UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização cinética da (Na^+, K^+)-ATPase de animais juvenis e adultos durante a ontogenia do camarão de água doce *M. amazonicum*.

Thais Milena de Souza Bezerra

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO -SP
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização cinética da (Na^+, K^+)-ATPase de animais juvenis e adultos durante a ontogenia do camarão de água doce *M. amazonicum*.

Thais Milena de Souza Bezerra
Orientador: Francisco de Assis Leone

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO -SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Bezerra, Thais Milena de Souza

Caracterização cinética da (Na^+, K^+)-ATPase de animais juvenis e adultos durante a ontogenia do camarão de água doce *M. amazonicum*, 2010.
108 p. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filsosofia e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Enzimologia.

Orientador: Leone, Francisco de Assis

1. (Na^+, K^+)-ATPase. 2. *M. amazonicum*. 3. Ontogenia. 4. Excreção de amônio.

Agradeço primeiramente a Deus sem o qual nada podemos fazer.

Dedico aos meus pais, Lourdes e José pelo apoio, compreensão e amor incondicional, os quais preencheram esta trajetória com momentos de muita alegria e incentivo em meio as dificuldades.

A minha avó Mariana, por seus cuidados sempre presentes que me cercaram de amor e carinho.

A os meus irmãos Elaine e Arnaldo pelo incentivo inicial e apoio que contribuíram para alcançar esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Francisco de Assis Leone, que durante o desenvolvimento deste projeto muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Douglas Chodi Masui pela amizade, pelo companheirismo, paciência, apoio e pelas discussões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Coltroni Valenti e todos seus alunos pelo auxílio e cooperação imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara e sua aluna Claudia, pelas colaborações e prestatividade.

Ao Prof. Pietro Ciancaglini e seus alunos pelo auxílio e paciência, muito importantes em diversos momentos deste trabalho.

A Profª Rosa pelos momentos de apoio e compreensão que muito me auxiliaram.

Aos colegas de laboratório Sandra, Malson, João, Luana, Rômulo, Ana Rita, Daniela, Flávio, Andreza, Daiana, Raquel, Talita e Juliana pela companhia e respeito durante estes anos de convivência.

Aos técnicos Waldir, Ivana, Vitor e Nilton pelo auxílio e companheirismo sempre presentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

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: ditriotreitol

EDTA: ácido etinodiamino-tetra acidoacético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N’-etanosulfônico

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

Pi: fosfato inorgânico

PQ: piruvato quinase

PNFF: p-nitrofenilfosfato

PNFFase: p-nitrofenilfosfatase

Tris: tris-(hidroxietil)aminoetano

U: Unidade de atividade enzimática

v_C: velocidade inicial corrigida

V: velocidade máxima

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas a caracterização cinética e as propriedades bioquímicas da (Na^+, K^+)-ATPase branquial dos estágios ontogenéticos juvenil e adulto do camarão de água doce *M. amazonicum*. Em ambos os estágios de desenvolvimento foi expressa uma (Na^+, K^+)-ATPase com peso molecular de 105 kDa. A estimulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase de animais adultos pelo ATP apresentou comportamento michaeliano (V=181,8±77,83 U mg^{-1}; K_M=0,11±0,01 mmol L^{-1}). Entretanto a estimulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pelo Mg^{2+} (V=174,7±74,76 U mg^{-1}; $K_{0,5}$=0,27±0,05 mmol L^{-1}; n= 2,5), Na^+ (V=175,5±75,12 U mg^{-1}; $K_{0,5}$=4,73±0,81 mmol L^{-1}; n= 1,9), K^+ (V=171,2±73,28 U mg^{-1}; $K_{0,5}$=1,00±0,17 mmol L^{-1}; n=1,2) e NH_4^+ (V=194,2±63,34 U mg^{-1}; $K_{0,5}$= 4,76±2,15 mmol L^{-1}; n=1,9) ocorreu segundo cinética cooperativa. Nos animais juvenis, a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pelo ATP, também apresentou comportamento michaeliano (V=189,52±32,45 U mg^{-1}; K_M= 0,14±0,02 mmol L^{-1}). O mesmo foi observado para o K^+ (V=178,56±30,58 U mg^{-1}; K_M= 1,30±0,22 mmol L^{-1}) e o NH_4^+ (V=205,91±35,26 U mg^{-1}; K_M=1,88±0,32 mmol L^{-1}). Para o Mg^{2+} (V=168,35±28,83 U mg^{-1}; $K_{0,5}$=0,51±0,09 mmol L^{-1}; n=3,5) e o Na^+ (V=165,48±28,33 U mg^{-1}; $K_{0,5}$=4,92±0,84 mmol L^{-1}; n=1,3), a estimulação da enzima ocorreu através de interações sítio-sítio. Na presença de K^+ e NH_4^+ a atividade da enzima de animais adultos, foi estimulada 30% e o $K_{0,5}$ aumentou 3 vezes. Já os animais juvenis, apresentaram um aumento de 12% na velocidade máxima e o $K_{0,5}$ aumentou 2 vezes. Na presença de K^+ a atividade ATPase total dos animais adultos foi inibida 62% pela ouabaína com K_i=114±2,41 µmol L^{-1}. Já para os animais juvenis, a inibição foi da ordem de 87% com K_i=91,22±15,62 µmol L^{-1}. Na presença de NH_4^+ a inibição pela ouabaína da atividade ATPase total dos animais adultos foi da ordem de 70% com K_i=57,95±17,04 µmol L^{-1} enquanto para os juvenis a inibição foi da ordem de 85% com K_i=53,98±9,24 µmol L^{-1}.

ABSTRACT

In the present work studied the kinetic characterization and biochemical properties of the (Na^+, K^+)-ATPase gill ontogenetic stages of juvenile and adult freshwater prawn *M. amazonicum*. In both stages of development was expressed as a (Na^+, K^+)-ATPase with molecular weight of 105 kDa. The stimulation of activity (Na^+, K^+)-ATPase by ATP in adult animals showed a michaeliano (V=181.8±77.83 U mg^{-1}, K_M=0.11±0.01 mmol L^{-1}). However the stimulation of activity (Na^+, K^+)-ATPase by Mg^{2+} (V=174.7±74.76 U mg^{-1}, $K_{0,5}$ =0.27±0.05 mmol L^{-1}, n=2.5), Na^+ (V=175.5±75.12 U mg^{-1}, $K_{0,5}$=4.73±0.81 mmol L^{-1}, n=1.9), K^+ (V =171.2±73,28 U mg^{-1}, $K_{0,5}$=1.00±0.17 mmol L^{-1}, n=1,2) and NH_4^+ (V=194.2±63.34 U mg^{-1}, $K_{0,5}$=4, 76±2.15 mmol L^{-1}, n=1.9) was second cooperative kinetics. In juvenile animals, modulation of the activity (Na^+, K^+)-ATPase by ATP, exhibited behavior michaeliano (V=189.52±32.45 U mg^{-1}, K_M=0.14±0.02 mmol L^{-1}). The same was observed for K^+ (V=178.56±30.58 U mg^{-1}, K_M=1.30±0.22 mmol L^{-1}) and NH_4^+ (V=205.91±35.26 U mg $^{-1}$, K_M=1.88±0.32 mmol L^{-1}). For Mg^{2+} (V=168.35±28.83 U mg^{-1}, $K_{0,5}$=0.51 ± 0.09 mmol L^{-1}, n=3.5) and Na^+ (V=65.48±28 mmol L^{-1}, 33 U mg^{-1}, $K_{0,5}$=4.92±0.84 mmol L^{-1}, n=1.3), stimulation of the enzyme occurred through site-site interactions. In the presence of K^+ and NH_4^+ the enzyme activity of adult animals, was stimulated 30% and $K_{0,5}$ increased by 3 times. Already the young animals showed a 12% increase in speed and $K_{0,5}$ increased by 2 times. In the presence of K^+ ATPase activity of the total adult animals was inhibited 62% by ouabain with K_i=114±2.41 mmol L^{-1}. As for the juvenile animals, the inhibition was approximately 87% with K_i=1.22±15.62 mmol L^{-1}. In the presence of NH_4^+ by ouabain inhibition of total ATPase activity of adult animals was about 70% with K_i=57.95±17.04 mmol L^{-1} while for juveniles the inhibition was approximately 85% with K_i=53.98 ± 9.24 mmol L^{-1}.

SUMÁRIO

		Pág.
1.0	**INTRODUÇÃO**.....	1
1.1	A (Na^+, K^+)-ATPase.....	1
1.2	A (Na^+, K^+)-ATPase e a osmorregulação nos crustáceos.....	8
1.3	O camarão *Macrobrachium amazonicum*.....	11
1.4	A (Na^+, K^+)-ATPase excreção de compostos nitrogenados nos crustáceos..	15
2.0	**OBJETIVOS**.....	18
2.1	Objetivos gerais.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3.0	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	19
3.1	Coleta dos animais.....	19
3.2	Dessecção das Brânquias.....	19
3.3	Preparação da fração microsomal do tecido branquial.....	19
3.4	Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	20
3.5	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	20
3.6	Western blotting.....	20
3.7	Dosagem de íons e osmolalidade da hemolinfa.....	21
3.8	Determinação da atividade p-nitrofenilfosfatase (PNFFase).....	21
3.9	Determinação da atividade ATPase.....	22
3.10	Tratamento das enzimas do sistema de acoplamento.....	23
3.11	Preparação da solução de gliceraldeído-3-fosfato.....	23
3.12	Dosagem de proteína.....	23
3.13	Tratamento dos dados cinéticos.....	23
4.0	**RESULTADOS**.....	25
4.1	Estudo da fração microsomal.....	25
4.2	Eletroforese e western blotting.....	26
4.3	Dosagem de íons da hemolinfa.....	26
4.4	Caracterização da atividade K^+-fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase.....	26

4.5 Caracterização da atividade ATPase da (Na^+, K^+)-ATPase..... 47

5.0 DISCUSSÃO..... 69

5.1 Dosagem de íons e osmolalidade da hemolinfa..... 69

5.2 Caracterização da fração microsomal..... 71

5.3 Caracterização da atividade K^+-Fosfatase..... 72

5.4 Caracterização da atividade (Na^+, K^+)-ATPase..... 76

6.0 CONCLUSÃO..... 87

BIBLIOGRAFIA…… 88

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 A (Na^+, K^+)-ATPase

A (Na^+, K^+)-ATPase (E.C.3.6.1.37) foi uma das primeiras proteínas de membrana com função enzimática descoberta, é uma ATPase do tipo P envolvida no transporte de cátions, caracterizada pela formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico (Horisberger, 2004; Morth et al., 2009). Esta enzima integral da membrana celular acopla a hidrólise do fosfato γ do ATP, ao transporte de dois íons potássio para o meio intracelular e dois íons sódio para o meio extracelular. (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Martin, 2005).

A (Na^+, K^+)-ATPase nativa é um heterodímero constituído pelas subunidades α e β e uma recentemente identificada subunidade γ (FIGURA 1). A subunidade α apresenta peso molecular de 110 kDa e possui quatro isoformas sendo que a α_1 é encontrada na maioria dos epitélios. Ela é constituída de dez segmentos transmembrana formando alças extra e intracelulares. As alças extracelulares são mais curtas, com exceção da alça formada pelos segmentos M7-M8, que constitui uma importante região de interação com a subunidade β (Lingrel & Kuntzweiller, 1994; Kaplan, 2002). As alças intracelulares formam três domínios denominados A, N e P, responsáveis por mediar o caminho que dá acesso ao sítio de ligação dos cátions (Kaplan, 2002; Jorgensen et al.; 2003; Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005). Os domínios N e P formados pela alça entre os segmentos M4-M5 são essenciais para ligação de nucleotídeos, contendo o sítio de ligação do ATP. O domínio A formado pelos segmentos M2-M3 tem importante atuação em relação a afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase para o ATP, atuando como regulador (Daly et al., 1997; Kaplan, 2002). Mutações realizadas no C terminal da subunidade α, revelaram que interação entre, esta região e a alça citoplasmática formada pelos segmentos transmembrana M8 e M9, e com o segmento M5, modulam a afinidade da enzima pelos íons Na^+, e dirigem mudanças conformacionais (Toustrup-Jensen et al., 2009; Yaragatupalli et al., 2009). Resíduos presentes na alça extracelular formada pelos segmentos M3-M4, apresentam grande influencia na afinidade da enzima para o K^+, indicando que este pode ser um possível caminho para ligação destes íons a enzima (Eguchi et al., 2005). A Asp^{369} devido a sua carga negativa favorece o afastamento do domínio A dos domínios N e P (Belogus et al., 2009). Os resíduos Tyr^{1017}, Tyr^{1018} e Arg^{935} são indispensáveis para a interação do Na^+ no lado extracelular da membrana, revelado pela incapacidade do

sódio de impulsionar a transição de E_1P para E_2P em mutantes mesmo em altas concentrações. Estes dados demonstram que o C-terminal controla a afinidade pelo Na^+ de ambos os lados da membrana e sugerem que Arg^{935} constitui um importante elo de ligação entre o C-terminal e o sitio de ligação do Na^+ (Toustrup-Jensen et al., 2009).

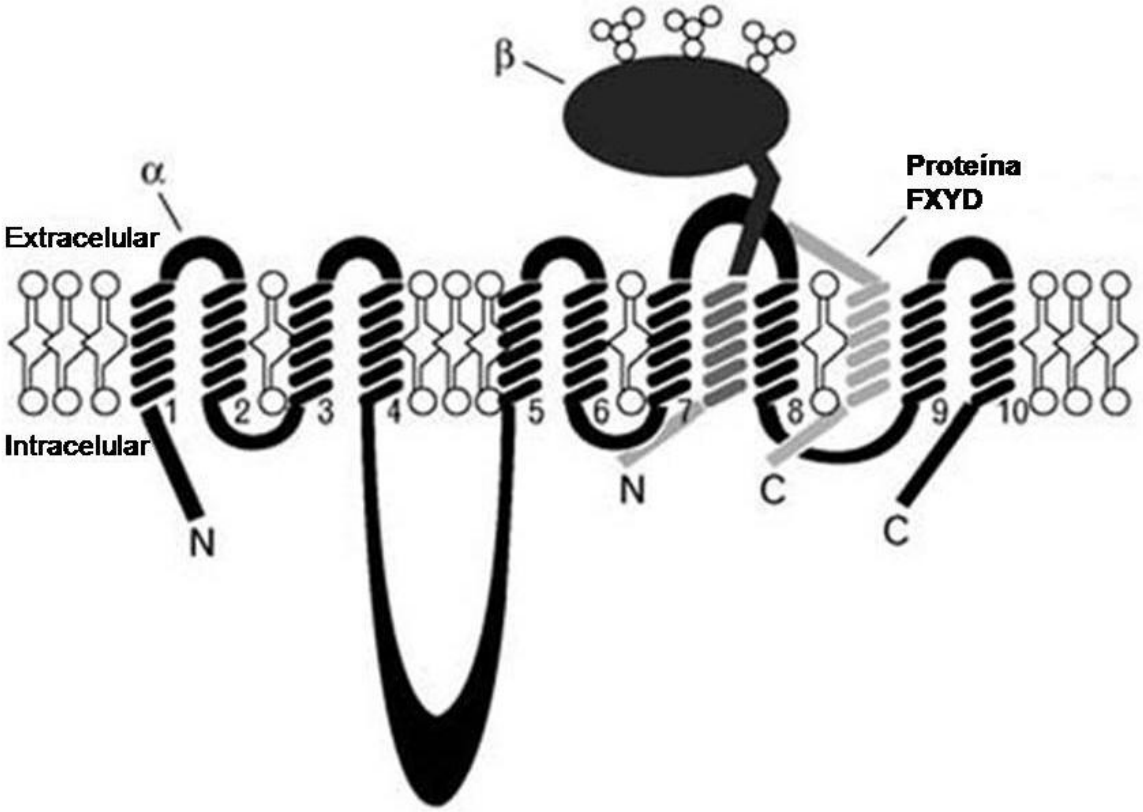


FIGURA 1. Topologia de membrana da (Na^+, K^+)-ATPase.

O modelo proposto apresenta a subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase com dez segmentos transmembrana formando alças extra e intracelulares e a subunidade β com um único segmento transmembrana interagindo com os segmentos M7/M8 da subunidade α. A subunidade γ uma pequena proteína que interage com o M9 da subunidade α. Modificado de Geering et al. (2008).

A subunidade β apresenta apenas um domínio transmembrana de aproximadamente 55 kDa, que interage diretamente com os segmentos transmembrana M7-M10 da subunidade α (Morth et al., 2007). Altamente glicosilada esta subunidade apresenta o N terminal (30 resíduos) voltado para o meio intracelular, e a maior parte (serca de 300 dos 370 resíduos) voltada para o meio extracelular (Kaplan, 2002). Esta subunidade tem função de chaperona, atuando na estabilização e no enovelamento

correto da subunidade α, e orientando a inserção da (Na^+, K^+)-ATPase na membrana plasmática (Hasler et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Becker et al., 2004; Morth et al., 2007; Faller, 2008; Geering, 2008). A subunidade β também modula a atividade catalítica da enzima, alem do transporte de K^+ e Na^+ (Lutsenko & Kaplan, 1993; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Martin, 2005; Durr et al., 2009).

A subunidade γ é uma pequena proteína (9 kDa), integrante de uma família de reguladores denominada FXYD. Ela possui um único segmento transmenbrana, posicionado ao lado do segmento M9 da subunidade α, que estabiliza o complexo αγ através de interações com aminoáciados específicos (Faller, 2008). Através de mutagênese sitio-dirigida, modelagem molecular e microscopia eletrônica observou-se que, as FXYD interagem com resíduos localizados em uma cavidade da subunidade α, formada pelos segmentos M2-M4-M9. Estudos em relação a interações da (Na^+, K^+)-ATPase e a FXYD1 em micelas de SDS, revelaram que o segmento transmembrana M2 da subunidade α e a FXYD1 estão próximos, sendo provável a estabilização desta interação por anéis aromáticos (Teriete et al., 2007; Dempski et al., 2008). É expressa de maneira tecido-específica e não necessária para a atividade da (Na^+, K^+)-ATPase, e interações entre a subunidade γ e a (Na^+, K^+)-ATPase foram demonstradas pela primeira vez através de ligação covalente com derivados fotoreativos da ouabaína (Garty & Karlish, 2006). A subunidade γ interage de maneira específica com a (Na^+, K^+)-ATPase alterando as afinidades aparentes da enzima para Na^+, K^+, ATP e V atuando também como inibidor (Dempski et al., 2008). Estes efeitos cinéticos apesar de modestos podem ter importância fisiológica, contudo podem também ser apenas resultado das interações entre a subunidade γ e a (Na^+, K^+)-ATPase (Garty & Karlish, 2006; Faler, 2008).

A ATPase tipo P melhor caracterizada estruturalmente é a Ca^{2+}-ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA), para a qual foram determinadas estruturas tridimensionais para diferentes estados conformacionais a nível de resolução atômica (Toyoshima et al., 2000, 2004, 2007; Sorensen et al., 2004; Toyoshima & Mizutani, 2004; Olesen et al., 2004; Jensen et al., 2006). Recentemente a estrutura cristalina do complexo αβ da (Na^+, K^+-ATPase) de rim de porco foi determinada por Morth e colaboradores (2007), sendo que a subunidade α é muito semelhante a da Ca^{2+}-ATPase, validando os modelos anteriormente utilizados para a estrutura tridimensional da (Na^+, K^+)-ATPase, baseados na homologia de seqüencias de aminoácidos, e na semelhança das características gerais da estrutura tridimensional entre as duas enzimas (Rice et al.,

2001; Martin, 2005). Entretanto existem algumas diferenças significativas entre as subunidades α das duas enzimas, tais como a disposição espacial de alguns segmentos transmembrana, e do segmento citoplasmático C-terminal, que podem ser relevantes para a seletividade dos íons transportados. Por outro lado, embora a arquitetura dos domínios citoplasmáticos seja muito similar nas duas enzimas, o domínio N é menor na (Na^+, K^+)-ATPase, enquanto o domínio P apresenta uma alça extra, que possivelmente esta envolvida na interação com proteínas regulatórias (Morth et al., 2007).

São conhecidas quatro isoformas para a subunidade α, e três da subunidade β, codificadas por diferentes famílias de genes. A isoforma α_1 é a única presente no rim, e a isoforma predominante na maioria dos tecidos. Isoforma α_2 é predominante no músculo esquelético, mas também é encontrada no cérebro, coração, olhos e tecido adiposo. A isoforma α_3 é essencialmente encontrada no cérebro (neurônios), e a α_4 é expressa apenas no testículo (Woo et al., 2000). Estas diferentes isoformas da subunidade α apresentam propriedades cinéticas distintas, em relação a estimulação por Na^+, K^+, ATP e a inibição pela ouabaína (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasheri et al., 2000; Segall et al., 2000; Lingrel et al., 2003). Homólogos diretos da subunidade α dos vertebrados ainda não foram descritos em invertebrados (Emery et al., 1998; Okamura et al., 2003). Duas isoformas da subunidade α foram descritas em Artemia salina e Artemia franciscana, sem correspondência direta com as isoformas encontradas em vertebrados. (Baxter-Lowe et al., 1989; Cortas et al., 1989; Macias et al., 1991; GarciaSaez et al., 1997; Cortas & Edelman, 1998; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Mais recentemente foi sugerida por Blanco (2005) a existência de duas novas isoformas da subunidade β. A combinação dessas isoformas expressadas seletivamente em diferentes tecidos da origem a várias izoenzimas com propriedades cinéticas distintas. Embora todas as possíveis combinações αβ resultem em enzimas cataliticamente ativas, ainda não é conhecido se in vivo, essa associação de isoformas particulares é regulada, de maneira a favorecer a expressão de apenas algumas isoenzimas. Além disso, a relevância fisiológica dessa diversidade de isoformas ainda não está esclarecida (Mijatovic et al., 2007).

O mecanismo de reação de hidrólise do ATP acoplada ao transporte de íons pela (Na^+, K^+)-ATPase, envolve grande mudanças conformacionais entre as duas formas da enzima (FIGURA 2), denominadas E_1 que apresenta alta afinidade pelo Na^+ citoplasmático, e E_2 que apresenta alta afinidade pelo K^+ extracelular (Kaplan, 2002;

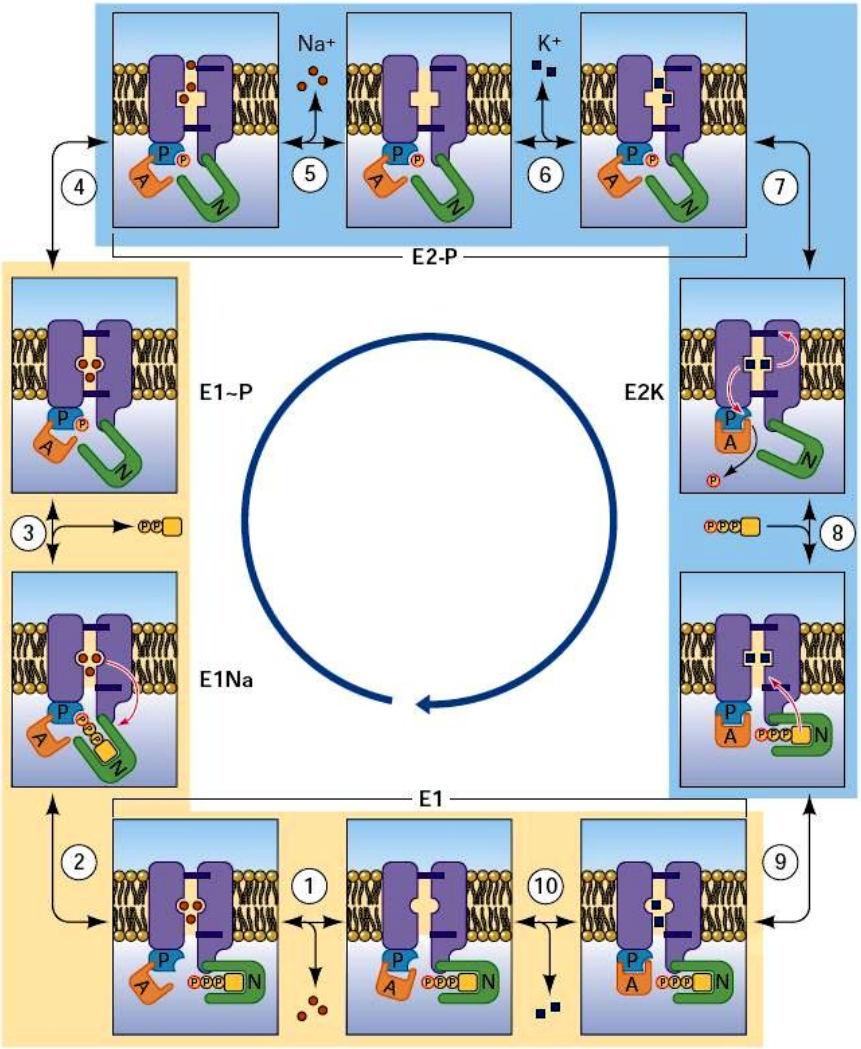


FIGURA 2. Esquema integrado do ciclo funcional da (Na^+, K^+)-ATPase.

O esquema mostra a direção do ciclo reacional impulsionada pela razão ATP/ADP. Os estados conformacionais E_1 e E_2 da enzima apresentam diferentes afinidades para K^+ e Na^+ e movimentos dos domínios A, N e P levam a fosforilação e defosforilação da enzima revelando os sítios de ligação dos cátions. Modificado de Horisberger et al. (2004).

Jorgensen et al., 2003; Apell, 2004; Horisberger, 2004).

Numa etapa inicial (etapa 1) a enzima encontra-se na conformação E_1, o ATP está ligado ao seu sítio, e a ligação dos íons Na^+ a enzima provoca um rearranjo dos segmentos transmembrana da subunidade α, que é propagado para os domínios citoplasmáticos, induzindo o posicionamento adequado do resíduo de aspartato que será fosforilado pelo ATP. Para tal, uma ampla rotação do domínio N posiciona o fosfato γ do ATP perto do sitio de fosforilação, nesta posição, o ATP parece atuar como ponte entre os domínios N e P, desta forma, a clivagem desta ponte leva a transferência do

fosfato γ para D^{376} (etapa 2). Segundo, ocorre a liberação de uma molécula de ADP, e o domínio A gira em torno de 30° no eixo horizontal, levando a um amplo movimento de translação do primeiro segmento transmembrana no meio intracelular responsável pela oclusão dos íons sódio (etapa 3). Esta conformação de alta energia denominada E_1~P relaxa rapidamente para a conformação E_2~P, onde um canal que dá acesso ao meio extracelular é aberto (etapa 4), e o primeiro Na^+ é liberado levando a reorientação dos sítios de ligação de cátions do meio citoplasmático para o meio extracelular, a desoclusão dos dois íons Na^+ restantes leva a transição para a forma E_2P, com liberação dos íons Na^+ para fora da célula (etapa 5). Dois íons K^+ extracelulares ligam-se a enzima levando a conformação E_2P(2K) (etapa 6), o que resulta na defosforilação do resíduo D^{376}, e oclusão dos íons potássio (etapa 7). A ligação do ATP acelera a mudança conformacional de E_2 para E_1 desocluindo os íons K^+ (etapa 8) e deixando livres os sítio de ligação que são ocupados por três íons sódio (etapa 9) reiniciando o ciclo. (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004).

A (Na^+, K^+)-ATPase apresenta um sítio de ligação para cardiotônicos evolutivamente conservado. Atualmente acredita-se que esteróides cardiotônicos endógenos, capazes de ligar-se especificamente a enzima, atuam fisiologicamente como moduladores da sua ação em diversos organismos (Dostanic-Larson et al., 2006; Nesher et al., 2007). A ouabaína um glicosídeo cardiotônico intensamente estudado, inibe especificamente a atividade catalítica e o transporte iônico da (Na^+, K^+)-ATPase, através da interação com uma fenda na superfície extracelular, envolvendo múltiplos grupos funcionais localizados na subunidade α e em menor extensão na subunidade β (Croyle et al., 1997; Crambert et al., 2004). Ao interagir com a porção extracelular da (Na^+, K^+)-ATPase, a ouabaína se liga com maior afinidade a forma E_2P (Paula et al., 2005). Recentemente Ogawa e colaboradores (2009) investigaram a localização do sítio de ligação do inibidor ouabaína a (Na^+, K^+)-ATPase, através do estudo cristalográfico da enzima na conformação E_1 contendo a ouabaína ligada ao seu sítio, mostrando que os resíduos de aminoácidos localizados nos segmentos transmembrana desempenham um papel chave na ligação do inibidor a enzima, confirmando que a ouabaína interage com a (Na^+, K^+)-ATPase pelo lado extracelular, mas indicando que seu sítio encontra-se inserido na membrana, localizado em uma cavidade formada pelos segmentos transmembrana M1, M2, M4, M5 e M6, muito próximo ao sítio de ligação do K^+, isto poderia explicar porque a ligação da ouabaína é tão lenta, contudo, estes resultados serão confirmados pelo estudo cristalográfico da enzima na conformação E_2 (Qiu et al.,

2005). A (Na^+, K^+)-ATPase assim como outras ATPases do tipos P, também é fortemente inibida por ortovanadato, que mimetiza o estado de transição da fosforilação/desfosforilação da enzima na forma E_2. O ortovanadato liga-se covalentemente a enzima, bloqueando o ciclo reacional (Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998).

A (Na^+, K^+)-ATPase pode hidrolisar substratos como o para-fenilfosfato (PNFF), a vantagem em utilizar este pseudo-substrato é que sua hidrólise pode ser medida de forma direta e contínua, enquanto a análise da hidrólise do ATP exige a utilização de um ensaio descontínuo, seguida da liberação de fosfato inorgânico, ou o ensaio contínuo mas com uso de sistemas indiretos como Piruvato Kinase - Lactato desidrogenase onde a oxidação do NADH é quantificada (Gache et al., 1977). O esquema cinético desta reação ainda não está totalmente esclarecido, um ponto duvidoso envolve a presença ou não de uma conformação onde o K^+ está ocluído. Desta forma o íon estaria preso no interior da proteína, e o canal de acesso ao meio extra ou intracelular não estaria exposto, sendo necessário uma mudança de conformação para sua dissociação. Entretanto mesmo que a atividade para-nitrofenil fosfatase (pNPPase), e a desfosforilação envolvam a hidrólise do grupo fosfato, e ambos sejam estimulados por K^+, o lado a partir da qual o K^+ se liga é diferente nos dois casos. Os íons potássio extracelulares estimulam a desfosforilação enquanto os intracelulares estimulam a atividade pNPPase (Gache et al., 1977; Gatto et al., 2007).

Belda e colaboradores (2001) confirmaram que o ciclo catalítico das ATPases tipo P não segue uma seqüência rígida de reações, através da caracterização detalhada do ciclo reacional da Ca^{2+}-ATPase do reticulo sarcoplasmático, utilizando p-nitrofenil fosfato como substrato doador de energia. Na presença de Ca^{2+} (E_1Ca^{2+}) a adição de pNPP leva à formação do intermediário fosforilado E_1PCa^{2+}. A forma pela qual o Ca^{2+} se dissocia da enzima leva a dois ciclos catalíticos E_1 e E_2. Quando a dissociação Ca^{2+} dentro das vesículas leva a liberação de P_i para o meio externo, há um ciclo de E_2-E_1 que produz uma translocação vetorial de Ca^{2+} do citoplasma para o compartimento lumenal. Quando a liberação de P_i ocorre em primeiro lugar, o Ca^{2+} dissocia para o meio externo através do ciclo E_1. A interação com o pNPP pode produzir intermediários fosforilados sem ligação com o Ca^{2+} (E_2P) originando o ciclo E_2.

1.2 A (Na^+, K^+)-ATPase e a osmorregulação nos crustáceos

Ao invadir meios diluídos os crustáceos necessariamente enfrentam influxo osmótico de água e perdas de sal por difusão através de superfícies permeáveis, estes processos alteram o volume e composição dos fluidos corporais destes animais (Pequeux, 1995; Kirschner, 2004). Diferentes grupos estabeleceram-se com êxito nos ambientes de água doce e salobra, através de um conjunto de mecanismos fisiológicos que se desenvolveram ao longo do processo evolutivo, permitindo o controle do volume intracelular e o balanço de solutos (Pequeux, 1995; Lucu et al., 2000).

A osmorregulação compreende um conjunto de mecanismos fisiológicos que permitem ao animal, controlar o teor de água e osmólitos intra e extracelulares, mantendo a concentração osmótica de seus fluidos relativamente constante, independente da salinidade do meio externo (Pequeux, 1995). Além do ambiente marinho ancestral os crustáceos habitam uma grande variedade de biótopos. A invasão da água doce por estes animais parecem ter evoluído através de duas adaptações principais: mecanismos eficientes de regulação hiper-osmótica e iônica e independência da água salobra para completar seu ciclo ontogenético (Mantel & Farmer, 1983; Charmantier, 1998; Anger, 2001).

Os principais mecanismos de regulação iônica e osmótica nos crustáceos de água doce incluem absorção ativa de Na^+ através de um epitélio branquial especializado e baixa permeabilidade à água, juntamente com a excreção de urina isosmótica ou diluída pelas glândulas antenais (Augusto et al., 2009). Nestes animais a captura de íons sódio apresenta um comportamento cinético michaeliano, e é dependente de sua concentração, já que aumentos na concentração de amônio no meio externo inibem a captura de íons sódio levando a suposição que um trocador Na^+/H^+ pode estar envolvido (Kirschiner, 2004).

Uma evidência para indicar determinada proteína como relevante na osmorregulação, é a alteração de sua expressão ou atividade após o organismo ser submetido a aclimatação em altas ou baixas salinidades, especialmente quando essas alterações são observadas em órgãos osmorregulatórios como as brânquias (Saez et al., 2009). Estas alterações na expressão da enzima, em resposta a aclimatação foram relatadas por Belli e colaboradores (2009) que realizaram um Western blotting da fração microsomal de tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum*, utilizando anticorpo monoclonal para a subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase de aves, realizando uma comparação entre animais recém capturados e aclimatados a 21S, onde foi observado

uma mudança quantitativa na expressão da enzima resultante da aclimatação. Resultados semelhantes foram relatados por Garçon e colaboradores (2009) para o siri *Callinectes ornatus*.

O transporte dos íons Na^+ do citoplasma das células epiteliais para a hemolinfa, ocorre principalmente através de uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral do epitélio branquial (Towle & Weihrauch, 2001). Um modelo para a absorção de Na^+, e Cl^- através do epitélio branquial em crustáceos está mostrado na Figura 3. Em hiperosmoreguladores fortes, o Na^+ é absorvido através de canais Na^+ sensíveis a amilorida na membrana apical e pela (Na^+, K^+)-ATPase na membrana basolateral (FIGURA 3. A). Trocadores Cl^-/HCO^-_3 presentes na membrana apical atuam no transporte do íon cloreto do meio externo para as células epiteliais, sendo que o transporte até a hemolinfa ocorre através de canais Cl^- presentes na membrana basolateral. Os canais K^+ localizados na membrana basolateral, geram um potencial elétrico negativo nas células epiteliais, favorecendo a saída do Cl^- do citoplasma para a hemolinfa. Uma V-ATPase apical gera aumento do HCO_3^- celular que favorece a absorção de Cl^- transapical, levando a hiperpolarização celular, gerando a entrada transapical de Na^+ e favorecendo também a saída do Cl^- através da membrana basolateral (Freire et al., 2008).

O modelo apresentado para hiperosmorreguladores fracos está mostrado na Figura 3. B. Semelhantemente ao observado para os hiperreguladores fortes, um canal K^+ está presente na membrana basolateral, atuando na geração do potencial elétrico e canais Cl^- basolaterais transportam o íon cloreto para hemolinfa, enquanto canais K^+ localizados na membrana apical geram substrato para um co-transportador $Na^+/K^+/2Cl^-$, que favorecem a natureza eletrogênica deste transporte. A absorção de uma fração aparentemente variável de NaCl ocorre através da ação de trocadores apicais, onde a hidratação do CO_2 catalisada pela anidrase carbônica fornece o substrato celular para esses trocadores (Freire et al., 2008).

Em água doce a maioria dos crustáceos são hiperosmóticos em relação ao meio externo, ou seja, mantém a concentração osmótica e iônica de sua hemolinfa maiores que as do meio externo. Nestas condições, estes animais enfrentam a perda de íons por difusão e ganho de água, sendo necessário um gasto energético para manter as concentrações da hemolinfa, este gasto energético é minimizado pela redução da permeabilidade a íons e/ou água. Estes animais apresentam diferentes afinidades, estabelecidas por características de cada uma destas espécies em relação a invasão deste

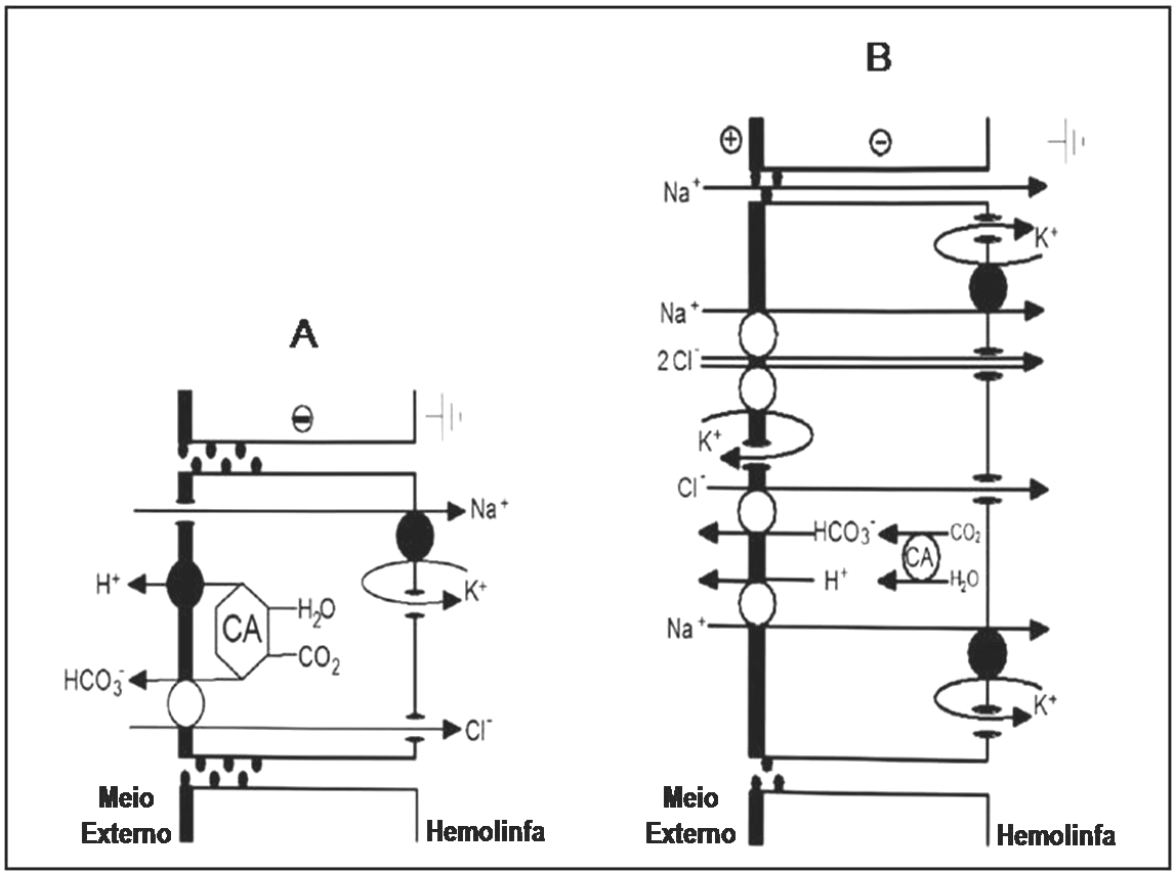


FIGURA 3. Osmorregulação em crustáceos.
Mecanismo de transporte para absorção transbranquial de sódio em osmorreguladores fortes (A) e fracos (B). Modificado de Freire et al. (2008).

ambiente, e podem ser divididos em dois grupos amplos em relação a regulação osmótica. O primeiro grupo, formado pelos Branchipoda e alguns copépodes apresentam baixa osmolalidade da hemolinfa de até 200 mOsm/Kg, o segundo grupo Malacrostaca apresentam osmolalidades maiores de 200-500 mOsm/Kg. Alguns decápodes como M*acrobrachium australiense* e *Macrobrachium rosembergii* produzem urina hipoosmótica em relação ao meio externo para minimizar o gasto energético relacionado a osmorregulaçao (Mantel & Farmer, 1983).

Como mencionado anteriormente a independência da salinidade para completar seu ciclo de vida é um fator determinante na invasão da água doce pelos crustáceos. O estabelecimento destes animais em meios diluídos é determinado pela habilidade de cada uma das fases de desenvolvimento em adaptar-se ao novo ambiente. Alguns animais migram entre diferentes ambientes durante seu ciclo de vida, sendo que as diferentes fases de desenvolvimento destes animais enfrentam um meio externo com diferentes salinidades, logo a forma como o animal osmorregula seus fluidos corporais deve alterar-se durante a ontogênese, considerando que mudanças morfológicas durante

o desenvolvimento do animal levam a mudanças fisiológicas, aumentando a tolerância a salinidade. Três possíveis padrões de ontogenia osmorregulação foram descritos por Charmantier (1998) e estão apresentadas na Figura 4.

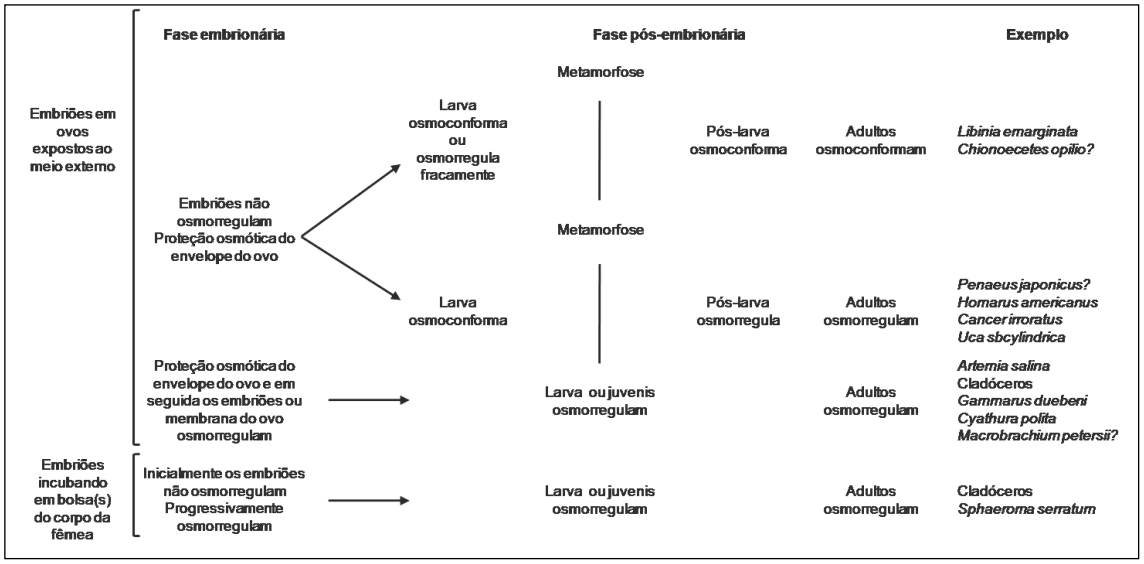


FIGURA 4. Diferentes padrões de ontogenia da osmorregulação. Modificado de Charmantier (1998).

Na fase embrionária os ovos podem estar expostos ao meio externo onde são osmoticamente protegidos por uma membrana, neste caso os animais podem permanecer osmoconformadores durante seu ciclo de vida ou adquirir a capacidade de osmorregular durante a fase pós-embrionária. Quando os ovos são incubados junto aos pleópodos da fêmea, permanecem em bolsas fechadas onde ficam osmoticamente protegidos e progressivamente desenvolvem a capacidade de osmorregular permanecendo osmorreguladores durante todo seu ciclo de vida.

1.3 O camarão *Macrobrachium amazonicum*

O camarão *M. amazonicum* (FIGURA 5) pertence à família Palaeomonidae e está amplamente distribuído na América do Sul, desde a Venezuela até a Argentina. No Brasil, apresenta importante potencial pesqueiro e de cultivo devido a características como rápido desenvolvimento e fácil manutenção em cativeiro (Sampaio et al., 2007; Moraes-Valenti & Valenti, 2007; Maciel & Valenti, 2009).

Segundo Jahilal e colaboradores (1993), os palaemonídeos do gênero Macrobrachium (Bate, 1868), são um grupo de crustáceos originários de ancestrais

marinhos no início do Pleistoceno e que posteriormente migraram para água doce, podendo ter havido mais de uma onda de migração e portanto, seus membros são encontrados habitando toda a gama de habitats, dos animais puramente marinhos aos animais habitantes de águas interiores. Devido a esse fato, eles podem apresentar diversos tipos de padrões de desenvolvimento. A evolução é um processo contínuo, sendo bastante difícil de definir claramente os padrões de desenvolvimento em tipos distintos. No entanto, em função do número de estágios larvais, três tipos básicos podem ser amplamente reconhecidos: Tipo I (tipo prolongada ou Normal), Tipo II (tipo parcialmente Abreviada) e Tipo III (tipo completamente abreviado). O camarão *M. amazonicum* pertence ao grupo tipo I. Este grupo pode ser dividido em dois grupos, dependendo do número de estágios larvais (por número de ecdises). O grupo IA, com mais de 10 fases larvais e do grupo IB, compreendendo 8 ou 9 estágios larvais.

Algumas populações deste gênero completam seu ciclo de vida em água doce, enquanto outras necessitam da água salobra nos primeiros estágios de desenvolvimento para completar seu ciclo de vida que compreende ovo, larva, juvenil e adulto. A fase embrionária ocorre em um período de 12-18 dias e neste período a fêmea permanece em água doce. As larvas necessitam de ambientes com salinidade em torno de 10-12 e esta fase abrange um período de 20-23 dias apresentando de 9-11 estágios larvais, onde os estágios I-VI são zoeas e os estágios finais são decapoditos. O primeiro juvenil aparece em média 20-22 dias após a eclosão dos ovos, neste estágio os animais vivem em água doce, ainda não apresentam maturação gonadal e as estruturas morfológicas que permitem diferenciar os órgãos reprodutivos não estão visíveis (Moraes-Riodades & Valenti, 2004; Maciel & Valenti, 2009). Na aqüicultura a fase juvenil é dividida em I e II onde, os juvenis recentes (juvenil I) pesam de 0,02 a 0,2 gramas e os juvenis tardios (juvenil II) pesam entre 1,2 a 1,5 gramas. O local e de estocagem e as condições de temperatura e densidade populacional variam nestes dois estágios juvenis (Zimmermann & Sampaio, 2008).

Devido a sua capacidade de hiper-regular as concentrações osmóticas e iônicas de sua hemolinfa em ambientes de salinidade variável e a dependência de certas populações em relação a água salobra para a reprodução, *M. amazonicum* é considerado um recente invasor do ambiente de água doce (Magalhães, 1985). Estudos realizados por Santos e colaboradores (2007) em uma população de um reservatório próximo a Sertãozinho (em São Paulo, Brasil a 400 km do mar), embriões e adultos

FIGURA 5. O camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum*
Modificado de Maciel & Valenti (2009)

apresentaram melhor percentagem de sobrevivência em água doce e os estágios larvais em salinidades de 6 a 25, entretanto animais adultos desta população não apresentaram altos índices de mortalidade a 25S por até 10 dias de aclimatação sendo que em 7 dias a 30S a mortalidade foi de 90%.

As brânquias de crustáceos eurialinos têm um papel fundamental na osmorregulação iônica. Em perfundidos de brânquias isoladas do caranguejo-azul *Callinectes danae*, por exemplo, a inibição da (Na^+, K^+)-ATPase pela ouabaína bloqueia mais de 50% da absorção de Na^+ do meio externo para a hemolinfa. Características típicas deste epitélio celular incluem membrana superficial grandemente elaborada, particularmente na região basolateral que está em contato direto com o fluido corporal e numerosas células ricas em mitocôndrias, que fornecem ATP para os processos que requerem energia (Towle & Weihrauch, 2001).

O camarão de água doce *M. amazonicum* possui sete pares de pleurobrânquias

(FIGURA 6. A), localizadas na câmara branquial cefalotoráxica e constituídas de duas hemi-lamelas filobranquiadas, projetando-se de uma base triangular caracterizadas pela presença de um ou mais eixos de simetria (FIGURA 6. B).

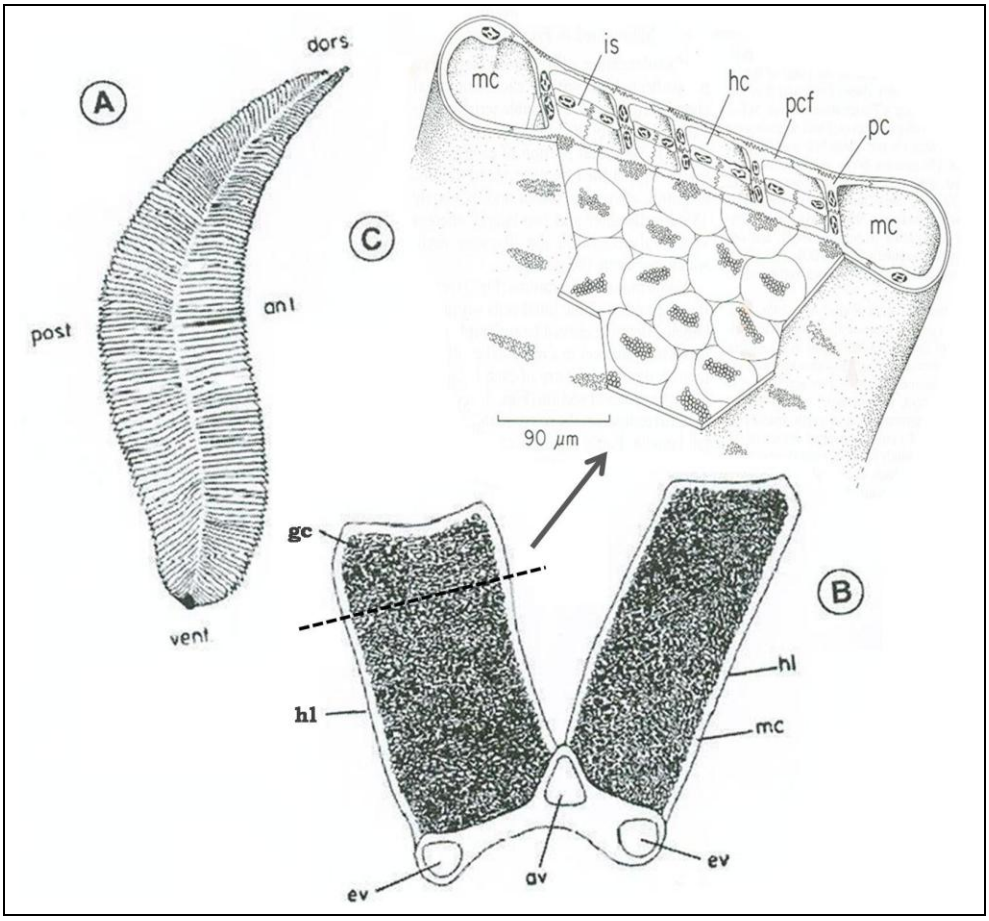


FIGURA 6. Morfologia da brânquia de um camarão decápode de água doce.

Um resumo de localização e diagrama mostrando a anatomia geral da sexta, brânquia posterior direita (A) e de uma lamela branquial componente (B) no camarão de água doce Olfersi Macrobrachium. A hemolinfa flui através dos vasos eferentes laterais (ev), passando pelo canal externo marginal (mc), através da hemilamella (hl) por meio de branquiais capilares (gc) para os canais interiores marginais, e de volta através do vaso centra aferente (av). A seção transversal de uma hemilamela (C) mostra as células pilares (pc), o septo intralamelar (is), canal da hemolinfa (hc) e canal marginal lateral (cm). Modificado de Freire et al. (2008) e Freire & McNamara (1995).

A análise ultraestrutural do epitélio branquial do camarão *M. amazonicum* revelou muitas semelhanças ao encontrado para *Macrobrachium olfersii* (FIGURA 6). O eixo é achatado e contêm dois vasos aferentes (av) e um eferente (ev) conectados através de duas hemi-lamelas (hl). O epitélio branquial está localizado abaixo de uma cutícula fina e consiste de células pilares (pc) achatadas dispostas em ambos os lados

das lamelas (FIGURA 6. C). As células pilares exibem espessas projeções apicais, que se estendem radialmente abaixo da cutícula, conectando-se as projeções adjacentes através de complexos juncionais. O corpo celular suporta uma camada basal simples de células septais intra-lamelares, formando um sistema de lacunas, na forma de compartimentos irregulares através do qual flui a hemolinfa (hc). A interface entre a superfície das projeções apicais inferiores e a hemolinfa é simples e não forma dobras ou amplificações, consistindo de projeções da membrana basal apoiadas por uma lâmina basal. As junções entre as projeções das células pilares e as células adjacentes consiste de uma pequena estrutura similar a um desmossomo, seguida por junções septadas e uma longa região de justaposição entre as membranas celulares, levando ao espaço da hemolinfa (FIGURA 6. C). O septo intralamelar é extenso e consistindo de células septais justapostas caracterizadas por mitocôndrias abundantes, e cercado por numerosas e profundas invaginações da membrana celular. A interface entre as células do septo e da hemolinfa é altamente amplificada, composta por longas e estreitas invaginações que se estendem profundamente no citoplasma da célula septal longitudinalmente, cada uma associada ou perto de uma ou mais mitocôndrias próximas a membrana celular de ambos os lados de cada invaginação, formando uma unidade bem estruturada (Belli et al., 2009).

1.4 A (Na^+, K^+)-ATPase excreção de compostos nitrogenados nos crustáceos

Os crustáceos são amoniotéicos e excretam compostos nitrogenados na forma de amônia. Nestes animais a amônia excretada origina-se principalmente do catabolismo de proteínas e aminoácidos sendo que, sua toxicidade leva a diversos distúrbios fisiológicos logo, a presença de mecanismos efetivos de excreção se torna importante para que as concentrações biológicas não ultrapassem os limiteis toleráveis (Weihrauch et al., 2004). A forma iônica da amônia (NH_4^+) pode permear as membranas biológicas devido à suas propriedades hidrofílicas, assim o NH_4^+ difunde-se pelas bicamadas lipídicas muito lentamente, desta forma, sua passagem pela membrana ocorre através de proteínas associadas ou transportadoras. Estudos realizados em *Callinectes sapidus, Eriocher sinensis, Carcinus maenas e M. rosenbergii* revelaram uma correlação entre excreção de amônia e absorção de sódio. Utilizando vesículas de membranas do epitélio branquial e perfusão de brânquias isoladas obteve-se indícios de que o NH_4^+ pode substituir o K^+ no co-transporte de Na^+ em uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral do epitélio branquial, já que nestes experimentos a ouabaína

bloqueia a excreção de amônia, apoiando a idéia de que uma (Na^+, K^+)-ATPase funcional é essencial para este processo (Weihrauch et al., 1998; Towle & Weihrauch, 2001).

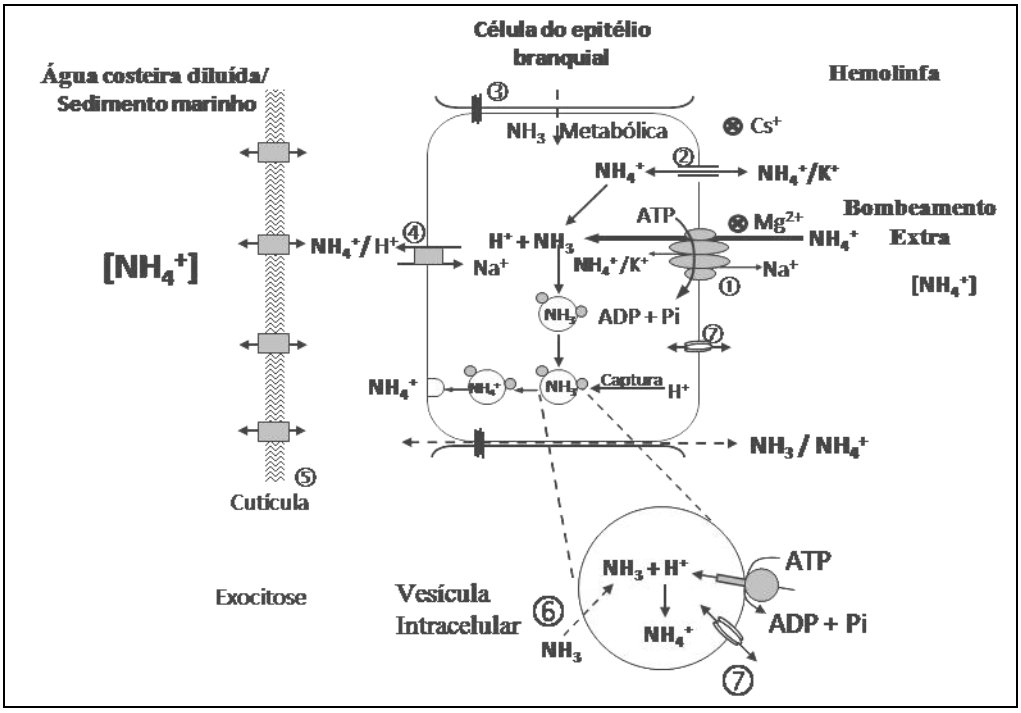


FIGURA 7. Modelo para excreção ativa de amônia através das brânquias do caranguejo eurialino C. danae.

(1) Uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral, que apresenta segundo sítio de ligação para o NH_4^+ quando está totalmente saturada com K^+. (2) canais K^+ sensíveis ao Cs^+ localizados na membrana basolateral, não discriminam entre K^+ e NH_4^+. (3) junção septada. (4) Transportador Na^+/NH_4^+ (H^+), localizado na membrana apical, ativo particularmente durante a extrusão transcelular de NH_4^+. (5) Canais permeáveis a cátions sensíveis a amilorida, presentes na cutícula permitem a difusão de NH_4^+ para o meio externo. (6) Uma V-ATPase e (7) uma proteína análoga a Rhesus de mamíferos também participam da excreção. Modificado de Masui et al. (2005).

Masui e colaboradores (2005) apresentam um modelo onde a (Na^+, K^+)-ATPase é responsável por direcionar o transporte do íon amônio para o meio externo (FIGURA 7). Neste modelo a (Na^+, K^+)-ATPase é a força motriz principal no transporte de NH_4^+ para fora da célula, onde o íon amônio pode substituir o K^+ no transporte de Na^+ ou, ser transportado através de um segundo sítio, exposto quando a enzima está saturada com K^+. No transporte do NH_4^+ para o citoplasma das células do epitélio branquial também estão presentes canais K^+, que não discriminam entre K^+ e NH_4^+ e um transportador de amônia recentemente descrito, Rhesus-like, que pode mediar transferência de íons NH_4^+

através das membranas celulares. Uma vez no citoplasma o íon amônio pode ser transportado para o espaço subcuticular por exocitose em vesículas acidificadas por uma V-ATPase ou através de um transportador Na^+/NH_4^+ (H^+) presente na membrana apical, sendo levado para o meio externo através de estruturas permeáveis a cátions sensíveis a amilorida presentes na cutícula.

Foram relatados estimulação sinergística da (Na^+, K^+)-ATPase de vários crustáceos na presença de íons potássio e amônio (Masui et al., 2002; Furriel et al 2004; Santos et al., 2007; Garçon et al., 2007). Efeitos como incrementos da velocidade máxima e modulação da afinidade foram observados na presença dos dois íons.

Crustáceos de água doce como o *M. amazonicum* realizam absorção de Na^+ de um meio extracelular com baixas concentrações, sendo que a excreção de NH_4^+ a favor de seu gradiente de concentração acoplada a absorção de Na^+ de meios diluídos pode representar um importante mecanismo fisiológico adaptativo (Furriel et al., 2004).

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterização e comparação das propriedades bioquímicas e cinéticas da (Na^+, K^+)-ATPase branquial em diferentes estágios ontogenéticos do camarão *M. amazonicum* recém capturado.

2.2 Objetivos específicos

Em relação a animais adultos e juvenis I, i) obtenção das frações de membrana ricas em (Na^+, K^+)-ATPase branquial, que serão utilizadas para medidas de atividade e determinação do peso molecular. ii) comparação da abundância da enzima por western blot, para investigar possíveis mudanças relacionadas a ontogenia do animal. iii) caracterização das propriedades cinéticas da (Na^+, K^+)-ATPase expressa de brânquias em relação a hidrólise dos substratos ATP e PNFF, para investigar mudanças nos parâmetros cinéticos da enzima em relação aos ligantes ATP, sódio, potássio e amônio durante a ontogênese. iv) estudo da modulação da atividade da enzima pelos íons potássio e amônio, para investigar a presença ou não de estimulação sinergística da enzima, possivelmente relacionada a um mecanismo de redução do custo energético para absorção de sódio a partir de um meio externo com baixas concentrações.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Tris, ATP (sal de tris), p-nitrofenilfosfato, ouabaína, ortovanadato de sódio, ácido etacrínico, imidazol, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanolsulfônico, fosfoenolpiruvato, NAD^+, NADH, piruvato quinase, lactato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e 3-fofogliceraldeído dietil acetal e alameticina foram adquiridos da Sigma Chem. Co (USA). Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético, dimetilsulfóxido e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck. Bafilomicina A_1 (Darmstadt, Alemanha), tapsigargina, oligomicina e os inibidores de protease (benzamidina 1 mmol L^{-1}, antipaína 5 µmol L^{-1}, leupeptina 5 µmol L^{-1} e pepstatina A 1 µmol L^{-1}) foram adquiridos da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico. O anticorpo monoclonal α-5 para a subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase foi obtido do Developmental Studies Hybridoma (Iowa, USA). Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura apirogênica tratada em equipamentos MilliRO e MilliQ (Bedford, USA).

3.1 Coleta dos animais

O camarão *Macrobrachium amazonicum* foi cultivado no Laboratório de Carcinicultura (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil com matrizes originárias do nordeste do estado do Pará, Brasil (1º 13'25"S, 48º 17'40"W). Os camarões juvenis I e adultos foram coletados dos tanques de criação e transportados para o laboratório de Bioquímica do departamento de Química da FFCLRP/USP – Ribeirão Preto – SP, na mesma a água do local da coleta.

3.2 Dessecção das Brânquias

Para cada homogeneizado os animais foram anestesiados por resfriamento em gelo picado, e as brânquias foram imediatamente removidas e transferidas para tampão de homogeneização gelado (TH), constituído por tampão imidazol 20 mmol L^{-1}, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L^{-1}, EDTA 6 mmol L^{-1}, Tris 6 mmol L^{-1} e um coquetel inibidores de protease (benzamidina 1 mmol L^{-1}, antipaína 5 mmol L^{-1}, leupeptina 5 mmol L^{-1} e pepstatina A 1 mmol L^{-1}).

3.3 Preparação da fração microsomal do tecido branquial

Após a remoção, as brânquias foram homogenizadas em tampão de homogeneização (20 mL/ grama de peso úmido) usando um homogeneizador Potter. Em seguida o extrato bruto foi centrifugado a 10.000 g durante 35 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi armazenado em gelo e o pellet foi resuspendido para o mesmo volume de tampão de homogeneização, e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. Os dois sobrenadantes foram reunidos e centrifugados a 100.000 g durante 2 horas a 4 ºC. O pellet resultante foi resuspendido em tampão imidazol 20 mmol L^{-1}, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L^{-1}, tris 6 mmol L^{-1} e o coquetel inibidor de protease (benzamidina 1 mmol L^{-1}, antipaína 5 mmol L^{-1}, leupeptina 5 µmol L^{-1} e pepstatina A 1 µmol L^{-1}) na proporção de 15 mL de tampão por grama de peso seco. Alíquotas de 0,5 mL foram congeladas com uma mistura de gelo seco / acetona e estocadas a 20ºC e descongeladas antes de seu uso.

3.4 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota da fração microsomal contendo de 3 a 4 mg de proteína foi aplicada em um gradiente contínuo de sacarose 10% a 50% (p/p) em tampão imidazol 20 mmol L^{-1}, pH 6,8 e centrifugada a 180000 g em uma centrífuga Hitachi 55P-72 usando um rotor vertical (PV50T2) durante 3 horas a 4ºC. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo com o auxílio de uma bomba peristáltica a analisadas em relação as atividades PNFFase, ATPase, concentração de proteína e índice de refração (usando um refratrômetro BioBrix 2WAJ).

3.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida (5-20%) conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi separado em duas partes onde, uma delas foi corada utilizando nitrato de prata e a outra foi utilizada para análise western blotting. O padrão de peso molecular utilizado foi o Full-Range Rainbow da Amersham (Piscataway, USA).

3.6 Western blotting

Após a eletroforese (SDS-PAGE), o gel foi submetido a uma eletrotransferência utilizando um sistema Hoefer, empregando membranas de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). Para o blotting, a membrana de nitrocelulose foi incubada com caseína para

bloqueio dos sítios inespecíficos. A imunodetecção foi realizada no sistema Milipore SNAP .id (Bedford, USA). A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 (diluído 1:10) a 25°C, durante 30 minutos. Após 3 lavagens com tampão TBS/Tween (Tris.HCl 50 mmol L^{-1}, pH 8,0 contendo NaCl 150 mmol L^{-1} e Tween 20 0,1%), a membrana foi incubada com o anticorpo antimouse IgG, conjugado a fosfatase alcalina (diluído 1:7500), a 25°C, durante 30 minutos. A incorporação específica do anticorpo foi revelada em tampão Tris-HCl, pH 9,5 contendo NaCl 100 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, 0,2 mmol L^{-1} NBT e 0,8 mmol L^{-1} BCIP.

3.7 Dosagem de íons e osmolalidade da hemolinfa

A hemolinfa dos animais adultos foi obtida a partir da região pericária dos animais com o auxílio de uma seringa de insulina acoplada a uma agulha #25-8 e acondicionada em Eppendorf de 0,5 mL. Para a dosagem, a hemolinfa foi diluída (1:125) em HNO_3 1%, e os íons Na^+, K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} foram quantificados utilizando um espectrôfotometro de absorção atômica Shimadzu A-A680 acoplado a um registrador Shimadzu PR-5 Graphic printer. Para minimizar a interferência do Na^+ na dosagem de K^+ foi adicionado CsCl 0,1%. O $LaNO_3$ 1% foi utilizado como supressor de interferências na dosagem de Ca^{2+} e Mg^{2+}. O íon cloreto foi quantificado através da titulação (Metron Herisou, Modelo E 485) de 10µL de amostra com nitrato de mercúrio empregando S-difenilcarbazona como indicador. A osmolalidade da hemolinfa foi determinada utilizando-se 10µL de amostra em um osmômetro de pressão de vapor (Wescor, Model 5500).

3.8 Determinação da atividade p-nitrofenilfosfatase (PNFFase)

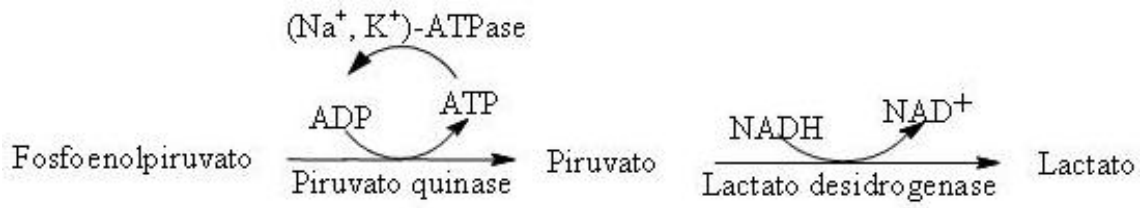
A hidrólise do PNFF foi determinada continuamente, a 25ºC, acompanhando-se a liberação do íon p-nitrofenolato ($\varepsilon_{410nm,\ pH\ 7,5}$=13.160 $M^{-1}cm^{-1}$). As condições padrão foram: tampão Hepes 50 mmol L^{-1} pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um volume final de 1 mL. A atividade PNFFase total também foi determinada em presença de ouabaína 3 mmol L^{-1}. A diferença entre a atividade PNFFase total medida na ausência e na presença de ouabaína corresponde a atividade K^+-fosfatase da fração microsomal.

Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, em condições padrões. A atividade PNFFase também foi medida após 10 minutos 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. Todos os ensaios foram realizados em duplicata usando três preparações diferentes.

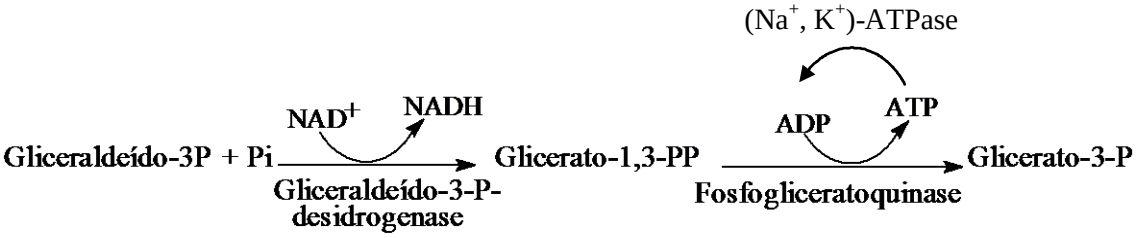
3.9 Determinação da atividade ATPase

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



A oxidação do NADH foi acompanhada em 340nm ($\varepsilon_{340nm,\ pH\ 7,5}$= 6200 $M^{-1}cm^{-1}$) em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas. As condições padrão dos ensaios foram: Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,2 mg/mL, FEP 1,15 mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1 mL.

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



A formação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\varepsilon_{340nm,\ pH\ 7,5}$= 6200 M^{-1} cm^{-1}). As condições padrão dos ensaios foram: TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NAD^+ 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1 mL.

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e controles sem a adição da enzima com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições do ensaio.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1nmol de substrato por minuto. Todos os experimentos foram realizados em duplicata usando-se pelo menos três preparações diferentes (N=3). A atividade ATPase também foi medida após 10 minutos de pré-incubação da preparação com alameticina 1mg/mg de proteína, a 25ºC (Bonnafous et al., 1982).

3.10 Tratamento das enzimas do sistema de acoplamento

As suspensões cristalinas das enzimas PQ/LDH foram aliquotadas e centrifugadas a 14000 rpm, 4ºC durante 15 minutos em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5813. O pellet foi ressuspenso em 500 µL de Hepes 50 mmol L^{-1} pH 7,5 e logo após transferido para um filtro Microcon e lavado 3 vezes com o mesmo tampão a 10000 rpm, 4ºC durante 20 minutos para remoção dos íons amônio. Para o sistema FGQ/GAFDH as enzimas foram tratadas do mesmo modo, mas utilizando o tampão Trietanolamina 50 mmol L^{-1}, pH 7,5 contendo DTT 1 mmol L^{-1}.

3.11 Preparação da solução de gliceraldeído-3-fosfato

A solução de gliceraldeído-3-fosfato 20 mmol L^{-1}, foi preparada imediatamente antes do uso, através da hidrólise de 12,5 mg de 3-fosfogliceraldeído dietil acetal em 1mL de água ultrapura, com 150µL de HCl concentrado (d=1,18g/mL). A mistura foi mantida em banho de água em ebulição durante 2 minutos e neutralizada até o pH 7,5 com 25µL de trietanolamina pura (d=1,12 g/mL).

3.12 Dosagem de proteína

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

3.13 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., 2005b). As constantes de

dissociação do complexo enzima-inibidor (K_I) foram determinadas de acordo com Dixon (1953).

Os valores dos parâmetros cinéticos mostrados nas tabelas representam a média ± 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 de dados e cada figura é uma curva representativa de uma preparação microsomal de brânquias.

4.0 RESULTADOS

4.1 Estudo da fração microsomal da fase adulta de desenvolvimento

O gradiente em densidade de sacarose da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento está representado na Figura 8. A. Um pico de atividade foi observado entre 25-34 % de sacarose (pico I) com um valor máximo de atividade de 12,9 U mg^{-1}. Um segundo pico localizado em frações mais densas (39-43% de sacarose) apresentou um valor máximo de atividade de 7,3 U mg^{-1}. A atividade PNFFase de ambos os picos foi inibida parcialmente na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} sugerindo a presença de outras fosfatases na preparação.

Para os animais em estágio juvenil I a utracentrifugação da fração microsomal de tecido branquial em um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% está representada na Figura 8. B. Utilizando PNFF como substrato foram obtidos dois picos de atividade, o pico I entre 32-35% de sacarose com uma atividade K^+-Fosfatase de 4,86 U mL^{-1} e o pico II entre 37-42% de sacarose com uma atividade K^+-Fosfatase de 2,96 U mL^{-1}. A atividade PNFFase de ambos os picos foi parcialmente inibida na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1}, sendo que o pico I apresentou inibição de aproximadamente 82% e o pico II 66% da atividade PNFFase total.

A utracentrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto em um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% em relação a atividade ATPase está representado na Figura 9. A. Observa-se a presença de dois picos de atividade onde o pico I corresponde a uma densidade de sacarose entre 26-34% e apresenta com uma atividade (Na^+, K^+)-ATPase de 12,25 U mL^{-1}. O pico II corresponde a uma densidade de sacarose entre 36-41% de. Na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} a atividade ATPase do pico I foi inibida 85% e do pico II foi inibida 40%.Estes dados sugerem que na preparação estão presentes outras ATPases diferentes da (Na^+, K^+)-ATPase.

Na Figura 9.B está mostrada a utracentrifugação da preparação da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I em um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50%, em relação a atividade ATPase. Observa-se a presença de dois picos de atividade onde o pico I corresponde 23-36% sacarose com um valor máximo de atividade (Na^+, K^+)-ATPase de 16,16 U/mL, e o pico II entre 38-44% de sacarose. Na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} a atividade ATPase de ambos os picos foi parcialmente inibida: 88% para o pico I e 76% o pico II.

4.2 Eletroforese e western blotting

A eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e o western blotting estão mostrados na Figura 12. As três primeiras colunas (A, B, C) mostram o resultado da coloração com prata, para juvenil I, juvenil II e adulto de *M. amazonicum*. Pode-se observar algumas diferenças em relação a expressão quantitativa da enzima nas bandas obtidas para animais juvenis I em relação aos juvenis II e adultos, porém os valores para a massa molecular da enzima se mostram muito semelhantes. Para o ensaio por western blotting mostrado nas três últimas colunas (D, E, F) obteve-se uma banda em cada um dos três estágios de desenvolvimento com um peso molecular de 105 kDa.

4.3 Dosagem de íons da hemolinfa

Os valores obtidos para a dosagem de íons da hemolinfa de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento estão mostrados na Tabela 1. A osmolalidade da hemolinfa foi de 326,71±20,73 mOsm/Kg H_2O.

TABELA 1. Dosagem de íons da hemolinfa de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento.

Na^+ (mmol L^{-1})	Cl^+ (mmol L^{-1})	K^+ (mmol L^{-1})	Mg^{2+} (mmol L^{-1})	Ca^{2+} (mmol L^{-1})
201,6±0,06	208,0±0,011	9,9±0,002	1,6±0,001	14,28±0,004

4.4 Caracterização da atividade K^+-fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase

A fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto apresentou uma atividade PNFFase da ordem de 112,0 U mg^{-1}, sendo que 82,0 U mg^{-1} corresponde a atividade K^+-fosfatase, e 30,0 U mg^{-1} corresponde a atividade PNFFase insensível a ouabaína. Para animais em estágio juvenil I a fração microsomal do tecido branquial revelou presença de atividade Fosfatase total da ordem de 80,0 U mg^{-1}. A atividade fosfatase insensível a ouabaína foi de 15,7 U mg^{-1}, resultando em uma atividade K^+-fosfatase da ordem de 64,7 U mg^{-1}.

Na Figura 11.A está mostrada a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto pelo PNFF. Em

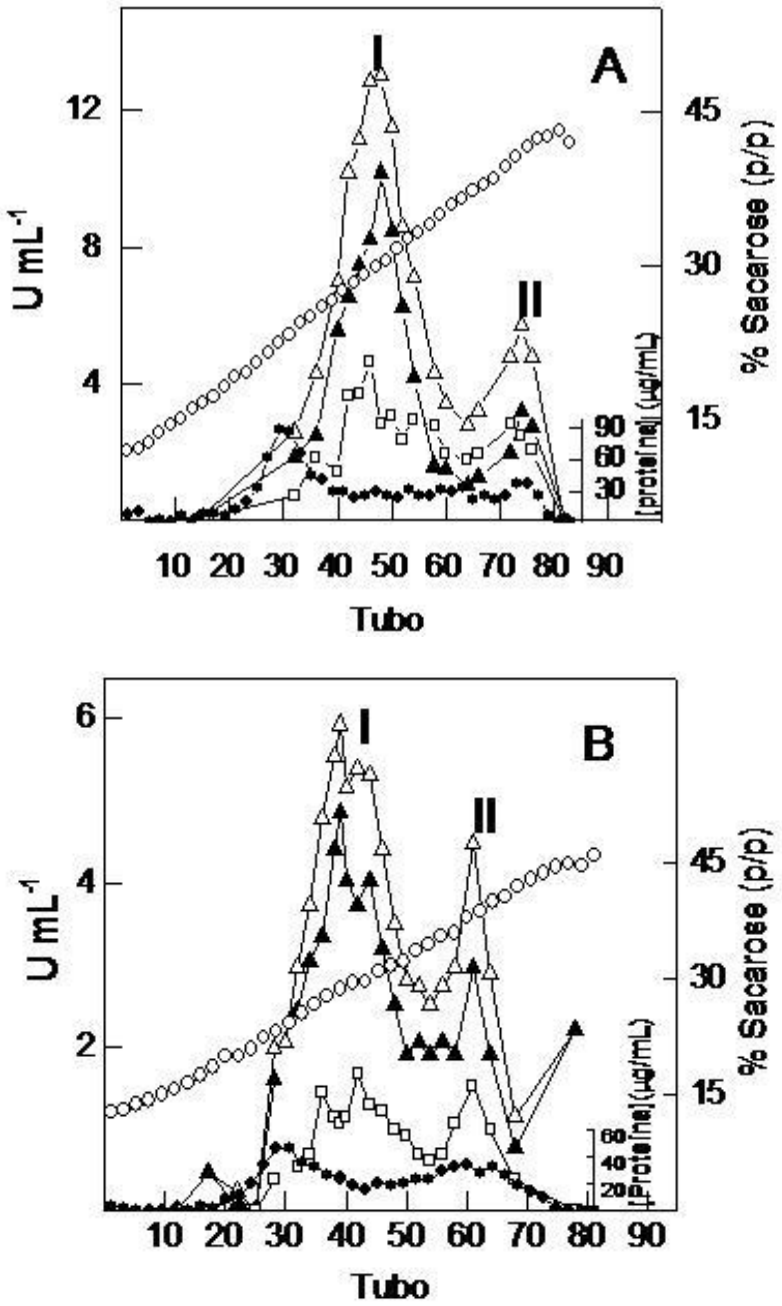


Figura 8. Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum em relação a atividade PNFFase*.

A fração microsomal (3,76 mg de proteína) foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p), em tampão imidazol 20 mmol L^{-1}, pH 6,8. Após centrifugação a 180000 g durante 3 horas, a 4 °C, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação a atividade PNFFase total (Δ); atividade K^+-fosfatase (▲); atividade insensível a ouabaína (□); concentração de proteína (●) e concentração de sacarose (○). A atividade da cada alíquota foi medida continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um 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. Animais adultos (A) e juvenis (B).

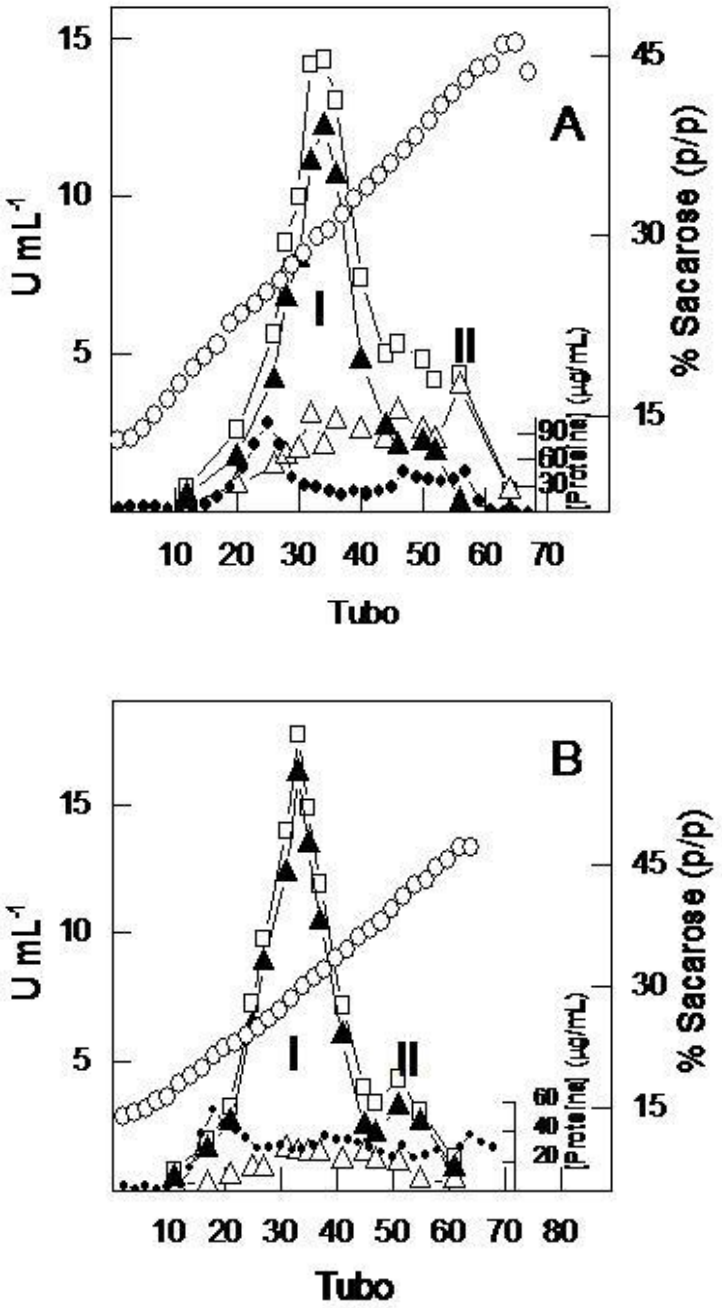


Figura 9. Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum em relação a atividade ATPase*.

A fração microsomal (1,9 mg (A) e 4,53mg (B) de proteína) foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p), em tampão imidazol 20 mmol L^{-1}, pH 6,8. Após centrifugação a 180000g durante 3 horas, a 4°C, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação a atividade ATPase total (□); atividade (Na^+, K^+)-ATPase (▲); atividade insensível a ouabaína (Δ); concentração de proteína (●) e concentração de sacarose (○). A atividade da cada alíquota foi medida continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,14 mmol L^{-1}, FEP 2 mmol L^{-1}, PQ 20U e LDH 78U, em um 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. Animais adultos (A) e juvenis (B).

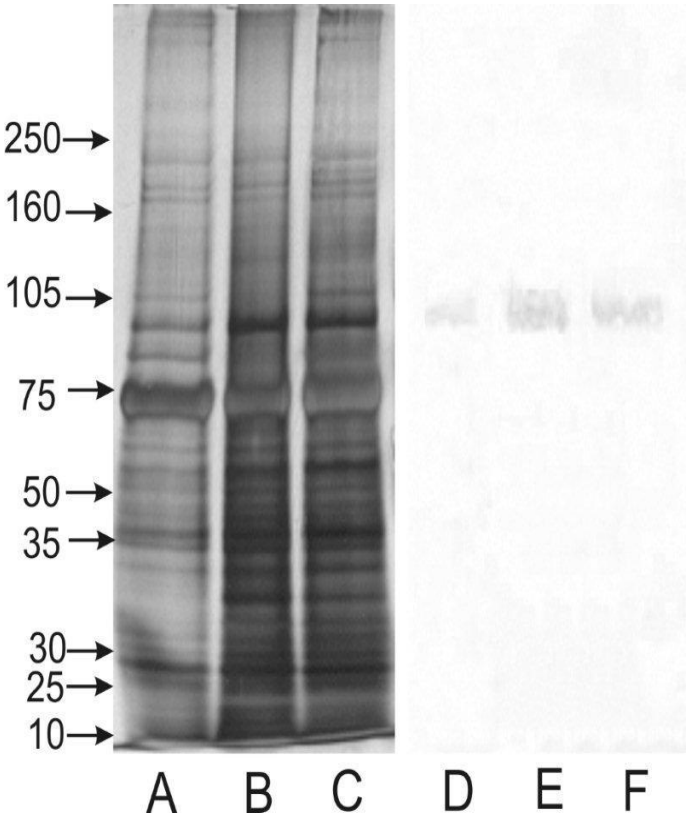


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western Blotting da fração microsomal de tecido branquial de M. amazonicum.

A eletroforese foi realizada em um gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20%, usando 4 µg de proteína para a revelação com prata e 160 µg para a análise por Western blotting. Após a corrida, uma das metades do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. Coloração com nitrato de prata de *M. amazonicum* em estágio juvenil I (A), juvenil II (B) e adulto (C) de desenvolvimento; Western blotting de *M. amazonicum* em estágio juvenil I (D), juvenil II (E) e adulto (F) de desenvolvimento.

condições saturantes de íons potássio e magnésio, o aumento da concentração de PNFF resultou numa única curva de saturação que apresentou interações sítio-sítio (n_H=1,5).

A atividade específica máxima foi de V=82,69±2,34 U mg^{-1} apresentando um valor de $K_{0,5}$ igual a 1,52±0,44 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína, nessas condições, foi estimulada por PNFF até valores de 33,69 U mg^{-1}, sugerindo a presença de outras fosfatases na fração microsomal.

Utilizando a fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I obteve-se o perfil mostrado na Figura 11.C. Em condições saturantes de íons potássio e magnésio, o aumento da concentração de PNFF resultou em uma única curva de saturação que apresentou interações sítio-sítio (n_H=1,2). A atividade específica máxima de V=71,3±1,15 U mg^{-1} apresentando um valor de $K_{0,5}$ igual a 1,45±0,28 mmol L^{-1}. Na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} observou-se estimulação pelo PNFF (15,14 U mg^{-1}), sugerindo a presença de outras fosfatases na fração microsomal.

A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento por íons magnésio está representada da Figura 12.A. A atividade da enzima foi estimulada por íons Mg^{2+} em concentrações que variam entre 10^{-5} a 10^{-2} M, em concentrações saturantes de íons potássio e PNFF.

A estimulação máxima da enzima pelos íons magnésio ocorreu através de uma curva de saturação simples que apresentou interações cooperativas (n_H= 2,0). A atividade máxima calculada nessas condições foi de V=84,5±3,1 U mg^{-1}.

O valor de $K_{0,5}$ calculado para estimulação da atividade K^+-fosfatase pelos íons Mg^{2+} foi de 1,0±0,16 mmol L^{-1}. Concentrações acima de 10 mmol L^{-1} de íons magnésio provocaram inibição da atividade K^+-fosfatase. A atividade insensível a ouabaína também foi estimulada por íons magnésio, até valores de 30 U mg^{-1}. A inibição parcial da ativiade PNFFase sugere a presença de outras fosfatases na fração microsomal sensíveis ao magnésio.

A modulação por íons magnésio da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I de desenvolvimento está representada da Figura 12.C. A estimulação máxima da atividade pelos íons magnésio ocorreu através de uma curva simples de saturação que apresentou interações cooperativas (n_H= 1,4). A atividade máxima calculada nessas condições foi de V=73,04±0,18 U mg^{-1}. O valor de $K_{0,5}$ calculado para estimulação da atividade

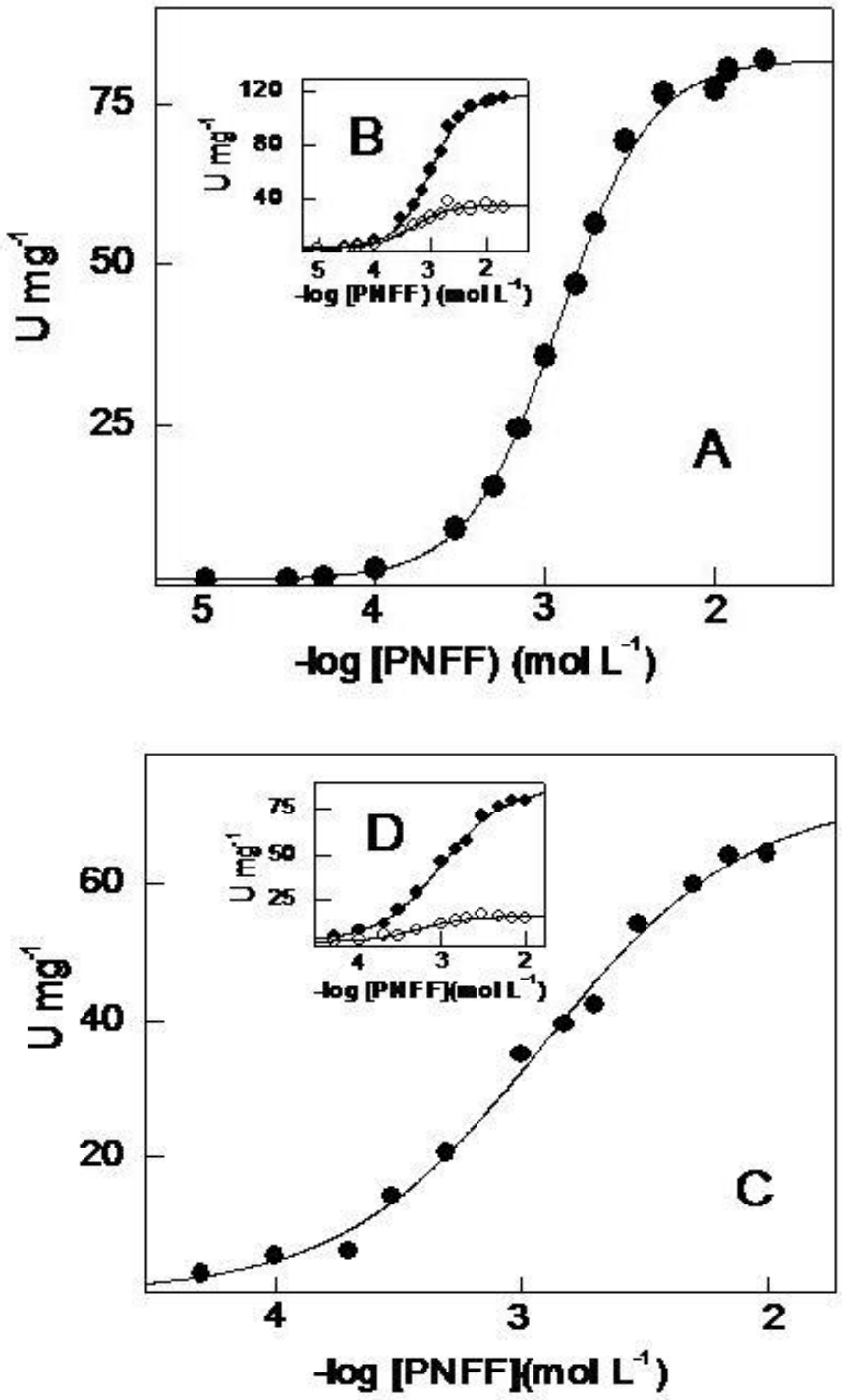


Figura 11. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo PNFF.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 µg (A) e 9,44 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração do PNFF sobre a atividade PNFFase total (●) e atividade PNFFase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

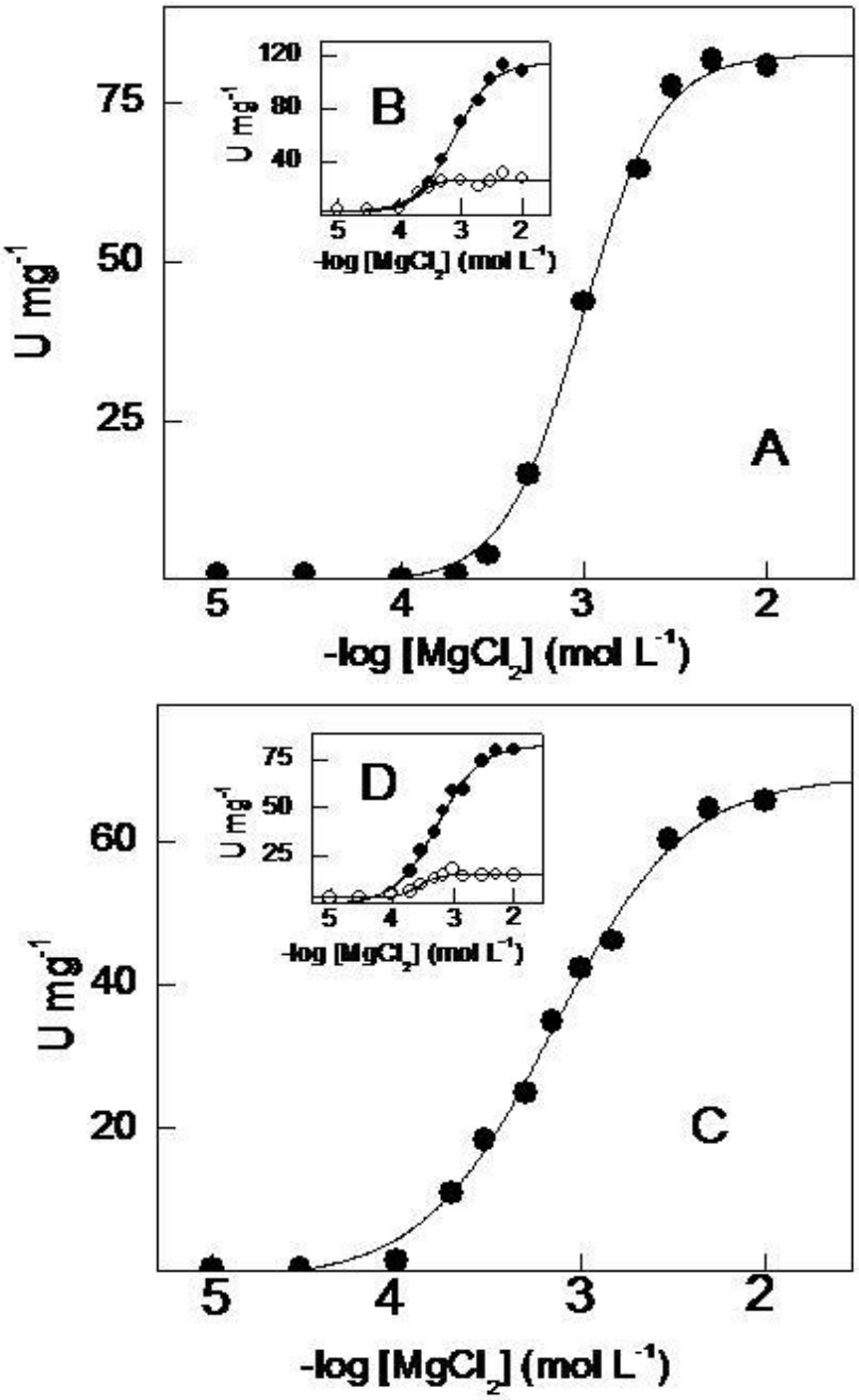


Figura 12. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons magnésio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 μg (A) e 9,44 μg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração do $MgCl_2$ sobre a atividade PNFFase total (●) e atividade PNFFase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

K^+-fosfatase pelos íons Mg^{2+} foi da ordem de 1,0±0,48 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína também foi estimulada por íons magnésio apresentando valores de 14,26 U mg^{-1}, sugerindo que outras fosfatases presentes na fração microsomal são sensíveis aos íons magnésio.

A figura 13.A representa a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento pelos íons potássio. O aumento da concentração de K^+ entre 10^{-5} até 10^{-2} mol L^{-1} provocou uma estimulação da atividade da enzima, através de uma curva de saturação monofásica que apresentou interações sítio-sítio (n_H= 1,9). Sob condições saturantes de PNFF e íons magnésio, a atividade específica máxima determinada foi da ordem de V=85,8±1,27 U mg^{-1}, apresentando um valor $K_{0,5}$=1,91±0,81 mmol L^{-1}. Os íons potássio estimularam a atividade insensível a ouabaína até valores de 27,83 U mg^{-1} nesta mesma faixa de concentração, sugerindo a presença de uma atividade fosfatase sensível a íons potássio, diferente da atividade K^+-fosfatase.

A Figura 13.C mostra a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio na fase de desenvolvimento juvenil I. O aumento da concentração dos íons potássio entre valores compreendidos entre 10^{-5} até 10^{-2} mol L^{-1} provocou uma estimulação da atividade da enzima, segundo uma curva de saturação monofásica que apresentou interações sítio-sítio (n_H=2,0). Sob condições saturantes de PNFF e íons magnésio, a atividade específica máxima determinada foi de V= 65,7±7,2 U mg^{-1}, com $K_{0,5}$= 1,77±0,21 mmol L^{-1}. Os íons potássio estimularam a atividade insensível a ouabaína, até valores da ordem de 15,12 U mg^{-1} sugerindo a presença de uma atividade fosfatase sensível a íons potássio, diferente da atividade K^+-fosfatase.

A Figura 14.A mostra a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento pelo íon amônio. A estimulação da atividade enzima, em condições saturantes de PNFF e íons magnésio, ocorreu através de uma curva de saturação simples, que apresentou interações sítio-sítio (n_H= 1,7). A atividade específica máxima observada nessas condições foi da ordem de V= 100 U mg^{-1}, apresentando $K_{0,5}$=9,0±1,76 mmol L^{-1}. A atividade PNFFase insensível a ouabaína foi estimulada até valores máximos de 21,49 U mg^{-1} nessa mesma faixa de concentração.

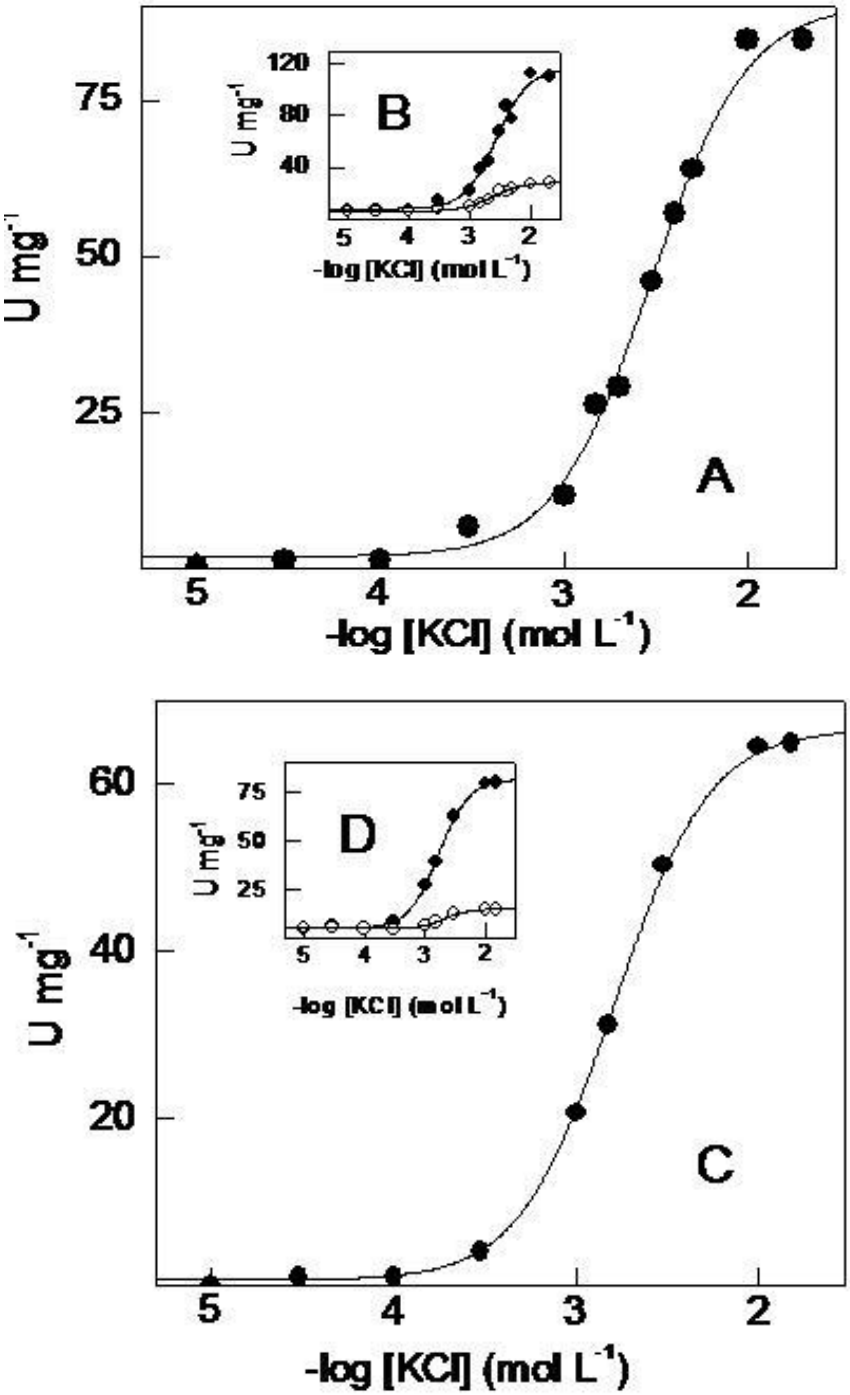


Figura 13. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 μg (A) e 9,44 μg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração do KCl sobre a atividade PNFFase total na ausência (●)e atividade PNFFase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase juvenil I de desenvolvimento pelo íon amônio esta representada na Figura 14.C. A estimulação da atividade enzima em condições saturantes de PNFF e íons magnésio, ocorreu através de uma simples curva de saturação, que apresentou interações sítio-sítio (n_H=2,0). A atividade específica máxima observada nessas condições foi de V=65,7±0,01 U mg^{-1}, apresentando um $K_{0,5}$ de 9,0±3,25 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína foi estimulada essa mesma faixa de concentração de íons amônio até valores da ordem de 6,94 U mg^{-1}.

O efeito do Na^+ sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* está representado na Figura 15.A. A atividade fosfatase total foi totalmente inibida pelos íons sódio (5,43 U mg^{-1}) através de uma curva simples de inibição. O valor de K_I calculado foi de 9,82±2,70 mmol L^{-1}. Para os animais em estágio de desenvolvimento juvenil I (Figura 15. C) a atividade fosfatase total (V=64,47 U mg^{-1}) foi inibida pelos íons sódio até valores de V=7,00 U mg^{-1}. O valor de K_I calculado para inibição da atividade pelo íons sódio foi de 6,67±0,134 mmol L^{-1} (Figura 15.D).

A Figura 16. A mostra o efeito de concentrações crescentes de ouabaína na atividade fosfatase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento. Em concentrações saturantes de PNFF, íons magnésio e potássio, inibição da atividade fosfatase ocorreu através de uma curva monofásica de inibição pela ouabaína. A atividade PNFFase total foi inibida parcialmente (aproximadamente 70%) com o aumento da concentração de ouabaína 10^{-5} a 10^{-2} mol L^{-1}. O valor da constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína (K_I) calculado para a inibição da atividade PNFFase pela ouabaína é 156,0±16,26 µmol L^{-1}.

A Figura 16.C mostra o efeito de concentrações crescentes de ouabaína na atividade PNFFase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase de desenvolvimento juvenil I. Em concentrações saturantes de PNFF, íons magnésio e potássio, inibição da atividade fosfatase foi inibida parcialmente (aproximadamente 80%) para concentrações de ouabaína da ordem de 3mmol L^{-1}. A constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína (K_I) calculada nessas condições foi da ordem de 142,05±57,13 µmol L^{-1} (Figura 16.D).

O efeito da ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase adulta na presença de amônio está representado na Figura 17.A. Da mesma forma ao observado na ausência de amônio, a

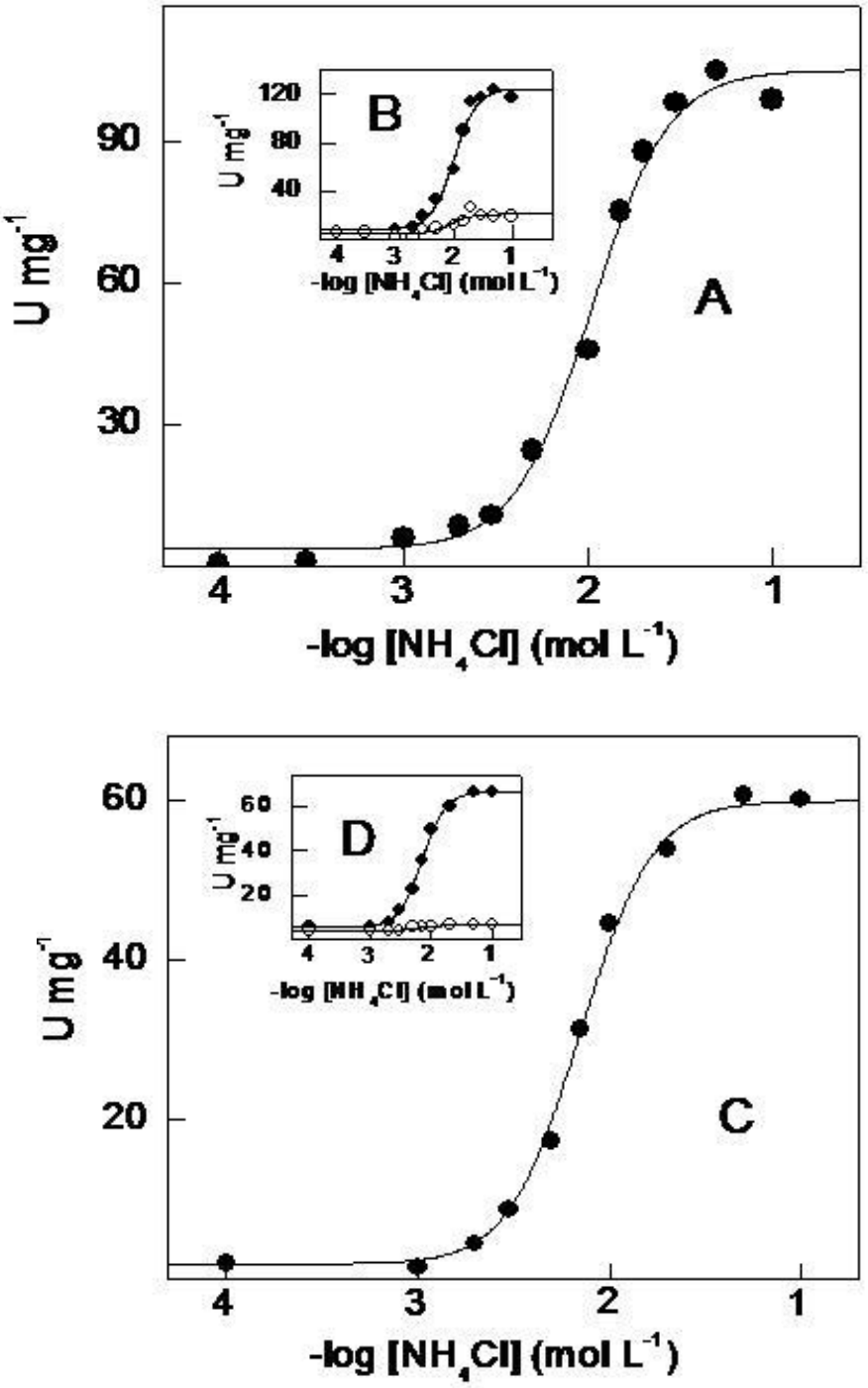


Figura 14. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 µg (A) e 9,44 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração do NH_4Cl sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e atividade PNFFase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

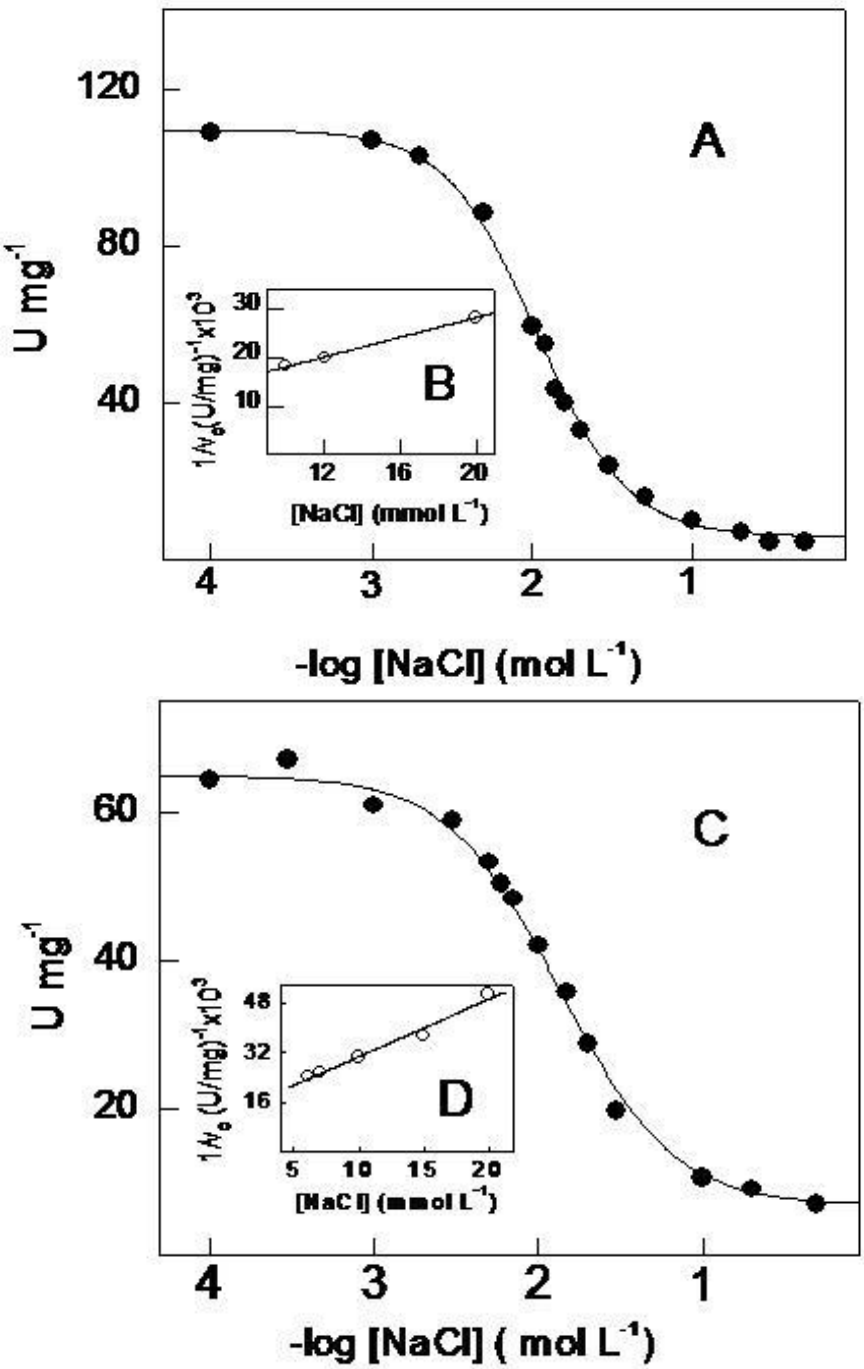
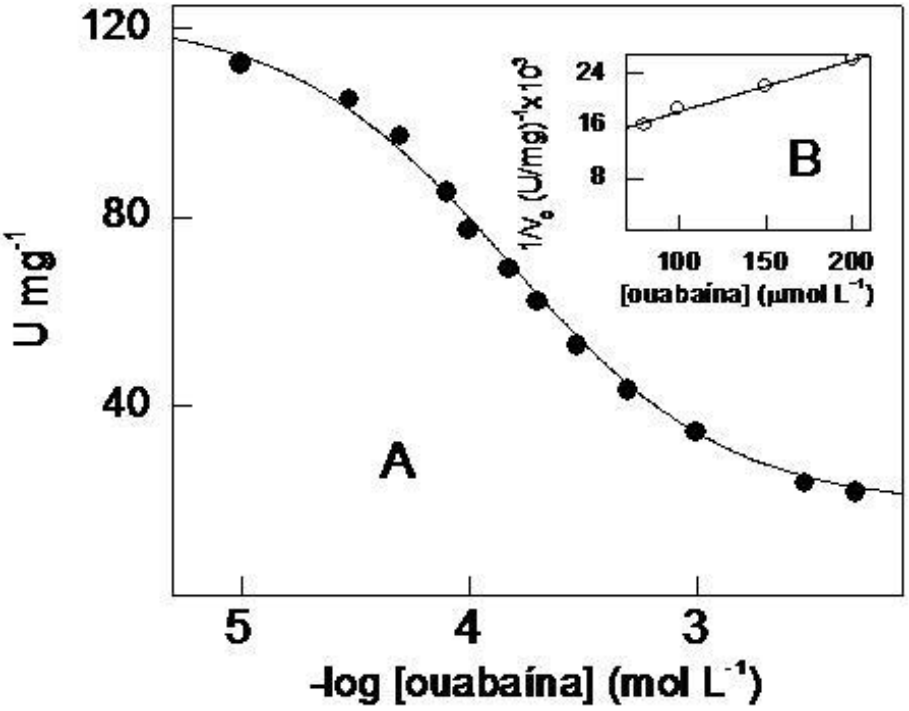


Figura 15. Efeito da concentração de sódio sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* .

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 μg (A) e 9,44 μg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade K^+-fosfatase. Animais adultos (A) e juvenis (C).



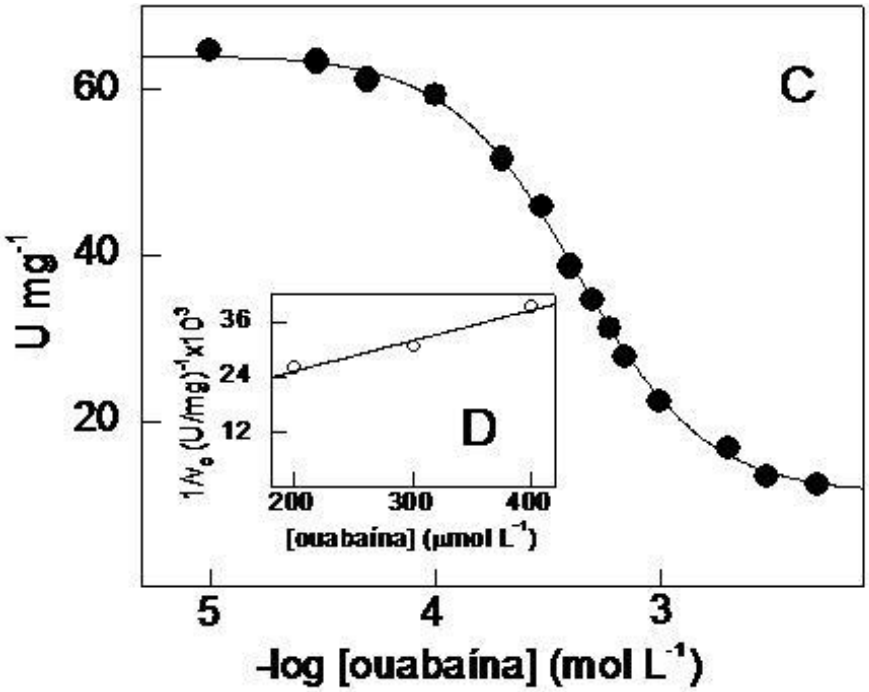


Figura 16. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum*.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 µg (A) e 9,44 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade K^+-fosfatase. Animais adultos (A) e juvenis (C).

atividade PNFFase total foi inibida por ouabaína através de uma curva simples de inibição. O aumento da concentração de ouabaína entre 10^{-5} e 10^{-2} mol L^{-1} provocou uma inibição parcial da atividade fosfatase total (80%), e o valor calculado para K_I foi de 47,25±12,99 µmol L^{-1}.

O efeito da ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase juvenil I na presença de amônio está representado na Figura 17.C. O aumento da concentração de ouabaína entre 10^{-6} e 10^{-3} mol L^{-1} provocou inibição parcial da atividade fosfatase total, e o valor de K_I calculado foi de 117,1±82,7µmol L^{-1} (Figura 17.D).

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+-Fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em relação aos efetores PNFF, Mg^{2+}, K^+, NH_4^+ e os valores de K_i para o Na^+ e a ouabaína.

A Figura 18.A mostra o efeito dos íons potássio na presença de diferentes concentrações de NH_4^+ sobre a atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento. Observa-se que a V não é alterada mesmo na presença de NH_4^+ 50 mmol L^{-1}. Entretanto, na presença de NH_4^+ o $K_{0,5}$ para a estimulação pelo K^+ aumenta cerca de duas vezes (para NH_4^+ 50 mmol L^{-1}) sugerindo uma diminuição da especificidade da enzima pelo potássio na precença de NH_4^+.

O efeito dos íons potássio sobre a atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil está mostrada na Figura 18.B. Observou-se que quando estimulada por íons potássio na presença de baixas concentrações de íons amônio ocorre uma aumento da afinidade da enzima pelos íons potássio, e quando o íon amônio está presente em concentrações saturantes (50 mmol L^{-1}) a atividade não é estimulada.

A variação dos diferentes parâmetros cinéticos dos animais adultos em função da concentração do K^+ para diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 19. A, B e C. Interessantemente pode-se observar que para concentrações de NH_4^+ da ordem de 50 mmol L^{-1}, a velocidade máxima observada coincide com aquela observada na ausência de NH_4^+.

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+-Fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I pelo íon potássio na presença de diferentes concentrações de íons amônio está mostrada na Figura 19.D, E e F. Na presença de concentrações entre 1 e 50 mmol L^{-1}

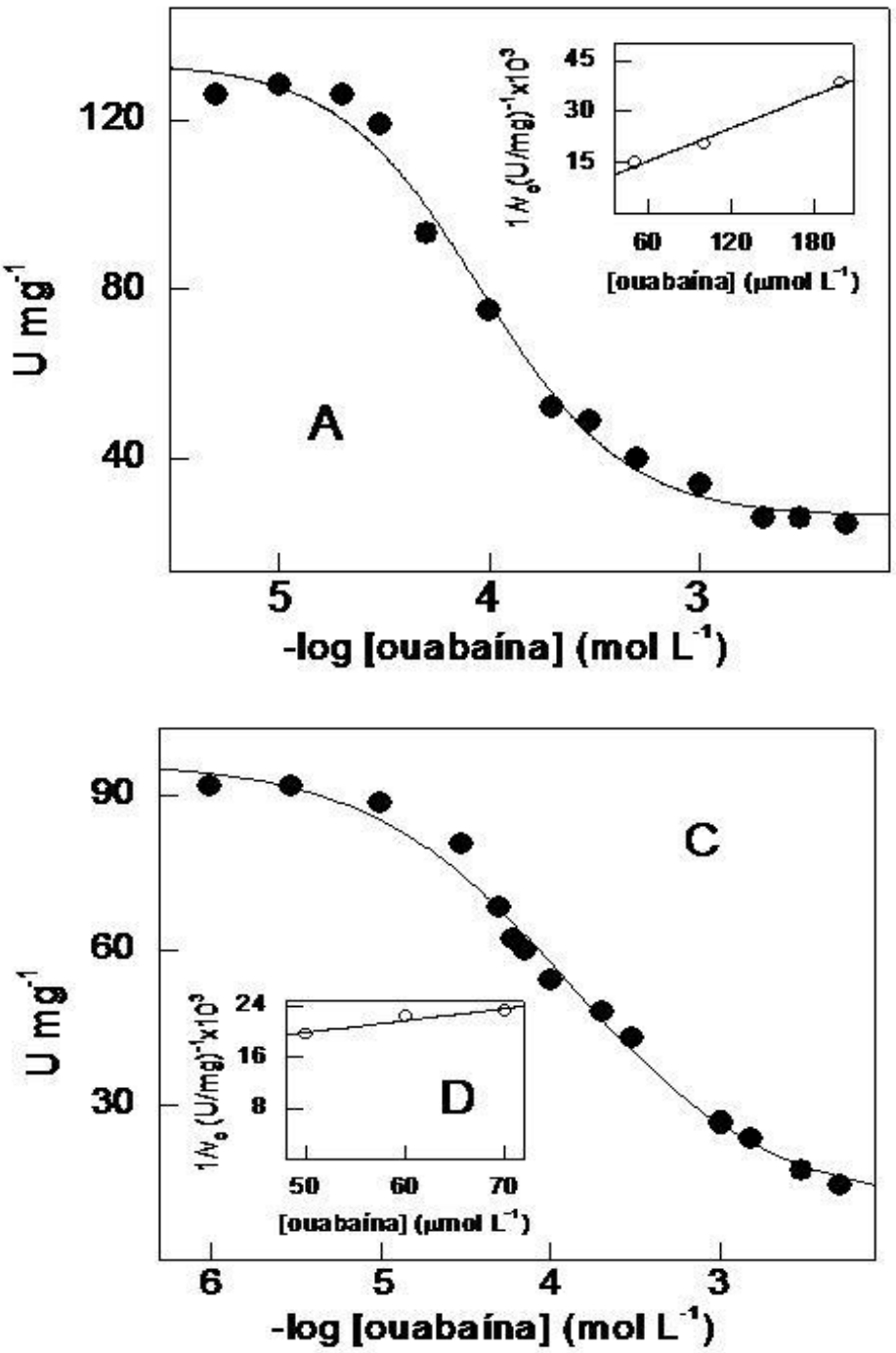


Figura 17. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1} e NH_4Cl 50 mmol L^{-1} em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 20,2 µg (A) e 9,44 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) homogeneizados de brânquias diferentes. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade K^+-fosfatase. Animais adultos (A) e juvenis (C).

TABELA 2. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons magnésio, potássio e amônio e as constantes de inibição para o sódio e ouabaína.

Efetor	**V(U mg^{-1})**		**$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})**		**n_H**	
	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil
PNFF	82,7±2,3	71,3±1,15	1,52±0,40	1,45±0,276	1,5	1,2
Mg^{2+}	84,5±3,1	73,0±0,18	1,09±0,16	1,07±0,481	2,0	1,4
K^+	85,8±1,3	65,7±7,2	1,91±0,81	1,77±0,212	1,9	2,0
NH_4^+	99,4±14,0	65,7±0,01	9,16±1,76	9,40±3,25	1,8	2,0

	K_i (mmol L^{-1})	
Inibidor	Adulto	Juvenil
Na^+	9,82±2,70	6,67±0,134
Ouabaína (K^+)	0,156±16,26	0,142±0,571
Ouabaína (NH_4^+)	0,047±13,0	0,117±0,827

de NH_4^+ atividade foi estimulada até valores 25,6% maiores do que foi estimado na ausência de amônio (FIGURA 19.F). Os valores de n_H obtidos indicam comportamento cooperativo (FIGURA 19.D). Os valores de $K_{0,5}$ para os íons potássio diminuíram em função do aumento da concentração de NH_4^+ até valores 3,5 vezes menores em relação ao $K_{0,5}$ para íons potássio na ausência de íons amônio (FIGURA 19.E).

A atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto foi estimulada pelos íons amônio na presença de íons potássio como representado na Figura 20.A. Afinidade da enzima pelos íons amônio aumentou em concentrações crescentes de íons potássio, sendo que em concentrações saturantes de NH_4^+ não ocorreu estimulação da atividade.

A estimulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* no estágio juvenil I pelos íons amônio na presença de íons potássio está representada na Figura 20.B. Na presença de concentrações crescentes de potássio (entre 1 e 10 mmol L^{-1}), a afinidade da enzim pelo amônio aumentou em até

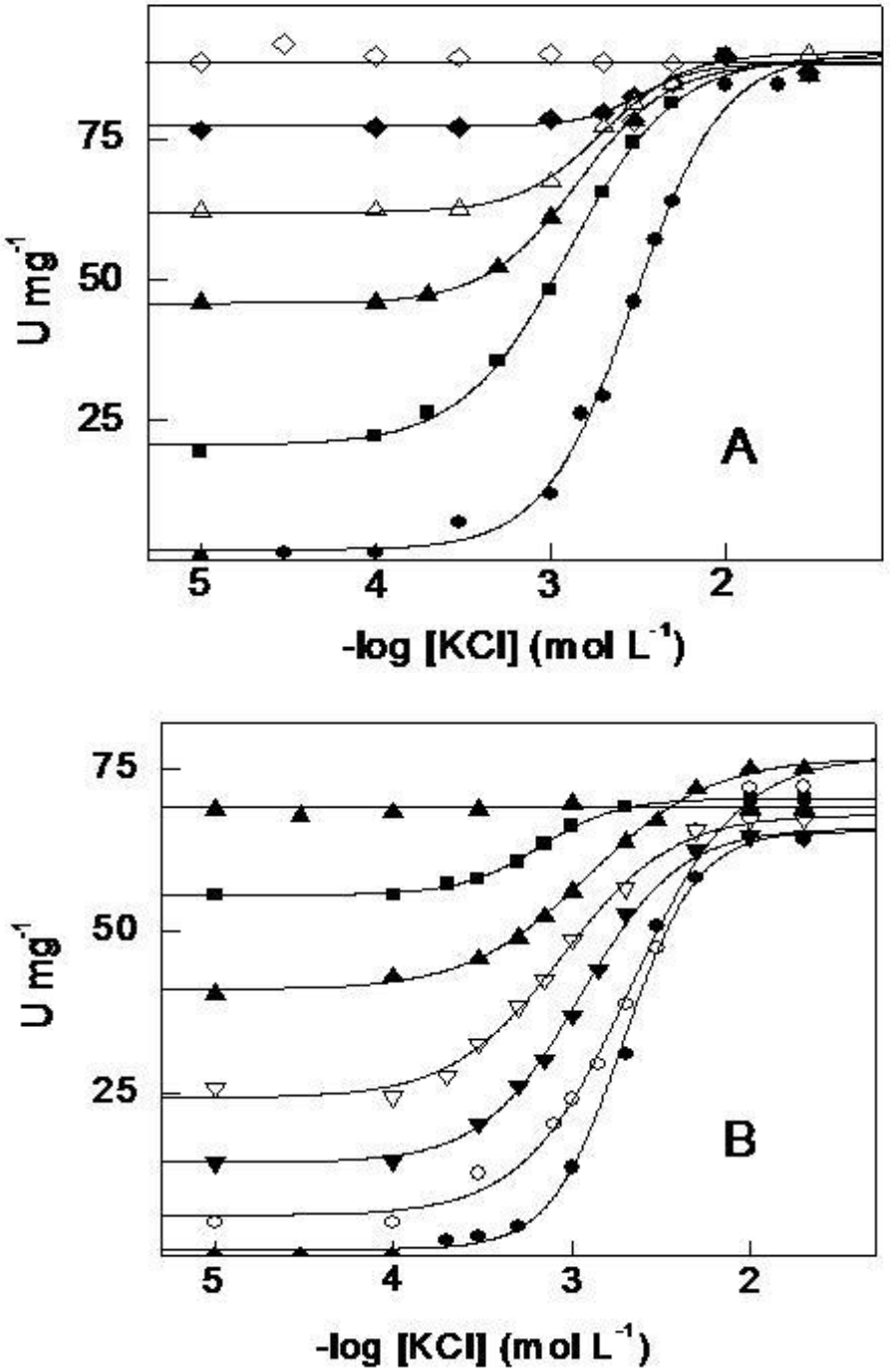


Figura 18. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína (A e B). Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Atividade K^+-Fosfatase na presença de (○) 1 mmol L^{-1} NH_4Cl, (▼) 1,5 mmol L^{-1} NH_4Cl, (▽) 2 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◄) 3 mmol L^{-1} NH_4Cl, (■)5 mmol L^{-1} NH_4Cl, (□) 7 mmol L^{-1} NH_4Cl (▲)10 mmol L^{-1} NH_4Cl, (Δ) 14 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◆) 20 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◇) 50 mmol L^{-1} NH_4Cl, e (●) na ausência se NH_4Cl. Animais adultos (A) e juvenis (B).

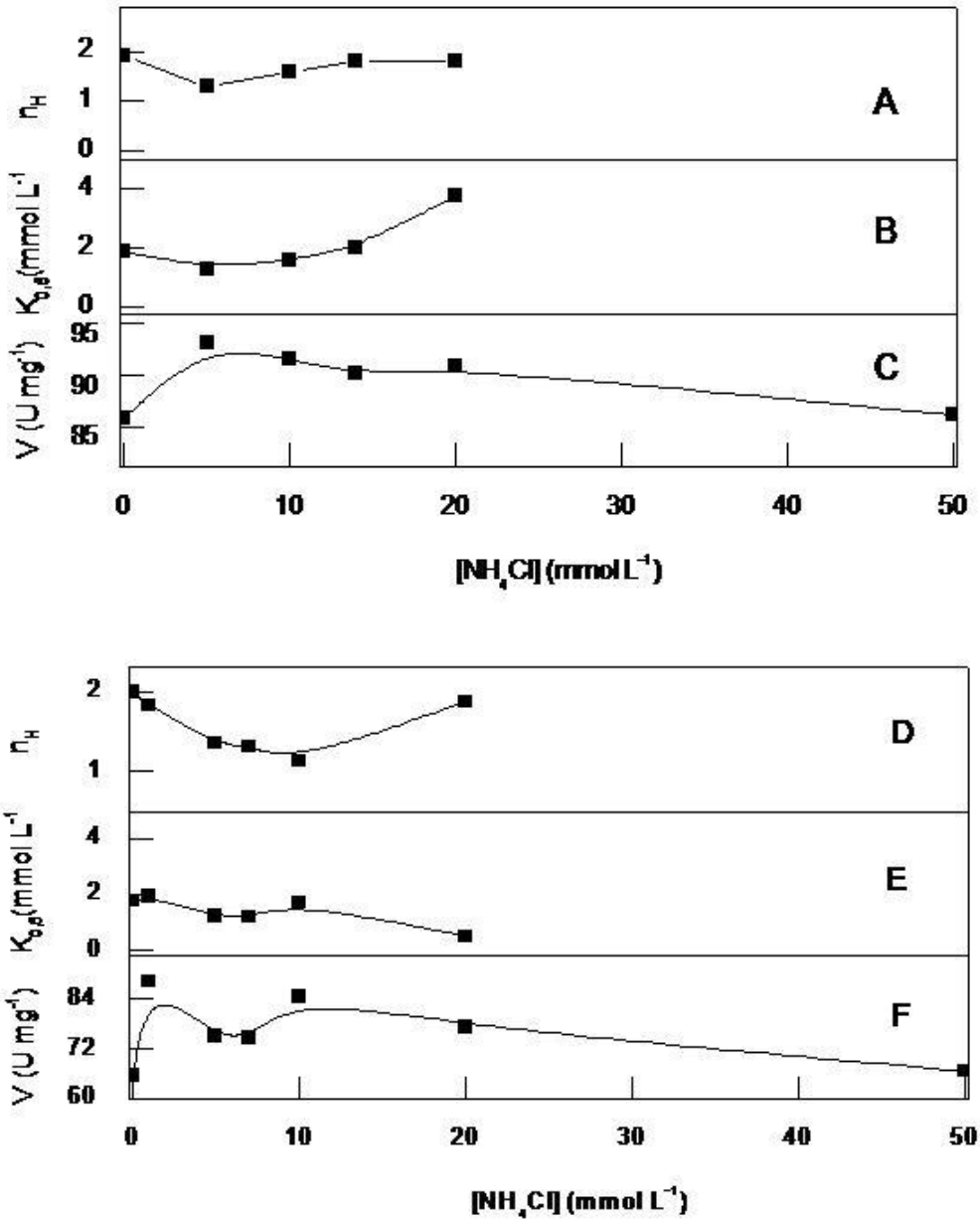


Figura 19. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade da K^+-Fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo potássio na presença de diferentes concentrações do íon amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína. Todos os parâmetros obtidos foram de experimentos realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Animais adultos (A, B, C) e juvenis (D, E, F).

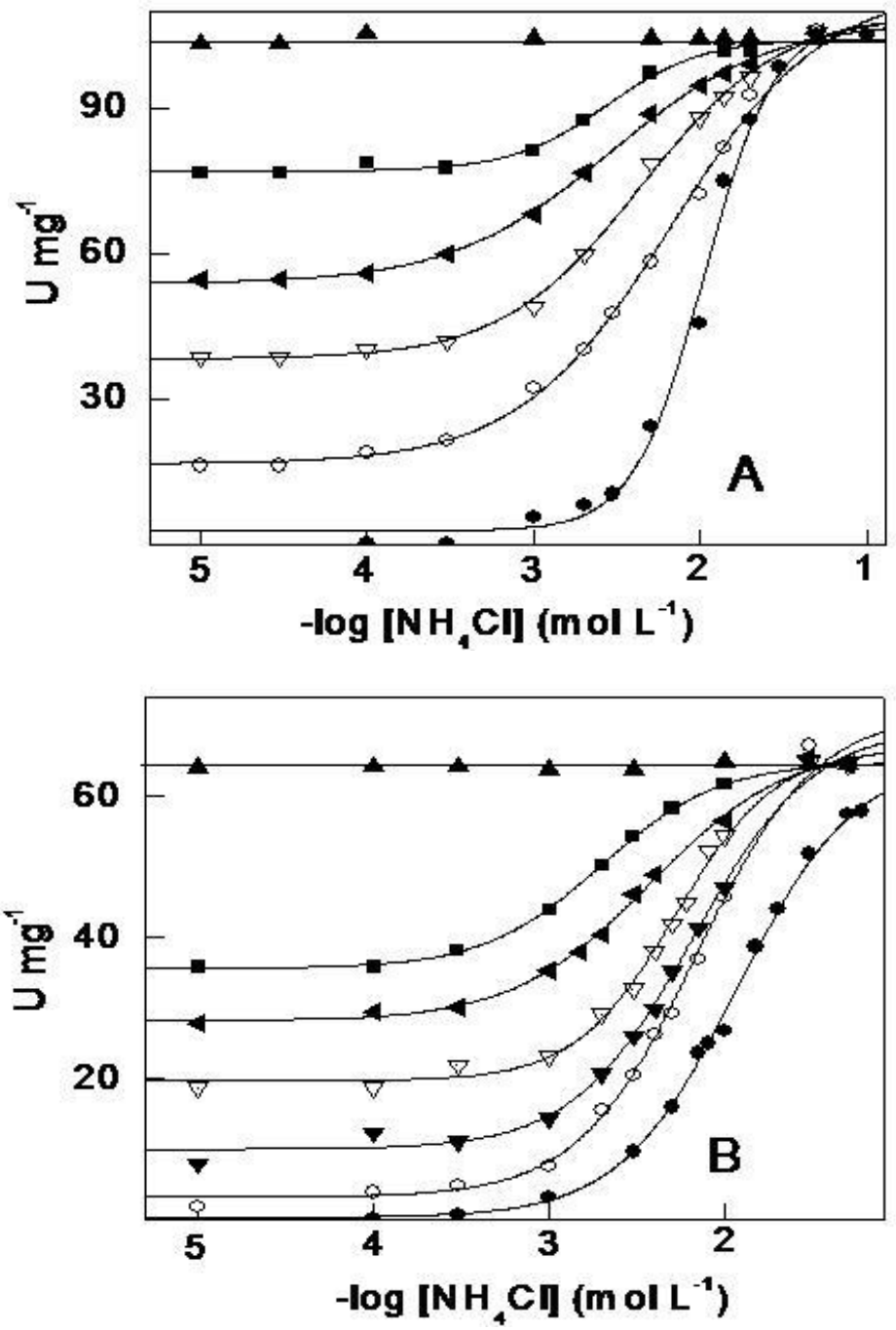


Figura 20. A modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons amônio na presença de íons potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína (A e B). Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) homogeneizados de brânquias diferentes. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Atividade K^+-Fosfatase na presença de (○) 1 mmol L^{-1} KCl, (▼) 1,5 mmol L^{-1} KCl, (▽) 2 mmol L^{-1} KCl, (◀) 3 mmol L^{-1} KCl, (■)5 mmol L^{-1} KCl, (▲)10 mmol L^{-1} KCl e (●) na ausência se KCl. Animais adultos (A) e juvenis (B).

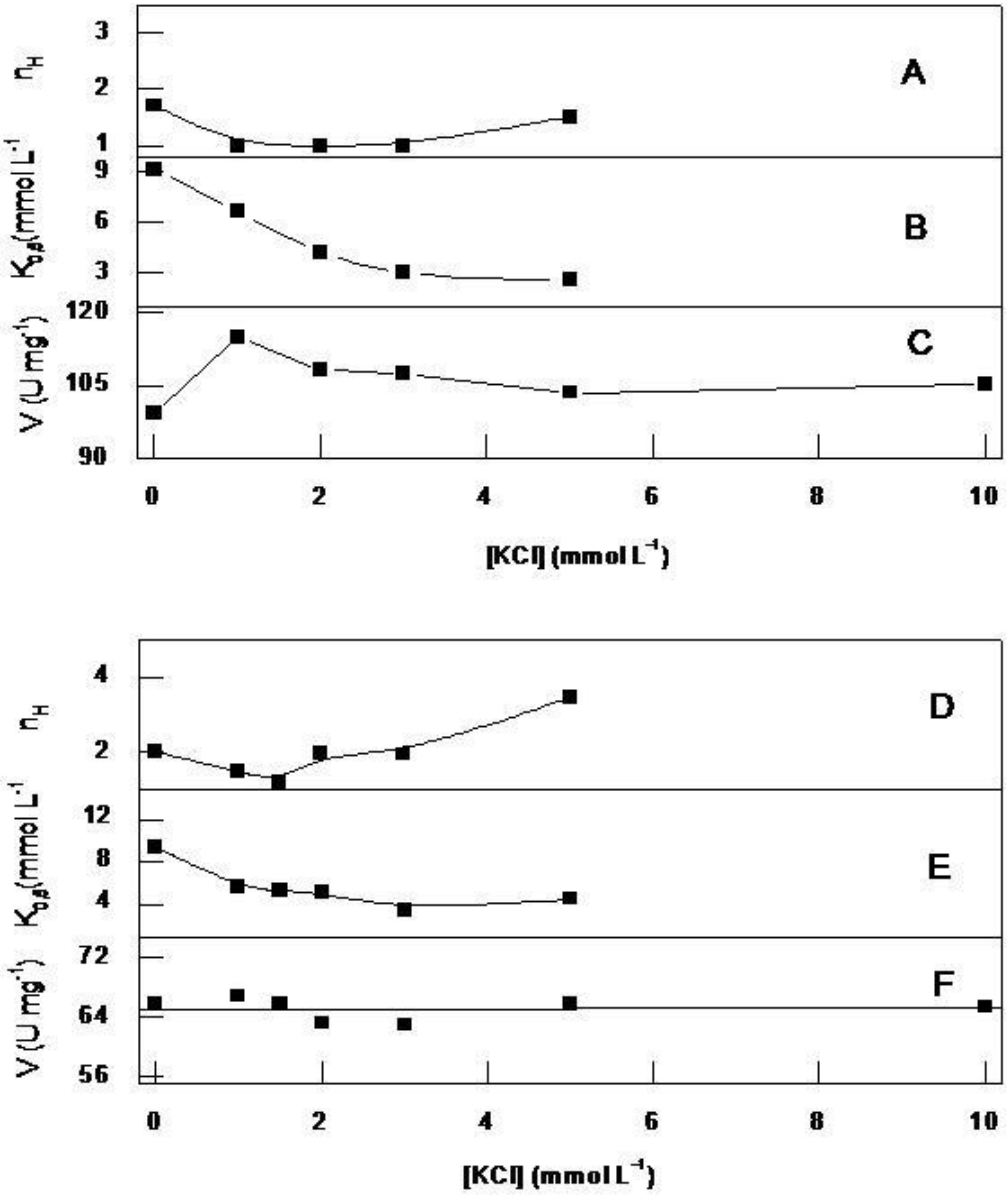


Figura 21. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade da K^+-Fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento pelo amônio na presença de diferentes concentrações do íon potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína. Todos os parâmetros obtidos foram de experimentos realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias.

TABELA 3. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio e amônio.

$[K^+]$ (mmol L^{-1})	$[NH_4^+]$ (mmol L^{-1})	V (U mg^{-1})		$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})		n_H		V/K	
		Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil
Variável	0	85,8±1,3	65,68±7,12	1,91±0,81	1,77±0,21	1,9	2,0	-	258
Variável	1	-	88,33±15,53	-	1,92±0,27	-	1,8	-	274
Variável	5	95,6±3,5	75,13±13,24	1,37±0,05	1,22±0,17	1,3	1,4	756	379
Variável	7	-	74,71±9,55	-	1,20±0,46	-	1,3	-	354,5
Variável	10	94,0±3,4	84,62±10,86	1,64±0,06	1,70±0,65	1,6	1,2	384	210,5
Variável	14	92,5±3,4	-	2,06±0,08	-	1,9	-	193	-
Variável	20	93,2±3,4	77,34±9,88	3,88±0,14	0,50±0,20	1,8	1,9	52	176
Variável	50	86,1±3,1	66,69±2,52	-	-	-	-	-	-
0	Variável	99,4±14,0	65,72±0,01	9,16±1,76	9,4±3,25	1,7	2,0		48,5
1	Variável	111,6±4,6	66,86±8,65	6,47±0,26	5,66±1,68	1,7	1,5	191	81,0
1,5	Variável	-	65,90±8,52	-	5,30±1,83		1,2		66,5
2	Variável	105,1±4,3	63,24±5,79	4,13±0,17	5,12±0,01	1,0	2,0	211	63,5
3	Váriavel	104,4±4,3	62,96±2,62	2,97±0,12	3,50±2,13	1,0	2,0	224	79,5
5	Variável	100,7±4,1	65,70±2,73	2,50±0,10	4,57±1,15	1,5	3,5	138	59,0
10	Variável	105,4±4,3	62,54±2,49	-	-	-	-	-	-

2,7 vezes. Em concentrações saturantes de potássio a atividade K^+-fosfatase não apresentou estimulação.

A afinidade da enzima de animais adultos pelos íons amônio foi modulada na presença dos íons K^+ representado na Figura 21.B, apresentando comportamento cooperativo (FIGURA 21.A).

A variação dos parâmetros cinéticos calculados em animais juvenis para a estimulação da atividade K^+-Fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon amônio na presença de diferentes concentrações de íons potássio está mostrada na Figura 22.C, D e E. Em concentrações crescentes de íons potássio observou-se um aumento da afinidade da enzima pelos íons amônio (FIGURA 22. E), pela diminuição no valor do $K_{0,5}$ de 9,4±3,25 mmol L^{-1} na ausência de íons potássio para 4,57±1,15 mmol L^{-1} na presença de 5 mmol L^{-1} de K^+. A atividade K^+-fosfatase apresentou valores constantes em todas as concentrações de íons potássio empregadas, e os valores de n_H indicam comportamento cooperativo para todas as curvas obtidas.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade PNFFase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em relação aos íons potássio e amônio.

4.5 Caracterização da atividade ATPase da (Na^+, K^+)-ATPase.

A metodologia empregada na obtenção da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto revelou presença de atividade (Na^+, K^+)-ATPase total da ordem de 204,9 U mg^{-1}. A atividade fosfatase insensível a ouabaína foi de 172,86 U mg^{-1}, apresentando uma atividade (Na^+, K^+)-ATPase da ordem de 31,23 U mg^{-1}. Enquanto que, para animais em estágio juvenil a fração microsomal revelou presença de atividade (Na^+, K^+)-ATPase total da ordem de 221,63 U mg^{-1}. A atividade fosfatase insensível a ouabaína foi de 29,09 mg^{-1}, resultando em uma atividade (Na^+,K^+)-ATPase da ordem de 192,54 mg^{-1}.

Na Figura 22. A está mostrada a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo ATP em estágio adulto. Em condições saturantes de íons potássio, sódio e magnésio, o aumento da concentração de ATP resultou numa única curva de saturação apresentando características michaelianas (n_H=1,0). A atividade específica máxima foi da ordem de V=181,8±77,83 U mg^{-1} apresentando um valor de $K_{0,5}$=0,87±0,16 mmol L^{-1}. A atividade insensível a

ouabaína, nessas condições, foi estimulada por ATP (35,2 U mg^{-1}), sugerindo a presença de outras fosfatases na fração microsomal.

Na Figura 22.C está mostrada a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I pelo ATP. Em condições saturantes de íons potássio, sódio e magnésio, o aumento da concentração de ATP resultou em uma única curva de saturação que apresentou comportamento michaeliano. A atividade específica máxima foi V=189,52±32,45 U mg^{-1} e o um valor de $K_{0,5}$ foi 0,14±0,02 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína, nessas condições também foi estimulada por ATP, e apresentou um valor máximo V=29,09 U mg^{-1} sugerindo a presença de outras ATPases na fração microsomal.

A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* por íons magnésio em estágio adulto de desenvolvimento está representada da Figura 23.A. A atividade da enzima foi estimulada por Mg^{2+} (10^{-5} a 10^{-2} mol L^{-1}), em concentrações saturantes de ATP, K^+ e Na^+. A estimulação máxima da enzima pelo Mg^{2+} ocorreu através de uma curva simples de saturação que apresentou interações cooperativas (n_H=2,5). A atividade máxima calculada nessas condições foi de V=174,7±74,8 U mg^{-1} e o valor de $K_{0,5}$ calculado foi de 0,27±0,05 mmol L^{-1}. Concentrações acima de 10 mmol L^{-1} de íons magnésio provocaram inibição da atividade K^+-fosfatase. A atividade insensível a ouabaína também foi estimulada por íons magnésio até valores de 38,48 U mg^{-1}, sugerindo a presença de outras fosfatases na fração microsomal sensíveis a estes íons (Figura 23. B).

A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* por íons magnésio em estágio de desenvolvimento juvenil I está representada da Figura 23.C. A atividade da enzima foi estimulada por Mg^{2+} em concentrações que variam entre 10^{-6} a 10^{-2} mol L^{-1}, em concentrações saturantes de ATP, íons potássio e sódio. A estimulação máxima dos íons magnésio ocorreu através de uma curva simples de saturação que apresentou interações cooperativas (n_H= 3,5). A atividade máxima calculada nessas condições foi de V=168,35±28,9 U mg^{-1}. O valor de $K_{0,5}$ calculado para estimulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons Mg^{2+} foi de 0,51±0,09 mmol L^{-1}. Foi observada também a presença de outras ATPases sensíveis aos íons magnésio que foram estimulados até V=29,09 U mg^{-1} nessa mesma faixa de concentração de magnésio.

A Figura 24.A representa a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons sódio na fase adulta de

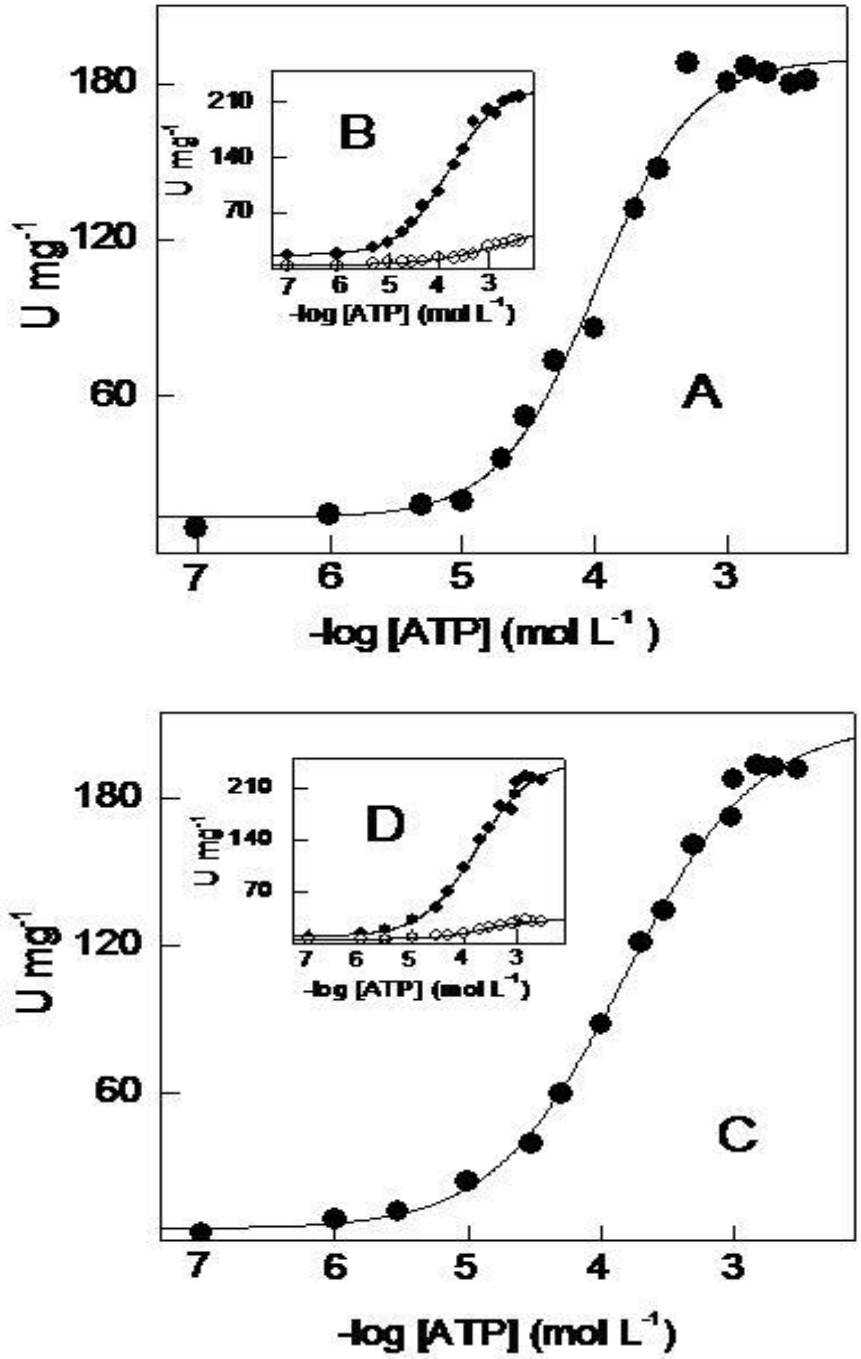


Figura 22. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo ATP.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NADH 0,2 mg/mL, FEP 1,15 mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração do ATP sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e atividade ATPase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

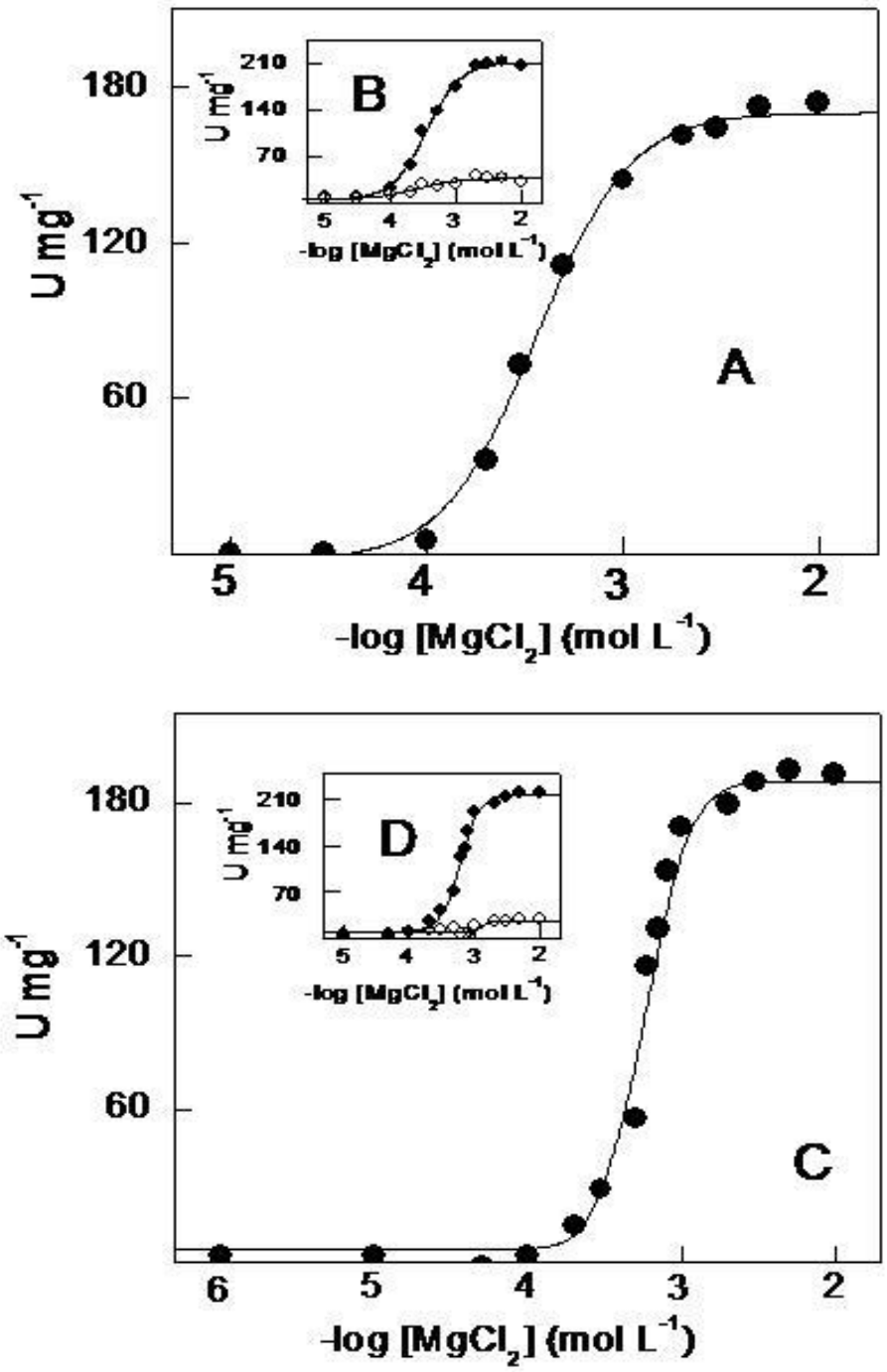


Figura 23. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon magnésio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NADH 0,2 mg/mL, FEP 1,15 mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração de íons magnésio sobre a atividade ATPase total na ausência (●)e atividade ATPase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

desenvolvimento. O aumento da concentração dos Na^+ entre 10^{-4} e 10^{-1} mol L^{-1} provocou uma estimulação da atividade da enzima, através interações sítio-sítio (n_H= 1,9). Sob condições saturantes de ATP, íons magnésio e potássio, a atividade específica máxima determinada foi da ordem de V= 175,5±75,1 U mg^{-1}, e o $K_{0,5}$ de 4,73±0,81 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína apresentou estimulação com valor de 31,23 U mg^{-1}, nessa mesma faixa de concentração de Mg^{2+}.

A Figura 24.C mostra a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons sódio na fase de desenvolvimento juvenil I. O aumento da concentração dos íons sódio entre valores compreendidos entre 10^{-5} até 10^{-1} mol L^{-1} provocou uma estimulação da atividade da enzima, com resultando em uma curva de saturação monofásica que apresentou interações sítio-sítio (n_H= 1,3). Em condições saturantes de ATP, íons magnésio e potássio, a atividade específica máxima determinada foi V=165,48±28,3 U mg^{-1}, apresentando $K_{0,5}$= 4,92±0,84 mmol L^{-1}. A atividade insensível a ouabaína também foi estimulada nessa mesma faixa de concentração até valores V=43,85 U mg^{-1} sugerindo a presença de outras ATPases estimuladas pelos íons sódio.

A figura 25. A representa a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio na fase adulta de desenvolvimento. O aumento da concentração dos íons potássio entre 10^{-5} e 10^{-2} mol L^{-1} provocou uma estimulação da atividade da enzima, através de uma curva de saturação monofásica que apresentou interações sítio-sítio (n_H= 1,2). Em condições saturantes de ATP, íons magnésio e sódio, a atividade específica máxima determinada foi da ordem de V=171,21±73,3 U mg^{-1}, e o $K_{0,5}$ foi de 1,0±0,17 mmol L^{-1}. Os íons potássio não estimularam a atividade insensível a ouabaína, nessa mesma maixa de concentração entretanto, observa-se que mesmo de presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} a preparação apresenta uma atividade basal da ordem de 33,69 U mg^{-1} (Figura 25.B).

A Figura 25.C mostra a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase juvenil I pelos íons potássio. O aumento da concentração dos íons potássio entre 10^{-5} até 10^{-2} mol L^{-1}, provocou uma estimulação da atividade da enzima, através de uma curva de saturação monofásica que apresentou comportamento michaeliano. Em condições saturantes de ATP, íons magnésio e sódio, a atividade específica máxima determinada foi de V=178,56±30,58 U mg^{-1}, com $K_{0,5}$ de 1,30±0,22 mmol L^{-1}. Na presença de 3 mmol L^{-1} a atividade da preparação foi 29,99 U mg^{-1}, não tendo sido observada nenhuma estimulação dessa

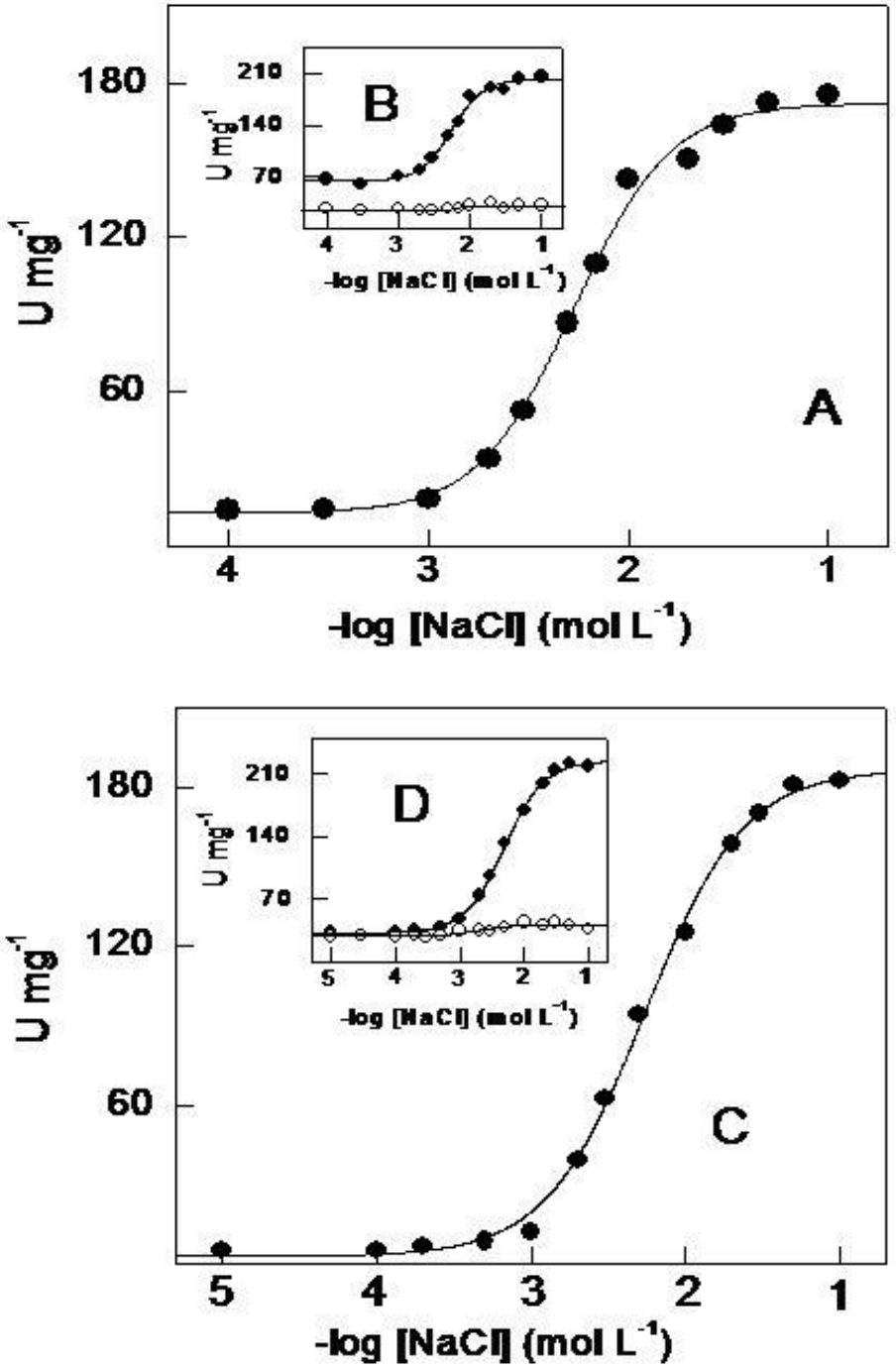


Figura 24. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon sódio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,2mg/mL, FEP 1,15mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) homogeneizados de brânquias diferentes. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração dos íons sódio sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e atividade ATPase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

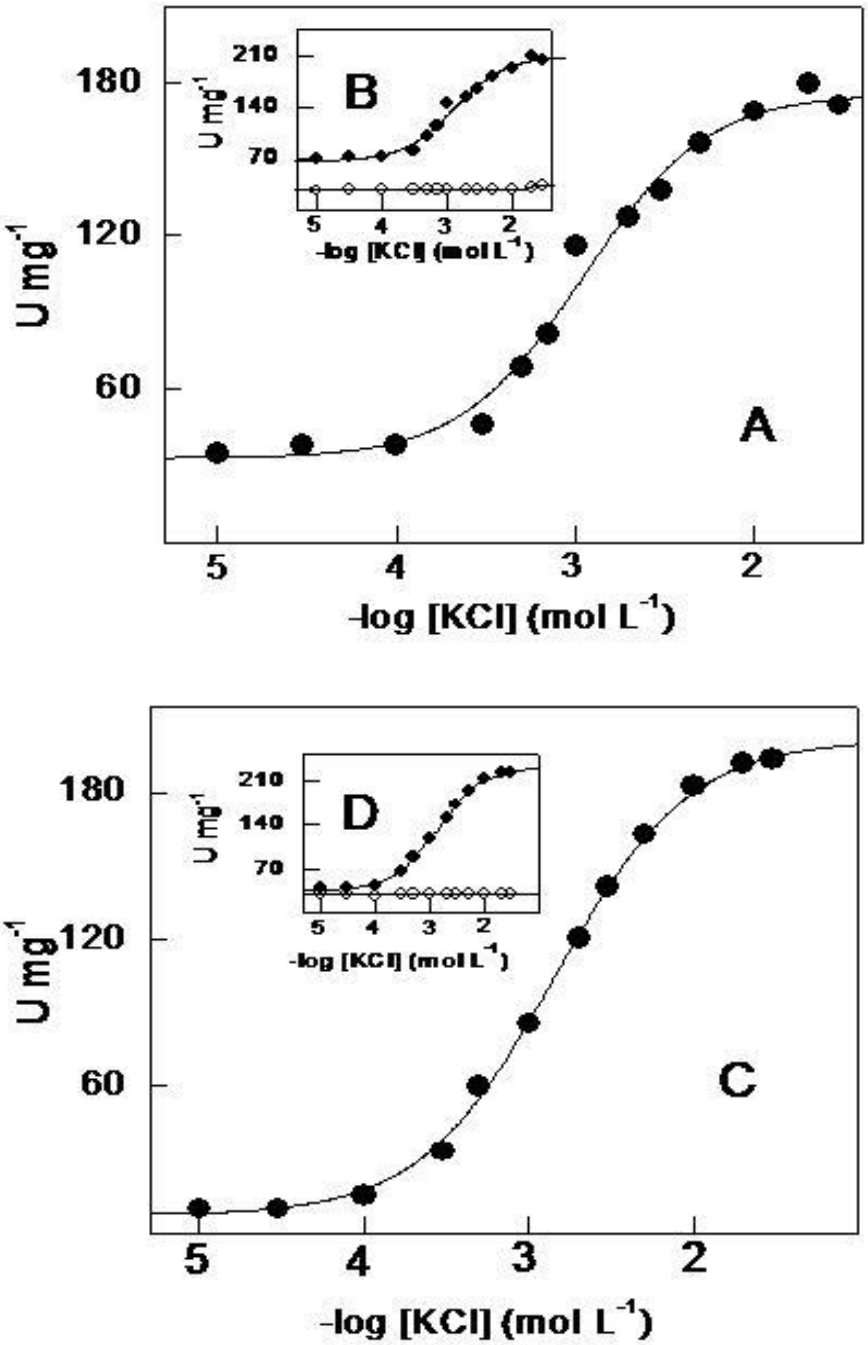


Figura 25. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B, D):** Efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e atividade ATPase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

atividade insensível a ouabaína nessa mesma faixa de concentração. Esses resultados sugerem que na preparação não estão presentes outras ATPases estimuladas por K^+.

A Figura 26.A mostra a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento pelo íon amônio. A estimulação da atividade enzima pelo íon amônio, em condições saturantes de ATP, íons magnésio e sódio, ocorreu através de uma simples curva de saturação, que apresentou interações sítio-sítio (n_H=1,9). A atividade específica máxima observada nessas condições foi da ordem de V= 194,18±63,3 U mg^{-1}, e um $K_{0,5}$ de 4,76±2,15 mmol L^{-1}. Diferentemente ao observado para a estimulação da atividade insensível a ouabaína por K^+, o aumento da concentração de íons amônio não resultou em uma estimulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase insensível a ouabaína. Nessas condições foi observada uma atividade basal, de aproximadamente 21,87 U mg^{-1}, independente da concentração de íons amônio (Figura 26.B).

A atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na fase de desenvolvimento juvenil I foi modulada pelo íon amônio como mostrado na Figura 26. C. A estimulação da atividade enzima pelo íon amônio, em condições saturantes de ATP, íons magnésio e sódio, ocorreu através de uma simples curva de saturação, que apresentou cinética michaeliana. A atividade específica máxima observada nessas condições foi de V=205,91±35,26 U mg^{-1}, com $K_{0,5}$=1,88±0,32 mmol L^{-1}. Na presença de 3 mmol L^{-1} a atividade da preparação foi 38,56 U mg^{-1}, não tendo sido observada nenhuma estimulação dessa atividade insensível a ouabaína nessa mesma faixa de concentração. Esses resultados sugerem que na preparação não estão presentes outras ATPases estimuladas por NH_4^+.

A Figura 27.A mostra o efeito de concentrações crescentes de ouabaína na atividade ATPase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento. Em concentrações saturantes de ATP, íons magnésio, potássio e sódio, a atividade ATPase total foi inibida parcialmente (aproximadamente 61,6%) através do aumento da concentração de ouabaína com valores compreendidos entre 10^{-7} a 10^{-3} mol L^{-1}. O valor da constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína (K_I) foi 114±2,41 µmol L^{-1} (Figura 27.B).

A Figura 27.C mostra o efeito de concentrações crescentes de ouabaína na atividade ATPase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase de desenvolvimento juvenil I. Em concentrações saturantes de ATP, íons magnésio, potássio e sódio, a inibição da atividade ATPase revelou a presença de uma única curva

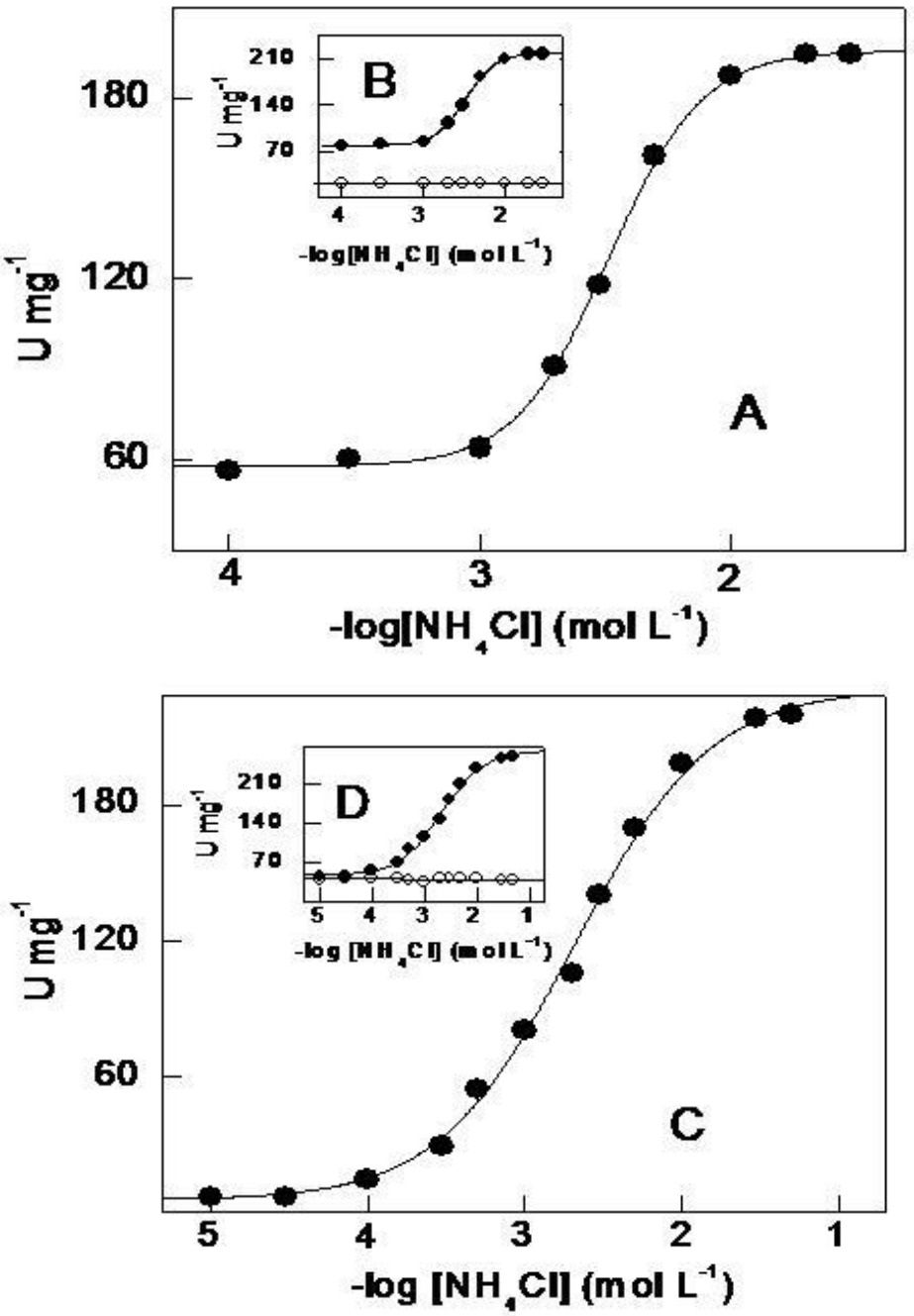


Figura 26. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** Efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e atividade ATPase insensível a ouabaína (○). Animais adultos (A) e juvenis (C).

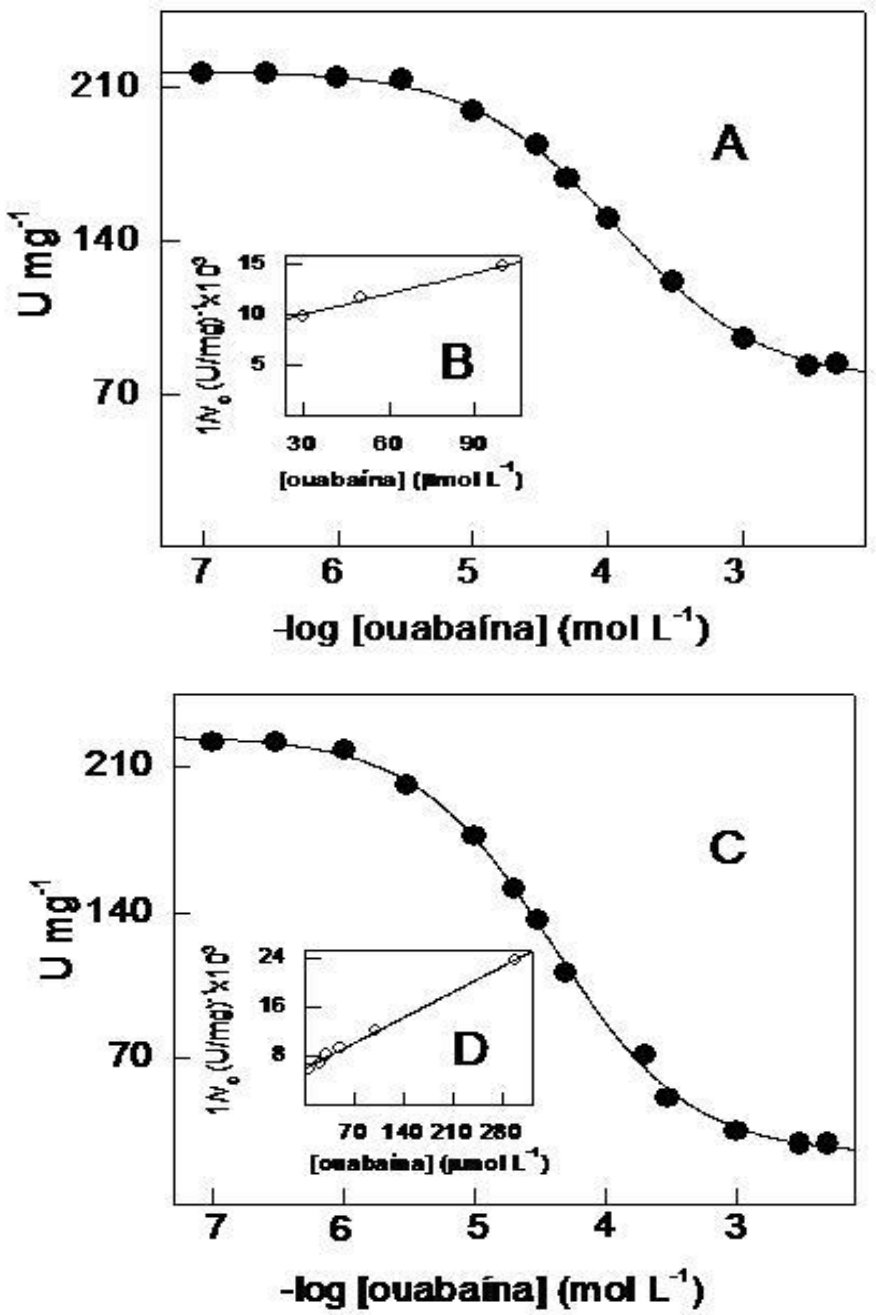


Figura 27. **Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na presença de íons potássio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,2 mg/mL, FEP 1,15 mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade (Na^+, K^+)-ATPase. Animais adultos (A) e juvenis (C).

de inibição pela ouabaína. A atividade ATPase total foi inibida cerca de 87% com o aumento da concentração de ouabaína entre 10^{-7} a 10^{-3} M. A constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína (K_I) calculado foi 91,22±15,62 µmol L^{-1}

Na presença de NH_4^+ o efeito de concentrações crescentes do inibidor ouabaína sobre a atividade ATPase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento foi muito similar ao obtido na ausência desse íons (Figura 28.A). Uma curva monofásica de inibição foi obtida em concentrações saturantes de ATP, íons magnésio, amônio e sódio. Entretanto, na presença de íons amônio a enzima apresentou maior afinidade pelo inibidor ouabaína com K_I=57,95±17,04 µmol L^{-1}. Nessas condições concentrações de ouabaína da ordem de 3 mmol L^{-1} inibiram aproximadamente 70% da atividade ATPase foi inibida restando uma atividade basal de 40,5 U mg^{-1}.

O efeito de concentrações crescentes de ouabaína na atividade ATPase total nos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase de desenvolvimento juvenil I na presença de amônio está representado na Figura 28.C. Em concentrações saturantes de ATP, íons magnésio, sódio e amônio, a inibição da atividade ATPase apenas uma única curva de inibição foi observada. A atividade ATPase total foi inibida cerca de 85% e o valor da constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína (K_I) calculado foi 53,98±9,24 µmol L^{-1}.

Concentrações crescentes de ortovanadato (10^{-9} a 10^{-4} mol L^{-1}) inibiram a atividade ATPase total dos microsomas de brânquias de *M. amazonicum* na fase adulta de desenvolvimento como mostrado na Figura 29. A. A constante de inibição calculada foi 0,145±0,01 µmol L^{-1}.

A inibição da atividade ATPase da fração microssomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio juvenil I de desenvolvimento pelo otovanadato ocorreu está mostrada na Figura 29.C. Em concentrações saturantes de ATP, íons magnésio, sódio e potássio, a atividade ATPase foi inibida 72% e a constante de dissociação enzima-inibidor calculada foi 0,21±0,04 µmol L^{-1}.

Na tabela 4 estão apresentados os parâmetros cinéticos para a modulação da atividade (Na^+,K^+)-ATPase pelos íons magnésio, sódio, potássio e amônio e pelo ATP, bem como os valores de K_i para o inibidor ouabaína na presença dos íons amônio e potássio também são mostrados.

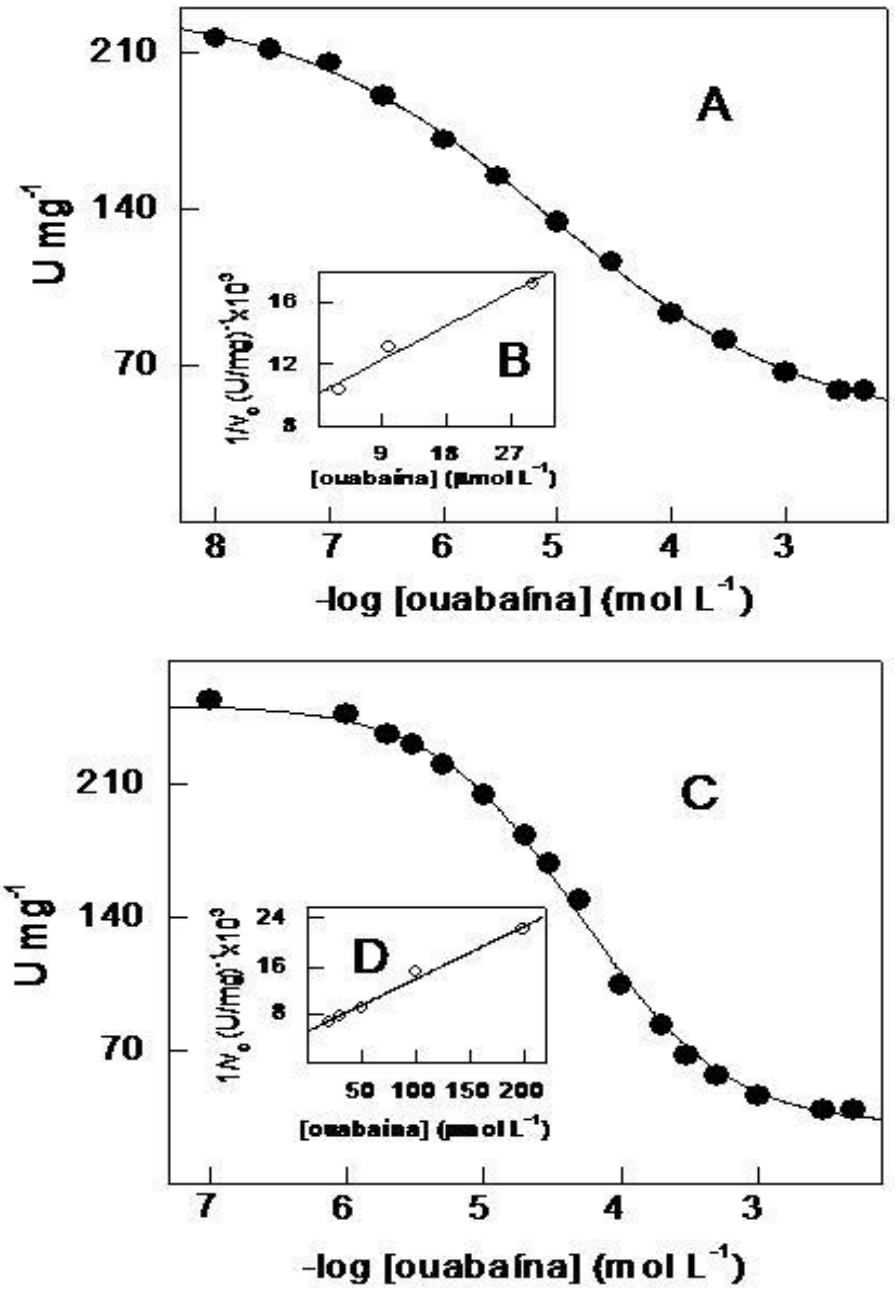


Figura 28. **Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* na presença de íons amônio.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NH_4Cl 50 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade (Na^+, K^+)-ATPase. Animais adultos (A) e juvenis (C).

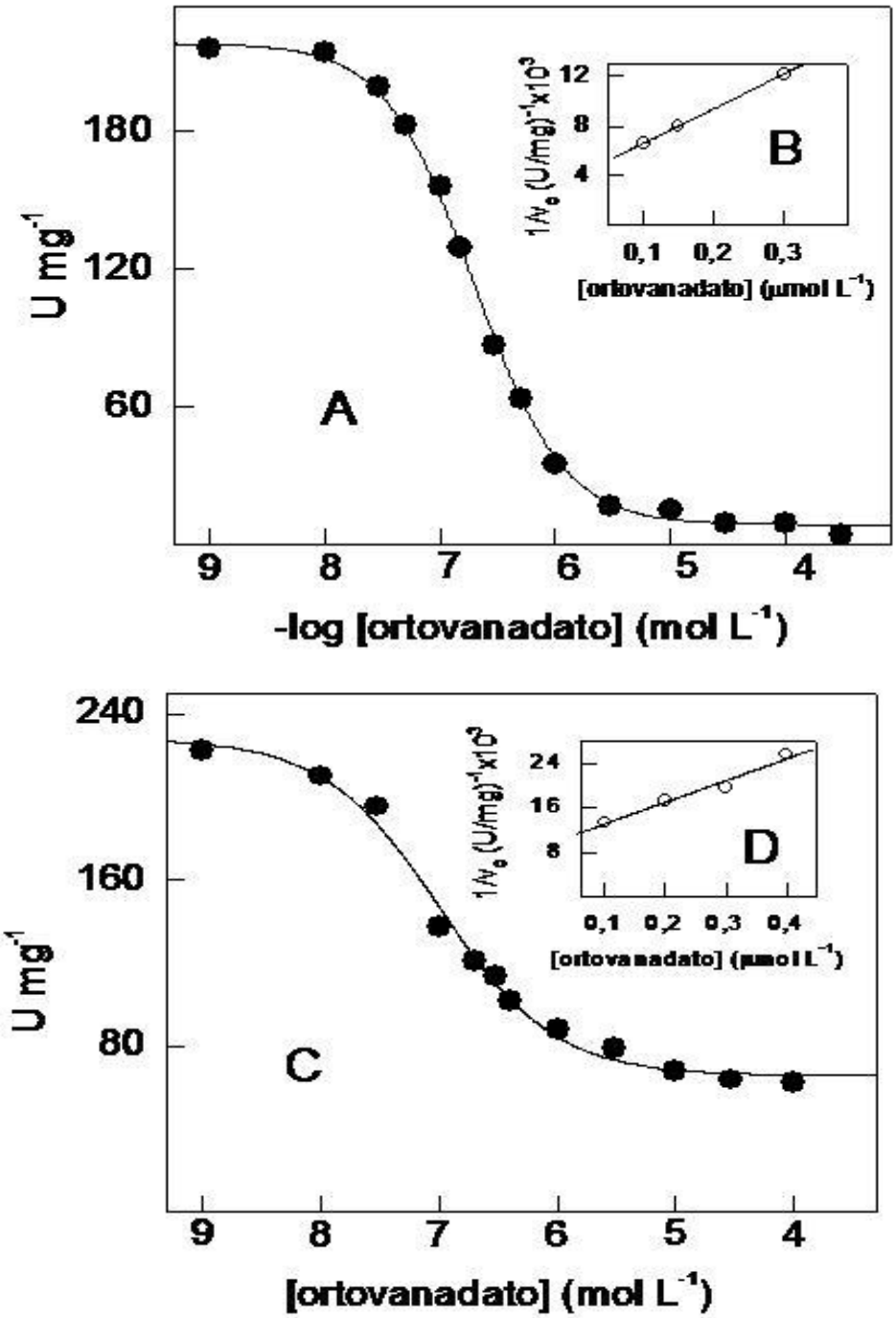


Figura 29. **Efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum*.**

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,2 mg/mL, FEP 1,15 mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção (B e D):** representação de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-inibidor, na qual v_c representa a velocidade corrigida para atividade (Na^+, K^+)-ATPase. Animais adultos (A) e juvenis (C).

TABELA 4: Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+,K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo ATP, íons magnésio, potássio, sódio e amônio.

Efetor	V(U mg^{-1})		$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})		n_H	
	Adulto	Juvenil	Adulto	uvenil	Adulto	Juvenil
ATP	181,8±77,83	189,52±32,45	0,11±0,01	0,14±0,02	1,0	1,0
$MgCl_2$	174,7±74,76	168,35±28,83	0,27±0,05	0,51±0,09	2,5	3,48
NaCl	175,5±75,12	165,48±28,33	4,73±0,81	4,92±0,84	1,9	1,2
KCl	171,2±73,28	178,56±30,58	1,00±0,17	1,30±0,22	1,2	1,0
NH_4Cl	194,2±63,34	205,91±35,26	4,76±2,15	1,88±0,32	1,9	1,0

Inibidor	K_i(µmol L^{-1})	
	Adulto	Juvenil
Ortovanadato	0,145±0,01	0,21±0,04
Ouabaína (K^+)	114,3±2,41	91,22±15,62
Ouabaína (NH_4^+)	57,95±17,04	53,98±9,24

Como mostrado na Figura 30.A em animais adultos os íons potássio estimularam a atividade (Na^+, K^+)-ATPase na presença de concentrações fixas de amônio. Observa-se uma estimulação sinergística da velocidade máxima com valores até 32% maiores quando comparados a estimulação da enzima apenas na presença do potássio. Em todos os experimentos realizados a estimulação da enzima ocorreu através de uma curva simples de saturação. Os valores de n_H obtidos indicam que a estimulação da (Na^+, K^+)-ATPase pelo potássio em baixas concentrações de amônio ocorreu de acordo com a cinética michaeliana. Na presença de concentrações crescentes de amônio, a afinidade da enzima pelo K^+ diminuiu cerca de três vezes (FIGURA 31.B).

Como mostrado na Figura 30.B os íons potássio estimularam a atividade (Na^+, K^+)-ATPase na presença de concentrações fixas de amônio nos microsomas de animais juvenis. Observa-se que o aumento da concentração de íons NH_4^+ entre 1 e 10 mmol L^{-1} provoca um aumento da atividade basal pelo deslocamento do K^+ pelo NH_4^+. Entretanto em concentrações saturantes de NH_4^+ não ocorre estimulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase. Os valores de n_H aumentam com o aumento das concentrações de NH_4^+ (FIGURA 31.D).

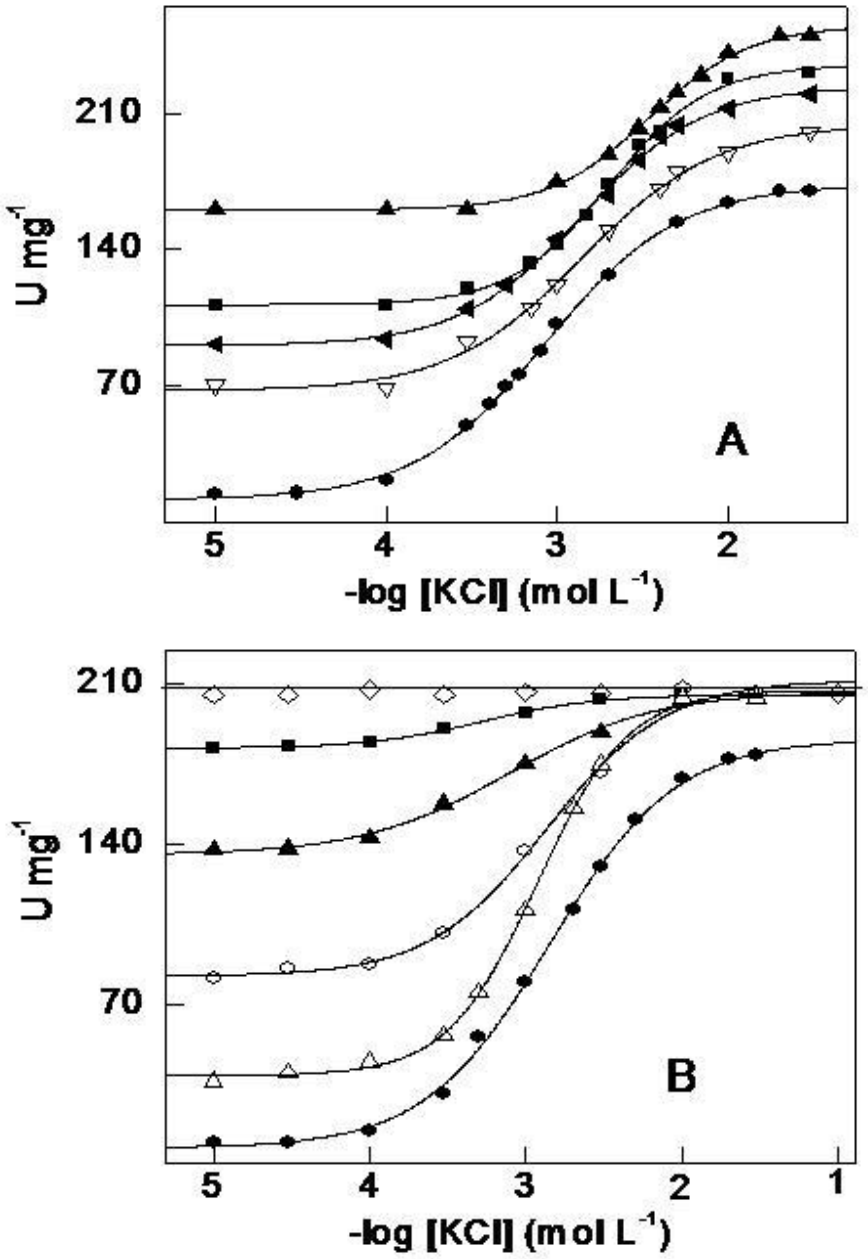


Figura 30. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NH_4Cl 30 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 9,53 µg de proteína (A e B). Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Atividade (Na^+, K^+)-ATPase na presença de (Δ) 0,3 mmol L^{-1} NH_4Cl, (□) 0,4 mmol L^{-1} NH_4Cl, (○) 1 mmol L^{-1} NH_4Cl, (▽) 2 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◄) 3 mmol L^{-1} NH_4Cl, (■) 5 mmol L^{-1} NH_4Cl, (▲)10 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◆) 20 mmol L^{-1} NH_4Cl, (◇) 30 mmol L^{-1} NH_4Cl, e (●) na ausência se NH_4Cl. Animais adultos (A) e juvenis (B).

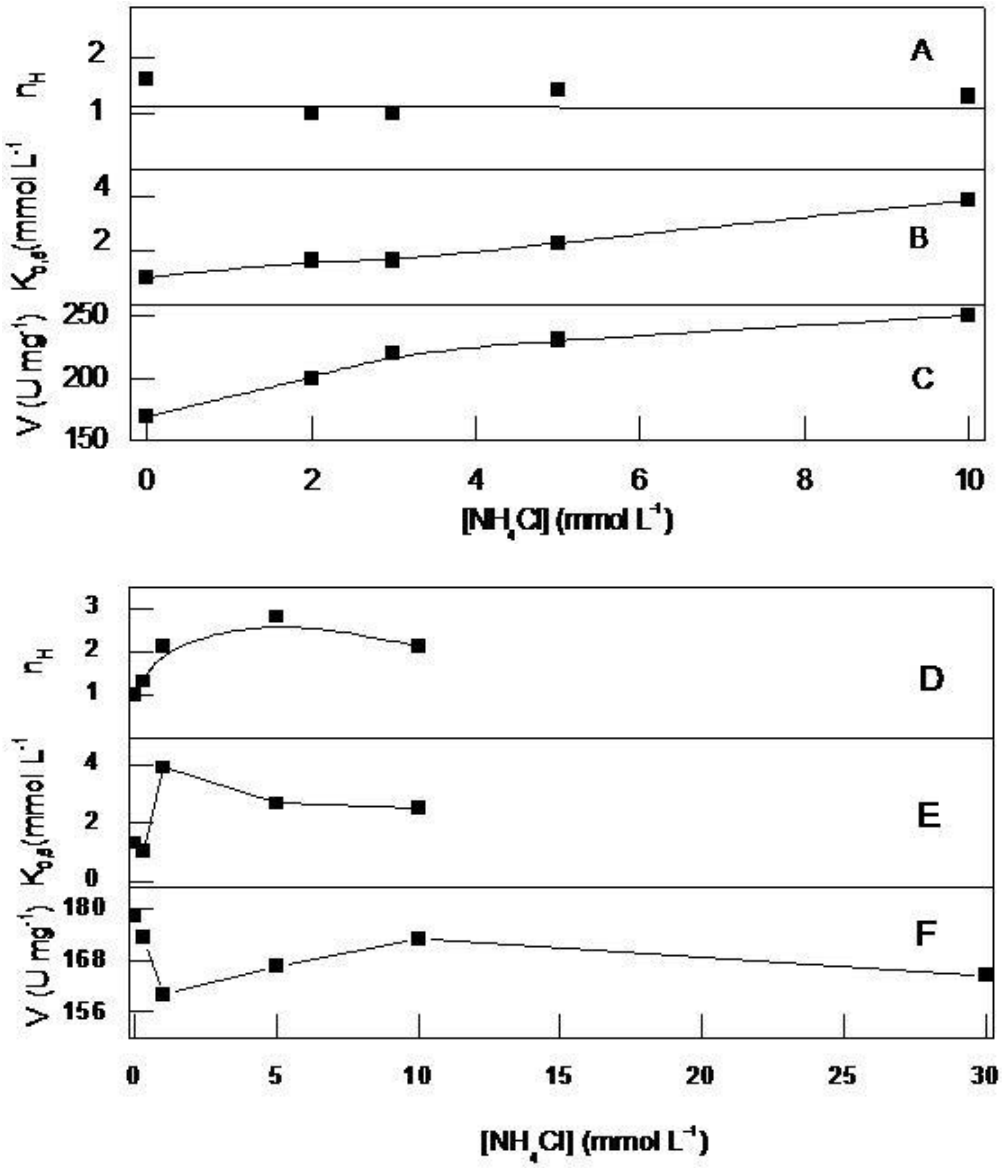


Figura 31. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo potássio na presença de diferentes concentrações do íon amônio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NH_4Cl 30 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 9,53 µg de proteína. Todos os parâmetros obtidos foram de experimentos realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Animais adultos (A, B e C) e juvenis (D, E e F).

A modulação da (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons amônio na presença de concentrações fixas de íons potássio em animais adultos está representada na Figura 32.A. Nessas condições também foi observada uma estimulação sinergística da afinidade (263,35 U mg^{-1}). Entretanto com aumento da concentração do K^+ a afinidade da enzima pelo NH_4^+ aumentou cerca de 4 vezes (TABELA 5).

Independentemente da concentração do K^+, a modulação da enzima pelo NH_4^+ ocorreu com interação sítio-sítio (Figura 33.A, C e TABELA 5).

A modulação da (Na^+, K^+)-ATPase em animais juvenis pelos íons amônio na presença de concentrações fixas de íons potássio está representada na Figura 32.B. Nessas condições também foi observada uma diminuição dos valores de $K_{0,5}$, e que em concentrações saturantes de K^+ não ocorre o deslocamento do NH_4^+. Os valores de n_H obtidos permaneceram em torno e 1 (FIGURA 33.D) e a atividade (Na^+,K^+)-ATPase não apresentou alterações sigificativas (FiGURA 33.F).

Na tabela 5 estão resumidos os parâmetros cinéticos da estimulação da atividade (Na^+,K^+)-ATPase pelos íons potássio e amônio.

O efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total e insensível a ouabaína é mostrado na Figura 34 e os valores de inibição obtidos para na Tabela 6. A atividade insensível a ouabaína representa cerca de 37,9% da atividade total. A inibição de 29% da atividade insensível ao inibidor ouabaína pelo ortovanadato indica a presença de ATPases do tipo P na preparação. Uma (Ca^{2+})-ATPase e uma V-ATPase também foram identificadas. A F_0F_1-ATPase é responsável por 45,85 U mg^{-1}, já que o inibidor oligomicina e a azida de sódio inibiram a atividade insensível ouabaína. Também estão presentes na preparação uma (Na^+)-ATPase e fosfatases neutras. Nos animais em estágio juvenil I inibição pelo ortovanadato indica que cerca de 12 % das outras enzimas que estão presentes na preparação são ATPase tipo P. Também foram identificados uma F_0F_1-ATPase, V-ATPase e Ca^{2+}-ATPase. A inibição pelo ácido etacrínico mais ouabaína indica a presença de uma Na^+-ATPase como indica a inserção da Figura 24.D. A estimulação observada indica a presença de uma ATPase sensível ao sódio na preparação ao contrário do observado na Figura 25.D, a atividade insensível da enzima quando modulada pelos íons potássio apresenta uma reta indicando a ausência de outras fosfatases sensíveis aos íons potássio na preparação. Fosfatases neutras são responsáveis por uma atividade de 12,75±0,7 U mg^{-1}.

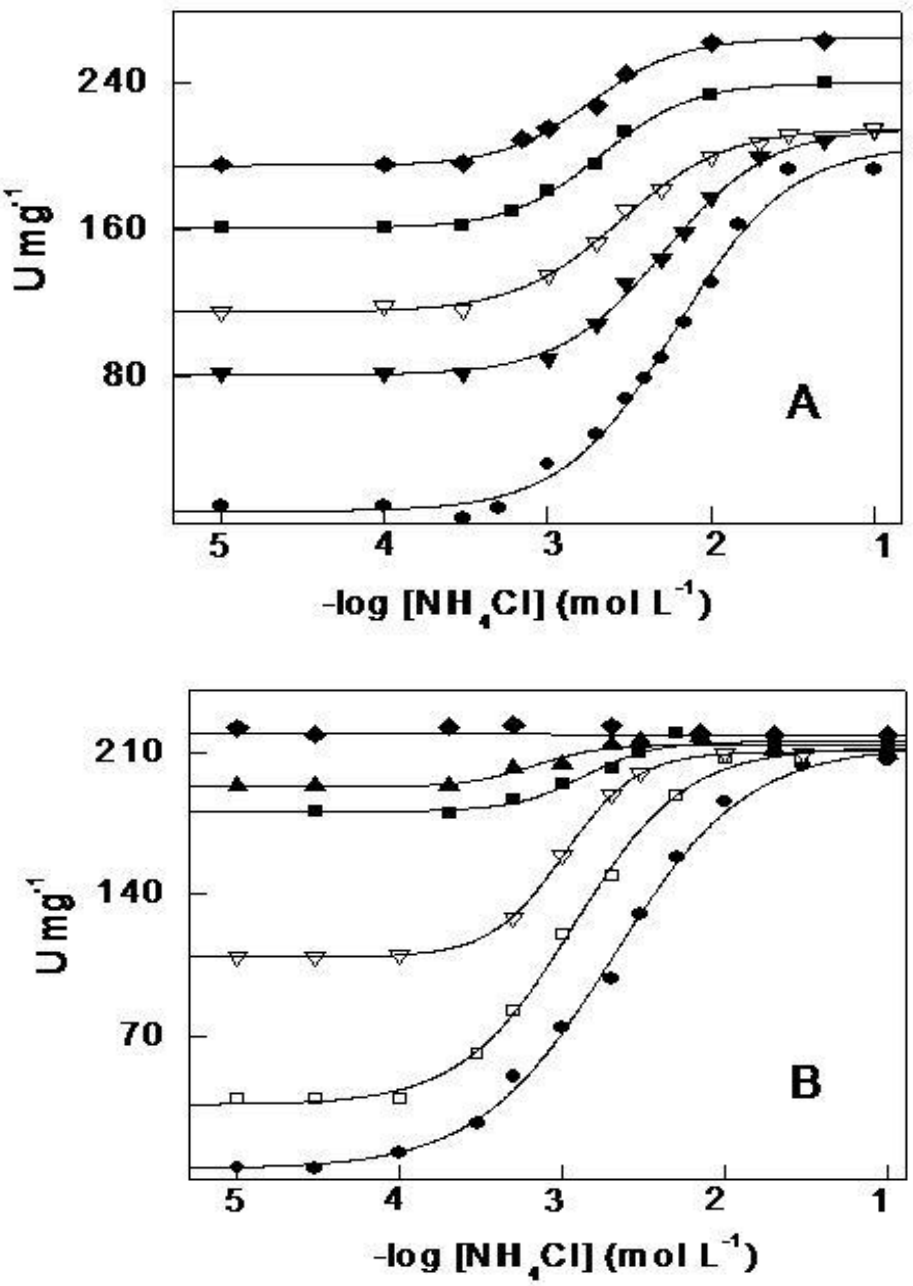


Figura 32. A modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons amônio na presença de íons potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NH_4Cl 30 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg de proteína (A e B). Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. A figura acima corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Atividade (Na^+,K^+)-ATPase na presença de (□) 0,4 mmol L^{-1} KCl, (▼) 0,5 mmol L^{-1} KCl, (▽) 2 mmol L^{-1} KCl, (■) 5 mmol L^{-1} KCl, (▲)10 mmol L^{-1} KCl, (◆) 20 mmol L^{-1} KCl e (●) na ausência se KCl. Animais adultos (A) e juvenis (B).

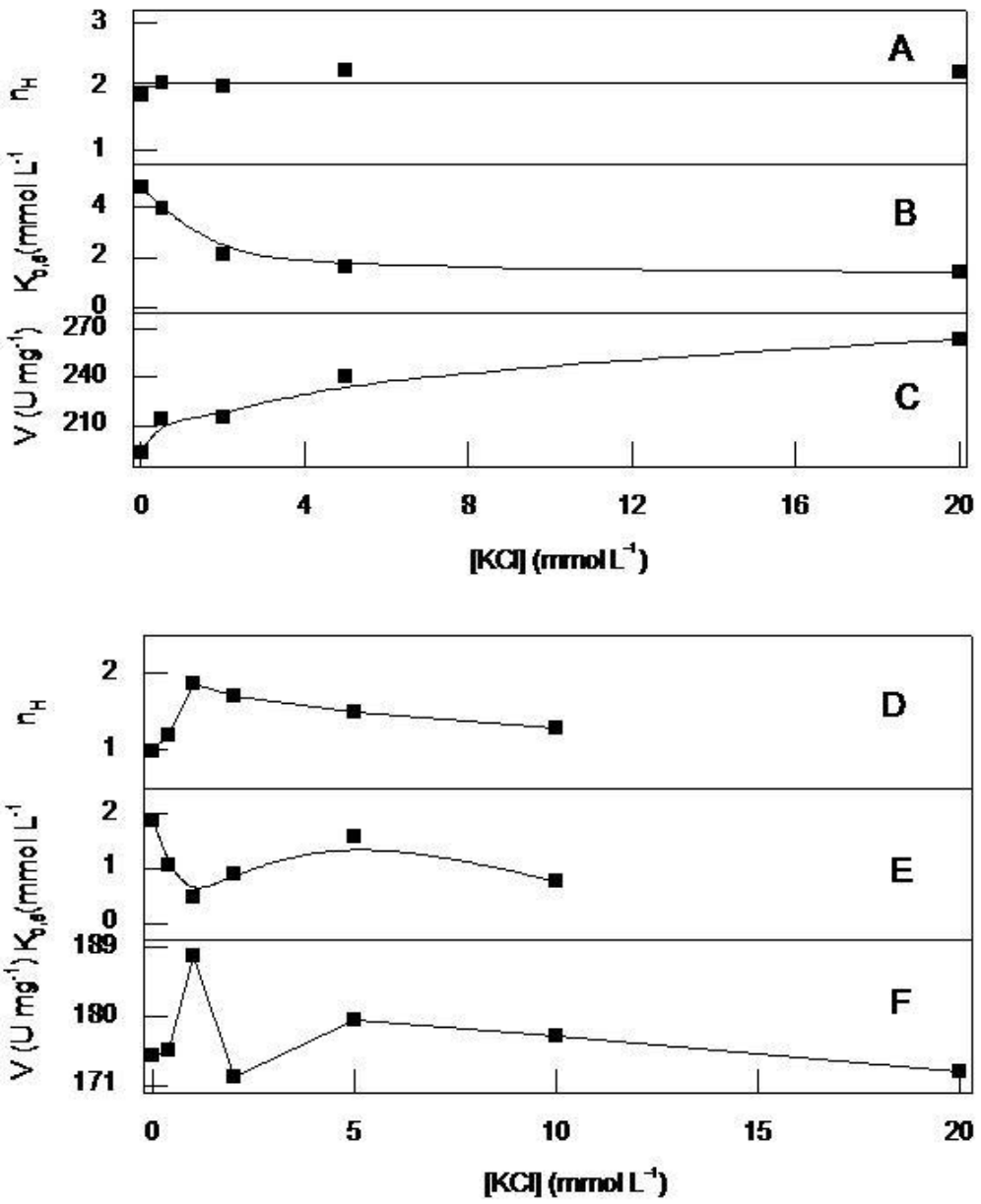


Figura 33. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelo amônio na presença de diferentes concentrações do íon potássio.

A atividade da enzima foi medida continuamente a 25º C, em tampão TEA 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1} e $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, NaCl 50 mmol L^{-1}, NH_4Cl 30 mmol L^{-1}, NAD 1,4 mg/mL, fosfato de sódio 1 mmol L^{-1}, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L^{-1}, FGQ 9U e GAFDH 12U em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg de proteína. Todos os parâmetros obtidos foram de experimentos realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados correspondem a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. Animais adultos (A, B e C) e juvenis (D, E e F).

TABELA 5. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio e amônio.

$[K^+]$	$[NH_4^+]$	V_M		$K_{0.5}$		n_H		V_M/K	
(mmol L^{-1})	(mmol L^{-1})	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil
Variável	0	169,9±71,4	178,4±30,6	1,00±0,17	1,29±0,22	1,6	1,0	817,10	122,2
Variável	0,3	-	203,8±29,7	-	1,03±0,18	-	1,3	-	785,9
Variável	1	-	206,0±27,4	-	3,90±0,67	-	2,1	-	80,3
Variável	2	200,3±84,1	-	1,61±0,28	-	1,0	-	426,90	-
Variável	3	219,7±92,3	-	1,60±0,29	-	1,0	-	430,25	-
Variável	5	230,9±97,0	204,5±28,5	2,28±0,40	2,67±0,46	1,4	2,8	276,40	73,2
Variável	10	250,1±105,0	203,6±29,6	3,85±0,64	2,50±0,43	1,3	2,1	124,20	80,3
Variável	30	-	205,4±28,1	-	-	-	-	-	-
0	Variável	193,4±62,2	205,9±35,3	4,76±2,15	1,87±0,32	1,8	1,0	149,38	83,0
0,4	Variável	-	207,1±30,0	-	1,06±0,18	-	1,2	-	480,8
0,5	Variável	214,1±70,0	-	3,96±1,80	-	2,1	-	128,28	-
2	Variável	215,4±69,4	202,7±29,5	2,13±0,96	0,90±0,15	2,0	1,7	142,03	325,6
5	Variável	240,1±77,3	219,7±30,7	1,62±0,73	1,59±0,27	2,2	1,5	187,84	75,8
10	Variável	-	218,1±30,4	-	0,77±0,13	-	1,3	-	102,6
20	Variável	263,4±84,8	217,5±29,6	1,40±0,63	-	2,2	-	188,50	-

TABELA 6. **Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento.**

Inibidor	V(U mg^{-1})	Atividade residual (%)	V(U mg^{-1})	Atividade residual (%)
	Adulto		Juvenil	
Controle	157,3±3,2	100	221,64±3,2	100
Ouabaína (3 mmol L^{-1})	33,45±1,3	21,3	84,07±1,5	37,9
Ortovanadato (0,03 mmol L^{-1})	21,33±3,2	13,6	73,37±0,3	33,10
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Etanol (10 µL)	32,8±1,0	20,8	87,13±0,4	39,31
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + DMSO (20 µL)	34,0±0,9	21,6	72,5±0,4	32,71
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Ortovanadato (0,03 mmol L^{-1})	19,91±0,3	12,7	64,2±0,2	29,0
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Oligomicina (1µg/mL)	13,54±2,1	8,6	41,27±2,5	18,62
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Tapsigargina(0,5 µmol L^{-1})	10,35±0,7	6,6	45,86±1,4	20,69
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Bafilomicina (0,4 µmol L^{-1})	13,02±1,6	8,3	53,5±0,72	24,14
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Ácído Etacrinico (2 mmol L^{-1})	24,69±0,2	15,7	7,64±0,80	3,45
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Teofilina (5 mmol L^{-1})	12,75±0,7	8,1	29,04±2,3	13,1
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Aurovertina (0,1 mmol L^{-1})	13,0±3,6	8,6	-	-
Ouabaína (3 mmol L^{-1}) + Azida de sódio (0,1 mmol L^{-1})	-	-	20,0±3,1	9,02

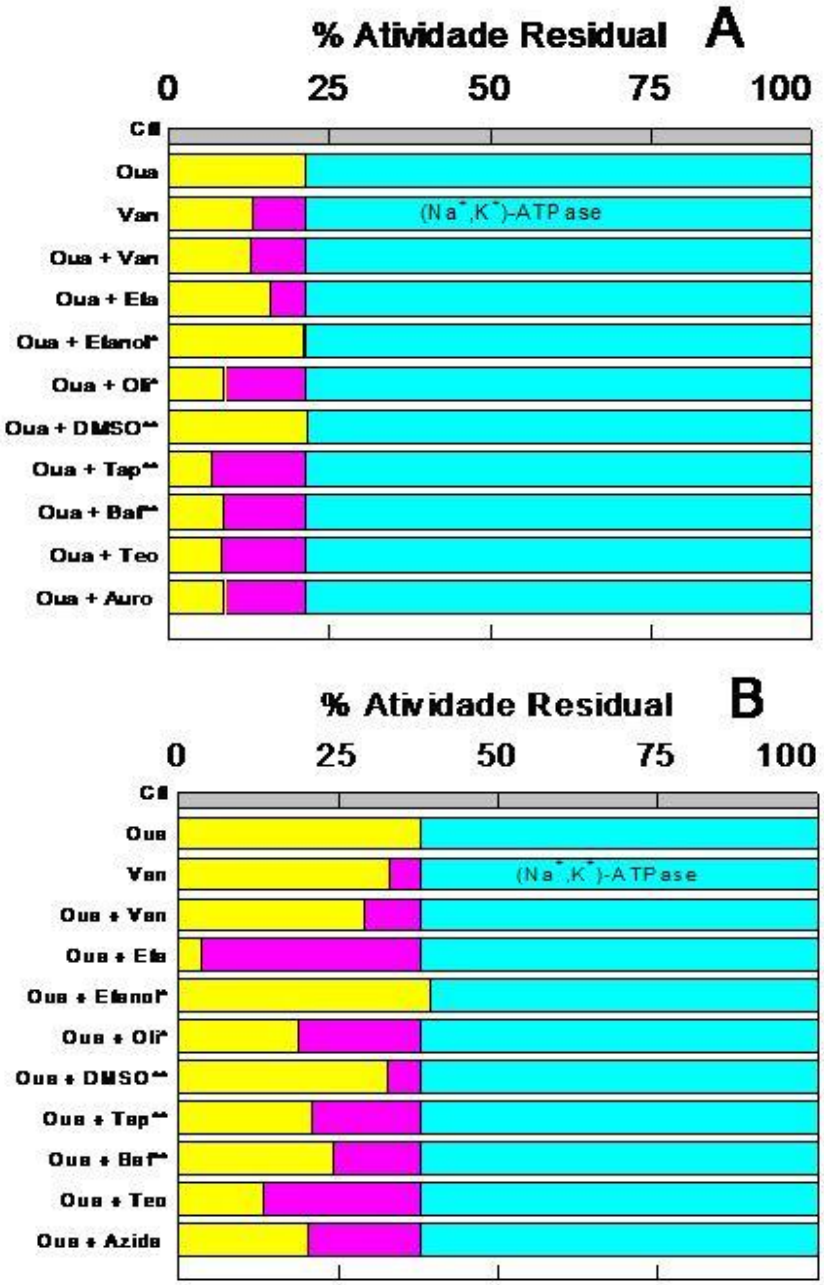


Figura 34. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum*.

A atividade da fração microsomal foi medida continuamente a 25º C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1}, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L^{-1}, $MgCl_2$ 5 mmol L^{-1}, KCl 20 mmol L^{-1}, NADH 0,2mg/mL, FEP 1,15mg/mL, PQ 20U e LDH 78U em um volume final de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,71 µg (A) e 12,9 µg (B) de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três (N=3) homogeneizados de brânquias diferentes. APTase total (■); Atividade residual relativa aos inibidores (■); Atividade ATPase contaminante (■) e Atividade (Na^+, K^+)-ATPase (■). Ctl: controle, Oua: Ouabaína, Van: ortovanadato, Etá: ácido etacrínico, Oli: oligomicina, DMSO: dimetilsulfóxido, Tap: tapsigargina, Baf: bafilomicina, Teo: teofilina e Auro: aurovertina. Animais adultos (A) e juvenis (B).

5.0 DISCUSSÃO

Camarões do gênero Macrobrachium apresentam diferentes graus de dependência a água salgada. Em várias espécies, os primeiros estágios larvais planctônicos são dependentes da água salobra para a sobrevivência, ao contrário dos mais velhos pós-larvas, juvenis e adultos, que vivem exclusivamente em água doce. O camarão *M. amazonicum* é um invasor recente do ambiente de água doce, uma evidência é que os estágios larvais de seu desenvolvimento ocorrem em água salgada (Magalhães, 1985; Moreira et al., 1986). A evolução de vários processos permitiu a adaptação destes animais ao ambiente dulcícola, entre eles a osmorregulação. Vários estudos indicam o envolvimento da (Na^+, K^+)-ATPase nos processos osmorregulatórios dos crustáceos aquáticos, sendo que o estudo da (Na^+,K^+)-ATPase branquial é fundamental para uma melhor compreensão destes processos nestes animais (Péqueux, 1995; Weihrauch et al 1999; Lovett et al., 2001; Lucu & Towle, 2003). Considerando que durante seu ciclo de vida estes animais migram entre ambientes de diferentes salinidades, a adaptação osmótica destes animais através do surgimento de mecanismos osmorregulatórios é essencial para sua sobrevivência nestes diferentes habitats (Charmantier et al., 2001).

5.1 *Dosagem de íons e osmolalidade da hemolinfa*

A eficiência da capacidade osmorregulatória, necessária para manter uma alta concentração osmótica da hemolinfa, é fundamental para a colonização do habitat de água doce. A dosagem da osmolalidade da hemolinfa dos animais adultos de *M. amazonicum* foi de 326,71±20,73 mOsm/kg valor muito semelhante ao obtido para *M. nipponense* (330 mOsm/kg,) e *M. olfersii* (336,24 mOsm/kg) (Freire et al., 2003; Wang et al., 2004). Valores obtidos para outras espécies de água doce do gênero Macrobrachium apresentaram aumento de 1,2 vezes em relação a *M. amazonicum* de populações selvagens (403 mOsm/kg,), e *M. tuxtlaense* (406,6 mOsm/kg,), cerca de 1,3 vezes maior para *M. brasiliense* (412 mOsm/kg,), e *M. potiuna* (418 mOsm/kg), 1,4 vezes maior para *M. rosenbergii* (440 mOsm/kg,), e 1,6 vezes maior (515 mOsm/kg) em relação ao *M. australiense* (Mantel & Farmer, 1983; Freire et al., 2003; Ordiano et al., 2005; Augusto et al., 2007; Wilder et al., 2009). Camarões do gênero Macrobrachium têm inúmeras características biológicas que sugerem a invasão recente do ambiente de água doce, como alta osmolalidade da hemolinfa. Aparentemente, a

adaptação funcional destes animais ainda é um processo contínuo, apresentando espécies que adotam diferentes estratégias fisiológicas para lidar com um meio diluído (McNamara, 1987; Freire et al., 2003).

A concentração de Na^+ estimada na hemolinfa de espécies do gênero Macrobrachium apresenta um ampla variação. Para animais adultos de *M. amazonicum* da população em estudo o valor obtido foi de 201,64 mmol L^{-1} contudo, populações selvagens de *M. amazonicum* apresentaram uma diminuição de 1,7 vezes (119 mmol L^{-1}) na concentração de Na^+ na hemolinfa (Augusto et al., 2007), enquanto que *M .olfersii* apresentou uma diminuição de 1,3 vezes (145,4 mmol L^{-1}), e *M. brasiliense* (163 mmol L^{-1}) um valor 1,2 vezes menor em relação a população em estudo (Freire et al., 2003), e curiosamente a concentração de Na^+ observada para a hemolinfa de *M. australiense* (260 mmol L^{-1}) apresentou um aumento de 1,3 vezes (Mantel & Farmer, 1983). Para hemolinfa de *M. rosenbergii* (Cheng et al., 2003; Wilder et al., 2009;) e *M. acanthurus* (Foster, 2006) medidas similares foram encontradas.

A hemolinfa de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento apresentou uma concentração de Cl^- de 208,0±0,011 mmol L^{-1}, valor muito similar ao encontrado para *M. rosembergii* 207±3,6 mmol L^{-1} (Wilder et al., 2009), enquanto que, animais de populações selvagens (149,6±14 mmol L^{-1}) de *M. amazonicum*, *M. australiense* e *M. olfersii* apresentaram valor 1,4 vezes menor (Mantel & Farmer, 1983; Freire et al., 2003; Santos et al., 2007). Os valores obtidos para *M. potiúna* e *M. brasiliense* foram 1,3 vezes menores (Freire et al., 2003).

O valor de concentração dos íons Ca^{2+} (14,29 mmol L^{-1}) para os animais adultos de *M. amazonicum* é similar ao obtido para *M. olfersii* (11 mmol L^{-1}) em água doce (McNamara et al., 1990). Já o valor encontrado para *M. rosenbergii* foi 1,9 vezes maior (Greenaway, 1985; Wilder et al., 2009) e para *M. acanthurus* (Foster, 2006). Para outras espécies de crustáceos em água doce, valores para concentração dos íons Ca^{2+} da mesma ordem de grandeza foram encontrados (Mantel & Farmer, 1983; Greenaway, 1985).

O valor de concentração dos íons K^+ na hemolinfa de animais adultos de *M. amazonicum* de 9,89 mmol L^{-1} foi maior em relação a alguns palaemonídeos, como em *M. rosenbergii* (Wilder et al., 2009) com uma concentração de K^+ 2,6 vezes menor e em *M. olfersii* (McNamara et al., 1990), que apresentou uma diminuição de 2 vezes na concentração de K^+ na hemolinfa. Outras espécies de crustáceos de água doce como *P. zealandicus*, *A. astacus*, *A. pallipes*, *P. leniusculus*, *O. limosus*, *S. africanus* e *S.*

hydrodroma também apresentaram valores menores de concentração de K^+ (Mantel & Farmer, 1983). Já para *P. niloticus*, valores similares foram encontrados (Mantel & Farmer, 1983).

Para o Mg^{2+}, a concentração encontrada na hemolinfa dos animais adultos de *M. amazonicum* de 1,6 mmol L^{-1} foi 1,3 vezes menor em relação ao encontrado em *M. olfersii* e *M. acanthurus* (McNamara et al., 1990; Foster, 2006) e 2 vezes menor em *M. rosenbergii* (Wilder et al., 2009). Para outras espécies de crustáceos de água doce, os valores encontrados variaram de 0,5 a 10 mmol L^{-1} (Mantel & Farmer, 1983).

5.2 *Caracterização da fração microsomal*

A eletroforese desnaturante das frações microsomais de animais adultos e juvenis de *M. amazonicum* cultivados revelou a presença de várias bandas protéicas, mas a análise de western blotting com anticorpo monoclonal para a subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase de aves, revelou a presença de uma única banda imunoespecífica com Mr de 105 kDa. Frações microsomais do tecido branquial de *M. amazonicum* (populações selvagens*), M. olfersii, C. vittatus, C. ornatus* e *C. Danae* submetidas a western blotting com anticorpo monoclonal para a subunidade α revelou também a presença de uma banda imunoespecífica com Mr próximos aos valores obtidos para os estágios de *M. amazonicum* estudados (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2000; Garçon et al., 2007; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007). Para todos os estágios de desenvolvimento estudados a mesma quantidade de proteína foi aplicada (160 μg), mas as marcações apresentaram intensidades diferentes, sugerindo que durante o desenvolvimento do animal podem ocorrer mudanças quantitativas na expressão da enzima. Estas mudanças têm sido relatadas para animais aclimatados quando comparados a animais recém capturados como populações selvagens de *M. amazonicum* e *C. ornatus* (Belli et al., 2009; Garçon et al., 2009). Alguns estudos têm utilizado a técnica de PCR para investigar mudanças quantitativas na expressão da (Na^+, K^+)-ATPase em diferentes tecidos ou em brânquias de crustáceos submetidos a aclimatação (Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003; Lovett et al., 2006; Jayasundara et al., 2007), mas estudos utilizando diferentes estágios ontogenéticos destes crustáceos ainda não foram realizados.

5.3 *Caracterização da atividade K^+-Fosfatase*

A centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* apresentou dois picos para animais adultos e juvenis I. O perfil observado para estes animais que são habitantes da água doce foi muito semelhante ao obtido para animais adultos de populações selvagens aclimatados a 21S (Belli et al., 2009), esta semelhança pode indicar que embora os animais adultos e juvenis desta população estejam na água doce apresentam características dos estágios ancestrais onde viveram na água salgada. Os dois picos encontrados para os estágios ontegenéticos estudados indicam que a (Na^+, K^+)-ATPase está distribuída na membrana em frações de diferentes densidades onde, a fração menos densa apresenta a maior percentagem da atividade K^+-Fosfatase. Para o camarão decápode *M. olfersii* (Furriel et al., 2001; Mendonça et al., 2007) animais em água doce apresentaram um pico de atividade K^+-Fosfatase enquanto animais aclimatados a 21 S apresentaram dois picos protéicos. Semelhante ao observado para populações selvagens de *M. amazonicum* e adultos de *M. olfersi* o siri *C. danae* apresentou um único pico para atividade K^+-Fosfatase com densidade semelhante ao encontrado para a população de *M. amazoniucm* em estudo (Masui et al., 2003; Masui et al., 2005).

O mecanismo pelo qual ocorre a hidrólise do p-nitrofenilfosfato (pNFF) pela (Na^+, K^+)-ATPase ainda não é bem conhecido (Gatto et al., 2007). Possivelmente o pNFF se liga a conformação E_2 da enzima, mas a fosforilação da enzima neste processo é controversa mesmo que ocorra a ligação dos íons potássio tanto na atividade pNFFase quanto na fosforilação, enquanto os íons K^+ extracelulares estimulam a desfosforilação E-P os íons K^+ intracelulares estimulam a atividade pNFFase, ou seja o íon se liga em lados diferentes nos nestes dois casos. A afinidade da enzima pelo pNFF foi muito próximas para animais juvenis e adultos de *M. amazonicum*, sendo observados valores semelhantes para *M. olfersii* recém capturado, aclimatado a 21S, e populações selvagens de *M. amazonicum* recém capturado e aclimatado, C. danae recém capturado e aclimatado (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Masui et al., 2005; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009). Os valores de atividade máxima observados para animais adultos foram de 1,9 vezes menores quando comparados a animais de populações selvagens (Belli et al., 2009), valores maiores de atividade também foram relatados para outros crustáceos. Quando comparados aos animais juvenis os animais adultos apresentaram maior velocidade para a hidrólise do pNFF, sendo que os dois estágios apresentaram um comportamento cooperativo com curvas simples de saturação.

Ushimaru e Fukushima (2007) confirmaram que a Ca^{2+}-ATPase é fosforilada pelo pNFF durante o ciclo catalítico e embora a fofoforilação ocorra com uma velocidade menor quando comparada ao ATP uma quantidade de fosfoenzima cerca de 1,5 vezes maior foi formada. Estudos realizados por Strugatsk e colaboradores (2005) indicam que a (Na^+, K^+)-ATPase apresenta dois sítios para o íons Mg^{2+} sendo que um destes sítios pode ser essencial para a atividade pNFFase (Gatto et al., 2007). A estimulação da atividade K^+-Fosfatase pelos íons magnésio ocorreu através de cinética cooperativa em ambos os estágios de desenvolvimento estudados, com valores de velocidade máxima e afinidade muito próximos que também foram relatados para outros crustáceos (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Masui et al., 2005; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009).

A afinidade da K^+-Fosfatase para os íons potássio de diversos crustáceos apresentam valores entre 1,3-3,6 mmol L^{-1} (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Masui et al., 2005; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009), para a população de *M. amazonicum* em estudo os valores observados são próximos aqueles determinados para outros crustáceos. A K^+-Fosfatase de animais adultos transportou íons potássio com valores de velocidade máxima 1,3 vezes maiores em relação aos animais juvenis apresentando um perfil crescente nos valores de afinidade durantes os estágios juvenil I, juvenil II e adulto (TABELA 7).

Como mencionado anteriormente o camarão *M. amazonicum* é uma espécie com grande potencial para o cultivo (Maciel & Valenti, 2009) e um conhecido fator limitante na aquicultura é o aumento da excreção de compostos nitrogenados principalmente amônia e nitrato (Kir et al 2004; Lin et al., 2001). Nestes sistemas a concentração de amônia aumenta exponencialmente com o tempo e seu acúmulo leva a uma diminuição no crescimento, aumento do consumo de oxigênio, alteração das concentrações de aminoácidos livres e proteínas da hemolinfa e aumento da mortalidade (Kir et al., 2004). Em solução, a amônia está presente na forma livre (NH_3) e ionizada (NH_4^+) sendo que o pH do meio é determinante na proporção (NH_3/NH_4^+) e no pH biológico mais de 90% esta na forma de NH_4^+ (Weihrauch et al., 2004; Pagliarani et al., 2007). Sabe-se que o NH_4^+ pode substituir os íons K^+ no co-transporte de íons Na^+ na enzima (Na^+, K^+)-ATPase (Weihrauch et al., 2004), deste modo o efeito do íons amônio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase pode constituir um importante mecanismo de excreção destes compostos e sua compreensão contribuir na otimização do cultivo desta espécie.

A modulação da atividade K^+-Fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons K^+/NH_4^+ foi relatada para *Dilocarcinus pagei*, *M. olfersii*, *C. ornatus* (Garçon, 2007; Furriel et al., 2001; Firmino, 2009) e populações selvagens de *M. amazonicum* não apresentaram estimulação sinergistica da K^+-Fosfatase pelos íons K^+/NH_4^+. Os animais adultos e juvenis da população em estudo apresentaram modulação da afinidade K^+-Fosfatase pelos íons potássio e amônio. Para a estimulação da enzima pelos íons potássio na presença de concentrações crescentes de íons amônio animais adultos apresentaram uma diminuição da afinidade em até 2,8 vezes, enquanto para animais juvenis ocorreu um aumento de até 3,8 vezes, este comportamento indica que enquanto nos animais juvenis na presença de 10 mmol L^{-1} de amônio a enzima transporta íons K^+ com maior velocidade e afinidade nos adultos ela transporta K^+ com maior velocidade, porém menor afinidade. Este comportamento divergente indica que mudanças conformacionais da enzima podem ocorrer durante o desenvolvimento do animal levando a alterações na afinidade na presença destes íons. Para a estimulação da enzima pelos íons amônio na presença de diferentes concentrações de íons potássio o comportamento observado foi semelhante onde em concentrações crescentes de potássio a afinidade da enzima pelos íons amônio aumenta em 3,7 vezes em animais adultos e 2,7 vezes em animais juvenis. A modulação observada pelos íons NH_3^+/K^+ sobre a K^+-Fosfatase foi apenas da afinidade sendo que incrementos da velocidade máxima com o aumento da concentração não foram observados, embora na presença dos dois íons a K^+-Fosfatase apresentou velocidade máxima 10% maior em relação a estimulação da enzima pelos íons sozinhos.

Os íons Na^+ inibem a atividade K^+-Fosfatase, possivelmente pela competição juntamente com os íons K^+ pelos sítios de transporte. Como relatado anteriormente os íons potássio intracelulares estimulam a atividade pNFFase, logo os íons potássio ativam a K^+-Fosfatase através dos sítios citoplasmáticos onde os íons sódio se ligariam, desta forma na presença de ambos os íons ocorre uma inibição da atividade K^+-Fosfatase, pela competição dos dois íons por este sítio citosólico (Mendonça et al., 2007). Para a inibição da atividade K^+-Fosfatase de animais juvenis foi necessária uma concentração de íons Na^+ 40% maior em relação a enzima de animais adultos. A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor foi 1,5 vezes maior em animais adultos, indicando que a enzima de animais juvenis tem maior afinidade pelos íons Na^+.

A atividade pNFFase foi inibida em até 81% pela ouabaína, confirmando que a atividade caracterizada foi a K^+-Fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase. A inibição ocorreu

TABELA 7. Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade K^+-Fosfatase pelos íons magnésio, sódio, potássio, amônio, PNFF e inibição pela ouabaína nas frações microsomais de brânquias de *M. amazonicum* em três diferentes fases de desenvolvimento.

Efetor	V (U mg^{-1})			$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})			n_H		
	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto
PNFF	71,27±1,15	98,92	82,69±2,34	1,45±0,28	1,16	1,52±0,44	1,2	1,3	1,5
Mg^{2+}	73,04±0,18	103,6	84,50±3,07	1,07±0,48	1,04	1,09±0,16	1,4	1,8	2,0
K^+	65,68±7,20	99,37	85,80±1,27	1,77±0,21	1,86	1,91±0,81	2,0	2,0	1,9
NH_4^+	65,72±0,01	102,1	99,38±14,00	9,40±3,25	7,89	9,16±1,76	2,0	2,4	1,7

Inibidor	K_i (mmol L^{-1})		
	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto
Na^+	6,67±0,13	-	9,82±2,70
Ouabaína(K^+)	0,142±0,57	0,105	0,156±16,26
Ouabaína(NH_4^+)	0,117±0,83	-	0,047±13,00

*Masui, D. C. (comunicação pessoal)

através de uma curva simples com valores de afinidade muito semelhantes para animais adultos e juvenis desta população. Na presença de íons amônio ocorreu um aumento da afinidade de até 3,3 vezes. Comportamentos semelhantes foram relatados para populações selvagens de *M. amazonicum* (Beli et al., 2009).

5.4 *Caracterização da atividade (Na^+, K^+)-ATPase*

Um gradiente em densidade de sacarose da fração microsomal de *M. amazonicum* em estágio adulto de desenvolvimento em relação a atividade (Na^+, K^+)-ATPase revelou a presença de dois picos protéicos semelhante ao obtido para animais em estágio juvenil de desenvolvimento. O pico I está localizado entre 20-35% de sacarose em ambos os estágios de desenvolvimento, com um valor máximo de atividade (Na^+, K^+)-ATPase da ordem de 14 U mL^{-1}. Este pico I observado para adultos e juvenis cultivados apresenta densidade próxima ao pico único encontrado em animais adultos de populações selvagens de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007). O pico II observado para animais adultos e juvenis cultivados esta localizado em frações mais densas (35-45%) não foi observado para animais adultos de populações selvagens. Resultados similares com a presença de um pico de atividade (Na^+, K^+)-ATPase entre 20-35% de sacarose foram obtidos para *M. olfersii, Clibanarius vittatus, C. ornatus* e *C. Danae* (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2000; Garçon et al., 2007; Gonçalves et al., 2007). A inibição da atividade ATPase nos dois estágios estudados indica a presença de ATPases e/ou fosfatases em ambas as preparações microsomais. O perfil observado para animais adultos e juvenis é muito semelhante indicando que durante estes dois estágios ontogenéticos ocorrem poucas alterações na distribuição da enzima na membrana celular, onde o pico I está distribuido de forma quase idêntica nos dois estágios de desenvolvimento localizado em frações menos densas indicando que a enzima está presente em frações homogêneas da membrana celular, enquanto o pico II para o estágio adulto apresenta alta atividade insensível a ouabaína, para o estágio juvenil I a (Na^+, K^+)-ATPase é responsável por praticamente toda a atividade.

A atividade (Na^+, K^+)-ATPase nos animais adultos de *M. amazonicum* cultivado apresentou um único sítio para hidrólise do ATP (K_M=0,11±0,007 mmol L^{-1}) semelhante a animais em estágio juvenil (K_M=0,14±0,02 mmol L^{-1}). Resultados obtidos para a modulação pelo ATP em populações selvagens de *M. amazonicum* na fase adulta, apresentaram dois sítios para a ligação do ATP um de alta e outro de baixa afinidade com K_M=0,0042 mmol L^{-1} e 0,144 mmol L^{-1} respectivamente (Santos et al., 2007). O

valor de K_M obtido para a hidrólise do ATP para *M. amazonicum* em estágio adulto e juvenil é muito parecido com K_M obtido para adultos de populações selvagens e adultos de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007). O coeficiente de Hill para a modulação da (Na^+, K^+)-ATPase pelo ATP em todos os estágios ontogenéticos estudados apresentou valor igual a um, indicando comportamento michaeliano. Estes resultados indicam que a afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase para o ATP entre estas diferentes espécies do gênero *Macrobrachium* é muito similar. Observa-se também uma semelhança entre os valores de V nos estágios adulto (181,84±77,83 U mg^{-1}) e juvenil para animais cultivados (189,52±32,45 U mg^{-1}) o que indica que não ocorrem mudanças significativas em relação a hidrólise do ATP pela (Na^+, K^+)-ATPase entre estes dois estágios de desenvolvimento.

Os estágios ontogenéticos do camarão *Macrobrachium rosembergii* foram investigados quanto a atividade (Na^+, K^+)-ATPase, sendo observado um aumento progressivo da atividade (Na^+, K^+)-ATPase nos primeiros estágios larvais de desenvolvimento (0,7-70 U mg^{-1}), seguidos de uma contínua diminuição até os últimos estágios onde permanece relativamente constante, sendo de 21-26 U mg^{-1} para pós-larvas e 25 U mg^{-1} para animais adultos. Este comportamento foi atribuído a transição do animal da água salobra (12 S) para água doce nos estágios iniciais, sendo também uma compensação osmótica (Wilder et al., 2000; Wilder et al., 2001; Huong et al., 2004).

Ituarte e colaboradores (2008) relataram variações da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase presente nas brânquias do camarão carídeo *Palaemonetes argentinus* durante a ontogênese. A atividade da enzima apresentou um perfil crescente no estágio embrionário atingindo um valor máximo nos embriões tardios com valores entre 140-230 U mg^{-1}, seguindo de um dedrécimo nos estágios posteriores chegando até metade destes valores na fase adulta 36-102 U mg^{-1}. Esta espécie apresenta um ciclo de vida semelhante a população de *M. amazonicum* em estudo. Sendo um invasor recente dos ambientes de água doce, as larvas desta espécie necessitam de água salobra (5 a 15 S) para completar seu desenvolvimento e a atividade da enzima nos estágios finais permanece relativamente constante.

A atividade da (Na^+, K^+)-ATPase do camarão decápode *Penaeus japonicus* nos estágios larvais e pós larvais foi caracterizada por Bouaricha e colaboradores (1991). A atividade da enzima nos estágios larvais foi medida a partir de homogeneizados do corpo inteiro com valores de 3-105 U mg^{-1}, apresentando um aumento nos estágios pós-

larvais 118-168 U mg^{-1} onde a atividade foi medida a partir de homogeneizados do cefalotórax dos animais. A atividade (Na^+, K^+)-ATPase branquial de animais adultos apresentou valores de 173 U mg^{-1}. Esta caracterização apresenta o mesmo perfil relatado anteriormente onde a atividade (Na^+, K^+)-ATPase nos estágios finais permanece relativamente constante.

Similarmente a atividade (Na^+, K^+)-ATPase obtida a partir de homogeneizados do cefalotórax de larvas e pós-larvas da lagosta *Homarus gammarus* apresentou um perfil crescente, sendo de 47 a 50 U mg^{-1} nos estágios larvais e 53 U mg^{-1} nos estágios pós-larvais (Thuet et al., 1988).

A investigação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase durante a ontogênese de algumas espécies de crustáceos indicam que estes animais apresentam uma elevada atividade (Na^+, K^+)-ATPase durante a fase embrionária sendo que esta atividade decresce nos estágios larval e adulto (Felder et al., 1986; Wilder et al., 2001; Taylor & Seneviratna, 2005). Os resultados para a variação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase nos últimos estágios ontogenéticos de *M. amazonicum* como mostrado na Tabela 11 são similares aos resultados obtidos para outros crustáceos, sugerindo que um aumento da atividade (Na^+, K^+)-ATPase ocorreria nos estágios iniciais para compensar mudanças osmóticas no ambiente, quando os animais migram de águas salobras para água doce, e uma diminuição da atividade (Na^+, K^+)-ATPase nos últimos estágios de desenvolvimento estaria relacionada a estabilização do animal neste ambiente.

Mudanças nos parâmetros cinéticos da (Na^+, K^+)-ATPase em diferentes estágios de desenvolvimento podem estar relacionadas com diferentes níveis de expressão e localização da enzima durante a ontogênese. Animais que migram entre diferentes ambientes durante seu ciclo de vida, enfrentam diferentes condições que exigem adaptações fisiológicas que podem ser refletidas na localização, expressão e atividade da (Na^+, K^+)-ATPase.

A expressão da (Na^+, K^+)-ATPase durante a ontogênese do caranguejo *Eriocheir sinensis* foi estudada por Cieluch e colaboradores (2007). A imunolocalização da enzima durante o desenvolvimento do animal revelou que nos primeiros estágios larvais (zoea I-III) a enzima está localizada no branquiostegitos, no último estágio larval (zoea V) a expressão da enzima não foi detectada nos branquiostegitos ou nas brânquias posteriores reaparacendo no primeiro estágio juvenil (megalopoda) nas brânquias posteriores onde permanece até a fase adulta. Uma mudança na capacidade osmorregulatória do animal também foi determinada entre a fase zoea V e megalopoda

onde o animal que inicialmente possui capacidade moderada de hiper-isorregular sua hemolinfa torna-se um hiper-hiporregulador forte sendo também neste período que ocorre a transição do animal do ambiente marinho para o estuarino.

Os íons magnésio são essenciais para a atividade (Na^+, K^+)-ATPase, já que ligando-se a enzima levam a alterações conformacionais necessárias para torná-la ativa (Rossi et al., 1978; Glyn, 1985). Os íons magnésio apresentaram V=168,35±28,83 U mg^{-1}, valor muito próximo ao encontrado para animais juvenis II e adultos coletados de *M. amazonicum* (TABELA 8). Os valores de afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase para animais em estágio juvenil I e II foram iguais a 0,51 mmol L^{-1} enquanto os animais adultos apresentaram maior afinidade para os íons magnésio com valor de 0,27±0,05 mmol L^{-1}. Estes resultados indicam que nesta população a afinidade da enzima para o Mg^{2+} sofre alterações quando o animal passa do estágio juvenil para o estágio adulto. Sabendo-se que os estágios larvais ocorrem em água salobra e os estágios finais em água doce um aumento na afinidade da enzima pelos íons magnésio durante a ontogênese pode estar relacionado a transição do animal entre estes dois ambientes, indicando que no estágio adulto para trabalhar com a mesma velocidade específica a enzima precisa aumentar sua afinidade em aproximadamente duas vezes. Os animais em estágio adulto de populações selvagens apresentaram um $K_{0,5}$ de 0,79 mmol L^{-1} (Santos et al., 2007) indicando que a (Na^+, K^+)-ATPase branquial desta população apresenta menor afinidade para o Mg^{2+} em relação aos animais cultivados. Os valores de n_H obtidos indicam que a estimulação da enzima pelos íons magnésio ocorre através de uma cinética cooperativa em todos os estágios ontogenéticos estudados.

A afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase de camarões de água doce pelos íons sódio apresenta valores entre 5,0-6,0 mmol L^{-1} (Furriel et al., 2000; Wilder et al., 2000; Santos et al., 2007) similares aquele obtido para juvenis I de *M. amazonicum* de 4,92±0,84 mmol L^{-1}. Alguns crustáceos também apresentam valores próximos para $K_{0,5}$ como *Xiphopenaeus kroyeri*, *C. danae*, *C. ornatus* e *C. vittatus* (Masui et al., 2002; Leone et al., 2005a). Os parâmetros em relação a modulação da (Na^+, K^+)-ATPase branquial para os estágios de desenvolvimento juvenil I, II e adulto indicam que a enzima transporta íons sódio com afinidade e velocidade específica relativamente constantes durantes estes estágios ontogenéticos.

Estimulada por íons potássio a (Na^+, K^+)-ATPase apresentou K_M=1,3±0,22 mmol L^{-1} para *M. amazonicum* coletado em estágio juvenil I este valor é semelhante a afinidade de alguns crustáceos para os íons potássio, que varia de 0,8-2,4 mmol L^{-1}

(Masui et al., 2003; Garçon et al., 2007; Furriel et al., 2000; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007). A afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase de *M. amazonicum* em estagio juvenil II e adultos para os íons potássio foi de 2,35±0,01 mmol L^{-1} e 1,0±0,17 mmol L^{-1} respectivamente, estes valos próximos indicam que durante estes estágios ontogenéticos a afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase branquial de *M. amazonicum* pelos íons potássio não sofre alterações significativas. Comparando os valores de afinidade de *M. amazonicum* coletados e de populações selvagens observa-se uma diminuição da afinidade da enzima pelos íons potássio (Santos et al., 2007).

A (Na^+, K^+)-ATPase de crustáceos apresenta valores máximos de velocidade específica quando os íons potássio estão presentes em concentrações de 5-10 mmol L^{-1} (Furriel et al., 2000; Lucu & Towle, 2003; Masui et al., 2005; Garçon et al., 2007), para *M. amazonicum* em estágio juvenil I a saturação da enzima pelos íons potássio ocorreu com 20 mmol L^{-1} de potássio, este valor também foi observado para a (Na^+, K^+)-ATPase branquial de *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2007). Em comparação a enzima de outros crustáceos a (Na^+, K^+)-ATPase de animais juvenis e adultos desta população cultivada de *M. amazonicum* precisa de 2 vezes mais potássio para saturar seu sítio de ligação. Uma população de *M. amazonicum* estudada por Zanders e Rodriguez (1992) apresentou uma concentração de K^+ na hemolinfa de ≈10 mmol L^{-1} atingindo uma V=270 U mg^{-1} quando saturada pelo íon, está população cultivada apresenta V=171 U mg^{-1} ($[K^+]_{hemolinfa}$=10 mmol L^{-1}) com uma saturação de 20 mmol L^{-1}.

Segundo Santos e colaboradores (2007) invasores recentes, que estão em um processo de adaptação ao ambiente de água doce podem desenvolver mecanismos fisiológicos para reduzir o custo energético da captação de íons, algumas destas alterações podem ser refletidas nos parâmetros cinéticos da enzima como velocidade específica e afinidade.

Na presença de concentrações saturantes de íons amônio a atividade (Na^+, K^+)-ATPase de *M. amazonicum* (juvenil I) foi estimulada até valores de V 13% maiores do que quando a enzima foi estimulada por íons potássio, animais em estagio adulto apresentaram valores muito similares (12%), aumentos significativos também foram relatados para a (Na^+, K^+)-ATPase de outros crustáceos na presença de concentrações saturantes de íons amônio, com valores de 13% para *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2009) e 22% para animais recém capturados (Masui et al., 2002), 25% para *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), 33% para *C. ornatus* (Garçon et al., 2007) até valores de 42% para *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2007). Animais em estágio adulto de

populações selvagens de *M. amazonicum* apresentaram um aumento de 28% na V quando a (Na^+, K^+)-ATPase branquial foi estimulada por íons amônio em comparação com a estimulação por íons potássio.

Como mencionado anteriormente os íons amônio podem substituir os íons potássio, atuando como contra íon no transporte ativo de sódio, (Robison, 1970; Holliday, 1985; Wall, 1996; Wilkie, 1997; Wall et al., 1999; Masui et al., 2002; Weihrauch et al., 2002; Lucu & Towle, 2003; Furriel et al., 2004; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007) já que o raio iônico de ambos é muito similar (Knepper et al., 1989).

A velocidade específica da enzima estimulada por íons amônio apresenta aumentos significativos na velocidade específica, mas os valores de K_M calculados indicam uma afinidade menor da enzima pelos íons amônio em relação aos íons potássio já que os valores de afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase de *M. amazonicum* (juvenil I) para os íons amônio são muitos similares a afinidade pelos íons potássio, isto significa que mesmo com uma afinidade semelhante a velocidade em que a enzima transporta o íons amônio é 1,5 vezes maior em relação aos íons potássio. Para animais adultos desta população cultivada a enzima apresenta uma diminuição da afinidade para os íons amônio cerca de 5 vezes em relação aos íons potássio porém, a velocidade específica apresenta valores similares aos animais juvenis, ou seja, a enzima transporta NH_4^+ com maior velocidade mas com uma afinidade muito menor em relação ao K^+. Esta diminuição da afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons amônio em relação aos íons potássio foram relatadas para outros crustáceos, com o mesmo perfil no aumento dos valores de V (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2004; Garçon et al., 2007; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007; Masui et al., 2009).

Os valores de n_H obtidos para a estimulação da enzima pelos íons amônio em animais juvenis I apresentam comportamento michaeliano (K_M=1,0 mmol L^{-1}) resultados semelhantes foram obtidos para populações selvagens de *M. amazonicum*, *M. olfersii*, *X. kroyeri*, *C. vittatus e C. danae* (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2004; Leone et al., 2005b; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007), enquanto animais adultos apresentam comportamento cooperativo, também observado para *C. ornatus* (Garçon et al., 2007). Os valores de K_M para os íons amônio da (Na^+, K^+)-ATPase de animais adultos de populações cultivadas e populações selvagens de *M. amazonicum* apresentaram afinidades semelhantes para o íons amônio (Santos et al., 2007), com

TABELA 8. Parâmetros cinéticos para estimulação da (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons magnésio, sódio, potássio, amônio, ATP e inibição pela ouabaína nas frações microsomais de brânquias de *M. amazonicum* em três diferentes fases de desenvolvimento.

Efetor	V (U mg^{-1})			$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})			n_H		
	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto
ATP	189,52±32,45	194,4±9,6	181,84±77,83	0,14±0,02	0,18±0,01	0,11±0,01	1,0	1,0	1,0
Mg^{2+}	168,35±28,83	181,3±7,7	174,67±74,76	0,51±0,09	0,51±0,02	0,27±0,05	3,5	1,3	2,5
Na^+	165,48±28,33	186,8±9,3	175,5±75,12	4,92±0,84	4,06±0,2	4,73±0,81	1,3	1,3	1,9
K^+	178,6±30,58	196,5±10,1	171,21±73,28	1,3±0,22	2,35±0,1	1,0±0,17	1,0	1,0	1,2
NH_4^+	205,91±35,26	-	194,18±63,34	1,88±0,32	-	4,76±2,15	1,0	-	1,9

Inibidor	K_i(µmol L^{-1})		
	Juvenil I	Juvenil II*	Adulto
Ouabaína(K^+)	91,22±15,62	85±4,06	114,3±2,41
Ouabaína(NH_4^+)	53,98±9,24	-	57,95±17,04

*Masui et al (2007)

valores cerca de 2,5 vezes menores para animais cultivados em estágio juvenil I.

Os crustáceos aquáticos são amoniotélicos, excretando a amônia resultante de reações catabólicas através das brânquias por difusão e troca iônica. Altas concentrações de amônia (NH_3) levam a distúrbios e alterações em diversos processos biológicos vitais nos crustáceos, como alterações na regulação iônica e permeabilidade celular (Spaargaren, 1990; Young-Lai et al., 1991; Harris et al., 2001). Para manter a concentração de amônia em níveis toleráveis nos fluidos corporais, assegurando as funções celulares é necessário um sistema efetivo de excreção.

Estudos anteriores em relação ao mecanismo de excreção de amônia através do epitélio branquial de *Carcinus maenas* e outras espécies de caranguejos sugerem que a amônio presente na hemolinfa é transportado para o citosol por uma (Na^+, K^+)-ATPase (Weihrauch et al., 2004). Romano & Zheng (2010) realizaram um estudo da relação entre excreção de amônio, alterações da salinidade e atividade (Na^+, K^+)-ATPase, onde juvenis de *Portunus pelagicus* um carangueijo estuarino, foram submetidos a variações de salinidade e concentração de amônio do meio, revelando que a velocidade de excreção de amônio diminui com o aumento da salinidade, possivelmente relacionado ao aumento do influxo de amônio e, a atividade (Na^+, K^+)-ATPase aumenta em altas concentrações de amônio em baixas salinidades. Estudos realizados em *C. maenas*, *Eriocheir sinensis* e *Callinectes sapidus* relacionam a excreção de amônio a absorção de sódio, isto porque os íons amônio podem substituir os íons potássio ativando uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral do epitélio branquial destes animais.

A estimulação sinergística da atividade (Na^+, K^+)-ATPase por íons K^+ e NH_4^+ têm sido relatada para alguns crustáceos (Masui et al., 2002; Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007) e está relacionada exposição de um novo sítio para o amônio pela enzima, na presença de concentrações saturantes de potássio levando a valores maiores de atividade específica e aumento da afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase para os íons amônio.

A (Na^+, K^+)-ATPase branquial de *M. amazonicum* cultivados em estágio adulto apresentou estimulação sinergística na presença de K^+/NH_4^+. Para animais em estágio juvenil I na presença de K^+/NH_4^+ a enzima apresentou modulação da afinidade.

Populações cultivadas de *M. amazonicum* em estágio adulto e assim como encontrado para populações selvagens e o siri *C. danae* (Masui et al., 2002; Santos et al., 2007) apresenta uma conformação com uma afinidade menor para os íons K^+, quando é estimula da por íons K^+ em concentrações fixas de NH_4^+, sendo que um resultado oposto foi relatado para o siri *C. ornatus* (Garçon et al., 2007). Na presença de

concentrações crescentes de amônio a enzima transporta K^+ com menor afinidade mais com valores de velocidade até 30% maiores. A diminuição da afinidade pode ser atribuída ao deslocamento dos íons K^+ de seu sítio pelos íons NH_4^+. Na presença de NH_4^+ a enzima de animais juvenis transporta íons potássio com menor afinidade, mas com a mesma velocidade específica observada na presença do K^+ sozinho.

Um aumento nos valores de $K_{0,5}$ para os íons NH_4^+ na presença de concentrações fixas de íons K^+, pode estar relacionada com uma mudança conformacional da enzima, que leva a exposição de um novo sítio para o NH_4^+, já que os valores de n_H indicam a presença de mais de uma sítio para este íon nestas condições. Aumentos significativos da atividade específica da enzima na presença de NH_4^+ podem estar relacionados a esse novo sítio exposto pela (Na^+, K^+)-ATPase.

Em animais no estágio juvenil I a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons K^+ na presença de íons NH_4^+, indicam que o amônio modula a afinidade da enzima pelos íons K^+ mas sem incrementos na velocidade específica, diferente do que foi observado para animais adultos e de populações selvagens de *M. amazonicum,, C. danae* e *C. ornatus* (Masui et al., 2002; Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007). O mesmo efeito também foi observado para a modulação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pelos íons NH_4^+ na presença de íons K^+.

Estes resultados indicam que a modulação da enzima pelo amônio nestes dois estágios de desenvolvimento ocorre através de mecanismos diferentes. Enquanto os animais adultos apresentam estimulação sinergística indicando a presença de um segundo sítio para o amônio, animais juvenis apresentam apenas modulação da afinidade.

A modulação sinergística da enzima pelos íons potássio e amônio pode apresentar grande importância em relação a excreção de amônio e captura de íons sódio. Como relatado anteriormente a amônia é muito tóxica para o sistema biológico, e um mecanismo eficiente de excreção que permita um controle de sua concentração é muito importante, desta forma a (Na^+, K^+)-ATPase atuaria como um importante componente de um sistema de excreção onde a amônia na forma de seu íon amônio seria transportada para o interior das células epiteliais através de uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral e o Na^+ para a hemolinfa. A água doce, ambiente onde vivem os adultos e juvenis desta população cultivada de *M. amazonicum* apresenta uma baixíssima concentração de íons, logo um mecanismo que realize a excreção de NH_4^+ a favor de seu gradiente de concentração aliado a captura de íons sódio de forma

ativa e de um meio externo com baixas concentrações, pode estabelecer um mecanismo efetivo de excreção para estes animais, com baixo custo energético.

A atividade (Na^+, K^+)-ATPase de animais em estágio adultos de *M. amazonicum* foi inibida pela ouabaína em concentrações saturantes de magnésio, sódio e potássio através de uma curva monofásica com K_I de 114,3±2,41 µmol L^{-1}, sendo que animais em estágio juvenil I e juvenil II apresentaram valores semelhantes de afinidade pelo inibidor ouabaína com K_I de 91,22±15,62 µmol L^{-1} e 85±4,06 µmol L^{-1} respectivamente. Em concentrações saturantes de íons potássio a afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase de crustáceos para o inibidor ouabaína apresenta valores entre 53,8-147,2 µmol L^{-1} (Furriel et al., 2004; Leone et al., 2005; Gonçalves et al., 2007; Santos et al., 2007). Em animais adultos a atividade ATPase total foi inibida 61,8% com 3 mmol L^{-1} de ouabaína, indicando uma atividade residual de cerca de 46 U mg^{-1}, enquanto animais juvenis apresentaram uma inibição de 86,9% com uma atividade residual de 26 U mg^{-1}, um perfil semelhante de inibição pela ouabaína na presença de potássio saturante foi observado para populações selvagens de *M. amazonicum* com inibição de 78,9% da atividade total por 3 mmol L^{-1} de ouabaína (Santos et al., 2007), 78,7% para *C. vittatus* com uma atividade residual de 40 U mg^{-1} (Gonçalves et al., 2007) e 86,5% para *C. ornatus* (Garçon et al., 2007).

Os valores de K_I para inibição da atividade (Na^+, K^+)-ATPase de animais em estágio juvenil I de *M. amazonicum* na presença de concentrações saturantes de íons magnésio, sódio e amônio apresentou valores cerca de 1,7 vezes menor do que na presença de íons potássio, indicando que na presença de amônio a enzima apresenta uma conformação com maior afinidade para o inibidor ouabaína. Para animais adultos a (Na^+, K^+)-ATPase apresentou um aumento de 2 vezes na afinidade do inibidor ouabaína. Na presença de íons amônio a ouabaína inibiu cerca de 80% da atividade ATPase total em animais juvenis através de uma curva monofásica, apresentando K_I de 53,98±9,24 µmol L^{-1} e uma atividade insensível a ouabaína de 51,0 U mg^{-1}, enquanto animais adultos a atividade (Na^+, K^+)-ATPase foi responsável por uma percentagem menor da atividade ATPase (73%) sendo que a atividade insensível apresentou 11 U mg^{-1} a menos em relação aos juvenis. Na presença de íons potássio e amônio o inibidor ouabaína inibiu 80% da atividade (Na^+, K^+)-ATPase em animais juvenis através de uma curva monofásica com um K_I de 72,79 µmol L^{-1}. Um aumento da afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase pelo inibidor ouabaína na presença de íons amônio e potássio foi relatado para outros crustáceos como populações selvagens de *M. amazonicum*, *M. olfersii* e *C.*

ornatus (Furriel et al., 2004; Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007). Este aumento da afinidade da (Na^+, K^+)-ATPase pelo inibidor ouabaína pode ser atribuído a mudanças conformacionais da enzima levando a uma estrutura altamente sensível ao inibidor na presença de íons potássio e amônio (Fedosova et al., 1998; Furriel et al., 2004).

A constante de afinidade aparente da (Na^+, K^+)-ATPase para o inibidor ortovanadato foi 0,145±0,01 µmol L^{-1} para animais adultos e 0,21±0,04 µmol L^{-1} para animais juvenis. Para ambos os estágios a inibição máxima ocorreu em 0,03 mmo L^{-1} de ortovanadato com aproximadamente 94% para adultos e 72% para juvenis. Valores semelhantes para foram relatados para *C. ornatus* K_i=0,65±0,03 µmol L^{-1}(Garçon et al., 2007) embora valores até 75 vezes maiores foram relatados para *C. danae* (Masui et al., 2002).

Para estudar a natureza das outras enzimas presentes na fração microsomal de tecido branquial de *M. amazonicum* o efeito de vários inibidores sobre a atividade ATPase foi estudado. A atividade insensível a ouabaína foi de 21% para animais adultos e 37,9% para juvenis I. Uma V-ATPase com atividade de 13,02 U mg^{-1} foi identificada em microsomas de animais adultos enquanto em juvenis está enzima responde por 24,14% da atividade total com um valor de 53,5 Umg^{-1}. A inibição pela tapsigargina indica que uma Ca^{2+}-ATPase é responsável por cerca de 6,6% da atividade ATPase na fração microsomal de animais adultos e 20,9% em animais juvenis. Os microsmas de animais juvenis apresentam maior proporção de outras enzimas se comparado aos animais adultos embora, a atividade (Na^+, K^+)-ATPase foi maior para as frações microsomais de animais adultos, o que pode indicar que nos animais juvenis outras enzimas presentes na fração microsomal tem um papel importante na osmorregulação atuando juntamente com a (Na^+, K^+)-ATPase, um aumento da atividade da enzima (Na^+, K^+)-ATPase na fase adulta poderia levar a uma diminuição na atividade destas outras enzimas como um mecanismo fisiológico que auxiliaria o animal a enfrentar as características osmóticas dos diferentes ambientes pelos quais ele passa durante seu ciclo de vida.

6.0 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a (Na^+, K^+)-ATPase do camarão *M. amazonicum* apresenta características cinéticas muito semelhantes a outros camarões de água doce do gênero Macrobrachium que são invasores recentes da água doce, através de uma análise comparativa entre *M. amazonicum, M. olfersi e M. rosembergui*.

A modulação da enzima de animais adultos apresenta um perfil cinético diferente dos animais juvenis, na presença de íons K^+/NH_4^+, indicando que durante o desenvolvimento do animal podem ocorrer mudanças conformacionais responsáveis pelos diferentes comportamentos observados. Estas observações podem estar relacionadas com a excreção de amônio pelo animal, já que alguns modelos indicam que uma (Na^+, K^+)-ATPase localizada na membrana lateral do epitélio branquial participa no processo de excreção.

Nestes animais a participação da (Na^+, K^+)-ATPase no processo de excreção pode estar relacionada a captura de sódio de meios diluídos aliada a excreção de amônio a favor de seu gradiente de concentração, como uma forma de diminuir o custo energético.

Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos osmorregulatórios em animais juvenis e adultos do camarão de água doce *M. amazonicum*, em relação a ontogenia da osmorregulação e a excreção de amônio e a importância da (Na^+, K^+)-ATPase neste contexto.

BIBLIOGRAFIA

Anger, K. **(**2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issues. 14 **:** I-XII, 1-420.

Apell, H. -J. (2004) How do P-Type ATPases transport ions? Bioeletrochemistry 63:149-156.

Augusto, A.; Greene, L. J.; Laure, H. J. & McNamara, J. C. (2007) The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Crustacea, Decapoda). J. Crust. Biol. 27: 626–634.

Augusto, A.; Pinheiro, A. S.; Greene, L. J.; Laure, H. J. & McNamara, J. C. (2009) Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. Aquat. Biol. 7: 113–122.

Baxterlowe, L. A.; Jian, Z. G.; Bergstrom, E. E. & Hokin, L. E. (1989) Molecular-cloning of the NA,K-ATPase alpha-subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms. FEBS Letters. 257(1): 181-187.

Becker, S.; Schneider, H. & Scheiner-Bobis, G. (2004) The Highly conserved extracellular peptide, DSYG (893 896), is a critical structure for sodium pump function. Europ. J. Biochem 271: (19) 3821-3831.

Belda, F. F.; Fortea, M. I. & Soler, F. (2001) Testing the Versatility of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase Reaction Cycle When p-Nitrophenyl Phosphate Is the Substrate. The Journal of Biological Chemistry. 276 (11): 7998–8004.

Belli, N. M.; Faleiros, R. O.; Firmino, K. C. S.; Masui, D. C.; Leone, F. A.; McNamara, J. C. & Furriel, R. P. M. (2009) Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 152: 431–439.

Belogus, T.; Haviv, H.; Karlish, S. J. D. (2009) Neutralization of the Charge on Asp(369) of Na^{+},K^{+}-ATPase Triggers E-1 <-> E-2 Conformational Changes. Journal of Biological Chemistry. 248 (45): 31038-31051.

Blanco, G. (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. Seminars in Nephrology. 25 **(**5)**:** 292-303**.**

Blanco, G. & Mercer, R.W. (1998) Isozymes of the Na,K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. 275: F633–F650.

Bonnafous, J. C.; Dornand, J. & Mani, J. C. (1982) Alamethicin or detergent permeabilization of the cell-membrane as a tool for adenylate-cyclase determination - application to the study of hormone responsiveness in lymphocytes. Biochimica et Biophysica Acta**.** 720: **(**3) 235-241.

Boxenbaum, N.; Daly, S. E.; Javaid, Z. Z.; Lane, L. K. & Blostein, R. (1998) Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the (Na^+, K^+)-ATPase α-sibunit. J. Biol. Chem. 273: 23086-23092.

Bouaricha, N.; Thuet, P.; Charmantier, G.; Charmantierdaures, M. & Trilles, Jp. (1991) Na^+, K^+-ATPase and Carbonic-Anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (decapoda, penaeidea). Comparative Biochemistry and Physiology Physiology A. 100(2): 433-437.

Charmantier, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Invert. Reprod. Devl. 33: 177–190.

Charmantier, G.; Haond C.; Lignot, J. H. & Charmantier-Daures, M. (2001) Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: A review in homarid lobsters. Journal of Experimental Biology**.** 204 (5): 967-977.

Cheng, W.; Liu, C. H.; Cheng, C. H. & Chen, J. C. (2003) Osmolality and ion balance in giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* subjected to changes in salinity: role of sex. Aquaculture Research**.** 34(7)**:** 555-560**.**

Cieluch, U.; Anger, K.; Charmantier-Daures, M. & Charmantier, G. (2007) Osmoregulation and immunolocalization of Na^+/K^+-ATPase during the ontogeny of the mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea). Marine Ecology-Progress Series**.** 329**:** 169-178.

Corotto, F. S. & Holliday, C. W. (1996) Branchial (Na^+,K^+)-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). Comp. Biochem. Physiol. A 113: 361–368.

Cortas, N.; Arnaout, M.; Salon, J. & Edelman, I.S. (1989) Isoforms of NaK-ATPase in Artemia salina: II Tissue distribution and kinetic characterization. J. Membr. Biol. 108:187-195.

Cortas, N. & Edelman, I. S. (1988) Isolation of two isoforms of NaK-ATPase from *Artemia salina*: kinetic characterization. In "The NaK-Pump Part A: Mol Aspects" pages 287-292. Alan R. Liss Inc.

Crambert, G.; Hasler, U.; Beggah, A. T.; Yu, C. L.; Modyanov, N. N.; Horisberger, J. D.; Lelievre, L. & Geering, K. (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. J Biol Chem 275: 1976-1986.

Crambert, G.; Schaer, D.; Roy, S. & Geering, K. (2004) New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms. Mol. Pharmacol 65: 335-341.

Croyle, M. L.; Woo, A. L. & Lingrel, J. B. (1997) Extensive random mutagenesis analysis of the (Na^+, K^+)-ATPase a subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity. Implications for ouabain binding. Eur J Biochem. 248: 488-495.

Daly, S. E.; Blostein, R. & Lane, L. K. (1997) Functional consequences of a posttransfection mutation in the H2-H3 cytoplasmic loop of the alpha subunit of Na,K-ATPase. Journal of Biological Chemistry. 272: (10) 6341-6347.

Dempski, R. E.; Lustig, J.; Friedrich, T. & Bamberg, E. (2008) Structural Arrangement and Conformational Dynamics of the γ Subunit of the Na^+/K^+-ATPase. Biochemistry. 47: 257-266.

Dostanic-Larson, I.; Lorenz, J. N.; Van Huysse, J. W.; Neumann, J. C.; Moseley, A. E. & Lingrel, J. B. (2006) Physiological role of the alpha(1)- and alpha(2)-isoforms of the Na^+-K^+-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. 290(3): R524-R528.

Durr, K. L.; Tavraz, N. N.; Dempski, R. E.; Bamberg, E. & Friedrich, T. (2009) Functional Significance of E_2 State Stabilization by Specific α/β-Subunit Interactions of Na,K- and H,K-ATPase. The Journal of Biological Chemistry. 284 (6): 3842–3854.

Eguchi, H.; Takeda, K; Schwarz, W.; Shirahata, A. & Kawamura, M (2005) Involvement in K^+ access of Leu^{318} at the extracellular domain flanking M3 and M4 of the Na^+,K^+-ATPase subunit. Biochemical and Biophysical Research communications 330: 611-614.

Emery, A. M.; Billingsley, P. F.; Ready, P. D. & Djamgoz, M. B. A. (1998) Insect (Na^+, K^+)-ATPase. J. Insect Physiol. 44: 197-209.

Faleiros, R. O. & McNamara, J. C. (2007) Osmoregulatorio capability and gill ultrastructure in the diadromous freshwater shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). Comp. Bio. Physiol. A 148: S122-S122.

Faller, L. D. (2008) Mechanistic studies of sodium pump. Archives of Biochemistry and Biophysics. 476:12–21.

Felder, J. M.; Felder, D. L. & Hand, S. C. (1986) Ontogeny of osmoregulation in the estuarine ghost shrimp *Callianassa Jamaicense* var Louisianensis Schmitt (Decapoda, Thalassinidea) Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 99**(**2)**:** 91-105.

Firmino, K. C. S. (2009) Processos osmorregulatórios no caranguejo *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae), um antigo invasor da água doce: estudo das atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase brânquiais. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão. Dissertação de Mestrado. 115 p.

Fedosova, N. U.; Cornelius, F. & Klodos, I. (1998) E_2P phosphoforms of (Na^+, K^+)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and P_i by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. Biochemistry 37: 13634-13642.

Foster, C. (2006) Crustáceos osmoconformadores possuem maior capacidade de regular o volume de suas células do que crustáceos osmorreguladores? Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 62p.

Freire,C. A. & McNamara, J. C. (1995) Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium Olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. J Crustacean Biol 15: 103-116.

Freire, C. A.; Onken, H. & McNamara, J.C. (2008) A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Comp. Biochem. Physiol. A 151: 272–304.

Furriel, R. P. M.; Masui, D. C.; McNamara, J. C. & Leone, F. A. (2004) Modulation of gill (Na^+,K^+)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. J. Exp. Zool. A 301: 63–74.

Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C. & Leone, F. A. (2000) Characterization of (Na^+, K^+)-ATPase in gill microsomes from the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. Comp. Biochem. Physiol. B 126: 303–315.

Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C. & Leone, F. A. (2001) Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na^+,K^+)-ATPase activity in hyperegulating Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. A 130: 665–676.

Gache, C.; Rossi, B. & Lazdunski, M. (1977) Mechanistic Analysis of the (Na^+K^+)-ATPase using new pseudosubstrates. Biochemistry 16: 2957-2965.

GarciaSaez, A.; Perona, R. & Sastre L. **(**1997) Polymorphism and structure of the gene coding for the alpha 1 subunit of the *Artemia franciscana*. Biochemical Journal**.** 321(2)**:** 509-518.

Garçon, D. P.; Masui, D. C.; Mantelatto, F. L. M.; Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C. & Leone, F. A. (2009) Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na^+, K^+)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 154: 44–55.

Garçon, D. P.; Masui, D. C.; Mantelatto, F. L. M.; McNamara, J. C.; Furriel, R. P. M. & Leone, F. A. (2007) K^+ and NH_4^+ modulate gill (Na^+, K^+)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: fine tuning of ammonia excretion. Comp. Biochem. Physiol. A 147: 145–155.

Garçon, D. P. (2007) Caracterização cinética da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustácea, Portunidae). Faculdade de Filosofia Ciência de Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado. 90 p.

Garty H. & Karlish, S. J.D. (2006) Role of FXYD Proteins in Ion Transport. Annu. Rev. Physiol. 68: 431–59.

Gatto, C.; Arnett, K. L. & Milanick, M. A. (2007) Divalent cation interactions with Na,K-ATPase cytoplasmic cation sites: Implications for the para-nitrophenyl phosphatase reaction mechanism. Journal of Membrane Biology. 216 (1): 49-59.

Geering, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. J Bioenerg. Biomemb. 33: 425-438.

Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 17: 526–532.

Glynn, I. M. (1985) The Na^+,K^+-transporting adenosine triphosphatase. In: Martonosi, A.N. (Ed.), The Enzymes of Biological Membranes, vol. 3. Plenun Press, New York, 35–114.

Gonçalves, R. R.; Masui, D. C.; McNamara, J. C.; Mantelatto, F. L. M.; Garçon, D. P.; Furriel, R. P. M. & Leone, F. A. (2007) A kinetic study of the gill (Na^+, K^+)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. Comp. Biochem. Physiol. A 145: 346–356.

Greenaway, P. (1985) Calcium balance and molting in the Crustacea. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 60**(**3**):** 425-454**.**

Harris, R. R. & Bayliss, D. (1988) Gill (Na^+, K^+)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na^+ regulation. Comp. Biochem. Physiol. A 90: 303–308.

Harris, R. R.; Coley, S.; Collins, S. & McCabe, R. (2001) Ammonia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). J. Comp. Physiol. B 171: 681-693.

Hasler, U.; Crambert, G.; Horisberger, J. D. & Geering, K (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the beta subunit revelaed by tryptophan scanning. J. Biol. Chem 276: (19)16356-16364.

Henry, R. P.; Garrelts, E. E.; McCarty, M. M. & Towle, D. W. (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and (Na^+,K^+)-ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. J. Exp. Zool 292: 595–603.

Holliday, C.W. (1985) Salinity-induced changes in gill (Na^+,K^+)-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. J. Exp. Zool 233: 199–208.

Holthuis, L. B. (1952) A general revision of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas II. The subfamily Palaemonidae. Occ Pap. Allan Hancock Fdn 12: 1-396.

Horisberger, J. D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. Physiology 19: 377–388.

Huong, D. T. T.; Jayasankar, V.; Jasmani, S.; Saido-Sakanaka, H.; Wigginton, A. J. & Wilder, M. N. (2004) (Na^+,K^+)-ATPase activity during larval development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of salinity on survival rates. Fisheries science 70: 518–520.

Ituarte, R. B.; Mañanes, A. A. L.; Spivak, E. D. & Anger, K. (2008) Activity of Na^+, K^+-ATPase in a 'freshwater shrimp' *Palaemonetes argentinus* (Caridea, Palaemonidae): ontogenetic and salinity-induced changes. Aquatic Biology. 3: 283–290.

Jalihal, D. R.; Sankolli, K. N. & Shenoy, S. (1993) Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus Macrobrachium Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana. 65: 365-376.

Jayasundara, N.; Towle, D.W.; Weihrauch, D. & Spanings-Pierrot, C. (2007) Gill-specific transcriptional regulation of Na^+/K^+-ATPase α-subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. J. Exp. Biol. 210: 2070–2081.

Jensen, A. M.; Sorensen, T. L.; Olesen, C.; Moller, J. V. & Nissen, P. (2006) Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. EMBO J. 25: 2305–2314.

Jorgensen, P. L.; Hakansson, K. O. & Karlish, S. J. D. (2003) Structure ans mechanism of: Functional sites and their interactions. Ann. Rev. Physiol 65: 817-849.

Jorgensen, P. L. & Pedersen, P. A. (2001) Structure–function relationships of Na^+,K^+, ATP or Mg^{2+} C binding and energy transduction in Na,K-ATPase. Biochim. Biophys. Acta. 1505: 57–74.

Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. Annu. Rev. Biochem 71: 511–53.
Kir, M.; Kumlu, M. & Eroldogan, O.T. (2004) Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. Aquaculture 241: 479–489.

Kirschner, L. B. (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. J. Exp. Biol. 207: 1439–1452.

Knepper, M. A.; Packer, R. & Good, D. W. (1989) Ammonium transport in the kidney. Physiol. Rev 69: 179-249.

Khodabandeh, S.; Kutnik, M.; Aujoulat, F.; Charmantier, G. & Charmantier-Daures, M. (2005) Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na^+, K^+-ATPase. Cell Tissue Res. 319: 167–174.

Leone, F. A.; Baranauskas, J. A.; Furriel, R. P. M. & Borin, I. A. (2005a) SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. Biochem. Mol. Bio Educ 33: 399-403.

Leone, F. A.; Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C.; Mantelatto, F. L. M.; Masui, D. C.; Rezende, L. A.; Gonçalves, R. R. & Garçon, D. P. (2005b) (Na^+,K^+)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. Comp. Biochem. Physiol 11: 1-15.

Lima, A. G.; McNamara, J. C. & Terra, W. R. (1997) Regulation of hemolymph osmolytes and gill (Na^+,K^+)-ATPase activities during acclimation to saline media in the

freshwater shrimp *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann 1836) (Decapoda Palaemonidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 215, 81-91.

Lin, Y. C. & Chen, J. C. (2001) Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 259: 109–119.

Lingrel J. B. & Kuntzweiler T. (1994) (Na^+, K^+)-ATPase. J. Biol. Chem. 269:19659–19662.

Lingrel, J.; Moseley, A.; Dostanic, I.; Cougnon, M.; He, S. W.; James, P.; Woo, A.; O'Connor, K. & Neumann, J. (2003) Functional roles of the alpha isoforms of the Na,K-ATPase. Ann NY Acad Sci 986: 354-359.

Lovett, D. L.; Verzi, M. P.; Clifford, P. D. & Borst, D. W. (2001) Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas.* Comp. Biochem. Physiol A 128: (2) 299-306.

Lovett, D. L.; Colella, T.; Cannon, A. C.; Lee, H.; Evangelisto, A.; Muller, E.M. & Towle, D.W. (2006) Effect of Salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. Biol. Bull. 210: 132–139.

Lucu, C.; Devescovi, M.; Skaramuca, B. & Kozul, V. (2000) Gill (Na^+, K^+)-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers - Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 246: 163-178.

Lucu, C. & Towle, D. W. (2003) (Na^+,K^+)-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp. Biochem. Physiol. A135: 195-214.

Lutsenko, S. & Kaplan, J. H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the NaK-ATPase beta-subunit in cation occlusion. Biochemistry 32: 6737-43.

Macías, M. T.; Palmero, I. & Sastre, L (1991) Of a cDNA encoding na *Artemia franciscana* α-subunit. Gene 105: 197-204.

Maciel, C. R. & Valenti, W. C. (2009) Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum:* A Review. Nauplius 17(2): 61-79.

Magalhães, C. (1985) The larval development of palaemonids from amazon region reared in the laboratory. 1. *Macrobrachium amazonicum* (Heller,1986) (Crustacea, Decapoda). Amazoniana-Limnologia et oecologia regionalis systemae fluminis amazonas. 9: (2) 247-274.

Mantel, L. H. & Farmer, L. L. (1983) Osmotic and ionic regulation. In: LH Mantel (Ed.) and DE Bliss (Ed.) The biology of crustacea Vol. 5 Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press New York New York. p. 53-161.

Martin, D. W. (2005) Structure-Function. Relationships in the Na^+,K^+-Pump. Seminars in nephrology 198: 282-291.

Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; Mantelatto, F. L. M.; McNamara, J.C. & Leone, F. A. (2003) Gill (Na^+,K^+)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K^+-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. Comp. Biochem. Physiol. B 134, 631–640.

Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C.; Mantelatto, F. L. M. & Leone, F. A. (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na^+,K^+)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for the regulation of ammonia excretion. Comp. Biochem. Physiol. C 132, 471–482.

Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; Silva, E. C.; Mantelatto, F. L. M.; McNamara, J. C.; Barrabin, H.; Scofano, H. M.; Fontes, C. F. L. & Leone, F. A. (2005) Gill microsomal (Na^+,K^+)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: interactions at cationic sites. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2521–2535.

Masui, D. C.; Mantelatto, F. L. M.; McNamara, J. C.; Furriel, R. P. M.; & Leone, F. A. (2009) (Na^+, K^+)-ATPase activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: Novel perspectives on ammonia excretion. Comp. Biochem. and Physiol. A. 153 141–148.

Masui, D. C.; Valenti, W.C.; Furriel, R. P. M.; Leone, F. A. (2007) (Na^+,K^+)-ATPase in the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): Characterization of the gill enzyme in juveniles. Comp. Bio. Physiol. A 148: S89-S90.

McNamara, J. C.; Salomao, L. C. & Ribeiro, E. A. (1990) The effect of eyestalk ablation on hemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the fresh-water shrimp Macrobrachium Olfersii (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). Hydrobiologia 199(3)**:** 193-199.

Meyran, J. C. & Graf, F. (1986) Ultra-histochemical localization of (Na^+,K^+)-ATPase, Ca^{2+}-ATPase and alkaline phosphatase activity in a calcium-transporting epithelium of a crustacean during moulting. Histochemistry 85, 313–320.

Mijatovic, T.; Quaquebeke, E. V.; Delest, B.; Debeir, O.; Darro, F. & Kiss, R. (2007) Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochimica et Biophysica Acta 1776: 32–57.

Mobasheri, A.; Avila, J.; Cozar-Castellano, I.; Brownleader, M. D.; Trevan, M.; Francis, M. J. O.; Lamb, J. F. & Martin-Vasallo, P. (2000) Na^+, K^+-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci. Reports. 20: 51-91.

Moraes-Riodades, P. M. C. & Valenti, W. C. (2004) Morphotypes in male Amazon River Prawns, *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture 236: 297-307.

Moraes-Valenti, P. M. C. & Valenti, W. C. (2007) Effect of intensification on grow out of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*. Journal of The World Aquaculture Society. 38 (4): 516-526.

Moreira, G. S.; Mcnamara, J. C. & Moreira, P. S. (1986) The effect of salinity on the upper thermal limits of survival and metamorphosis during larval development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (decapoda, palaemonidae). Crustaceana. 50: 231-238.

Moreira, L. C. & Collart, O. O. (1993) Diel vertical migration of the prawn larvae of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) in a central amazonian floodplain lake, careiro island, Brazil. Amazoniana 12: 399-413.

Morth, J. P.; Pedersen, B. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Sørensen, T. L.-M.; Petersen, J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B. & Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump Nature. 450: 1043-1050.

Nesher, M.; Shpolansky, U.; Rosen, H. & Lichtstein, D. (2007) The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. Life Sciences**.** 80 (23)**:** 2093-2107**.**

Ogawaa, H.; Shinodaa, T.; Cornelius,F. & Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+,K^+-ATPase) with bound potassium and ouabain. Proc. Natl. Acad. Sci. 166 (33): 13742–13747.

Olesen, C., Sorensen, T. L., Nielsen, R. C., Moller, J. V. & Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. Science 306: 2251–2255.

Okamura, H.; Yasuhara J. C.; Fambrough D. M. & Takeyasu, K. (2003) P-type ATPases in Caenorhabditis and Drosophila: Implications for evolution of the P-type ATPase subunit families with special reference to the Na,K-ATPase and H,K-ATPase subgroup. Journal of Membrane Biology. 191(1): 13-24.

Onken, H. & McNamara, J. C. (2002) Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. Journal of Experimental Biology. 205 (2): 167-175.

Pagliarani, A.; Bandiera, P.; Ventrella, V.; Trombetti, F.; Manuzzi, M. P.; Pirini, M. & Borgatti, A. R. (2008) Response of Na^+-dependent ATPase Activities to the Contaminant Ammonia Nitrogen in *Tapes philippinarum*: Possible ATPase Involvement in Ammonium Transport. Arch Environ Contam Toxicol. 55 (1): 49-56.

Paula, S.; Tabet, M. R. & Ball, W. J. (2005) Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: Three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E-2-P-i form of the enzyme versus activity inhibition. Biochemistry**.** 44 **(**2**):** 498-510.

Péqueux, A. (1995) Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. 15: 1-60.

Qiu, L. Y.; Swarts, H. G. P.; Tonk, E. C. M., Willems, P. H. G. M.; Koenderink, J. B. & De Pont, J. J. H. H. M. (2006) Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids Conversion of the low affinity ouabain-binding site of non-gastric H,K-ATPase into a

high affinity binding site by substitution of only five amino acids. Journal of Biological Chemistry**.** 281**(**19)**:** 13533-13539.

Qiu, L. Y.; Krieger, E.; Schaftenaar, G.; Swarts, H. G. P.; Willems, P. H. G. M.; De Pont, J. J. H. H. M. & Koenderink, J. B. (2005) Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids. Journal of Biological Chemistry. 280(37): 32349-32355.

Read, S. M. & Northcode, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-G dye-binding assay for protein. Analytical Biochem. 116: 53-64.

Rice, W. J.; Young, H. S.; Martin, D. W.; Sachs, J. R. & Stokes, D. L. (2001)Structure of the Na^+,K^+-ATPase at 11-A° resolution: comparison with Ca^{2+}-ATPase in E_1 and E_2 states. Biophys. J. 80: 2187–2197.

Robison, J. D. (1970) Interactions between monovalent cations and the (Na^+,K^+)-dependent adenosine triphosphatase. Arch Biochim Biophys 139: 17-27.

Romano, N. & Zeng, C. (2010) Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. Comp. Biochem. Physiol C. 151: 222-228.

Rossi, B.; Gache, C. & Lazdunski, M. (1978) Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na^+,K^+)-activated adenosinetriphosphatase. Eur. J. Biochem. 85: 561-570.

Saéz, A. G.; Lozano, E. & Riverón, A. Z. (2009) Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. Genetica. 136: 479–490.

Sampaio, C. M. S.; Silva, R. R.; Santos, J. A. & Sales S. P. (2007) Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). Braz. J. Biol., 67(3): 551-559.

Santos, L. C. F.; Belli, N. M.; Augusto, A.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C. & Furriel, R.P. M. (2007) Gill (Na^+,K^+)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and α-subunit expression. Comp. Biochem. Physiol. A 148, 178–188.

Segall, L.; Daly, S. E.; Boxenbaum, N.; Lane, L. K. & Blostein, R. (2000) Distinct catalytic properties of the α1, α2 and α3 isoforms of the rat (Na^+,K^+)-ATPase. Biophys J. 78: (1) 456.

Sorensen, T. L.; Moller, J. V. & Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. Science 304: 1672–1675.

Spaargaren, D. H. (1990) The effect of environmental ammonia concentrations on the ion-exchange of shore crabs, *Carcinus maenas* (L.).Comp. Biochem. Physiol. C 97: 87-91.

Strugatsky, D.; Gottschalk, K. E.; Goldshleger, R. & Karlish, S. J. D. (2005) D443 of the N Domain of Na^+,K^+-ATPase Interacts with the ATP-Mg^{2+} Complex, Possibly via a Second Mg^{2+} Ion. American Chemical Society. 44(49): 15961- 15969.

Taylor, H. H. & Seneviratna, D. (2005) Ontogeny of salinity tolerance and hyper-osmoregulation by embryos of the intertidal crabs *Hemigrapsus edwardsii* and *Hemigrapsus crenulatus* (Decapoda, Grapsidae): Survival of acute hyposaline exposure. Comp. Biochem. Physiol. A. 140 **(**4)**:** 495-505.

Teriete, P.; Franzin,C. M.; Choi, J. & Marassi, F. M. (2007) Structure of the Na,K-ATPase Regulatory Protein FXYD1 in Micelles. Biochemistry. 46: 6774-6783.

Toustrup-Jensen, M. & Vilsen, B. (2005) Importance of Gly(363) of the Na^+,K^+-ATPase for catalytic function and E-2-E-1 conformational changes. Journal of General Physiology. 126: (1) 33A-34A.

Toustrup-Jensen, M. S.; Holm, R.; Einholm, A. P.; Schack, V. R.; Morth, J. P.; Nissen, P.; Andersen, J. P.; Vilsen, B. (2009) The C Terminus of Na^+,K^+-ATPase controls Na^+ affinity on Both Sides of the Membrane through Arg^{935}. The Journal of Biological Chemistry. 284: (28) 18715–18725.

Towle, D. W. & Weihrauch, D. (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. Am. Zoologist 41: 770-780.

Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. Nature 430: 529–535.

Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. & Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. Nature 405: 647–655.

Toyoshima, C.; Nomura, H. & Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. Nature. 432: 361–368.

Toyoshima, C.; Norimatsu, Y.; Iwasawa, S.; Tsuda, T. & Ogawa, H. (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104 **(**50)**:** 19831-19836.

Thuet, P.; Charmantier-Daures, M. & Charmantier, G. (1988) Relation entre osmorégulation et activités d'ATPase Na^+ -K^+ et d'anhydrase carbonique chez larves et postlarves de *Homarus gammarus* (L.) (Crustacea : Decapoda) . J. *Exp. Mar.* Biol. *Ecol.* 115: 249-261.

Wall, S. M. (1996) NH_4^+ augments net acid secretion by ouabain-sensitive mechanism in isolated perfused inner medullary collecting ducts. Am. J. Physiol-Renal 39F: 432-439.

Wall, S. M.; Davis, B. S.; Hassell, K. A.; Mehta, P. & Park, S. J. (1999) In rat tIMCD, NH_4^+ uptake by (Na^+,K^+)-ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. Am. J. Physiol 277: F866-F874.

Wang, W. N.; Wang, A. L.; Zhang, Y. J.; Li, Zh. H.; Wang, J. X. & Sun, R. Y. (2004). Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture. 232: 679–686.

Weihrauch, D.; Ziegler, A.; Siebers, D. & Towle, D.W. (2002) Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of (Na^+,K^+)-ATPase, V-type H^+-ATPase and functional microtubules. J. Exp. Biol. 205, 2765–2775.
Weihrauch, D.; Morris, S. & Towle, D. W. (2004) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. J. Exp. Biol. 207: 4491-4504.

Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Luck-Kopp, S. & Siebers, D. (1999) Potencial of active excretion of ammonia in three different haline species crabs. J. Comp. Physiol. B 169: 25-37.

Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Riestenpatt, S. & Siebers, D. (1998). Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. J. Comp. Physiol. *B* 168: 364-376.

Wilder, M. N.; Huong, D. T. T.; Atmomarsono, M.; Tran, T. T. H.; Phu, T. Q. & Yang, W. J. (2000) Characterization of (Na^+, K^+)-ATPase in *Macrobrachuim rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. Comp. Biochem. Physiol. 125A: 377-388.

Wilder, M. N.; Huong, D. T. T.; Jasmani, S.; Jayasankar, V.; Kaneko, T.; Aida, K.; Hatta, T.; Nemoto, S. & Wigginton, A. (2009) Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Changes with the molt cycle. Aquaculture. 292: (1-2): 104-110.

Wilder, M. N.; Huong, D. T. T.; Okuno, A.; Atmomarsono M. & Yang, W. J. (2001) Ouabain-sensitive Na/K-ATPase activity increases during embryogenesis in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fisheries Science. 67(1): 182-184.

Wilkie, M. P. (1997) Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comp. Biochem. Physiol. A 118: 39-50.

Woo, A. L.; James, P. F. & Lingrel, J. B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. 275: 20693–20699.

Yaragatupalli, S.; Olivera, J. F.; Gatto, C.; Artigas, P. (2009) Altered Na^+ transport after an intracellular α-subunit deletion reveals strict external sequential release of Na^+ from the Na/K pump. Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (36): 15507–15512.

Young-Lai, W. W.; Charmantier-Daures, M. & Charmantier, G. (1991) Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. Mar. Biol. 110: 293-300.

Ushimaru, M. & Fukushima Y. (2007) Synthesis of ATP by the simple addition of ADP to the p-nitrophenyl phosphate-prepared phosphoenzyme of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 353: 799–804.

Zanders, I. P. & Rodriguez, J. M. (1992) Effects of temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on oxygen-consumption in larvae and adults of *Macrobrachium amazonicum* (DECAPODA, PALAEMONIDAE) Comp. Biochem. Physiol. A**.** 101**(**3**):** 505-509.

Zimmermann, S. & Sampaio, C. M. S. (1998) Sistemas de berçário: Caracterização e manejo in: Valenti, W. C. (Ed.) Carcinicultura de água doce: Tecnologia para produção de camarões. Instituto Brasileiro do meio Ambinete e dos Recursos Naturais Renovaveis. Brasília, 390 p.