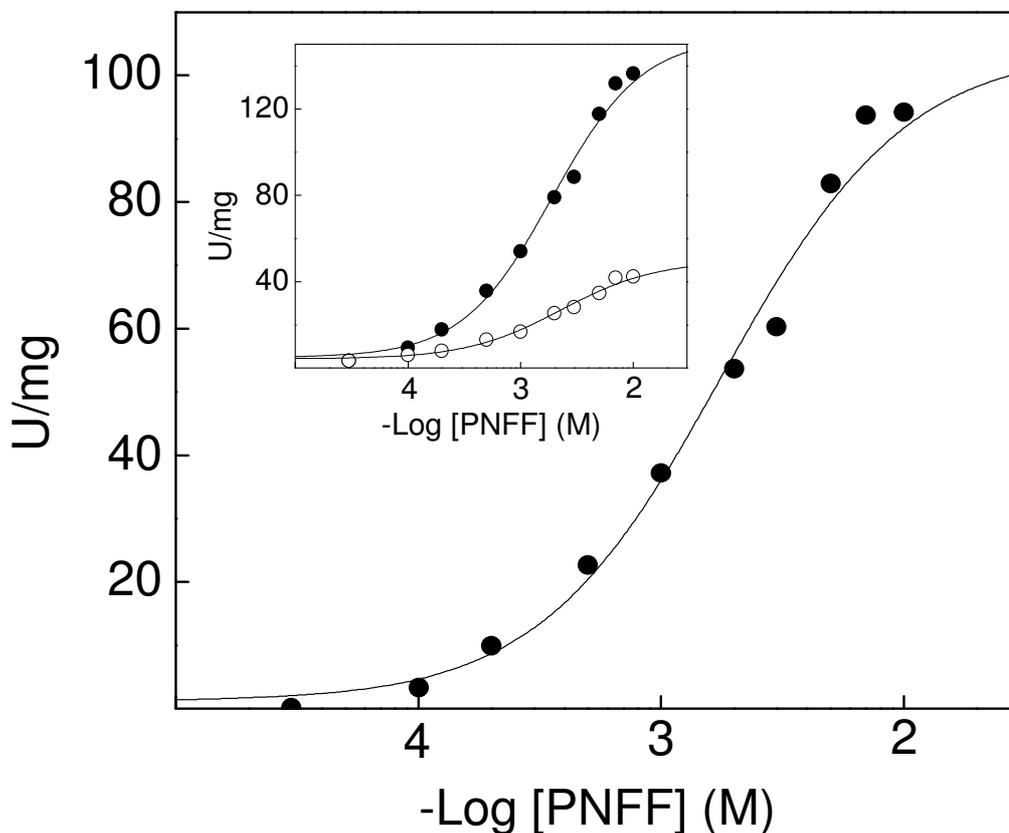
### 3.1 –Caracterização da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.

A Figura 16 mostra o efeito da concentração do PNFF sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae*. Em condições saturantes de íons Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>, a estimulação da atividade da enzima pelo PNFF ocorreu através de simples curva de saturação que apresentou características cooperativas ( $n_H = 1,2$ ). A atividade específica observada foi de  $102,9 \pm 4,3$  U/mg e o valor de  $K_M$  foi  $1,7 \pm 0,1$  mM. A atividade basal para estimulação da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase pelo PNFF foi desprezível (< 1 %). Na inserção é mostrado o efeito do aumento da concentração de PNFF na atividade PNFFase total e na atividade insensível a ouabaína.

A modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* pelos íons magnésio é mostrada na Figura 17. Em condições saturantes de PNFF e KCl, concentrações de íons Mg<sup>2+</sup> variando entre  $10^{-4}$  M e  $10^{-2}$  M estimularam a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da preparação. A curva de saturação monofásica, apresentando interações sítio-sítio ( $n_H = 1,2$ ) resultou em uma atividade específica de  $93,7 \pm 2,3$  U/mg e o valor de  $K_M$  foi  $1,4 \pm 0,03$  mM. Na inserção é mostrado o efeito do aumento da concentração de íons magnésio na atividade PNFFase total e na atividade insensível a ouabaína.

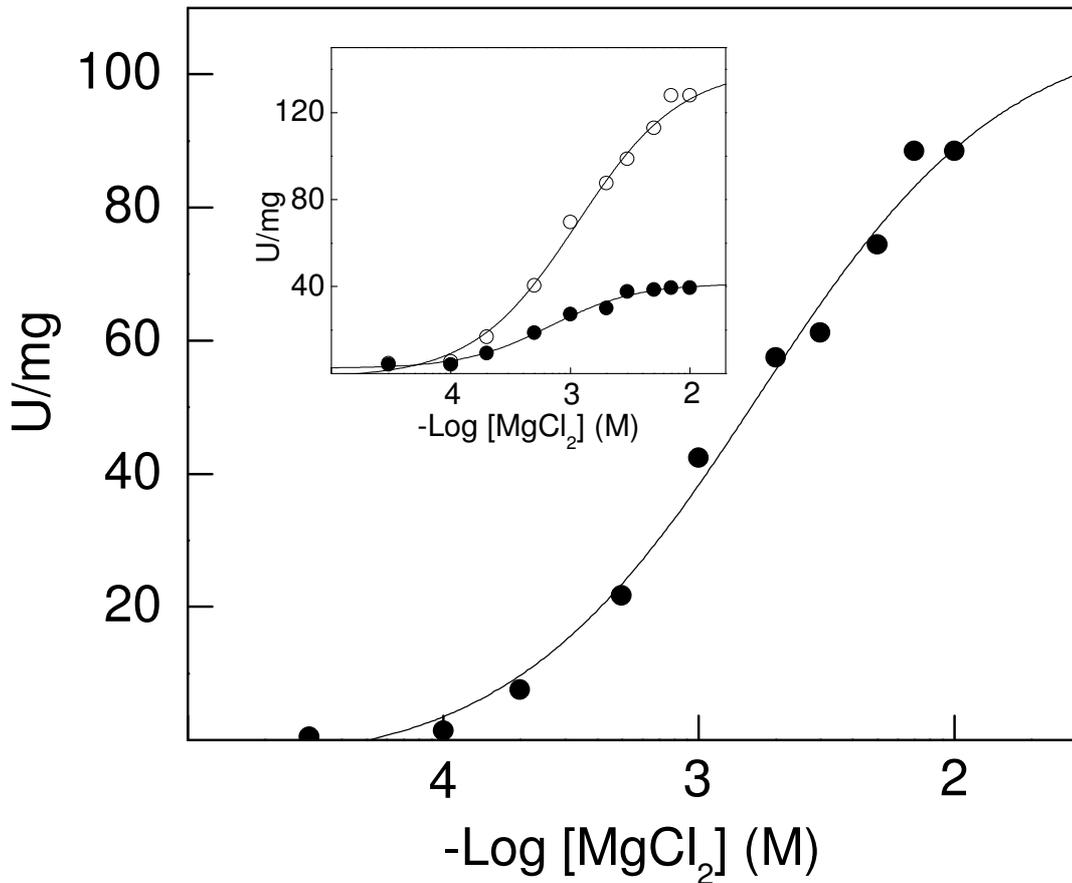
A figura 18 mostra a modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* pelos íons potássio. Em condições saturantes de PNFF e íons Mg<sup>2+</sup>, na ausência de íons amônio, a estimulação da atividade da enzima pelos íons K<sup>+</sup> ocorreu de acordo com uma cinética cooperativa ( $n_H = 1,8$ ). O valor de  $K_{0,5}$  estimado nessas condições foi de  $2,9 \pm 0,1$  mM, e a atividade específica foi  $94,9 \pm 3,5$  U/mg. Concentrações superiores a 20 mM em íons K<sup>+</sup> provocaram inibição da atividade da enzima. A atividade basal encontrada foi de aproximadamente  $0,6 \pm 0,022$  U/mg. Na inserção é mostrado o efeito do aumento da concentração dos íons potássio na atividade PNFFase total e na atividade insensível a ouabaína.

O efeito da concentração dos íons amônio sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos microsomas de brânquias de *Callinectes danae* é mostrado na figura 19. No intervalo de concentração de íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> entre  $10^{-3}$  M a  $10^{-1}$  M, a enzima apresentou interações sitio-sítio ( $n_H = 2,9$ ) e a atividade específica máxima foi  $106,2 \pm 2,2$  U/mg com  $K_{0,5}$  da ordem de  $9,8 \pm 0,2$  mM. Concentrações de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> superiores a 60 mM provocaram inibição da atividade da enzima (resultados não mostrados). A ati-



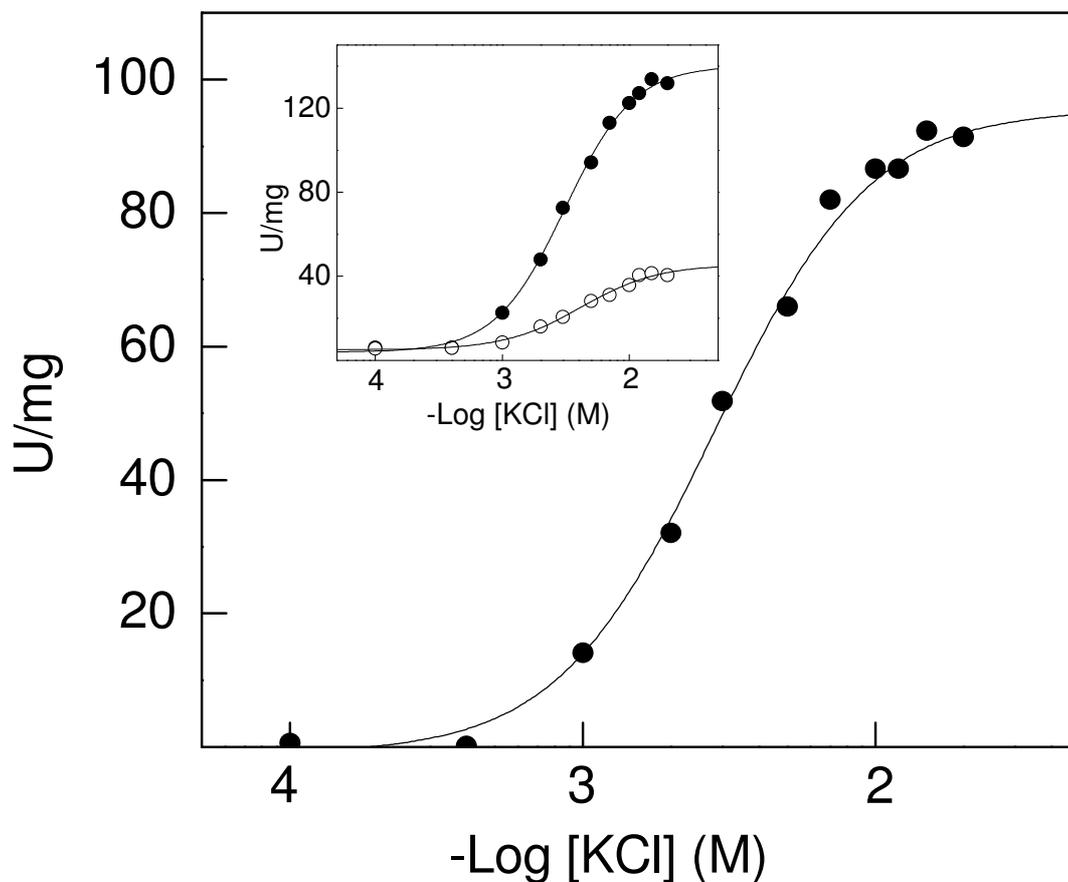
**Figura 16 – Modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelo PNFF.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFFase total (●) e insensível à ouabaína (○).



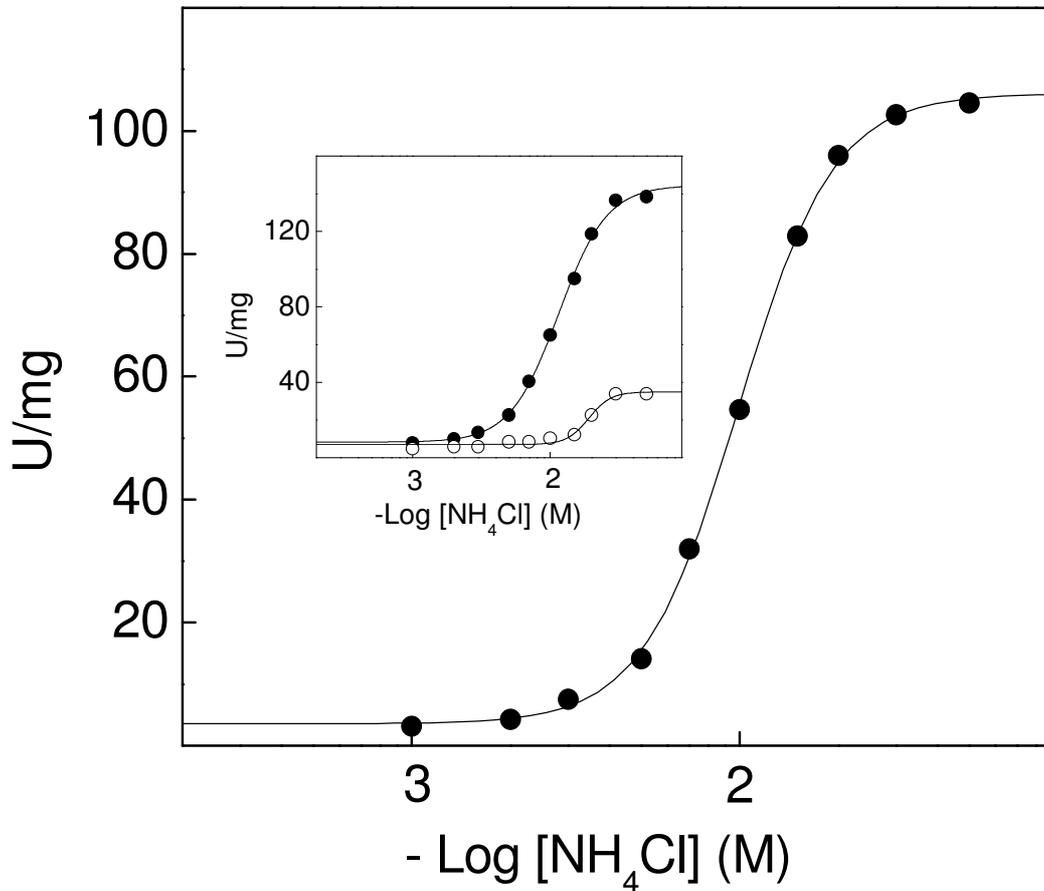
**Figura 17 – Modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons magnésio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFFase total (○) e insensível à ouabaína (●).



**Figura 18 – Modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons potássio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFFase total (●) e insensível à ouabaína (○).



**Figura 19 – Modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons amônio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFFase total (●) e insensível à ouabaína (○).

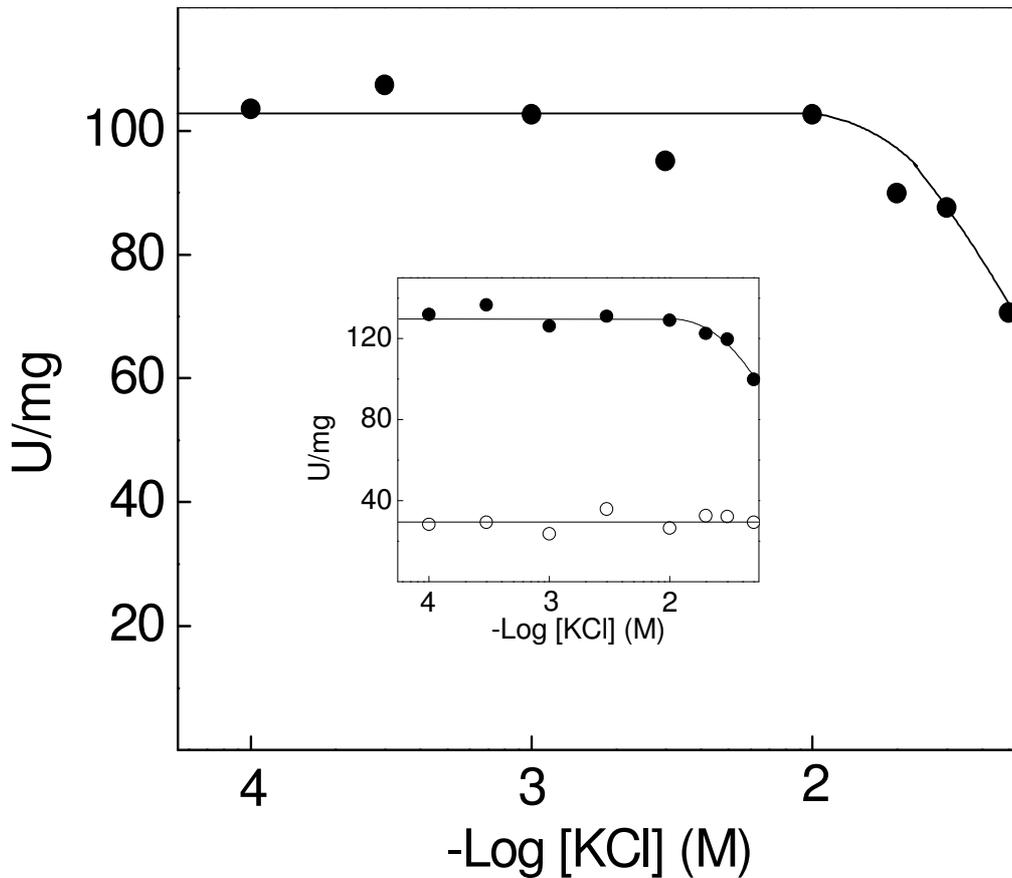
vidade basal foi considerada desprezível ( $3,11 \pm 0,06$  U/mg) . Na inserção é mostrado o efeito do aumento da concentração dos íons amônio na atividade PNFFase total e na atividade insensível a ouabaína.

A figura 20 mostra a modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* pelos íons potássio. Em condições saturantes de PNFF e íons Mg<sup>2+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, não foi observada nenhuma estimulação da atividade da enzima pelos íons K<sup>+</sup>. Observa-se que entre 10<sup>-4</sup> M e 10<sup>-2</sup> M para os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a atividade máxima foi de  $103,6 \pm 4,6$  U/mg, uma vez que a enzima já está totalmente saturada pelos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Concentrações superiores a 20 mM de íons K<sup>+</sup> provocaram inibição da atividade da enzima. Na inserção é mostrado o efeito do aumento da concentração dos íons potássio na atividade PNFFase total e na atividade insensível a ouabaína.

O efeito da concentração dos íons amônio sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos microsomas de brânquias de *Callinectes danae* é mostrado na figura 21. Similarmente, os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não provocaram nenhuma estimulação da atividade da enzima, em condições saturantes de PNFF, e de íons Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>. No intervalo entre 10<sup>-4</sup> M e 10<sup>-2</sup> M, a atividade máxima foi  $102,6 \pm 3,8$  U/mg e esse valor é justificado uma vez que a enzima está saturada pelos íons K<sup>+</sup>. Concentrações de íons amônio superiores a 80 mM provocaram inibição da atividade da enzima. Na inserção é mostrado o efeito dos íons amônio nas atividades PNFFase total e insensível à ouabaína.

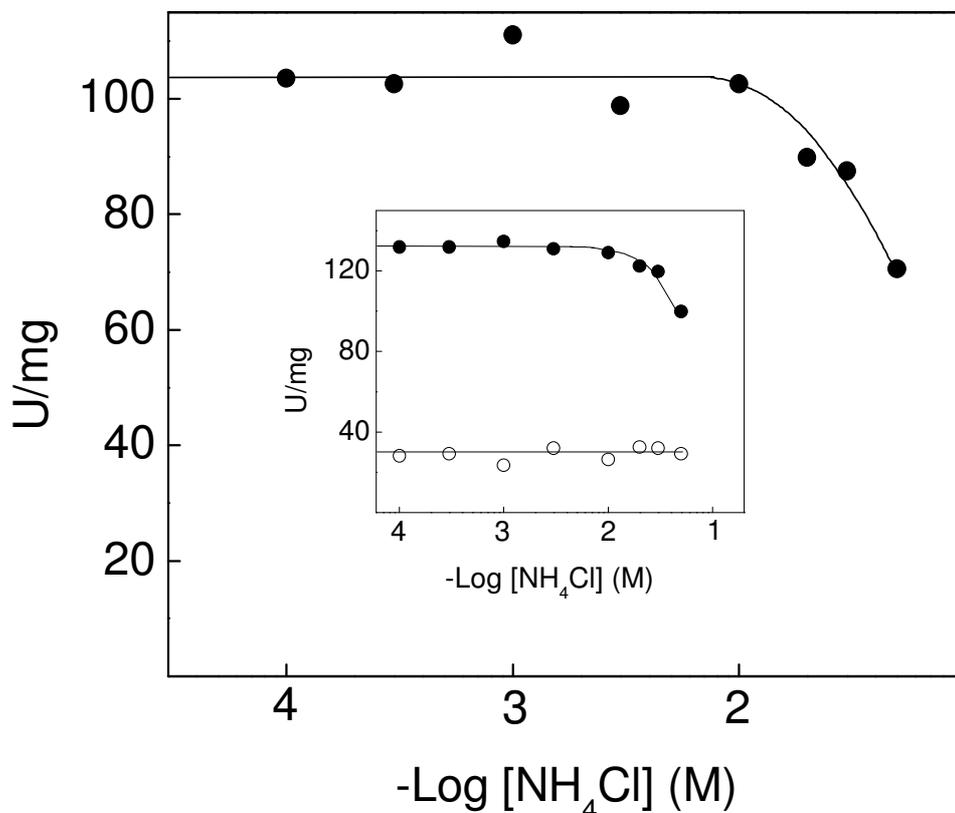
O efeito da concentração dos íons sódio sobre a atividade PNFFase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* é mostrado na Figura 22. Na presença de condições saturantes de PNFF e de íons magnésio e potássio, os íons Na<sup>+</sup> atuaram como inibidores da atividade da enzima para concentrações superiores a 10<sup>-2</sup> M. Concentrações de íons sódio da ordem de 100 mM inibiram completamente a atividade da enzima. Na inserção é mostrada a representação de Dixon para a determinação de K<sub>I</sub>, que é da ordem de  $22,7 \pm 1,7$  mM.

A tabela 4 resume os valores dos parâmetros cinéticos estimados para a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* em relação aos diferentes efetores.



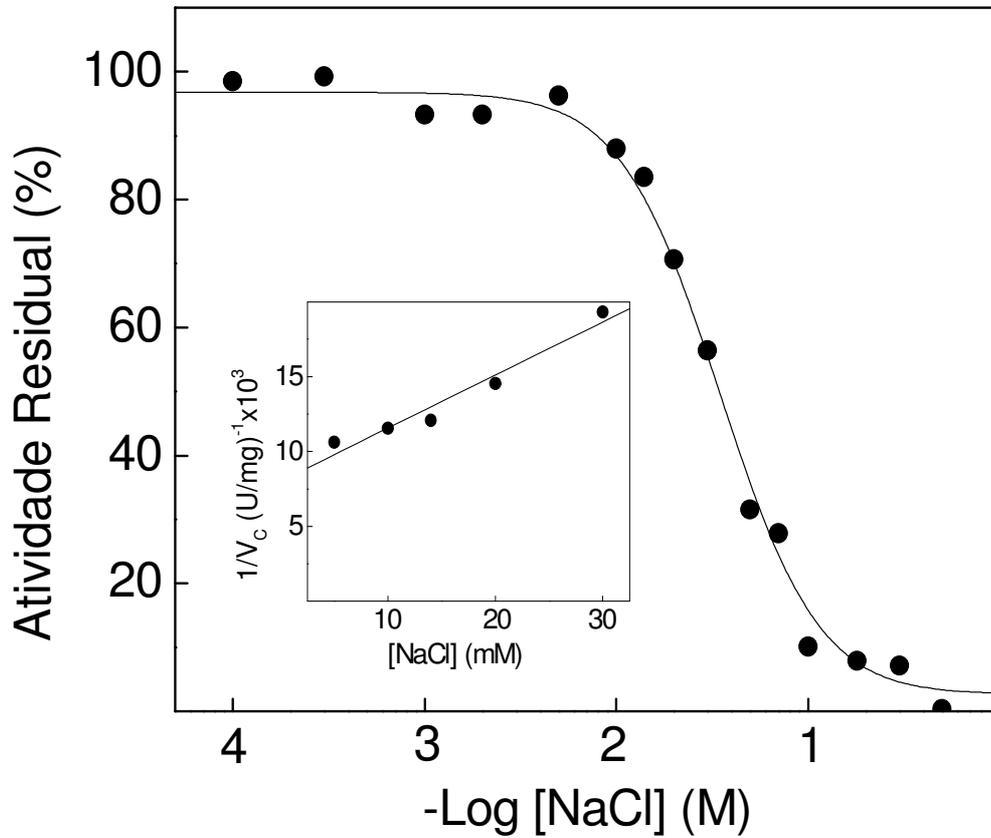
**Fig 20 – Modulação da atividade PNFase da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons potássio, na presença de ions amônio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNF 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4  $\mu\text{g}$  de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFase total (●) e insensível à ouabaína (○).



**Figura 21 – Modulação da atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* pelos íons amônio na presença de íons potássio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNFFase total (●) e insensível à ouabaína (○).



**Figura 22 – Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNFFase da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4  $\mu\text{g}$  de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade na ausência de inibidor corresponde a  $132,8 \pm 9,94$  U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon.

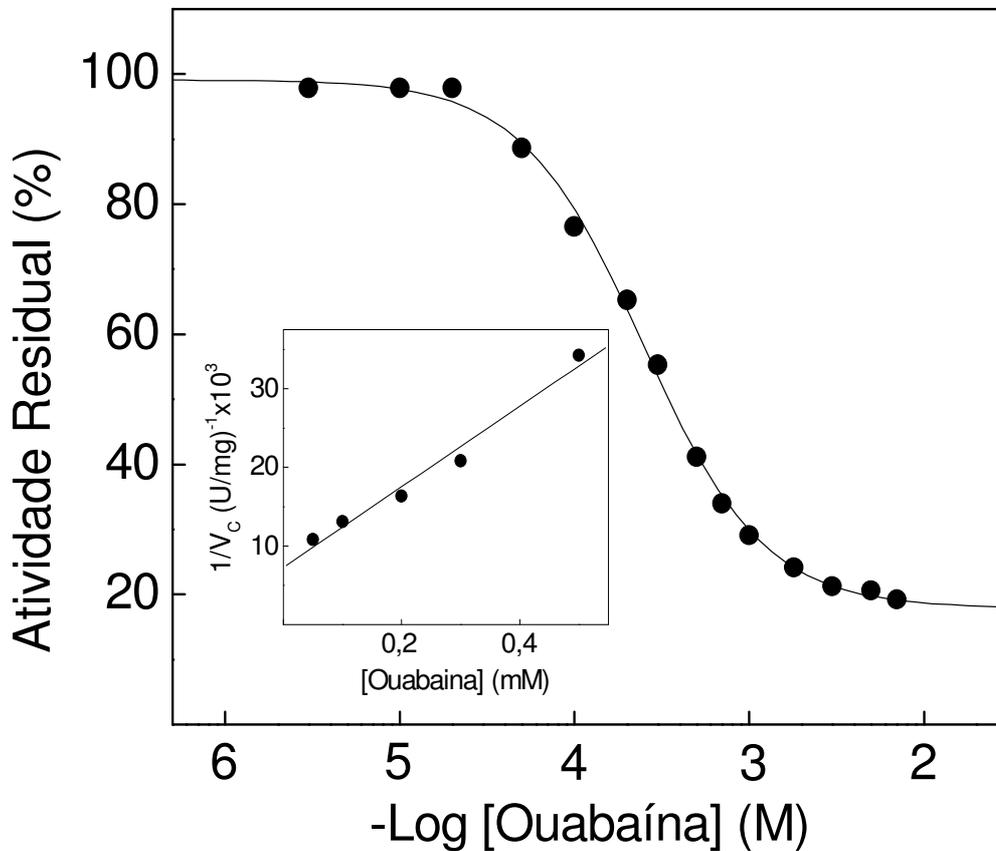
**Tabela 4 - Parâmetros cinéticos estimados para a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* em relação a diferentes efetores.**

A atividade da fração microsomal foi estimada usando-se 16,4 µg de proteína em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 10 mM de PNFF, e os diferentes efetores num volume final de 1,0 mL. Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão e foram calculados a partir de pelo menos três preparações diferentes (N= 3).

<b>Efedor</b>	<b>V (U/mg)</b>	<b>K<sub>0,5</sub> (mM)</b>	<b>n<sub>H</sub></b>
PNFF	102,9 ± 4,3	1,7 ± 0,1	1,2
Mg <sup>2+</sup>	93,7 ± 2,3	1,4 ± 0,03	1,2
K <sup>+</sup>	94,9 ± 3,5	2,9 ± 0,1	1,8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	106,2 ± 2,2	9,8 ± 0,2	2,9

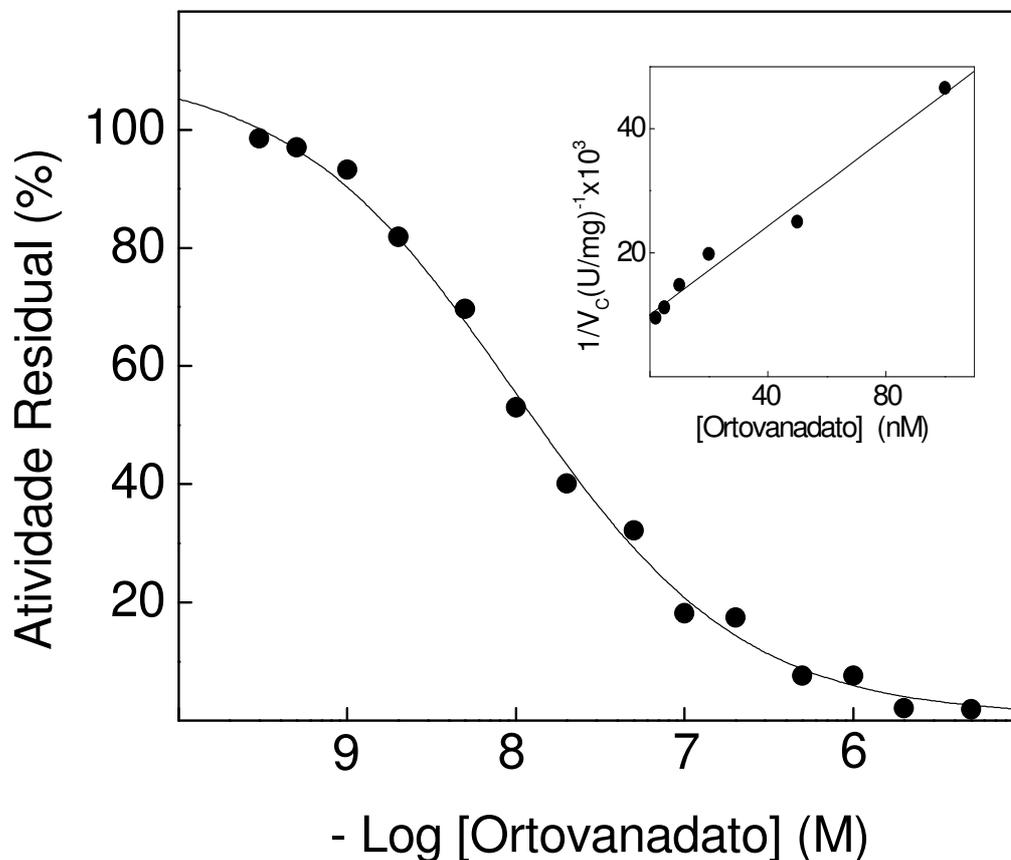
A Figura 23 mostra o efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*. Na presença de concentrações saturantes de PNFF e de íons magnésio e potássio, uma única curva foi observada no intervalo de concentração de ouabaína entre 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-3</sup> M. Concentrações da ordem de 3 mM de ouabaína inibiram aproximadamente 75% da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase. Na inserção é mostrada a representação de Dixon para a determinação do valor de K<sub>I</sub>, que foi da ordem de 142,0 ± 7,1 µM.

O efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. danae* está mostrado na figura 24. Em condições saturantes de PNFF e de íons Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>, o ortovanadato inibiu a totalmente a atividade fosfatase da enzima. Na inserção é mostrada a representação de Dixon para a determinação do K<sub>I</sub>, que é da ordem de 28,1 ± 1,4 nM.



**Figura 23 – Efeito da concentração de íons ouabaína sobre a atividade PNFFase da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4  $\mu\text{g}$  de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade na ausência de inibidor corresponde a  $131,8 \pm 5,7$  U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon.



**Figura 24 – Efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade PNFFase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae*.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 16,4 µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade na ausência de inibidor corresponde a 131,8 ± 5,7 U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** representação de Dixon.

## 4.0 – DISCUSSÃO

### 4.1 – Estudo da fração microsomal.

A relação existente entre a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial medida em diferentes espécies de crustáceos e o processo de regulação osmótica e iônica desses animais em relação à exposição desses organismos a ambientes de salinidade variável tem sido objeto de estudo de vários autores (Harris & Bayliss, 1988; Péqueux, 1995; Piller et al., 1995; Corotto & Holliday, 1996; Lima et al., 1997; Lucu & Flik, 1999; Lucu & Devescovi, 1999; Flik & Haond, 2000; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003; Furriel et al., 2004; Leone et al., 2005b). Contudo, pouco se conhece a respeito das características cinéticas da enzima obtida nesses animais (Furriel et al., 2001). Além de participar do processo de captura ativa de íons Na<sup>+</sup> para a homeostase osmo-iônica, a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase encontrada no epitélio branquial também pode desempenhar um papel crucial na excreção de compostos nitrogenados nos crustáceos (Péqueux, 1995; Weihrauch et al, 1999, 2002, 2004; Towle & Weihrauch, 2001; Masui et al., 2002, 2003; Furriel et al., 2004; Kirschner, 2004; Leone et al., 2005b).

O único pico protéico obtido para os microsomas analisados em gradiente contínuo de sacarose (pico entre 30 e 40 % de sacarose) foi similar ao encontrado para *Callinectes danae* recém-capturado à salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2003) e também para o camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2001). Similarmente ao observado para *C. danae* recém-capturado a 33 ‰ de salinidade (Masui et al., 2002, 2003), a análise das atividades PNFFase total (Masui et al., 2005a) e ATPase total do animal aclimatado à salinidade de 15‰ mostraram a presença de um pico único de atividade. A inibição parcial das atividades ATPase total e PNFFase total por ouabaína sugere a presença de outras ATPases e/ou fosfatases. Isto também foi observado por Furriel et al. (2000) em *M. olfersii*, mas difere dos resultados obtidos para a enzima de *C. danae* em animais recém-capturados a 33 ‰ de salinidade em que se observou inibição total pela ouabaína (Masui et al., 2002, 2003).

Os microsomas de tecido branquial obtidos de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰ apresentaram uma atividade ATPase insensível à ouabaína correspondente a aproximadamente 10% da atividade ATPase total. Atividades ATPase insensíveis à ouabaína também foram demonstradas para microsomas provenientes do tecido branquial de outros caranguejos braquiúros, sendo freqüentemente descrita a presença de outras enzimas tais como Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Wheatly, 1999), Na<sup>+</sup>-ATPase e/ou K<sup>+</sup>-

ATPase (Proverbio et al., 1991) além de fosfatases (Lovett et al., 1994). Entretanto, para *C. danae* recém-capturado a salinidade de 33 ‰, as atividades ATPase e PNFFase medidas correspondem unicamente à (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Masui et al., 2002, 2003).

A presença de uma única banda imuno-específica, com Mr da ordem de 110 kDa dos microsomas de tecido brânquial de *C. danae* obtidos a partir de animais recém-capturados na salinidade de 33 ‰ e de animais aclimatados às salinidades de 15‰ e 33‰ sugere a presença de uma única isoforma da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em cada uma dessas condições. Valores de Mr semelhantes foram relatados para a enzima de várias fontes (Pressley, 1996; Furriel et al., 2000; Donnet et al., 2001; Towle et al., 2001; Masui et al., 2002, 2005a; Lucu & Towle, 2003). É importante destacar que mesmo empregando quantidades semelhantes de proteína (30µg) foi observada uma diferença significativa de marcação o que sugere mudanças quantitativas na expressão da enzima do tecido branquial em cada condição de aclimação específica. Medidas da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de tecido branquial de *Carcinus maenas* realizadas por Henry et al. (2002) mostraram atividades específicas similares em animais aclimatados às salinidades de 32 ‰ e a 10 ‰, o que poderia indicar a ocorrência de mecanismos de resposta rápida a flutuações constantes de salinidade do ambiente modulando a atividade da enzima já presente no tecido branquial e portanto a captura ativa de íons. Já os dados relatados para *Callinectes sapidus* mostram aparentemente que animais aclimatados as salinidades de 35‰ e 5‰ não apresentam mudanças notáveis nas proporções relativas de mRNA e de proteína da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores (Towle et al., 2001). Em *Pachygrapsus marmoratus* e *Chasmagnathus granulatus*, respondem a um aumento nas proporções relativas de mRNA durante a aclimação a mudança para uma menor salinidade (Lucu & Towle, 2003; Luquet et al., 2005).

#### 4.2 – Caracterização da atividade ATPase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.

A atividade específica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase encontrada em crustáceos estuarinos ou de água doce varia desde valores de aproximadamente 100 até 600 U/mg (Neufeld et al., 1980; D’Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Lucu & Pavicic, 1995; Piller et al., 1995; Corotto & Holliday, 1996; Furriel et al., 2000, 2004). A atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase encontrada em *C. danae* aclimatado à salinidade de c (V= 298,83 ± 16,73 U/mg) foi semelhante à observada para os animais recém-capturados a 33‰ de

salinidade (Masui et al., 2002). Esse valor é relativamente menor quando comparado ao obtido para a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980; Lovett & Watts, 1995; Lucu et al., 2000; Lucu & Towle, 2003). Curiosamente, esse valor de atividade é muito similar aos obtidos para outras espécies aclimatadas à água do mar (Harris & Bayliss, 1988; D'Orazio & Holliday, 1985; Lucu et al., 2000). Estudos realizados em outras espécies de caranguejos mostraram que a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial aumenta em resposta a aclimação a baixa salinidade (Holliday, 1985; D'Orazio & Holliday, 1985; Harris & Bayliss, 1988; Corotto & Holliday, 1996; Henry et al, 2002). Apesar dessas medidas mostrarem claramente a relação entre a adaptação à salinidade do meio e a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial, as diferenças entre os valores relatados por diferentes autores podem estar associadas aos procedimentos empregados para obtenção da enzima, bem como para a determinação da atividade, ou ainda a características específicas de cada espécie. Deve-se considerar também que muitos dos valores citados representam determinações de atividade realizadas em condições de concentração de substrato e de íons arbitrariamente escolhidas sem a prévia caracterização cinética da enzima.

A modulação da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos vertebrados pelo ATP é caracterizada pela presença de uma família de sítios de alta afinidade com valores de K<sub>0,5</sub> compreendidos entre 0,1 e 1 µM, e outra família de sítios de baixa afinidade, com valores de K<sub>0,5</sub> entre 0,01 e 0,4 mM (Neufeld & Levy, 1969; Kanazawa *et al.*, 1970; Robinson, 1976; Glynn, 1985; Ward & Cavieres; 1993). No entanto, a caracterização desses sítios de alta afinidade ainda permanece controversa (Martin & Sachs, 2000), já que as atividades encontradas correspondem a menos de 10% da atividade total medida (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998; Masui et al., 2002). A ausência de sítios de alta afinidade para o ATP na enzima obtida de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ está de acordo com o encontrado para enzima de outros crustáceos (Gache et al., 1977; D'Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Tentes & Stratakis, 1991; Corotto & Holliday, 1996; Furriel et al., 2000; Lucu & Towle, 2003), mas contrasta com o relatado para a enzima obtida de *C. danae* recém-capturado, para a qual foi observada a presença de um sítio de alta afinidade para o ATP (Masui et al., 2002). O valor de K<sub>0,5</sub> encontrado para a estimulação da atividade da enzima obtida de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ pelo ATP mostrou para sítio de baixa afinidade foi da ordem de K<sub>0,5</sub> de 174,20 ± 9,75 µM. A atividade basal da enzima, dos animais aclimatados a salinidade de 15 ‰, correspondeu

a menos de 5,0 % da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. O emprego de técnicas mais sensíveis pode contribuir para elucidar a presença ou não de sítios de alta afinidade para o ATP na enzima obtida de *C. danae* aclimatado. O valor de K<sub>0,5</sub> para o ATP foi cerca de 3,17 vezes maior que o encontrado para a enzima obtida de animais recém-capturados (Masui et al, 2002), o que pode indicar a presença de uma isoforma diferente da enzima. Por outro lado, o valor de K<sub>0,5</sub> para o ATP de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰ mostrou-se semelhante aos valores obtidos para outras espécies de crustáceos aclimatados a água doce, como o encontrado nos microsomas de brânquias de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e no homogeneizado de brânquias de *Macrobrachium rosenbergii* (Wilder et al., 2000), sugerindo a presença de uma mesma isoforma entre essas espécies em ambiente menos salino. Todavia, valores da mesma ordem de grandeza também foram observados para a enzima de membrana axonal do caranguejo marinho *Cancer pagurus* (Balerna et al., 1975; Gache et al., 1977). Interessantemente, o valor de K<sub>0,5</sub> encontrado em homogeneizado de brânquias de *C. sapidus* aclimatado a água do mar (Neufeld et al., 1980; Lucu & Towle, 2003) foi da mesma magnitude. Constantes de afinidade para o ATP com valores 9,0 vezes maiores foram encontrados nos homogeneizados de brânquias de *Potamom potamios* aclimatados a água doce (Tentes & Stratakis, 1991), de *Uca minax* (Wanson et al., 1984) e glândulas renais de *Procambarus clarkii* (Sarver et al., 1994). Valores de K<sub>0,5</sub> para o ATP de aproximadamente 600 μM foram observados para a enzima obtida de homogeneizados de brânquias de *U. pugnax* (Holliday, 1985), de *Uca pugilator* (D'Orazio & Holliday, 1985) e de *Hemigrapsus nudus* (Corotto & Holliday, 1996) aclimatados a 100% de água do mar. Estudos realizados empregando frações de membrana do tecido branquial de *Eriocheir sinensis*, mostraram que aparentemente não ocorreram diferenças significativas entre os valores de K<sub>0,5</sub> para o ATP em animais aclimatados a água doce ou água do mar (Péqueux, et al., 1984).

O complexo Mg-ATP é o verdadeiro substrato da enzima, e a presença dos íons Mg<sup>2+</sup> é essencial para a hidrólise do ATP (Glynn, 1985; Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002). Ainda não está estabelecido qual é o número de sítios de ligação para os íons magnésio na molécula da enzima e nem os passos da reação de hidrólise que são afetados por estes íons (Glynn, 1985; Jorgensen & Pedersen, 2001). Aparentemente, os íons magnésio atuam de forma crucial nas mudanças conformacionais envolvidas na hidrólise do ATP e no transporte dos íons sódio e potássio (Grisham & Mildvan, 1974; Jorgensen et al., 1998a, 2001, 2003; Patchornik et al., 2002). O valor de K<sub>0,5</sub> para os íons magnésio

obtido para enzima de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ ( $767,31 \pm 36,06 \mu\text{M}$ ) é semelhante ao encontrado para a enzima dos animais recém-capturados (Masui et al., 2002). Esse valor de  $K_{0,5}$  foi similar ao encontrado para enzima obtida do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e é semelhante ao obtido para *C. sapidus* aclimatado a 100% de água do mar (Neufeld et al., 1980) e para a enzima de membrana axonal de *C. pagurus* (Gache et al., 1976). Entretanto, contrasta com o valor obtido para enzima do caranguejo de água doce *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), com  $K_{0,5}$  de 4,0 mM. Valores elevados de  $K_{0,5}$  para os íons  $\text{Mg}^{2+}$  foram encontrados para *H. nudus* (Corotto & Holliday, 1996), *U. pugilator* (D'Orazio & Holliday, 1985) e *U. pugnax* (Holliday, 1985), e também para a enzima do tecido renal de *P. clarkii* (Sarver et al., 1994), quando os animais foram aclimatados à água do mar. Da mesma forma que observado para enzima dos microsomas de brânquias de *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002, 2005b) e para a enzima de membrana axonal de *C. pagurus* (Gache et al., 1976), a modulação da atividade ATPase da enzima pelos íons  $\text{Mg}^{2+}$  sugere a presença de múltiplos sítios ligantes.

A  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  dos vertebrados apresenta diferentes isoformas para a subunidade  $\alpha$  que apresentam afinidades distintas pelos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al 2001; Lopez et al., 2002). Além disso, as isoenzimas constituídas pela mesma isoforma da subunidade  $\alpha$  em associação com diferentes isoformas da subunidade  $\beta$  também apresentam diferentes afinidades por estes íons (Blanco et al., 1998; Therien et al., 1996; Geering, 2001). As diferenças nas afinidades da enzima pelos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  aparentemente são dependentes do tecido e do organismo em que são expressas, sugerindo que fatores da membrana ou pós-traducionais participam da regulação das propriedades cinéticas da enzima (Sweadner, 1989; Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Lopez et al., 2002).

Os crustáceos aquáticos bem adaptados a meios diluídos desenvolveram várias estratégias para manter a osmolalidade de seus fluidos extracelulares relativamente constante frente a mudanças de salinidade do meio (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004). Dentre essas estratégias destaca-se o aumento da afinidade por íons sódio na  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  importante para a captura ativa desses íons em ambientes menos salinos (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003). A  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  dos crustáceos de água doce apresenta maior afinidade aparente por íons  $\text{Na}^+$  que

aquelas dos crustáceos de água salobra; essa afinidade é ainda menor para a enzima dos crustáceos marinhos (Lucu & Towle, 2003). A constante de afinidade aparente obtida para estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase pelo íon Na<sup>+</sup>, para enzima obtida de frações de membrana do tecido branquial de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ de salinidade, é semelhante ao valor da constante de afinidade observado para a enzima de *C. danae* recém-capturado a 33 ‰ de salinidade (Masui et al., 2002). Resultados análogos foram encontrados por Genovese et al. (2004) em *Chasmagnathus granulata*, onde os valores de K<sub>0,5</sub> para os íons Na<sup>+</sup> foram aproximadamente iguais para as enzimas de animais aclimatados a 10, 30 ou 45 ‰ de salinidade. Além disso, o valor de K<sub>0,5</sub> encontrado para *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ foi similar ao encontrado para *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *M. rosenbergii* (Wilder et al., 2000). Curiosamente, Harris & Bayliss (1988) encontraram para a enzima branquial de *C. maenas* um valor de K<sub>0,5</sub> para os íons Na<sup>+</sup> menor em animais aclimatados a 100 ‰ de água do mar em relação aos animais aclimatados a 40 ‰. Siebers et al. (1983), relataram, porém, para a mesma espécie, um aumento da afinidade da enzima por esses íons quando os animais foram aclimatados a salinidade de 10 ‰. Afinidades para os íons Na<sup>+</sup> variando de 0,06 a 0,26 mM foram também relatados para outras espécies de crustáceos (Harris & Bayliss, 1988).

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase dos vertebrados apresenta constantes de afinidade para os íons K<sup>+</sup> que variam muito pouco entre as isoenzimas, e que oscilam entre 0,5 a 2,5 mM (Robinson & Pratap, 1991; Levenson, 1994; Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Specht et al., 1997). O valor de K<sub>0,5</sub> observado para os íons K<sup>+</sup> para a enzima de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ de salinidade foi similar ao encontrado para animais recém-capturados a 33 ‰ (Masui et al., 2002, 2005b) e está em concordância com aqueles encontrados para a enzima branquial de *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2000). Valores similares foram observados para a enzima das brânquias de *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980) e para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* (Gache et al., 1976). Constantes de afinidades para os íons K<sup>+</sup> elevadas também foram encontrados para animais mantidos em 100 ‰ de água do mar (Neufeld et al., 1980; Corotto & Holliday, 1996; Holliday, 1985; D'orazio & Holliday, 1985; Winkler, 1986; Wanson et al., 1984). A presença de múltiplos sítios de ligação para os íons potássio (n<sub>H</sub>= 1,7) também foi relatada para membrana axonal de caranguejo (Gache et al., 1976). Estes resultados contrastam com o comportamento “Michaeliano” observado

para a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase obtida de *U. pugnax* (Holliday, 1985) e de *U. pugilator* (D'Orazio & Holliday, 1985).

A substituição dos íons K<sup>+</sup> por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na estimulação da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase encontrada nos vertebrados foi descrita por vários autores (Robinson, 1970, Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992; Wall, 1996,1997; Wilkie, 1997; Wall et al.,1999). Estudos realizados para a enzima obtida do tecido branquial de varias espécies de crustáceos mostraram resultados similares (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003; Weihrauch et al., 2002,2004; Masui et al., 2002; Furriel et al., 2004). Por outro lado, a participação dos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como contra-íons no transporte de íons Na<sup>+</sup> mediado pela (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Towle & Holleland, 1987) foi demonstrada empregando vesículas de membrana obtidas a partir do tecido brânquial de *C. sapidus*. Estudos de perfusão de brânquias isoladas de *C. maenas* confirmam esses resultados (Lucu et al., 1989). O valor de K<sub>0,5</sub> para os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> encontrado para a enzima de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ de salinidade (6,04 ± 0,333 mM) é similar àquele encontrado para a enzima do animal recém-capturado à salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2002) e para *M. olfersii* (Furriel et al., 2004). Valores semelhantes também foram observados para a enzima obtida de membrana axonal de caranguejo (Skou, 1960; Rossi et al., 1978). Já para a enzima de vertebrados, o valor da afinidade aparente para os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> varia entre 3,3 mM (Landon & Norris, 1963) e 6,1 mM (Robinson, 1970). Uma menor afinidade da enzima pelos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em relação aos íons K<sup>+</sup> (cerca de 3,7 vezes) também foi observada para os animais recém-capturados (Masui et al., 2002), para *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), além da enzima de membranas axonais de caranguejo (Skou, 1960; Rossi., 1978). Nos vertebrados, a relação entre as afinidades para NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e K<sup>+</sup> variou de 8,1 a 5,0 (Landon & Norris, 1963; Robinson, 1970). A presença de múltiplos sítios de ligação para o íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (n<sub>H</sub>= 1,3) encontrada para enzima dos animais aclimatados a 15 ‰ de salinidade também foi descrita para membranas axonais de *C. pagurus* (Rossi et al., 1978), mas difere do observado para enzimas obtidas de *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002) e também de *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), em que se observou a presença um único sítio de ligação para esses íons. Além disso, uma maior estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase pelos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em relação aos íons K<sup>+</sup> foi observada também em *C. danae* recém-capturado a salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2002), *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *U. pugnax* (Holliday, 1985) e para a

enzima de outras fontes (Robinson, 1970; Landon & Norris, 1963; Skou, 1962; Schoner et al., 1967).

Desde os primeiros estudos cinéticos da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial nesta espécie (Masui et al., 2002, 2003, 2005a,b) foi observou-se a presença de uma estimulação sinérgica na atividade ATPase pelos íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nos animais recém capturados (Masui et al., 2002). Essa característica sugere um possível papel fisiológico da enzima no processo de excreção ativa de compostos nitrogenados que, nos crustáceos, ocorre em grande parte através das brânquias na forma de amônia. Resultados similares foram observados para o camarão de água doce *M. olfersii* (Furriel et al., 2004). Os resultados obtidos para *C. danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ no presente trabalho mostram também essa estimulação sinérgica na atividade da enzima entre íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figuras 9, 10 e 11 e 12). O valor da afinidade aparente pelos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na presença de íons K<sup>+</sup> (Figura 11) foi bastante próximo do obtido para *C. danae* recém-capturado a salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2002) e também para a enzima de *M. olfersii* (Furriel et al., 2004). Entretanto, a estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por íons K<sup>+</sup> em presença de concentrações saturantes de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 9) mostrou um aumento da afinidade aparente da enzima de cerca de 35 vezes quando comparada à enzima obtida de animais recém-capturados à salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2002). Já em *M. olfersii*, essa modulação sinérgica da atividade da enzima por íons K<sup>+</sup> em presença de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em concentração saturante não foi observada (Furriel et al., 2004). Experimentos complementares se fazem necessários para estabelecer os mecanismos que regem este aumento de afinidade da enzima para os íons K<sup>+</sup> e sua possível importância para a excreção ativa de compostos nitrogenados nesses animais.

A maioria dos crustáceos aquáticos são amoniotélicos, excretando compostos nitrogenados na forma de amônia (NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Kormanik & Cameron, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999, 2004). A urina primária nos caranguejos aquáticos é formada via ultrafiltração nas glândulas antenais e contribui para a regulação do teor de água e de cátions divalentes no animal (Mantel & Farmer, 1983), mas não exerce um papel significativo na excreção de compostos nitrogenados que ocorre principalmente via epitélio branquial (Regnault, 1987; Weihrauch et al., 1999,2004). Em *C. sapidus* menos de 2% do total de amônia é eliminada como urina via glândula antenal (Cameron & Batterton, 1978; Weihrauch et al., 2004). Inicialmente, foi sugerido que a excreção de amônia através das brânquias de crustáceos ocorreria por simples difusão de NH<sub>3</sub>, a favor de seu gradiente. Outros autores, porém, sugerem fortemente que uma parte da

amônia produzida é excretada sob a forma de íons  $\text{NH}_4^+$  (Lucu et al., 1989; Pressley et al., 1981; Siebers et al., 1985; Weihrauch et al., 1998, 1999). Estudos de transporte transepitelial de íons  $\text{NH}_4^+$  através de brânquias isoladas e perfundidas de *C. maenas*, *C. pagurus* e *E. sinensis* mostraram sensibilidade a ouabaína, sugerindo a participação da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  neste processo (Lucu et al., 1989; Péqueux & Gilles, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999, 2002, 2004). Acredita-se que os íons  $\text{NH}_4^+$  podem ser ativamente excretados contra seu gradiente de concentração, no epitélio branquial substituindo os íons  $\text{K}^+$  na  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , em certos caranguejos braquiúros (Weihrauch et al., 1998, 1999). Em *C. maenas*, a extrusão de íons  $\text{NH}_4^+$  para o meio externo pode envolver seqüestro em vesículas de membrana acidificadas por uma  $\text{H}^+\text{-ATPase}$  tipo-V (Weihrauch et al., 2002). Aparentemente, os íons  $\text{NH}_4^+$  também podem ser trocados por íons  $\text{H}^+$  e levados ao meio externo por um trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizado na membrana apical (Morris, 2001; Weihrauch et al., 1998, 1999, 2002, 2004).

Nesse sentido, os resultados obtidos até o presente momento permitem propor o seguinte modelo para a excreção de íons amônio através das brânquias de *C. danae* (**Painel 6**) (Masui et al., 2005b). Canais de  $\text{K}^+$ , sensíveis a  $\text{Cs}^+$ , (Riestenpatt et al., 1996) seriam incapazes de discriminar entre os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , e dessa forma, translocariam os íons  $\text{NH}_4^+$  da hemolinfa para o citoplasma (Weihrauch et al., 2002, 2004; Lucu et al., 1989; Towle & Holleland, 1987). Sugere-se ainda a participação de um transportador de amônia (RhCM) identificado nessa espécie de crustáceo neste processo (Marini et al., 2000; Weihrauch et al., 2004). Os íons  $\text{NH}_4^+$  dissociam-se em  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}^+$  no citoplasma, e a  $\text{NH}_3$  resultante se difunde para o interior de vesículas acidificadas por uma  $\text{H}^+\text{-ATPase}$  tipo V. Essas vesículas contendo  $\text{NH}_4^+$  são transportadas via microtúbulos até o lado apical da célula, onde se fundem com a membrana liberando os íons  $\text{NH}_4^+$  no espaço subcuticular *via* exocitose, e finalmente através de estruturas sensíveis a amiloride na cutícula (Weihrauch et al., 1998, 2002, 2004).

Os caranguejos bênticos podem encontrar concentrações de amônia no ambiente que excedem os valores de íons  $\text{NH}_4^+$  normalmente encontrados em sua hemolinfa, o que pode levar a um influxo de íons  $\text{NH}_4^+$  (Rebelo et al., 1999; Masui et al., 2002, 2003). *Callinectes danae* é um caranguejo bêntico que freqüentemente se enterra no sedimento podendo estar sujeito a altas concentrações de amônia, da ordem de 2 a 3 mM (Weihrauch et al., 1999; Rebelo et al., 1999). Assim, um mecanismo eficiente de excreção de íons  $\text{NH}_4^+$  via  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  contra seu gradiente de concentração, ativo

mesmo em presença de concentrações saturantes de íons K<sup>+</sup>, pode ser fisiologicamente relevante para os animais desta espécie.

Segundo Mantelatto & Fransozo (2000), animais da espécie *C. danae* são freqüentemente encontrados em locais da baía de Ubatuba sujeitos à influência de água doce e apresentando grandes quantidades de matéria orgânica no substrato, o que sugere que freqüentemente ficam expostos a altas concentrações de amônia. Assim, a presença de um mecanismo eficiente para sua excreção ativa no tecido branquial se faz necessária, sugerindo que a seleção de uma (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase que seja modulada diretamente por íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> poderia contribuir evolutivamente para a sobrevivência desta e de outras espécies de caranguejos bênticos. A excreção de amônia contra seu gradiente de concentração aparentemente é afetada pela permeabilidade do epitélio branquial, sendo maior nos animais marinhos e estuarinos como *C. pagurus* e *C. maenas*, se comparados a animais tolerantes a água doce como *E. sinensis* (Weihrauch et al., 1999, 2004).

O valor de K<sub>I</sub> calculado para a inibição da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de microsomas de brânquias de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰, pela ouabaína, na ausência de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é cerca de 3,3 vezes menor que o determinado para a enzima do animal recém-capturado, e é aproximadamente 2 vezes menor se comparado na presença de íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Masui et al., 2002). As diferenças encontradas nos valores de K<sub>I</sub> em *C. danae* podem sugerir a expressão de um isoenzima diferente. A expressão de diferentes isoformas da subunidade α da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em brânquias de peixes em proporções relativas que se alteram em resposta a aclimatação a diferentes salinidades (Pagliarani et al., 1991; Lee et al., 1998; Feng, et al., 2002; Richards, et al., 2003), assim como a presença de duas isoformas mostrando diferentes afinidades para os íons sódio nas brânquias de *C. granulata* (Castilho et al., 2001) suportam esta hipótese. Comparações entre as enzimas de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ e de animais recém-capturados (Masui et al., 2002) não mostraram diferenças significativas na afinidade da enzima pelos íons Na<sup>+</sup>. Contudo, o aumento significativo na afinidade aparente da enzima para íons K<sup>+</sup> na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (37 vezes maior) em animais aclimatados a 15 ‰ de salinidade, quando comparado com a afinidade aparente observada nos animais recém-capturados (Masui et al., 2002), sugere que a expressão de uma isoforma diferente pode estar mais relacionada com os mecanismos de excreção de amônia nessas condições. Valores maiores de K<sub>I</sub> para a inibição da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase pela ouabaína foram relatados por Neufeld et al. (1980) para enzima do tecido branquial de

*C. sapidus*, e também para a enzima dos caranguejos braquiúros adaptados à água do mar (Corotto & Holliday, 1996; Holliday, 1985; D'orazio & Holliday, 1985). Entre os crustáceos de água doce, valores similares foram relatados para *M. rosenbergii* (Stern et al., 1984), embora valores discrepantes tenham sido observados para *M. olfersii* (Furriel et al., 2002). Em *P. potamios*, o  $K_I$  para ouabaína foi de 0,5 mM (Tentes & Stratakis, 1991) e para enzima de *C. maenas*, o valor foi de 0,29  $\mu$ M em animais aclimatados a 10 ‰ (Postel et al., 1998). A constante de inibição por ortovanadato para *C. danae* aclimatado a 15 ‰ de salinidade foi cerca de 8,5 vezes menor em relação à enzima dos animais recém-capturados (Masui et al., 2002). Contudo, este valor foi semelhante ao observado por Furriel et al. (2000) para *M. olfersii* e também para a enzima de outras fontes (Holleland & Towle, 1990; Skou & Esmann, 1992).

A ausência de inibição da atividade ATPase insensível à ouabaína por teofilina descartou a presença de fosfatases na fração microsomal do tecido branquial de *C. danae*, embora elas tenham sido encontradas em preparações de  $(Na^+, K^+)$ -ATPases descritas por Lovett et al. (1994) para o tecido branquial de outros crustáceos. A aparente ausência de uma ATPase tipo-V está em concordância com o obtido para a os animais recém-capturados (Masui et al., 2002, 2003, 2005a). Aparentemente, uma V-ATPase poderia desempenhar um papel importante na captura de íons  $Na^+$  através do epitélio branquial de espécies mais tolerantes ou bem adaptadas a meios diluídos, mas não em espécies eurialinas com moderada capacidade osmorregulatória (Zare & Greenaway, 1998; Weihrauch et al., 2001; Towle & Weihrauch, 2001). A ausência de inibição por tapsigargina contrasta com o observado para preparações de tecido braquial de outros caranguejos, que apresentam atividade  $Ca^{2+}$ -ATPase (Wheatly, 1999). Por outro lado, a inibição parcial da atividade insensível à ouabaína por oligomicina sugere fortemente a presença de uma  $F_0F_1$ -ATPase na fração microsomal, o que é coerente com o fato deste epitélio apresentar uma grande quantidade de mitocôndrias (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Towle & Kays, 1986). Por outro lado, a inibição por ácido etacrínico sugere a presença de uma  $Na^+$ -ATPase e/ou  $K^+$ -ATPase (Proverbio et al., 1991). A estimulação da atividade insensível a ouabaína por íons  $K^+$  e não por íons  $Na^+$  sugere que esta atividade possa ser atribuída a uma  $K^+$ -ATPase.

#### **4.3 – Caracterização da atividade $K^+$ -fosfatase da $(Na^+, K^+)$ -ATPase.**

O processo de regulação osmótica e iônica nos crustáceos hiperosmorreguladores tem sido objeto de estudo de vários autores, que estabeleceram

uma relação estreita entre esse processo com o aumento da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Péqueux, 1995; Towle, 1997; Lucu & Towle, 2003). A identificação e a determinação da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em animais expostos a ambientes de salinidade variável tem sido realizada através de medidas empregando o substrato fisiológico ATP (Harris & Bayliss, 1988; Piller et al., 1995; Corotto & Holliday, 1996; Lima et al., 1997; Lucu & Flik, 1999; Lucu & Devescovi, 1999; Flik & Haond, 2000; Lucu & Towle, 2003).

A capacidade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase também poder hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (PNFF) tem sido estudada por vários autores (Gache et al., 1977; Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Specht et al., 1997; Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003, 2005a; Homareda & Ushimaru, 2005). Existem controvérsias a respeito do papel do PNFF em não estar associado ao transporte de cátions ou fosforilação da enzima (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992), ou ainda que esse substrato não fisiológico possa realmente promover os passos de fosforilação e de transporte na enzima (Yamazaki et al., 1994; Homareda & Ushimaru, 2005). Acredita-se que, aparentemente, na ausência de íons Na<sup>+</sup>, os íons K<sup>+</sup> aparentemente ativam a reação dos sítios citoplasmáticos no qual os íons Na<sup>+</sup> usualmente ativam a reação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Jorgensen et al., 1998a, b). Estudos de caracterização das propriedades cinéticas da enzima nesses animais empregando o PNFF como substrato são muito escassos (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003, 2005a). O estudo da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase realizado em frações de membrana do tecido branquial do siri *Callinectes danae* e do camarão *Macrobrachium olfersii* proporcionaram novos enfoques para utilização do substrato PNFF na caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-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, 2005a).

A atividade específica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ com respeito à hidrólise do PNFF (102,9 U/mg) é um pouco menor (1,2 vezes) se comparada com a mesma atividade da fração microsomal do animal capturado a 33 ‰, da ordem de 125,4 U/mg (Masui et al., 2003). O valor de K<sub>0,5</sub> = 1,7 mM encontrado para a estimulação da atividade da enzima pelo PNFF bem como a presença de uma única família de sítios de hidrólise para esse substrato, são semelhantes

ao relatado para enzima do animal capturado a salinidade de 33 ‰ (Masui et al., 2002). Além disso, valores similares de afinidade da enzima para o PNFF foram também observados para enzima do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1977; 1979) e outros tecidos de vertebrados (Beaugé & Berberian, 1983; Davis & Robinson, 1988).

Os íons magnésio são reconhecidamente essenciais para ambas as atividades ATPase e K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPases obtida de diferentes fontes (Rossi et al., 1978; Gache et al., 1979; Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Furriel et al., 2000, 2001; Masui et al., 2002, 2003). A estimulação da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase pelos íons magnésio revelou um K<sub>0,5</sub> de aproximadamente 1,4 mM semelhante ao observado para enzima obtida das frações de membrana de brânquias do camarão de água doce *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2003), das membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1976, 1979) e da enzima obtida de vertebrados (Robinson, 1981; Beaugé & Berberian, 1983).

Já está bem estabelecido que a conformação E<sub>2</sub> da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é a principal conformação associada na hidrólise do PNFF (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Jorgensen et al., 1998). Na ausência de íons sódio, os íons potássio são capazes de ativar a reação de hidrólise (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991). A inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase por altas concentrações de íons sódio resultam aparentemente da competição entre os íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> pelos sítios citosólicos dos íons (Glynn, 1985). Dessa forma, a inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima do tecido branquial de *C. danae* por elevadas concentrações de íons Na<sup>+</sup> está de acordo com os dados relatados para enzima obtida de várias fontes (Gache et al., 1976; Glynn, 1985; Furriel et al., 2001).

A estimulação da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *C. danae* pelos íons potássio revelou um K<sub>0,5</sub> semelhante ao observado para enzima obtida do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001; 2004), *C. danae* (Masui et al., 2003), membranas axonais de caranguejo (Gache et al., 1976, 1979), e tecidos de vertebrados (Robinson, 1981; Glynn, 1985). Os íons potássio podem ser substituídos pelos íons amônio na atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima encontrada nos vertebrados (Robinson, 1970; Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992) com também para a enzima dos crustáceos (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Wall, 1996; Masui et al., 2002, 2003; Furriel et al., 2004). O valor de K<sub>0,5</sub>= 9,8 mM para a estimulação da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *C.*

*danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰ pelos íons amônio é semelhante ao relatado para enzima de *C. danae* encontrado a 33 ‰ (Masui et al., 2003), para o camarão *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), para enzima de membranas axonais de caranguejo (Skou, 1960; Rossi et al., 1978) e cérebro de rato (Robinson, 1970). Semelhantemente ao observado para a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase e atividade ATPase de *C. danae* capturado a 33 ‰ (Masui et al., 2002, 2003) a presença dos íons K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não provocou estimulação sinérgica da enzima do animal aclimatado a 15 ‰. Isto sugere os íons amônio podem substituir os íons potássio ligando-se ao mesmo sítio na estimulação da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Robinson, 1970). Além disso, a inibição da atividade da enzima de várias fontes, por excesso de íons potássio ou amônio, provavelmente resulta de uma competição entre cátions monovalentes e divalentes (Robinson, 1970; Gache et al., 1976).

A inibição parcial da atividade da enzima pela ouabaína sugere a presença de outras enzimas na preparação de membranas. Alguns estudos (Robinson 1981; Gache et al., 1976) mostraram valores de K<sub>I</sub> para a ouabaína de 3 μM até valores de aproximadamente 200 μM. O valor de K<sub>I</sub> encontrado para inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ (142,0 μM) contrasta aos valores aproximadamente 6 vezes menores relatados para enzima de tecido branquial de *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2003) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2002), da ordem de 830,3 μM e 762,4 μM respectivamente. Contudo, o valor de K<sub>I</sub> para atividade K<sup>+</sup>-fosfatase obtida do animal aclimatado a 15 ‰ é similar ao encontrado para enzima da membrana axonal de *C. pagurus* (Gache et al., 1976) e também coincide com os valores relatados para enzima de vertebrados (Skou & Esmann, 1992). O valor para constante de inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase pelo vanadato na atividade K<sup>+</sup>-fosfatase foi de aproximadamente 28,06 nM e é semelhante ao observado para a enzima do mesmo animal recém-capturado (Masui et al., 2003). Esse valor de K<sub>I</sub> é similar ao relatado para enzima de vertebrados (Beaugé & Berberian, 1983; Skou & Esmann, 1992). Todavia, o valor de K<sub>I</sub> para o vanadato da enzima de *C. danae* aclimatado a 15‰ é relativamente menor em relação ao encontrado para a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da fração de membrana de brânquias do camarão de água doce *M. olfersii* (Furriel et al., 2001). Entretanto, os resultados não permitem descartar a possibilidade que em uma menor salinidade, novas fosfatases possam ser expressas.

## 5.0 – BIBLIOGRAFIA.

- Abriel H, Hasler U, Geering K & Horisberger JD (1999) Role of the intracellular domain of the  $\beta$  subunit in Na,K pump function. *Biochim Biophys Acta* **1418**: 85-96.
- Aguilar R, Hines AH, Wolcott TG, Wolcott DL, Kramer MA & Lipcius RN (2005) The timing and route of movement and migration of post-copulatory female blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun, from the upper Chesapeake Bay. *J Exp Mar Biol Ecol* **319**: 117-128.
- Ahearn GA, Duerr JM, Zhuang Z, Brown RJ, Aslamkhan A & Killebrew DA (1999) Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol Biochem Zool* **72**: 1-18.
- Antolovic R, Hamer E, Serpersu EH, Kost H, Linnertz H, Kovarik Z & Schoner W (1999) Affinity labelling with MgATP analogues reveals coexisting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> forms of the alpha-subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur J Biochem* **261**: 181-189.
- Apell HJ (2004) How do P-type ATPases transport ions? *Bioelectrochem* **63**: 149-156.
- Apell HJ, Schneeberger A & Sokolov VS (1998) Partial reactions of the NaK-ATPase: kinetic analysis and transport properties. *Acta Physiol Scand* **163**: 235-245.
- Arato-Oshima T, Matsui H, Wakizaka H & Homareda H (1996) Mechanism responsible for oligomycin-induced occlusion of Na<sup>+</sup> within Na/K-ATPase. *J Biol Chem* **271**: 25604-25610.
- Arguello JM, Whitis J & Lingrel JB (1999b) Alanine scanning mutagenesis of oxygen-containing amino acids in the transmembrane region of the Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys* **367**: 341-347.
- Arguello JM, Whitis J, Cheung MC & Lingrel JB (1999a) Functional role of oxygen-containing residues in the fifth transmembrane segment of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit. *Arch Biochem Biophys* **364**: 254-263.
- Arystarkhova E, Donnet C, Asinovski NK & Sweadner KJ (2002a) Differential regulation of renal Na,K-ATPase by splice variants of the  $\gamma$ -subunit. *J Biol Chem* **277**: 10162-10172.
- Arystarkhova E, Wetzel RK & Sweadner KJ (2002b) Distribution and oligomeric association of splice forms of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase regulatory  $\gamma$ -subunit in rat kidney. *Am J Physiol* **282**: F393-F407.
- Askew GR & Lingrel JB (1994) Identification of all amino-acid substitution in human  $\alpha$ -1 Na,K-ATPase which confers differentially reduced affinity for 2 related cardiac-glycosides. *J Biol Chem* **269**: 24120-24126.
- Balerna M, Fosset M, Chicheportiche R, Romey G & Lazdunski M (1975) Constitution and properties of axonal membranes of crustacean nerves. *Biochemistry* **14**: 5500-5511.
- Bar Shimon M, Goldshleger R & Karlisch SJD (1998) Specific Cu<sup>2+</sup>-catalyzed oxidative cleavage of Na,K-ATPase at the extracellular surface. *J Biol Chem* **273**: 34190-34195.
- Barra JA, Péqueux AJR & Humbert W (1983) A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue Cell* **15**: 583-596
- Baxter-Lowe LA, Guo JZ, Bergstrom EE & Hokin LE (1989) Molecular cloning of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit in developing brine-shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett* **257**: 181-187.
- Beaugé L & Berberian G (1983) The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase and the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump. *Biochim Biophys Acta* **7127**:336-350.
- Beaugé L (2001) Breakdown of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-exchanging ATPase phosphoenzymes formed from ATP and from inorganic phosphate during Na<sup>+</sup>-ATPase activity - Response to Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions. *Eur J Biochem* **268**: 5627-5632.
- Béguin P, Crambert G, Monnet-Tschudi F, Uldry M, Horisberger JD, Garty H, Geering K (2002) FXYD7 is a brain-specific regulator of Na,K-ATPase alpha 1-beta isozymes. *EMBO J* **21**: 3264-3273.
- Béguin P, Hasler U, Beggah A, Horisberger JD & Geering K (1998) Membrane integration of Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunits and  $\beta$ -subunit assembly. *J Biol Chem* **273**: 24921-24931.
- Béguin P, Hasler U, Staub O & Geering K (2000) Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: Topogenic determinants involved in the degradation of the

- unassembled Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit and in its stabilization by  $\beta$ -subunit assembly Mol Biol Cell **11**: 1657-1672.
- Béguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD & Geering K (1997) The  $\gamma$ -subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. EMBO J **16**: 4250-4260.
- Berberian G & Beaugé L (1992) Phosphatase-activity and potassium-transport in liposomes with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase incorporated. Biochim Biophys Acta **1103**: 85-93.
- Bhattacharyya KK, Bergstrom EE & Hokin LE (1990) Molecular-cloning of the  $\beta$ -subunit of the Na,K-atpase in the brine shrimp, *Artemia* - the cdna-derived aminoacid-sequence shows low homology with the  $\beta$ -subunits of vertebrates except in the single transmembrane and the carboxy-terminal domains FEBS Lett **269**: 233-238.
- Bianchini A & Gilles R (1990) cyclic-AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the euryhaline chinese crab *Eriocheir sinensis*. Mar Biol **104**: 191-195.
- Blanco G & Mercer RW (1998) Isozymes of the Na,K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am J Physiol - Renal Physiol **44**: F633-F650.
- Blanco G, Melton RJ, Sanchez G & Mercer RW (1999) Functional characterization of a testes specific alpha-subunit isoforma of the sodium/potassium adenosine triphosphatase. Biochemistry **38**: 13661-13669
- Blanco G, Sanchez G & Mercer RW (1998) Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. Arch Biochem Biophys **359**: 139-150.
- Blostein R (1999) Structure-function studies of the sodium pump. Biochem Cell Biol **77**: 1-10.
- Blostein R, Daly SE, Boxenbaum N, Lane LK, Arguello M, Lingrel JB, Karlsh SDJ, Caplan MJ & Dunbar L (1998) Conformational alterations resulting from mutations in cytoplasmic domains of the  $\alpha$ -subunit of the Na,K-ATPase. Acta Physiol Scand **163**: 275-281.
- Blostein R, Pu HX, Scanzano R & Zouzoulas A (2003) Structure/function studies of the  $\gamma$ -subunit of the Na,K-ATPase. Ann NY Acad Sci **986**: 420-427.
- Boxenbaum N, Daly SE, Javaid ZZ, Lane LK & Blostein R (1998) Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit. J. Biol. Chem. **273**: 23086-23092.
- Budu CE, Efendiev R, Cinelli AM, Bertorello AM & Pedemonte CH (2002) Hormonal-dependent recruitment of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to the plasmalemma is mediated by PKC  $\beta$  and modulated by [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. British J Pharmacol **137**: 1380-1386.
- Cameron JN & Batterton CV (1978) Antennal gland-function in freshwater blue crab, *Callinectes sapidus* - water, electrolyte, acid-base and ammonia excretion. J Comp Physiol **123**: 143-148.
- Cantley LC, Cantley LG & Josephson L (1978) A characterization of vanadate interactions with the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. J Biol Chem **253**: 7361-7368.
- Capendeguy O & Horisberger JD (2005) The role of the third extracellular loop of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit in a luminal gating mechanism. J Physiol **565**: 207-218.
- Castilho PC, Martins IA & Bianchini A (2001) Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J Exp Mar Biol Ecol **256**: 215-227.
- Chacur MM & Negreiros-Fransozo ML (2001) Spatial and seasonal distributions of *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, Sao Paulo, Brazil. J Crustacean Biol **21**: 414-425.
- Chacur MM (1998) Distribuição ecológica do siri azul *Callinectes danae* Smith, 1863 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na enseada de Ubatuba (SP). Tese de Mestrado. ICB/UNESP-Botucatu. 104 pp.
- Chapelle S & Zwingelstein G (1984) Phospholipid-composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities - relationship between Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and phospholipids. Comp Biochem Phys **78B**: 363-372.

- Cioffi M (1984) Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *Amer Zool* **24**: 139-156.
- Cohen E, Goldshleger R, Shainskaya A, Tal DM, Ebel C, le Maire M, & Karlsh SJD (2005) Purification of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an Essential role of phospholipid-protein interactions. *J Biol Chem* **280**: 16610-16618.
- Copeland DE & Fitzjarrell AT (1968) The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **92**: 1-22.
- Coppi MV, Compton LA & Guidotti G (1999) Isoform-specific effects of charged residues at borders of the M1-M2 loop of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit. *Biochemistry* **38**: 2494-2505.
- Cornelius F & Mahmmoud YA (2003) Direct activation of gastric H,K-ATPase by N-terminal protein kinase C phosphorylation. Comparison of the acute regulation mechanisms of H,K-ATPase and Na,K-ATPase. *Biophys J* **84**: 1690-1700.
- Cornelius F (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry* **40**: 8842-8851.
- Corotto FS & Holliday CW (1996) Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp Biochem Physiol* **113A**: 361-368.
- Cortas N & Edelman IS (1988) Isolation of two isoforms of Na,K-ATPase from *Artemia salina*: kinetic characterization. *Prog Clin Biol Res* **268A**: 287-292.
- Cortas N, Arnaout M, Salon J & Edelman IS (1989) Isoforms of Na,K-ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue distribution and kinetic characterization. *J Membr Biol* **108**: 187-195.
- Costa CJ, Gatto C & Kaplan JH (2003) Interactions between Na,K-ATPase alpha-subunit ATP-binding domains. *J Biol Chem* **278**: 9176-9184.
- Costa TM & Negreiros-Fransozo ML (1998) The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba Region, Brazil. *Crustaceana* **71**: 615-627.
- Crambert G, Beguin P, Uldry M, Monnet-Tschudi F, Horisberger JD, Garty H & Geering K (2003) FXYD7, the first brain- and isoform-specific regulator of Na,K-ATPase - Biosynthesis and function of its post-translational modifications. *Ann NY Acad Sci* **986**: 444-448.
- Crambert G, Fuzesi M, Garty H, Karlsh S & Geering K (2002) Phospholemman (FXYD1) associates with Na,K-ATPase and regulates its transport properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11476-11481
- Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu CL, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelievre L & Geering K (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human isozymes. *J Biol Chem* **275**: 1976-1986.
- Crambert G, Li CM, Swee LK & Geering K (2004) FXYD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J Biol Chem* **279**: 30888-30895.
- Croyle ML, Woo AL & Lingrel JB (1997) Extensive random mutagenesis analysis of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity. Implications for ouabain binding. *Eur J Biochem* **248**: 488-495.
- Dafnis E & Sabatini S (1994) Biochem and pathophysiol of vanadium. *Nephron* **67**: 133-143.
- Davis RL & Robinson JD (1988) Substrate sites of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase: pertinence of the adenine and fluorescein binding sites. *Biochim Biophys Acta* **953**: 26-36.
- Deane EE & Woo NYS (2005) Cloning nad characterization of sea-bream (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase alpha and beta subunit genes: in vitro effects of hormones on transcriptional and translational expresson. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1229-1238.
- Dempski RE, Friedrich T & Bamberg E (2005) The  $\beta$ -subunit of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *J Gen Physiol* **125**: 505-520.
- Dirksen H, Böcking D, Heyn U, Mandel C, Chung JS, Baggerman G, Verhaert P, Daufeldt S, Plösch T, Jaros PP, Waelkens E, Keller R & Webster SG (2001) Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ

- neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem J* **356**: 159-170.
- Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **55**: 170-171.
- Domaszewicz W & Apell HJ (1999) Binding of the third Na<sup>+</sup> ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *FEBS Lett* **458**: 241-246.
- Donnet C, Arystarkhova E & Sweadner KJ (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and  $\gamma$ -subunit association with the C-terminal domain. *J Biol Chem* **276**: 7357-7365.
- D'Orazio SE & Holliday CW (1985) Gill Na,K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab *Uca pugilator*. *Physiol Zool* **58**: 364-373.
- Doris PA & Bagrov AY (1998) Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. *Proceedings Soc Exp Biol Med* **218**: 156-165.
- Dunbar LA & Caplan MJ (2001) Ion pumps in polarized cells: Sorting and regulation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases. *J Biol Chem* **276**: 29617-29620.
- Duran MJ, Pierre SV, Carr DL & Pressley TA (2004) The isoform-specific region of the Na,K-ATPase catalytic subunit: role in enzyme kinetics and regulation by protein kinase C. *Biochemistry* **43**: 16174-16183.
- Eckhardt E, Pierrot C, Thuet P, VanHerp F, Charmantier-Daures M, Trilles JP & Charmantier G (1995) Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea Decapoda) by a sinus gland peptide. *Gen Comp Endocrinol* **99**: 169-177.
- Efendiev R, Bertorello AM, Zandomeni R, Cinelli AR & Pedemonte CH (2002) Agonist-dependent regulation of renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is modulated by intracellular sodium concentration. *J Biol Chem* **277**: 11489-11496.
- Eguchi H, Takeda K, Schwarz W, Shirahata A & Kawamura M (2005) Involvement in K<sup>+</sup> access of Leu<sup>318</sup> at the extracellular domain flanking M3 and M4 of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit *Biochem Biophys Res Comm* **330**: 611-614.
- Else PL & Wu BJ (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 PL, Wu BJ, Storlien LH & Hulbert AJ (2003) Molecular activity of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Ann NY Acad Sci* **986**: 525-526.
- Emery AM, Billingsley PF, Ready PD, & Djamgoz MBA (1998) Insect Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Insect Physiol* **44**: 197-209.
- Emery AM, Ready PD, Billingsley PF & Djamgoz MBA (1995) A single isoform of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit in insects: evidence from characterization of the first extracellular domain. *Insect Mol Biol* **4**: 179-192.
- Ettrich R, Melichercik M, Teisinger J, Ettrichova O, Krumscheid R, Hofbauerova K, Kvasnicka P, Schoner W & Amler E (2001) Three-dimensional structure of the large cytoplasmic H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub> loop of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase deduced by restraint-based comparative modeling shows only one ATP binding site. *J Mol Model* **7**: 184-192.
- Farman N, Fay M & Cluzeaud F (2003) Cell-specific expression of three members of the FXFD family along the renal tubule. *Ann NY Acad Sci* **986**: 428-436.
- Farr C D, Burd C, Tabet MR, Wang X, Welsh WJ & Ball Jr WJ (2002) Three-dimensional quantitative structure activity relationship study of the inhibition of Na/K-ATPase by cardiotonic glycosides. *Biochemistry* **41**: 1137-1148.
- Fedosova NU, Cornelius F & Klodos I (1998) E<sub>2</sub>P phosphoforms of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochemistry* **37**: 13634-13642.
- Felsenfeld, DP & Sweadner KJ (1988) Fine specificity mapping and topography of an isozyme-specific epitope of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase catalytic subunit. *J Biol Chem* **263**: 10932-10942.
- Feng J & Lingrel JB (1994) Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. *Biochemistry* **33**: 4218-4224.

- Feng SH, Leu JH, Yang CH, Fang MJ, Huang CJ & Hwang PP (2002) Gene expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 3 subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. *Mar Biotechnol* **4**: 379-391.
- Feraille E & Doucet A (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. *Physiol Rev* **81**: 345-418.
- Feraille E, Mordasini D, Gonin S, Deschenes G, Vinciguerra M, Doucet A, Vandewalle A, Summa V, Verrey F & Martin PY (2003) Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann NY Acad Sci* **986**: 570-578.
- Feschenko MS, Donnet C, Wetzel RK, Asinovski NK, Jones LR & Sweadner KJ (2003) Phospholemman, a single-span membrane protein, is an accessory protein of Na,K-ATPase in cerebellum and choroid plexus. *J Neurosci* **23**: 2161-2169.
- Flik G & Haond C (2000) Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: Effects of dilute sea water. *J Exp Biol* **203**: 213-220.
- Frasen P (2005) Phospholemman, a chaperone of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase? *Cardiovascular Res* **65**: 13-15.
- Freire CA & McNamara JC (1992) Involvement of the central nervous system in neuroendocrine mediation of osmotic and ionic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Gen Comp Endocrinol* **88**: 316-327.
- Furriel RPM, Masui DC, McNamara JC & Leone FA (2004) Modulation of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity by ammonium ions: Putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J Exp Zool* **301A**: 63-74.
- Furriel RPM, McNamara JC & Leone FA (2000) Characterization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp Biochem Physiol* **126B**: 303-315.
- Furriel RPM, McNamara JC & Leone FA (2001) Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp Biochem Physiol* **130A**: 665-676.
- Füzesi M, Gottschalk KE, Lindzen M, Shainskaya A, Küster B, Garty H & Karlisch SJD (2005) Covalent Cross-links between the  $\gamma$  Subunit (FX<sub>2</sub>YD<sub>2</sub>) and  $\alpha$  and  $\beta$ -Subunits of Na,K-ATPase *J Biol Chem* **280**: 18291-18301.
- Gache C, Rossi B & Lazdunski M (1976) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes, cooperativity and control. *Eur. J. Biochem.* **65**: 293-306.
- Gache C, Rossi B & Lazdunski M (1977) Mechanistic analysis of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase using new pseudosubstrates. *Biochemistry* **16**: 2957-2965.
- Gache C, Rossi B, Leone FA & 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.
- Garty H, Lindzen M, Füzesi M, Aizman R, Goldshleger R, Asher C & Karlisch SJD (2003) A specific functional interaction between CHIF and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase - Role of FX<sub>2</sub>YD proteins in the cellular regulation of the pump. *Ann NY Acad Sci* **986**: 395-400.
- Gaspar MH (1981) Contribuição ao estudo biológico do "siri" *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda-Portunidae) do rio Itiberé (Paranaguá-Paraná) 150 pp. Universidade Federal do Paraná.
- Gatto C, Helms JB, Prasse MC, Arnett KL & Milanick MA (2005) Kinetic characterization of tetrapropylammonium inhibition reveals how ATP and Pi alter access to the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase transport site. *Am J Physiol* **289**: C302-C311.
- Gatto SJ, Thornewell JP, Holden JP & Kaplan JH (1999) Cys(577) is a conformationally mobile residue in the ATP-binding domain of the NaK-ATPase alpha-subunit. *J Biol Chem* **274**: 24995-25003
- Geering K (2000) Topogenic motifs in P-type ATPases. *J Membr Biol* **174**: 181-190.
- 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, Karlsh S, Fuzesi M, Horisberger JD & Crambert G (2003) FXYP proteins: New tissue- and isoform-specific regulators of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Ann NY Acad Sci* **986**: 388-394.
- Genovese G, Luchetti CG & Luquet CM (2004) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.
- Glynn IM (1985) The (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-transporting adenosine triphosphatase. In: AN Martonosi (Ed) *The enzymes of biological membranes*. Plenum Press NY **3**: 35-114.
- Glynn IM (2002) A hundred years of sodium pumping. *Ann Rev Physiol* **64**: 1-18.
- Goldshleger R & Karlsh SJD (1999) The energy transduction mechanism of Na,K-ATPase studied with iron-catalyzed oxidative cleavage. *J Biol Chem* **274**: 16213-16221.
- Goodman SH & Cavey MJ (1990) Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* **260**: 495-505.
- Gordon JA (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**: 477-482.
- Grisham CM & Mildvan AS (1974) Magnetic resonance and kinetic studies of the mechanism of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **249**: 3187-3197.
- Grosell M, Nielsen C & Bianchini A (2002) Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp Biochem Physiol* **133C**: 287-303.
- Guenoun S & Horisberger JD (2000) Structure of the 5th transmembrane segment of the Na,K-ATPase alpha subunit: a cysteine-scanning mutagenesis study. *FEBS Lett* **482**: 144-148.
- Guenoun S & Horisberger JD (2002) Cysteine-scanning mutagenesis study of the sixth transmembrane segment of the Na,K-ATPase alpha subunit. *FEBS Lett* **513**: 277-281.
- Guerin JL & Stickle WB (1997) A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *J Exp Mar Biol Ecol* **218**: 165-186.
- Hakansson KO & Jorgensen PL (2003) Homology modeling of Na,K-ATPase - A putative third sodium binding site suggests a relay mechanism compatible with the electrogenic profile of Na<sup>+</sup> translocation. *Ann NY Acad Sci* **986**: 163-167.
- Hakansson KO (2003) The crystallographic structure of Na,K-ATPase N-domain at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* **332**: 1175-1182.
- Hansen O (2003) No evidence for a role in signal-transduction of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. *Eur J Biochem* **270**: 1916-1919.
- Harris RR & Bayliss D (1988) Gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na<sup>+</sup> regulation. *Comp Biochem Physiol* **90A**: 303-308.
- Hasler U, Crambert G, Horisberger JD & Geering K (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase β-subunit revealed by tryptophan scanning. *J Biol Chem* **276**: 16356-16364.
- Hasler U, Greasley PJ, von Heijne G & Geering K (2000) Determinants of topogenesis and glycosylation of type II membrane proteins - Analysis of Na,K-ATPase β(1) and β(3) subunits by glycosylation mapping. *J Biol Chem* **275**: 29011-29022
- Hasler U, Wang XY, Crambert G, Beguin P, Jaisser F, Horisberger JD & Geering K (1998) Role of the β-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **273**: 30826-30835.
- Hayashi Y, Shinji N, Tahara Y, Hagiwara E & Takenaka H (2003) Isolation of (alpha,beta)(4)-tetraprotomer having half-of-sites ATP binding from solubilized dog kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Ann NY Acad Sci* **986**: 232-234.
- Hebert H, Purhonen P, Thomsen K, Vorum H & Maunsbach AB (2003) Renal Na,K-ATPase structure from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals. *Ann NY Acad Sci* **986**: 9-16.
- Hebert H, Purhonen P, Vorum H, Thomsen K & Maunsbach AB (2001) Three-dimensional structure of renal Na,K-ATPase from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals. *J Mol Biol* **314**: 479-494.

- Henry RP, Garrelts EE, McCarty MM & Towle DW (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J Exp Zool* **292**: 595-603.
- Hilge M, Siegal G, Vuister GW, Guntert P, Gloor SM & Abrahams JP (2003) ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat Struct Mol Biol* **10**: 468-474.
- Hofbauerova K, Kopecky V, Ettrich R, Ettrichova O & Amler E (2002) Secondary and tertiary structure of nucleotide-binding domain of  $\alpha$ -subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biopolymers* **67**: 242-246.
- Holleland T & Towle DW (1990) Vanadate but not ouabain inhibits (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase and sodium transport in tight inside-out native membrane vesicles from crab gill (*Carcinus maenas*). *Comp Biochem Physiol* **96B**: 177-181.
- Holliday CW (1985) Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *J Exp Zool* **233**: 199-208.
- Holmgren M, Wagg J, Bezanilla F, Rakowski RF, De Weer P & Gadsby DC (2000) Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Nature* **403**: 898-901.
- Homareda H & Ushimaru M (2005) Stimulation of *p*-nitrophenylphosphatase activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by NaCl with oligomycin or ATP. *FEBS J* **272**: 673-684.
- Horisberger JD (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology* **19**: 377-388.
- Hu YK & Kaplan JH (2000) Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein - The topology of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -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<sup>+</sup> Transport, and Gln-923 (M8) Is Essential for Na,K-ATPase Activity. *J Biol Chem* **280**: 18736-18744.
- Ivanov A, Zhao H & Modyanov NN (2000) Packing of the transmembrane helices of Na,K-ATPase: Direct contact between beta-subunit and H8 segment of alpha-subunit revealed by oxidative cross-linking. *Biochemistry* **39**: 9778-9785.
- Jacobsen MD, Pedersen PA & Jorgensen PL (2002) Importance of Na,K-ATPase residue alpha1-Arg<sup>(544)</sup> in the segment Arg<sup>(544)</sup>-Asp<sup>(567)</sup> for high-affinity binding of ATP, ADP, or MgATP. *Biochemistry* **41**: 1451-1456.
- Jones DH, Li TY, Arystarkhova E, Barr KJ, Wetzel RK, Peng J, Markham K, Sweadner KJ, Fong GH & Kidder GM (2005) Na,K-ATPase from mice lacking the  $\gamma$ -subunit (FXYD2) exhibits altered Na<sup>+</sup> affinity and decreased thermal stability. *J Biol Chem* **280**: 19003-19011.
- Jorgensen PL & Pedersen PA (2001) Structure-function relationships of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, or Mg<sup>2+</sup> binding and energy transduction in (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1505**: 57-74.
- Jorgensen PL (2003) Transmission of E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> structural changes in response to Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> binding in Na,K-ATPase. *Ann NY Acad Sci* **986**: 22-30.
- Jorgensen PL, Hakansson KO & Karlsh SJD (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Ann Rev Physiol* **65**: 817-849.
- Jorgensen PL, Jorgensen JR & Pedersen PA (2001) Role of conserved TGDGVND-loop in Mg<sup>2+</sup> binding, phosphorylation, and energy transfer in Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomemb* **33**: 367-377.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H. & Pedersen, P.A. (1998b) Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163**, Suppl **643**: 79-87.
- Jorgensen, PL, Nielsen JM, Rasmussen JH & Pedersen PA (1998a) Structure-function relationships of E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 65-70.
- Kamemoto FI (1991) Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zool Sci* **8**: 827-833.

- Kanazawa T, Saito M & Tonomura Y (1970) Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate in the reaction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> dependent ATPase. *J Biol Chem* **67**: 693-711.
- Kaplan JH (2002) Biochemistry of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Ann Rev Biochem* **71**: 511-535.
- Kaplan JH, Gatto C, Holden JP & Thornewell SJ (1998) Structural changes associated with the coupling of ATP hydrolysis and cation transport by the Na pump. *Acta Physiol Scand* **163**, Suppl **643**: 99-105.
- Kaplan JH, Hu YK & Gatto C (2001) Conformational coupling: The moving parts of an ion pump. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 379-385.
- Karlish SJD (2003) Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe<sup>2+</sup>-catalyzed oxidative cleavage. *Ann NY Acad Sci* **986**: 39-49.
- Kasturi R, Yuan J, McLean LR, Margolies MN & Ball Jr WJ (1998) Identification of a model cardiac glycoside receptor: comparisons with (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochemistry* **37**: 6658-6666.
- Kawamura M & Nagano K (1984) Evidence for essential disulfide bonds in the beta-subunit of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **774**: 188-192.
- Kazanietz MG, Caloca MJ, Aizman O & Nowicki S (2001) Phosphorylation of the catalytic subunit of rat renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by classical PKC isoforms. *Arch Biochem Biophys* **388**: 74-80
- Keenan SM, DeLisle RK, Welsh WJ, Paula S & Ball Jr. WJ (2005) Elucidation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase digitalis binding site. *J Mol Graphics Modelling* **23**: 465-475.
- Kirley TL (1990) Inactivation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. *J Biol Chem* **265**: 4227-4232.
- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* **207**: 1439-1452.
- Koenderink JB, Geibel S, Grabsch E, De Pont JJHHM, Bamberg E & Friedrich T (2003) Electrophysiological analysis of the mutated Na,K-ATPase cation binding pocket. *J Biol Chem* **278**: 51213-51222.
- Koenderink JB, Hermsen HPH, Swarts HGP, Willems PHGM & De Pont JJHHM (2000b) High-affinity ouabain binding by a chimeric gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase containing transmembrane hairpins M3-M4 and M5-M6 of the alpha(1)-subunit of rat Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11209-11214.
- Koenderink JB, Swarts HGP, Hermsen HPH, Willems PHGM & De Pont JJHHM (2000) Mutation of aspartate 804 of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase modifies the cation binding pocket and thereby generates a high Na<sup>+</sup>-ATPase activity. *Biochemistry* **39**: 9959-9966.
- Kormanik GA & Cameron JN (1981) Ammonia excretion in the seawater blue crab (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> exchange. *J Comp Physiol* **141B**: 457-462.
- Kramer HJ, Krampitz G, Backer A & Meyer-Lehnert H (1998) Ouabain-like factors in human urine: identification of a Na-K-ATPase inhibitor as vanadium-diascorbate adduct. *Clin Exp Hyperten* **20**: 557-571.
- Kubala M, Hofbauerova K, Ettrich R, Kopecky V, Krumscheid R, Plasek J, Teisinger J, Schoner W & Amler E (2002) Phe<sup>(475)</sup> and Glu<sup>(446)</sup> but not Ser<sup>(445)</sup> participate in ATP-binding to the alpha-subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 154-159.
- Kubala M, Plasek J & Amler E (2004) Fluorescence competition assay for the assessment of ATP binding to an isolated domain of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol Res* **53**: 109-113.
- Kubala M, Teisinger J, Ettrich R, Hofbauerova K, Kopecky V, Baumruk V, Krumscheid R, Plasek J, Schoner W & Amler E (2003) Eight amino acids form the ATP recognition site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry* **42**: 6446-6452.
- Kurtz I & Balaban, R.S. (1986) Ammonium as a substrate for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* **250**: F497-F502.
- Landon EJ & Norris JL (1963) Sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase activity in a rat-kidney endoplasmic reticulum fraction. *Biochim Biophys Acta* **71**: 266-276.
- Lansky Z, Kubala M, Ettrich R, Kutý M, Plasek J, Teisinger J, Schoner W & Amler EE (2004) The hydrogen bonds between Arg<sup>(423)</sup> and Glu<sup>(472)</sup> and other key residues, Asp<sup>(443)</sup>, Ser<sup>(477)</sup>,

- and Pro<sup>(489)</sup>, are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemistry* **43**: 8303-8311.
- Laughery MD, Todd ML, Kaplan JH (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.
- Lebovitz, RM, Takeyasu K & Fambrough DM (1989) Molecular characterization of the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **8**: 193-202.
- Lee TH, Tsai JC, Fang MJ, Yu MJ & Hwang PP (1998) Isoform expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Am J Physiol* **44**: R926-R932.
- Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RPM, Borin IA (2005b) SigrafW: An Easy-to-use Program for Fitting Enzyme Kinetic Data. *Biochem Mol Biol Edu* **33**: 399-403.
- Leone FA, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Masui DC, Alves LR, Gonçalves RR & Garçon DP (2005a) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. *Trends Comp Biochem Physiol* **11**: 1-15.
- Levenson R (1994) Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **123**: 1-45.
- Li C, Capendeguy O, Geering K & Horisberger JD (2005) A third Na<sup>+</sup>-binding site in the sodium pump *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12706–12711.
- Li CM, Grosdidier A, Crambert G, Horisberger JD, Michielin O & Geering K (2004) Structural and functional interaction sites between Na,K-ATPase and FXYD proteins. *J Biol Chem* **279**: 38895-38902.
- Lichtstein D & Rosen H (2001) Endogenous digitalis-like Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors, and brain function. *Neurochem Res* **26**: 971-978.
- Lignot JH, Susanto GN, Charmantier-Daures M & Charmantier G (2005) Immunolocalization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* **319**: 331-339.
- Lima AG, McNamara JC & Terra WR (1997) Regulation of hemolymph osmolytes and gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann 1836) (Decapoda Palaemonidae). *J Exp Mar Biol Ecol* **215**: 81-91.
- Lingrel J, Moseley A, Dostanic I, Cougnon M, He SW, James P, Woo A, O'Connor K & Neumann J (2003) Functional roles of the  $\alpha$ -isoforms of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Ann NY Acad Sci* **986**: 354-359.
- Lingrel JB & Kuntzweiler T (1994) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* **269**: 19659-19662.
- Lingrel JB, Croyle ML, Woo AL & Arguello JM (1998) Ligand Binding sites of Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163**, Suppl **643**: 69-77.
- Linnertz H, Kost H, Obsil T, Kotyk A, Amler E & Schoner W (1998) Erythrosin 5'-isothiocyanate labels Cys(549) as part of the low-affinity ATP binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett* **441**: 103-105.
- Linnertz H, Lanz E, Gregor M, Antolovic R, Krumscheid R, Obsil T, Slavik J, Kovarik Z, Schoner W & Amler E (1999) Microenvironment of the high affinity ATP-binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is slightly acidic. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 215-221
- Linnertz H, Urbanova P, Obsil T, Herman P, Amler E & Schoner W (1998a) Molecular distance measurements reveal an (alpha-beta)(2) dimeric structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase—High affinity ATP binding site and K<sup>+</sup>-activated phosphatase reside on different alpha-subunits. *J Biol Chem* **273**: 28813-28821.
- Lopez LB, Quintas LEM & Noel F (2002) Influence of development on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comp Biochem Physiol* **131A**: 323-333.
- Lopina OD (2001) Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)* **66**:1122-1131.
- Lovett DL & Watts SA (1995) Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp Biochem Physiol* **110B**: 115-119.

- Lovett DL, Towle DW & Faris JE (1994) Salinity-sensitive alkaline phosphatase activity in gills of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp Biochem Physiol* **109B**: 163-173.
- Lovett DL, Verzi MP, Clifford PD & Borst DW (2001) Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol* **128A**: 299-306.
- Lucu C & Devescovi M (1999) Osmoregulation and branchial Na,K-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater. *J Exp Mar Biol Ecology* **234**: 291-304.
- Lucu C & Flik G (1999) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase and Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am J Physiol* **276**: R490-R499.
- Lucu C & Pavicic D (1995) Role of seawater concentration and major ions in oxygen consumption rate of isolated gills of the shore crab *Carcinus mediterraneus* Csnr. *Comp Biochem Physiol* **112A**: 565-572.
- Lucu C & Towle DW (2003) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol* **135A**: 195-214.
- Lucu C (1990) Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp Biochem Physiol* **97A**: 297-306.
- 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, Devescovi M, Skaramuca B & Kozul V (2000) Gill NaK-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 CM, Genovese G, Rosa GA & Pellerano GN (2002a) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathys granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. *Mar Biol* **141**: 753-760.
- Luquet CM, Postel U, Halperin J, Urcola MR, Marques R & Siebers D (2002b) Transepithelial potential differences and Na<sup>+</sup> flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathys granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J Exp Biol* **205**: 71-77.
- Luquet CM, Weihrauch D, Senek M & Towle DW (2005) Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathys granulatus*. *J Exp Biol* **208**: 3627-3636.
- Lutsenko S, Anderko R & Kaplan JH (1995) Membrane disposition of the M5-M6 hairpin of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase alpha subunit is ligand dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7936-7940.
- Lutsenko S, Kaplan JH (1993) An essential role for the extracellular domain of the NaK-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry* **32**: 6737-43.
- Macías MT, Palmero I & Sastre L (1991) Cloning of a cDNA encoding an *Artemia franciscana*  $\alpha$ -subunit. *Gene* **105**: 197-204.
- MacLennan DH & Green NM (2000) Structural biology - Pumping ions. *Nature* **405**: 633-634
- Maina JN (1990) The morphology of gills of the freshwater African crab *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): A scanning and transmission electron microscopic study. *J Zool (London)* **221**: 499-515.
- Mandal AK, Mikhailova L & Arguello JM (2003) The Na,K-ATPase S5-H5 helix - Structural link between phosphorylation and cation-binding sites. *Ann NY Acad Sci* **986**: 224-225.
- Mantel LH & Farmer LL (1983) Osmotic and ionic regulation. In: LH Mantel (Ed) & DE Bliss (Ed) *The biology of crustacean. Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press, NY **5**: 53-161.
- Mantelatto FLM & Fransozo A (1999) Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Rev Brasil Biol* **59**: 23-31.
- Mantelatto FLM & Fransozo A (2000) Brachyuran community in Ubatuba Bay, northern coast of Sao Paulo State, Brazil. *J Shellfish Res* **19**: 701-709.
- Martin DW & Sachs JR (1999) Preparation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase with near maximal specific activity and phosphorylation capacity: Evidence that the reaction mechanism involves all of the sites. *Biochemistry* **38**: 7485-7497.

- Martin DW & Sachs JR (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 ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase, nor do the sites coexist in native enzyme. *J Biol Chem* **275**: 24512-24517.
- Martin DW, Marecek J, Scarlata S & Sachs JR (2000) alpha beta protomers of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify molecular activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3195-3200.
- Martinez AS, Charmantier G, Compère P & Charmantier-Daures M (2005) Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue Cell* **37**: 153-165.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC & Leone FA (2003) Gill ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of  $\text{K}^+$ -phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comp Biochem Physiol* **134B**: 631-640.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC & Leone FA (2005a)  $\text{K}^+$ -phosphatase activity of gill ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase from the blue crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the  $\alpha$ -subunit. *J Exp Zool* **303A**: 294-307.
- Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM & Leone FA (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol* **132C**: 471-482.
- Masui DC, Furriel RPM, Silva EC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Barrabin H, Scofano HM, Fontes CF & Leone FA (2005b) Gill microsomal ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2521-2535.
- McConnell FM (1987) Morphometry of transport tissues in a freshwater crustacean. *Tissue Cell* **19**: 319-349.
- McGregor SE & Walker JM (1993) Inhibitors of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *Comp Biochem Physiol* **105C**: 1-9.
- McLusky DS & Elliott M (2004) *The Estuarine Ecosystem : Ecology, Threats, and Management*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, NY. 224 pp.
- McNamara JC, Salomão LC & Ribeiro EA (1990) The effect of eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia* **199**: 193-199.
- McNamara JC, Salomão LC & Ribeiro EA (1991) Neuroendocrine regulation of osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda) *Gen Comp Endocrinol* **84**: 16-26.
- Melo GAS (1996) *Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro*. Plêiade, São Paulo 1-603.
- Mense M, Dunbar LA, Blostein R & Caplan MJ (2000) Residues of the fourth transmembrane segments of the  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase and the gastric  $\text{H}, \text{H}$ -ATPase contribute to cation selectivity. *J Biol Chem* **275**: 1749-1756.
- Mense M, Rajendran V, Blostein R & Caplan MJ (2002) Extracellular domains, transmembrane segments, and intracellular domains interact to determine the cation selectivity of  $\text{Na}, \text{K}$ - and gastric  $\text{H}, \text{K}$ -ATPase. *Biochemistry* **41**: 9803-9812.
- Middleton DA, Rankin S, Esmann M & Watts A (2000) Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13602-13607.
- Mikhailova L, Mandal AK & Arguello JM (2002) Catalytic phosphorylation of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase drives the outward movement of its cation-binding H5-H6 Hairpin. *Biochemistry* **41**: 8195-8202.
- Mo JL & Greenaway P (2001) cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Comp Biochem Physiol* **129A**: 843-849.
- Mo JL, Devos P & Trausch G (1998) Dopamine as a modulator of ionic transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in the gills of the chinese crab *Eriocheir Sinensis*. *J Crustacean Biol* **18**: 442-448.

- Mo JL, Devos P & Trausch G (2002) Dopamine D-1 receptors in the gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol* **131C**: 433-438.
- Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF & Martin-Vasallo P (2000) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase isozyme diversity comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Reports* **20**: 51-91.
- Moreira GS, McNamara JC, Shumway SE & Moreira PS (1983) Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda Palaemonidae) *Comp Biochem Physiol* **74A**: 57- 62.
- Moretti R, Martín M, Provérbio T, Provérbio F & Marín R (1991) Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp Biochem Physiol* **98**: 623-626.
- Morris S & Edwards T (1995) Control of osmoregulation via regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegatus*. *Comp Biochem Physiol* **112C**: 129-136.
- Morris S (2001) Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J Exp Biol* **204**: 979-989.
- Neufeld AH & Levy HM (1969) A second ouabain-sensitive sodium-dependent adenosine triphosphate in brain microsomes. *J Biol Chem* **244**: 6493-6497.
- Neufeld GJ, Holliday CW & Pritchard JB (1980) Salinity adaptation of gill Na,K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Exp Zool* **211**: 215-224.
- Nielsen JM, Pedersen PA, Karlsh SJD & Jorgensen PL (1998) Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K<sup>+</sup> ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase. *Biochemistry* **37**: 1961-1968.
- Ning G, Maunsbach AB, Lee YJ & Moller JV (1993) Topology of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase alpha subunit epitopes analyzed with oligopeptide-specific antibodies and double-labeling immunoelectron microscopy. *FEBS Lett* **336**: 521-524.
- Noguchi S, Higashi K & Kawamura M (1990) A possible role of the bsubunit of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in facilitating correct assembly of the α-subunit into the membrane. *J Biol Chem* **265**: 15991-15995.
- Ogawa H & Toyoshima C (2002) Homology modeling of the cation binding sites of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15977-15982.
- Okamura H, Denawa M, Ohniwa R & Takeyasu K (2003) P-type ATPase superfamily - Evidence for critical roles for kingdom evolution. *Ann NY Acad Sci* **986**: 219-223.
- Onken H & McNamara JC (2002) Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol* **205**: 167-175.
- Onken H & Riestenpatt S (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comp Biochem Physiol* **119A**: 883-893.
- Onken H & Riestenpatt S (2002) Ion transport across posterior gills of hyperosmoregulating shore crabs (*Carcinus maenas*): amiloride blocks the cuticular Na<sup>+</sup> conductance and induces current-noise. *J Exp Biol* **205**: 523-531.
- Onken H, Tresguerres M & Luquet CM (2003) Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol* **206**: 1017-1023.
- Or E, Goldshleger R, Shainskaya A & Karlsh SJD (1998) Specific cross-links between fragments of proteolyzed Na,K-ATPase induced by o-phthalaldehyde. *Biochemistry* **37**: 8197-8207.
- Pagliarani A, Ventrella V, Ballestrazzi R, Trombetti F, Pirini M & Trigari G (1991) Salinity-dependence of the properties of gill (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* **100B**: 229-236.
- Palasis M, Kuntzweiler TA, Arguello JM & Lingrel JB (1996) Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J Biol Chem* **271**: 14176-14182.
- Parrie L & Towle DW (2002) Induction of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase α-subunit mRNA in branchial tissues of the American lobster *Homarus americanus*. *Integr Comp Biol* **42**: 1291-1291.

- Patchornik G, Goldshleger R & Karlsh SJD (2000) The complex ATP-Fe<sup>2+</sup> serves as a specific affinity cleavage reagent in ATP-Mg<sup>2+</sup> sites of a Na,K-ATPase: Altered ligation of Fe<sup>2+</sup> (Mg<sup>2+</sup>) ions accompanies the E<sub>1</sub>P → E<sub>2</sub>P conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11954-11959.
- Patchornik G, Munson K, Goldshleger R, Shainskaya A, Sachs G & Karlsh SJD (2002) The ATP-Mg<sup>2+</sup> binding site and cytoplasmic domain interactions of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase investigated with Fe<sup>2+</sup>-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *Biochemistry* **41**: 11740-11749.
- Paula S, Tabet MR & Ball Jr WJ (2005) Interactions between Cardiac Glycosides and Sodium/Potassium-ATPase: Three-Dimensional Structure-Activity Relationship Models for Ligand Binding to the E<sub>2</sub>-Pi Form of the Enzyme versus Activity Inhibition. *Biochemistry* **44**: 498-510.
- Pedemonte CH & Bertorello AM (2001) Short-term regulation of the proximal tubule Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Increased/decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity mediated by protein kinase C isoforms. *J Bioenerg Biomemb* **33**: 439-447.
- Pedersen PA, Jorgensen JR & Jorgensen PL (2000) Importance of conserved alpha-subunit segment <sup>(709)</sup>GDGVND for Mg<sup>2+</sup> binding, phosphorylation, and energy transduction in Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **275**: 37588-37595.
- Pedersen PA, Nielsen JM, Rasmussen JH & Jorgensen PL (1998) Contribution to TI<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup> binding of Asn<sup>(776)</sup>, Ser<sup>(775)</sup>, Thr<sup>(774)</sup>, Thr<sup>(772)</sup>, and Tyr<sup>(771)</sup> in cytoplasmic part of fifth transmembrane segment in alpha-subunit of renal Na,K-ATPase. *Biochemistry* **37**: 17818-17827.
- Péqueux A & Gilles R (1981) Na<sup>+</sup> 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.
- Péqueux A, Marchal A, Wanson S & Gilles R (1984) Kinetic characteristics and specific activity of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the euryhaline chinese crab, *Eriocheir sinensis* during salinity acclimation. *Mar Biol Lett* **5**: 35-45.
- Peterson GL & Hokin LE (1981) Molecular weight and stoichiometry of the sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase subunits. *J Biol Chem* **256**: 3751-3761.
- Pfeiffer R, Beron J & Verrey F (1999) Regulation of Na<sup>+</sup> pump function by aldosterone is alpha-subunit isoform specific. *J Physiol (London)* **516**: 647-655.
- Piller SC, Henry RP, Doeller JE & Kraus DW (1995) A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J Exp Biol* **198**: 349-358.
- Post RL (1999) Active transport and pumps. *Current Topics in Membranes* **48**: 397-417.
- Postel U, Petrausch G, Riessenpatt S, Weihrauch D, Malykh J, Becker W & Siebers D (1998) Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and of active ion-transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium. *Mar Biol* **130**: 407-416.
- Pressley TA (1992) Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within α-subunit of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Am J Physiol* **262**: C743-C751.
- Pressley TA (1996) Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metab* **22**: 264-271.
- Pressley TA, Graves JS & Krall AR (1981) Amiloride-sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. *Am J Physiol* **241**: R370-R378.
- Proverbio F, Marin R & Proverbio T (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. *Comp Biochem Physiol* **99A**: 279-83.
- Proverbio T, Zanders IP, Marín, R Rodriguez, JM & Proverbio F (1990) Effects of Na<sup>+</sup> and/or K<sup>+</sup> on the Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activities in shrimp (*Macrobrachium amazonicum*) gill homogenates. *Comp Biochem Physiol* **97B**: 383-390.
- Rathmayer M & Siebers D (2001) Ionic balance in the freshwater-adapted Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *J Comp Physiol* **171B**: 271-281.
- Read SM & Northcote DH (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.

- Rebelo MF, Santos EA & Monserrat JM (1999) Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comp Biochem Physiol* **122A**: 429-435.
- Reeves SA & Yamanaka MK (1993) Cloning and sequence analysis of the  $\alpha$ -subunit of the cat flea sodium pump. *Insect Biochem. Mol Biol* **23**: 809-814.
- Regnault M (1987) Nitrogen excretion in marine and freshwater crustacea. *Biol Rev* **62**: 1-24.
- Rezende, LA (2005) Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Decapoda). Tese de Doutorado. FFCLRP-Química/USP-Ribeirão Preto. 123 pp.
- Rice WJ, Young HS, Martin DW, Sachs JR & Stokes DL (2001) Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> states. *Biophys J* **80**: 2187-2197
- Richards JG, Semple JW, Bystriansky JS & Schulte PM (2003) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *J Exp Biol* **206**: 4475-4486.
- Riestenpatt S, Onken H & Siebers D (1996) Active absorption of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-flux studies. *J Exp Biol* **199**: 1545-1554.
- Riestenpatt S, Zeiske W & Onken H (1994) Cyclic AMP stimulation of electrogenic uptake of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across the gill epithelium of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J Exp Biol* **188**: 159-174.
- Robinson JD & Pratap PR (1991) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase: modes of inhibition by Mg<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 267-78.
- Robinson JD (1970) Interactions between monovalent cations and the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)- dependent adenosine triphosphatase. *Arch Biochem Biophys* **139**: 17-27.
- Robinson JD (1976) Substrate sites for the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **429**: 1006-1019.
- Robinson JD (1981) Substituting manganese for magnesium alters certain reaction properties of the Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **642**: 405-417.
- Rome MS, Young-Williams AC, Davis GR & Hines AH (2005) Linking temperature and salinity tolerance to winter mortality of Chesapeake Bay blue crabs (*Callinectes sapidus*) *J Exp Mar Biol Ecol* **319**: 129-145.
- Rossi B, Gache C & Lazdunski M (1978) Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-activated adenosinetriphosphatase. *Eur J Biochem* **85**: 561-570.
- Salgado-Commissariat D, Zandomeni R & Pedemonte CH (2001) Cytoplasmic segment interactions in the alpha(1)-subunit of the rat Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Clin Exp Hypertension* **23**: 479-488.
- Sanchez G & Blanco G (2004) Residues within transmembrane domains 4 and 6 of the Na,K-ATPase alpha subunit are important for Na<sup>+</sup> selectivity. *Biochemistry* **43**: 9061-9074.
- Santos FH & McNamara JC (1996) Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *J Exp Mar Biol Ecol* **206**: 109-120.
- Sarver RG, Flynn MA & Holliday CW (1994) Renal Na,K-ATPase and osmoregulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Phys* **107A**: 349-356.
- Savage JP & Robinson GD (1983) Inducement of increased gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol* **75**: 65-69.
- Scheiner-Bobis G & Schreiber S (1999) Glutamic acid 472 and lysine 480 of the sodium pump alpha 1 subunit are essential for activity. Their conservation in pyrophosphatases suggests their involvement in recognition of ATP phosphates. *Biochemistry* **38**: 9198-9208.
- Scheiner-Bobis G (1998) Ion-transporting ATPases as ion channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **357**: 477-482.
- Scheiner-Bobis G (2002) The sodium pump - Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem* **269**: 2424-2433.

- Schleich CE, Goldemberg LA & Mananes AAL (2001) Salinity dependent Na,K-ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen Physiol Biophys* **20**: 255–266.
- Schneeberger A & Apell HJ (2001) Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of various cations. *J Membrane Biol* **179**: 263-273
- Schneeberger A & Apell HJ (1999) Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J Membr Biol* **168**: 221-228.
- Schoner W (2002) Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem* **269**: 2440-2448.
- Schoner W, von Ilberg C, Kramer R & Seubert W (1967) On the mechanism of Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1. Purification and properties of a Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-activated ATPase from ox brain. *Eur J Biochem* **1**: 334-343.
- Segall L, Daly SE & Blostein R (2001) Mechanistic basis for kinetic differences between the rat  $\alpha(1)$ ,  $\alpha(2)$ , and  $\alpha(3)$  isoforms of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J Biol Chem* **276**: 31535-31541.
- Segall L, Daly SE, Boxenbaum N, Lane LK & Blostein R (2000) Distinct catalytic properties of the  $\alpha(1)$ ,  $\alpha(2)$  and  $\alpha(3)$  isoforms of the rat (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biophys J* **78**: 456.
- Seok JH, Kim JB, Hong JH, Sung JY, Hur GM, Lim K & Lee JH (1998) Regulation of Na,K-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rat. *Biochem Mol Biol Int* **46**: 667-672.
- Shainskaya A, Schneeberger A, Apell HJ & Karlish SJD (2000) Entrance port for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the cytoplasmic loop between transmembrane segments M6 and M7 of the alpha subunit - Proximity of the cytoplasmic segment of the beta subunit. *J Biol Chem* **275**: 2019-2028.
- Siebers D, Winkler A, Leweck K & Madian A (1983) Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgolander Meeresunters* **36**: 303–312.
- Siebers D, Winkler A, Lucu C, Thedens G & Weichart D (1985) Na,K-ATPase generates an active-transport potential in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Biol* **87**: 185-192.
- Skou JC & Esmann M (1992) The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomemb* **24**: 249-261.
- Skou JC (1960) Further investigations on a Mg<sup>2+</sup>+Na<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta* **42**: 6-23.
- Skou JC (1962) Preparation of mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. *Biochim Biophys Acta* **58**: 314-325.
- Skou JC (1998) The identification of the sodium-potassium pump (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed* **37**: 2320-2328.
- Sommer MJ & Mantel LH (1988) Effect of dopamine cyclic AMP and pericardial organs on sodium uptake and Na/K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* (L). *J Exp Zool* **248**: 272-277.
- Sommer MJ & Mantel LH (1991) Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab, *Carcinus maenas* (L). *Gen Comp Endocrinol* **82**: 364-368.
- Sorensen TLM, Moller JV & Nissen P (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* **304**: 1672–1675.
- Spanings-Pierrot C, Soye D, Van Herp F, Gompel M, Skaret G, Grousset E & Charmantier G (2000) Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen Comp Endocrinol* **119**: 340-350.
- Specht SC, 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comp Biochem Physiol* **79B**: 47-50.

- Su P & Scheiner-Bobis G (2004) Lys<sup>(691)</sup> and Asp<sup>(714)</sup> of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit are essential for phosphorylation, dephosphorylation, and enzyme turnover. *Biochemistry* **43**: 4731-4740.
- Summa V, Mordasini D, Roger F, Bens M, Martin PY, Vandewalle A, Verrey F & Feraille E (2001) Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. *J Biol Chem* **276**: 47087-47093.
- Sun BH & Salvaterra PM (1995a) Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. *J Neurochem* **65**: 434-443.
- Sun BH & Salvaterra PM (1995b) 2 *Drosophila* nervous system antigens, Nervana-1 and Nervana-2, are homologues to the beta subunit of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5386-5400.
- Sun BH, Wang WY & Salvaterra PM (1998) Functional analysis and tissue-specific expression of *Drosophila* Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunits. *J Neurochem* **71**: 142-151.
- Sweadner KJ & Donnet C (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **356**: 685-704.
- Sweadner KJ & Feschenko MS (2001) Predicted location and limited accessibility of protein kinase A phosphorylation site on Na-K-ATPase. *Am J Physiol* **280**: C1017-C1026.
- Sweadner KJ (1989) Isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **988**: 185-220.
- Sweadner KJ, Arystarkhova E, Donnet C & Wetzel RK (2003) FXYD proteins as regulators of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in the kidney. *Ann NY Acad Sci* **986**: 382-387.
- Sweeney G & Klip A (1998) Regulation of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by insulin: Why and how? *Mol Cell Biochem* **182**: 121-133.
- Takeda K & Kawamura M (2001) The functional unit of Na,K-ATPase is a monomeric alpha beta protomer. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1364-1366.
- Taniguchi K, Kaya S, Abe K & Mardh S (2001) The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J Biochem* **129**: 335-342.
- Taylor HH & Taylor EW (1992) Gills and lungs: The exchange of gases and ions. In: F.W. Harrison and A.G. Humas (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol 10, Decapoda, Crustacea, pp.203-293, Wiley-liss, New York.
- Teixeira VL, Katz AI, Pedemonte CH & Bertorello AM (2003) Isoform-specific regulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase endocytosis and recruitment to the plasma membrane. *Ann NY Acad Sci* **986**: 587-594.
- Tentes I & Stratakis E (1991) Partial purification and properties of Na,K-ATPase from *Potamon potamios*. *Comp Biochem Physiol* **100C**: 619-624.
- Teramachi S, Imagawa T, Kaya S & Taniguchi K (2002) Replacement of several single amino acid side chains exposed to the inside of the ATP-binding pocket induces different extents of affinity change in the high and low affinity ATP-binding sites of rat Na/K-ATPase. *J Biol Chem* **277**: 37394-37400.
- Therien AG & Blostein R (1999) K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antagonism at cytoplasmic sites of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase: a tissue-specific mechanism of sodium pump regulation. *Am J Physiol* **277C**: 891-898.
- Therien AG & Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol* **279C**: 541-566.
- Therien AG, Karlsh SJD & Blostein R (1999) Expression and Functional Role of the  $\gamma$ -Subunit of the Na,K-ATPase in Mammalian Cells. *J Biol Chem* **274**: 12252-12256.
- Therien AG, Nestor NB, Ball WJ & Blostein R (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J Biol Chem* **272**: 32628-32634.
- Thurman C (2003) Osmoregulation in fiddler crabs (*Uca*) from temperate Atlantic and Gulf of Mexico coasts of North America. *Mar Biol* **142**: 77-92.
- Toustrup-Jensen M & Vilsen B (2003) Importance of conserved Thr<sup>(214)</sup> in domain A of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase for stabilization of the phosphoryl transition state complex in E2P dephosphorylation. *J Biol Chem* **278**: 11402-11410.

- Toustrup-Jensen M & Vilsen B (2005) Interaction between the Catalytic Site and the A-M3 Linker Stabilizes E2/E2P Conformational States of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **280**: 10210-10218.
- Towle DW & Holleland T (1987) Ammonium ion substitutes for K<sup>+</sup> in ATP-dependent Na<sup>+</sup> transport by basolateral membrane-vesicles. *Am J Physiol* **252**: R479- R489.
- Towle DW & Holleland T (1987) Ammonium ion substitutes for K<sup>+</sup> in ATP-dependent Na<sup>+</sup> transport by basolateral membrane-vesicles. *Am Journal Physiol* **252**: R479-R489.
- Towle DW & Kays WT (1986) Basolateral localization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gill epithelium of 2 osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J Exp Zool* **239**: 311-318.
- Towle DW & Weihrauch D (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am Zool* **41**: 770-780.
- Towle DW & Weihrauch D (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am Zool* **41**: 770-780.
- Towle DW (1984) Membrane-bound ATPases in arthropod ion-transporting tissues. *Amer Zool* **24**: 177-185.
- Towle DW (1993) Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J Exp Zool* **265**: 387-396.
- Towle DW (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *Amer Zool* **37**: 575-584.
- Towle DW, Palmer GE & Harris JL (1976) Role of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J Exp Zool* **196**: 315-321.
- Towle DW, Paulsen RS, Weihrauch D, Kordylewski M, Salvador C, Lignot JH & Spanings-Pierrot C (2001) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of  $\alpha$ -subunit mRNA and protein. *J Exp Biol* **204**: 4005-4012.
- Toyoshima C & Mizutani T (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**: 529-535.
- Toyoshima C & Nomura H (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418**: 605-611.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H & Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution. *Nature* **405**: 647-655.
- Toyoshima C, Nomura H & Sugita Y (2003) Crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in various physiological states. *Ann NY Acad Sci* **986**: 1-8.
- Tran CM & Farley RA (1999) Catalytic activity of an isolated domain of Na,K-ATPase expressed in *Escherichia coli*. *Biophys J* **77**: 258-66.
- Tresguerres M, Onken H, Perez AF & Luquet CA (2003) Electrophysiology of posterior, NaCl-absorbing gills of *Chasmagnathus granulatus*: rapid responses to osmotic variations. *J Exp Biol* **206**: 619-626.
- Tsoi KH, Chiu KM & Chu KH (2005) Effects of temperature and salinity on survival and growth of the amphipod *Hyale crassicornis* (Gammaridea, Hyalidae). *J Nat Hist* **39**: 325-336.
- Tsuda T, Kaya S, Yokoyama T, Hayashi Y & Taniguchi K (1998a) Half-site modification of Lys-480 of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -chain with pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine reduces ATP-dependent phosphorylation stoichiometry from half to a quarter. *J Biol Chem* **273**: 24334-24338.
- Tsuda T, Kaya S, Yokoyama T, Hayashi Y & Taniguchi K (1998b) ATP and acetyl phosphate induces molecular events near the ATP binding site and the membrane domain of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* **273**: 24339-24345.
- Vasilets LA (2002) Mechanisms of short-term regulation of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by protein kinases. *Biol Memb* **19**: 77-82.
- Vilsen B & Andersen JP (1998) Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. *Biochemistry* **37**: 10961-10971.

- Vilsen B (1995) Mutant Glu781→Ala of the rat kidney (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry* **34**: 1455-1463.
- Vilsen B (1999) Mutant Phe788→Leu of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is inhibited by micromolar concentrations of potassium and exhibits high Na<sup>+</sup>-ATPase activity at low sodium concentrations. *Biochemistry* **38**: 11389-11400.
- Wall SM (1996) Ammonium transport and the role of the Na,K-ATPase. *Miner Electrol Metab* **22**: 311-317.
- Wall SM (1997) Ouabain reduces net acid secretion and increases pH(i) by inhibiting NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake on rat tIMCD Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol* **42**: F857-F868.
- Wall SM, Davis BS, Hassell KA, Mehta P & Park SJ (1999) In rat tIMCD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. *Am J Physiol Physiol* **277**: F866-F874.
- Wang SG & Farley RA (1998) Valine 904, tyrosine 898, and cysteine 908 in Na,K-ATPase alpha subunits are important for assembly with beta subunits. *J Biol Chem* **273**: 29400-29405.
- Wang XQ & Yu SP (2005) Novel regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by Src tyrosine kinases in cortical neurons. *J Neurochem* **93**: 1515-1523.
- Wanson S, Pequeux A & Roer R (1984) Na<sup>+</sup> regulation and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte). *Comp Biochem Physiol* **79A**: 673-678.
- Ward DG & Cavieres JD (1993) Solubilized αβ Na,K-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5332-5336.
- Ward DG & Cavieres JD (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.
- Weber LI & Levy JA (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* **420**: 203-210.
- 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 DW (2004) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol* **207**: 4491-504.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D & Towle DW (2001) Molecular characterization of V-type H<sup>+</sup>-ATPase (β-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J Exp Biol* **204**: 25-37.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D & Towle DW (2002) Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, V-type H<sup>+</sup>-ATPase and functional microtubules. *J Exp Biol* **205**: 2765-2775.
- Weihrauch Dirk, McNamara JC, Towle DW & Onken H (2004b) Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J Exp Biol* **207**: 4623-4631.
- Wetzel RK & Sweadner KJ (2001) Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. *Am J Physiol* **281**: F531-F545.
- Wheatly MG (1999) Calcium homeostasis in crustacea: The evolving role of branchial renal digestive and hypodermal epithelia. *J Exp Zool* **283**: 620-640.
- Wilder MN, Huong DTT, Atmomarsono M, Tran TTH, Phu TQ & Yang WJ (2000) Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comp Biochem Physiol* **125A**: 377-388.
- Wilkie MP (1997) Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comp Biochem Physiol* **118A**: 39-50.
- Williams AB (1974) Swimming crabs of genus *Callinectes* (Decapoda-Portunidae). *Fish Bull* **72**: 685-768

- 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.
- Woo AL, James PF & Lingrel JB (1999) Characterization of the fourth alpha isoform of the NaK-ATPase. *J Membr Biol* **169**: 39-44.
- Wu BJ, Else PL, Storlien LH & Hulbert AJ (2001) Molecular activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *J Exp Biol* **204**: 4271-4280.
- Xu PZ, Sun BH & Salvaterra PM (1999) Organization and transcriptional regulation of *Drosophila* Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase beta subunit genes: Nrv1 and Nrv2. *Gene* **236**: 303-313.
- Yamazaki A, Kaya S, Tsuda T, Araki Y, Hayashi Y & Taniguchi K (1994) An extra phosphorylation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by para-nitrophenylphosphate (pNPP): evidence for the oligomeric nature of the enzyme. *J Biochem (Tokyo)* **116**: 1360-1369.
- Yokoyama T, Kaya S, Abe K, Taniguchi K, Katoh T, Yazawa M, Hayashi Y & Mardh S (1999) Acid-labile ATP and/or ADP/P-i binding to the tetraprotomeric form of Na/K-ATPase accompanying catalytic phosphorylation-dephosphorylation cycle. *J Biol Chem* **274**: 31792-31796.
- Zare S & Greenaway P (1998) The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea Parastacidae). *Comp Biochem Physiol* **119A**: 739-745.
- Zouzoulas A, Dunham PB & Blostein R (2005) The Effect of the Gamma Modulator on Na/K Pump Activity of Intact Mammalian Cells. *J Membr Biol* **204**: 49-56.

## **CURRICULUM VITAE**

## ***CURRÍCULO VITAE***

***Douglas Chodi Masui***

Natural de Ribeirão Preto, SP (21/08/1975).

### **Formação:**

Graduação: Departamento de Biologia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

-Bacharel em Ciências Biológicas, 1999.

-Licenciado em Ciências Biológicas, 1999.

Mestrado: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP – Mestre em Ciências, área de concentração: Biologia Comparada.

Título da Dissertação: Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes danae* (Crustacea, Portunidae). Setembro, 2002.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone.

### **Artigos publicados em revistas de circulação internacional:**

- 1.Masui DC, Furriel RPM, Silva ECC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Barrabin H, Scofano H, Fontes CFL & Leone FA (2005) Gill microsomal (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. Int. J. Biochem. Cell. Biol. **37**: 2521–2535.
- 2.Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC & Leone FA (2005) K<sup>+</sup>-phosphatase activity of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the swimming crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the alpha-subunit. J. Exp. Zool. **303A**: 294-307.
- 3.Leone FA, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Masui DC, Rezende LA, Gonçalves RR & Garçon DP (2006) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. Trends Comp. Biochem. Physiol. **11**: 1-15.

4. Mendonça NN, Masui DC, McNamara JC, Leone FA & Furriel RPM (2006) Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit expression and K<sup>+</sup>-phosphatase activity Comp. Biochem. Physiol. **(no prelo)**.
5. Bogo KR, Masui DC, Leone FA, Jorge JA & Furriel RPM (2006) Purification and characterization of a conidial alkaline phosphatase from an osmotic-sensitive mutant (*os-1*) of *Neurospora crassa*. Folia Microbiol. **(no prelo)**.
6. Caseli L, Masui DC, Furriel RPM, Leone FA & Zaniquelli MED (2005) Adsorption kinetics and dilatational rheological studies for the soluble and anchored forms of alkaline phosphatase at the air/water interface. J. Brazilian Chem. Soc. **16**: 969 – 977.
7. Caseli L, Oliveira RG, Masui DC, Furriel RPM, Leone FA, Maggio B & Zaniquelli MED (2005) Effect of molecular surface packing on enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. Langmuir. **21**: 4090 – 4095.
8. Caseli L, Masui DC, Furriel RPM, Leone FA & Zaniquelli MED (2005) Incorporation conditions guiding the aggregation of a glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein in Langmuir monolayers. Colloid Surface B **46**: 248 – 254.
9. Furriel RPM, Masui DC, McNamara JC & Leone FA (2004) Modulation of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity by ammonium ions: Putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. J. Exp. Zool. **301A**: 63 – 74.
10. Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC & Leone FA (2003) Gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K<sup>+</sup>-phosphatase activity by potassium and ammonium ions.. Comp. Biochem. Physiol. **134B**: 631 – 640.

11. Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM & Leone FA (2002) Modulation by ammonium ions of microsomal (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* **132C**: 71 - 482.

**Artigos resumidos publicados em revistas de circulação internacional:**

1. Silva ECC, Masui DC, Furriel RPM, Leone FA, Barrabin H, Scofano H & Fontes CFL (2005) Polyamines as regulators of *Callinectes danae* gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Gen. Physiol.* **126**: 57A - 57A.
2. Caseli L, Zaniquelli MED, Masui DC, Leone FA, Furriel RPM, Orbulescu J & Leblanc RM (2004) Lagmuir film study of rat osseous alkaline phosphatase. *Abstracts of Papers of the American Chem. Soc.* **228**: U290 - U290.