Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Caracterização cinética da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal
do tecido branquial do ermitão intertidal *Clibanarius vittatus*
(CRUSTACEA, DECAPODA)**

Rubia Regina Gonçalves Sivieri

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal
do tecido branquial do ermitão intertidal *Clibanarius vittatus*
(CRUSTACEA, DECAPODA)**

Rubia Regina Gonçalves Sivieri

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Gonçalves, Rubia Regina

Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do ermitão intertidal *Clibanarius vittatus* (CRUSTACEA, DECAPODA). Ribeirão Preto, 2007.
114 pág.

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

Orientador: Leone, Francisco de Assis.

1. (Na⁺,K⁺)-ATPase, 2. *Clibanarius vittatus*, 3. brânquias de crustáceos, 4. caracterização cinética.

DEDICO

Ao meu marido Disney

Realmente você foi um presente de Deus, meu maior tesouro.

Se tive dificuldades ao longo desse caminho, você com certeza,

suavizou grande parte dele... sua dedicação, compreensão, amizade e amor são alicerces seguros para o nosso convívio. Estou imensamente feliz, pois nossos objetivos e metas estão sendo pouco a pouco alcançados com merecido sucesso pelo grande esforço e dedicação por nós dedicados.

Obrigada por me dar forças, quando achava não mais possuí-las, obrigada por me ensinar a voar, quando minhas asas já não batiam mais...

Eu o amo, muito além do que consigo escrever ou expressar!!!

Aos meus pais, Rubens e Leila,

Difícil defini-los,...tão pouco escrever em poucas palavras meus sinceros sentimentos...Talvez eu passe toda minha existencia sem conhecer pessoas melhores...São para mim um exemplo de vida, de amor, de perseverança e acima de tudo de moralidade. Vocês renunciaram a muitos de seus sonhos em prol aos meus, nem que eu quisesse poderia recompensá-los por completo. Tenho por vocês imensa gratidão por tudo que me doaram com muito amor e carinho. É com muita alegria que divido com vocês mais uma conquista. Eu sempre vou amar vocês por aquilo que são, pelo que sempre fizeram e pelo o que ainda fazem por mim.

Obrigado e que Deus os abençoe.

A minha irmã Rudilea,

Acima de tudo uma amiga. Sem trasmitir com clareza muitas vezes o que sente ou pensa, é uma pessoa repleta de sentimentos. Sei que torce por mim, e eu sei que posso contar com você sempre...

Com amor e carinho

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Leone,

A você que confiou e me proporcionou a chance de dar o primeiro passo, meu muito obrigado!

Constantemente pessoas passam pelo nosso caminho deixando sua marca, provocando reações, sentimentos e comportamentos antes não percebidos ou adormecidos. Espero ter lhe deixado o que há de melhor em mim!

Que Deus o ilumine sempre, que seu caminho seja sempre repleto de saúde, alegrias, amigos, família e amor, pois essas são com certeza nossas verdadeiras riquezas.

Sonhe

Clarice Lispector

"Sonhe com aquilo que você quiser.

Vá para onde você queira ir.

Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido.

Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar, duram uma eternidade.

A vida não é de se brincar porque em pleno dia se morre."

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus que me permitiu chegar até aqui e viver e aprender com muita intensidade todas as fases desse trabalho.

A minha tia Neli que com carinho, paciência e muita compreensão têm estado a meu lado nos momentos de tristezas, alegrias e conquistas, sempre com gestos e palavras de conforto.

Aos meus familiares tia D'arc, avó Therezinha, Thaila, Maira, Valdirene, Toninho, Vanderlei, Rosângela, Gigio, tia Nair, tio Natalino e tantos outros que com amor me incentivaram e torceram por mim durante o percurso de mais um trabalho.

Aos amigos do Centro Universitário Barão de Mauá, Silvia Zucchi, Silvio Cecchi, Carmito, Margareth, Orivaldo, Marcelo Zini, Mônica Zini, Ana Rosa, Omar Cozac (in memorian), Maria Helena, Lucimara, Adalberto Gonçalves, Jorge Nunes, Silvana S. Nunes, Jorge Abud, Cristina, Luis Augusto, Luis Henrique, Tânia, Tokico, Regilene, Ilka, Celso, Dulce do Val, Dulce, Sara, Renata, Andréia, Kátia e tantos outros que nessa longa caminhada compartilharam comigo doando companheirismo e incentivo durante a realização desse trabalho.

Aos amigos Profa. Dra. Fernanda Anibal “amiga e companheira de viagem e trabalho”, Luis Bispo, Orlando Mesquita, Douglas Masui, Arthur Oliveira, Luciana Rezende pelo apoio e amizade durante a realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório da USP, Ivana, Daniela, Lílían, Carlos, Nara, Hérica, Kátia, Prislaine, e a todos os outros que conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto e seus alunos, que contribuíram de forma inestimável para a realização deste trabalho na coleta dos animais.

A Prof^a. Dra. Rosa dos P. I. Furriel, por sua amizade e seus conhecimentos indispensáveis para o sucesso desse trabalho.

Aos docentes e funcionários dos Departamentos de Química e Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP.

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

À FAPESP e CNPq pelos auxílios recebidos.

RESUMO

GONÇALVES-SIVIERI. R.R. **Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do ermitão intertidal *Clibanarius vittatus* (CRUSTACEA, DECAPODA).** 2007. Tese (Doutorado). – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A (Na⁺,K⁺)-ATPase presente no tecido branquial dos crustáceos osmorreguladores é um componente essencial do sistema de regulação iônica e osmótica e de excreção ativa de NH₄⁺. Dessa forma, a caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *Clibanarius vittatus* pode fornecer dados importantes para a compreensão dos mecanismos bioquímicos desses processos. Nesse sentido, foram realizados ensaios cinéticos com a fração microsomal obtida do tecido branquial de *C. vittatus*. Os dados obtidos revelaram a presença de um único pico com atividade ATPase. Os dados obtidos a partir da hidrólise do substrato ATP revelaram a presença de dois sítios, um de alta afinidade que apresenta interação sítio-sítio ($n_H=1,9$; $K_{0,5}= 63,8 \pm 2,9$ nM e $V= 19,1 \pm 0,8$ U/mg) e outro de baixa afinidade, com características Michaelianas ($n_H=1,0$; $K_M= 44,1 \pm 2,6$ μ M e $V_M= 123,5 \pm 6,1$ U/mg). Além disso, foi observada interação do tipo sítio-sítio ($n_H= 1,8$) para estimulação dos íons magnésio ($V= 132,0 \pm 5,3$ U/mg e $K_{0,5}= 0,36 \pm 0,02$ mM). Por outro lado, as interações dos íons sódio ($K_{0,5}= 7,4 \pm 0,4$ mM), potássio ($K_{0,5}= 1,51 \pm 0,05$ mM) e amônio ($K_{0,5}= 4,5 \pm 0,2$ mM) obedeceram a uma cinética Michaeliana. Os dados obtidos mostraram que em condições saturantes de íons potássio, a atividade enzimática aumenta de maneira concentração-dependente quando na presença de íons amônio ($V= 290,8 \pm 14,4$ U/mg e $K_M= 2,9 \pm 0,1$ mM). A presença da ouabaína no meio reacional acarretou 66% de inibição ($K_I= 117,3 \pm 3,5$ μ M), indicando a presença de outras ATPases. A atividade K⁺-fosfatase, medida usando o substrato sintético PNFF revelou a presença de um único sítio de hidrólise ($V= 47,4 \pm 1,9$ U/mg e $K_M= 1,0 \pm 0,04$ mM) com características Michaelianas ($n_H= 1,1$). Entretanto, para os íons Mg²⁺ ($n_H= 2,6$ e $K_{0,5}= 0,6 \pm 0,1$ mM), K⁺ ($n_H= 1,4$ e $K_{0,5}= 3,7 \pm 0,1$ mM) e NH₄⁺ ($n_H= 1,9$ e $K_{0,5}= 19,3 \pm 0,7$ mM) foram observadas interações sítio-sítio. Em conjunto, os resultados cinéticos obtidos para a (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus*, reforçam a possibilidade de que essa enzima contribui eficientemente com o mecanismo adaptativo desencadeado em resposta à exposição a altas concentrações externas de amônia. É importante ressaltar que o presente trabalho representa o primeiro estudo de caracterização cinética da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase no ermitão *C. vittatus*, um animal inserido em um microambiente constituído pela concha. Finalmente, este trabalho agrega informações relevantes relacionadas ao grupo dos Decapoda, em relação ao papel da (Na⁺,K⁺)-ATPase nos processos metabólicos e de osmorregulação nos crustáceos.

Palavras chave: (Na⁺,K⁺)-ATPase, *Clibanarius vittatus*, brânquias de crustáceos, caracterização cinética.

ABSTRACT

GONÇALVES-SIVIERI, R.R. **Kinetic characterization of gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase from intertidal hermit crab *Clibanarius vittatus* (CRUSTACEA, DECAPODA).** 2007. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

(Na⁺,K⁺)-ATPase is an essential component of osmotic and iono-regulatory system of crustacean gill and plays a relevant role in NH₄⁺ excretion. Thus, the kinetic characterization of *Clibanarius vittatus* gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase, can provide crucial data to the understanding of osmoregulating and excretion processes of these animals in different environments, especially the shell microenvironment. In this way, kinetic assays were performed with gill microsomal fraction. The results showed a single protein peak with ATPase activity. The results from ATP hydrolysis revealed the presence of two different sites. One of them is related to the high-affinity with site-site interaction ($n_H=1.9$; $K_{0.5}= 63.8 \pm 2.9$ nM and $V= 19.1 \pm 0.8$ U/mg) and the other shows low-affinity, obeying Michaelis-Menten kinetics ($n_H=1.0$; $K_M= 44.1 \pm 2.6$ μ M and $V_M= 123.5 \pm 6.1$ U/mg). Moreover, site-site interaction ($n_H= 1.8$) was observed to the magnesium ions stimulation ($V= 132.0 \pm 5.3$ U/mg and $K_{0.5}= 0.36 \pm 0.02$ mM). On the other hand, the stimulations of Na⁺ ($K_{0.5}= 7.4 \pm 0.4$ mM), K⁺ ($K_{0.5}= 1.51 \pm 0.05$ mM) and NH₄⁺ ($K_{0.5}= 4.5 \pm 0.2$ mM), followed Michaelis-Menten kinetics. At saturating concentrations of potassium ions, the enzyme activity was increased in a dependent-concentration manner with increasing ammonium ions concentration ($V= 290.8 \pm 14.4$ U/mg and $K_M= 2.9 \pm 0.1$ mM). Ouabain inhibited 66% of (Na⁺,K⁺)-ATPase activity ($K_I= 117.3 \pm 3.5$ μ M) of the gill microsomal enzyme, indicating the presence of other ATPase activities. The K⁺-fosfatase activity was also measured using PNPP, a synthetic substrate. PNPP hydrolysis resulted in single site hydrolysis site, obeying the Michaelis-Menten kinetics ($n_H= 1.1$). However, it was observed site-site interactions for Mg²⁺ ($n_H= 2.6$; $K_{0.5}= 0.6 \pm 0.1$ mM), K⁺ ($n_H= 1.4$; $K_{0.5}= 3.7 \pm 0.1$ mM) and NH₄⁺ ($n_H= 1.9$; $K_{0.5}= 19.3 \pm 0.7$ mM) ion estimulations. Taken together, these results provide important informations on the kinetic properties of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase of *C. vittatus*, emphasizing the synergistic stimulation induced by K⁺ and NH₄⁺, which appear to contribute to the efficient adaptive mechanism triggered by exposure of high external ammonia concentrations. It is important to emphasize that this is the first study on the kinetic properties of (Na⁺,K⁺)-ATPase enzyme of the hermit crab *C. vittatus*. Finally, this study provide information concerning the (Na⁺,K⁺)-ATPase role in the metabolic and osmoregulating mechanisms of this Decapoda group

Key words: (Na⁺,K⁺)-ATPase, *Clibanarium vittatus*, crustacean gill, kinetic characterization.

ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5' difosfato

ATP: adenosina 5' trifosfato

ATPase: adenosina 5' trifosfatase

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

Da: Dalton

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acidoacético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAF: 3-fosfogliceraldeído

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

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

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_i : constante de inibição

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

LDH: lactato desidrogenase

n_H : número de Hill

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NBT: nitroblue tetrazolium

Pi: fosfato inorgânico

PQ: piruvato quinase

PNFF: p-nitrofenilfosfato

PNFFase: p-nitrofenilfosfatase

Tris: tris-(hidroximetil)aminometano

v: velocidade inicial

v_c : velocidade inicial corrigida

V: velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 A (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase.....	12
1.2 O crustáceo <i>Clibanarius vittatus</i>	24
1.3 Caracterização branquial	27
1.4 Objetivos gerais	32
1.5 Objetivos específicos	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Coleta de animais	35
2.2 Remoção de brânquias	36
2.3 Preparação da fração microssomal do tecido branquial	36
2.4 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	37
2.5 Determinação da atividade ATPase.....	37
2.6 Determinação da atividade PNFFase.....	39
2.7 Preparação do gliceraldeído-3-fosfato	39
2.8 Preparação da solução de ortovanadato	40
2.9 Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento	40
2.10 Dosagem de proteína.....	41
2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida	41
2.12 Western blotting	41
2.13 Tratamento dos resultados.....	42
3. RESULTADOS.....	43
4. DISCUSSÃO	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A (Na⁺,K⁺)-ATPase

O transporte dos íons sódio e potássio pela (Na⁺,K⁺)-ATPase foi descrito pela primeira vez por Skou (1957) e essa descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel 40 anos mais tarde. Post & Jolly (1957) demonstraram em eritrócitos um transporte eletrogênico de 3 íons Na⁺ para o exterior da célula e dois íons K⁺ para o interior da célula, e que era inibido por um esteróide cardíaco (Pedersen, 2005).

A (Na⁺,K⁺)-ATPase (E.C.3.6.1.37), também conhecida como bomba de sódio, é uma proteína integral localizada na membrana plasmática da maioria das células animais. Participa do transporte de três íons sódio para o meio extracelular em troca de dois íons potássio para o meio intracelular através das membranas plasmáticas. A energia para esse trabalho, resulta da hidrólise da ligação do fosfato terminal do ATP que se liga a um resíduo de aspartato na proteína, permitindo então o transporte desses íons (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Beaugé et al., 1997; Emery et al., 1998; Sweeney & Klip, 1998; Skou, 1998; Hu & Kaplan, 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Horisberger, 2004). Esse transporte é responsável pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico através da membrana, essencial para o balanceamento iônico, regulação do volume celular, manutenção dos potenciais de membrana e transporte de substâncias vitais para o meio intracelular (Crambert et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Post & Jolly (1957) mostraram que no curso da sua reação a (Na⁺,K⁺)-ATPase é covalentemente fosforilada, uma propriedade única dessa classe de ATPases de transporte, conhecida como ATPase do tipo P, para designar seu estado de fosforilação em uma etapa do ciclo catalítico (Lutsenko & Kaplan,

1993; Crambert et al., 2000; Geering, 2000; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004; Pedersen, 2005).

A (Na⁺,K⁺)-ATPase é constituída por duas subunidades, denominadas α e β (**Painel 1**). A subunidade α , contém cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e Mr da ordem de 110 kDa. Contém os sítios de ligação para o substrato da enzima e existe na forma de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Pressley et al., 2005). A heterogeneidade da subunidade α , foi primeiramente detectada por Sweadner (1979) que observou diferenças de mobilidade eletroforética e esta diversidade tem sido confirmada repetidamente por métodos de clonagem molecular. Quatro isoformas da subunidade α já foram identificadas em mamíferos e estão correlacionadas com genes diferentes (Shull et al., 1986; Herrera et al., 1987; Shamraj & Lingrel, 1994), apresentando diferenças na afinidade por potássio, sódio, ATP e na sensibilidade à ouabaína (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasher et al., 2000; Segall et al., 2001; He et al., 2001).

Essas isoformas possuem padrões diferentes de expressão em tecidos específicos e são classificadas como subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$, sendo que a isoforma $\alpha 1$ é expressa praticamente em todos os tecidos. A isoforma $\alpha 2$ é expressa principalmente nos tecidos nervoso e adiposo, coração e músculo esquelético. A isoforma $\alpha 3$ é encontrada primariamente no tecido nervoso, embora também tenha sido detectada em outros locais, incluindo macrófagos multinucleados, glândula pineal e endotélio da córnea (Shyjan et al., 1990; Vignery et al., 1991; Huang et al., 2003). Estudos relacionados com a expressão da isoforma $\alpha 4$ têm sugerido que a sua expressão está restrita a tecidos reprodutivos (Blanco et al., 2000; Duran et al., 2004). Homólogos diretos das diferentes isoformas da subunidade α dos vertebrados ainda não foram descritos nos invertebrados e as duas isoformas encontradas nos

crustáceos *Artemia salina* e *Artemia franciscana* não correspondem diretamente a nenhuma das isoformas dos vertebrados (Cortas & Edelman, 1988; Baxter-Lowe et al., 1989; Cortas et al., 1989; Macías et al., 1991; Escalante et al., 1995; GarciaSaez et al., 1997; Emery et al., 1998; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Painel 1. Topologia de membrana proposta para as subunidades α e β da (Na⁺,K⁺)-ATPase. O modelo mostra as subunidades α e β e que podem estar associadas a subunidade γ. . Modificado de Horisberger (2004).

Os estudos de clonagem molecular da subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase sugerem a presença de 10 segmentos transmembrana (Geering, 2000; Mobasher et al., 2000; Rice et al., 2001; Donnet et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

A subunidade α pode ser dividida em 3 domínios globulares distintos que estão voltados para o citoplasma e que são conectados por uma haste estreita a um domínio transmembrana de forma aproximadamente cilíndrica e compacta (Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Estes domínios foram denominados P (domínio de fosforilação), domínio A (atuador) e N (domínio de ligação de nucleotídeos). Similarmente ao domínio transmembrana, apresentam grande similaridade

estrutural com os domínios identificados para a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (Toyoshima et al., 2000; Sweadner & Donnet, 2001; MacLennan & Green, 2000; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Resumidamente, o domínio A da (Na⁺,K⁺)-ATPase é constituído pela região N-terminal e a alça citoplasmática da cadeia polipeptídica localizada entre os segmentos transmembrana M2 e M3 (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Já os domínios N e P estão co-localizados na alça citoplasmática formada entre os segmentos transmembrana M4 e M5 da subunidade α , formada aproximadamente por 430 resíduos de aminoácidos, e contém o sítio de ligação do ATP e de fosforilação da enzima, respectivamente (Goldshleger & Karlsh, 1999; Toyoshima et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004).

A subunidade β , contém cerca de 300 resíduos de aminoácidos, apresenta Mr da ordem de 50 kDa e apenas um domínio transmembrana cuja extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma. Esta subunidade é altamente glicosilada e está praticamente voltada para o meio extracelular (Bar Shimon et al., 1998; Geering, 2000; Hasler et al., 2001; Rice et al., 2001; Geering, 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). Estudos de clonagem molecular têm identificado a heterogeneidade da subunidade β , mostrando as isoformas β 1, β 2 e β 3. Originalmente a isoforma β 1 foi isolada a partir do tecido renal, enquanto as outras isoformas têm sido identificadas em vários tecidos (Martin-Vasallo et al., 1989; Malik et al., 1996).

A estabilização do complexo da (Na⁺,K⁺)-ATPase ocorre através da interação da região extracelular da subunidade β com a alça extracelular da subunidade α entre os segmentos M7 e M8 (Or et al., 1998; Bar Shimon et al., 1998; Wang & Farley, 1998; Béguin et al., 2000; Rice et al., 2001; Hasler et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004).

A subunidade β apresenta três sítios de ligação de oligossacarídeos (N-ligados) no domínio extracelular, além de seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto intracadeia, aparentemente essenciais para a atividade da enzima (Kirley, 1989; Miller & Farley, 1990; Bar Shimon et al., 1998). A redução destas pontes dissulfeto com β -mercaptoetanol ou ditioneitol resulta na perda da atividade catalítica, atribuída a uma desestabilização da oclusão dos íons potássio pela enzima, (Kawamura & Nagano, 1984; Kirley, 1990; Lutsenko & Kaplan, 1993). Entretanto, vários estudos têm sugerido que a glicosilação da subunidade β não é importante para as propriedades de transporte ou de hidrólise da enzima (Zamofing et al., 1989). Por outro lado, Beggah et al. (1997) mostraram que a N-glicosilação possui papel importante no enovelamento das subunidades de proteínas oligoméricas. Além disso, há evidências de que a subunidade β é essencial para a atividade catalítica, pois a separação das subunidades α e β resulta na inativação da enzima (Xie et al., 1996; Gatto et al., 2001).

A atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase está diretamente ligada à heterodimerização das subunidades $\alpha\beta$, na qual a subunidade β atua como uma chaperona específica, estabilizando o enovelamento correto da subunidade α , favorecendo o direcionamento do dímero para a membrana plasmática (Béguin et al., 1998a; Abriel et al., 1999; Béguin et al., 2000; Martin et al., 2000; Geering, 2000; Mobasher et al., 2000; Hasler et al., 2001; Geering, 2001; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Além disso, têm sido relatado que a subunidade β pode modular a atividade catalítica da enzima bem como o transporte pelos íons potássio e sódio (Kaplan et al., 1998; Abriel et al., 1999; Mobasher et al., 2000; Hasler et al., 1998, 2001; Kaplan et al., 2001; Geering, 2001).

Recentemente, Horisberger (2004) propôs um modelo elegante para descrever o acoplamento entre a hidrólise do ATP (domínios citoplasmáticos)

e o transporte dos cátions pela (domínio transmembrana). Esse modelo, mostrado no **Painel 2**, descreve a presença dos domínios A, N e P, chamados de “centro motor” das ATPases do tipo P. Devido ao alto grau de conservação da seqüência nesses domínios, acredita-se que o mecanismo existente nesta parte da proteína pode ser muito semelhante em todas as P-ATPases. Entretanto, as alterações estéricas que definem os sítios dos cátions são específicas para cada P-ATPase. Na etapa inicial do ciclo reacional a enzima no estado E1, com o ATP presente em seu sítio de ligação, liga três íons sódio em seu sítio interno de alta afinidade provocando uma alteração conformacional onde o domínio N sofre uma rotação e posiciona o fosfato γ do ATP fechando o sítio de fosforilação. Nesta posição, o ATP parece realizar uma ponte entre os domínios P e o N (Toyoshima & Mizutami, 2004). Essa ponte pode ser rompida permitindo a transferência do fosfato γ para o resíduo de aspartato D369 presente no sítio de fosforilação. Em seguida, o domínio A também sofre uma rotação de 30° em torno do eixo horizontal (Toyoshima & Mizutami, 2004), produzindo um movimento de translação do primeiro segmento transmembrana do lado intracelular e 90° na terceira volta interna desta α -hélice. Esses autores propõem que esse movimento do primeiro segmento transmembrana provoca o fechamento do portão interno que é responsável pela entrada dos íons sódio. Essa etapa é acompanhada pela liberação do ADP, resultando no estado E1~P da enzima. Durante o ciclo catalítico, este estado E1~P de alta energia muda para a conformação E2-P abrindo o portão para o lado extracelular e provocando uma alteração conformacional no sítio de ligação dos cátions, com a subsequente liberação dos íons sódio. A conformação E2, agora com os sítios dos cátions vazios está pronta para a entrada dos íons potássio. A ocupação dos sítios da enzima no estado E2P por dois íons potássio vindos do meio extracelular resulta em duas mudanças: a defosforilação do resíduo D369 e a oclusão do potássio pelo

fechamento do portão extracelular. O domínio N agora possui um sítio acessível ao ATP intracelular. Durante o ciclo do transporte dos cátions, o ATP (ou outros nucleotídeos como ADP ou análogos não hidrolisáveis do ATP) liga-se a esse sítio intracelular de baixa afinidade (da ordem de 10-100 μM) provocando uma mudança conformacional da forma E2K para a conformação E1 resultando na abertura do portão intracelular, com a subsequente liberação do potássio do lado citoplasmático. Essas etapas podem ocorrer na ausência do nucleotídeo no sítio de alta afinidade, mas com uma velocidade menor (Horisberger, 2004).

Painel 2. Modelo proposto para o transporte dos cátions pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. P, A e N correspondem aos domínios de fosforilação, atuador e de ligação de nucleotídeos, respectivamente. Modificado de Horisberger (2004).

Já está estabelecido que a hidrólise catalítica do ATP e o transporte de cátions monovalentes ocorrem em diferentes regiões da (Na⁺,K⁺)-ATPase e que os grupos importantes para a interação com o ATP estão na alça citoplasmática entre M4 e M5 (Kaplan et al., 1997, 2001; Jorgensen et al., 1998a; Scheiner-Bobis & Schreiber, 1999; Jorgensen & Pedersen, 2001; Rice et al., 2001).

Alguns autores têm sugerido que na coordenação dos cátions, dois resíduos de aspartato localizados no segmento M6 e dois resíduos de glutamato, um em M4 e outro em M5, são essenciais tanto para a ligação dos íons sódio como dos íons potássio na enzima (Lingrel, 1997, 1998; Jorgensen et al., 1997, 1998a; Karlsh, 1997; Nielsen et al., 1998; Jorgensen & Pedersen 2001; Horisberger, 2004). Da mesma forma, resíduos de glutamato, aspartato, serina, treonina, tirosina e asparagina localizados na mesma região da subunidade α aparentemente participam da coordenação de cátions, embora alguns interajam preferencialmente com íons sódio e outros com íons potássio (Jorgensen et al., 1997, 1998a, b; Karlsh, 1997; Lingrel et al., 1997, 1998; Vilsen, 1999; Arguello et al., 1999a; Mense et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Tem sido sugerido que dois íons potássio e dois íons sódio se ligam aos mesmos resíduos em um sítio comum, formado pelos segmentos M4 e M5-M6 da subunidade α , onde os grupos hidrofóbicos estariam voltados para a fase lipídica enquanto os grupos carregados negativamente ou ricos em oxigênio estariam localizados em uma cavidade central e desempenhariam papel importante na ligação, na especificidade e no transporte dos cátions (Jorgensen et al., 1997, 1998a, b; Shainskaya et al., 2000; Geering, 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Kaplan et al., 2001). O terceiro íon sódio transportado pela molécula de ATP, aparentemente interage com a

conformação E₁ATP[Na⁺]₂ em um sítio distinto do mencionado anteriormente e que apresenta apenas grupos polares não carregados (Goldshleger et al., 1987; Glynn & Karlsh, 1990; Or et al., 1996; Karlsh, 1997; Apell et al., 1998).

As mudanças conformacionais entre as formas E₁ e E₂ da (Na⁺,K⁺)-ATPase estão intimamente associadas ao transporte dos cátions e acopladas à hidrólise do ATP (Gatto et al., 1997; Post, 1999; Goldshleger & Karlsh, 1999; Jorgensen & Pedersen, 2001). Aparentemente, a ligação do ATP ao seu sítio e a conseqüente fosforilação/desfosforilação da subunidade α , desencadeiam modificações conformacionais que são transmitidas aos sítios de ligação/oclusão de cátions no interior da membrana (Goldshleger & Karlsh, 1999; Pedersen et al., 2000; Rice et al., 2001). Analogamente, a ligação dos íons aos seus sítios provoca modificações conformacionais transmitidas aos sítios de ligação de ATP e fosforilação (Gatto et al., 1997; Apell et al., 1998; Kaplan et al., 1998; Goldshleger & Karlsh, 1999; Rice et al., 2001). Desse modo, mudanças conformacionais transmitidas à distância permitem a utilização da energia química liberada pela hidrólise do ATP para alteração da orientação e especificidade dos sítios para os íons sódio e potássio, realizando o transporte deles através da membrana (Jorgensen et al., 1997, 1998a; Post, 1999; Gatto et al., 1999; Schneeberger & Apell, 1999; Pedersen et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001).

Na conformação E₂ os domínios citoplasmáticos (N, P e A) da (Na⁺,K⁺)-ATPase encontram-se num arranjo hidrofóbico (Rice et al., 2001). Acredita-se que a transição para a conformação E₁ envolveria movimentos de inclinação e rotação destes domínios, resultando na sua dissociação, tal como descrito para a Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático, sugerindo um mecanismo de acoplamento comum para as ATPases do tipo P (Toyoshima et al., 2000; Rice et al., 2001; Jacobsen et al., 2002; Horisberger, 2004). Embora

as bases moleculares do mecanismo de acoplamento ainda não estejam bem estabelecidas (Jorgensen et al., 1998a; Goldshleger & Karlsh, 1999; Scheiner-Bobis & Schreiber, 1999; Pedersen et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001) existem evidências de que a ligação do ATP à forma E₂[2K] induz a dissociação dos domínios citoplasmáticos, associada a um rearranjo nos segmentos transmembrana, resultando na transição para a forma E₁ATP e na liberação dos íons potássio para o citosol. Já a ligação do terceiro íon sódio à forma E₁ATP induz mudanças conformacionais no domínio P, que permitem a sua fosforilação pelo fosfato γ do ATP, já ligado ao domínio N. Essa fosforilação induz novas mudanças conformacionais tanto nos domínios citoplasmáticos, que se reassociam com a passagem da enzima para a forma E₂, quanto no domínio transmembrana, como o transporte e a extrusão dos íons sódio para o meio extracelular. A ligação dos íons potássio à forma E₂P catalisa a hidrólise de fosfato ligado à enzima, associada à oclusão dos íons potássio reiniciando o ciclo de catálise e transporte (Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004).

A atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase é inibida especificamente por glicosídeos cardiotônicos dos quais a ouabaína é o mais representativo (Doris, 1994; Lingrel et al., 1997; Emery et al., 1998; Kasturi et al., 1998; Schoner, 2000; Middleton et al., 2000; Koenderink et al., 2000). É bem conhecido que a ouabaina e outros glicosídeos cardíacos similares interagem com a porção extracelular da enzima (Hoffman, 1996), ligando-se seletivamente e com maior afinidade à forma E₂P da proteína, bloqueando o transporte de íons e a hidrólise de ATP (Erdmann & Schoner, 1973; Yoda & Yoda, 1982; Askari et al., 1988; Asami et al., 1995; Pressley, 1996; Lingrel et al., 1997; Kasturi et al., 1998).

Diversos resíduos de aminoácidos localizados nas alças extracelulares da subunidade α e também nos segmentos transmembrana são importantes para a

interação enzima-ouabaína (Feng & Lingrel, 1994; Askew & Lingrel, 1994; Palasis et al., 1996; Karlsh, 1997; Croyle et al., 1997). A cadeia β também parece estar envolvida nessa interação (Hansen, 1984; Pressley, 1996; Hasler et al., 1998). Entretanto, apesar dos avanços obtidos, o sítio de ligação desse inibidor ainda não está perfeitamente conhecido (Feng & Lingrel, 1994; Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Palasis et al., 1996; Karlsh, 1997; Croyle et al., 1997; Kasturi et al., 1998; Coppi et al., 1999; Koenderink et al., 2000; Middleton et al., 2000).

A (Na⁺,K⁺)-ATPase também é inibida por vanadato, um inibidor das ATPases do tipo P e que é análogo do estado de transição do fosfato ligado à enzima (Nechay, 1984; Dafnis & Sabatini, 1994; Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998; MacGregor & Walker, 1993; Rice et al., 2001). A ligação do vanadato ao sítio de fosforilação interrompe o ciclo catalítico da enzima, dando origem a uma forma covalente E-V (MacGregor & Walker, 1993; Dafnis & Sabatini, 1994; Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998).

A (Na⁺,K⁺)-ATPase nos vertebrados está sujeita a uma complexa regulação, que acaba conferindo às células a capacidade de coordenar precisamente a atividade da enzima com as suas necessidades fisiológicas (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 2000). Todavia, os mecanismos que atuam nesta regulação ainda não estão bem estabelecidos (Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 2000; Mobasher et al., 2000). As características cinéticas intrínsecas das isoformas, sua distribuição e localização distintas conferem uma variedade de respostas específicas nos diferentes tecidos e células (Moller et al., 1996; Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasher et al., 2000). Contudo, os principais fatores que agem na modulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase são as concentrações intra e extracelulares de ATP, sódio e

potássio (Ewart & Klip, 1995; Blanco & Mercer, 1998; Therien & Blostein, 1999, 2000).

Outro fator importante, embora ainda pouco conhecido, é o microambiente constituído pela membrana, que também parece modular a afinidade relativa da enzima pelos íons sódio e potássio (Therien et al., 1996; Therien & Blostein, 1999, 2000). Além disso, um proteolipídeo que se associa especificamente ao dímero $\alpha\beta$, denominado peptídeo γ , foi identificado e caracterizado em alguns tecidos de vertebrados (Mercer et al., 1993; Scheiner-Bobis & Farley, 1994; Arystarkhova et al., 1999; Therien & Blostein, 2000; Donnet et al., 2001). Composto por um único segmento transmembrana, com a extremidade N-terminal voltada para o meio extracelular, possui peso molecular em torno de 7 kDa (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1997; Blanco & Mercer, 1998; Minor et al., 1998). Embora não seja um componente essencial da enzima, vários estudos sugerem que o peptídeo γ atua na regulação das propriedades cinéticas da (Na⁺,K⁺)-ATPase modulando sua afinidade pelos íons potássio e sódio e pelo ATP e com ouabaina (Béguin et al., 1997, 1998; Arystarkhova et al., 1999; Therien & Blostein, 2000). Ela faz parte de uma família de proteínas denominadas FXYD (Béguin et al., 2002; Geering et al., 2003; Horisberger, 2004)

A atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase de vertebrados está sujeita a regulação de curto e longo prazo através da ação de vários hormônios tais como a aldosterona, norepinefrina, dopamina e insulina. A primeira delas envolve efeitos diretos sobre o comportamento cinético da enzima ou a translocação de moléculas da enzima entre a membrana plasmática e os locais de estoques intracelulares (Ewart & Klip, 1995; Middleton, 1996; Pedemonte et al., 1997; Blanco et al., 1998; Therien & Blostein, 2000). Já a regulação de longo prazo geralmente afeta a síntese *de novo* da enzima ou a sua degradação (McDonough & Farley, 1993; Ewart & Klip, 1995; Middleton, 1996; Seok et

al., 1998; Bonvalent, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Therien & Blostein, 2000). A atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase também pode ser regulada por cAMP, proteínas quinases e fosfatases (Therien & Blostein, 2000; Mo & Greenaway, 2001) bem como pela presença de inibidores endógenos semelhantes à ouabaína (Doris & Bragrov, 1998; Kramer et al., 1998; Ferrandi & Manunta, 2000; Therien & Blostein, 2000; Kaplan 2002).

1.2. O crustáceo *Clibanarius vittatus*

Os Decapoda constituem a maior e mais diversa ordem entre os Crustacea, composta por aproximadamente 10.000 espécies descritas, distribuídas entre os ambientes marinho, de água-doce e terrestre (Abele, 1982). No grupo Decapoda, encontra-se a infraordem Anomura, que engloba, entre outros, os ermitões. Estes se encontram reunidos nas famílias Parapaguridae, Paguridae e Diogenidae, que junto às famílias Lithodidae e Pylochelidae compõem a superfamília Paguroidea (Melo, 1999). De acordo com Ingle (1993), os ermitões apresentam mais de 800 espécies descritas no mundo todo, e embora desperte a atenção de pesquisadores devido ao seu elevado e variado grau de comportamento evolutivo, ainda são pouco estudadas.

Os ermitões diferenciam-se dos demais crustáceos decápodos pela presença de um abdômen não-calcificado e não-segmentado, usualmente curvado para a direita, possuindo o 4^o e 5^o par de pereiópodos reduzidos (**Painel 3**). Este crustáceo utiliza conchas desabitadas de moluscos para proteção de seu corpo. Este comportamento incomum faz desse animal um alvo interessante para estudos do ponto de vista evolutivo, uma vez que há a necessidade da ocupação de uma carapaça de outro animal. Este envoltório possui propriedades protetoras tanto contra predadores naturais bem como na

locomoção do ermitão no substrato marinho, já que seu abdômen pode ser facilmente rompido por não apresentar calcificação. Além disso, a concha evita a dessecação do animal quando este fica fora do ambiente marinho. Esta situação normalmente ocorre em períodos de maré baixa, expondo o animal à luz solar e altas temperaturas. As conchas também desempenham outra função importante relacionada à proteção dos ovos que ficam aderidos no lado externo do abdômen da fêmea.

Painel 3. Ermitão *Clibanarius vittatus* – Foto do crustáceo sem a presença da concha, indicando as principais características morfológicas da espécie.

De acordo com Coelho & Ramos (1972) e Melo (1999), a família Diogenidae está representada no litoral brasileiro por 23 espécies. Entre elas encontram-se oito gêneros, entre eles o *Clibanarius danae* e *Clibanarius vittatus*. O ermitão *Clibanarius vittatus*, descrito pela primeira vez por Bosc

(1802), é o pagurídeo mais comum e abundante na zona intertidal da região de São Vicente (SP, Brasil), comumente encontrado em praias e mangues (Coelho & Ramos, 1972; Williams, 1984), principalmente nas regiões relacionadas à alta deposição de matéria orgânica e sujeita a influência de água doce (Lowery & Nelson, 1988). Entretanto, esta espécie apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde a costa Atlântica oeste dos Estados Unidos até o estado de Santa Catarina no Brasil (Coelho & Ramos, 1972; Young, 1978; Lowery & Nelson, 1988; Williams, 1984). Os ermitões também podem ser encontrados em estuários, recifes de coral, areia do fundo e águas rasas de até 22 metros (Melo, 1999).

O *C. vittatus* é um paguro de tamanho mediano, encontrado comumente habitando conchas de diversos gêneros, entre elas *Strombus*, *Stramonita*, *Auricularia*, *Polinices*, *Littorina*, *Canthaurus*, *Busycon*, *Terebra* e *Murex* (Fransozo et al., 1991). São animais onívoros detritivos e a quela esquerda geralmente é usada para a captura do alimento (Narchi, 1973).

A utilização das conchas dos gastrópodos é, sem dúvida, um importante recurso na biologia populacional dos ermitões (Provenzano, 1960; Childress, 1972; Vance, 1972; Kellog, 1976; Spight, 1985). De acordo com Fotheringham (1976) e Spight (1985) a concha desempenha papel central no crescimento e proteção desses crustáceos, bem como para a reprodução (Childress, 1972; Bach et al., 1976; Hazlett & Baron, 1989). O padrão comportamental destes animais associado ao fato de viverem em conchas, constitui sua maior adaptação, tornando-os capazes de explorar o ambiente intertidal com eficiência (Fransozo et al., 1991).

Como consequência à exposição às marés, o *C. vittatus* enfrenta grandes mudanças sazonais e variação de salinidade (Fotheringham, 1975), e apesar do interessante padrão de comportamento, existem poucos relatos descrevendo a distribuição e a biologia desse animal (Melo, 1999), bem como

pouca disponibilidade de dados para esclarecer os comportamentos fisiológicos e bioquímicos.

1.3. Caracterização Branquial

Os ermitões apresentam trico- ou filobrânquias, sendo que o gênero *Clibanarius* apresenta filobrânquias (McLaughlin & Lemaitre, 1997). O *C. vittatus* possui 14 pares de brânquias dispostas lateralmente no cefalotórax presentes nas regiões dos pereiópodos 1 a 4 (Forest & Saint Laurent, 1968), arranjadas em pares de dez artrobrânquias e quatro pleurobrânquias (Forest & Saint Laurent, 1968). No entanto, até o presente momento, pouco é conhecido sobre as características histológicas e ultraestruturais das brânquias desse crustáceo. Por outro lado, já está estabelecido que nas brânquias de caranguejo braquiúra, a (Na⁺,K⁺)-ATPase está localizada na superfície basolateral das células epiteliais (Towle & Kays, 1986).

As brânquias de crustáceos possuem papel central nos processos regulatórios ativos iônico e osmótico (Péqueux, 1995), na troca gasosa respiratória (Böttcher & Siebers, 1993), na regulação ácido-base da hemolinfa (Henry & Wheatly, 1992) e na excreção de produtos metabólicos nitrogenados finais (Cameron & Batterton, 1978; Weihrauch et al., 1998; 1999, 2004). Já está bem estabelecido que a (Na⁺,K⁺)-ATPase presente no tecido branquial dos crustáceos osmorreguladores é uma enzima fundamental para a regulação osmótica e iônica da hemolinfa (Péqueux, 1995; Towle, 1997; Furriel et al., 2000). Estudos recentes sugerem que a atividade desta enzima pode também ser importante no processo de excreção através das brânquias (Lucu, 1993; Weihrauch et al., 1998, 1999; Masui et al., 2002; Masui et al., 2005).

O *C. vittatus* possui capacidade de hiperosmoregulação muito eficiente em salinidade entre 5 e 25‰; contudo, em altas salinidades é um fraco osmoregulador (Young, 1979a; Sharp & Neff, 1980; Sabourin & Stickle, 1980).

As informações sobre o ciclo de vida do *C. vittatus* não estão bem definidas, entretanto, foi descrito que a água salgada é necessária para o desenvolvimento do ovo e da larva, com a metamorfose para a fase juvenil ocorrendo em salinidades de 25 a 30‰ (Young & Hazlett, 1978).

Os crustáceos, como os outros animais, apresentam um conjunto de respostas adaptativas ao meio ambiente. Uma resposta adaptativa importante está relacionada com o controle osmo-iônico intra- e extracelular, fundamental para a adaptação à salinidade a qual o animal está exposto (Péqueux, 1995). Dos crustáceos que ocupam o ambiente marinho, grande parte são osmoconformadores, isto é, possuem osmolalidade e concentração salina da hemolinfa semelhantes às da água do mar (Lucu, 1990; Péqueux, 1995). Esses animais não apresentam nenhum mecanismo de osmorregulação dos fluidos extracelulares, o que os torna pouco tolerantes a mudanças da salinidade do meio externo (Péqueux, 1995). A capacidade de regular a osmolalidade da hemolinfa pode ser estimada comparando-se a concentração de um determinado soluto na hemolinfa com aquela encontrada no ambiente numa ampla faixa de salinidade (Castille & Laurence, 1981).

Com raras exceções, os crustáceos são animais amoniotélicos, excretando seus resíduos metabólicos nitrogenados principalmente na forma de amônia (NH₃ + NH₄⁺), sendo que a maior proporção da excreção de amônia ocorre através das brânquias (Kormanick & Cameron, 1981; Regnault, 1987; Weihrauch et al., 1999). Tradicionalmente acreditava-se que a liberação de amônia através das brânquias ocorreria por simples difusão de NH₃ a favor do seu gradiente de concentração. Entretanto, evidências recentes

indicam claramente que pelo menos parte da amônia é excretada ativamente na sua forma iônica, isto é, na forma de NH₄⁺ (Lucu et al., 1989; Weihrauch et al., 1998, 1999). Além disso, estudos empregando brânquias isoladas e perfundidas de alguns caranguejos braquiuros revelaram a ocorrência de transporte ativo transepitelial de NH₄⁺ sensível a ouabaina, o que sugere fortemente o envolvimento da (Na⁺,K⁺)-ATPase nesse processo, até o momento pouco compreendido (Lucu et al., 1989; Péqueux & Gilles, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999). Aparentemente, este transporte ativo transepitelial parece ocorrer tanto em animais osmoconformadores quanto em osmorreguladores (Weihrauch et al., 1998, 1999).

Os raios iônicos similares dos íons K⁺ e NH₄⁺ hidratados sugerem que o NH₄⁺ pode interagir com os sítios de ligação do K⁺ (Knepper et al., 1989), como de fato ocorre na estimulação da atividade hidrolítica da (Na⁺,K⁺)-ATPase em vertebrados (Robinson, 1970; Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992) e em tecidos branquiais de crustáceos (Towle et al., 1976; Holliday, 1985; Towle & Holleland, 1987; Lucu et al., 1989; Masui et al., 2003; Furriel et al., 2004; Leone et al., 2005). Existem também evidências de que este íon pode ser transportado através da membrana, em substituição ao K⁺, pela enzima de vertebrados (Kurtz & Balaban, 1986; Wall, 1996) e pelo tecido branquial de crustáceos (Towle & Holleland, 1987). O controle osmótico e a participação da (Na⁺,K⁺)-ATPase nesse processo são de fundamental importância. Estudos relacionados com a captação e regulação da concentração de íons sódio e cloreto na hemolinfa têm sido realizados em várias espécies de crustáceos (Péqueux, 1995; Towle, 1993, 1997; Onken & Riestenpatt, 1998; Zare & Greenaway, 1998; Lignot et al., 2000; Furriel et al., 2000). Aparentemente, os processos de transporte transepitelial de íons sódio e cloreto em baixa salinidade envolvem a ação coordenada de vários sistemas de transporte localizados nas regiões apical e basolateral da lamela do tecido

branquial (Péqueux, 1995; Towle, 1997; Zare & Greenaway, 1998; Onken & Riestenpatt, 1998). Vários estudos sugerem a presença de diversos transportadores de íons, tais como trocadores Na⁺/H⁺ ou Na⁺/NH₄⁺, canais de sódio e co-transportadores Na⁺/K⁺/2Cl localizados na região apical das células do tecido branquial (Zeiske et al., 1992; Péqueux, 1995; Towle 1997; Towle et al., 1997). Além disso, existem evidências que suportam a existência de canais de potássio na região basolateral, que permitiriam a manutenção de níveis de K⁺ intracelulares compatíveis com a funcionalidade da célula (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). Acredita-se que a (Na⁺,K⁺)-ATPase, presente na região basolateral do epitélio branquial dos crustáceos, tenha um papel fundamental nesse processo, transportando ativamente íons sódio do meio intracelular para a hemolinfa contribuindo para a manutenção do equilíbrio osmo-iônico (**Painel 4**) desses animais em ambientes de baixa salinidade e constituindo assim a principal força motriz para o estabelecimento de um gradiente eletroquímico que energizaria uma variedade de outros transportadores (Barra & Péqueux, 1986; Towle & Kays, 1986; Towle, 1993, 1997, 1999; Onken & Puntzenlechner, 1995; Péqueux, 1995; Masui et al., 2005).

Por ser um grupo morfológico e ecologicamente diverso, apresentando muitas espécies que habitam grande variedade de biótopos, os Anomura representam um grupo interessante e promissor para estudos que objetivam a compreensão das estratégias adaptativas necessárias para o estabelecimento desses animais em diferentes ambientes (Mantelatto & Sousa, 2000; Greenaway, 2003). Além disso, as estratégias adaptativas, fisiológicas e/ou bioquímicas, empregadas pela classe Crustácea, para confrontar as mudanças osmóticas da vida na água doce e habitats estuarinos, podem ser melhor compreendidas através de estudos comparativos e sistemáticos das

características bioquímicas da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial em inúmeras espécies de diferentes habitats.

Painel 4. Modelo hipotético para a excreção ativa das brânquias dos caranguejos osmorreguladores. ① a principal força que dirige o transporte do NH_4^+ para fora da célula é a (Na⁺,K⁺)-ATPase localizada na membrana basolateral. Além disso, uma força extra-bombedora inibida por magnésio para a excreção de NH_4^+ está representada por um segundo sítio de NH_4^+ , o qual aparece quando a bomba está completamente saturada por íons K⁺. ② Canais de K⁺, sensíveis a Cs⁺ localizados na membrana basolateral não distinguem entre os íons potássio e amônio. ③ junção septada. ④ transportador Na⁺/ NH_4^+ (H⁺), particularmente ativo durante a excreção transcelular do amônio. ⑤ Presumivelmente, estruturas semelhantes a canais, sensíveis a amiloride e permeáveis a cátions na cutícula permitem a difusão dos íons para o meio externo. ⑥ A NH_3 citoplasmática é difundida para dentro das vesículas intracelulares contendo uma bomba de prótons (V-ATPase), que acidifica seu interior levando a formação de NH_4^+ . NH_3 é levado para o espaço subcuticular via exocitose. ⑦ Uma proteína transportadora de amônia semelhante a encontrada em rhesus (RhCM), um suposto transportador de amônia de localização desconhecida pode suportar o mecanismo de captura ácida. Modificado de Masui et al. (2005b).

1.4. Objetivos Gerais

Esta linha de pesquisa começou a ser desenvolvida em 1997 com a caracterização bioquímica da (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*. Atualmente sete diferentes espécies de caranguejos, siris e camarões estão sendo estudadas comparativamente a fim de se tentar estabelecer um modelo para o mecanismo de adaptação a ambientes de diferentes salinidades (**Painel 5**). Essa pesquisa envolve o estudo das características cinéticas (em relação à hidrólise do ATP e PNFF, e a inibição pela ouabaína), bem como a caracterização das possíveis isoformas da enzima preparada de animais coletados em seu ambiente natural bem como aclimatados a diferentes salinidades.

Painel 5. Habitat das espécies estudadas.

1.5. Objetivos Específicos

O presente trabalho teve como objetivo isolar membranas ricas em (Na⁺,K⁺)-ATPase a partir do tecido branquial do ermitão *Clibanarius vittatus* e caracterizar cinética e estruturalmente essa enzima. Além disso, pretende-se estudar o efeito do NH₄⁺ sobre a atividade da enzima, procurando contribuir para uma maior compreensão de seu papel no processo de excreção de amônio que ocorre nas brânquias dos crustáceos ainda pouco compreendido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura apirogênica tratada em equipamentos Milli RO e Milli Q (Millipore Co., USA). Tris, ATP sal de Tris, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD⁺, NADH, lactato desidrogenase (LDH), piruvato quinase (PK), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), fosfoglicerato quinase (PGK), ditioneitol (DTT), p-nitrofenilfosfato (PNPP), 3-fosfogliceraldeído dietil acetal, ouabaina, ortovanadato de sódio, imidazol, nitroblue tetrazolium, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCPI) e ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanolsulfônico (HEPES) foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (USA). Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck (Alemanha). O anticorpo monoclonal alfa-5 contra a subunidade alfa da (Na⁺,K⁺)-ATPase (todas as isoformas) foi adquirido do Hybridoma Bank da Universidade de Iowa (USA).

2.1. Coleta dos animais

Ermitões *Clibanarius vittatus* adultos, de ambos os sexos, foram coletados durante a maré baixa na Praia do Araçá, São Sebastião (23° 48' 86''S/ 45° 24' 52''W) no litoral norte de São Paulo. Os animais foram transportados e mantidos vivos no laboratório (de 2 a 7 dias), em tanques contendo água do mar com a mesma salinidade do local de coleta (31‰), a 25 ± 2°C, e alimentados em dias alternados com pedaços de camarão marinho.

2.2. Remoção das brânquias

O ermitão foi retirado da concha, quebrando-se a mesma com o auxílio de uma morsa. Os animais foram anestesiados através de choque térmico, em freezer a -20°C , e imediatamente as brânquias posteriores (pleurobrânquias) foram removidas e transferidas rapidamente para 25 mL de tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, EDTA 6 mM, Tris 6 mM e sacarose 250 mM), gelado e mantidas em banho de gelo até a homogeneização.

2.3. Preparação da fração microsomal do tecido branquial

Após a remoção do excesso de tampão de homogeneização, as brânquias foram pesadas (peso úmido), picotadas em pequenos pedaços e homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 mL/g de tecido úmido) em um homogeneizador Potter ajustado para 600 rpm. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g, durante 35 min, a 4°C , em uma centrífuga Sorvall RC5C Plus. O sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo. O pellet obtido foi ressuspenso no mesmo volume inicial de tampão de homogeneização, e manipulado conforme descrito acima. O sobrenadante resultante da segunda centrifugação foi coletado, adicionado ao primeiro sobrenadante e após misturar gentilmente, a solução resultante foi centrifugada a 100.000g, durante 2h, a 4°C , em uma ultra-centrífuga Hitachi 55P-72. Finalmente, o pellet resultante foi ressuspenso com tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo Tris.HCl 6 mM e sacarose 250 mM (10 mL de tampão/g de tecido úmido) e fracionado em alíquotas de 0,5 mL, que foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C por um período não superior a 4 meses, sem perda significativa da atividade da enzima.

2.4. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota da fração microsomal contendo 2,9 mg de proteína/0,7 mL, foi aplicada a um gradiente contínuo de 10 a 50% (p/v) de sacarose em tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, e centrifugada a 180.000g em uma centrífuga Hitachi 55P-72, usando o rotor vertical PV50T2, durante 2 h, a 4°C. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo com auxílio de uma bomba peristáltica e em seguida analisadas em relação às atividades PNFFase, ATPase total e ATPase insensível a ouabaína (medida na presença de 3 mM de ouabaína), concentração de proteína e concentração de sacarose.

2.5. Determinação da atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada continuamente, a 25°C, empregando-se o sistema de associação PK/LDH, onde a hidrólise do ATP é acoplada a oxidação do NADH (Furriel et al., 2000).

A oxidação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatzadas. As condições padrões dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl_2 2 mM, KCl 20 mM, NaCl 50 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, em um volume final de 1 mL.

A atividade enzimática também foi medida utilizando o sistema de associação GAFDH/FGK, onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD⁺. A formação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 20 mM, NaCl 50mM, NAD⁺ 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ em um volume final de 1 mL.

A atividade ATPase também foi medida na presença de ouabaína 3 mM ouabaína. A diferença entre a atividade medida na ausência e presença de ouabaína foi considerada como sendo a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase.

A reação sempre foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação e controles sem adição de enzima foram empregados para se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato/min, em condições padrões. Todos os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três preparações diferentes (N=3). A atividade ATPase também foi medida após 10 min. de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C. Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a presença de vesículas seladas na preparação (Bonnafeous et al., 1982).

2.6. Determinação da atividade PNFFase

A atividade PNFFase foi determinada continuamente, a 25°C, através da hidrólise do PNFF em 410 nm ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 13160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas. As condições padrões dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM, e KCl 15 mM, em um volume final de 1 mL.

A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação e controles sem adição de enzima foram empregados com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato/min, em condições padrões. Todos os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três preparações diferentes (N=3). A atividade PNFFase também foi medida após 10 minutos de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C.

2.7. Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento

Suspensões cristalinas (500 µL) de LDH e PQ foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 15 min., a 4°C, em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O pellet foi ressuspenso em 500 µL Hepes 50 mM, pH 7,5 e, após ser transferido para um filtro Microcon YM-10 foi lavado 5 vezes com o mesmo tampão através de centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C, durante 15 min. para completar a remoção de íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, o pellet foi ressuspenso em 500 µL de tampão Hepes 50 mM pH 7,5 e usado imediatamente para dosar a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase. Para o sistema FGQ e GAFDH, a suspensão foi tratada

exatamente como descrito acima exceto que o tampão utilizado foi trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo DTT 1 mM.

2.8. Preparação do gliceraldeído-3-fosfato

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

2.9. Preparação da solução de ortovanadato

A solução estoque de ortovanadato (1 mM) foi preparada conforme descrito por Gordon (1991). O pH de uma solução de concentração aproximadamente 1 mM foi acertado em 10,0 e em seguida a solução foi fervida em banho-maria até tornar-se translúcida. Após o resfriamento, o pH da solução foi novamente ajustado em 10,0 e a concentração final corrigida espectrofotometricamente ($\epsilon_{260\text{nm}, \text{pH } 10,0} = 3.550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Alíquotas da solução resultante foram congeladas em tubos plásticos e estocadas a -20°C até o momento do uso.

2.10. Dosagem de proteína

A concentração de proteína da fração microsomal foi determinada conforme descrito por Read & Northcote (1981), empregando-se soralbumina bovina como padrão.

2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida de 5 a 20%, conforme descrito por Laemmli (1970) e a proteína foi corada com nitrato de prata. Como padrões de peso molecular foram utilizados: miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soralbumina bovina (68 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

2.12. Western blotting

Após a eletroforese em condições desnaturantes, o gel foi cortado em duas partes. Uma das metades do gel foi submetida a uma eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 (diluído 1:10) a 25°C, durante 1 h. Após 3 lavagens com Tris.HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM e Tween20 0,1% (TBS/Tween), a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:7500), a 25°C, durante 1 h. A incorporação específica do anticorpo foi revelada em Tris.HCl 100 mM, pH 9,5, contendo NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NBT 0,2 mM e BCIP 0,8 mM. Foram usados como padrões: miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soralbumina bovina (68 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

2.13. Tratamento dos resultados

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 usando-se o software Sigrafw (Leone et al., 2005a). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_I) foram determinadas conforme descrito por Dixon (1953). Todos os experimentos foram realizados em duplicata empregando três (N=3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. Os parâmetros cinéticos apresentados no texto e nas tabelas são valores calculados e representam a média ± desvio padrão. Cada figura apresentada neste trabalho corresponde a uma curva representativa de cada experimento realizado.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

A metodologia empregada na obtenção da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* revelou a presença de atividade ATPase total da ordem de 183,7 U/mg e uma atividade PNFFase total da ordem de 70,5 U/mg. Não foram detectadas perdas significativas destas atividades, que permaneceram estáveis quando a enzima foi mantida por até 6 horas a 4°C ou por um período de cerca de quatro meses a -20°C (dados não mostrados). Além disso, a utilização da alameticina nos ensaios de atividade sugere que as frações de membrana obtidas não estão na forma de vesículas seladas no meio reacional (não mostrado).

A ultracentrifugação da preparação da fração microsomal de tecido branquial de *Clibanarius vittatus* em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% está mostrada na Figura 1 e mostra um único pico de atividade entre 25 – 35% sacarose, empregando como substrato o ATP. Na presença de ouabaína 1 mM a atividade ATPase, correspondente às frações compreendidas entre 25-35% de sacarose, foi parcialmente inibida, mostrando cerca de 40% de atividade residual na presença do inibidor.

Na Figura 2 está mostrado o resultado da ultracentrifugação da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* em gradiente contínuo de sacarose para a atividade PNFFase. Observa-se a presença de um único pico de atividade PNFFase entre a faixa de 25-30% de sacarose. Da mesma forma, na presença de ouabaína 1 mM a atividade PNFFase, correspondente às frações compreendidas entre 25-30% de sacarose, foi parcialmente inibida, mostrando cerca de 40% de atividade residual na presença do inibidor, o que sugere a presença de outras ATPases diferentes da Na,K-ATPase.

Figura 1. Distribuição da atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*, após centrifugação em gradiente contínuo de sacarose. Uma amostra de 2,9 mg de proteína microsomal foi aplicada no gradiente de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mM pH 6,8 e centrifugada a 180000g durante 3 h, a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase (□); atividade ATPase total (▲); atividade ATPase insensível a ouabaína (■); concentração de sacarose (●) e concentração de proteína (△). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N= 3).

Figura 2. Distribuição da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*, após centrifugação em gradiente contínuo de sacarose. Uma amostra de 1,9 mg de proteína microsomal foi aplicada no gradiente de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mM pH 6,8 e centrifugada a 180000g durante 3 h, a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas em relação a atividade K⁺-fosfatase (□); PNFFase total (▲); atividade PNFFase insensível a ouabaína (■); concentração de sacarose (●) e concentração de proteína (D). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N= 3).

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blot da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5% a 20%. Após a corrida, o gel foi dividido em duas partes. Uma metade (contendo 4 µg de proteína) foi corada com nitrato de prata e a outra metade (40 µg de proteína) foi submetida a uma eletrotransferência em membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo monoclonal alfa-5 (diluição 1:10) durante 1 h, a 25°C, lavada com TBS/Tween, seguido de incubação com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:7500) durante 1 h, lavado novamente com TBS/Tween e finalmente revelado com solução contendo NBT/BCIP. A - Coloração com nitrato de prata. B - Western blotting.

A Figura 3 mostra a eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (5 a 20%) da amostra purificada em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e o Western blotting da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. A Figura 2A, onde o gel foi corado com nitrato de prata (usando 4 µg de proteína) mostra várias bandas protéicas indicando a presença de diferentes proteínas. A análise por Western blotting (usando 45 µg de proteína) com o anticorpo monoclonal alfa-5 para a subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase identificou uma única banda com baixa intensidade que apresentou Mr da ordem de 105 kDa (2B).

A Figura 4 mostra o efeito da concentração do ATP sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. Em concentrações saturantes de íons magnésio, sódio e potássio, a modulação da enzima pelo ATP resultou na presença duas famílias de sítios de hidrólise para o ATP. A interação da enzima com o substrato ATP mostra interações sítio-sítio ($n_H = 1,9$) para a família de sítios de alta afinidade (10^{-9} M – 10^{-6} M) enquanto a de baixa afinidade (10^{-6} M – 10^{-3} M) obedeceu a uma cinética Michaeliana ($n_H = 1,0$). Os sítios de alta afinidade apresentaram $K_{0,5} = 63,8 \pm 2,9$ nM e $V = 19,1 \pm 0,8$ U/mg enquanto para os de baixa afinidade foram estimados $K_M = 44,1 \pm 2,6$ µM e $V_M = 123,5 \pm 6,1$ U/mg respectivamente. Concentrações de ATP superiores a 2 mM provocaram efeitos inibitórios na atividade da enzima (dados não mostrados). É importante notar que a atividade ATPase insensível à ouabaína corresponde a cerca de 37% da atividade ATPase total e é estimulada até valores de $76,8 \pm 3,1$ U/mg nessa mesma faixa de concentrações (inserção da Figura 3). Isso sugere a presença de outras ATPases e/ou fosfatases na preparação.

O efeito da concentração dos íons magnésio na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase é mostrado na Figura 5. Em condições saturantes de ATP, sódio e potássio, foi observado um aumento da atividade da enzima para

concentrações de Mg²⁺ entre 3 µM – 3 mM. A estimulação da atividade da enzima ocorreu através de uma única família de sítios que apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,8$) sugerindo o envolvimento de múltiplos sítios de ligação, $V = 132,0 \pm 5,3$ U/mg e $K_{0,5} = 0,36 \pm 0,02$ mM. Os resultados mostrados na inserção da figura também sugerem a presença de outras ATPases e/ou fosfatases, estimuladas pelos íons magnésio. A atividade insensível à ouabaína presente na fração microsomal foi também estimulada até 62 U/mg para a mesma concentração de Mg²⁺ (inserção figura 5).

O efeito da concentração dos íons sódio sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal das brânquias de *Clibanarius vittatus* é mostrado na Figura 6. Na presença de concentrações saturantes de ATP e íons magnésio e potássio, os íons sódio estimularam a atividade da enzima através de uma cinética “michaeliana”. Na faixa de concentração de sódio entre 0,3 mM e 1 mM, a hidrólise do ATP ocorreu com $V = 149,0 \pm 7,4$ U/mg e $K_M = 7,4 \pm 0,4$ mM. Diferentemente do Mg²⁺ e ATP, para o Na⁺ os resultados mostrados na inserção da figura sugerem que a preparação microsomal das brânquias não apresenta Na⁺-ATPases.

A modulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* pelos íons potássio está representada na Figura 7. Em condições saturantes de ATP, íons magnésio e sódio, e na ausência de íons NH₄⁺, a enzima foi estimulada por potássio através de cinética “michaeliana”, apresentando valores máximos de $V = 140,0 \pm 4,9$ U/mg e $K_M = 1,51 \pm 0,05$ mM. Os resultados mostrados na inserção da figura sugerem que a preparação microsomal das brânquias não apresenta K⁺-ATPases, pois a atividade da ATPase total insensível à ouabaína não foi estimulada pelo potássio em várias concentrações diferentes.

Figura 4. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do *Clibanarius vittatus* pelo ATP. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do ATP sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. As figuras apresentadas correspondem a curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 5. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do *Clibanarius vittatus* pelos íons magnésio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, NaCl 30 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do MgCl₂ sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. As figuras apresentadas correspondem a curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 6. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons sódio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do NaCl sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. As figuras apresentadas correspondem as curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 7. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons potássio na ausência de amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, NAD⁺ 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do KCl sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. A figura apresentadas corresponde a curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

A modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* pelos íons potássio na presença de concentrações fixas de amônio está representada na Figura 8. Interessantemente, na presença de concentrações fixas de NH₄⁺ (10 e 30 mM) a atividade total da enzima foi $V = 155,2 \pm 4,7$ U/mg e $236,6 \pm 9,4$ U/mg, respectivamente. Entretanto, a adição de K⁺ entre 10⁻⁵M e 10⁻²M, não provocou nenhuma estimulação adicional.

A modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* pelos íons amônio é mostrada na Figura 9. Observa-se que na presença de concentrações saturantes de ATP e dos íons magnésio e sódio, e na ausência de potássio, a enzima apresentou uma única família de sítios com características Michaelianas. O aumento da concentração de NH₄⁺ entre 10⁻⁵ M e 5.10⁻² M provocou um aumento na atividade até valores máximos de $V = 245,6 \pm 9,8$ U/mg e com $K_{0,5} = 4,5 \pm 0,2$ mM. A inserção da figura 9 mostra que a preparação também não apresenta outras atividades fosfohidrolíticas estimuladas por NH₄⁺.

Na presença de concentrações saturantes de potássio (20 mM), o aumento na concentração de NH₄⁺ (de 10⁻⁵ M a 50 mM) resultou em uma estimulação sinérgica com perfil “Michaeliano” (Figura 10). Valores máximos de $V = 240,8 \pm 14,4$ U/mg e $K_M = 2,9 \pm 0,1$ mM foram calculados. O efeito sinérgico observado na presença de potássio mais amônio sugere que esses íons se ligam em sítios diferentes. É possível observar na inserção da figura 10 que a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada pelo amônio no mesmo intervalo de concentração.

Na Tabela 1 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.

Figura 8. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons potássio na presença de amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, NH₄Cl 30 mM, NAD⁺ 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. Efeito da concentração do KCl sobre a atividade a atividade ATPase total na ausência (●,■) e presença (○,□) de ouabaína 1 mM; com 30 mM de NH₄Cl (círculos); e com 10 mM NH₄Cl (quadrados). A figura apresentadas corresponde a curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 9. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons amônio na ausência de íons potássio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, NAD⁺ 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do NH₄Cl sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. As figuras apresentadas correspondem as curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 10. Modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons amônio na presença de íons potássio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, KCl 20 mM, NAD⁺ 1 mM, fosfato de sódio 0,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM, 12 U de GAFDH e 9 U de FGQ, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. **Inserção:** Efeito da concentração do NH₄Cl sobre a atividade ATPase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM. As figuras apresentadas correspondem as curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelo ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.

Efector	V (U/mg)	K _{0,5}	K _M	n _H
ATP	19,1 ± 0,8	63,8 ± 2,9 nM		1,9
	123,5 ± 6,1		44,1 ± 2,6 μM	1,0
Mg ²⁺	132,0 ± 5,3	0,36 ± 0,02 mM	-	1,8
Na ⁺	149,0 ± 7,4	-	7,4 ± 0,4 mM	1,0
K ⁺	140,0 ± 4,9	-	1,51 ± 0,05 mM	1,0
K ⁺ (na presença de NH ₄ ⁺ 30 mM)	236,6 ± 9,8	-	-	-
NH ₄ ⁺	245,6 ± 9,8	-	4,51 ± 0,18 mM	1,1
NH ₄ ⁺ (na presença de KCl 20 mM)	240,8 ± 14,5		2,9 ± 0,1 mM	1,0

O efeito da concentração da ouabaína sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* é mostrado na Figura 11. Em condições saturantes de ATP e de íons magnésio, sódio e potássio, e na ausência de NH₄⁺, a atividade ATPase total é inibida cerca de 66%. A curva de inibição simples sugere a existência de um único sítio de fixação para a ouabaína. A constante de dissociação calculada para o complexo enzima-ouabaína é da ordem de 117,3 ± 3,5 μM (inserção da Figura 11).

A Figura 12 mostra o efeito da concentração da ouabaína sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* em condições saturantes de ATP e de íons magnésio, sódio, potássio, e NH₄⁺ (30 mM). Da mesma forma, na presença de concentrações saturantes de NH₄⁺, a atividade ATPase total é inibida cerca de 87% através de uma curva simples que sugere a existência de um único sítio de fixação para a ouabaína. A constante de dissociação calculada para o complexo enzima-

ouabaina é da ordem de $56,4 \pm 3,4 \mu\text{M}$ (inserção da Figura 12) para a inibição da ouabaina na presença de NH_4^+ . Observa-se também que concentrações de ouabaina da ordem de 1,0 mM independente da ausência (Figura 11) ou presença de NH_4^+ (Figura 12) provocaram uma inibição da atividade ATPase da ordem de 66%, o que sugere a presença de cerca de 34% de contaminações de outras ATPases e/ou fosfatases na preparação microsomal das brânquias.

A inibição da atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* por ortovanadato está mostrada na Figura 13. De acordo com a curva de inibição, observa-se também que concentrações da ordem de 0,1 mM provocaram uma inibição da atividade ATPase da ordem de 61%. Os resultados são coerentes com os estimados na presença de ouabaina.

A Figura 14 mostra o efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na presença de concentrações saturantes de ATP e de íons magnésio, sódio, potássio e amônio. Observa-se que a atividade ATPase total foi inibida cerca de 83% por ortovanadato 0,1 mM e a inibição ocorreu através de uma simples curva. A atividade residual, da ordem de 39%, observada na presença e ausência de íons amônio, sugere que a preparação está contaminada por outras fosfohidrolases.

O efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial do *Clibanarius vittatus* está apresentado na Figura 15. Na presença de ATP 1 mM, MgCl_2 2 mM, KCl 20 mM e NaCl 50 mM foi observada uma atividade residual de cerca de 36% na presença de ouabaina 1 mM. Esse resultado sugere que 64% da atividade ATPase total corresponde à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. A atividade ATPase residual de cerca de 33% obtida na presença de vanadato 50 μM e também na presença

Figura 11. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na ausência de íons amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, NaCl 30 mM, KCl 10 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. A atividade ATPase total correspondente a 100% foi de 183,9 U/mg. **Inserção:** representação de Dixon, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 12. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na presença de íons amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mM ATP, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, KCl 10 mM, NH₄Cl 30 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 μg de proteína. A atividade total correspondente a 100% foi de 302,4 U/mg. **Inserção:** representação de Dixon, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 13. Efeito da concentração de ortovanadato na atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na ausência de íons amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 30 mM NaCl, 10 mM KCl, 0,14 mM NADH, 2 mM FEP, 49 U PQ e 94 U LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 μg de proteína. A atividade ATPase total correspondente a 100% foi de 169,0 U/mg. Inserção: representação de Dixon, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 14. Efeito da concentração de ortovanadato na atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na presença de NH₄⁺ 30 mM. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 30 mM, KCl 10 mM, NH₄Cl 30 mM, NADH 0,14 mM, FEP 2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 μg de proteína. A atividade ATPase total correspondente a 100% foi de 291,2 U/mg. Inserção: representação de Dixon, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 15 – Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. A atividade da fração microsomal foi realizada em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mM de ATP, 2 mM de MgCl₂, 30 mM NaCl e 10 mM KCl, num volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 17 µg de proteína. Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão e foram calculados a partir de três preparações diferentes (N=3). Atividade ATPase total (■); Atividade residual relativa ao(s) inibidor(es) (■); Atividade ATPase contaminante (■) e Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase (■). Ctl= controle; Oua= ouabaína; Azi= azida de sódio; Eta= Etanol; Oli= oligomicina; Tap = tapsigargina; Baf= bafilomicina; Van= ortovanadato; Eta= ácido etacrínico; Teo= teofilina; DMSO: dimetilsulfóxido.

de ouabaína 1 mM mais vanadato 50 μ M, confirmam os dados apresentados acima. A ausência de uma inibição adicional na presença de ouabaína mais ácido etacrínico, consistente com os resultados pelos resultados apresentados nas figuras 6 e 7, exclui a presença de Na⁺ e/ou K⁺-ATPases. Valores de atividade na presença de ouabaína mais azida de sódio e a ouabaína mais oligomicina sugerem que a preparação apresenta cerca de 20% de F₀F₁-ATPase. A inibição da atividade ATPase por ouabaína mais bafilomicina A₁ indica 7% de atividade V-ATPase. Finalmente a inibição por teofilina (8%) e por tapsigargina (20%) devem ser observadas com cautela, desde que estes dados obtidos contrastam com os resultados obtidos para a ouabaína mais orto-vanadato (atividade residual de aproximadamente 33%), sugerindo que somente 6% da atividade corresponderia a fosfatases neutras e/ou P-ATPases, diferente da (Na⁺, K⁺)-ATPase, como por exemplo, uma atividade Ca²⁺-ATPase. A (Na⁺, K⁺)-ATPase pode ser inibida não especificamente pelos inibidores empregados. A Tabela 2 resume o efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total (na ausência de amônio) da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*.

Na Figura 16 está mostrada a modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelo PNFF. Em condições saturantes de íons potássio e magnésio, o aumento da concentração do PNFF resultou em uma única curva de saturação que apresenta $n_H = 1,1$, sugerindo a ocorrência de um efeito cooperativo. A atividade específica máxima foi estimada da ordem de $V = 47,4 \pm 1,9$ U/mg e o valor do $K_{0,5}$ da ordem de $1,0 \pm 0,04$ mM. A inserção da figura mostra que na preparação existe uma atividade residual de fosfohidrolase da ordem de 28% que é

Tabela 2. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total na fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*.

Inibidor	V (%)	V (U/mg)
Controle	100	184,2 ± 5,5
Ouabaína (1 mM)	36	66,3 ± 2,9
Orto-vanadato (50 µM)	33	60,7 ± 1,5
Ouabaína (1 mM) + Orto-vanadato (50 µM)	30	55,0 ± 2,2
Ouabaína (1 mM) + Azida de Sódio (100 µM)	16	29,5 ± 0,9
Ouabaína (1 mM) + Bafilomicina A ₁ (0,4 µM)	29	53,0 ± 2,4
Ouabaína (1 mM) + Tapsigargina (0,5 µM)	16	30,8 ± 1,5
Ouabaína (1 mM) + Ácido Etacrínico (2 mM)	33	61,1 ± 2,1
Ouabaina (1 mM) + Oligomicina (1µg / mL)	13	23,6 ± 1,4
Ouabaina (1 mM) + DMSO	34	63,0 ± 2,5
Ouabaina (1 mM) + Etanol	31	56,2 ± 2,2

estimulada pelo aumento da concentração de PNFF, na mesma faixa de concentração.

O efeito da concentração dos íons magnésio sobre a atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* está mostrado na Figura 17. Em concentrações saturantes de PNFF e íons potássio, os íons magnésio estimularam a atividade da enzima até valores máximos de V= 43,9 ± 1,5 U/mg, através de uma simples curva de saturação que apresentou interações sítio-sítio (n_H= 2,6). O valor de K_{0,5} calculado foi da ordem de 0,6 ± 0,1 mM. A inserção da figura mostra que na preparação existe uma atividade residual de fosfohidrolase da ordem de 25% que é

estimulada pelo aumento da concentração dos íons magnésio, nessa mesma faixa de concentração.

A modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons potássio está representada na Figura 18. Em condições saturantes de PNFF e íons magnésio a estimulação máxima da atividade da enzima pelos íons potássio é da ordem de $V = 48,9 \pm 2,4$ U/mg com $K_{0,5} = 3,7 \pm 0,1$ mM. A inserção da figura mostra que na preparação existe uma atividade residual de fosfohidrolase da ordem de 60% que é estimulada pelo aumento da concentração dos íons potássio.

O efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade K⁺-fosfatase do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*, na presença de concentração saturante de íons amônio é mostrado na Figura 19. Na presença de concentrações saturantes de amônio (100 mM), a atividade PNFFase permaneceu praticamente constante ($V = 43,9 \pm 1,1$ U/mg) com o aumento da concentração dos íons potássio até 10 mM. Acima de 10 mM os íons potássio provocaram uma inibição da atividade. Observa-se também que a atividade PNFFase insensível à ouabaína também não foi estimulada pelos íons potássio (inserção da Figura 19).

A Figura 20 mostra a modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons amônio. Em condições saturantes de PNFF e íons magnésio a estimulação máxima da atividade da enzima pelos íons amônio é da ordem de $V = 42,1 \pm 1,3$ U/mg através de uma simples curva de saturação que apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,9$), com $K_{0,5} = 19,3 \pm 0,7$ mM. A inserção da figura mostra que na preparação existe uma atividade residual de fosfohidrolase da ordem de 28% que é estimulada pelo aumento da concentração dos íons amônio.

Figura 16. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial do *Clibanarius vittatus* pelo PNFF. A atividade da enzima foi medida continuamente em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do PNFF sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaina 1 mM.

Figura 17. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons magnésio. A atividade foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do MgCl₂ sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM.

Figura 18. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons potássio. A atividade foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e MgCl₂ 10 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do KCl sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM.

Figura 19. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons potássio na presença de íons amônio. A atividade foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM e NH₄Cl 100 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do KCl sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM.

Figura 20. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons amônio. A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM e MgCl₂ 10 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do NH₄Cl sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM.

A Figura 21 mostra a modulação da atividade K⁺-fosfatase pelos íons potássio e amônio. Na presença de concentrações saturantes de íons potássio (15 mM) o aumento da concentração dos íons amônio não provoca nenhum efeito adicional na atividade da enzima $V = 41,3 \pm 0,8$ U/mg até concentrações de amônio de 10 mM.

A combinação dos resultados obtidos das Figuras 19 e 21 sugere que, diferentemente do observado para a hidrólise do ATP, os íons potássio e amônio não apresentam efeitos sinérgicos em relação à atividade K⁺-fosfatase da enzima da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*.

Na Figura 22 é mostrado o efeito da concentração dos íons sódio sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. Em condições saturantes de PNFF e de íons potássio e magnésio, os íons sódio atuam como inibidores da atividade da enzima.

A Figura 23 mostra o efeito de concentrações crescentes de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. Em condições saturantes de PNFF e de íons potássio e magnésio a atividade PNFFase total foi inibida cerca de 67% por concentrações de ouabaína da ordem de 10 mM. O valor calculado para K_i para a inibição da atividade K⁺-fosfatase pela ouabaína foi da ordem de $352,9 \pm 14,1$ μ M (inserção da Figura 23).

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na presença de amônio é mostrado na Figura 24. Em condições saturantes de PNFF, de íons potássio, magnésio e amônio a atividade PNFFase total foi inibida cerca de 66% por concentrações de ouabaína da ordem de 10 mM. O valor calculado para K_i para a inibição da atividade PNFFase pela ouabaína foi da ordem de $167,0 \pm 8,3$ μ M na presença de íons amônio 100 mM (inserção da Figura 24).

O efeito da concentração da ortovanadato sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* é mostrado na Figura 25. Em condições saturantes de PNFF, de íons potássio e magnésio, a atividade PNFFase total é inibida cerca de 44% através de uma curva simples.

A Tabela 3 resume os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade PNFFase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelo PNFF, íons magnésio, potássio e amônio.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelo PNFF e íons magnésio, potássio e amônio.

Efator	V (U/mg)	K_{0,5} (mM)	n_H
PNFF	47,4 ± 1,9	1,0 ± 0,01	1,1
Mg ²⁺	43,9 ± 1,5	0,6 ± 0,1	2,6
K ⁺	48,9 ± 2,4	3,7 ± 0,1	1,4
K ⁺ (na presença de NH ₄ ⁺ 100 mM)	43,9 ± 1,1	-	-
NH ₄ ⁺	42,1 ± 1,3	19,3 ± 0,7	1,9
NH ₄ ⁺ (na presença de KCl 15 mM)	41,3 ± 0,8	-	-

Figura 21. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* pelos íons amônio na presença de íons potássio. A atividade da enzima foi medida continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3). **Inserção:** Efeito da concentração do NH₄Cl, com íons potássio saturante, sobre a atividade PNFFase total na ausência (●) e presença (○) de ouabaína 1 mM.

Figura 22. Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é 70,54 U/mg. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 23. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na ausência de íons amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 15 mM, num volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 μg de proteína. A atividade fosfatase total correspondente a 100% foi de 70,54 U/mg. **Inserção:** representação de Dixon para o efeito da ouabaína, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade K⁺-fosfatase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 24. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus* na presença de íons amônio. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 15 mM e NH₄Cl 100 mM. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 μg de proteína. A atividade PNFFase total correspondente a 100% foi de 70,54 U/mg. **Inserção:** representação de Dixon para o efeito da ouabaína na presença de íons amônio, onde v_c representa a velocidade corrigida para a atividade K⁺-fosfatase. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados (N=3).

Figura 25. Efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade PNFFase total da microsomal do tecido branquial de *Clibanarius vittatus*. A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNFF 10 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 26,4 µg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é 70,54 U/mg. As figuras apresentadas correspondem à curvas representativas de um dos homogeneizados (N=3).

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Os principais desafios enfrentados pelos Crustacea estuarinos e/ou intertidais são as variações de temperatura e salinidade resultantes dos ciclos de marés, dessecação pela exposição ao ar e a disponibilidade de oxigênio. As adaptações fisiológicas à salinidade, incluindo a regulação osmótica e iônica, têm sido frequentemente investigadas (Mantel & Farmer, 1983; Péqueux, 1995), incluindo análises das adaptações comportamentais dos ermitões intertidais e o papel protetor das suas conchas (Reese, 1969). Entretanto, pouco se conhece sobre os processos de regulação osmótica e iônica realizados pelos Anomura (Young, 1979a, b; Sabourin & Stickle, 1980). Nos crustáceos, os processos de excreção e osmoregulação são realizados principalmente via epitélio branquial, exercendo, desta maneira, papel fundamental na manutenção dos processos metabólicos do animal (Péqueux, 1995; Weinhrauch et al., 1999; Lovett et al., 2001; Lin et al., 2002). O epitélio branquial desses animais é um tecido multifuncional composto por várias enzimas envolvidas no transporte de íons. Entretanto, comparações das propriedades cinéticas da (Na⁺,K⁺)-ATPase, enzima alvo do presente estudo, retirada de brânquias de *C. vittatus*, um típico ermitão pagurideo intertidal, com aquelas de outras espécies de crustáceos poderiam fornecer melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de osmorregulação e excreção desempenhados por esta enzima.

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas por eletroforese e Western blotting da fração microsomal do tecido branquial do *C. vittatus* mostraram que a enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase isolada deste tecido possui massa molecular de 105 kDa, equivalente às isoformas encontradas em outros crustáceos decápodes (Lucu & Towle, 2003), incluindo *Callinectes danae* (Masui et al., 2002) e *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2000). Estudos

conduzidos por Masui et al (2002), sugerem a existência de uma única isoforma da subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase isolada do tecido branquial de *Callinectes danae*.

Embora já tenha sido relatada a presença de mais de uma isoforma da subunidade α em um mesmo tecido de diferentes organismos (Cortas & Edelman, 1988; Cortas et al., 1989; Sweadner, 1989; Levenson, 1994; Pressley, 1996; Escalante et al., 1995; Schmalzing et al., 1997; Garcia Saez et al., 1997), até o presente momento não foi observada a presença de mais de uma isoforma da subunidade α no tecido branquial dos crustáceos.

Os ensaios de atividade específica da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial do *C. vittatus* ($V = 142,6 \pm 4,3$ U/mg), mostraram que a atividade desta enzima é 2,2 e 1,7 vezes menor que a observada para a enzima obtida dos tecidos branquiais de *Callinectes danae* e *C. sapidus*, respectivamente, embora muito similar àquela retirada das brânquias do *C. ornatus* (Leone et al., 2005b). Esta atividade enzimática menor observada no tecido branquial de *C. vittatus* é coerente com a hiperosmoregulação modesta mostrada por este animal em salinidades acima de 25‰ (Young, 1979a; Sharp & Neff, 1980). Em salinidade de 30‰, por exemplo, o *C. vittatus* mantém a concentração isosmótica de Na⁺ da sua hemolinfa em torno de 344 mM contra uma concentração de Na⁺ externa de 349 mM (Sabourin & Stickle, 1980), justificando a baixa atividade específica (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial.

Nas espécies de crustáceos como *Callinectes danae* e *C. sapidus*, que estão expostos à variação contínua da salinidade, mantém níveis elevados de atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial como consequência dessa condição ambiental a qual estão submetidos (Masui et al., 2005). Do mesmo modo, por *C. vittatus* habitar zonas intertidais que são suscetíveis à influência da água doce, está sujeito a grandes variações sazonais e salinidades das marés (Coelho & Ramos, 1972; Fotheringham, 1975; Williams, 1984; Lowery &

Nelson, 1988). Sendo assim, poderia se esperar que a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase também seria alta por causa dessas condições. Entretanto, *C. vittatus* é uma espécie que habita conchas de gastrópodes, as quais possuem um papel protetor contra as interferências do meio ambiente. Esta proteção, além de diminuir o estresse físico, diminui também as interferências das flutuações de salinidade e temperatura, proporcionando ao animal um microambiente favorável, protegendo os ermitões das conseqüências metabólicas geradas por essas alterações (Reese, 1969; Wernick & Moreira, 1985). Esses dados podem explicar os baixos valores de atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase encontrados nos tecidos branquiais desses animais. Em crustáceos como por exemplo, o *Pagurus bernhardus* e *Isocheles sawayai*, quando estudados fora de suas conchas, a concentração de suas hemolinfas tornam-se muito mais diluídas durante a exposição a baixas salinidades quando comparadas à dos mesmos ermitões protegidos por suas conchas (Shumway, 1978; Wernick et al., 1984). Deste modo, a variação de salinidade na água retida na concha ocupada é atenuada comparada ao ambiente aquático externo, os níveis de atividade enzimática são correspondentemente baixos comparados à atividade enzimática observada em decápodes exclusivamente marinhos.

A (Na⁺,K⁺)-ATPase pode apresentar mais de um sítio de ligação para o ATP, mas existem controvérsias relacionadas à caracterização desses sítios de ligação (Beaugé et al., 1997; Martin & Sachs, 2000). Enquanto os sítios de alta (K_M entre 0,1 e 1,0 μ M) e baixa afinidade (K_M entre 0,07 e 0,4 mM) para a hidrólise do ATP são conhecidos para a enzima dos vertebrados (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998; Thoenges et al., 1999), as suas localizações específicas dentro da molécula da enzima permanecem a serem determinadas (Krumscheid et al., 2004). A estimulação da atividade da enzima do tecido branquial pelo ATP tem sido investigada em várias espécies de crustáceos (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b). Entretanto, sítios de ligação de

baixa e alta afinidade do ATP foram descritos somente para *C. danae* (Masui et al., 2002). Os resultados obtidos a partir da hidrólise do ATP pela (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial do *C. vittatus* indicaram, assim como o observado no tecido branquial do *C. danae*, que esta enzima possui dois sítios de ligação para o ATP. Os resultados mostraram que o ATP hidrolisado pela (Na⁺,K⁺)-ATPase, no sítio de baixa afinidade ($K_M = 44,1 \pm 3,0 \mu\text{M}$), obedeceu à cinética Michaeliana, enquanto que para o sítio de alta afinidade ($K_{0,5} = 0,064 \pm 0,003 \mu\text{M}$), apresentou cinética cooperativa. Além disso, os sítios de alta afinidade da enzima no *C. vittatus* representam 13% da velocidade máxima, similar à enzima obtida do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002) e da enzima obtida nos vertebrados (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998).

Está bem estabelecido que os íons magnésio são essenciais para a hidrólise do ATP pela (Na⁺,K⁺)-ATPase de várias fontes (Glynn, 1985; Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002) e, da mesma forma, foi observado que para a (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus* esta condição também é essencial para a hidrólise do ATP. A estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo Mg²⁺ ocorre de maneira cooperativa ($n_H = 1,8$), como observado para as enzimas da brânquia de *C. danae* (Masui et al., 2002) e no axônio do caranguejo *Cancer pagurus* (Gache et al., 1976). Estes dados sugerem a presença de múltiplos sítios de ligação para o íon Mg²⁺ na (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus*.

A afinidade aparente da enzima branquial de *C. vittatus* observada para os íons Mg²⁺ ($K_{0,5} = 0,36 \pm 0,02 \text{ mM}$) é similar àquela encontrada nas enzimas de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), de *C. danae* (Masui et al., 2002), da membrana axonal de caranguejo (Gache et al., 1976) e vertebrados (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991). Entretanto, valores dez vezes maiores têm sido observados para enzimas de alguns caranguejos eurialinos (Leone et al., 2005b).

A afinidade aparente da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus* pelos íons Na⁺ ($K_M = 7,4 \pm 0,4$ mM), situa-se na mesma faixa de concentração determinada para a enzima obtida de vários caranguejos eurialinos (Lucu & Towle, 2003). Entretanto, certos osmoconformadores marinhos apresentam valores de $K_{0,5}$ 7 a 10 vezes maiores se comparados a enzima obtida de *C. vittatus*, enquanto que valores de $K_{0,5}$ de 0,06 a 0,9 mM têm sido relatados para espécies de crustáceos bem estabelecidos em água doce (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b). O comportamento Michaeliano observado para a estimulação da atividade da enzima por Na⁺ em *C. vittatus* contrasta com a cooperatividade positiva relatada para enzimas obtidas das brânquias de *C. danae* (Masui et al., 2002) e *M. olfersii* (Furiel et al., 2000) e para enzimas de mamíferos de várias fontes (Blanco et al., 1998; Koster et al., 1996).

A afinidade aparente da enzima branquial de *C. vittatus* para os íons K⁺ ($K_M = 1,5 \pm 0,1$ mM) são similares às aquelas encontradas para o *C. ornatus*, *C. danae* e *C. sapidus*, situando-se na mesma faixa de concentração observadas para enzimas de outros crustáceos eurialinos (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b). A modulação da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de crustáceos pelo K⁺ é bastante similar entre diferentes espécies, independente do biótopo habitado.

Na hidrólise do ATP pela (Na⁺,K⁺)-ATPase, em tecidos de vertebrados, o K⁺ pode ser substituído pelo íon NH₄⁺ (Robinson, 1970; Mallery, 1983; Skou & Esmann, 1992; Wall, 1996), ocorrendo da mesma forma nos tecidos branquiais de crustáceos (Holliday, 1985). Tanto o K⁺ quanto o NH₄⁺, podem ser transportados ativamente pela enzima de vertebrados (Mallery, 1983; Wall, 1996). O NH₄⁺ também pode substituir o K⁺ como um contra-íon no transporte de Na⁺ nas vesículas de membrana de *C. sapidus* (Towle & Holleland, 1987). A atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase pode apresentar diferenças importantes quando são associados os íons NH₄⁺ e K⁺. Os resultados obtidos

no presente trabalho sugerem que a (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus* seja estimulada sinergicamente pela associação de NH₄⁺ e K⁺, assim como observado para as enzimas de *C. danae* (Masui et al., 2002) e *M. olfersii* (Furiel et al. 2000). É importante ressaltar que a concentração de um íon é sempre constante enquanto que a concentração do outro é variável. Os resultados encontrados a partir da determinação do coeficiente de Hill ($n_H=1,1$) para a estimulação enzimática pelo K⁺, na ausência de NH₄⁺, no tecido branquial de *C. vittatus* é similar ao comportamento de Michaeliano observado para a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *U. pugnax* (Holliday, 1985) e *U. pugilator* (D'Orazio e Holliday, 1985). Entretanto, estes resultados contrastam com os múltiplos sítios de ligação para os K⁺ conhecidos para as enzimas da membrana axonal do caranguejo (Gache et al., 1976) e do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002). Interessantemente, o K_M ($4,51 \pm 0,18$ mM) estimado para a modulação por NH₄⁺ da enzima branquial do *C. vittatus*, na ausência de K⁺, é muito similar àquela do nervo do caranguejo (Skou, 1960), do tecido branquial do *C. danae* (Masui et al., 2002) e da enzima de vertebrados (Robinson, 1970).

A utilização de inibidores específicos em preparações enzimáticas se torna uma ferramenta essencial para a avaliação da presença ou não de enzimas contaminantes no meio reacional. Sabidamente, glicosídeos cardiotônicos, como a ouabaína, são inibidores da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase. O processo inibitório ocorre através da ligação do glicosídeo com a porção extracelular da enzima (Hoffman, 1996), ligando-se com maior afinidade com a forma E₂P da proteína, bloqueando, dessa maneira, o transporte de íons e a hidrólise do ATP (Erdmann & Schoner, 1973; Asami et al., 1995; Pressley, 1996; Lingrel et al., 1997; Kasturi et al., 1998). No presente trabalho, foi observado que a inibição induzida pela ouabaína, sobre a atividade total no

tecido branquial de *C. vittatus*, foi de aproximadamente 64%. Além disso, a inibição induzida pela ouabaína foi do tipo monofásica, como ocorre na enzima obtida de *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Leone et al., 2005b) e no camarão *M. olfersii* (Furriel et al., 2001). Por outro lado, estes resultados contrastam com a resposta bifásica observada na enzima dos caranguejos *U. pugnax* (Holliday, 1985) e *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980), e em *Potamon potamios* (Tentes & Stratakis, 1991). Ainda, os resultados obtidos com a presença da ouabaína indicaram que na preparação microsomal do tecido branquial de *C. vittatus* apresentam atividades enzimáticas insensíveis à ouabaína. De fato, a utilização de outros inibidores, em associação com a ouabaína, sugerem a presença de enzimas como, por exemplo, fosfatases neutras, Ca⁺-ATPase, a FoF₁-ATPase e V-ATPases (Tabela 2).

O valor de K_i para a ouabaína encontrado para a (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *C. vittatus* (K_i = 56,4 ± 3,4 μM) é similar à enzima de *C. ornatus* e outros crustáceos (Leone et al., 2005b), mas é em torno de 3 vezes menor quando comparado ao valor de K_i da enzima obtida do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002) e de *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980).

Outro inibidor utilizado nos ensaios com a fração microsomal de tecido branquial de *C. vittatus* foi o ortovanadato, o qual é capaz de inibir as todas ATPases do tipo-P. Os resultados obtidos na presença deste inibidor indicaram que 67% da atividade presente na preparação analisada corroboram os resultados obtidos para a medida da atividade ATPase total na presença de ouabaína. Os resultados mostraram também que a inibição induzida pelo ortovanadato é do tipo monofásica, assim como observado para a ouabaína. Além disso, a atividade residual observada (37%) na presença deste inibidor confirma a presença de outras atividades hidrolizantes de ATP no homogenizado de brânquias do ermitão *C. vittatus*.

No presente trabalho também foi utilizado o substrato sintético PNFF que permite a hidrólise pela enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase, sendo bastante útil para as determinações cinéticas da enzima (Furriel et al., 2001; Masui et al. 2003, 2005a). A atividade específica da (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial de *C. vittatus* em relação à hidrólise do PNFF ($V = 47,4 \pm 1,9$ U/mg) foi de aproximadamente 2,6 vezes menor que a observada para a hidrólise do ATP. Os resultados obtidos com o substrato PNFF contrastam com os da hidrólise do ATP, pois não foram identificados sítios de alta e baixa afinidade e sim uma única família de sítios de hidrólise, com afinidade aparente de $1,0 \pm 0,04$ mM.

As atividades (Na⁺,K⁺)-ATPase e K⁺-fosfatase presentes no tecido branquial de *C. vittatus* apresentam uma relação similar entre atividades máximas de hidrólise considerando os substratos ATP e PNFF. Essa similaridade também pode ser observada para as atividades (Na⁺,K⁺)-ATPase e K⁺-fosfatase obtidas dos tecidos branquiais de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001) e de *C. danae* (Masui et al., 2002, 2003), nas membranas axoniais do caranguejo *C. pagurus* (Gache et al., 1977) e outros tecidos de vertebrados (Beaugé & Berberian, 1983; Davis & Robinson, 1988). Entretanto, esta característica observada para a enzima pode estar mais intimamente relacionada aos tecidos obtidos de crustáceos, pois usualmente as relações entre as atividades (Na⁺,K⁺)-ATPase e K⁺-fosfatase observadas para a enzima de vertebrados estão em torno de 5 a 6 vezes (Esmann, 1988; Robinson, 1981).

Os íons magnésio são reconhecidamente essenciais para ambas as atividades (Na⁺,K⁺)-ATPase e K⁺-fosfatase obtida de diferentes fontes (Rossi et al., 1978; Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Furriel et al., 2000, 2001; Masui et al., 2002, 2003). A análise da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase, sobre a hidrólise do ATP, pode ser

influenciada quando da presença dos íons magnésio, pois esses íons podem formar um complexo ATP-Mg²⁺ que interfere na atividade catalítica da (Na⁺,K⁺)-ATPase. Ainda, os íons magnésio podem se fixar em um sítio de reconhecimento que existe na enzima que está situado na face interna da membrana, prejudicando ainda mais a análise da atividade enzimática (Grisham & Mildvan, 1974). Por outro lado, a utilização do substrato sintético PNFF é vantajosa quando se considera o fato de que esse composto não forma complexo com os íons magnésio nas condições experimentais utilizadas. Portanto, a análise da interação dos íons magnésio com a enzima, através da atividade PNFFase, favorece interpretações mais claras e simples relacionadas à atividade enzimática *per si*.

O valor de K_{0,5} observado para a estimulação da atividade K⁺-fosfatase da enzima do tecido branquial de *C. vittatus* pelos íons magnésio foi de aproximadamente 0,6 ± 0,1 mM. Este valor encontrado é muito similar ao observado para a (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), *C. danae* (Masui et al., 2002), membranas axoniais de caranguejo (Gache et al., 1976) e diferentes tecidos de vertebrados (Robinson, 1981; Beaugé & Berberian, 1983).

Outra semelhança observada a partir dos resultados obtidos referentes à atividade K⁺-fosfatase da enzima do tecido branquial de *C. vittatus* está relacionada à afinidade aparente da enzima aos íons potássio (K_{0,5}= 3,7 ± 0,1 mM), a qual é similar à encontrada para as enzimas do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2003), *M. olfersii* (Furriel et al., 2001, 2004), tecidos de vertebrados (Robinson, 1981; Glynn, 1985) e membrana axonial de caranguejo (Gache et al., 1976).

Os experimentos para avaliar a atividade K⁺-fosfatase da enzima a partir da substituição dos íons potássio pelos íons amônio, indicaram que estes últimos são capazes de estimular a atividade da enzima. Entretanto, os

resultados revelaram que a enzima possui menor afinidade pelos íons amônio ($K_{0,5} = 19,3 \pm 0,7$ mM) quando comparada a enzimas do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002, 2003), das membranas axoniais de caranguejo (Rossi et al., 1978) e cérebro de rato (Robinson, 1970).

Os coeficientes de Hill calculados para a estimulação da enzima pelos íons potássio e amônio foram 1,4 e 1,9, respectivamente. Estes resultados sugerem a existência de múltiplos sítios de ligação para estes íons da mesma forma como observado para enzimas de diferentes fontes (Robinson, 1970; Rossi et al., 1978, Masui et al., 2002, 2003). A presença simultânea dos íons potássio e amônio no meio de reação, não promoveu alteração na atividade K⁺-fosfatase do tecido branquial de *C. vittatus*, sugerindo que a estimulação da atividade K⁺-fosfatase da enzima pelos dos íons amônio, quando utilizados em substituição aos íons potássio, ocorra através da interação com os mesmos sítios de ligação como proposto anteriormente por Robinson (1970). Além disso, foi observado que em concentrações acima de 100 mM, tanto os íons potássio quanto os íons amônio promoveram inibição parcial da atividade K⁺-fosfatase da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial de *C. vittatus*. Esta observação pode ser explicada baseada na competição entre cátions monovalentes, como descrito em estudos anteriores (Robinson, 1970; Gache et al., 1976).

Os perfis de análise da cinética enzimática, utilizando o substrato sintético PNFF e o substrato natural da enzima, o ATP, fornecem resultados consistentes quando comparados entre si em preparações a partir de tecidos de diferentes espécies de crustáceos estudados (**Painel 05**). Dessa maneira, a utilização do substrato sintético para a avaliação da atividade K⁺-fosfatase da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial de *C. vittatus*, fornece parâmetros confiáveis diretamente relacionáveis ao monitoramento da atividade da enzima. Ainda, o PNFF pode ser utilizado como ferramenta útil

em estudos que envolvem processos osmorregulatórios comparativos com outras enzimas presentes em tecidos de vertebrados (Furriel et al., 2001).

Estudos conduzidos anteriormente sugerem que a hidrólise do PNFF pela (Na⁺,K⁺)-ATPase seja realizada principalmente quando a enzima está no seu estado conformacional E₂, ocorrendo na presença dos íons potássio, mas é inibida pela presença dos íons sódio. Ainda, nesta conformação não é observado o transporte acoplado dos íons sódio ou potássio através da membrana (Garrahan & Rega, 1972) ou a fosforilação da enzima durante o ciclo catalítico (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Jorgensen et al., 1998).

A inibição da atividade K⁺-fosfatase induzida pela presença dos íons sódio observada para a enzima do tecido branquial do *C. vittatus* (K_i= 12,6 mM) concorda com achados já descritos anteriormente para enzimas de outras fontes (Gache et al., 1976; Glynn, 1985; Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003). Este efeito inibitório pode ser explicado baseado nos estudos conduzidos por Robinson e Pratap (1991), os quais mostraram que os íons sódio podem competir pelos mesmos sítios de ligação do magnésio e, dessa forma, contribuindo para a inibição da atividade K⁺-fosfatase da enzima.

Da mesma forma como observado para a atividade ATPase, a presença da ouabaína no meio reacional induziu inibição de cerca de 67% da atividade K⁺-fosfatase total observada para a fração microssomal do tecido branquial de *C. vittatus*, indicando a presença de outras atividades enzimáticas presentes no homogenato. A inibição induzida pela ouabaína sobre a atividade PNFFase, assim como para a atividade ATPase, foi do tipo monofásica, indicando o mesmo comportamento quando comparada às inibições observadas sobre as atividades enzimáticas de *C. danae* (Masui et al., 2003) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2001).

O K_i aparente determinado para a inibição da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase das brânquias de *C. vittatus* pela ouabaína foi de $V = 352,9 \pm 14,1 \mu\text{M}$. Estes dados indicam que a atividade PNFFase é mais resistente à ação da ouabaína quando compara à atividade ATPase da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial de *C. vittatus*. Entretanto, vários estudos mostram diferentes valores de K_i para ouabaína sobre as atividades PNFFase de outros crustáceos (Gache et al., 1976; Furriel et al., 2002) e vertebrados (Robinson, 1981), sugerindo que o comportamento da enzima na presença do mesmo inibidor pode variar dependendo do animal estudado.

A atividade PNFFase também foi estimada na presença do inibidor de ATPases do tipo P, o ortovanadato. Os resultados obtidos foram similares aos observados para a ouabaína, ou seja, a inibição induzida pelo ortovanadato foi da ordem de 66% do total da atividade do homogenato, também confirmando a presença de atividades insensíveis ao inibidor de ATPases do tipo P. A presença do ortovanadato no meio reacional também induziu inibição do tipo monofásica como observado para a ouabaína, mantendo o mesmo comportamento quando comparada com a inibição observada para a enzima obtida de outras espécies de crustáceos (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003).

A concentração de amônia no ambiente aquático é usualmente baixa devido à nitrificação bacteriana, raramente excedendo $5 \mu\text{M}$ na água do mar despoluída e oxigenada (Koroleff, 1983; Weihrauch et al., 1999). Entretanto, concentrações de amônia em torno de $100 \mu\text{M}$ na hemolinfa têm sido observadas em várias espécies de caranguejos braquiúros adaptados a diferentes salinidades (Weihrauch et al., 1999). Este gradiente químico favorável facilita a excreção da amônia principalmente por difusão passiva, particularmente em animais pelágicos. Em contraste, crustáceos bênticos enterrados no sedimento podem enfrentar concentrações muito maiores de

amônia (em torno de 2,8 mM), particularmente em áreas com grande deposição de matéria orgânica (Weihrauch et al., 1999; Rebelo et al., 1999). Assim, sob circunstâncias específicas, tais animais podem ser expostos a concentrações de amônia que geralmente excedem os níveis da hemolinfa, facilitando o influxo de amônia (Weihrauch et al., 1999). A excreção ativa de NH₄⁺ através do epitélio branquial contra elevadas concentrações externas de amônia ocorre em *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* e *C. pagurus* (Weihrauch et al., 1999). De acordo com modelos recentes, a principal atividade de direção para o transporte de NH₄⁺ para o espaço extracelular é a (Na⁺,K⁺)-ATPase basolateral. Uma atividade de bombeamento adicional, inibida por íons magnésio, utilizada para a extrusão do NH₄⁺, é constituída pelo segundo sítio de ligação do NH₄⁺, o qual pode aparecer quando a bomba está completamente saturada pelos íons K⁺ (Masui et al., 2002, 2005). Além da (Na⁺,K⁺)-ATPase, canais de K⁺ sensíveis ao Cs⁺, localizados na membrana basolateral (Riestenpatt et al., 1996), os quais não discriminam entre K⁺ e NH₄⁺, podem translocar NH₄⁺ da hemolinfa para dentro do citoplasma (Towle & Holleland, 1987; Lucu et al., 1989; Weihrauch et al., 2002). Um transportador de amônio semelhante à proteína transportadora de amônio encontrada em rhesus de localização desconhecida, também pode mediar à transferência dos íons NH₄⁺ através da membrana celular (Marini et al., 2000; Weihrauch et al., 2004). A difusão metabólica de NH₄⁺ da hemolinfa para dentro das células epiteliais também contribui para o conjunto de amônia citoplasmática, o qual pode entrar nas vesículas intracelulares tanto por difusão quanto através de transportadores de amônio semelhante à proteína transportadora de amônio. Uma V-ATPase acidifica o interior da vesícula, por meio de uma bomba de próton, induzindo a formação de NH₄⁺, o qual é aparentemente expulso para o espaço subcuticular por exocitose dependente

de motores citoesqueléticos (Weihrauch et al., 2002, 2004; Masui et al., 2005).

A exposição a elevadas concentrações de amônia pode constituir um problema para o ermitão *C. vittatus*. A excreção contínua de amônia para dentro do ambiente restrito, constituído pela água da concha, em conjunto com a exposição prolongada a temperaturas elevadas e o represamento de sedimentos ricos em matéria orgânica pode levar a níveis perigosos de amônia. Estas condições extremas podem ter conduzido à seleção natural de um mecanismo particularmente eficiente da excreção de NH₄⁺ contra seu gradiente. A estimulação sinérgica da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial pelo NH₄⁺ e K⁺ pode constituir um importante componente da resposta fisiológica do *C. vittatus* a estes elevados níveis externos de amônia, permitindo a excreção de NH₄⁺ contra um gradiente de concentração quando a enzima é saturada com K⁺. Considerando que em salinidade de 30‰, *C. vittatus* mantém a concentração de K⁺ na hemolinfa em torno de 20 mM (Sabourin & Stickle, 1980), e que a hemolinfa banha os sítios de ligação externos de alta afinidade para o K⁺ da (Na⁺,K⁺)-ATPase, a enzima trabalharia completamente saturada pelo K⁺. Além disso, mesmo em salinidades baixas como 10‰, a concentração de K⁺ na hemolinfa diminui até limites de 13 mM (Sabourin & Stickle, 1980). Considerando este grau de salinidade, e os parâmetros estimados aqui, parece provável que a enzima é saturada pelo K⁺, aumentando a atividade específica à medida que aumenta a concentração de NH₄⁺. Dessa maneira, estes achados reforçam a importância da estimulação sinérgica da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. vittatus* pelos íons K⁺ e NH₄⁺, aparentemente contribuindo no eficiente mecanismo adaptativo desencadeado em resposta à exposição a altas concentrações externas de amônia.

Finalmente, é importante ressaltar que o presente trabalho é o primeiro estudo que realizou a caracterização cinética da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase no

ermitão *C. vittatus*, e que esta enzima possui particularidades específicas quando comparadas às outras enzimas obtidas de tecidos branquiais provenientes de diferentes espécies de crustáceos (Leone et al., 2005), pois *C. vittatus* está inserido em um microambiente completamente diferenciado dos outros crustáceos, o qual é constituído pela concha. Este microambiente faz com que a enzima tenha um comportamento específico frente às condições proporcionadas pela concha.

Além disso, este trabalho agrega informações relevantes relacionadas ao grupo dos Decapoda, que em conjunto com os resultados obtidos pelo nosso grupo (Leone et al., 2005), fornece dados essenciais sobre o papel da (Na⁺,K⁺)-ATPase nos processos metabólicos e de osmorregulação nos crustáceos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIEL, H. et al. Role of the intracellular domain of the β subunit in NaK pump function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999,1418: 85-96.
- APELL, H.J.; SCHNEEBERGER, A. & SOKOLOV, V.S. Partial reactions of the Na,K-ATPase: kinetic analysis and transport properties. *Acta Physiol. Scand.* 1998, 163: 235-245.
- ARGUELLO, J.M. et al. Functional role of oxygen-containing residues in the fifth transmembrane segment of the Na,K-ATPase alpha subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999a, 364: 254-263.
- ARYSTARKHOVA, E. et al. The gamma subunit modulates Na⁺ and K⁺ affinity of the renal (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 33183-33185.
- ASAMI, M. et al. Quantification of the Na⁺/K⁺-pump in solubilized tissue by the ouabain binding method coupled with high-performance gel chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1240: 55-64.
- ASKARI, A.; KAKAR, S.S. & HUANG, W. Ligand binding sites of the ouabain-complexed (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1988, 263: 235-242.
- ASKEW, G.R. & LINGREL, J.B. Identification of an amino acid substitution in human alpha 1 (Na⁺,K⁺)-ATPase which confers differentially reduced affinity for two related cardiac glycosides. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 24120-24126.
- BACH, C.; HAZLETT, B. and RITTSCHOF, D. Effects of interspecific competition on fitness of the hermit crab *Clibanarius tricolor*. *Ecology* 1976, 57: 579-586.
- BAR SHIMON, M.; GOLDSHLEGER, R. & KARLISH, S.J.D. Specific Cu²⁺-catalyzed oxidative cleavage of (Na⁺,K⁺)-ATPase at the extracellular surface. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 34190-34195.
- BARRA, J.A. & PÉQUEUX, A.J.R. Ultrastructural and biochemical localization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in salt-transporting gills of the Chinese crab. In: Comparative physiology of environmental adaptations. Abstracts of the 8th Conference ESCPB, 1986, p.21, ESCPB Publ. Strasbourg, France.
- BAXTER-LOWE, L. A. et al. Molecular cloning of the (Na⁺,K⁺) – ATPase α -subunit in developing brine-shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett* 1989, 257:181-187.
- BEAUGÉ, L. & BERBERIAN, G. The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and the Na⁺ K⁺ pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 727: 336-50.

- BEAUGÉ, L.A.; GADSBY, D.C. & GARRAHAN, P.J. (Na⁺,K⁺)-ATPase and related transport ATPases. Structure, mechanism, and regulation. **Ann. N. Y. Acad. Sci. USA**, 1997, 834: XV-XVIII.
- BEGGAH, A. T.; JAUNIN, P. & GEERING, K. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1997, 272:10318-26.
- BÉGUIN, P. et al. The γ subunit is a specific component of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and modulates its transport function. **EMBO J.** 1997, 16: 4250-4260.
- BÉGUIN, P. et al. Membrane integration of (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunits and β -subunit assembly. **J. Biol. Chem.** 1998a, 273: 24921-24931.
- BÉGUIN, P. et al. Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly. **Mol Biol Cell.** 2000 May; 11(5):1657-72.
- BÉGUIN, P. et al. FXYD7 is a brain-specific regulator of Na,K-ATPase alpha1-beta-isoenzymes. **EMBO J.** 2002, 21: 3264-3273.
- BERBERIAN, G. & BEAUGÉ, L. Phosphatase-activity and potassium-transport in liposomes with (Na⁺,K⁺)-ATPase incorporated. **Biochim. Biophys. Acta** 1992, 1103: 85-93.
- BLANCO, G. & MERCER, R.W. Isozymes of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **Am. J. Physiol. - Renal Physiol.** 1998, 44: F633-F650.
- BLANCO, G.; SANCHEZ, G. & MERCER, R.W. Differential regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. **Arch. Biochem. Biophys.** 1998, 359: 139-150.
- BLANCO, G. et al. The alpha 4 isoform of the (Na⁺,K⁺)-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **J Histochem. Cytochem.** 2000, 48: 1023-1032.
- BONNAFOUS, J.C.; DORNAND, J. & MANI, J.C. Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate cyclase determination. **Biochim. Biophys. Acta** 1982, 720: 235-241.
- BONVALET, J.P. Regulation of sodium transport by steroid hormones **Kidney Int. Suppl.** 1998, 65: S49-S56.
- BORGATTI, A.R. et al. Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of a microsomal Mg²⁺-ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) **Comp. Biochem. Physiol.** 1985, 81A: 127-135.
- BÖTTCHER, K. & SIEBERS, S. Biochemistry, localization, and physiology of carbonic anhydrase in the gills of euryhaline crabs. **J. Exp. Zool.** 1993, 265: 398-409.

- BOXENBAUM, N. et al. Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit. **J. Biol. Chem.** 1998, 273: 23086-23092.
- CAMERON, J.N. & BATTERTON C.V. Antennal gland function in the freshwater crab *Callinectes sapidus*: water, electrolyte acid-base and ammonia excretion. **J. Comp. Physiol. B** 1978, 123:143-148.
- CASTILLE, F.L. & LAWRENCE A.L. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 1981, 68A: 75-80.
- COELHO, P.A. & RAMOS, R.A. A constituição e a distribuição da fauna de decápodos do litoral leste da América do Sul entre as latitudes 5° N e 39° S. **Trabls. Oceanogr. Univ. Fed.PE.** 1972, 13: 133-326.
- COPPI, M.V.; COMPTON, L.A. & GUIDOTTI, G. Isoform-specific effects of charged residues at borders of the M1-M2 loop of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit. **Biochemistry**. Feb 1999, 23;38(8):2494-505.
- CORTAS, N. & EDELMAN, I.S. Isolation of two isoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase from *Artemia salina*: kinetic characterization. **Prog. Clin. Biol. Res.** 1988, 268A: 287-292.
- CORTAS, N. et al. Isoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue distribution and kinetic characterization. **J. Membr. Biol.** 1989, 108: 187-195.
- CRAMBERT, G. et al. Transport and pharmacological properties of nine different human (Na⁺,K⁺)-ATPase isozymes. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 1976-1986.
- CROYLE, M.L.; WOO, A.L. & LINGREL, J.B. Extensive random mutagenesis analysis of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity. Implications for ouabain binding. **Eur. J. Biochem.** 1997, 248: 488-495.
- D'ORAZIO, S.E. & HOLLIDAY, C.W. Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. **Physiol. Zool.** 1985, 58: 364-373.
- DAFNIS, E. & SABATINI, S. Biochemistry and pathophysiology of vanadium. **Nephron** 1994, 67: 133-143.
- DAVIS, R.L. & ROBINSON, J.D. Substrate sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: pertinence of the adenine and fluorescein binding sites. **Biochim. Biophys. Acta** 1988, 953: 26-36.
- DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochem. J.** 1953, 55: 170-171.

- DONNET, C.; ARYSTARKHOVA, E. & SWEADNER, K.J. Thermal denaturation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and γ subunit association with the C-terminal domain. **J. Biol. Chem.** 2001, 276: 7357-7365.
- DORIS, P.A. Regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by endogenous ouabain-like materials. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 1994, 205:202-212.
- DORIS, P.A. & BAGROV, A.Y. Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 1998, 218: 156-165.
- DURAN, M.J. et al. The isoform-specific region of the (Na⁺,K⁺)-ATPase catalytic subunit: role in enzyme kinetics and regulation by protein kinase C. **Biochemistry**. Dec 2004, 28;43(51):16174-83.
- EMERY, A.M. et al. Insect (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Insect Physiol.** 1998, 44:197-209.
- ERDMANN, E. & SCHONER, W. Ouabain-receptor interactions in (Na⁺,K⁺)-ATPase preparations. II Effects of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. **Biochim. Biophys. Acta** 1973, 330: 302-315.
- ESCALANTE, R.; GARCIA-SAEZ, A. & SASTRE, L. In situ hybridization analyses of (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha-subunit expression during early larval development of *Artemia franciscana*. **J. Histochem. Cytochem.** 1995, 43: 391-399.
- ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of (Na⁺,K⁺)-ATPase: Molar and specific activity, protein determination. **Methods Enzymol.** 1988, 156: 105-115.
- EWART, H.S. & KLIP, A. Hormonal regulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. **Am. J. Physiol.** 1995, 269: C295-311.
- FEDOSOVA, N.U.; CORNELIUS, F. & KLODOS, I. E₂P phosphoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. **Biochem.** 1998, 37:13634-13642.
- FENG, J. & LINGREL, J.B. Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. **Biochem.** 1994, 33: 4218-4224.
- FERRANDI, M. & MANUNTA, P. Ouabain-like factor: is this the natriuretic hormone? **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** 2000, 9: 165-171.
- FOREST, J. & SAINT LAURENT, M.; Campagne de la "Calypso" au large des cotes atlantiques de l'Amérique du Sud (1961-1962). 6. Crustacés Décapodes: Pagurides. **Ann. Inst. Océanogrph.** 1968, 45: 47-169.
- FOTHERINGHAM, N. Structure of seasonal migrations of the littoral hermit crab *Clibanarius vittatus* (Bosc). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 1975, V.18, p 47-53.

- FOTHERINGHAM, N. Effects of shell stress on the growth of hermit crabs. **J. exp. Mar. Biol. Ecol.** 1976, 23: 655-671.
- FRANSOZO, M.L.N.; FRANSOZO, A. & HEBLING, N.J. Estrutura populacional e determinação do tamanho da concha em 4 espécies de ermitões (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) do litoral paulista. **Biotemas**, 1991, 4: 135-148.
- FURRIEL, R.P.M.; MCNAMARA, J.C. & LEONE, F.A. Characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. **Comp. Biochem. Physiol.** 2000, 126B: 303-315.
- FURRIEL, R.P.M.; MCNAMARA, J.C & LEONE, F.A. Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in hyperegulating crustacea. **Comp. Biochem. Physiol.** 2001, 130A: 665-676.
- FURRIEL, R. P. M. et al. Modulation of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. **Journal of experimental Zoology** 2004, 301A:63-74.
- GACHE, C.; ROSSI, B. & LAZDUNSKI, M. (Na⁺,K⁺)-Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes, cooperativity and control. **Eur. J. Biochem.** 1976, 65: 293-306.
- GACHE, C.; ROSSI, B. & LAZDUNSKI, M. Mechanistic analysis of the (Na⁺,K⁺)-ATPase using new pseudosubstrates. **Biochem.** 1977, 16: 2957-2965.
- GACHE, C. et al. Pseudo-substrates to analyze the reaction mechanism of the Na,K-ATPase. In: JC Skou (Ed) & JG Norby (Ed) Na,K-ATPase, Structure and Kinetics. **Academic Press.** 1979, NY 301-314.
- GARCIA SAEZ, A.; PERONA, R. & SASTRE, L. Polymorphism and structure of the gene coding for the alpha subunit of the *Artemia franciscana*. **Biochem. J.** 1997, 321:509-518.
- GARRAHAN, P. J. & REGA, A. F. Potassium activated phosphatase from human red blood cells. The effects of p-nitrophenylphosphate on cation fluxes. **J. Physiol.** 1972, 233:595-617.
- GATTO, C.; LUTSENKO, S. & KAPLAN, J.H. Chemical modification with dihydro-4,4'-didsothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate reveals the distance between K 480 and K 501 in the ATP-binding domain of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Arch. Biochem. Biophys.** 1997, 340: 90-100.
- GATTO, C. et al. Cys(577) is a conformationally mobile residue in the ATP-binding domain of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha-subunit. **J. Biol. Chem.** 1999, 274: 24995-25003.
- GATTO, C.; MCLOUD, S. M. & KAPLAN, J. H. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** 2001, 281C: 982-92.

- GEERING, K. Topogenic motifs in P-type ATPases. **J. Membr. Biol.** 2000, 174: 181-190.
- GEERING, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. **J. Bioenerg. Biomemb.** 2001, 33: 425-438.
- GEERING, K et al. FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sc. USA*, 2003, 986: 388-394.
- GLYNN, I.M. The (Na⁺,K⁺)-transporting adenosine triphosphatase. In: A.N. Martonosi (Ed), **The enzymes of biological membranes**. 1985, Vol 3, pp 35-114, Plenum Press, New York.
- GLYNN, I.M. & KARLISH, S.J.D. Occluded cations in active transport. **Annu. Rev. Biochem.** 1990, 59: 171-205.
- GOLDSHLEGGER, R. et al. The effect of membrane potential on the mammalian sodium-potassium pump reconstituted into phospholipid vesicles. **J. Physiol.** 1987, 387: 331-355.
- GOLDSHLEGER, R. & KARLISH, S.J.D. The energy transduction mechanism of (Na⁺,K⁺)-ATPase studied with iron-catalyzed oxidative cleavage. **J. Biol. Chem.** 1999, 274: 16213-16221.
- GORDON, J.A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. **Methods Enzymol.** 1991, 201: 477-482.
- GREENAWAY, P.; Terrestrial adaptations in the Anomura (Crustacea: Decapoda). **Memoirs of Museum Victoria** 2003, 60, 13-26.
- GRISHAM, C.M. & MILDVAN, A.S. Magnetic resonance and kinetic studies of the mechanism of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.** 1974, 249: 3187-3197.
- HANSEN, O. Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺,K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. **Pharmacol. Rev.** 1984, 36:143-163.
- HASLER, U. et al. Role of the beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1998, 273: 30826-30835.
- HASLER, U. et al. Structural and functional features of the transmembrane domain of the (Na⁺,K⁺)-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. **J. Biol. Chem.** 2001, 276: 16356-16364.
- HAZLETT, B.A. & BARON, L.C. Influence of shells on mating behavior in the hermit crab *Calcinus tibicen* **Behav. Ecol. Sociobiol.** 1989, 24: 369-376.
- HE, S.W. et al. The alpha(1)- and alpha(2)-isoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. **Am. J. Physiol.** 2001, 281: R917-R925.

- HENRY, R.P. & WHEATLY, M.G. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. **Amer. Zool.** 1992, 32: 407-416.
- HERRERA V.L. et al. Three differentially expressed (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications. **J. Cell. Biol.** 1987, Oct; 105:1855-65.
- HOFFMAN, J.F. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. **Am. J. Med.** 1966, 41: 666-680.
- HOLLIDAY, C.W. Salinity-induced changes in gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. **J. Exp. Zool.** 1985, 233: 199-208.
- HORISBERGER, J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology** 2004, 19:377-387.
- HU, Y.K. & KAPLAN, J.H. Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein - The topology of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha-subunit. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 19185-19191.
- HUANG, B. et al. Human corneal endothelial cell expression of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase isoforms. **Arch. Ophthalmol.** 2003 Jun;121:840-845.
- JACOBSEN, M.D.; PEDERSEN, P.A. & JORGENSEN, P.L. Importance of (Na⁺,K⁺)-ATPase Residue R1-Arg544 in the Segment Arg544-Asp567 for High-Affinity Binding of ATP, ADP, or MgATP. **Biochem.** 2002, 41: 1451-1456.
- JORGENSEN, P.L. et al. Transport-linked conformational changes in (Na⁺,K⁺)-ATPase. Structure-function relationships of ligand binding and E1-E2 conformational transitions. **Ann. N.Y. Acad. Sci. USA** 1997, 834: 161-174.
- JORGENSEN, P.L. & PEDERSEN, P.A. Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.** 2001 May 1;1505(1):57-74.
- JORGENSEN, P.L. et al. Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. **Biochim. Biophys. Acta** 1998a, 1365: 65-70.
- JORGENSEN, P.L. et al. Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Acta Physiol. Scand.** 163, Suppl 1998b, 643: 79-87.
- JORGENSEN, P.L.; HAKANSSON, K.O. & KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of (Na⁺,K⁺)-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu. Rev. Physiol.** 2003, 65: 817-849.
- KAPLAN, J.H., HU, Y.K. & GATTO, C. Conformational coupling: The moving parts of an ion pump. **J. Bioenerg. Biomembr.** 2001, 33: 379-385.

- KAPLAN, J.H. Biochemistry of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Annu. Rev. Biochem.** 2002, 71:511-535.
- KARLISH, S.J.D. Organization of the membrane domain of the Na,K-pump. **Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA)** 1997, 834: 30-44.
- KASTURI, R. et al. Identification of a model cardiac glycoside receptor: comparisons with (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Biochem.** 1998, 37: 6658-6666.
- KAWAMURA, M. & NAGANO, K. Evidence for essential disulfide bonds in the beta-subunit of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** 1984, 774:188-92.
- KELLOG, C.W. Gastropod shells: a potentially limiting resource for hermit crabs. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 1976, 22: 101-111.
- KIRLEY, T.L. Determination of three disulfide bonds and one free sulphydryl in the β subunit of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1989, 264: 7185-7192.
- KIRLEY, T. L. Inactivation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. **J. Biol. Chem.** 1990, 265: 4227-32.
- KOENDERINK, J.B. et al. High-affinity ouabain binding by a chimeric gastric H⁺,K⁺-ATPase containing transmembrane hairpins M3-M4 and M5-M6 of the alpha(1)-subunit of rat (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2000, 97: 11209-11214.
- KORMANIK, G.A. & CAMERON, J.N. Ammonia excretion in the seawater bluecrab (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion and not Na⁺/NH₄⁺ exchange. **J. Comp. Physiol.** 1981, 141B: 457-462.
- KOROLEFF, F. Determination of ammonia, Methods of seawater analysis, K. Grasshoff, M. Ehrhart, K. Kremling (eds.), **Verlag Chemie**, Weinheim, 1983, pp 150-151.
- KOSTER J.C. et al. Substitutions of glutamate 781 in the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased affinity for ATP. **J. Biol. Chem.** 1996, 271:2413-21.
- KNEPPER, M.A.; PACKER, R.; GOOD, D.W. Ammonium transport in the Kidney. **Physiol. Ver.** 1989, 69: 179-249.
- KRAMER, H.J. et al. Ouabain-like factors in human urine: identification of a (Na⁺,K⁺)-ATPase inhibitor as vanadium-diascorbate adduct. **Clin. Exp. Hyperten.** 1998, 20: 557-571.
- KRUMSCHEID, R. et al. The phosphatase activity of the isolated H4-H5 loop of (Na⁺,K⁺)-ATPase resides outside its ATP binding site. **Eur. J. Biochem.** Oct; 2004, 271: 3923-36.

- KURTZ, I. & BALABAN, R.S. Ammonium as a substrate for (Na⁺,K⁺)-ATPase in rabbit proximal tubules. **Am. J. Physiol.** 1986, 250: F497-F502.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970, 227: 680-685.
- LEONE, F.A. et al. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Ed.** 2005a, 33: 399-403.
- LEONE, F.A. et al. (Na⁺,K⁺)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. **Trends Comp. Biochem. Physiol.** 2005b, 11: 1-15.
- LEVENSON, R. Isoforms of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: family members in search of function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 1994, 123: 1-45.
- LIGNOT, J.H.; SPANINGS-PIERROT, C. & CHARMANTIER, G. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. **Aquaculture** 2000, 191: 209-245.
- LIN H.C.; SU Y.C. & SU S.H. A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: *Uca*). **Zoolog Sci.** Jun; 2002, 19(6):643-50.
- LINGREL, J.B. & KUNTZWEILER, T. (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1994, 269: 19659-19662.
- LINGREL, J.B. et al. Cation and cardiac glycoside binding sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Ann. N.Y. Acad. Sci. USA** 1997, 834: 194-206.
- LINGREL, J.B. et al. Ligand Binding sites of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Acta Physiol. Scand.** 1998, 163: 69-77.
- LOVETT, D.L. et al. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol.** 2001, 128A: 299-306.
- LOWERY, W.A. & NELSON, W.G. Population ecology of the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda: Diogenidae) at Sebastian Inlet, Florida. **J. Crust. Biol.** 1988, 8: 548-556.
- LUCU, C. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. **Comp. Biochem. Physiol.** 1990, 97A: 297-306.
- LUCU, C. Ion transport in the gill epithelium of aquatic crustacea. **J. Exp. Zool.** 1993, 265: 378-386.
- LUCU, C.; DEVESCOVI, M. & SIEBERS, D. Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? **J. Exp. Zool.** 1989, 249: 1-5.

- LUCU, C. & TOWLE, D.W. (Na⁺,K⁺)-ATPase in gills of aquatic crustacean. **Comp. Biochem. Physiol.** 2003, 135A: 195-214.
- LUTSENKO, S.; ANDERKO, R. & KAPLAN, J.H. Membrane disposition of the M5-M6 hairpin of (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunit is ligand dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1995, 92: 7936-40.
- MACLENNAN, D. H. & GREEN, N. M. Structural biology. Pumping ions. **Nature** 2000, 405: 633-634.
- MALLERY, C.H. A carrier enzyme basis for ammonium excretion in teleost gill. NH₄⁺-stimulated Na-dependent ATPase activity in *Opsanus beta*. **Comp. Biochem. Physiol.** 1983, 74A: 889-897.
- MALIK, N. et al. Identification of the mammalian (Na⁺,K⁺)-ATPase β_3 subunit. **J. Biol. Chem.** 1996, 271: 22754-22758.
- 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* 1983, pp. 53-161 Academic Press New York New York.
- MANTELATTO, F.L.M. & SOUSA, L.M., Population biology of the hermit crab *Paguristes tortugae* Schmitt, 1933 (Anomura, Diogenidae) from Anchieta Island, Ubatuba, Brazil. **Nauplius** 2000, 8: 185-193.
- MARINI, A.M. et al. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat. Genet.* 2000, 26: 341-344.
- MARTIN, D.W. & SACHS, J.R. Ligands presumed to label high affinity and low affinity ATP binding sites do not interact in an (alpha beta)(2) diprotomer in duck nasal gland (Na⁺,K⁺)-ATPase, nor do the sites coexist in native enzyme. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 24512-24517.
- MARTIN, D.W. et al. Alpha beta protomers of (Na⁺,K⁺)-ATPase from microsomes of duck salt gland are mostly monomeric: Formation of higher oligomers does not modify molecular activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2000, 97: 3195-3200.
- MARTIN-VASALLO, P. et al. Identification of a putative isoform of the (Na⁺,K⁺)-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. **J. Biol. Chem.** 1989, 264:4613-8.
- MASUI, D.C. et al. 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.** 2002, 132C: 471-482.
- MASUI, D. C. et al. Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K⁺-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 2003, 134:631-640.

- MASUI, D. C. et al. K⁺-phosphatase activity of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the α -subunit. **J. Exp. Zool.** 2005a, 303A: 294-307.
- MASUI, D. C. et al. Gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 2005b, 37: 2521-2535.
- MCDONOUGH, A.A. & FARLEY, R.A. Regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase activity. **Curr. Opin. Nephrol. Hyper.** 1993, 2: 725-734.
- MACGREGOR, S.E. & WALKER, J.M. Inhibitors of the Na⁺,K⁺-ATPase. **Comp. Biochem. Physiol.** 1993, 105C: 1-9.
- MCLAUGHLIN, P.A. and LEMAITRE, R. The hermit crabs. **Contributions to Zoology**, 1997, 67(2): 79-123.
- MELO, G.A.S. Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda do Litoral Brasileiro, 1999, 56-57.
- MENSE, M. et al. Residues of the fourth transmembrane segments of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and the gastric H,H-ATPase contribute to cation selectivity. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 1749-1756.
- MERCER, R.W. et al. (1993) Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Cell. Biol.** 1993, 121: 579-586.
- MIDDLETON, J.P. Direct regulation of the Na,K pump by signal transduction mechanisms. **Miner. Electrolyte Metab.** 1996, 22: 293-302.
- MIDDLETON, D.A. et al. Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. **PNAS** 2000, 97: (25) 13602-13607.
- MILLER, R.P. & FARLEY, R.A. β -subunit of (Na⁺,K⁺)-ATPase contains three disulfide bonds. **Biochem.** 1990, 29: 1524-1532.
- MINOR, N.T. et al. The gamma subunit of the (Na⁺,K⁺)-ATPase induces cation channel activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1998, 95: 6521-6525.
- MO, J.L. & GREENAWAY, P. cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. **Comp. Biochem. Physiol.** 2001, 129A: 843-849.
- MOBASHERI, A. (Na⁺,K⁺)-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci. Reports** 2000, 20: 51-91.
- MOLLER, J.V.; JUUL, B. & LE MAIRE, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. **Biochim. Biophys. Acta** 1996, 1286: 1-51.
- NARCHI, W. Estudos Práticos – Crustáceos I. 1973, 105-116.

- NECHAY, B.R. Mechanisms of action of vanadium. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1984, 24: 501-524.
- NEUFELD, G.J.; HOLLIDAY, C.W. & PRITCHARD, J.B. Salinity adaptation of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **J. Exp. Zool.** 1980, 211: 215-224.
- NIELSEN, J.M. Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K⁺ ions at equilibrium in renal (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Biochem.** 1998, 37: 1961-1968.
- ONKEN, H. & PUTZENLECHNER, M. A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. **J. Exp. Biol.** 1995, 198: 767-774.
- ONKEN, H. & RIESTENPATT, S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** 1998, 119A: 883-893.
- OR, E. et al. Specific cross-links between fragments of proteolyzed (Na⁺,K⁺)-ATPase induced by o-phthalaldehyde. **Biochem.** 1998, 37: 8197-8207.
- PALASIS, M. et al. Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the (Na⁺,K⁺)-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. **J. Biol. Chem.** 1996, 271: 14176-14182.
- PEDEMONTE, C.H. Regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase transport activity by protein kinase C. **J. Memb. Biol.** 1997, 155: 219-227.
- PEDERSEN, P.A.; JORGENSEN, J.R. & JORGENSEN, P.L. Importance of conserved alpha-subunit segment (709) GDGVND for Mg²⁺ binding, phosphorylation, and energy transduction in (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 37588-37595.
- PEDERSEN, P.L. Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. **J. Bioenerg. Biomembr.** 2005 37:349-357.
- PÉQUEUX, A. & GILLES, R. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. **J. Exp. Biol.** 1981, 92: 173-186.
- PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **J. Crust. Biol.** 1995, 15: 1-60.
- POST, R.L. Active transport and pumps. **Current Topics in Membranes** 1999, 48: 397-417.
- POST, R.L. & JOLLY P.C. The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. **Biochim. Biophys. Acta.** 1957, 25:118-28.

- PRESSLEY, T.A. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. **Miner. Electrolyte Metab.** 1996, 22: 264-271.
- PRESSLEY, T.A.; DURAN, M.J. & PIERRE, S.V. Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the Na,K-pump. **Front. Biosci.** 2005, Sep 1;10:2018-26.
- PROVENZANO, A.J.Jr. Notes on Bermuda hermit crabs (Crustacea: Anomura). **Bull. Mar. Sci.** 1960, 10: 117-124.
- READ, S.M. & NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analyt. Biochem.** 1981, 116: 53-64.
- REBELO, M.F.; SANTOS, E.A. & MONSERRAT, J.M. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. **Comp. Biochem. Phys.** 1999, 122 A: 429-435.
- REGNAULT, M. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. **Biol. Rev.** 1987, 62: 1-24.
- REESE, E.S. Behavioral adaptations of intertidal hermit crabs. **Am. Zool.** 1969, 9: 343-355.
- RICE, W.J. et al. Structure of (Na⁺,K⁺)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E-1 and E-2 states. **Biophys. J.** 2001, 80: 2187-2197.
- RIESTENPATT, S., ONKEN, H., SIEBERS, D. Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: Voltage-clamp and ion-flux studies. **J. Exp. Biol.** 1996, 199: 1545-1554.
- ROBINSON, J.D. Interactions between monovalent cations and the (Na⁺ + K⁺)- dependent adenosine triphosphatase. **Arch. Biochem. Biophys.** 1970, 139: 17-27.
- ROBINSON, J.D. Substituting manganese for magnesium alters certain reaction properties of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** 1981, 642: 405-417.
- ROBINSON, J.D. & PRATAP, P.R. (Na⁺,K⁺)-ATPase: modes of inhibition by Mg²⁺. **Biochim. Biophys. Acta** 1991, 1061: 267-278.
- ROSSI, B.; GACHE, C. & LAZDUNSKI, M. Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na⁺,K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. **Eur. J. Biochem.** 1978, 85: 561-570.
- SABOURIN, T.D. & STICKLE, W.B. Respiratory and osmoregulatory responses of the hermit crab, *Clibanarius vittatus* (Bosc), to salinity changes. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 1980, 46: 241.

- SCHMALZING, G.; RUHL, K. & GLOOR, S.M. Isoform-specific interactions of (Na⁺,K⁺)-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1997, 94: 1136-1141.
- SCHNEEBERGER, A. & APELL, H.J. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. **J. Membr. Biol.** 1999, 168: 221-228.
- SCHEINER-BOBIS, G. & FARLEY, R.A. Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1994, 1193: 226-234.
- SCHEINER-BOBIS, G. & SCHREIBER, S. Glutamic acid 472 and lysine 480 of the sodium pump alpha 1 subunit are essential for activity. Their conservation in pyrophosphatases suggests their involvement in recognition of ATP phosphates. **Biochem.** 1999, 38: 9198-9208.
- SCHONER, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes** 2000, 108: 449-454.
- SEGALL, L.; DALY, S.E. & BLOSTEIN, R. Mechanistic basis for kinetic differences between the rat alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 2001, 276: 31535-31541.
- SEOK, J.H. et al. Regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rat. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 1998, 46: 667-672.
- SHAINSKAYA, A. et al. Entrance port for Na⁺ and K⁺ ions on (Na⁺,K⁺)-ATPase in the cytoplasmic loop between transmembrane segments M6 and M7 of the alpha subunit - Proximity of the cytoplasmic segment of the beta subunit. **J. Biol. Chem.** 2000, 275: 2019-2028.
- SHAMRAJ, O.I. & LINGREL, J.B. A putative fourth (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit gene is expressed in testis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1994, 91: 12952-12956.
- SHARP, M.S. & NEFF, J.M. Steady state hemolymph osmotic and chloride ion regulation and percent body water in *Clibanarius vittatus* (Decapoda, Anomura) from the Texas Gulf coast. **Comp. Biochem, Physiol.** 1980, 66A: 455.
- SHULL, G.E.; LANE, L.K. & LINGREL, J.B. Amino-acid sequence of the β subunit of the (Na⁺,K⁺)-ATPase deduced from a cDNA. **Nature** 1986, 321: 429-431.
- SHUMWAY, S.E. Osmotic balance and respiration in the hermit crab *Pagurus bernhardus*, exposed to fluctuating salinities. **J. Mar. Biol. Ass. UK** 1978, 58: 869-876.
- SHYJAN, A.W. et al. Differential expression and enzymatic properties of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha 3 isoenzyme in rat pineal glands. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 1990, 87: 1178-82.

- SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta**. 1957, 23:394-401.
- SKOU, J.C. Further investigations on a Mg²⁺+Na⁺-activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. **Biochim. Biophys. Acta** 1960, 42: 6-23.
- SKOU, J.C. & ESMANN, M. The (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Bioenerg. Biomemb.** 1992, 24: 249-261.
- SKOU, J.C. The identification of the sodium-potassium pump (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed.** 1998, 37: 2320-2328.
- SPIGHT, T.N. Why small hermit crabs have large shells. **Res. Pop. Ecol.** 1985, 27: 39-54.
- SWEADNER, K.J. Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. **J. Biol. Chem.** 1979 254:6060-6067.
- SWEADNER, K.J. Isozymes of the Na,K-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** 1989, 988: 185-220.
- SWEADNER, K. J. & DONNET, C. Structural similarities of (Na⁺,K⁺)-ATPase and SERCA the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Biochem. J.** 2001, 356: 685-704.
- SWEENEY, G. & KLIP, A. Regulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase by insulin: Why and how? **Mol. Cell. Biochem.** 1998, 182: 121-133.
- TENTES, I. & STRATAKIS, E. Partial purification and properties of (Na⁺,K⁺)-ATPase from *Potamon potamios*. **Comp. Biochem. Physiol.** 1991, 100C: 619-624.
- THERIEN, A.G. & BLOSTEIN, R. Na⁺/K⁺ antagonism at cytoplasmic sites of (Na⁺,K⁺)-ATPase: a tissue-specific mechanism of sodium pump regulation. **Am. J. Physiol.** 1999, 277: C891-C898.
- THERIEN, A.G. & BLOSTEIN, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. **Am. J. Physiol.** 2000, 279: C541-C566.
- THERIEN, A.G. et al. Tissue-specific *versus* isoform-specific differences in cation activation kinetics of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1996, 271: 7104-7112.
- THERIEN, G. et al. Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. **J. Biol. Chem.** 1997, 272: 32628-32634.
- THOENGES, D. Tight binding of bulky fluorescent derivatives of adenosine to the low affinity E2ATP site leads to inhibition of (Na⁺,K⁺)-ATPase. Analysis of structural

- requirements of fluorescent ATP derivatives with a Koshland-Nemethy-Filmer model of two interacting ATP sites. **J. Biol. Chem.** 1999, 274: 1971-1978.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1979, 76: 4350-4354.
- TOWLE, D.W. & KAYS, W.T. Basolateral localization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. **J. Exp. Zool.** 1986, 239: 311-318.
- TOWLE, D.W. & HOLLELAND, T. Ammonium ion substitutes for K⁺ in ATP-dependent Na⁺ transport by basolateral membrane-vesicles. **Am. J. Physiol.** 1987, 252: R479-R489.
- TOWLE, D.W. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. **J. Exp. Zool.** 1993, 265: 387-396.
- TOWLE, D.W. Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. **Amer. Zool.** 1997, 37: 575-584.
- TOWLE, D.W. Osmoregulation by gills of aquatic animals. **Amer. Zool.** 1999, 39: 35.
- TOWLE, D.W.; PALMER, G.E. & HARRIS, J.L. Role of gill (Na⁺,K⁺)-dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. **J. Exp. Zool.** 1976, 196: 315-321.
- TOWLE, D.W. et al. Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: Molecular cloning, expression, and tissue distribution. **J. Exp. Biol.** 1997, 200: 1003-1014.
- TOYOSHIMA, C. et al. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution. **Nature** 2000, 405: 647-655.
- TOYOSHIMA, C. & MIZUTANI, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. **Nature** 2004, 430: 529-535.
- VANCE, R.R. Competition and mechanism of coexistence in three sympatric species of intertidal hermit crabs. **Ecology** 1972, 53: 1062-1074.
- VIGNERY, A. et al. Detection of the (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha 3-isoform in multinucleated macrophages. **Am. J. Physiol.** 1991, 260: F704-F709.
- VILSEN, B. Mutant Phe788 -> Leu of the (Na⁺,K⁺)-ATPase is inhibited by micromolar concentrations of potassium and exhibits high Na⁺-ATPase activity at low sodium concentrations. **Biochem.** 1999, 38: 11389-11400.
- XIE, Z. L. et al. Similarities and differences between the properties of native and recombinant Na⁺/K⁺-ATPases. **Arch. Biochem. Biophys.** 1996, 330: 153-62.

- WALL, SM. Ammonium transport and the role of the (Na⁺,K⁺)-ATPase **Miner. Electrol. Metab.** 1996, 22: 311-317.
- WANG, S.G. & FARLEY, R.A. Valine 904, tyrosine 898, and cysteine 908 in (Na⁺,K⁺)-ATPase alpha subunits are important for assembly with beta subunits. **J. Biol. Chem.** 1998 Nov 6; 273(45): 29400-29405.
- WARD, D.G. & CAVIERES, J.D. Photoinactivation of fluorescein isothiocyanate-modified (Na⁺,K⁺)-ATPase by 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) 8-azidoadenosine 5'-diphosphate. **J. Biol. Chem.** 1998a, 273: 14277-14284.
- WARD, D.G. & CAVIERES, J.D. Affinity labeling of two nucleotide sites on (Na⁺,K⁺)-ATPase using 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) 8-azidoadenosine 5'-[alpha-P-32] diphosphate (TNP-8N(3)-[alpha-P-32]ADP) as a photoactivatable probe. Label incorporation before and after blocking the high affinity ATP site with fluorescein isothiocyanate. **J. Biol. Chem.** 1998b, 273: 33759-33765.
- WEIHRAUCH, D. et al. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. **J. Comp. Physiol.** 1999, 169B: 25-37.
- WEIHRAUCH, D. et al. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. **J. Comp. Physiol.** 1998, 168B: 364-376.
- WEIHRAUCH, D. 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.** 2002, 205: 2765-2775.
- WEIHRAUCH, D.; MORRIS, S. & TOWLE, D. W. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. **J. Exp. Biol.** 2004, 207, 4491-4504.
- WERNICK, A.M.; Mcnamara, J.C.; MOREIRA, G.S. Variation in hemolymph and shell water osmotic concentrations during low salinity exposure in the hermit crab *Isocheles sawayai* (Decapoda, Anomura). **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1984, 17,492-492.
- WERNICK, A.M. & MOREIRA, G.S. Osmoregulatory and respiratory responses of the hermit crab *Isocheles sawayai* to salinity changes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1985, 18: A751- A751.
- WILLIAMS, A.B. Shrimps, lobsters and crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United State, Maine to Florida. **Smithsonian Institute Press, Washington, EUA**, 1984, 550pp.
- YODA, A. & YODA, S. Interaction between ouabain and the phosphorylated intermediate of (Na⁺,K⁺)-ATPase. **Mol. Pharmacol.** 1982, 22: 700-705.

- YOUNG, A.M. & HAZLETT, T.L. Effect of salinity and temperature on larval development of *Clibanarius vittatus* (Bosc) (Crustacea-Decapoda-Diogenidae). **J Exp. Mar. Biol. Ecol.** 1978, 34: 131-141.
- YOUNG, A.M. Osmoregulation in three hermit crab species, *Clibanarius vittatus* (Bosc), *Pagurus longicarpus* Say and *P. pollicaris* Say (Crustacea: Decapoda; Anomura). **Comp. Biochem. Physiol.** 1979a, 63A: 377-382.
- YOUNG, A.M. Osmoregulation in larvae of the striped hermit crab *Clibanarius vittatus* (Bosc) (Decapoda, Anomura; Diogenidae). **Estuarine Coastal Mar. Sc.** 1979b, 9: 595-601.
- ZAMOFING, D.; ROSSIER, B.C. & GEERING, K. Role of the (Na⁺,K⁺)-ATPase β -subunit in the cellular accumulation and maturation of the enzyme as assessed by glycosilation inhibitors. **J. Membr. Biol.** 1988, 104: 69-79.
- ZAMOFING, D.; ROSSIER, B.C. & GEERING, K. Inhibition of N-glycosylation affects transepithelial Na⁺ but not (Na⁺,K⁺)-ATPase transport. **Am. J. Physiol.** 1989 May; 256(5 Pt 1):C958-66.
- ZARE, S. & GREENAWAY, P. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of (Na⁺,K⁺)-ATPase, and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 1998, 119A: 739-745.
- ZEISKE, W. et al. Invertebrate epithelial Na⁺ channels: Amiloride-induced current noise in crab gill. **Biochim. Biophys. Acta.** 1992, 1105: 245-252.