Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Processos osmorregulatórios no caranguejo *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae), um antigo invasor da água doce: estudo das atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais.”

Kelly Cristina Silva Firmino

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2009

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Processos osmorregulatórios no caranguejo *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae), um antigo invasor da água doce: estudo das atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais.”

Kelly Cristina Silva Firmino

Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Dissertação 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 MESTRE EM CIÊNCIAS – Área: Química

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

Firmino, Kelly Cristina Silva

“Processos osmorregulatórios no caranguejo *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae), um antigo invasor da água doce: estudo das atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais.”

Ribeirão Preto, 2009.
116 pág.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo

1. (Na,K)-ATPase. 2. V-ATPase. 3. *Dilocarcinus pagei*.
4. Brânquias. 5. Osmorregulação.

DEDICAÇÃO

Dedico à minha mãe e à minha irmã, pessoas essenciais que me deram todo o apoio e carinho para a conclusão desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes, pessoa muito especial e por quem tenho um grande afeto, obrigada pela paciente orientação e dedicação, que contribuiu muito para o meu conhecimento e crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leone, agradeço a sua colaboração profissional para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. John Campebell McNamara, e seu aluno Rogério, pela realização das coletas e colaboração científica na realização deste trabalho.

Ao Douglas Chodi Masui, pela inestimável ajuda, paciência e amizade.

Aos colegas do laboratório Nara, Sandra, Flávio, César, Thaís, Malson, Daniela, Raquel, João Carlos, Talita, Daiane, Luana, Rômulo e aos colegas dos laboratórios de vizinhos, pela amigável convivência.

À Ivana e ao Nilton, pelo suporte técnico e atenção.

Às minhas grandes amigas especiais Patrícia, Marcilene, Francielle, Francielen, Simoni, Juliana e Paula, que sempre estiveram presente, tanto nos melhores momentos, quanto nos mais difíceis.

Ao Anderson, obrigada pelo incentivo, pela amizade e companheirismo.

À minha amável família que me deu apoio nesta fase da minha vida.

Aos Docentes e Funcionários da Universidade de São Paulo: Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a fundação Capes pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Nome
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase	Adenosina-5'-trifosfatase
BCIP	5-bromo- 4-cloro- 3-indolilfosfato
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FEP	Fosfoenolpiruvato
FGQ	Fosfoglicerato quinase
GAF	3-fosfogliceraldeído dietil acetal
GAFDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico
$K_{0,5}$	Constante de dissociação aparente do complexo enzima - metal
K_I	Constante de dissociação aparente do complexo enzima- inibidor
K_M	Constante de Michaelis-Mentem
LDH	Lactato desidrogenase
M_r	Massa molecular
n_H	Coefficiente de Hill
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (Forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (Forma reduzida)
NBT	Nitroblue tetrazolium
Pi	fosfato inorgânico
PQ	Piruvato quinase
PNFF	p-Nitrofenilfosfato
PNFFase	p-Nitrofenilfosfatase
SDS	duodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade de atividade enzimática (nmol/min)
V	Velocidade máxima

RESUMO

Os crustáceos são originariamente marinhos; ao longo da evolução, diversas espécies invadiram ambientes de salinidades menores, chegando à água doce. A capacidade dos crustáceos colonizarem com sucesso o ambiente dulcícola depende do desenvolvimento de mecanismos eficientes de hiperosmorregulação.

A osmolalidade e a composição iônica da hemolinfa de um crustáceo, em meios diluídos, refletem o equilíbrio dinâmico entre a perda de íons por difusão e pela urina e sua reabsorção do meio externo, através das brânquias. A (Na,K)-ATPase branquial desempenha um papel chave no processo de captura de Na^+ a partir de ambientes diluídos e suas características cinéticas vem sendo investigadas recentemente, embora as enzimas de caranguejos dulcícolas sejam pouco conhecidas. Segundo o modelo atual, a afinidade por Na^+ é o parâmetro cinético mais variável entre as enzimas de diferentes espécies, refletindo a salinidade do habitat do animal, de modo que enzimas de espécies bem adaptadas à água doce apresentam afinidades maiores por Na^+ . Entretanto, vários resultados conflitantes têm sido relatados nos últimos anos. Recentemente, foi proposto que uma V-ATPase também desempenha papel essencial na captação de Na^+ através das brânquias dos crustáceos dulcícolas. Esta enzima ainda é praticamente desconhecida: suas características cinéticas não foram estudadas e a relação entre a magnitude da sua atividade e a salinidade do meio externo não está estabelecida.

Este projeto teve por objetivo a caracterização das enzimas (Na,K)-ATPase e V-ATPase das brânquias posteriores do caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei*, considerado um antigo invasor da água doce. A (Na,K)-ATPase foi caracterizada em animais mantidos em água doce, a fim de comparar suas propriedades cinéticas com aquelas das enzimas de outras espécies de caranguejos, habitantes de meios mais salinos, visando melhorar o entendimento das adaptações bioquímicas associadas à invasão da água doce. A V-ATPase foi caracterizada em animais mantidos em água doce ou expostos por diferentes intervalos de tempo à salinidade de 21‰ ou ainda aclimatados por 10 dias a diferentes salinidades (5-21‰), visando estabelecer uma relação entre a magnitude da atividade e a salinidade do meio, além de investigar os mecanismos de regulação da atividade da enzima.

A análise da fração microsomal branquial de *D. pagei* mantido em água doce em gradiente contínuo de sacarose mostrou dois picos protéicos (25-35% e 35-45% de sacarose), ambos com atividades K^+ -fosfatase, (Na,K)-ATPase e V-ATPase. Estes resultados indicam a presença de

frações de membrana com densidades distintas, apresentando, em ambos os casos, as principais bombas de íons envolvidas na captação de Na^+ . Estas membranas podem ser originárias de locais distintos do epitélio branquial posterior assimétrico deste caranguejo.

A análise por Western blotting revelou duas bandas imuno-específicas (M_r 116 kDa e 105 kDa) correspondentes à subunidade α da (Na,K)-ATPase, sugerindo a presença de duas isoformas nas brânquias posteriores do animal.

A estimulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase pelo PNFF envolveu interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$), com $V = 43,4 \pm 2,2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,13 \pm 0,06 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação da atividade da enzima por K^+ ($V = 39,9 \pm 1,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 4,2 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), Mg^{2+} ($V = 45,0 \pm 2,2 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 0,82 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$) e NH_4^+ ($V = 31,7 \pm 1,6 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 19,0 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) também ocorreu por meio de interações sítio-sítio. A afinidade aparente da enzima pelo PNFF e Mg^{2+} foi similar às relatadas para enzimas de outros crustáceos, incluindo caranguejos habitantes de meios mais salinos. Entretanto, a enzima de *D. pagei* apresentou menor afinidade aparente por íons K^+ que as outras espécies já estudadas.

A atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce foi estimulada sinergicamente por K^+ e NH_4^+ sugerindo a presença de dois sítios de ligação para estes íons na molécula da enzima.

Ouabaína (4 mmol L^{-1}) inibiu a atividade PNFFase total da preparação ($\approx 89\%$), por meio de uma curva monofásica ($K_i = 225,6 \pm 11,3 \mu\text{mol L}^{-1}$), sugerindo que, se presentes na fração microsomal, as duas isoenzimas da (Na,K)-ATPase apresentam sensibilidades próximas para o inibidor. Ortovanadato ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) inibiu 95% da atividade PNFFase total por meio de uma curva bifásica, reforçando a sugestão da presença de duas isoenzimas na preparação.

A hidrólise do ATP pela (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce ocorreu em sítios de alta ($V = 6,4 \pm 0,32 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,34 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$) e baixa afinidade ($V = 127,1 \pm 6,2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_M = 84 \pm 4,1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Não foi encontrada uma correlação direta entre a afinidade pelo ATP e o habitat de diferentes espécies de caranguejos. A atividade (Na,K)-ATPase específica de *D. pagei* mantido em água doce foi cerca de 3 vezes menor que relatada para *Potamon edulis*, única espécie de caranguejo dulcícola para a qual este parâmetro foi relatado. Atividades específicas muito maiores foram encontradas para caranguejos estuarinos, particularmente quando aclimatados a salinidades baixas. A baixa atividade específica determinada para *D. pagei* pode ser atribuída ao baixo gradiente osmótico que este

animal mantém entre a hemolinfa e o meio externo, comparado a outros caranguejos dulcícolas, que o caracteriza como uma espécie particularmente bem adaptada ao ambiente dulcícola.

A estimulação da atividade da enzima por íons Na^+ ($V = 133,8 \pm 7,3 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 4,7 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$), Mg^{2+} ($V = 136,5 \pm 8,0 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 0,62 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$), K^+ ($V = 131,7 \pm 7,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,47 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$) e NH_4^+ ($V = 125,6 \pm 6,3 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 1,90 \pm 0,09 \text{ mmol L}^{-1}$) ocorreu por meio de interações sítio-sítio.

A afinidade aparente por Na^+ da enzima de *D. pagei* é baixa, se comparada às relatadas para outros animais dulcícolas, e similar às encontradas para espécies estuarino/marinhas. Em contraste, a afinidade aparente por K^+ é 2,5 a 5 vezes maior que as determinadas para espécies habitantes de meios mais salinos e aparentemente está mais relacionada ao habitat do animal que a afinidade por Na^+ . Esta possibilidade é coerente com o fato da (Na,K)-ATPase branquial dos crustáceos apresentar os sítios de ligação de K^+ expostos para a hemolinfa, o que possibilita a modulação da atividade da enzima pela concentração de K^+ na hemolinfa.

Ao contrário do observado para várias outras espécies de caranguejos, a atividade (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* não foi estimulada sinergisticamente por K^+ e NH_4^+ . Entretanto, a presença de um dos íons no meio reacional provoca o aumento da afinidade aparente da enzima pelo outro em cerca de 3 vezes. Fisiologicamente, esta característica cinética pode ser importante para garantir o transporte de ambos os íons pela enzima, mesmo em presença de concentrações relativamente elevadas do outro.

Ouabaína (3 mmol L^{-1}) inibiu a atividade ATPase total ($\approx 78\%$) por meio de uma curva bifásica ($K_I = 6,21 \pm 0,32 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $101,2 \pm 5,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), reforçando os resultados anteriores no sentido de demonstrar a existência de duas isoenzimas da (Na,K)-ATPase nas brânquias posteriores de *D. pagei*. Observou-se também uma inibição bifásica por ortovanadato ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), que inibiu a atividade ATPase total em 85%.

O pH ótimo para a atividade V-ATPase branquial de *D. pagei* foi de 7,5. A modulação da atividade V-ATPase do animal mantido em água doce por ATP ($V = 26,5 \pm 1,3 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 3,9 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e Mg^{2+} ($V = 27,9 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0,5} = 0,80 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$) ocorreu por meio de interações cooperativas. Já a inibição da atividade ATPase insensível ao ortovanadato por bafilomicina A_1 ocorreu segundo uma curva monofásica ($K_I = 55,0 \pm 2,8 \text{ nmol L}^{-1}$). Cerca de 44 % da atividade ATPase total foi inibida, correspondendo à V-ATPase.

A atividade V-ATPase branquial de *D. pagei* diminuiu acentuadamente em resposta à exposição à salinidade de 21‰. Após 1h de exposição, a atividade diminuiu cerca de 3 vezes, chegando a 4 vezes após 24h, o que indica a atuação de mecanismos eficientes de regulação a curto prazo. Curiosamente, a atividade V-ATPase foi cerca de 2 vezes maior para um tempo de aclimação de 120h a 21‰, comparado a 24 h, embora 2 vezes menor que a estimada em água doce. Passadas 240 h, a atividade voltou aos baixos níveis observados entre 1h e 24h, o que indica a ação de mecanismos de regulação a longo prazo.

Além da diminuição da atividade específica também foi observado aumento da afinidade da enzima por ATP (12 vezes) e Mg^{2+} (3 vezes) em resposta à exposição dos animais a 21‰. Similarmente, ocorreu um aumento de até 190 vezes na afinidade da enzima por bafilomicina A_1 . Propõe-se que, em resposta à alteração de salinidade, ocorrem mudanças conformacionais tanto em V_1 (onde se encontram os sítios de ligação de ATP e Mg^{2+}) quanto V_0 (onde se localiza o sítio de ligação de bafilomicina), resultando numa maior exposição do sítio para o inibidor e no aumento da afinidade por Mg^{2+} e ATP. Como os aumentos de afinidade são observados já após 1h de exposição, este mecanismo parece ser independente da expressão protéica e, portanto, não estaria relacionado à expressão de isoformas diferentes de alguma das subunidades da enzima.

A diminuição da atividade V-ATPase branquial de *D. pagei* em resposta à exposição a uma salinidade elevada é compatível com os mecanismos propostos para a atuação desta enzima no processo de captura ativa de Na^+ em crustáceos dulcícolas. Após 10 dias de aclimação ainda se tem atividade V-ATPase detectável nas frações microsomais das brânquias posteriores do animal, possivelmente envolvida nas funções de regulação ácido-base e excreção de amônia.

Os resultados obtidos para a aclimação de *D. pagei* por um período de 10 dias a salinidades entre 5 e 21‰ mostraram também uma diminuição acentuada da atividade V-ATPase em resposta ao aumento da salinidade. Entretanto, com exceção da salinidade mais baixa (5‰) não se observou aumento da afinidade da enzima por bafilomicina, sugerindo que esta alteração seja limitada a tempos de aclimação mais curtos. Entretanto, também se verificou um aumento acentuado da afinidade da enzima por ATP e Mg^{2+} .

ABSTRACT

Crustacean arose in the sea but, during evolution, several species invaded lower salinity biotopes, reaching fresh water. The ability of crustaceans to successfully colonize the freshwater biotope depends on efficient mechanisms of hyperosmoregulation.

In dilute media, crustaceans' hemolymph osmolality and ionic composition reflect a balance between diffusive and urinary ion losses, and active ion capture through the gills. The gill (Na,K)-ATPase plays a pivotal role in Na^+ capture from dilute environments and its kinetic characteristics are under investigation in recent years, although freshwater crab enzymes are poorly known. According to the most recent model, the apparent affinity for Na^+ is the most variable kinetic parameter among gill enzymes from different species, and reflects the salinity of the species' habitat. Thus, enzymes from species which are well adapted to freshwater usually present higher affinities for Na^+ . However, several recent results are incompatible with this model. On the other hand, it has been proposed that a V-ATPase is also involved in Na^+ capture through the gills of hololimnetic crustaceans. This enzyme is almost completely unknown: its kinetic characteristics have not been studied yet and the relationship between the magnitude of its activity in the gills and the external medium salinity has not been established.

This work aimed to characterize the (Na,K)-ATPase and V-ATPase from the posterior gill from the holimnetic crab *Dilocarcinus pagei*, considered an old fresh water colonizer. The (Na,K)-ATPase was characterized in animals maintained in fresh water, in order to establish a comparison of its kinetic properties with those of enzymes from other crab species that inhabit more saline media. This comparison may enhance our understanding of the biochemical adaptations associated to fresh water invasion. V-ATPase was characterized in animals kept in fresh water or exposed for varying time intervals to a medium of 21‰ salinity, or else acclimated for 10 days to media of different salinities (5-21‰), aiming to establish a relationship between the enzyme specific activity in the gill tissue and the external salinity, and also investigate the mechanisms involved in enzyme activity regulation.

The analysis of *D. pagei* gill microsomes in a continuous-density sucrose gradient revealed two protein peaks (25-35% and 35-45% sucrose), both showing K^+ -phosphatase, (Na,K)-ATPase and V-ATPase activities. These results indicate the presence of membrane fractions of distinct densities, both presenting the main ion pumps involved in Na^+ capture. These membranes may originate from different places in the asymmetric posterior gill epithelium from this crab. Western

blotting analysis revealed two immunoreactive bands (Mr 116 kDa e 105 kDa) corresponding to the (Na,K)-ATPase α -subunit, suggesting the presence of two isoforms in *D. pagei* posterior gills.

K⁺-phosphatase activity of the (Na,K)-ATPase was stimulated by the substrate p-nitrophenylphosphate (PNPP) through site-site interactions ($n_H = 1.4$), with $V = 43.4 \pm 2.2 \text{ U mg}^{-1}$ and $K_{0.5} = 1.13 \pm 0.06 \text{ mmol L}^{-1}$. The stimulation of enzyme activity by K⁺ ($V = 39.9 \pm 1.9 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 4.2 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$), Mg²⁺ ($V = 45.0 \pm 2.2 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 0.82 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$) and NH₄⁺ ($V = 31.7 \pm 1.6 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 19.0 \pm 0.9 \text{ mmol L}^{-1}$) also occurred with cooperative kinetics. Apparent affinity for PNPP and Mg²⁺ was similar to those reported for the gill enzymes from other crustaceans, including crabs from more saline habitats. However, *D. pagei* enzyme presented higher apparent affinity for K⁺, compared to other species. K⁺-phosphatase activity from the gill (Na,K)-ATPase from *D. pagei* maintained in freshwater was synergistically stimulated by K⁺ e NH₄⁺, suggesting the presence of two binding sites for these ions in the enzyme molecule.

Ouabain (4 mmol L^{-1}) inhibited total PNPPase activity of the microsomal preparation ($\approx 89\%$) through a monophasic curve ($K_I = 225.6 \pm 11.3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), suggesting that the two isoenzymes of the (Na,K)-ATPase possibly present show similar affinities for this inhibitor. Orthovanadate ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) inhibited total PNPPase activity by 95% through a biphasic curve, reinforcing the suggestion that two (Na,K)-ATPase isoenzymes are present in *D. pagei* posterior gills.

ATP hydrolysis by the gill (Na,K)-ATPase from *D. pagei* kept in fresh water occurred in high- ($V = 6.4 \pm 0.32 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 0.34 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) and low- ($V = 127.1 \pm 6.2 \text{ U mg}^{-1}$; $K_M = 84 \pm 4.1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) affinity sites. There was no direct correlation between ATP affinity and the habitat of different crab species. (Na,K)-ATPase specific activity was about 3-fold lower than that reported for *Potamon edulis*, the only species of freshwater crab for which this parameter was reported. Much higher specific activities were found for estuarine crabs, particularly when acclimated to low salinities. The low specific activity estimated for *D. pagei* may be attributed to the lower osmoionic gradient that it maintains between the hemolymph and the external medium, compared to other freshwater crabs.

Stimulation of enzyme activity by Na⁺ ($V = 133.8 \pm 7.3 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 4.7 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1}$), Mg²⁺ ($V = 136.5 \pm 8.0 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 0.62 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$), K⁺ ($V = 131.7 \pm 7.9 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 0.47 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1}$) and NH₄⁺ ($V = 125.6 \pm 6.3 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 1.90 \pm 0.09 \text{ mmol L}^{-1}$) occurred with site-site interactions. The apparent affinity for Na⁺ of the gill enzyme from *D. pagei* is low, when

compared to those reported for other freshwater animals, but similar to those found for estuarine/marine species. In contrast, the apparent affinity for K^+ is 2.5 to 5-fold higher than those estimated for species that inhabit more saline media, and is apparently more related to the animals' habitat than Na^+ affinity. This possibility is consistent with the location of the (Na,K)-ATPase in crabs gill tissue, with K^+ binding sites exposed to the hemolymph, allowing the direct modulation of enzyme activity by hemolymph K^+ concentration.

In contrast to data reported for other crab species, *D. pagei* gill (Na,K)-ATPase activity was not synergistically stimulated by K^+ and NH_4^+ . However, the presence of one of these ions in the reaction medium results in an increase of about 3-fold in the apparent affinity of the enzyme for the other. This kinetic characteristic may be physiologically relevant to assure the transport of both ions, even in the presence of elevated concentrations of the other.

Ouabain (3 mmol L^{-1}) inhibited total ATPase activity ($\approx 78\%$) through a biphasic curve ($K_I = 6.21 \pm 0.32 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $101.2 \pm 5.1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) reinforcing previous results suggesting the presence of two isoenzymes in the microsomal preparations. A biphasic inhibition by orthovanadate ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) to about 15% residual activity was also observed.

Optimal pH for *D. pagei* gill V-ATPase activity was 7.5. The modulation of enzyme activity of the animal kept in fresh water by ATP ($V = 26.5 \pm 1.3 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 3.9 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$) and Mg^{2+} ($V = 27.9 \pm 1.4 \text{ U mg}^{-1}$; $K_{0.5} = 0.80 \pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$) occurred with positive cooperativity. The inhibition of the orthovanadate insensitive ATPase activity by bafilomycin A_1 followed a monophasic curve ($K_I = 55.0 \pm 2.8 \text{ nmol L}^{-1}$). About 44 % of total ATPase activity was inhibited, corresponding to the V-ATPase.

Dilocarcinus pagei gill V-ATPase activity substantially decreased in response to animal's exposure to 21‰ salinity. After 1h exposure, the activity diminished about 3-fold, reaching 4-fold after 24h, indicating the action of efficient short-time regulation mechanisms. Interestingly, V-ATPase activity was about 2-fold higher after 120h exposure, compared to 24h, although 2-fold lower compared to that estimated in fresh water. After 240h, the activity returned to the low levels observed for 1 and 24 h, indicating efficient long-term regulation.

Besides the decrease in specific activity, it was also observed an increase in enzyme's apparent affinity for ATP (12 fold) and Mg^{2+} (3 fold) in response to animal's exposure to 21‰ salinity. Simultaneously, the enzyme's affinity for bafilomycin A_1 increased up to 190-fold. We propose that, in response to salinity alteration, conformational changes take place both in V_1 (in

which the ATP and Mg^{2+} binding sites are located) and V_0 (which contains the bafilomycin A_1 binding site), resulting in higher exposition of the inhibitor binding site and also higher affinity for Mg^{2+} and ATP. As the affinity increases are observed after just 1h exposure, this regulatory mechanism seems to be independent of protein expression and, thus, should not be related to the expression of distinct isoforms of some enzyme subunit.

The lowering of gill V-ATPase activity in *D. pagei* in response to exposure to an elevated salinity is consistent with the mechanisms proposed for the role of this enzyme in active Na^+ capture in hololimnetic crustaceans. After 10 days at 21‰, the gill microsomal fractions still show a little V-ATPase activity, possibly related to acid-base regulation and ammonia excretion processes.

The results obtained for the acclimation of *D. pagei* for 10 days at salinities in the range 5 to 21‰ also showed a substantial decrease of V-ATPase activity in response to the increase in medium salinity. However, except for 5‰, it was not observed an increase of enzyme's affinity for bafilomycin, suggesting that this alteration is limited to shorter periods of exposure. However, a significant increase in the enzyme's affinity for ATP and Mg^{2+} was also observed.

ÍNDICE		Página
1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1. A invasão da água doce e a regulação osmótica em crustáceos dulcícolas....	1
	1.2. (Na,K)-ATPase: características gerais.....	4
	1.3. V-ATPase: características gerais.....	9
	1.4. Adaptação à salinidade em crustáceos: atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase.....	16
	1.5. O caranguejo <i>Dilocarcinus pagei</i>	20
2	OBJETIVOS.....	23
	2.1. Objetivo geral.....	23
	2.2. Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
	3.1. Coleta de animais.....	24
	3.2. Aclimação dos animais.....	24
	3.3. Coleta da hemolinfa dos animais.....	25
	3.4. Dissecção das brânquias posteriores.....	25
	3.5. Preparação da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i>	25
	3.6. Determinação das atividades PNFFase total e K ⁺ -fosfatase das frações microsomais.....	26
	3.7. Determinação das atividades ATPase total e (Na,K)-ATPase das frações microsomais.....	27
	3.8 . Determinação da atividade V-ATPase das frações microsomais.....	28
	3.9. Determinação do pH ótimo para a atividade V-ATPase das frações microsomais do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	29
	3.10. Tratamento das enzimas de acoplamento.....	30
	3.11. Dosagem de íons na hemolinfa de <i>D. pagei</i>	30
	3.12. Preparação da solução de ATP.....	30
	3.13. Preparação da solução de gliceraldeído 3-fosfato (GAF).....	31
	3.14. Dosagem de proteína.....	31
	3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise por “Western blotting”.....	31
	3.16. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.	32
	3.17. Preparação da solução de ortovanadato.....	32
	3.18. Tratamento dos dados cinéticos.....	32
4	RESULTADOS.....	33
	4.1. Atividade K ⁺ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	33
	4.2. Atividade ATPase da (Na,K)-ATPase branquial de <i>D. pagei</i>	47
	4.3. Atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i>	59
5	DISCUSSÃO.....	81
	5.1. Caracterização da atividade K ⁺ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	82
	5.2. Atividade ATPase da (Na,K)-ATPase branquial de <i>D. pagei</i>	87
	5.3. Atividade V-ATPase branquial de <i>D. pagei</i>	100
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
7	CURRICULUM VITAE.....	116

ÍNDICE

PAINÉIS, FIGURAS E TABELAS

Painel		Página
1	Representação esquemática da morfologia de uma brânquia posterior do caranguejo <i>Uca sp.</i>	2
2	Modelo da célula epitelial branquial dos crustáceos decápodes, mostrando os transportadores de íons envolvidos na osmorregulação em hiperreguladores fortes.....	3
3	Topologia de membrana das cadeias α e β da (Na,K)-ATPase dos vertebrados.....	5
4	Arquitetura do complexo $\alpha\beta$ da (Na,K)-ATPase de rim de porco.....	6
5	Esquema integrado do ciclo funcional da (Na,K)-ATPase.....	7
6	Estrutura da V-ATPase.....	10
7	Mecanismo de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ pela V-ATPase.....	12
8	Mecanismos de Regulação da atividade V-ATPase.....	15
9	O caranguejo <i>Dilocarcinus pagei</i>	21
10	Microanatomia das brânquias de <i>D. pagei</i>	22
Figura		
1	Efeito da concentração de alameticina sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	35
2	Análise da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose: atividade K^+ -fosfatase.....	36
3	Elektroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blotting da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.	37
4	Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por PNFF, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+	39
5	Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por K^+ em presença de diferentes concentrações fixas de NH_4^+	41
6	Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por NH_4^+ em presença de diferentes concentrações fixas de K^+	42
7	Efeito da concentração de ouabaína e ortovanadato sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	45
8	Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce pelo ATP.....	49
9	Estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+	50
10	Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por K^+ em presença de diferentes concentrações fixas de NH_4^+	52

11	Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por NH_4^+ em presença de diferentes concentrações fixas de K^+	53
12	Efeito da concentração de ouabaína e ortovanadato sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	55
13	Decurso temporal do efeito da aclimação de <i>D. pagei</i> à salinidade de 21‰ sobre a atividade (Na,K)-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.....	58
14	Efeito do pH sobre a atividade V-ATPase da fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	60
15	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	62
16	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21‰ por 1h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	64
17	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21‰ por 5h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	65
18	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21‰ por 24h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	67
19	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21‰ por 120h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	68
20	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	69
21	Decurso temporal do efeito da aclimação de <i>D. pagei</i> à salinidade de 21‰ sobre a atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.....	72
22	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 5‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	74
23	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 10‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	76
24	Fração microsomal branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 15‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.....	77
25	Efeito da salinidade de aclimação por 240h sobre a atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.....	78

26	Análise da fração microsomal do tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose: atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase.....	80
----	--	----

Tabela

1	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K ⁺ -fosfatase das frações microsomais das brânquias posteriores de <i>D. pagei</i> mantido em água doce pelo PNFF e pelos íons amônio, potássio e magnésio.....	40
2	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K ⁺ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce por íons potássio e amônio.....	43
3	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade PNFFase total e insensível à ouabaína da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	46
4	Parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de <i>D. pagei</i> pelo ATP e pelos íons Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ e NH ₄ ⁺	48
5	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> por íons potássio e amônio.....	54
6	Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total e insensível à ouabaína da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> mantido em água doce.....	57
7	Variação da atividade (Na,K)ATPase específica e de sua percentagem em relação à atividade ATPase total em frações microsomais de <i>D. pagei</i> mantido em água doce e aclimatado por diferentes intervalos de tempo à salinidade de 21 ‰.....	57
8	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por ATP e íons Mg ²⁺ e inibição por bafilomicina A ₁ da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a 21 ‰ por diferentes intervalos de tempo.....	70
9	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por ATP e íons Mg ²⁺ e inibição por bafilomicina A ₁ da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>D. pagei</i> aclimatado a diferentes salinidades por 240 horas.....	75
10	Dosagem da concentração de íons na hemolinfa de <i>D. pagei</i> após diferentes intervalos de tempo de exposição à salinidade de 21‰.....	79
11	Comparação dos parâmetros cinéticos determinados para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase no tecido branquial de diferentes crustáceos.....	88
12	Osmolalidade e concentração de diferentes íons na hemolinfa de <i>D. pagei</i> e outros caranguejos de água doce.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. A invasão da água doce e a regulação osmótica em crustáceos dulcícolas.

Os crustáceos surgiram no mar há aproximadamente 600 milhões de anos (Barnes, 1990) e ainda hoje a maioria das espécies conhecidas são marinhas. Ao longo da evolução, alguns grupos invadiram ambientes de salinidades inferiores à da água do mar (Schubart et al., 1998). Esta transição do ambiente marinho para o dulcícola constitui um grande desafio osmótico e iônico, visto que na água doce os animais tendem a perder íons por difusão e ganhar água por osmose. A capacidade dos crustáceos tornarem-se completamente independentes da água salobra deve-se essencialmente a dois tipos de adaptações: mecanismos eficientes de hiperosmorregulação, ou seja, manutenção da concentração osmótica da hemolinfa elevada em relação ao meio externo (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003) e independência de águas salobras para a reprodução (Schubart & Diesel, 1998).

Os crustáceos apresentam vários padrões de regulação osmótica. Quanto à capacidade de sobrevivência em diferentes salinidades são classificados como estenoalinos, que toleram somente pequena variação na salinidade do meio externo, ou eurialinos, quando capazes de tolerar amplas variações (Péqueux, 1995). A relação entre a concentração osmótica da hemolinfa e a do meio externo é expressa em termos de osmoconformidade ou osmorregulação. Nos crustáceos osmoconformadores, a concentração osmótica da hemolinfa mantém-se semelhante à do ambiente, enquanto nos osmorreguladores essa concentração é mantida entre certos limites espécie-específicos, abaixo (hiporregulação) ou acima (hiperregulação) daquela do meio externo (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000; Lucu & Towle, 2003). Os crustáceos hiperreguladores são subdivididos em dois grupos: os reguladores fracos que são capazes de viver e hiperregular em meios diluídos em relação à água do mar, mas sobrevivem mal em água doce; e os reguladores fortes, capazes de hiperregular fortemente em água doce e passar toda a vida adulta neste ambiente (Péqueux, 1995; Kirschner, 2004; Freire et al., 2008).

Os crustáceos marinhos são, em sua maioria, osmoconformadores e estenoalinos. Já as espécies que colonizaram com sucesso a água doce apresentam graus variados de eurialinidade, além de mecanismos eficientes de hiperosmorregulação (Péqueux, 1995; Mo & Greenaway, 2001; Onken & McNamara, 2002; Lucu & Towle, 2003).

A capacidade de hiperosmoregulação dos crustáceos dulcícolas está relacionada a uma menor permeabilidade da superfície corporal à água e íons (comparativamente a espécies habitantes de

meios mais salinos), assim como a mecanismos eficientes de absorção de íons, através de epitélios de interface entre o organismo e o meio externo como as brânquias e as glândulas antenais (Mantel & Farmer, 1983; Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Freire et al., 2008).

As brânquias são consideradas o principal órgão responsável pelo controle da osmolalidade da hemolinfa nos crustáceos aquáticos e estão envolvidas também nas trocas gasosas, regulação de pH e na excreção de compostos nitrogenados na forma de amônia (Péqueux, 1995; Taylor & Taylor, 1992; Weihrauch et al., 2004a). Consistem de estruturas multilamelares, sendo cada lamela constituída por um envelope cuticular banhado externamente pela água do ambiente e revestido internamente por uma única camada de células epiteliais, que formam um compartimento por onde circula a hemolinfa do animal (revisto por Péqueux, 1995; Freire et al., 2008). Na maioria das espécies de caranguejos hiperreguladores estudadas até o momento existe uma diferença funcional e estrutural marcada entre as brânquias anteriores e posteriores. As anteriores apresentam epitélio fino e são especializadas em trocas gasosas; as posteriores, envolvidas na absorção ativa de íons a partir de ambientes externos diluídos, apresentam a superfície apical das células epiteliais (voltada para o meio externo) amplificada por microvilos e as membranas basolaterais (banhadas pela hemolinfa) altamente invaginadas e associadas a numerosas mitocôndrias (Péqueux, 1995; Freire et al., 2008). O **Painel 1** mostra esquematicamente a morfologia típica de uma brânquia posterior de um caranguejo.

Painel 1. Representação esquemática da morfologia de uma brânquia posterior do caranguejo *Uca sp.*

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

Os principais íons envolvidos na regulação osmótica e iônica dos crustáceos são Na^+ e Cl^- e a regulação do seu fluxo é fundamental para a sobrevivência das espécies hiperreguladoras em meios diluídos (Péqueux, 1995; Kirschner, 2004). O modelo mais aceito para o mecanismo molecular de captação de Na^+ e Cl^- através do tecido branquial de animais hiperreguladores fortes, como *D. pagedi*, está representado no **Painel 2**. De acordo com ele, íons Na^+ provenientes do meio externo entram nas células branquiais através de canais de Na^+ apicais (1), a favor de um gradiente elétrico gerado por uma V-ATPase apical (2), sendo então transportados para a hemolinfa via (Na,K)-ATPase basolateral (3); canais de K^+ basolaterais (4) permitem a saída de K^+ de volta para a hemolinfa, contribuindo para manter o gradiente elétrico negativo intracelular. Íons Cl^- entram nas células a partir do meio externo via um trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical (5), passando do citosol para a hemolinfa através de canais de cloreto basolaterais (6), a favor do gradiente elétrico. A captação de Cl^- é independente da captação de Na^+ e não envolve a participação da (Na,K)-ATPase. A captação de ambos os íons depende da atividade da anidrase carbônica (7), responsável pelo suprimento de íons H^+ para exportação via V-ATPase apical (2) e HCO_3^- para o funcionamento do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical (5).

Painel 2. Modelo da célula epitelial branquial dos crustáceos decápodes, mostrando os transportadores de íons envolvidos na osmorregulação em hiperreguladores fortes.

1.2. (Na,K)-ATPase: características gerais.

A (Na,K)-ATPase (E.C. 3.6.1.9) é uma ATPase do tipo P, caracterizada pela formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico. Responsável pela troca de 3 íons Na^+ intracelulares por 2 íons K^+ extracelulares, atua como um transdutor de energia ao converter a energia química potencial da hidrólise do ATP em energia potencial eletroquímica, associada a um gradiente de concentração iônica. Além de manter o potencial de membrana, esse gradiente energiza outros processos de transporte, envolvidos na regulação do volume celular e no transporte de outros íons e solutos vitais (Horisberger, 2004; Martin, 2005).

A (Na,K)-ATPase é constituída por duas subunidades, denominadas α e β . A subunidade α ($M_r \sim 100$ kDa) apresenta 10 segmentos transmembrana, denominados M1-M10. Suas extremidades N- e C-terminal estão ambas voltadas para o citoplasma; alças intra- e extracelulares unem os segmentos transmembrana (**Painel 3**). Nesta subunidade estão os sítios de ligação para Na^+ , K^+ e ATP (Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Martin, 2005). As alças voltadas para o citoplasma estão estruturadas de modo a formar três domínios globulares, denominados “domínio de fosforilação” (**P**), “domínio âncora ou ativador” (**A**) e domínio de ligação de nucleotídeos (**N**). Os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação do ATP à enzima e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o ciclo reacional localizam-se nos domínios **N** e **P**, respectivamente. Os três domínios intracelulares conectam-se a um domínio transmembrana de forma cilíndrica por uma haste estreita. No domínio transmembrana estão localizados os resíduos de aminoácidos que participam da coordenação de Na^+ e K^+ . A subunidade β ($M_r \sim 50$) possui apenas um segmento transmembrana cuja extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma (**Painel 3**); cerca de 80% da cadeia é extracelular e altamente glicosilada (revisto por Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Martin, 2005).

Painel 3. Topologia de membrana das cadeias α e β da (Na,K)-ATPase dos vertebrados. (Modificado de Martin, 2005)

O **painel 4** mostra a arquitetura do complexo $\alpha\beta$ da (Na,K)-ATPase de rim de porco, recém caracterizada com resolução de 3,5 Å (Morth et al., 2007).

A associação entre as subunidades α e β é essencial para a expressão funcional da (Na,K)-ATPase. Apesar da cadeia α ser considerada a subunidade catalítica da enzima, está bem estabelecido que a cadeia β é essencial para o seu enovelamento, direcionamento e inserção corretos na membrana. Além disso, β também atua na modulação da atividade catalítica da enzima por íons monovalentes, bem como no reconhecimento e transporte destes íons através da membrana (Geering, 2001; Laughery et al., 2003; Becker et al., 2004; Martin, 2005; Vagin et al., 2007).

Nos mamíferos, foram identificados até o momento genes individuais para quatro isoformas da subunidade α e três da subunidade β (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasheri et al., 2000; Pressley et al., 2005). Recentemente, foi sugerida ainda a existência de duas novas isoformas da subunidade β (Blanco et al., 2005). A combinação dessas isoformas, cuja expressão ocorre de maneira seletiva em diferentes tecidos, origina uma série de isoenzimas com propriedades cinéticas diferentes no que diz respeito à afinidade por Na^+ , K^+ , ATP e ouabaína, inibidor específico da enzima, além de diferentes respostas a mensageiros secundários

(Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al., 2000; Mobasheri et al., 2000; Mijatovic et al., 2007). *In vitro*, todas as combinações possíveis de isoformas de α e β resultam em enzimas cataliticamente ativas; entretanto, não é conhecido se, *in vivo*, a associação de isoformas é regulada, favorecendo a expressão de apenas algumas isoenzimas (Mijatovic et al., 2007). Por outro lado, a relevância fisiológica dessa diversidade de isoformas ainda não é bem compreendida (Pressley et al., 2005; Lingrel et al., 2007; Pierre et al., 2008).

Painel 4. Arquitetura do complexo $\alpha\beta$ da (Na,K)-ATPase de rim de porco.

As subunidades α , β e γ estão mostradas, respectivamente, em azul, amarelo e vermelho. (Modificado de Morth et al, 2007).

O modelo mais aceito atualmente para o mecanismo de acoplamento entre a hidrólise do ATP e o transporte de íons pela (Na,K)-ATPase está apresentado no **Painel 5** e baseia-se na ocorrência de grandes transições conformacionais entre dois estados principais da enzima: E_1 , com alta afinidade por Na^+ intracelular, e E_2 , com alta afinidade por K^+ extracelular (revisto por Horisberger, 2004; Martin, 2005).

Painel 5. Esquema integrado do ciclo funcional da (Na,K)-ATPase.

(Modificado de Horisberger, 2004)

O ciclo se inicia com a enzima na forma $E_1\text{ATP}$, na qual a molécula de ATP está ligada ao domínio N e os domínios citoplasmáticos estão afastados entre si (**fase 1**). A ligação de 3 Na^+ extracelulares à enzima induz uma mudança conformacional, que envolve a rotação do domínio N, levando à aproximação entre o fosfato γ do ATP e o resíduo de aspartato a ser fosforilado (**fase 2**). A fosforilação do domínio P (**fase 3**) é acompanhada por uma aproximação do domínio A em relação aos domínios N e P. Simultaneamente, uma mudança conformacional no domínio transmembrana resulta no fechamento do canal de acesso aos sítios de ligação de cátions a partir do meio intracelular, ocluindo os íons Na^+ já ligados à enzima e dando origem à forma $E_1\text{P}(3\text{Na})$ (**fase 3**). Esta forma transforma-se rapidamente na forma $E_2\text{P}2\text{Na}$ (**fase 4**), envolvendo: 1. abertura dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular, desocluidos os íons Na^+ ; 2. redistribuição espacial de grupos importantes para a coordenação dos cátions no interior do domínio transmembrana, diminuindo a afinidade por íons Na^+ ; 3. liberação de um primeiro íon Na^+ para fora da célula. No próximo passo, um rearranjo do canal de acesso extracelular aos sítios de ligação de cátions leva à liberação dos dois íons Na^+ restantes (**fase 5**). A ocupação dos sítios de ligação de cátions da forma $E_2\text{P}$ por 2 íons K^+ extracelulares (**fase 6**) induz duas alterações principais: desfosforilação do domínio P e oclusão dos íons ligados, por fechamento do canal de acesso extracelular (**fase 7**). A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N (**fase 8**) leva ao distanciamento dos domínios N e P, que induz o movimento dos segmentos transmembrana da molécula, resultando na abertura do canal de acesso aos sítios de ligação de cátions para o meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions provoca a diminuição da afinidade da enzima por íons K^+ , ocasionando a transição conformacional da forma $E_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $E_1\text{ATP}2\text{K}$ (**fase 9**). A liberação dos íons K^+ para o citosol (**fase 10**) finaliza o ciclo de bombeamento (Modificado de Horisberger, 2004).

A (Na,K)-ATPase é especificamente inibida por ouabaína, que se liga à forma $E_2\text{P}$ (Croyle et al., 1997; Crambert et al., 2004), inibindo a atividade catalítica e o transporte iônico pela enzima. O vanadato, que mimetiza o estado de transição da fosforilação/desfosforilação da enzima na forma E_2 , também é um inibidor potente da (Na,K)-ATPase e de outras ATPases do tipo P (Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998).

1.3. V-ATPase: Características gerais

A V-ATPase (E.C. 3.6.3.14) é uma bomba de prótons encontrada em praticamente todas as células eucarióticas. A energia para o transporte ativo de H^+ provém da hidrólise do ATP e o gradiente eletroquímico gerado pode dirigir o transporte secundário de outros íons ou compostos (Cipriano et al., 2008; Beyenbach & Wieczoreck, 2006).

Esta enzima apresenta grande variedade de funções. Encontrada em membranas intracelulares (vacúolos, lisossomos, endossomos), é responsável pela acidificação destes compartimentos, de modo a estabelecer valores ótimos de pH para funções especializadas, como a degradação de macromoléculas por enzimas digestivas e o rompimento de interações ligante-receptor. Nas membranas de vesículas secretórias, a ação da V-ATPase é responsável pela geração da força motriz para a captação de pequenas moléculas, como neurotransmissores e ATP. Evidências recentes sugerem ainda um papel do domínio V_0 da enzima no processo de fusão de membranas (revisto por Jefferies et al., 2008).

A V-ATPase também é encontrada na membrana plasmática de certas células especializadas, particularmente células epiteliais, onde desempenha função importante na secreção de prótons. Em osteoclastos, a acidificação do espaço extracelular contribui para a reabsorção óssea (Toyomura et al., 2003); já nas células dos túbulos renais, a mesma enzima parece estar envolvida na reabsorção de HCO_3^- (Karet et al., 1999). Presente em células tumorais, acidifica o meio extracelular de modo a facilitar processos invasivos de outras células (Rojas et al., 2004; Sennoune et al., 2004). Em crustáceos, anfíbios e peixes de água doce, acredita-se estar envolvida na osmorregulação (revisto por Beyenbach & Wieczoreck, 2006; Forgac, 2007; Freire et al., 2008).

A V-ATPase apresenta múltiplas subunidades, arrançadas em 2 estruturas principais: um complexo citoplasmático periférico, V_1 (400-600 kDa), que interage com ATP, ADP e P_i , e um complexo integral de membrana, V_0 (150-300 kDa), que media o transporte de H^+ (**Painel 6**).

O complexo V_1 é composto por 8 subunidades diferentes, na estequiometria $A_3B_3CDE_2FG_2H$ (Jefferies et al., 2008; Marshansky & Futai, 2008; Bowman et al., 2006). Esta estrutura consiste de uma cabeça globular com 3 cópias alternadas das subunidades **A** e **B**, formando um anel, uma haste central rotacional, composta de uma subunidade **D** e uma **F**, e duas hastes periféricas (Jefferies et al., 2008; Marshansky & Futai, 2008). Seis sítios de ligação para o ATP estão localizados nas interfaces entre as subunidades **A** (≈ 70 kDa) e **B** (≈ 60 kDa). Três dos

sítios são catalíticos, constituídos majoritariamente por aminoácidos da subunidade **A**. Os outros três, não catalíticos, estão intercalados entre os catalíticos, aparentemente desempenhando função regulatória (Jefferies et al., 2008, Inoue et al., 2005; Cipriano et al., 2008).

O complexo V_0 , responsável pela translocação dos prótons através da membrana, é composto pelas subunidades **a**, **c**, **c'**, **c''**, **d** e **e**, com estequiometria **ac₄c'₂c''₂de**. Há 6 ou mais subunidades **c**, formando uma estrutura em anel na bicamada lipídica, denominada **anel-c** (**Painel 6**), que é essencial para a função da enzima (revisto por Inoue et al., 2005; Beyenbach & Wieczoreck, 2006, Jefferies et al., 2008).

Painel 6. Estrutura da V-ATPase.

Representação esquemática da V-ATPase de *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de Jefferies et al., 2008).

As subunidades **c**, **c'** e **c''** são proteolipídeos altamente hidrofóbicos e de baixa massa molecular (16 a 23 kDa), que se organizam na forma de 4 a 5 hélices transmembrana. Cada uma das subunidades **c** apresenta um resíduo de glutamato essencial, localizado em uma das hélices transmembrana, que interage com a subunidade **a** e sofre protonação/desprotonação reversível durante o transporte de prótons. A subunidade **d** está posicionada sobre o anel-**c**, estabelecendo uma interface entre o anel e a haste **DF** de V_1 que é essencial para o transporte de H^+ (revisto por Iwata et al., 2004; Cipriano et al., 2008).

A subunidade **a** (≈ 100 kDa) também é crucial para o mecanismo de transporte de prótons. Estudos estruturais mostram que ela apresenta 2 domínios: o domínio N-terminal é hidrofílico e está voltado para a face citoplasmática da membrana. A porção C-terminal constitui o outro domínio, integral, altamente hidrofóbico, organizado na forma de hélices transmembrana que geram dois semi-canais que permitem o acesso de H^+ aos resíduos de glutamato envolvidos no transporte, embebidos no **anel-c** (revisto por Cipriano et al., 2008; Forgac, 2007).

O transporte de H^+ pela V-ATPase ocorre por meio de catálise rotacional (Hirata et al., 2003; Imamura et al., 2003). A hidrólise do ATP induz mudanças conformacionais nas subunidades catalíticas (**A**) que dirigem a rotação da hélice central, ou “rotor”, constituído pelas subunidades **D**, **F**, **d** e pelo **anel-c**, resultando no movimento de prótons do citoplasma para o meio extracelular (Jefferies et al., 2008; Forgac, 2008) (**Painel 7**).

Acredita-se que o acoplamento entre a hidrólise do ATP e o transporte de H^+ envolve os seguintes passos (**Painel 7**): i. um íon H^+ , proveniente do citosol, passa através de um dos semi-canais transmembrana da subunidade **a**, voltado para o citosol, protonando um resíduo de glutamato de uma subunidade do **anel-c**; ii. a hidrólise do ATP, na subunidade **A**, dirige a rotação do **anel-c**, e o resíduo de glutamato protonado, sem carga, move-se no interior do ambiente hidrofóbico do anel; iii. após uma rotação completa, o resíduo de glutamato protonado aproxima-se de um resíduo de arginina essencial, localizado no outro semi-canal para H^+ da subunidade **a**, voltado para o meio extracelular; iv. o resíduo de arginina promove a desprotonação do glutamato, permitindo que o próton alcance o meio extracelular (revisto por Beyenbach & Wieczorek, 2006, Cipriano et al., 2008). Aparentemente, 2 íons H^+ são transportados por molécula de ATP hidrolisada (Tomashek & Brusilow, 2000).

Um requisito essencial para a ocorrência do mecanismo rotacional de catálise é que o complexo **A₃B₃** seja estacionário em relação à subunidade **a**. Esta função estrutural é desempenhada pelas duas hastes periféricas, constituídas pelas subunidades **C**, **E**, **G** e **H** e pelo domínio N-terminal da subunidade **a**. As subunidades **G** e **E** interagem fortemente entre si e com a subunidade **B**. Por sua vez, cada par **GE** interage com uma subunidade **C** ou **H**, estas últimas localizadas na interface entre V_1 e V_0 , interagindo com a subunidade **a**. Aparentemente, também ocorre interação direta entre o domínio N-terminal da subunidade **a** e a subunidade catalítica (revisto por Jefferies et al., 2008; Forgac, 2007). O conjunto destas interações garante a imobilização do conjunto em relação à membrana.

Painel 7. Mecanismo de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H⁺ pela V-ATPase.

A: Mecanismo de rotação da V-ATPase. B: Mecanismo de transporte de prótons através de V₀. (Modificado de Cipriano et al., 2008).

As V-ATPases são grandes complexos protéicos que começam a se arranjar no retículo endoplasmático (Graham et al., 2003; Malkus et al., 2004). Aparentemente, o arranjo correto requer a ação de chaperonas (Graham et al., 2003, Davis-Kaplan et al., 2006) e os domínios V₀ e V₁ podem ser formados na ausência um do outro (Kane et al., 2006). Todas as subunidades são essenciais para a atividade enzimática. Complexos sem a subunidade **H**, embora possam ser expressos na membrana de leveduras, são altamente instáveis e inativos (Hirata et al., 1993).

Múltiplas isoformas das subunidades da V-ATPase foram descritas. Dentre estas, quatro isoformas da subunidade **a** (**a1**, **a2**, **a3** e **a4**) foram encontradas em mamíferos, sendo expressas de maneira tecido-específica (Nishi et al., 2002), enquanto em leveduras apenas duas isoformas desta subunidade foram descritas (Manolson et al., 1994). A isoforma da subunidade **a** presente na molécula da V-ATPase define o seu direcionamento para diferentes membranas de compartimentos intracelulares ou ainda para diferentes regiões da membrana plasmática, em células polarizadas (revisto por Jefferies et al., 2008).

Nas leveduras, com exceção da subunidade **a**, todas as demais apresentam uma única isoforma. Em mamíferos, entretanto, várias outras subunidades são expressas como múltiplas isoformas: duas isoformas das subunidades **B**, **E**, **H** e **d** foram descritas (Da Silva et al., 2007; Wagner et al., 2004; Nishi et al., 2003; Smith et al., 2002; Murata et al., 2002; Sun-Wada et al., 2003) e três das subunidades **C** e **G** (Smith et al., 2002; Murata et al., 2002; Sun-Wada et al., 2003). A exemplo da subunidade **a**, estas isoformas são expressas de maneira tecido específica. Acredita-se que padrões variados de subunidades das isoenzimas da V-ATPase possam estar relacionados a uma regulação independente de formas expressas na mesma célula ou tecido (revisto por Jefferies et al., 2008).

A V-ATPase apresenta similaridade estrutural e mecânica com a F_0F_1 -ATPase. A estrutura das subunidades constituintes das duas enzimas, bem como o mecanismo de catálise rotacional pelo qual elas atuam são muito semelhantes. Em particular, a subunidade **A** da V-ATPase, na qual ocorre a hidrólise do ATP, apresenta grande homologia com a subunidade β da F-ATPase, na qual está localizado o sítio de síntese de ATP (Marshanky & Futai, 2008). Entretanto, as V-ATPases apresentam maior complexidade estrutural, o que pode ser um reflexo de sua diversidade de papéis biológicos.

Esta diversidade de funções implica necessariamente num conjunto complexo de mecanismos regulatórios da atividade da V-ATPase, incluindo dissociação reversível, direcionamento seletivo e alterações na eficiência de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de H^+ (Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008).

Um mecanismo característico de regulação da V-ATPase envolve a dissociação reversível dos domínios V_1 e V_0 , resultando na interrupção da hidrólise do ATP e consequentemente do transporte de H^+ (**Painel 8A**). Este mecanismo é desencadeado em resposta à diminuição dos níveis de glicose. Em leveduras e insetos é considerado uma resposta de conservação de energia. Entretanto, em células renais de mamíferos o seu significado fisiológico permanece obscuro (Jefferies et al, 2008; Cipriano et al., 2008). A subunidade **C** da enzima parece desempenhar um papel relevante neste mecanismo de regulação, separando-se completamente dos domínios V_0 e V_1 durante a dissociação reversível (Jefferies et al., 2008).

Um segundo mecanismo de regulação envolve a formação reversível de ligações dissulfeto entre resíduos conservados de cisteína presentes no sítio catalítico da subunidade **A**, inativando a enzima (Jefferies et al, 2008; Cipriano et al., 2008) (**Painel 8 B**).

Em certas células, a atividade da V-ATPase parece ser regulada também pelo controle da densidade de moléculas da enzima na membrana plasmática. Esta regulação é efetuada por meio da exocitose reversível de vesículas intracelulares que contém um grande número de moléculas de V-ATPase, as quais se fundem com a membrana plasmática, aumentando a densidade da enzima na superfície celular e com isso o fluxo de prótons (Jefferies et al, 2008; Cipriano et al., 2008) (**Painel 8 C**).

Um quarto mecanismo regulatório consiste em alterações da “eficiência de acoplamento” da enzima, ou seja, a eficiência com que os prótons são bombeados em resposta à hidrólise de ATP. Em leveduras, a eficiência de acoplamento da V-ATPase é determinada pela isoforma da subunidade **a** presente na enzima (Kawasaki-Nishi et al., 2001). O envolvimento de outras subunidades nessa modulação, especialmente em enzimas de mamíferos, permanece a ser esclarecido (Jefferies et al, 2008) (**Painel 8 D**). Por exemplo, sabe-se que a variação nos níveis de expressão da subunidade **H** afeta o arranjo correto das demais subunidades constituintes da V-ATPase; além disso, o domínio N-terminal desta subunidade é essencial para a ativação da hidrólise do ATP, enquanto seu domínio C-terminal desempenha um papel essencial no acoplamento entre a hidrólise e o transporte de prótons (revisto por Jefferies et al., 2008).

A bafilomicina e a concanamicina são compostos estruturalmente relacionados que inibem especificamente a V-ATPase, em concentração nanomolar (Bowman et al., 1988; Droese et al., 1993). Embora a exata localização do sítio de ligação da bafilomicina na molécula da enzima tenha permanecido obscura por mais de duas décadas após a sua identificação como inibidor específico da V-ATPase (Bowman et al, 1988), atualmente ela é bem conhecida (Bowman et al., 2004, 2006; Murata et al., 2005; Huss e Wiczorek, 2009). A bafilomicina liga-se ao complexo V_0 , interagindo majoritariamente com a subunidade **c**; alguns aminoácidos da subunidade **a** aparentemente também contribuem para a ligação. A interação do inibidor com essas subunidades aparentemente impede a rotação do **anel c**, bloqueando o transporte de prótons (Bowman & Bowman, 2002; Bowman et al., 2004; Wang et al., 2005, Fernandes et al., 2006; Huss e Wiczorek, 2009).

Diversos estudos mostram que a bafilomicina não apresenta especificidade para um tipo particular de V-ATPase, inibindo indiscriminadamente todas elas; este fato pode ser atribuído à grande homologia entre as subunidades **c** das enzimas das mais diferentes origens (Fernandes et al., 2006; Huss e Wiczorek, 2009).

Painel 8. Mecanismos de Regulação da atividade V-ATPase.

(Modificado de Jefferies et al, 2008).

1.4. (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais dos crustáceos.

A despeito de sua importância reconhecida no processo de osmoregulação, pouco se conhece sobre as características bioquímicas da (Na,K)-ATPase branquial dos crustáceos, em particular em espécies dulcícolas. Analogamente a enzimas de outras fontes, a dos crustáceos apresenta uma subunidade α , de peso molecular entre 95 e 104 KDa, e uma subunidade β , de peso molecular 38 a 40 KDa (Furriel et al., 2000; Masui et al., 2002; Towle et al., 2001; Lucu & Flik, 1999; Gonçalves et al., 2006; Santos et al., 2007; Garçon et al., 2007; Belli et al., 2009). As isoformas das duas subunidades são pouco conhecidas nos crustáceos. Um único cDNA para a subunidade α foi clonado de *Callinectes sapidus* (Towle et al., 2001), *Homarus americanus* (Parrie & Towle, 2002) e *Scylla paramosain* (Chung & Lin, 2006). Em contraste, dois cDNA diferentes para esta subunidade foram identificados em *Artemia* (Lucu & Towle, 2003) e *Pachygrapsus marmoratus* (Jayasundara et al., 2007). A estrutura primária completa da cadeia α é conhecida em poucas espécies de crustáceos, observando-se grande homologia entre elas (Baxter-Lowe et al., 1989; Macías et al., 1991; Pressley, 1992; Towle et al., 2001; Parrie & Towle, 2002; Jayasundara et al., 2007). Diferentemente da enzima de vertebrados, a subunidade α da enzima de *Artemia* parece apresentar apenas 8 segmentos transmembrana (Peterson & Hokin, 1981). Com respeito à subunidade β , sua estrutura primária só é conhecida em *Artemia*, sendo observada boa homologia com as isoformas da subunidade β de vertebrados (Bhattacharyya et al., 1990). Em *D. pagei*, foi descrita uma grande homologia entre a sequência de aminoácidos parcialmente deduzida para a subunidade α da (Na,K)-ATPase branquial e aquelas determinadas para enzimas de outros invertebrados e até mesmo vertebrados. Além disso, níveis mais elevados de RNAm para esta subunidade e uma atividade (Na,K)-ATPase cerca de 4 vezes maior foram determinados nas brânquias posteriores do animal (Weihrauch et al., 2004b).

As características cinéticas da (Na,K)-ATPase branquial dos crustáceos começaram a ser investigadas recentemente (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005a). Alguns autores têm sugerido que a afinidade por íons Na^+ seria o parâmetro cinético mais variável entre as enzimas branquiais de diferentes espécies, aparentemente refletindo a salinidade do ambiente natural do animal. Assim, enzimas de animais bem adaptados à água doce tenderiam a apresentar afinidades maiores por íons Na^+ , enquanto as afinidades por íons K^+ e Mg^{2+} e pelo ATP seriam menos variáveis e aparentemente não correlacionadas à salinidade do habitat do animal (Harris & Bayliss, 1988; Pequéux, 1995; Lucu & Towle, 2003). Entretanto, vários resultados conflitantes

com esta proposta foram relatados recentemente, sugerindo que, na verdade, o parâmetro mais variável seria a afinidade da enzima por K^+ . Desta forma, acredita-se que uma análise comparativa das características cinéticas da (Na,K)-ATPase branquial de crustáceos com diferentes graus de adaptação ao ambiente dulcícola pode contribuir para identificar características particulares da enzima que efetivamente contribuem para um processo eficiente de captação de íons Na^+ em meios diluídos, melhorando a compreensão das adaptações bioquímicas que estão associadas à invasão do ambiente dulcícola por estes animais, ao longo da evolução. Nesse contexto, *D. pagei*, um antigo invasor do ambiente dulcícola, constitui um modelo de estudo bastante adequado.

Comparativamente à (Na,K)-ATPase, ainda menos é conhecido sobre as características bioquímicas da V-ATPase branquial dos crustáceos. A subunidade **B** da enzima do caranguejo *Carcinus maenas* foi seqüenciada completamente (Weihrauch et al., 2001), mostrando 76–82% de identidade com as seqüências de aminoácidos deduzidas para a mesma subunidade em vertebrados, células vegetais e fungos. A mesma subunidade, em *Artemia franciscana*, também demonstrou alto grau de identidade, comparada às isoformas de mamíferos (Covi et al., 2005). A subunidade **B** foi parcialmente seqüenciada, ainda, nos caranguejos *Eriocheir sinensis*, *C. sapidus* e *Chasmagnathus granulatus* (Weihrauch et al., 2001; Luquet et al., 2005), mostrando boa homologia com a seqüência completa deduzida para *C. maenas*. A massa molecular estimada para a subunidade B da enzima de *C. maenas* (59 kDa) é bastante próxima daquela relatada para enzimas de outras fontes (Paunescu et al., 2004). As características cinéticas da V-ATPase de crustáceos ainda não foram investigadas. Em *D. pagei*, a subunidade **B** foi parcialmente seqüenciada (Weihrauch et al., 2004b), mostrando boa homologia com a seqüência completa deduzida para *C. maenas* (Weihrauch et al., 2001). Além disso, a expressão do RNAm para a V-ATPase foi maior nas brânquias posteriores em relação às anteriores, em animais mantidos em água doce, embora níveis similares de atividade enzimática tenham sido estimados (Weihrauch et al., 2004b).

A resposta osmorregulatória dos crustáceos é regulada por fatores neuroendócrinos. Estes compostos modulam o transporte de íons através do epitélio branquial, além da excreção de urina e permeabilidade corporal dos animais (revisto por Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Freire et al., 2008). As respostas a mudanças de salinidade observadas em crustáceos eurialinos podem ser divididas em dois níveis: curto prazo, num período de minutos a horas e longo prazo, num

período de dias. A curto prazo, a (Na,K)-ATPase parece ser o primeiro alvo da regulação do processo de captura ativa de íons Na^+ em meios diluídos, observando-se uma diminuição rápida e pronunciada da sua atividade quando da transferência dos animais para meios mais salinos (Neufeld et al., 1980; Henry et al., 2002; Lucu & Flik, 1999; Tresguerres et al., 2003; Bianchini et al., 2008). Aparentemente estes mecanismos de modulação rápida não envolvem mudanças no número de moléculas de enzima, podendo estar associados a alterações nos níveis intracelulares de cAMP (Sommer & Mantel, 1988,1991; Kamemoto, 1991; Mo et al., 1998,2003; Lucu & Flik, 1999; Spanings-Pierrot et al., 2000; Tierney et al., 2003; Bianchini et al., 2007; Lucu et al., 2008). A atividade da enzima também pode ser modulada por fosforilação/desfosforilação da cadeia α por proteínas quinases A e/ou C, como relatado para a enzima dos vertebrados (Lucu & Towle, 2003; Tresguerres et al., 2003; Fuller et al., 2009; Rodrigues-Mascarenhas et al., 2009).

Inúmeros estudos mostram que a atividade específica da (Na,K)-ATPase branquial também diminui quando crustáceos mantidos em meios diluídos são aclimatados a meios mais salinos por períodos mais longos, de 1-2 semanas (revisto por Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005a; Freire et al., 2008). Os mecanismos moleculares subjacentes a esta modulação da atividade da enzima a longo prazo também não são bem compreendidos, embora venham despertando interesse crescente dos pesquisadores. Acredita-se que podem estar envolvidos mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, incluindo alterações na velocidade de transcrição e/ou na estabilidade do RNAm, “splicing” diferencial do RNA, mudanças nas velocidades de síntese e degradação da proteína, modificações pós-traducionais e ainda translocação de moléculas pré-existentes entre a membrana plasmática e reservatórios intracelulares (Towle et al., 2001; Henry et al., 2002; Masui et al., 2005; Luquet et al., 2005; Lovett et al., 2006a; Chung & Lin, 2006; Jayasundara et al., 2007; Bianchini et al., 2008). A expressão de isoenzimas diferentes também pode estar envolvida, como sugerido para alguns caranguejos (Siebers et al., 1983; Harris & Bayliss, 1988; Genovese et al., 2004; Masui et al., 2005; Lovett et al., 2006a) e os camarão *Macrobrachium olfersi* (Mendonça et al., 2007).

Alguns autores têm sugerido ainda que a aclimação a diferentes salinidades provoque alterações na composição lipídica das membranas das células branquiais (Péqueux, 1995; Lucu and Towle, 2003, Hurtado et al., 2006; Belli, 2008), modulando a permeabilidade (Bell et al., 1986; Haines, 1994; Porter et al., 1996) e a atividade da (Na,K)-ATPase e de outras enzimas presentes na membrana (Gibbs, 1998; Turner et al., 2003). Por fim, o aumento da atividade da

(Na,K)-ATPase no epitélio branquial de caranguejos e lagostas marinhos/estuarinos expostos a meios diluídos parece estar associado à diferenciação e hipertrofia de células ionotransportadoras (Lucu & Towle, 2003; Lovett et al., 2006b). Nos caranguejos, tanto as brânquias anteriores como as posteriores exibem atividade (Na,K)-ATPase dependente da salinidade, porém a resposta à salinidade é diferente entre elas, dada sua diferenciação funcional (Bianchini et al., 2007).

A relação entre a atividade da V-ATPase branquial e a salinidade do meio tem sido pouco estudada; ainda não foi estabelecida uma relação direta entre a atividade da enzima e a hiperregulação osmótica nos crustáceos. As evidências da participação desta enzima na captação de íons por hiperreguladores fortes em água doce derivam exclusivamente de medidas eletrofisiológicas e da detecção de sua atividade no tecido branquial de algumas espécies, incluindo *D. pagei* (Weihrauch et al., 2004b). Apenas recentemente Tsai & Lin (2007) relataram, pela primeira vez, um aumento de cerca de 3 vezes na atividade V-ATPase branquial no caranguejo semi-terrestre marinho *Uca formosensis*, em resposta à aclimação a um meio diluído (5‰). Algumas evidências indicam ainda que o grau de mudança na expressão do RNAm da (Na,K)-ATPase branquial quando da transferência de animais de uma condição isosmótica para uma condição de baixa salinidade é maior que aquele observado para outros enzimas, incluindo a V-ATPase. Esta menor variação na expressão do RNAm para a V-ATPase pode ser atribuída a uma baixa resposta a um estresse salino, já que esta enzima também está envolvida em outros processos que não dependem diretamente da salinidade, como a excreção de amônia através das brânquias (Weihrauch et al., 2002, 2004, Luquet et al., 2005). Tem sido sugerido, ainda, que o aumento da atividade V-ATPase branquial em resposta à exposição a baixas e/ou altas salinidades pode estar associada a uma alta demanda para exportação de H^+ pelas células, em consequência de um possível aumento da velocidade metabólica induzido pela mudança de salinidade, com a finalidade de manter a regulação ácido-base da hemolinfa (Bianchini et al., 2007).

1.5. O caranguejo *Dilocarcinus pagei*

A família Trichodactylidae é exclusivamente dulcícola, distribuindo-se na América do Sul e Central, desde o sul do México até a Argentina. *Dilocarcinus pagei* (**Painel 9**) é um caranguejo tricodactilídeo encontrado nas bacias continentais da América do Sul e planícies costeiras das Guianas e do Brasil (Magalhães et al., 2005). Passa todo o ciclo de vida em água doce e apresenta desenvolvimento larval abreviado, típico de crustáceos estritamente dulcícolas (Hirose et al., 2000). Assim, é considerado um antigo invasor da água doce. Por outro lado, preserva uma notável capacidade de adaptação a salinidades elevadas (Augusto et al., 2007): apesar de apresentar alguma mortalidade a partir de 25‰, sobrevive até dois dias em água do mar (35‰).

Embora os caranguejos dulcícolas constituam um grupo abundante e bem sucedido de crustáceos decápodes, seus mecanismos fisiológicos de regulação osmótica e iônica têm sido pouco investigados. Sabe-se que são bons hiperosmorreguladores e que apresentam baixa permeabilidade a movimentos passivos de água e sais, minimizando as perdas difusivas de íons e a entrada osmótica de água através das superfícies corporais (Mantel & Farmer, 1983; Shaw, 1959; Harris, 1975; Greenaway, 1981; Morris & van Aardt, 1998). Nas espécies estudadas até o momento, não foi observada a produção de urina diluída, mas sim de urina isosmótica a uma taxa particularmente baixa, o que também contribui para minimizar as perdas de sais e reduzir a dependência relativa a mecanismos de absorção ativa de íons a partir do meio externo (Greenaway, 1981; Warburg & Goldenberg, 1984; Morris & van Aardt, 1998). Recentemente, demonstrou-se que *D. pagei* também produz urina isosmótica e isoiônica à hemolinfa (Augusto et al., 2007).

A capacidade osmorregulatória de *D. pagei* está bem caracterizada. Em água doce, os animais adultos mantêm a concentração osmótica da hemolinfa elevada (420 mOsm/kg H₂O), hiperregulando eficientemente até o ponto isosmótico de 744 mOsm/kg H₂O (24 ‰). As concentrações de Na⁺ e Cl⁻ da hemolinfa, em água doce, são mantidas em torno de 214 mmol L⁻¹ e 226 mmol L⁻¹, respectivamente (meio externo, osmolalidade 20 mOsm/KgH₂O; concentração de íons Na⁺ ≈ 0,7 mmolL⁻¹; concentração de íons Cl⁻ ≈ 5 mmol L⁻¹). As concentrações destes íons são hiperreguladas até 15‰, salinidade acima da qual observa-se osmoconformação (Onken & McNamara, 2002; Augusto et al., 2007b). As concentrações iônicas e a osmolalidade da hemolinfa de *D. pagei* podem ser consideradas baixas, quando comparadas àquelas determinadas para outros caranguejos dulcícolas (Onken & McNamara, 2002; Augusto et al., 2007). Esta

característica pode ter caráter adaptativo, uma vez que a redução do gradiente osmótico e iônico hemolinfa-meio externo diminui a perda passiva de íons e o gasto energético para sua captura a partir do meio externo diluído. Assim, entre os caranguejos dulcícolas estudados até o momento, *D. pagei* parece estar particularmente bem adaptado à vida em água doce.

Dilocarcinus pagei apresenta oito pares de brânquias. As brânquias de 1 a 5 (G1-G5) são designadas brânquias anteriores enquanto que G6-G8 são consideradas brânquias posteriores. O estudo da microanatomia das brânquias de *D. pagei* (Onken & McNamara, 2002; Weihrauch et al., 2004b) revelou que as anteriores apresentam a mesma especialização para trocas respiratórias observada em caranguejos marinhos ou de águas salobras. Entretanto, as lamelas branquiais posteriores apresentam assimetria estrutural marcada, em contraste com a simetria observada nas brânquias posteriores daqueles animais. Assim, em *D. pagei* o epitélio proximal é espesso, enquanto o epitélio distal é fino (**Painel 10**).

Painel 9. O caranguejo *Dilocarcinus pagei*.

Recentemente, foi demonstrado que o epitélio fino das brânquias posteriores de *D. pagei* está envolvido no transporte ativo de Cl^- , o qual parece ocorrer de maneira independente da atividade de (Na,K)-ATPase, mas envolvendo a ação de canais de Cl^- , anidrase carbônica e V-ATPase. Por outro lado, o epitélio espesso parece ser o responsável pelo transporte ativo de Na^+ , via (Na,K)-ATPase, embora não tenham sido identificados possíveis transportadores envolvidos na entrada desses íons para o citosol das células epiteliais (Onken & McNamara, 2002; Weihrauch et al.,

2004b). Desta forma, a captação de Na^+ e Cl^- através do epitélio branquial posterior de *D. pagei* parece envolver mecanismos moleculares semelhantes aos propostos para outros hiperreguladores fortes (Kirschner, 2004; Freire et al., 2008), embora o transporte de cada um dos íons ocorra de modo independente e através de lados opostos das lamelas branquiais. Essa assimetria estrutural e fisiológica das brânquias posteriores, descrita somente para *D. pagei* até o presente momento, pode representar uma contribuição importante para a invasão bem sucedida do ambiente dulcícola pelos caranguejos tricodactilídeos.

Painel 10. Microanatomia das brânquias de *D. pagei*

A - Microanatomia da lamela da brânquia anterior nº4, mostrando o epitélio fino e simetricamente arranjado em ambos os lados da lamela (e), separados pela hemolinfa (h) que contém um septo descontínuo (s). Ambos os epitélios consistem de células pilares (pc) e suas flanges laterais (f), muito finas, subjacentes a uma cutícula fina (c). **B** - Lamela da brânquia posterior nº7, mostra a assimetria dos epitélios distal (d) e proximal (p) subjacentes à cutícula (c), mais espessa. O epitélio distal é fino e bem desenvolvido e consiste exclusivamente das flanges apicais (f) das células pilares (pc), apresentando grande número de vesículas (v) e invaginações de membrana na região apical. Já o epitélio proximal é espesso, caracterizado por inúmeras invaginações apicais e basais (i) e poucas vesículas apicais. Observa-se ausência de septo intralamelar (Modificado de Weihrauch et al., 2004b). Barras: 20 μm .

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais do caranguejo holimnético *D. pagei*, considerado um antigo invasor do ambiente dulcícola, visando contribuir para:

- a. um maior entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos de osmorregulação nos crustáceos decápodes dulcícolas, ainda pouco estudados, com ênfase nos papéis desempenhados pelas enzimas em estudo;
- b. o esclarecimento dos mecanismos de regulação da atividade da V-ATPase em resposta à alteração da salinidade do meio externo;
- c. a compreensão das adaptações bioquímicas associadas à invasão da água doce pelos crustáceos decápodes, ao longo da evolução, por meio de uma análise comparativa das propriedades das (Na,K)-ATPases expressas nas brânquias de *D. pagei* e de outras espécies de caranguejos habitantes de meios mais salinos (em estudo ou já estudadas em nosso laboratório).

2.2. Objetivos específicos

- a. obtenção de frações microsomais das brânquias de caranguejos da espécie *D. pagei*, nas seguintes condições:
 - I. mantidos em água doce;
 - II. aclimatados a 21‰ por intervalos de tempo diferentes (1 a 240h);
 - III. aclimatados a diferentes salinidades (0,5-21‰) por 10 dias.
- b. caracterização cinética da (Na,K)-ATPase branquial de animais mantidos em água doce;
- c. caracterização cinética da V-ATPase branquial de animais mantidos em água doce;
- d. estudo do efeito do tempo de exposição a 21‰ sobre a atividade V-ATPase; caracterização cinética da enzima expressa em diferentes tempos de exposição;
- e. estudo do efeito da aclimação a diferentes salinidades (0,5 a 21‰), por 10 dias, sobre a atividade V-ATPase; caracterização cinética da enzima expressa em diferentes salinidades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

ATP (sal de Tris), p-nitrofenilfosfato (PNFF), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico (Hepes), imidazol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, ortovanadato de sódio, taptargina, aurovertina B, bafilomicina A₁, alameticina, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT), ácido etacrínico, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD⁺, NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 3-fosfogliceraldeído dietil acetal e padrões de massa molecular para eletroforese (SDS-6H2), para proteínas entre 30 e 200 kDa, foram adquiridos da Sigma. Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Merck. O coquetel de inibidores de protease (leupeptina 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, antipaína 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, benzamidina 1 mmol L^{-1} e pepstatina A 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi adquirido da Calbiochem. O anticorpo monoclonal $\alpha 5$ contra a subunidade α da (Na,K)-ATPase de aves (todas as isoformas) foi adquirido do Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA). Anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adquirido da Promega Corporation (USA). A resina AG50WX-8 foi adquirida da Biorad (USA). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água tratada sucessivamente em aparelhos MilliRO e MilliQ (Millipore Co.,USA).

3.1. Coleta dos animais.

Espécimes adultos de *D. pagei* em intermuda foram coletados no lago do pesqueiro AB, localizado na Rodovia Alexandre Baldo, Km 33, estado de São Paulo, com o auxílio de peneiras de malha de aço junto às raízes da vegetação marginal ou com o auxílio de armadilhas. Os animais foram levados para o Laboratório de Fisiologia de Crustáceos do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP em caixas de isopor contendo água do local da coleta em quantidade suficiente para molhá-los sem cobri-los totalmente.

3.2. Aclimação dos animais.

Os animais foram divididos em grupos de 7 a 10 espécimes. Um dos grupos foi mantido em água doce (< 0,5 ‰) do local de coleta por pelo menos três dias antes do sacrifício. Os demais grupos de animais foram aclimatados à salinidade de 21‰ por períodos de 1 h, 5 h, 24 h,

120 h e 240 h. Alternativamente, grupos de animais foram aclimatados por 10 dias às salinidades de 5‰, 10‰ e 15‰. Os caranguejos foram mantidos no laboratório em tanques de 100 L, contendo água de salinidade adequada constantemente aerada até uma profundidade de cerca de 10 cm, sendo alimentados, em dias alternados, com alface, laranja, banana, maçã e carne bovina. Plantas aquáticas e tijolos perfurados colocados nos tanques ofereciam refúgio e livre acesso dos animais a superfícies secas. Água de diferentes salinidades foi preparada por diluição da água do mar da praia de Maresias (33,5 ‰ de salinidade) com água doce do local de coleta; a salinidade final (± 0.5 ‰) foi ajustada usando um refratômetro (American Optical).

3.3. Coleta da hemolinfa dos animais.

Amostras da hemolinfa ($\approx 60\mu\text{L}$) de cada animal aclimatado à salinidade de 21‰ por diferentes intervalos de tempo foram coletadas com uma seringa de insulina e agulha #25-8, inserida na articulação entre o coxopodito do último pereiópodo e o segundo segmento abdominal.

3.4. Dissecção das brânquias posteriores.

Para cada homogeneizado preparado, 7 a 10 animais foram rapidamente mortos por destruição do gânglio cerebral dorsal e do gânglio ventral com uma tesoura. A carapaça foi removida e as brânquias posteriores seccionadas em suas bases com uma microtesoura, sendo colocadas, com auxílio de uma pinça, em 20 mL de tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mmol L^{-1} , pH 6,8 contendo sacarose 250 mmol L^{-1} , EDTA 6 mmol L^{-1} e uma mistura de vários inibidores de proteases, composta por benzamidina 1 mmol L^{-1} , antipaína $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, leupeptina $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e pepstatina A $1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e mantidas em gelo picado.

3.5. Preparação das frações microsomais do tecido branquial de *D. paguei*.

As frações microsomais do tecido branquial de diferentes grupos de animais, aclimatados por 10 dias a diferentes salinidades ou por diferentes intervalos de tempo à salinidade de 21‰, foram preparadas de acordo com Masui et al. (2002). Após a retirada do excesso de tampão, as brânquias foram pesadas, cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 mL de tampão/g de tecido úmido) em um homogeneizador Potter. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 35 minutos, a 4°C, numa centrífuga Sorval

RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em gelo picado e o *pellet* foi novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram reunidos e a suspensão resultante foi centrifugada a 100.000 g durante 1,5 h, a 4°C, numa ultracentrífuga Hitachi 55P-72. O *pellet* resultante (fração microsomal) foi homogeneizado em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L⁻¹ (15 mL de tampão/g de tecido úmido). Alíquotas de 0,5 mL foram congeladas em mistura de gelo seco/acetona e armazenadas a -20°C. Não foram observadas perdas significativas de atividade até 2 meses após a preparação. Quando necessário, alíquotas foram descongeladas, mantidas em gelo picado e utilizadas imediatamente.

3.6. Determinação das atividades PNFFase total e K⁺-fosfatase das frações microsomais.

A hidrólise do PNFF foi estimada continuamente, a 25°C, acompanhando-se a liberação de p-nitrofenolato ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 13.160 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) num espectrofotômetro FEMTO 700 plus equipado com células termostatizadas (Furriel et al., 2001). As condições padrão dos ensaios, determinadas para frações microsomais branquiais de animais mantidos em água doce, foram tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e 1 µg de alameticina/µg de proteína, num volume final de 1 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição de substrato ao meio reacional e a atividade foi medida após a pré-incubação da preparação microsomal com alameticina durante 10 minutos.

A atividade também foi determinada nas condições descritas acima, porém na presença de ouabaína 4 mmol L⁻¹. A diferença entre os valores obtidos na ausência (atividade PNFFase total) e na presença (atividade insensível à ouabaína) de ouabaína representa a atividade K⁺-fosfatase da (Na,K)-ATPase.

Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições de ensaio. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, a 25°C. As determinações foram feitas em duplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes, com preparações de enzima diferentes.

3.7. Determinação das atividades ATPase total e (Na,K)-ATPase das frações microsomais.

A atividade ATPase total foi determinada continuamente, a 25°C, empregando-se o sistema de acoplamento piruvato quinase/lactato desidrogenase, no qual a hidrólise do ATP é acoplada à oxidação do NADH (Masui et al., 2002), de acordo com o esquema:

A oxidação do NADH foi estimada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}}$, pH 7,5 = 6200 mol⁻¹ L cm⁻¹), utilizando um espectrofotômetro FEMTO 700 plus equipado com células termostatizadas. As condições padrão dos ensaios, determinadas para frações microsomais branquiais de animais mantidos em água doce, foram: Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U), LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, em um volume final de 1 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição de substrato ao meio reacional e a atividade foi medida sem a pré-incubação da preparação microsomal com alameticina.

Nos experimentos realizados em presença de baixas concentrações ou ausência de potássio, a atividade ATPase foi quantificada utilizando-se o sistema de acoplamento gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/fosfoglicerato quinase, sendo a hidrólise do ATP acoplada à redução do NAD⁺ (Masui et al., 2003), de acordo com o esquema abaixo.

A redução do NAD⁺ foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}}$, pH 7,5 = 6200 mol⁻¹ L cm⁻¹.cm⁻¹) e as condições padrão dos ensaios foram: tampão trietanolamina 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo

ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato (GAF) 2 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, FGQ (9U), GAFDH (12U) e 1 µg alameticina/µg proteína, em um volume final de 1 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição de substrato ao meio reacional e a atividade foi medida sem a pré-incubação da preparação microsomal com alameticina.

A atividade ATPase insensível à ouabaína foi determinada nas mesmas condições descritas acima mas em presença de ouabaína em concentração suficiente para inibir completamente a atividade ATPase total (3 mmol L⁻¹). A diferença entre a atividade ATPase total (medida na ausência de ouabaína) e a atividade ATPase insensível à ouabaína corresponde à atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal.

Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições de ensaio. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, a 25°C. As determinações foram feitas em duplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes, com preparações de enzima diferentes.

3.8. Determinação da atividade V-ATPase das frações microsomais.

A atividade V-ATPase foi estimada por diferença entre a atividade ATPase insensível ao ortovanadato e a atividade ATPase insensível à mistura ortovanadato e bafilomicina A₁, denominada “atividade ATPase insensível à bafilomicina”. Em ambas as determinações, a hidrólise do ATP foi acompanhada continuamente, a 25°C, empregando-se o sistema de acoplamento piruvato quinase/lactato desidrogenase, como descrito no item 3.7.

A atividade ATPase insensível ao ortovanadato corresponde à atividade ATPase estimada em presença de ortovanadato de sódio 10 µmol L⁻¹, concentração suficiente para inibir todas as ATPases do tipo P presentes nas frações microsomais em estudo. As condições padrão dos ensaios foram tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo KCl 3 mmol L⁻¹ (para assegurar alta atividade da piruvato quinase), ortovanadato de sódio 10 µmol L⁻¹, NADH 0,28 mmol L⁻¹, FEP 4,24 mmol L⁻¹, PQ (60 U), LDH (234 U) e 1 µg alameticina/µg proteína, além de ATP e MgCl₂ em condições ótimas, determinadas para as frações microsomais obtidas para cada condição salinidade/tempo de aclimação dos animais. A reação sempre foi iniciada pela adição de

substrato ao meio reacional e a atividade foi medida sem a pré-incubação da preparação microsomal com alameticina.

A atividade ATPase insensível à bafilomicina foi determinada nas mesmas condições descritas acima, mas em presença de bafilomicina A_1 em concentração suficiente para inibir completamente a atividade V-ATPase ($\approx 0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). A diferença entre a atividade insensível ao ortovanadato e a atividade insensível à bafilomicina corresponde à atividade V-ATPase da fração microsomal.

Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições de ensaio. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, a 25°C. As determinações foram feitas em duplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes, com preparações de enzima diferentes.

3.9. Determinação do pH ótimo para a atividade V-ATPase das frações microsomais do tecido branquial de *D. paguei* mantido em água doce.

A atividade V-ATPase foi estimada descontinuamente a 25°C, em diferentes pH, acompanhando-se a liberação de fosfato inorgânico, de acordo com Demenis et al. (2003). Em síntese, a reação foi iniciada pela adição da preparação enzimática ao meio reacional (volume final de 1 mL) e interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético a 30% (m/v) gelado. Após a interrupção da reação, os tubos foram mantidos em banho de gelo picado e imediatamente centrifugados a 4000 g por 10 minutos. A seguir, o fosfato liberado foi determinado empregando o método de Heinonen & Lahti (1981). A atividade V-ATPase foi definida como a diferença entre as atividades obtidas em presença de ortovanadato $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, na presença e ausência de bafilomicina A_1 $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. As condições padrão dos ensaios foram tampão Hepes, 50 mmol L^{-1} , em diferentes pH, contendo ATP 5 mmol L^{-1} , MgCl_2 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, KCl 3 mmol L^{-1} , ortovanadato $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g}$ alameticina/ μg proteína. Os ensaios foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido empregando pelo menos três preparações diferentes.

3.10. Tratamento das enzimas de acoplamento.

Imediatamente antes do uso, volumes adequados das suspensões cristalinas de LDH e PQ em sulfato de amônio foram centrifugados a 20.000g, a 4°C, por 15 min, numa centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810. O *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de tampão Hepes 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 e transferido para um filtro Microcon YM-30, sendo lavado por centrifugação a 14000 g e 4°C, com o mesmo tampão, até completa eliminação de NH₄⁺ (testada com o reagente de Nessler). Finalmente, o *pellet* foi ressuspenso no volume original em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5. Para as enzimas FGQ e GAFDH utilizou-se o mesmo procedimento, porém empregando para a lavagem tampão trietanolamina 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo DTT 1 mmol L⁻¹.

3.11. Dosagem de íons na hemolinfa de *D. paguei*.

As dosagens de íons Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ na hemolinfa de espécimes de *D. paguei* aclimatados por 1h, 5h, 24h, 120h ou 240 h à salinidade de 21‰ foram realizadas por absorção atômica, empregando um espectrofotômetro Shimadzu A-A680 e um registrador Shimadzu PR-5 Graphic printer. Inicialmente, cerca de 10 µL de amostra de hemolinfa foram diluídos (1:1000) em HCl 1%. Curvas padrão para a dosagem de cada íon nas amostras de hemolinfa foram construídas empregando soluções de concentrações conhecidas de cada íon, sendo adicionado a cada padrão CsCl 5%, a fim de eliminar a interferência de ionização. Igualmente, CsCl 5% foi adicionado a cada amostra de hemolinfa a ser analisada. Além disso, as amostras de hemolinfa receberam Ln 5%, com a finalidade de eliminar interferência química. As determinações foram feitas em duplicata e repetidas com amostras de hemolinfa de 3 animais diferentes, mantidos em cada condição analisada (N=3)

3.12. Preparação da solução de ATP.

Solução estoque de ATP de concentração 100 mmol L⁻¹ foi preparada utilizando ATP sal de Tris. A solução teve seu pH acertado em 7,5 com trietanolamina (d= 1,12 g mL⁻¹) e sua concentração foi ajustada por meio da determinação da absorbância em 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 7,0} = 15.400 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$).

3.13. Preparação da solução de gliceraldeído 3-fosfato (GAF).

A solução estoque de GAF 20 mmol L^{-1} foi preparada no momento do uso por hidrólise de 25 mg de 3-fosfogliceraldeído dietil acetal com 150 μL HCl concentrado ($d= 1,18 \text{ g mL}^{-1}$), em 2 mL de água. A mistura foi mantida em banho de água fervente por 2 min e neutralizada com trietanolamina ($d= 1,12 \text{ g mL}^{-1}$).

3.14. Dosagem de proteína.

As concentrações de proteína foram estimadas conforme a metodologia descrita por Read & Northcote (1981), empregando soroalbumina bovina como padrão.

3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise por “Western blotting”.

Eletroforeses das frações microsomais em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes foram realizadas em gradiente de concentração de acrilamida de 5 a 20% de acordo com Laemmli (1970). Após a eletroforese, o gel foi cortado em duas metades, sendo uma delas revelada para proteína empregando nitrato de prata (Blum et al., 1987). A segunda metade foi submetida a eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose (Towbin et al, 1979). Após a transferência, a membrana foi incubada por 10h, a 25°C , numa solução bloqueadora de leite desnatado 5% em tampão TBS-Tween (Tris/HCl 50 mmol L^{-1} , pH 8,0, contendo Tween-20 0,05 % e NaCl 150 mmol L^{-1}), sob agitação. Terminado este período, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBS-Tween e a seguir adicionou-se o anticorpo monoclonal α -5 (diluição 1:10 na mesma solução), procedendo-se a nova incubação, por 16h a 5°C . Após três lavagens em tampão TBS-Tween a membrana foi incubada por 1h a 25°C com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (diluído 1:7500 no mesmo tampão). A incorporação específica de anticorpo foi revelada em Tris/HCl 100 mmol L^{-1} , pH 9,5, contendo NaCl 100 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NBT $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e BCIP $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$. A massa molecular das bandas reveladas foi estimada utilizando como referência uma mistura de padrões de massa molecular para eletroforese (SDS-6H2, Sigma), para proteínas entre 30 e 200 kDa. A análise por Western blot foi repetida 3 vezes, utilizando amostras de preparações microsomais diferentes.

3.16. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

Uma alíquota da fração microsomal (0,5 mL) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de 10 a 50% (p/p) de sacarose em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8 e centrifugada a 180.000 g em uma centrífuga Hitachi 55P-72 usando um rotor vertical (PV50T2), durante 2 h, a 4°C. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A concentração de proteína presente em cada fração foi determinada, bem como a percentagem de sacarose, empregando um refratômetro de bancada RL3 (PZO, Poland). As medidas das atividades K⁺-fosfatase, (Na,K)-ATPase e V-ATPase em cada fração foram realizadas imediatamente após a coleta. A análise por centrifugação em gradiente de sacarose foi repetida 3 vezes, utilizando amostras de preparações microsomais diferentes.

3.17. Preparação da solução de ortovanadato.

A solução estoque de ortovanadato de sódio foi preparada segundo Gordon (1991). Uma solução de concentração aproximadamente 1 mmol L⁻¹ teve seu pH acertado em 10,0 e em seguida foi fervida em banho-maria até se tornar translúcida. Após o resfriamento, o pH da solução foi novamente ajustado em 10,0 e a concentração final da solução foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{260\text{nm}, \text{pH } 10,0} = 3550 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). Após ajustar a concentração para 1 mmol L⁻¹, alíquotas de 1 mL foram congeladas em frascos plásticos e estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.18. Tratamento dos dados cinéticos.

Os parâmetros cinéticos V (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis-Mentem), K_{0,5} (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram calculados por regressão não-linear empregando o programa SigraFW (Leone et al., 2005a). As constantes de dissociação do complexo enzima – inibidor (K_I) foram determinados graficamente conforme descrito por Dixon (1953). Os experimentos cinéticos foram realizados em duplicata e repetidos três vezes, empregando diferentes preparações de frações microsomais (N=3). Os parâmetros cinéticos apresentados no texto e nas tabelas são valores calculados e representam a média ± desvio padrão dos valores determinados nas três repetições. Cada figura apresentada mostra dados de uma das repetições do experimento e é representativa do resultado obtido.

4. RESULTADOS

A atividade PNFFase total específica foi inicialmente estimada em frações microsomais obtidas a partir das brânquias anteriores (G1-G5) e posteriores (G6-G8) de *D. pagei* mantido em água doce, correspondendo a $17,4 \pm 0,8$ e $43,4 \pm 2,2$ U mg^{-1} , respectivamente. Considerando que as brânquias posteriores do animal estão diretamente envolvidas nos processos osmorregulatórios, objeto deste estudo, enquanto as anteriores apresentam especialização para trocas respiratórias, deu-se continuidade ao trabalho empregando preparações microsomais apenas destas brânquias. A atividade específica cerca de 2,5 vezes maior estimada para as frações microsomais das brânquias posteriores é coerente com o papel relevante desempenhado por esta enzima na captação de íons através das brânquias dos crustáceos em meios diluídos.

4.1. Atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

Neste trabalho, foram caracterizadas inicialmente as propriedades cinéticas da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce utilizando o substrato sintético p-nitrofenilfosfato (PNFF). A metodologia empregada para obtenção das frações microsomais branquiais destes animais resultou numa preparação com atividade PNFFase total de $49,1 \pm 2,4$ U mg^{-1} . Esta preparação mostrou-se muito estável quando mantida a -20°C , não se observando perdas significativas de atividade por até 60 dias. No momento do uso, alíquotas foram descongeladas e mantidas em gelo picado; nessas condições, a atividade manteve-se constante por períodos de até 8 h (não mostrado).

A fim de investigar a presença de vesículas fechadas na preparação de membranas branquiais nas condições de medida de atividade, o que resultaria em valores subestimados, a atividade PNFFase foi determinada na ausência e na presença de alameticina, um antibiótico formador de canais transmembrana. A alameticina foi utilizada em concentrações crescentes (0-30 μg totais) no meio reacional, enquanto a massa de proteína total foi mantida constante (25 μg), e a preparação de membranas foi pré-incubada com o antibiótico por um minuto a 25°C . A **Figura 1** mostra um aumento de 45 % na atividade PNFFase em presença de alameticina em concentrações iguais ou superiores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína, sugerindo fortemente a presença de vesículas seladas na preparação. O estudo da variação do intervalo de tempo de incubação entre 0 e 20 minutos revelou atividade PNFFase crescente até 10 minutos; para intervalos de incubação maiores, a atividade manteve-se constante, em torno de 48 U mg^{-1} . A partir deste resultado, os

demais experimentos foram realizados em presença de alameticina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína) no meio reacional, com pré-incubação da mistura membranas/antibiótico por 10 minutos a 25°C.

A análise por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (10-50%) da fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* mostrou a presença de 3 frações protéicas (**Figura 2**). O pico I (20-25% de sacarose) apresentou maior concentração protéica máxima, porém baixa atividade PNFFase. Já o pico II (28-35% de sacarose) apresentou a menor concentração protéica máxima e alta atividade K^+ -fosfatase. Por fim, o pico III (42-47% de sacarose) também apresentou alta atividade K^+ -fosfatase, com uma concentração protéica máxima cerca de 3 vezes maior que o pico II. Tanto o pico II quanto o pico III apresentaram, além de atividade K^+ -fosfatase, atividade PNFFase insensível à ouabaína, indicando a presença de outras enzimas, diferentes da (Na,K)-ATPase e capazes de hidrolisar o PNFF nas condições experimentais empregadas. Os dois picos de atividade identificados indicam a presença de frações de membrana de diferentes densidades, contendo (Na,K)-ATPase, nas preparações microsomais em estudo.

A eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (5-20%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e a análise por Western blotting da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce estão mostrados na **Figura 3**. A utilização do anticorpo monoclonal $\alpha 5$ (contra todas as isoformas da subunidade α de aves, que dá reação cruzada com as (Na,K)-ATPases de crustáceos) revelou a presença de duas bandas imuno específicas com M_r de 105 e 116 kDa, o que sugere a presença de duas isoformas da subunidade α da (Na,K)-ATPase nas brânquias posteriores de *D. pagei*. Não foram reveladas bandas imuno específicas quando se empregou anticorpos primários isoforma específicos contra a subunidade α de vertebrados. Da mesma forma, não obtivemos sucesso na revelação de bandas correspondentes à subunidade β da (Na,K)-ATPase.

Figura 1. Efeito da concentração de alameticina sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo PNFF 10 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹. A fração microsomal (25 µg de proteína) foi incubada com quantidades crescentes de alameticina por 10 minutos a 25°C, e a reação foi iniciada pela adição do substrato ao meio reacional.

Figura 2. Análise da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose: atividade K^+ -fosfatase.

Uma amostra de fração microsomal (0,89 mg de proteína) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mmol L^{-1} , pH 6,8, e centrifugada a 180000g durante 2h, a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e cada uma delas foi analisada em relação a: (□) atividade PNFFase total; (■) atividade K^+ fosfatase; (○) atividade PNFFase insensível à ouabaína; (Δ) concentração de proteína e (●) percentagem de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blotting da fração microsomal branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20%, usando 135 µg de proteína para a análise por Western blotting (linha A) e 6 µg de proteína para revelação com prata (linha B). Após a corrida, uma das metades do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida à eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal α -5 por 16 h a 5°C e, após a lavagem para retirada do anticorpo primário, incubada com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A **Figura 4A** mostra a modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase da fração microsomal branquial de *D. pagei* pelo substrato PNFF em presença de $MgCl_2$ 7 mmol L^{-1} e KCl 20 mmol L^{-1} . Concentrações crescentes de PNFF estimularam a atividade através de uma única curva de saturação, envolvendo interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$), com $V = 43,4 \pm 2,2$ U mg^{-1} e $K_{0,5} = 1,13 \pm 0,06$ mmol L^{-1} . A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada na mesma faixa de concentrações, até um valor máximo correspondente a aproximadamente 13% da atividade PNFFase total (inserção da Fig. 4A).

A dependência da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de *D. pagei* em relação à concentração de Mg^{2+} , em presença de PNFF 10 mmol L^{-1} e KCl 20 mmol L^{-1} , é mostrada na **Figura 4B**. Concentrações crescentes de Mg^{2+} , entre 50 μ mol L^{-1} e 7 mmol L^{-1} , estimularam a atividade até um valor máximo de $V = 45,0 \pm 2,2$ U mg^{-1} com $K_{0,5} = 0,82 \pm 0,04$ mmol L^{-1} . A estimulação envolveu interações sítio-sítio ($n_H = 1,5$) e para concentrações de Mg^{2+} maiores que 7 mmol L^{-1} foi observada inibição da atividade. Analogamente ao observado para o ATP, a atividade insensível à ouabaína foi estimulada por Mg^{2+} na mesma faixa de concentrações (inserção da Fig. 4B).

A estimulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* por K^+ é apresentada na **Figura 4C**. Em concentrações saturantes de PNFF e $MgCl_2$, a atividade foi estimulada até um valor máximo $V = 39,9 \pm 1,9$ U mg^{-1} com $K_{0,5} = 4,2 \pm 0,2$ mmol L^{-1} e cooperatividade positiva ($n_H = 1,9$). A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada por K^+ na mesma faixa de concentrações, o que sugere a presença de uma K^+ -ATPase na preparação microsomal (inserção da Fig. 4C).

A **Figura 4D** mostra a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* por NH_4^+ , em presença de concentrações saturantes de PNPP e Mg^{2+} e ausência de K^+ . Observa-se uma única curva de estimulação, com cooperatividade positiva ($n_H = 2,2$), $V = 31,7 \pm 1,6$ U mg^{-1} e $K_{0,5} = 19 \pm 0,9$ mmol L^{-1} . Curiosamente, a estimulação da atividade por NH_4^+ resultou numa atividade específica 20% menor que a observada para a estimulação por K^+ . Por outro lado, a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada por NH_4^+ na faixa de concentrações estudada (inserção da Fig. 4D), ao contrário do observado para os íons K^+ .

Figura 4. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *D. paguei* mantido em água doce por PNFF, Mg²⁺, K⁺ e NH₄⁺.

A atividade foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo 1 µg alameticina/µg proteína. A modulação da atividade por cada efector foi analisada em condições ótimas dos demais. (A) PNFF; (B) Mg²⁺; (C) K⁺ (D) NH₄⁺. **Inserções:** Efeito da concentração dos efetores sobre (●) atividade PNFFase total; (○) atividade PNFFase insensível à ouabaína

Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise do PNFF pela (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K⁺-fosfatase das frações microsomais das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce pelo PNFF e pelos íons amônio, potássio e magnésio.

Efector	K _{0.5} (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	n _H
PNFF	1,13 ± 0,06	43,4 ± 2,2	1,4
Mg ²⁺	0,82 ± 0,04	45,0 ± 2,2	1,5
K ⁺	4,2 ± 0,2	39,9 ± 1,9	1,9
NH ₄ ⁺	19,0 ± 0,9	31,7 ± 1,6	2,2

Um estudo mais detalhado da estimulação da atividade K⁺-fosfatase da (Na,K)-ATPase das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce por K⁺, em presença de concentrações fixas de NH₄⁺ (0 a 70 mmol L⁻¹), está apresentado na **Figura 5**. Não foram observadas diferenças significativas na afinidade aparente da enzima por K⁺ ou na velocidade máxima, na presença de diferentes concentrações fixas de NH₄⁺ (inserções da Fig. 5). A modulação da atividade K⁺-fosfatase por NH₄⁺, em presença de concentrações fixas de K⁺ (0-20 mmol L⁻¹) é mostrada na **Figura 6**. Curiosamente, a presença de concentrações de K⁺ entre 2-5 mmol L⁻¹ levou a um aumento de cerca de 20% na velocidade máxima, que passou de 31,7 ± 1,6 U mg⁻¹ na ausência de K⁺ para 38,5 ± 1,9 U mg⁻¹ na presença de 20 mmol L⁻¹ de K⁺. Esta mudança na velocidade máxima foi acompanhada ainda por um aumento de cerca de 7 vezes na afinidade da enzima por NH₄⁺ (inserções da fig. 6). É importante destacar ainda que os íons NH₄⁺ não tiveram qualquer efeito sobre a velocidade máxima, em presença de concentrações de K⁺ maiores ou iguais a 10 mmol L⁻¹. O efeito sinérgico de K⁺ e NH₄⁺ sobre a atividade da enzima sugere a presença de dois sítios de ligação para estes íons na molécula da enzima.

A **Tabela 2** mostra os parâmetros cinéticos determinados para a modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* por íons potássio e amônio.

Figura 5. Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal branquial de *D. paguei* mantido em água doce por K^+ em presença de diferentes concentrações fixas de NH_4^+ .

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, PNFF 10 mmol L⁻¹ e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Concentrações fixas de NH₄Cl: (●) 0; (○) 10 mmol L⁻¹; (■) 20 mmol L⁻¹; (□) 40 mmol L⁻¹; (▲) 70 mmol L⁻¹. **Inserções:** Variação dos parâmetros K_{0,5} (a) e V (b) em função da concentração de NH₄⁺.

Figura 6. Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal branquial de *D. pagei* mantido em água doce por NH_4^+ em presença de diferentes concentrações fixas de K^+ .

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, PNFF 10 mmol L⁻¹ e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Concentrações fixas de KCl: (●) 0; (■) 2 mmol L⁻¹; (▲) 5 mmol L⁻¹; (▼) 10 mmol L⁻¹; (◆) 20 mmol L⁻¹. **Inserções:** Variação dos parâmetros $K_{0,5}$ (a) e V (b) em função da concentração de K^+ .

Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce por íons potássio e amônio.

K^+ (mmol L ⁻¹)	NH_4^+ (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mmol L ⁻¹)	n_H
Variável	0	39,9 ± 1,9	4,2 ± 0,2	1,9
Variável	10	43,6 ± 2,2	2,2 ± 0,1	1,1
Variável	20	43,0 ± 2,1	3,0 ± 0,1	1,0
Variável	40	39,7 ± 1,9	1,6 ± 0,1	2,2
Variável	70	38,3 ± 1,9	3,0 ± 0,1	2,7
0	Variável	31,7 ± 1,6	19 ± 0,9	2,2
2	Variável	31,9 ± 1,6	3,6 ± 0,2	0,9
5	Variável	35,0 ± 1,8	2,6 ± 0,1	1,4
10	Variável	37,0 ± 1,8	-	-
20	Variável	38,5 ± 1,9	-	-

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce está mostrado na **Figura 7A**. Em concentrações saturantes de K^+ , Mg^{2+} e PNFF, a atividade foi inibida em cerca de 89% por uma concentração de ouabaína em torno de 4 mmol L⁻¹. A inibição monofásica, correspondente a um modelo para um único sítio para a ligação do inibidor à enzima, sugere a presença de uma única isoforma da (Na,K)-ATPase na preparação. O valor de K_I foi de 225,6 ± 11,3 μ mol L⁻¹ (inserção da **Fig. 7**). A atividade residual de 11% indica a presença de enzimas diferentes da (Na,K)-ATPase capazes de hidrolisar o PNFF nas condições de ensaio empregadas, em concordância com os resultados da análise por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (**Fig. 2**).

A **Figura 7B** mostra a inibição da atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce pelo ortovanadato. A atividade foi totalmente inibida por uma concentração de ortovanadato em torno de 1 μ mol L⁻¹, por meio de uma curva bifásica com um patamar em torno de 56% da atividade total. Uma vez que a atividade insensível à ouabaína também foi inibida por ortovanadato, fica impossibilitada a determinação de constantes de inibição que possam ser atribuídas somente à inibição da atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-

ATPase. Por outro lado, considerando que esta atividade corresponde a cerca de 89% da atividade PNFFase total (**Fig. 7A**), é improvável que a curva bifásica de inibição possa ser atribuída à presença de outras atividades na preparação de membranas, correspondendo a apenas 11% da atividade total. Desta forma, a curva bifásica de inibição sugere a presença de duas isoformas da (Na,K)-ATPase na preparação de membranas, em concordância com os resultados da análise por Western blotting (**Fig. 3**).

Em presença de concentrações saturantes de PNFF, K^+ e Mg^{2+} , íons Na^+ em concentração ao redor de 300 mmol L^{-1} inibiram completamente a atividade PNFFase da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce (não mostrado). Como observado para a inibição pelo ortovanadato, a atividade insensível à ouabaína também foi inibida por Na^+ . Nenhum efeito inibitório foi observado em controles realizados com cloreto de colina na mesma faixa de concentração, descartando a possibilidade de inibição por efeitos de força iônica.

A **Tabela 3** reúne resultados referentes a ensaios de inibição realizados com a finalidade de identificar as enzimas responsáveis pela atividade PNFFase insensível à ouabaína encontrada na fração microsomal branquial de *D. pagei* mantido em água doce. Na ausência de inibidores, a atividade total foi de $48,7 \pm 2,9 \text{ U mg}^{-1}$. Em presença de ouabaína 4 mmol L^{-1} , a atividade residual de $5,36 \pm 0,29 \text{ U mg}^{-1}$ indica que cerca de 89% da atividade PNFFase total corresponde à atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase. Já a inibição de 95% da atividade total por ortovanadato $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ sugere a presença de outras ATPases do tipo P ou fosfatases neutras na preparação. Entretanto, a ausência de inibição da atividade insensível à ouabaína por teofilina sugere ausência de fosfatases.

A inibição da atividade insensível à ouabaína por ácido etacrínico, por sua vez, sugere a presença de uma Na^+ e/ou K^+ -ATPase na preparação, responsável por cerca de 5,3 % da atividade PNFFase total, em concordância com os resultados obtidos para a estimulação da atividade PNFFase insensível à ouabaína por íons K^+ (inserção da Fig. 4C). Já a ausência de inibição da atividade insensível à ouabaína por tapsigargina e EGTA sugere a ausência de Ca^{2+} -ATPase na preparação. Por fim, a inibição parcial da atividade insensível à ouabaína por azida sugere a presença de F_0F_1 -ATPase (cerca de 5,8 % da atividade PNFFase total). Entretanto, este resultado não foi confirmado pelo tratamento com aurovertina B, inibidor específico da ATP sintase.

Figura 7. Efeito da concentração de ouabaína e ortovanadato sobre a atividade PNFFase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7.5, contendo MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, KCl 20 mmol L⁻¹, PNFF 10 mmol L⁻¹ e 1 µg alameticina/µg de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade específica na ausência dos inibidores correspondeu a 49,1 ± 2,4 U mg⁻¹. (A) ouabaína; (B) ortovanadato. Inserção: Representação de Dixon para a determinação do valor da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-ouabaína.

Tabela 3. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade PNFFase total e insensível à ouabaína da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

Inibidor(es)		V (U mg ⁻¹)	Atividade residual (%)
Controle		48,7 ± 2,9	100
Ouabaína (4 mmol L ⁻¹)		5,36 ± 0,29	11,0
Ortovanadato (1 µmol L ⁻¹)		2,51 ± 0,23	5,1
Ouabaína (4 mmol L ⁻¹)	Ortovanadato (1 µmol L ⁻¹)	1,78 ± 0,12	3,4
	Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	5,67 ± 0,31	11,6
	Ácido etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	2,77 ± 0,17	5,7
	Tapsgargina (0,5 µmol L ⁻¹)	5,56 ± 0,21	11,4
	Azida (100 mmol L ⁻¹)	2,56 ± 0,18	5,2
	EGTA (1 mmol L ⁻¹)	5,56 ± 0,24	11,4
	Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	5,34 ± 0,29	10,7

4.2. Atividade ATPase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei*.

A fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce apresentou uma atividade ATPase total de $163,3 \pm 8,1 \text{ U mg}^{-1}$ foram observadas perdas significativas de atividade por até 60 dias quando as amostras foram estocadas a -20°C (não mostrado). As alíquotas foram descongeladas imediatamente antes do uso e mantidas em gelo picado, mantendo atividade ATPase constante por períodos de até 8 h (não mostrado).

Com a finalidade de investigar a presença de vesículas fechadas também no meio reacional empregado para a determinação da atividade ATPase, realizou-se dosagens de atividade em presença de concentrações crescentes de alameticina, sendo a preparação de membranas pré-incubada com o antibiótico por diferentes intervalos de tempo (0-20 min) a 25°C . Similarmente ao observado para a hidrólise do PNFF, ocorreu um aumento de 45 % na atividade ATPase total da fração microsomal em presença de alameticina ($1 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína), independentemente do período de pré-incubação, confirmando assim a presença de vesículas seladas. Desta forma, os ensaios posteriores foram realizados em presença de $1 \mu\text{g}$ de alameticina/ μg de proteína no meio reacional, sem pré-incubação da preparação de membranas com alameticina.

A **Figura 8** mostra a modulação da atividade (Na,K)ATPase das frações microsomais das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce pelo ATP, em presença de concentrações ótimas de Mg^{2+} , K^{+} e Na^{+} . A estimulação da atividade ocorreu segundo uma curva bifásica, revelando a presença de duas famílias de sítios para o substrato. A estimulação da atividade nos sítios de alta afinidade (10^{-7} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ATP) seguiu cinética cooperativa ($n_H=1,9$), com $V=6,4 \pm 0,32 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,34 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já nos sítios de baixa afinidade observou-se cinética Michaeliana, com atividade específica de $127,1 \pm 6,2 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_M= 84 \pm 4,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada pelo ATP na mesma faixa de concentrações, até um valor máximo de $36,2 \pm 1,8 \text{ U mg}^{-1}$, correspondente a 22 % da atividade ATPase total (não mostrado).

O efeito da concentração de Mg^{2+} , em presença de concentrações saturantes de ATP, K^{+} e Na^{+} , sobre a atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce está mostrado na **Figura 9A**. A atividade da enzima foi estimulada segundo uma única curva de saturação até valores máximos de $V= 136,5 \pm 8,0 \text{ U mg}^{-1}$, obedecendo cinética cooperativa ($n_H= 1,5$), e o valor de $K_{0,5}$ determinado foi de $0,62 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. Para concentrações de Mg^{2+} superiores a 7 mol L^{-1} ocorreu forte inibição da atividade enzimática (não

mostrado). A atividade insensível à ouabaína também foi estimulada por Mg^{2+} , na mesma faixa de concentrações (inserção da Fig. 9A).

A dependência da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de *D. pagei* mantido em água doce em relação à concentração de Na^+ , em presença de concentrações saturantes de ATP, K^+ e Mg^{2+} , é mostrada na **Figura 9B**. A modulação da atividade da enzima ocorreu por meio de uma curva simples de estimulação e envolveu efeitos cooperativos ($n_H = 1,6$), com uma constante de afinidade aparente de $4,7 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e atividade específica de $133,8 \pm 7,3 \text{ U mg}^{-1}$.

A modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce por K^+ , em presença de concentrações saturantes de ATP, Na^+ e Mg^{2+} está representada na **Figura 9C**. A estimulação ocorreu segundo uma curva simples, com cooperatividade positiva ($n_H = 1,4$), $V = 131,7 \pm 7,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,47 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$.

A **Figura 9D** mostra a modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce pelos íons NH_4^+ , em presença de concentrações saturantes de ATP, Na^+ e Mg^{2+} e na ausência de íons K^+ . A estimulação ocorreu segundo uma única curva de saturação até um valor máximo de $V = 125,6 \pm 6,3 \text{ U mg}^{-1}$, com $K_{0,5} = 1,9 \pm 0,09 \text{ mmol L}^{-1}$ e seguiu cinética cooperativa ($n_H = 1,6$). Analogamente ao observado para os íons K^+ e Na^+ , a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada por íons NH_4^+ (inserção da Fig. 9D).

Os parâmetros cinéticos estimados para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce por ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ estão resumidos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos obtidos para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de *D. pagei* pelo ATP e pelos íons Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ .

Efector	$K_{0,5}$	$V \text{ (U mg}^{-1}\text{)}$	n_H
ATP	$0,34 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	$6,4 \pm 0,32$	1,9
	$84 \pm 4,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	$127,1 \pm 6,2$	1,0
Mg^{2+}	$0,62 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$	$136,5 \pm 8,0$	1,5
Na^+	$4,7 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$	$133,8 \pm 7,3$	1,6
K^+	$0,47 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$	$131,7 \pm 7,9$	1,4
NH_4^+	$1,9 \pm 0,09 \text{ mmol L}^{-1}$	$125,6 \pm 6,3$	1,6

Figura 8. Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. paguei* mantido em água doce pelo ATP.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U) e LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Inserção:** sítio de alta afinidade.

Figura 9. Estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. paguei* mantido em água doce por Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U) e LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína. A modulação da atividade por cada efetor foi analisada em condições ótimas dos demais. (A) Mg²⁺; (B) Na⁺; (C) K⁺; (D) NH₄⁺. **Inserções:** Efeito da concentração dos efetores sobre: (●) atividade ATPase total; (○) atividade ATPase insensível à ouabaína.

Um estudo mais detalhado da estimulação da atividade (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce por íons K^+ em presença de concentrações fixas de íons NH_4^+ (0-10 mmol L^{-1}) está apresentado na **Figura 10**. Na presença de diferentes concentrações fixas de NH_4^+ , observa-se que ocorreu um aumento da atividade basal, porém não foram observadas diferenças significativas na velocidade máxima atingida (inserção b da Fig. 10). Em contraste, ocorreu uma diminuição de cerca de 3 vezes no valor da constante de afinidade aparente da enzima para K^+ , que passou de $0,47 \pm 0,03$ mmol L^{-1} , em ausência de NH_4^+ para $0,151 \pm 0,008$ mmol L^{-1} em presença destes íons em concentração 10 mmol L^{-1} (inserção a da Fig. 10).

A modulação da atividade (Na,K)-ATPase por NH_4^+ , em presença de concentrações fixas de K^+ (0-5 mmol L^{-1}) é mostrada na **Figura 11**. Analogamente ao observado na **Figura 10**, a presença de diferentes concentrações fixas de K^+ resultou em aumento da atividade basal, porém não foram observadas diferenças significativas na velocidade máxima atingida (inserção b da Fig. 11). Também neste caso ocorreu uma diminuição de cerca de 3 vezes no valor da constante de afinidade aparente da enzima para NH_4^+ , que passou de $1,92 \pm 0,09$ mmol L^{-1} , em ausência de K^+ para $0,78 \pm 0,04$ mmol L^{-1} em presença de K^+ em concentração 5 mmol L^{-1} (inserção a da Fig. 11). De modo bastante interessante, em presença de K^+ em concentração maior ou igual a 1 mmol L^{-1} a atividade (Na,K)-ATPase permaneceu constante para todas as concentrações de NH_4^+ testadas.

Os parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce por íons potássio e amônio estão apresentados na **Tabela 5**.

Ouabaína, em concentração 3 mmol L^{-1} , inibiu cerca de 78% da atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce, estimada em presença de concentrações ótimas de ATP, Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , com uma atividade residual de $35,6 \pm 1,8$ U mg^{-1} (**Figura 12A**). A inibição ocorreu por meio de uma curva bifásica, com valores de K_i correspondentes a $6,21 \pm 0,32$ μ mol L^{-1} e $101,2 \pm 5,1$ μ mol L^{-1} , observando-se um patamar em torno de 130 U mg^{-1} (20% da atividade total). Esta inibição bifásica da atividade ATPase total pela ouabaína, inibidor específico da (Na,K)-ATPase com estequiometria de ligação de 1:1, sugere fortemente a presença de duas isoformas da enzima na fração microsomal em estudo, com diferentes afinidades pelo inibidor. Este resultado é consistente com a inibição bifásica da atividade PNFFase total por ortovanadato (**Fig. 7B**) e também com a revelação de duas bandas imunoreativas na análise por Western blotting, empregando anticorpo primário $\alpha 5$ (**Fig. 3**).

Figura 10. Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal branquial de *D. pagai* mantido em água doce por K⁺ em presença de diferentes concentrações fixas de NH₄⁺.

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U), LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Concentrações fixas de NH₄Cl: (■) 0; (○) 1 mmol L⁻¹; (▲) 2 mmol L⁻¹; (◇) 10 mmol L⁻¹.

Inserções: Variação dos parâmetros K_{0,5} (a) e V (b) em função da concentração de NH₄⁺.

Figura 11. Modulação da atividade (Na,K)-ATPase da fração microsomal branquial de *D. paguei* mantido em água doce por NH_4^+ em presença de diferentes concentrações fixas de K^+ .

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U), LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Concentrações fixas de KCl: (□) 0; (●) 0,1 mmol L⁻¹; (△) 0,3 mmol L⁻¹; (▼) 1 mmol L⁻¹; (◇) 5 mmol L⁻¹. **Inserções:** Variação dos parâmetros $K_{0,5}$ (a) e V (b) em função da concentração de K^+ .

Tabela 5. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* por íons potássio e amônio.

K^+ (mmol L ⁻¹)	NH_4^+ (mmol L ⁻¹)	V (U mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ (mmol L ⁻¹)	n_H
Variável	0	131,7 ± 7,9	0,47 ± 0,03	1,4
Variável	1	132,9 ± 6,6	0,38 ± 0,02	2,2
Variável	2	136,8 ± 6,8	0,22 ± 0,01	1,6
Variável	10	137,4 ± 6,8	0,151 ± 0,008	0,7
0	Variável	125,6 ± 6,3	1,92 ± 0,09	1,6
0,1	Variável	120,7 ± 6,0	0,76 ± 0,04	1,6
0,3	Variável	127,3 ± 6,4	0,78 ± 0,04	1,0
1	Variável	128,3 ± 6,4	-	-
5	Variável	139,7 ± 6,9	-	-

O efeito de concentrações crescentes de ortovanadato sobre a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce, estimada em presença de concentrações ótimas de ATP, Na⁺, K⁺ e Mg²⁺, está mostrado na **Figura 12B**. A inibição ocorreu segundo uma curva bifásica, com uma atividade residual de 15% (26,8 ± 1,3 U mg⁻¹) em presença de uma concentração de ortovanadato de 10 µmol L⁻¹, observando-se um patamar em torno de 130 U mg⁻¹ (20 % da atividade total). A curva bifásica de inibição da atividade ATPase total pelo ortovanadato reforça os resultados apresentados anteriormente no sentido de sugerir a existência de duas isoformas da (Na,K)-ATPase na preparação microsomal. Considerando o maior percentual de inibição pelo ortovanadato, comparado à ouabaína, pode-se afirmar que ocorreu inibição de ATPases diferentes da (Na,K)-ATPase, impossibilitando a determinação de constantes de inibição que possam ser atribuídas somente à ação sobre esta enzima.

Figura 12. Efeito da concentração de ouabaína e ortovanadato sobre a atividade ATPase total da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagai* mantido em água doce.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U) e LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. A atividade total na ausência dos inibidores correspondeu a 163,3 ± 8,2 U/mg. (A) ouabaína; (B) ortovanadato. **Inserções:** Representações de Dixon para a determinação dos valores das constantes de dissociação (K_I) dos complexos enzima-ouabaína.

Experimentos de inibição empregando diferentes inibidores de ATPases associados à ouabaína em concentração suficiente para inibir completamente a atividade da (Na,K)-ATPase (3 mmol L^{-1}) foram realizados no intuito de investigar quais as enzimas responsáveis pela atividade ATPase insensível à ouabaína das preparações microsomais (**Tabela 6**). Na ausência de inibidores, a atividade ATPase total foi de $163,3 \pm 8,1 \text{ U mg}^{-1}$ (controle). A atividade residual determinada em presença de ouabaína ($39,7 \pm 1,9 \text{ U mg}^{-1}$) indica que cerca de 75 % da atividade ATPase total corresponde à atividade da (Na,K)-ATPase. Já o percentual de inibição de 85% por ortovanadato $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ sugere que, além da (Na,K)-ATPase, estão presentes na preparação outras ATPases do tipo P ou fosfatases neutras.

A inibição da atividade insensível à ouabaína por tapsigargina, EGTA e ortovanadato sugere a presença de Ca^{2+} -ATPase na preparação. Já o pequeno percentual de inibição da atividade insensível à ouabaína por bafilomicina A_1 indica a presença de V-ATPase na preparação de membranas.

A inibição da atividade insensível à ouabaína por ácido etacrínico sugere ainda a presença de uma Na^+ e/ou K^+ -ATPase na preparação, responsável por cerca de 8% da atividade ATPase total. Parte da atividade ATPase insensível à ouabaína aparentemente corresponde à atividade da F_0F_1 -ATPase, inibida por oligomicina, aurovertina e azida. Finalmente, a ausência de inibição da atividade insensível à ouabaína por teofilina sugere ausência de fosfatases neutras na preparação.

Neste trabalho, realizou-se ainda medidas da atividade específica da (Na,K)-ATPase, em condições ótimas de ATP e íons Mg^{2+} , K^+ e Na^+ , em frações microsomais do tecido branquial de *D. pageni* aclimatado a 21‰ por diferentes intervalos de tempo (**Figura 13, Tabela 7**). Observou-se uma diminuição de cerca de 3 vezes na atividade após uma hora e 24h de exposição dos animais à salinidade de 21‰. Surpreendentemente, após 120 h de aclimação a atividade atingiu valores cerca de 25% superiores àqueles determinados para animais mantidos em água doce (tempo zero). Finalmente, após 240h de exposição a atividade (Na,K)-ATPase específica atingiu os mais baixos níveis, correspondendo a apenas 21% da atividade estimada para frações microsomais obtidas de animais mantidos em água doce.

Tabela 6. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase total e insensível à ouabaína da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

Inibidores		V (U mg ⁻¹)	Atividade Residual (%)
Controle		163,3 ± 8,1	100
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹)		39,7 ± 1,9	24,3
Ortovanadato (10 µmol L ⁻¹)		31,6 ± 1,6	19,3
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) +	Ortovanadato (10 µmol L ⁻¹)	29,3 ± 1,5	17,9
	Tapsgargina (0,5 µmol L ⁻¹)	28,9 ± 1,4	17,7
	EGTA (1mmol L ⁻¹)	33,6 ± 1,7	20,5
	Bafilomicina A ₁ (0,4 µmol L ⁻¹)	33,4 ± 1,6	20,4
	Ácido Etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	26,4 ± 1,3	16,2
	Azida (100 mmol L ⁻¹)	14,5 ± 0,7	8,8
	Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	19,4 ± 0,9	11,9
	Oligomicina (1µg/mL)	17,4 ± 0,9	10,6
Teofilina (5 mmol L ⁻¹)		36,4 ± 1,8	22,3

Tabela 7. Variação da atividade (Na,K)ATPase específica e de sua percentagem em relação à atividade ATPase total em frações microsomais de *D. pagei* mantido em água doce e aclimatado por diferentes intervalos de tempo à salinidade de 21 ‰.

Tempo (horas)	Atividade (Na,K)-ATPase (Umg ⁻¹)	% de (Na,K)-ATPase
0	122,9 ± 6,1	76,0
1	40,6 ± 2,0	68,6
24	48,4 ± 2,4	64,8
120	153,6 ± 7,7	72,6
240	25,7 ± 1,3	56,5

Figura 13. Decurso temporal do efeito da aclimação de *D. paguei* à salinidade de 21‰ sobre a atividade (Na,K)-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, KCl 5 mmol L⁻¹, NaCl 20 mmol L⁻¹, NADH 0,16 mmol L⁻¹, FEP 2,5 mmol L⁻¹, PQ (20U) e LDH (78U) e 1 µg alameticina/µg proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Inserção (a):** variação da percentagem da atividade total correspondente à atividade (Na,K)-ATPase.

4.3. Atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei*.

O estudo da atividade V-ATPase também foi realizado empregando frações microsomais das brânquias posteriores de *D. pagei*, envolvidas no transporte iônico. Neste estudo, espécimes de *D. pagei* foram aclimatados por diferentes intervalos de tempo a uma salinidade relativamente elevada (21‰) ou a diferentes salinidades (5, 10, 15 e 21‰) por 10 dias e a seguir foram preparadas as frações microsomais das brânquias posteriores dos animais, em cada condição. As preparações de membranas foram conservadas a -20°C, não ocorrendo perdas significativas da atividade V-ATPase por até 60 (não mostrado). No momento do uso, alíquotas foram descongeladas e mantidas em gelo picado; nessas condições, a atividade ATPase foi constante por períodos de até 8 h (não mostrado).

Igualmente ao observado para a determinação das atividades K⁺-fosfatase e (Na,K)-ATPase, também foi detectada a presença de vesículas seladas nas preparações de membranas branquiais no meio reacional empregado para dosagem de atividade V-ATPase. Ao realizar dosagens de atividade em presença de concentrações crescentes de alameticina, sendo a preparação de membranas pré-incubada com o antibiótico por diferentes intervalos de tempo (0-20 min) a 25°C, verificou-se um aumento de atividade, independente do período de incubação. Desta forma, todas as medidas foram realizadas em presença de alameticina (1µg/µg de proteína), sem a pré-incubação da preparação de membranas com o antibiótico.

A **Figura 14** mostra o efeito do pH do meio reacional sobre a atividade V-ATPase em frações microsomais branquiais de *D. pagei* mantido em água doce. Observa-se um aumento abrupto de cerca de 4 vezes na atividade específica quando o pH passa de 7.0 para 7,5, valor no qual se tem atividade máxima. Acima de 7,5, a atividade diminuiu gradualmente, atingindo um valor de cerca de 34% da atividade máxima em pH 8,5.

A modulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce pelo substrato ATP, em presença de concentração saturante de Mg²⁺, está representada na **Figura 15A**. A estimulação da atividade seguiu uma curva simples de saturação, envolvendo interações cooperativas ($n_H = 6,4$), com $V = 26,5 \pm 1,3 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 3,9 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. É interessante observar que a atividade insensível à bafilomicina também foi estimulada por ATP, na mesma faixa de concentrações empregada (inserção da Fig. 15A).

Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade V-ATPase da fração microsomal branquial de *D. paguei* mantido em água doce.

A atividade foi determinada descontinuamente, a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, em diferentes pH, contendo ATP 5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 1,5 mmolL⁻¹, KCl 3 mmolL⁻¹, ortovanadato 10 μmol L⁻¹ e 1 μg alameticina/μg proteína, na presença e ausência de bafilomicina A₁ 0,4 μmol L⁻¹, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Inserção:** Efeito do pH sobre (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina.

A atividade da V-ATPase é dependente de íons Mg^{2+} , e sua estimulação por estes íons, em presença de concentração saturante de ATP, está representada na **Figura 15B**. A estimulação ocorreu segundo uma única curva de saturação, envolvendo interações sítio-sítio ($n_H=3,3$) e resultando numa atividade específica de $27,9 \pm 1,4$ U mg^{-1} . A constante de afinidade aparente da enzima para os íons Mg^{2+} foi igual a $0,80 \pm 0,04$ mmol L^{-1} . Concentrações de Mg^{2+} maiores que 5 mmol L^{-1} inibiram fortemente a atividade (não mostrado). Na inserção da Figura 15B observa-se que a atividade insensível à bafilomicina foi estimulada por Mg^{2+} na mesma faixa de concentrações.

A inibição da atividade ATPase insensível ao ortovanadato por bafilomicina A1 (**Figura 15C**) ocorreu segundo uma curva monofásica, com K_I igual a $55,0 \pm 2,8$ nmol L^{-1} (inserção da **Fig. 15C**). Cerca de 40% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato foi inibida por este inibidor específico de V-ATPase, percentual que corresponde à atividade da V-ATPase. A presença de atividade ATPase residual, insensível à bafilomicina e ao ortovanadato, indica que outras ATPases, diferentes das do tipo P e da V-ATPase, estão presentes na preparação, em conformidade com os resultados anteriormente apresentados.

Este mesmo estudo da atividade V-ATPase em frações microsomais de tecido braquial de *D. pagai* mantido em água doce foi realizado empregando ouabaína 3 mmol L^{-1} em substituição ao ortovanadato 10 μ mol L^{-1} . Assim, investigou-se a estimulação da atividade insensível à ouabaína por ATP e Mg^{2+} , bem como a inibição desta atividade, em condições ótimas destes efetores, por bafilomicina A_1 . A seguir, estudou-se a estimulação da atividade insensível à bafilomicina por ATP e Mg^{2+} , considerando a atividade V-ATPase como a diferença entre a atividade insensível à ouabaína e a atividade insensível à ouabaína e bafilomicina. Resultados muito similares foram obtidos para os valores de atividade V-ATPase específica, afinidades aparentes por ATP e Mg^{2+} e K_I para a bafilomicina. A partir deste estudo, adotou-se o uso do ortovanadato, devido ao custo muito inferior ao da ouabaína.

Figura 15. Fração microsomal branquial de *D. paguei* mantido em água doce: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos. (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-bafilomicina.

A estimulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 1 hora à salinidade de 21 ‰ pelo substrato ATP, em concentração saturante de Mg^{2+} , está representada na **Figura 16A**. A modulação da atividade ocorreu por meio de interações cooperativas ($n_H = 2,8$), seguindo uma curva simples de saturação. A atividade específica máxima correspondeu a $9,8 \pm 0,5 \text{ U mg}^{-1}$ e a constante de afinidade aparente para o substrato foi de $1,70 \pm 0,08 \text{ mmol L}^{-1}$. A **Figura 16B** mostra a modulação da atividade V-ATPase desta fração microsomal por íons Mg^{2+} . A atividade máxima correspondeu a $8,7 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$, com $K_{0,5} = 0,28 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 4,9$), por meio de uma curva simples de saturação e concentrações de Mg^{2+} maiores que 3 mmol L^{-1} inibiram a atividade da V-ATPase (não mostrado). Nas inserções das Figuras 15A e 15B pode-se observar que a atividade insensível à bafilomicina foi estimulada por ATP e Mg^{2+} nas mesmas faixas de concentração que a atividade insensível ao ortovanadato.

A inibição da atividade ATPase insensível ao ortovanadato da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 1 hora à salinidade de 21 ‰ por bafilomicina A_1 ocorreu segundo uma curva monofásica (**Figura 16C**), com $K_I = 0,30 \pm 0,02 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 16C). Cerca de 66% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato foi inibida por bafilomicina, correspondendo à V-ATPase. A determinação de atividade ATPase residual insensível à bafilomicina e ao ortovanadato indica que também nestas preparações de membrana estão presentes outras ATPases, diferentes das do tipo P e da V-ATPase.

As **Figuras 17A** e **17B** apresentam a modulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por um período de 5 horas à salinidade de 21 ‰ por ATP e Mg^{2+} , respectivamente. Tanto para o ATP ($n_H = 1,7$), como para o Mg^{2+} ($n_H = 3,6$), a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva. Os parâmetros cinéticos determinados corresponderam a $V = 9,2 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,50 \pm 0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ para a estimulação por ATP e $V = 8,5 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,29 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ para a modulação por Mg^{2+} .

A inibição da atividade ATPase total por bafilomicina A_1 (**Figura 17C**) ocorreu segundo curva monofásica com $K_I = 0,29 \pm 0,01 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 17C). A percentagem de inibição da atividade ATPase insensível ao ortovanadato por bafilomicina correspondeu a 52%, representando a atividade V-ATPase.

Figura 16. Fração microsomal branquial de *D. pagai* aclimatado a 21‰ por 1h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C , nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-bafilomicina.

Figura 17. Fração microsomal branquial de *D. pagai* aclimatado a 21‰ por 5h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg²⁺ e efeito de bafilomicina A₁ sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg²⁺ sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A₁ sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg²⁺ (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-bafilomicina.

A estimulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 24h à salinidade de 21‰ por ATP, em concentração saturante de Mg^{2+} , está representada na **Figura 18A**. A modulação da atividade ocorreu por meio de interações cooperativas ($n_H = 3,4$); a velocidade máxima correspondeu a $6,2 \pm 0,3 \text{ U mg}^{-1}$ e a constante de afinidade aparente para o substrato foi de $0,33 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$. A **Figura 18B** mostra a modulação da atividade V-ATPase desta fração microsomal por íons Mg^{2+} . A atividade máxima correspondeu a $6,2 \pm 0,3 \text{ U mg}^{-1}$, com $K_{0,5} = 0,34 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 4,9$) e concentrações de Mg^{2+} maiores que 1 mmol L^{-1} inibiram a atividade da V-ATPase (não mostrado). A atividade ATPase insensível ao ortovanadato da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 24 h à salinidade de 21 ‰ foi inibida em cerca de 64% por bafilomicina A_1 , segundo uma curva monofásica (**Fig. 18C**), com $K_I = 0,60 \pm 0,03 \text{ n mol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 18C).

As **Figuras 19A e 19B** mostram a estimulação pelo ATP e por íons Mg^{2+} , respectivamente, da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 120h à salinidade de 21‰. Em ambos os casos, a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva, sendo os valores de n_H iguais a 2,4 e 3,3 para ATP e Mg^{2+} , respectivamente. Os parâmetros cinéticos determinados corresponderam a $V = 13,0 \pm 0,6 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,56 \pm 0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ para a estimulação por ATP, e $V = 11,8 \pm 0,5 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,52 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ para a modulação por Mg^{2+} . A bafilomicina A_1 inibiu cerca de 40% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato (**Fig. 19C**), com K_I igual a $0,42 \pm 0,02 \text{ n mol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 19C).

A estimulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 240h à salinidade de 21‰ pelo ATP e por íon Mg^{2+} está representada nas **Figuras 20A e 20B**, respectivamente. Tanto o substrato quanto os íons estimularam a atividade da enzima por meio de interações sítio-sítio, com $n_H = 3,1$ para o ATP e $n_H = 1,1$ para Mg^{2+} . Os valores de V corresponderam a $8,6 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ para o ATP e $8,6 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ para o Mg^{2+} . Já as constantes de afinidade aparente para ATP e Mg^{2+} corresponderam respectivamente a $0,76 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,27 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$. Como observado para as demais preparações microsomais empregadas, ocorreu estimulação da atividade insensível à bafilomicina por ATP e Mg^{2+} nas mesmas faixas de concentração que a atividade insensível ao ortovanadato (inserções das Figuras 20A e 20B). A bafilomicina A_1 inibiu 53 % da atividade ATPase insensível ao ortovanadato (**Fig. 20C**), com K_I igual a $44,0 \pm 2,2 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 20C).

Figura 18. Fração microsomal branquial de *D. paguei* aclimatado a 21‰ por 24h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-bafilomicina.

Figura 19. Fração microsomal branquial de *D. paguei* aclimatado a 21‰ por 120h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-bafilomicina.

Figura 20. Fração microsomal branquial de *D. paguei* aclimatado a 21‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-bafilomicina.

Na **Tabela 8** estão reunidos os parâmetros cinéticos determinados para a estimulação por ATP e Mg^{2+} e inibição por bafilomicina A_1 da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado a 21 ‰ por diferentes intervalos de tempo.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por ATP e íons Mg^{2+} e inibição por bafilomicina A_1 da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado a 21 ‰ por diferentes intervalos de tempo.

Tempo (horas)	V (U mg^{-1})		$K_{0,5}$ (m mol L^{-1})		K_I (n mol L^{-1})	n_H	
	ATP	MgCl_2	ATP	MgCl_2		ATP	MgCl_2
0	$26,5 \pm 1,3$	$27,9 \pm 1,4$	$3,9 \pm 0,2$	$0,80 \pm 0,04$	$55,0 \pm 2,8$	6,4	3,3
1	$9,8 \pm 0,5$	$8,7 \pm 0,4$	$1,70 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	2,8	4,9
5	$9,2 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,4$	$1,50 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	1,7	3,6
24	$6,2 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3$	$0,33 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,03$	3,4	5,6
120	$13,0 \pm 0,6$	$11,8 \pm 0,5$	$1,56 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,02$	2,4	3,3
240	$8,6 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,4$	$0,76 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,01$	$44,0 \pm 2,2$	3,1	1,1

A **Figura 21** mostra a variação da atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* em função do tempo de exposição à salinidade de 21‰. Observa-se que ocorre uma grande diminuição da atividade V-ATPase em resposta à exposição de *D. pagei* à salinidade de 21‰ já nas primeiras horas. Após 1h e 5h, a atividade V-ATPase específica é cerca de 3 vezes menor que aquela determinada em frações microsomais branquiais do animal mantido em água doce, similarmente ao observado para a atividade (Na,K)-ATPase. Após 24h, uma atividade ainda menor é observada, chegando a ser 4 vezes menor que aquela determinada para animais mantidos em água doce. Após 120h, há um aumento da atividade, mas esta não chega a atingir os valores encontrados nas condições do animal não exposto à salinidade elevada. Já para 240h, a atividade se mantém num nível 3 vezes menor que o estimado para animais em água doce.

Curiosamente, a afinidade aparente da V-ATPase branquial pelo substrato dobra já após 1h de exposição do animal à salinidade de 21‰ e aumenta progressivamente até ser 12 vezes maior, para um tempo de exposição de 24h (inserção a da Fig. 21; Tabela 8). Em contraste, a afinidade aparente por ATP após 120 h de exposição é apenas 2,5 vezes maior que aquela determinada para a enzima de animais mantidos em água doce, voltando a ser 12 vezes maior após 240h de aclimação (Tabela 8). A afinidade aparente da enzima pelos íons Mg^{2+} também varia em resposta à exposição à salinidade mais elevada (inserção b da Fig. 21). Entretanto, já após 1h de exposição, a afinidade da enzima pelo Mg^{2+} aumenta cerca de 3 vezes, mantendo-se praticamente constante até 240h de exposição.

A constante de dissociação do complexo enzima-bafilomicina A_1 também varia amplamente em resposta à exposição do animal à salinidade de 21‰, diminuindo cerca de 183 vezes já após 1h nesta salinidade e mantendo-se constante até 120h de exposição (Tabela 8). Curiosamente, após um período de exposição de 240 h, a constante de dissociação enzima-bafilomicina volta a ser semelhante àquela determinada para a V-ATPase presente em frações microsomais de animais mantidos em água doce.

Figura 21. Decurso temporal do efeito da aclimação de *D. paguei* à salinidade de 21‰ sobre a atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo KCl 3 mmol L⁻¹, NADH 0,28 mmol L⁻¹, FEP 4,2 mmol L⁻¹, PQ (40U), LDH (156U), ortovanadato 10 µmol L⁻¹ e 1 µg alameticina/µg proteína, na presença e ausência de bafilomicina A₁ 0,4 µmol L⁻¹, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Inserções:** variação da afinidade aparente da V-ATPase em função do tempo de aclimação por (a) ATP; (b): Mg²⁺.

A estimulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por 240h à salinidade de 5‰ por ATP, em concentração saturante de Mg^{2+} , está representada na **Figura 22A**. A modulação da atividade ocorreu por meio de interações cooperativas ($n_H = 3,9$), seguindo uma curva simples de saturação. A velocidade máxima correspondeu a $15,2 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$ e a constante de afinidade aparente para o substrato foi de $2,2 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Concentrações de ATP maiores que 5 mmol L^{-1} inibiram a atividade da enzima.

A **Figura 22B** mostra a modulação da atividade V-ATPase da fração microsomal por íons Mg^{2+} , em presença de concentração saturante de ATP. A atividade máxima correspondeu a $14,5 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$, com $K_{0,5} = 0,90 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. A estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 3,1$), por meio de uma curva simples de saturação e concentrações de Mg^{2+} maiores que 3 mmol L^{-1} inibiram a atividade da V-ATPase (não mostrado). As inserções das Figuras 22A e 22B mostram que a atividade insensível à bafilomicina foi estimulada por ATP e Mg^{2+} nas mesmas faixas de concentração que a atividade insensível ao ortovanadato. A atividade insensível ao ortovanadato foi inibida apenas em cerca de 28% por bafilomicina A_1 , segundo uma curva monofásica (**Fig. 22C**), com $K_I = 7,6 \pm 0,4 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 22C). A determinação de atividade residual insensível à bafilomicina e ao ortovanadato indica que nestas preparações de membrana há outras ATPases, além das P- e V-ATPases.

As **Figuras 23A** e **23B** mostram a estimulação pelo ATP e por íons Mg^{2+} , respectivamente, da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por um período de 240 horas à salinidade de 10‰. Em ambos os casos, a estimulação foi cooperativa, com valores de n_H correspondentes a 1,3 para o ATP e 3,8 para o Mg^{2+} . As velocidades máximas determinadas corresponderam a $V = 13,2 \pm 0,6 \text{ U mg}^{-1}$ e $V = 14,5 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$ para a estimulação por ATP e Mg^{2+} , respectivamente. Já os valores de $K_{0,5}$ corresponderam a $0,75 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ para o ATP e $0,46 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ para Mg^{2+} . A bafilomicina inibiu aproximadamente 20% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato, percentagem que corresponde à atividade da V-ATPase (**Fig. 23C**). O valor de K_I estimado para a bafilomicina correspondeu a $70,0 \pm 3,5 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 23C).

Figura 22. Fração microsomal branquial de *D. pagei* aclimatado a 5‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C , nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-bafilomicina.

A estimulação da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado por um período de 240 horas à salinidade de 15 ‰ pelo ATP e por íons Mg^{2+} está apresentada nas **Figuras 24A e 24B**, respectivamente. Tanto o ATP ($n_H = 3,0$) como o Mg^{2+} ($n_H = 1,8$) estimularam a enzima por meio de interações sítio-sítio. Os parâmetros cinéticos determinados corresponderam a $V = 9,2 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 2,0 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para a estimulação por ATP e $V = 9,4 \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,59 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ para a modulação por Mg^{2+} . A bafilomicina inibiu apenas 14,3 % da atividade insensível ao ortovanadato (**Figura 24C**), com $K_I = 32,0 \pm 1,6 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Fig. 24C).

Na **Tabela 9** estão reunidos os parâmetros cinéticos estimados para a estimulação por ATP e Mg^{2+} e inibição por bafilomicina A_1 da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado a diferentes salinidades por 240 horas.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por ATP e íons Mg^{2+} e inibição por bafilomicina A_1 da atividade V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* aclimatado a diferentes salinidades por 240 horas

Salinidade ‰	V (U mg^{-1})		K _{0,5} (mmol L^{-1})		K _I (nmol L^{-1})	n _H	
	ATP	MgCl ₂	ATP	MgCl ₂		ATP	MgCl ₂
zero	26,5 ± 1,3	27,9 ± 1,4	3,9 ± 0,2	0,80 ± 0,04	55,0 ± 2,8	6,4	3,3
5	15,2 ± 0,7	14,5 ± 0,7	2,2 ± 0,1	0,90 ± 0,04	7,6 ± 0,4	3,9	3,1
10	13,2 ± 0,6	14,5 ± 0,7	0,75 ± 0,04	0,46 ± 0,02	70,0 ± 3,5	1,3	3,8
15	9,2 ± 0,4	9,4 ± 0,4	2,0 ± 0,1	0,59 ± 0,03	32,0 ± 1,6	3,0	1,8
21	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	0,76 ± 0,04	0,27 ± 0,01	44,0 ± 2,2	3,1	1,1

A **Figura 25** mostra a variação da atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* em função da salinidade de aclimação por 240 h. Observa-se que a atividade específica da enzima é menor que aquela estimada para os animais mantidos em água doce (controle) em todas as salinidades estudadas. Entretanto, valores muito próximos foram encontrados para as salinidades de 5 e 10 ‰, cerca de 2 vezes menores que o controle. Por outro lado, valores cerca de 3 vezes menores que os controles, próximos entre si, foram estimados para as salinidades de 15 e 21‰. Nas inserções da **Figura 25**, observa-se que a afinidade da enzima por ATP (inserção a) e Mg^{2+} (inserção b) aumenta com o aumento da salinidade de aclimação.

Figura 23. Fração microsomal branquial de *D. pagei* aclimatado a 10‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C , nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo enzima-bafilomicina.

Figura 24. Fração microsomal branquial de *D. pagei* aclimatado a 15‰ por 240h: estimulação da atividade V-ATPase por ATP e Mg^{2+} e efeito de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, nas condições padrão descritas em Materiais e Métodos (A) Efeito da concentração de ATP sobre a atividade V-ATPase. (B) Efeito da concentração de Mg^{2+} sobre a atividade V-ATPase (C) Efeito da concentração de bafilomicina A_1 sobre a atividade insensível ao ortovanadato. **Inserções a e b:** Efeito das concentrações de ATP (a) e Mg^{2+} (b) sobre: (●) atividade ATPase insensível ao ortovanadato; (○) atividade ATPase insensível à bafilomicina. **Inserção c:** representação de Dixon para a determinação da constante de dissociação (K_I) do complexo enzima-bafilomicina.

Figura 25. Efeito da salinidade de aclimação por 240h sobre a atividade V-ATPase específica da fração microsomal de tecido branquial.

A atividade foi determinada continuamente, a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo KCl 3 mmol L⁻¹, NADH 0,28 mmol L⁻¹, FEP 4,2 mmol L⁻¹, PQ (40U), LDH (156U), ortovanadato 10 µmol L⁻¹ e 1 µg alameticina/µg proteína, na presença e ausência de bafilomicina A₁ 0,4 µmol L⁻¹, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Inserções:** variação da afinidade aparente da V-ATPase em função da salinidade por (a) ATP; (b): Mg²⁺.

A **Tabela 10** mostra a variação da concentração de diversos íons na hemolinfa de *D. pagei* em função do tempo de aclimação à salinidade de 21 ‰. Observa-se que ocorreu um aumento na concentração de todos os íons analisados com o aumento do período de aclimação. Entretanto, variações abruptas foram observadas para tempos curtos de exposição, enquanto que os valores estimados para os períodos de 120 e 240h de aclimação foram muito próximos entre si.

Tabela 10. Dosagem da concentração de íons na hemolinfa de *D. pagei* após diferentes intervalos de tempo de exposição à salinidade de 21‰.

Tempo de aclimação	[Na ⁺] (mmol L ⁻¹)	[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[Ca ²⁺] (mmol L ⁻¹)	[Mg ²⁺] (mmol L ⁻¹)
0	190 ± 13	9,7 ± 0,7	10,2 ± 0,5	2,8 ± 0,4
5 horas	266,5 ± 13,3	91,0 ± 4,6	19,6 ± 0,9	7,3 ± 0,4
1 dia	379,5 ± 18,9	94,0 ± 4,7	26,0 ± 1,3	9,8 ± 0,5
5 dias	394,5 ± 19,7	104,5 ± 5,2	23,6 ± 1,2	15,3 ± 0,8
10 dias	407,5 ± 20,4	102,5 ± 5,1	23,5 ± 1,2	16,9 ± 0,8

A centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (10-50%) da fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce para a análise da distribuição das atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase (**Figura 26**) mostrou um perfil de distribuição de proteína muito semelhante ao observado na Figura 2. Observam-se também, nas duas análises, a presença de 2 picos de atividade. Na Figura 26, o pico I (28-35% de sacarose) apresenta alta atividade (Na,K)-ATPase; entretanto, sua atividade V-ATPase é bastante baixa. Já a atividade V-ATPase do pico III (38-45% de sacarose) é bem maior que a do pico I, enquanto a atividade (Na,K)-ATPase é similar nos dois picos. Os dois picos de atividade identificados indicam a presença de frações de membrana de diferentes densidades, contendo (Na,K)-ATPase e V-ATPase, nas preparações microsomais em estudo.

Figura 26. Análise da fração microsomal do tecido branquial de *D. paguei* mantido em água doce por centrifugação em gradiente contínuo de sacarose: atividades (Na,K)-ATPase e V-ATPase.

Uma amostra de fração microsomal (3 mg de proteína) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, e centrifugada a 180000g durante 2h, a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e cada uma delas foi analisada em relação a: (■) atividade (Na,K)-ATPase; (●) atividade V-ATPase; (○) concentração de proteína e (△) percentagem de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos.

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que tanto a (Na,K)-ATPase como a V-ATPase branquiais são enzimas importantes nos processos de regulação osmótica e iônica dos crustáceos dulcícolas. Entretanto, só recentemente se iniciou estudos detalhados das características cinéticas da (Na,K)-ATPase branquial destes animais e dados sobre as características cinéticas da V-ATPase branquial são completamente inexistentes até o momento. Está bem estabelecido, também, que existe uma relação direta entre a captação de íons em meios diluídos e a atividade da (Na,K)-ATPase branquial, que diminui várias vezes quando crustáceos são transferidos de meios mais diluídos para salinidades mais elevadas. Por outro lado, o efeito da salinidade do meio sobre a atividade da V-ATPase praticamente ainda não foi investigado. Os mecanismos através dos quais a atividade destas enzimas é regulada em resposta à alteração da salinidade do ambiente também não estão bem estabelecidos, particularmente para a V-ATPase.

Por fim, as adaptações bioquímicas associadas à invasão do ambiente dulcícola pelos crustáceos também ainda não são bem compreendidas. Nesse sentido, é interessante realizar uma análise comparativa das (Na,K)-ATPases expressas no tecido branquial de espécies com diferentes graus de adaptação ao ambiente dulcícola, visando identificar características particulares da enzima de animais bem adaptados à água doce que possam contribuir para um processo eficiente de captação de íons.

Diante disso, neste trabalho realizou-se a caracterização cinética da (Na,K)-ATPase em frações microsomais do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce, visando estabelecer comparações entre as características cinéticas da enzima expressa neste animal e aquelas das enzimas expressas no tecido branquial de caranguejos habitantes de meios mais salinos. Foi caracterizada também a V-ATPase em frações microsomais do tecido branquial de *D. pagei* mantido em água doce e aclimatado a diferentes salinidades por 10 dias ou mantido por intervalos de tempo variáveis numa salinidade relativamente elevada (21 ‰) em relação àquela do seu habitat natural. Estes resultados constituem a primeira caracterização cinética de uma V-ATPase originária de crustáceos e podem contribuir para estabelecer uma correlação entre a salinidade do meio e a atividade V-ATPase branquial, bem como para o conhecimento de possíveis mecanismos de regulação da atividade desta enzima.

As preparações de membranas empregadas neste trabalho mostraram-se adequadas para o estudo das propriedades cinéticas da (Na,K)-ATPase e V-ATPase branquiais de *D. pagei*, nas diferentes

condições estudadas, apresentando boa estabilidade tanto a -20°C (armazenagem) quanto em banho de gelo (experimentação). Por outro lado, embora tenham sido identificadas nas frações microsomais outras enzimas capazes de hidrolisar os substratos empregados neste estudo (PNFF e ATP) nas mesmas condições que a (Na,K)-ATPase e a V-ATPase, foi possível caracterizar as atividades atribuídas somente a estas enzimas (atividades K^{+} -fosfatase, (Na,K)-ATPase e V-ATPase) realizando medidas em presença e ausência dos seus inibidores específicos.

5.1. Caracterização da atividade K^{+} -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce.

Foram caracterizadas inicialmente as propriedades cinéticas da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* utilizando o substrato sintético (PNFF). Segundo Furriel et al. (2001) e Masui et al. (2003), o PNFF é uma ferramenta útil para caracterizar a enzima dos crustáceos, considerando que a metodologia empregada para medir a atividade é muito mais simples e direta, quando comparada à empregada para o ATP, substrato fisiológico da enzima.

O mecanismo cinético da reação de hidrólise do PNFF não está bem esclarecido; entretanto, parece envolver principalmente a forma E2 da enzima e não estar associada ao transporte de cátions (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Jorgensen et al., 1998). A ocorrência de fosforilação da enzima pelo PNFF também é controversa (Glynn, 1985; Yamazaki et al., 1994; Homareda & Ushimaru, 2005). Por fim, tanto a atividade ATPase quanto PNFFase da (Na,K)-ATPase envolvem a hidrólise de uma ligação fosfato e são estimuladas por K^{+} , porém a desfosforilação de E2P é estimulada por K^{+} extracelular, enquanto a hidrólise do PNFF é estimulada por K^{+} intracelular (Glynn, 1985).

A alameticina é um antibiótico peptídico fúngico usado para permeabilizar membranas a moléculas hidrofílicas de baixa massa molecular, como ATP e cátions. Aparentemente, ocorre o arranjo transmembrana de 6–8 moléculas helicoidais de antibiótico, formando um poro cheio de água através do qual essas substâncias podem se difundir (Tieleman et al., 1998; Gostimskaya et al., 2003; Ritov et al., 1992; Mottamal & Lazaridis, 2006; Crisma et al., 2007). Membranas de diferentes origens usualmente mostram tendências variadas a formar vesículas seladas, exibindo diferentes sensibilidades à alameticina, as quais são atribuídas a diferenças na sua composição lipídica (Ritov et al., 1992). O aumento de cerca de 45 % na atividade PNFFase total da fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei* em presença de alameticina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína) indica a presença

de vesículas seladas na preparação. Em contraste, preparações microsomais de tecido branquial dos siris *Callinectes danae*, estuarino, (Masui et al., 2003) e *Callinectes ornatus*, marinho (Garçon, 2007) não apresentaram vesículas seladas, sugerindo que possa haver uma diferença marcante na composição lipídica do tecido branquial destes animais, habitantes de meios mais salinos, e *D. pagei*. Em organismos aquáticos, a composição lipídica das membranas celulares parece afetar diretamente sua permeabilidade a água e íons, como observado para certos crustáceos (Whitney, 1974; Morris et al., 1982) e peixes (Leray et al., 1984; Zeidel, 1996). Uma diminuição da permeabilidade associada a diferenças na composição lipídica das membranas pode ter importância adaptativa, contribuindo para diminuir a energia investida em processos osmorregulatórios em meios diluídos (Palacios et al., 2004).

A separação de dois picos de atividade K^+ -fosfatase após a centrifugação em gradiente de sacarose indica a presença de frações de membrana de diferentes densidades, contendo (Na,K)-ATPase, na fração microsomal branquial de *D. pagei* mantido em água doce. Em contraste, um único pico de atividade K^+ -fosfatase, coincidente com um único pico de proteína, foi observado para frações microsomais branquiais do siri eurialino *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ (Masui et al., 2005a) ou recém capturado a 33‰ (Masui et al., 2003) e também do siri marinho *C. ornatus* (Garçon, 2007). As membranas de diferentes densidades, ricas em (Na,K)-ATPase, presentes nas frações microsomais branquiais de *D. pagei* podem ser originárias de diferentes locais do seu epitélio branquial posterior assimétrico. Em concordância com essa proposta, estudos de marcação ultracitoquímica para a (Na,K)-ATPase nas brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce revelaram a presença da enzima na membrana basolateral tanto do epitélio fino quanto do espesso (Torres, 2006).

A presença de duas bandas imuno específicas na análise por Western blotting da fração microsomal branquial de *D. pagei* sugere a presença de duas isoformas da subunidade α da (Na,K)-ATPase nas suas brânquias posteriores. Os valores de M_r determinados corresponderam a 105 e 116 kDa, próximos àqueles encontrados para a subunidade α da enzima de outros crustáceos (Peterson et al., 1978; Lucu & Flik, 1999; Furriel et al., 2000; Towle et al., 2001; Masui et al., 2002; Gonçalves et al., 2006; Santos et al., 2007; Garçon et al., 2007). Uma única banda imuno específica para a subunidade α foi identificada no tecido branquial dos siris *C. danae* (Masui et al., 2002, 2005), e *C. ornatus* (Garçon et al., 2007), além de outras espécies menos relacionadas (Furriel et al., 2000; Mendonça et al., 2007; Santos et al., 2007; Belli et al., 2009). A presença de

duas isoformas da subunidade α (M_r 113 e 131 kDa) no tecido branquial, identificadas por análise por Western blotting, foi relatada recentemente para o caranguejo estuarino *C. sapidus* (Lovett et al., 2006). Entretanto, segundo os autores, a diferença de mobilidade eletroforética também poderia ser atribuída a modificações pós-traducionais, como fosforilação ou glicosilação. Em *Artemia*, as diferenças de mobilidade eletroforética entre as duas isoformas da subunidade α identificadas também foram atribuídas a modificações pos-traducionais (Peterson et al., 1982). Em nível molecular, um único cDNA para a subunidade α foi clonado de *C. sapidus* (Towle et al., 2001), *Homarus americanus* (Parrie & Towle, 2002) e *Scylla paramosain* (Chung & Lin, 2006), enquanto dois cDNA diferentes para esta subunidade foram identificados em *Artemia* (Lucu & Towle, 2003) e *Pachygrapsus marmoratus* (Jayasundara et al., 2007).

A atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei*, foi estimulada pelo substrato sintético com cooperatividade positiva, tal como descrito para as enzimas branquiais de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ (Masui et al., 2003a), recém-coletado a 33 ‰ (Masui et al., 2003) e também *C. ornatus* (Garçon, 2007). O valor de $K_{0,5}$ determinado para a estimulação pelo substrato foi bastante similar aos relatados para enzimas de outros crustáceos, incluindo espécies pouco relacionadas, mantidas na salinidade do seu habitat natural ou aclimatadas a diferentes salinidades (Masui et al., 2003, 2005; Furriel et al., 2001; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009; Garçon, 2007). Estes resultados sugerem que a afinidade pelo PNFF é praticamente independente da espécie estudada e também da salinidade do ambiente.

A atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase de diferentes origens é dependente de Mg^{2+} (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992; Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Karlsh, 2003; Gatto et al., 2007). A inibição da atividade da enzima em concentrações elevadas de íons Mg^{2+} aparentemente se deve à competição com K^+ pela ligação aos sítios de transporte (Gatto et al., 2007). O valor de $K_{0,5}$ para Mg^{2+} encontrado para a enzima de *D. pagei* é próximo daqueles determinados para *C. ornatus* (Garçon, 2007) e *C. danae*, tanto aclimatado à salinidade de 15 ‰ (Masui et al. 2005a) quanto recém capturado a 33 ‰ (Masui et al., 2003).

A afinidade aparente da enzima branquial de *D. pagei* por K^+ é aproximadamente 2 vezes menor que aquelas encontradas para *C. ornatus* (Garçon, 2007) e *C. danae* recém capturado a 33‰ (Masui et al., 2003) e cerca de 1,5 vezes menor em relação a *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ (Masui et al., 2005).

É bem conhecido que os íons K^+ podem ser substituídos pelos íons NH_4^+ na estimulação da atividade da (Na,K)-ATPase de vertebrados (Robinson, 1970; Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992) e também de crustáceos (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Wall, 1996; Masui et al., 2002, 2003; Furriel et al., 2004; Mendonça et al., 2007; Weiner & Hamm, 2007; Belli et al., 2009). Entretanto, enzimas de diversas fontes são estimuladas por K^+ com afinidade aparente maior que por NH_4^+ (Robinson, 1970; Rossi et al., 1978; Furriel et al., 2004; Masui et al., 2003, 2005; Garçon, 2007; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009). Em concordância, a afinidade da enzima branquial de *D. pagei* por íons NH_4^+ foi cerca de 4,5 vezes menor que pelos íons K^+ .

Entre as enzimas de diferentes espécies de crustáceos já estudadas, a atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase foi estimulada por NH_4^+ até valores máximos muito próximos àqueles observados para a estimulação por K^+ (Masui et al., 2003; Furriel et al., 2004; Mendonça et al., 2007). Curiosamente, os íons NH_4^+ estimularam a atividade da enzima de *D. pagei* até uma atividade máxima cerca de 25% menor que aquela observada para a estimulação por K^+ .

O efeito sinérgico de K^+ e NH_4^+ sobre a atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* mantido em água doce sugere a presença de dois sítios de ligação para estes íons na molécula da enzima. Aparentemente, os íons K^+ podem ligar-se a ambos os sítios, independentemente da presença de íons NH_4^+ , que não competem com K^+ pela ligação à enzima. Esta conclusão baseia-se no fato dos valores de $K_{0,5}$ para K^+ serem praticamente constantes, independentemente da concentração de íons NH_4^+ presente. Já os íons NH_4^+ , na ausência de K^+ , aparentemente ligam-se a apenas um dos sítios, com baixa afinidade aparente, resultando numa velocidade máxima 20% menor que a observada em presença de concentrações saturantes de K^+ . Possivelmente, a ligação de K^+ em baixa concentração a um dos seus sítios de ligação, com alta afinidade, provoca uma mudança conformacional no sítio de ligação de NH_4^+ que resulta num aumento da afinidade por NH_4^+ até valores de $K_{0,5}$ semelhantes aos observados para K^+ . Entretanto, em altas concentrações de K^+ os íons NH_4^+ não podem ligar-se à enzima, apresentando uma atividade constante para a estimulação da atividade enzimática por NH_4^+ em presença de K^+ em concentração 10 e 20 mmol L^{-1} .

Em contraste com os resultados deste trabalho, não foi observada estimulação sinérgica da atividade K^+ -fosfatase da (Na,K)-ATPase branquial por íons K^+ e NH_4^+ para grande parte das espécies já estudadas até o momento (Masui et al., 2003; Masui et al., 2005; Furriel et al., 2004; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009). Somente a enzima branquial do siri marinho *C. ornatus*

apresentou atividade K^+ -fosfatase com estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ (Garçon, 2007). Curiosamente, esta característica nunca foi descrita para (Na,K)-ATPases das mais distintas fontes.

A curva monofásica de inibição da atividade PNFFase por ouabaína contrasta com a possível presença de duas isoformas da enzima na fração microsomal de tecido branquial de *D. pagei*, sugerida pela análise por Western blot. Entretanto, é possível que a sensibilidade à ouabaína das duas isoenzimas presentes em *D. pagei* seja muito próxima, quando o substrato empregado é o PNFF, levando ao comportamento monofásico. Curvas de inibição monofásicas também foram relatadas para as enzimas de *C. danae* aclimatado à salinidade de 15 ‰ (Masui et al., 2005a) ou recém capturado a 33‰ (Masui et al., 2003) e de *C. ornatus* (Garçon, 2007). O valor de K_i determinado para a enzima de *D. pagei* é 1,6 vezes maior que o determinado para a enzima de *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005a) e 1,1 vezes maior em relação ao relatado para a enzima de *C. ornatus* (Garçon, 2007). Entretanto a constante de inibição por ouabaína para a enzima de *C. danae* aclimatado a 33‰ (Masui et al., 2003) é 3,7 vezes maior que a encontrada para *D. pagei*.

O ortovanadato é conhecido por inibir a (Na,K)-ATPase do tecido de vertebrados em concentração de $nmol\ L^{-1}$ ligando-se covalentemente a um sítio de fosforilação intracelular (Lucu and Towle, 2003). A inibição bifásica da atividade PNFFase total por ortovanadato é coerente com a presença de duas isoformas da (Na,K)-ATPase na fração microsomal em estudo, com diferentes afinidades por este inibidor, de forma consistente com os resultados da análise por Western blotting. Curvas monofásicas de inibição da atividade PNFFase total pelo ortovanadato foram encontradas para frações microsomais branquiais de *C. danae* aclimatado a 15 ‰ (Masui et al., 2005a) e recém capturado a 33‰ (Masui et al., 2003), assim como de outras espécies de crustáceos (Furriel et al., 2001; Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009).

A atividade residual de cerca de 11% da atividade PNFFase total determinada em presença de ouabaína $3\ mmol\ L^{-1}$ indica que além da (Na,K)-ATPase, responsável por cerca de 90% da atividade ATPase total, outras enzimas capazes de hidrolisar o PNPP estão presentes na fração microsomal branquial de *D. pagei*. Em conjunto, o estudo do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade PNFFase insensível a ouabaína sugere a presença de uma Na^+ e/ou K^+ -ATPase na preparação, responsável por cerca de 5,3 % da atividade PNFFase total, além de F_oF_1 -ATPase (cerca de 5,7 % da atividade PNFFase total). A presença de Na^+ e/ou K^+ -ATPases foi relatada para o tecido branquial de vários crustáceos (Masui et al., 2005a; Moretti et al., 1991; Provérbio et al.,

1991; Lima et al., 1997; Mendonça et al., 2007). Já a contaminação da preparação por ATP sintase é esperada, em função do grande número de mitocôndrias presentes nas brânquias posteriores do animal (Torres, 2006).

A ausência de inibição da atividade PNFFase insensível à ouabaína por tapsigargina e EDTA sugere a ausência de Ca^{2+} -ATPase na preparação, em contraste com resultados de outros autores, que mostraram a presença desta enzima em preparações do tecido branquial de certos crustáceos (Morris & Greenaway, 1992; Flik et al., 1994; Belli, 2008).

5.2. Atividade ATPase da (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei*.

A alameticina também provocou aumento da atividade ATPase total da fração microsomal de *D. pagei* mantido em água doce, indicando que no meio reacional de medida desta atividade também estão presentes vesículas seladas.

O número de trabalhos que trata da caracterização cinética da (Na,K)-ATPase branquial de crustáceos vem aumentando, recentemente. Entretanto, a enzima foi pouco estudada em caranguejos dulcícolas (Onken & McNamara, 2002; Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005b). Os parâmetros cinéticos encontrados na literatura para a estimulação da atividade ATPase da (Na,K)-ATPase branquial de diferentes espécies de crustáceos por ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ , assim como os valores de K_i determinados para a inibição da atividade da enzima por ouabaína estão reunidos na **Tabela 11**, modificada de Leone et al. (2005).

A estimulação da atividade da (Na,K)-ATPase dos vertebrados pelo ATP ocorre por meio de duas famílias de sítios, uma de alta afinidade, com valores de $K_{0,5}$ entre 0,1 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e outra de baixa afinidade, com valores de $K_{0,5}$ entre 0,01 e 0,4 mmol L^{-1} (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1993). Os valores de $K_{0,5}$ e K_M determinados para a estimulação da atividade da enzima branquial de *D. pagei* pelo ATP encontram-se na faixa relatada para os sítios de baixa e de alta afinidade descritos para a enzima de diferentes tecidos de vertebrados (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1993).

A presença de sítios de alta afinidade para o substrato fisiológico também foi relatada para as enzimas branquiais de *C. danae* recém capturado a 33‰ (Masui et al., 2002), do ermitão entre-marés *Clibanarius vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e do camarão dulcícola *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Belli, 2008). Entretanto, não foi observado sítio de alta afinidade para a enzima branquial de *C. ornatus* (Garçon, 2007) e outros crustáceos (Furriel et al., 2000; Gache et al., 1977; D'Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Tentes & Stratakis, 1991; Corotto & Holliday, 1996).

Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinéticos determinados para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase no tecido branquial de diferentes crustáceos.

	Tipo de preparação	Habitat	Salinidade (‰)	$K_{0,5}$ ou K_M (mmol L ⁻¹)	V	K_I ouabaina (μmol L ⁻¹)	n_H	Referência
Efeito de Na⁺								
<i>Dilocarcinus pagei</i>	M	Água doce	FW	4,7	133,8		1,6	Este estudo
<i>Potamon edulis</i>	H	Água doce	FW	0,06	174,0			Harris and Bayliss, 1988
<i>Astacus astacus</i>	H	Água doce	FW	0,26	137,0			
<i>Austropotamobius pallipes</i>		Água doce		0,91	165,0			
<i>Macrobrachium olfersii</i>	M	Água doce	FW	6,0	653,8		1,6	Furriel et al, 2000
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>		Água doce		5,0				Wilder et al, 2000
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	FW	5,5	275,1		1,4	Santos et al., 2007
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	21‰	2,84	100,1		2,1	Belli, 2008
<i>Carcinus maenas</i>	H	Estuário	SW	0,6	27,0			Harris and Bayliss, 1988
			40% SW	12,5	186,0			
			10	6,0	311,6			Siebers et al , 1983
			35	14,0	100,0			
	M	Estuário	33‰	5,8	302,1		1,6	Masui et al, 2002
<i>Callinectes danae</i>								
<i>Uca minax</i>		Estuário		0,9	73,33			Wanson et al, 1984
<i>Clibanarius vitatus</i>	M	Entre-marés	31‰	7,4	149,0		1,0	Leone et al, 2005a
<i>Macropipus puber</i>		Estuário/Mar		41,6	121,7			Winkler et al, 1986
<i>Callinectes ornatus</i>	M	Mar	SW	5,2	136,0		1,8	Leone et al, 2005a
<i>Cancer pagurus</i>		Mar		34,6	90,0			
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	M	Mar	SW	5,3	282,8		2,2	Leone et al, 2005a

Efeito do ATP								
<i>Dilocarcinus pagei</i>	M	Água doce	FW	0,0034	6,4	6,21	1,9	Este estudo
	H		FW	0,084	127,1	101,2	0,8	
				-	19,3			Weihrauch et al., 2004
<i>Potamon potamios</i>	M	Água doce	FW	1,4				Tentes & Stratakis, 1991
<i>Macrobrachium olfersii</i>	M	Água doce	FW	0,17	686,1	61,6	1,0	Furriel et al, 2000
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>		Água doce		0,2				Wilder et al, 2000
<i>Orconectes limosus</i>		Água doce				70,0		Kosiol et al, 1988
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	FW	0,0042	33,9	147,5	2,8	Santos et al., 2007
				0,144	232,9		1,7	
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	21‰	0,000081	9,93	264,4	2,0	Belli, 2008
				0,341	105,8		1,4	
<i>Eriocheir sinensis</i>		Estuário/Água doce				790,0		Bigalke, 1986
	H		FW		1200			Onken & Putzenlechner, 1995
<i>Callinectes sapidus</i>	H	Estuário/Água doce	SW	0,19	238,3	150,0		Neufeld et al, 1980
<i>Uca pugnax</i>	M	Estuário/Água doce	SW	0,56	466,7	80,0		Holliday, 1985
<i>Hemigrapsus nudus</i>	H	Estuário/Água doce	SW	0,6	250,0	95,0		Corotto & Holliday, 1996
			75% SW		333,0			
			50% SW		458,0			
			25% SW		350,0			
			50% SW		611,1			
			10% SW		685,2			
<i>Callinectes danae</i>	M	Estuário	33‰	54,10 ⁻⁶ (H)	35,4	147,2	3,6	Masui et al, 2002
				55,0×10 ⁻³ L)	271,5		1,0	
<i>Carcinus maenas</i>	H	Estuário	50% SW		286,6			Flik et al, 1994
	M				1321,7			
			10 ‰ SW		60,0	0,29		Postel et al, 1998
<i>Uca pugilator</i>	H	Estuário/entre-marés	SW	0,48	285,7	79,0		D'Orazio et al, 1985
			10% SW		374,2			

	H		SW		34,0			
			10% SW		136,0			
<i>Clibanarius vitatus</i>	M	Entre-marés	31‰	$63,8 \times 10^{-6}$ (H)	19,1	117,3	1,9	Leone et al, 2005a
				$44,1 \times 10^{-3}$ (L)	142,6		1,0	
<i>Callinectes ornatus</i>	M	Mar	SW	$71,0 \times 10^{-3}$	135,7		1,0	Leone et al, 2005a
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	M	Mar	SW	$42,0 \times 10^{-3}$	334,1	53,8	1,0	Leone et al, 2005a
Efeito de Mg^{2+}								
<i>Dilocarcinus pagei</i>	M	Água doce	FW	0,62	136,5		1,5	Este estudo
<i>Potamon potamios</i>	M	Água doce	FW	4,0				Tentes & Stratakis, 1991
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	FW	0,79	261,9		1,7	Santos et al., 2007
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	21‰	0,51	106,7		2,8	Belli, 2008
<i>Macrobrachium olfersii</i>	M	Água doce	FW	0,80	632,5		0,8	Furriel et al, 2000
<i>Uca pugnax</i>	M	Estuário/Água doce	SW	3,3				Holliday, 1985
<i>Hemigrapsus nudus</i>	H		SW	2,6				Corotto & Holliday, 1996
<i>Callinectes danae</i>	M	Estuário	FC	0,48	309,7		1,3	Masui et al, 2002
<i>Clibanarius vitatus</i>	M	Entre-marés	IT	0,36	132,0		1,8	Leone et al, 2005a
<i>Callinectes ornatus</i>	M	Mar	SW	0,44	138,7		1,7	Leone et al, 2005a
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	M	Mar	SW	0,28	279,5		2,2	Leone et al, 2005a
Efeito de K^{+}								
<i>Dilocarcinus pagei</i>	M	Água doce	FW	0,47	131,7		1,4	Este estudo
<i>Potamon potamios</i>	M	Água doce	FW	1,2	840,0	500,0		Tentes & Stratakis, 1991
<i>Hemigrapsus nudus</i>	H		SW	1,5				Corotto & Holliday, 1996
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	FW	0,88	271,8		1,0	Santos et al., 2007
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	21 ‰	0,94	114,1		1,4	Belli, 2008
<i>Macrobrachium olfersii</i>	M	Água doce	FW	2,4	556,1		0,8	Furriel et al, 2004
<i>Uca pugnax</i>	M	Estuário/Água doce	SW	2,0	501,7			Holliday, 1985
			10‰	5,4	256,7			Winkler, 1986

			35‰	6,5	146,7		
<i>Callinectes sapidus</i>	H	Estuário/Água doce	SW	1,1			Neufeld et al, 1980
<i>Uca pugilator</i>	H	Estuário/entre-marés	SW	2,4			D'Orazio et al, 1985
<i>Callinectes danae</i>	M	Estuário	FC	1,61	294,0	2,5	Masui et al, 2002
<i>Clibanarius vitatus</i>	M	Entre-marés	IT	1,5	140,0	1,1	Leone et al, 2005a
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	M	Mar	SW	1,86	301,2		Leone et al, 2005a
<i>Callinectes ornatus</i>	M	Mar	SW	1,2	143,0		Leone et al, 2005a
Efeito de NH₄⁺							
<i>Dilocarcinus pagei</i>	M	Água doce	FW	1,9	125,6	1,6	Este estudo
<i>Uca pugnax</i>	M	Estuário/Água doce	SW		561,7		Holliday, 1985
<i>Callinectes danae</i>	M	Estuário	FC	4,6	377,8	1,1	Masui et al, 2002
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	FW	5,0	385,9	1,0	Santos et al., 2007
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	M	Água doce	21‰	3,09	154,4	1,3	Belli, 2008
<i>Macrobrachium olfersii</i>	M	Água doce	FW	2,4	556,1	1,1	Furriel et al, 2004
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	M	Mar	SW	3,7	501,7		Leone et al, 2005a
<i>Clibanarius vitatus</i>	M	Entre-marés	IT	4,5	245,6	1,1	Leone et al, 2005a

V: atividade específica (nmol/min/mg); M: fração microsomal de tecido branquial; H: homogenado total de tecido branquial; FW: água doce ; SW: água do mar; FC: recém coletado; IT: entre marés; (H): sítio de alta afinidade; (L): sítio de baixa afinidade.

A afinidade aparente da enzima branquial de *D. pagei* pelo ATP, nos sítios de baixa afinidade, é cerca de 17 vezes maior que a encontrada para o caranguejo de água doce *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991). Valores de K_M entre 2,3 e 7 vezes maiores que o encontrado para *D. pagei* foram relatados para enzimas branquiais de outras espécies de caranguejos (Tabela 11). Por outro lado, valores similares foram relatados para os sítios de baixa afinidade das enzimas branquiais de *C. danae* (Masui et al., 2002) e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006), e também de diferentes tecidos de vertebrados (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1993).

Nos sítios de alta afinidade, a enzima de *D. pagei* apresentou afinidade pelo ATP 50 a 60 vezes menor que as enzimas de *C. danae* e *C. vittatus*, porém 20 vezes maior que a enzima de *C. ornatus* (Tabela 11). Desta forma, não parece haver uma correlação entre a afinidade pelo ATP e o habitat da espécie considerada.

A atividade específica determinada para a fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* neste trabalho é 2,7 vezes maior que a determinada por Weihrauch et al (2004). Essa diferença aparentemente se deve a diferenças metodológicas, uma vez que estes autores empregaram homogeneizados totais das brânquias posteriores.

Valores amplamente variáveis foram encontrados para a atividade (Na,K)-ATPase específica no tecido branquial em diferentes espécies de crustáceos. Em grande parte, essas diferenças refletem características espécie-específicas, assim como o grau de adaptação de cada espécie à salinidade do seu habitat. De uma maneira geral, a atividade tende a ser maior em animais dulcícolas mantidos em meios diluídos, bem como em animais eurialinos expostos a salinidades mais reduzidas, refletindo o papel desta enzima na captação de íons do meio externo para a hemolinfa.

Entre os caranguejos de água doce, medidas de atividade (Na,K)-ATPase específica branquial só estão disponíveis para *Potamos edulis*, com uma atividade específica cerca de 3 vezes maior que *D. pagei* (Harris & Bayliss, 1988). Já os caranguejos estuarinos apresentam, de maneira geral, atividades específicas muito maiores que *D. pagei*, particularmente quando se consideram espécies osmorreguladoras aclimatadas a salinidades mais baixas (Tabela 11). Poucos estudos foram realizados com caranguejos marinhos, encontrando-se valores próximos ao determinado neste estudo em frações microsomais branquiais de *C. ornatus* em 33‰ de salinidade (Garçon et al., 2006).

Entre espécies menos relacionadas de água doce, valores próximos aos encontrados para *D. pagei* foram relatados para homogenados de tecido branquial dos lagostins *Astacus astacus* e *Austropotamobios pallipes* (Harris & Bayliss, 1988). Valores cerca de 2 vezes e 5 vezes maiores foram relatados para os camarões de água doce *M. amazonicum* (Santos et al., 2007) e *M. olfersi* (Furriel et al., 2000, 2004), respectivamente.

A diferença de atividade (Na,K)-ATPase específica entre *D. pagei* e *P. edulis* pode estar relacionada a diferenças na sua capacidade osmorregulatória. Um fator importante é o gradiente osmo-iônico mantido entre a hemolinfa e o meio externo, em cada espécie. Em água doce, *D. pagei* apresenta uma concentração de Na^+ na hemolinfa de cerca de 190 mmol L^{-1} , e uma osmolalidade de $380 \text{ mosmol/Kg H}_2\text{O}$ (Onken & McNamara, 2002; Augusto et al., 2007), valores baixos quando comparados àqueles encontrados para outros caranguejos dulcícolas (**Tabela 12**). Em contraste, *P. edulis* mantém osmolalidade em torno de $540 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ e íons Na^+ ao redor de 250 mmol L^{-1} (Harris & Micallef, 1971). Acredita-se que uma adaptação importante para os crustáceos que invadiram o ambiente dulcícola é a redução do gradiente osmótico e iônico hemolinfa/meio externo, observada nas espécies mais bem adaptadas à vida em água doce (Péqueux, 1995). Essa redução pode levar a um menor influxo osmótico de água e uma diminuição da perda difusiva de sais, e, em função disso, a uma menor atividade específica da (Na,K)-ATPase, diminuindo a energia consumida na hiperregulação osmótica (Péqueux, 1995; Onken & McNamara, 2002). Segundo este critério, *D. pagei* pode ser considerado uma espécie muito bem sucedida em sua adaptação à água doce, quando comparada às outras espécies de caranguejos dulcícolas estudadas até o momento (Onken & McNamara, 2002).

Embora outra possibilidade para explicar a baixa atividade (Na,K)-ATPase branquial em *D. pagei* pudesse ser a produção de urina hiposmótica em relação à hemolinfa, diminuindo a perda de sais, Augusto et al., (2007) demonstraram recentemente que este caranguejo produz urina isosmótica à hemolinfa, em água doce, similarmente a outros caranguejos dulcícolas (Mantel & Farmer, 1983). Entretanto, caranguejos dulcícolas freqüentemente produzem urina a uma taxa reduzida, o que pode ser vantajoso para a conservação de sais, reduzindo a dependência de mecanismos ativos de captura de íons.

Tabela 12: Osmolalidade e concentração de diferentes íons na hemolinfa de *D. pagei* e outros caranguejos de água doce.

	osmolalidade	[Na ⁺]	[Cl ⁻]	[K ⁺]	[Ca ²⁺]	[Mg ²⁺]
	(mosmol/kg)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
<i>Dilocarcinus pagei</i> ^a	386	190	206	9,7	10,2	2,8
<i>Potamonautes warreni</i> ^a	636	238	272	4,6	13	4,7
<i>Potamon niloticus</i> ^a	525	270	265	6,4	15,7	4,7
<i>Potamon edulis</i> ^a	540	250	210			
<i>Potamon fluviatilis</i> ^b	538					
<i>Sudamonautes africanus</i> ^a	500	260	240	8,4	12,7	
<i>Eriocheir sinensis</i> ^c	532					
<i>Paratelphusa hydrodriinus</i> ^a	480	210	240	5,9	11,8	10,6
<i>Armases robertii</i> ^c	678					
<i>Holthuisana transversa</i> ^a	620	330	255	6,8	7,8	7,8

^a Onken & McNamara, 2002; ^b Harris & Micallef, 1971; ^c Schubart & Diesel, 1998.

A menor atividade (Na,K)-ATPase específica encontrada para *D. pagei*, em relação aos caranguejos estuarinos, também poderia ser analisada comparando-se os gradientes osmótico e iônico mantidos entre a hemolinfa e o meio externo pelas diferentes espécies. Entretanto, além da diminuição deste gradiente, outra adaptação importante para o sucesso da colonização de ambientes diluídos é a redução da permeabilidade da superfície corporal a água e íons, em comparação com espécies habitantes de biótopos mais salinos (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003). Coerentemente, baixas taxas de difusão passiva de íons foram encontradas para vários caranguejos hololimnéticos (Shaw, 1959; Harris, 1975; Greenaway, 1981; Morris & van Aardt, 1998). Dessa forma, entre as estratégias adaptativo-evolutivas empregadas por *D. pagei* e outros caranguejos dulcícolas para a colonização da água doce pode-se incluir uma diminuição da permeabilidade corporal, diminuindo a necessidade de captação ativa de íons através do tecido branquial.

A capacidade dos crustáceos de hiperregular os fluidos corporais em meios de baixa salinidade aparentemente também está relacionada à razão superfície/volume corporal das diferentes espécies. Em alguns grupos de crustáceos, a forma alongada do corpo diminuiu, devido ao dobramento ventral do abdome por baixo da parte anterior do corpo. Em lagostas e camarões, o abdome é bem desenvolvido, estendido, e o exoesqueleto comumente fino e flexível. Já nos caranguejos o abdome é reduzido, encaixado debaixo do cefalotórax, o que resulta numa menor área de troca com o meio externo, reduzindo o influxo de água e efluxo de sais (Barnes, 1990; Schmidt-Nielsen, 1996). Desta forma, embora sejam encontrados na literatura dados referentes à osmolalidade, concentrações iônicas da hemolinfa e atividade da (Na,K)-ATPase branquial para camarões, lagostas e lagostins de água doce, comparações diretas com caranguejos dulcícolas devem ser consideradas com cuidado. Entretanto, pode-se sugerir que uma grande diferença de permeabilidade corporal possa explicar, em parte, a atividade 5 vezes maior determinada para o tecido branquial de *M. olfersi* mantido em água doce (Furriel et al., 2000), quando comparado a *D. pagei*, sabendo-se que este camarão mantém um gradiente hemolinfa/meio externo de 340 mosmol/Kg H₂O e 153 mmol L⁻¹ de íons Na⁺ (Lima et al., 1997; Freire et al., 2003).

A afinidade aparente por íons Mg²⁺ determinada para a (Na,K)-ATPase branquial de *D. pagei* é cerca de 6,5 vezes maior que a relatada para *P. potamios* (Tabela 11), o que pode ter algum valor adaptativo, uma vez que a concentração de Mg²⁺ na hemolinfa varia bastante entre os caranguejos dulcícolas já estudados (Tabela 12). Entretanto, a afinidade da enzima branquial de diferentes espécies de crustáceos por íons Mg²⁺ varia numa faixa mais estreita (0,28-4,0 mmol L⁻¹) e não parece estar correlacionada com a salinidade do habitat do animal (Tabela 11).

O valor da constante de afinidade aparente para Na⁺ encontrado para a enzima branquial de *D. pagei* é similar aos relatados para enzimas de vertebrados, que se encontram na faixa de 4 a 25 mmol L⁻¹ (Robinson & Pratap, 1991; Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Beaugé et al., 1997; Specht et al., 1997). Entre as enzimas branquiais de crustáceos estudadas até o momento, a afinidade aparente por íons Na⁺ é bastante variável e pode estar correlacionada com a salinidade do habitat do animal. Aparentemente, animais bem estabelecidos em água doce apresentam afinidades maiores por íons Na⁺, com valores de K_{0,5} variando entre 0,06 e 0,9 mmol L⁻¹. Já animais estuarinos e marinhos tendem a apresentar valores elevados de K_{0,5}, até cerca de 40 mmol L⁻¹. A partir destes dados, foi proposto que a seleção evolutiva de uma (Na,K)-ATPase com alta afinidade por íons Na⁺ no epitélio branquial seria uma adaptação importante para o estabelecimento de

diferentes espécies de crustáceos na água doce, contribuindo para o desenvolvimento de um sistema eficiente de captura de íons a partir do meio externo diluído (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005). Entretanto, existem exceções importantes, e valores em torno de $0,6 - 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ foram relatados para animais estuarinos. De uma maneira geral, o valor determinado para *D. pagei* pode ser considerado elevado, se comparado aos relatados para outros animais dulcícolas, sendo apenas levemente menor que aqueles determinados em nosso laboratório, empregando a mesma metodologia, para os siris *C. danae* (estuarino, Masui et al., 2002) e *C. ornatus* (marinho, Garçon, 2007), bem como para outras espécies estuarino/marinhas como *Macropipus puber* e *C. vitatus* (Leone et al., 2005). Considerando a presença de duas isoformas da enzima no tecido branquial de *D. pagei*, o valor de $K_{0,5}$ determinado para os íons Na^+ pode ser um valor médio entre as afinidades de duas isoformas, uma de alta e outra de menor afinidade, uma vez que não foi observada uma curva bifásica para a estimulação da atividade da enzima por estes íons.

A afinidade aparente das diferentes isoenzimas da (Na,K)-ATPase de vertebrados pelos íons K^+ encontra-se na faixa entre $0,5$ e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (Robinson & Pratap, 1991; Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Beaugé et al., 1997; Specht et al., 1997). Assim, a afinidade da enzima branquial de *D. pagei* por K^+ é similar àquelas descritas para a enzima de vertebrados. Ao contrário do observado para Na^+ , a afinidade aparente da enzima branquial de *D. pagei* por íons K^+ é substancialmente maior que a encontrada para espécies habitantes de meios de maior salinidade. Entre os resultados obtidos pelo nosso grupo, empregando a mesma metodologia, a afinidade da enzima de *D. pagei* por K^+ é similar à determinada para o camarão de água doce *M. amazonicum* (Santos et al., 2007) e cerca de 2,5 a 5 vezes maior que as determinadas para espécies habitantes de meios mais salinos. Desta forma, a afinidade da (Na,K)-ATPase branquial por íons K^+ pode estar mais relacionada ao habitat do animal que a afinidade por Na^+ . Esta possibilidade é coerente com o fato desta enzima, localizada na membrana basolateral do epitélio branquial, apresentar os sítios de ligação de K^+ voltados para a hemolinfa, enquanto os sítios para Na^+ estão voltados para o citosol das células branquiais, protegidos das variações de concentração iônica da hemolinfa. Desta forma, a atividade da enzima pode ser modulada diretamente pela concentração de K^+ na hemolinfa, e enzimas com maior afinidade por estes íons podem ser estimuladas em baixas concentrações, contribuindo para um mecanismo eficiente de captação de íons em meios diluídos.

As diferentes isoenzimas da (Na,K)-ATPase dos vertebrados mostram afinidades aparentes diferentes por ATP, Na^+ e K^+ (Levenson, 1994; Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Lopez et al., 2002; Geering, 2001). Essas diferenças são tecido-específicas e variam conforme o organismo em que a isoenzima é expressa, o que sugere que fatores pós-traducionais ou a composição da membrana também podem modular as propriedades cinéticas da (Na,K)-ATPase (Sweadner, 1989; Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Lopez et al., 2002). Entretanto, a relevância fisiológica desta grande diversidade de isoformas da (Na,K)-ATPase encontrada nos vertebrados parece não estar diretamente relacionada às diferenças cinéticas entre elas, que parecem ser muito pequenas, mas as interações isoforma-específicas com diversas proteínas regulatórias (Pressley et al., 2005).

Em contraste com os vertebrados, pouco se conhece sobre as isoformas da enzima nos crustáceos e suas diferenças cinéticas e funcionais. Entretanto, o fato de não terem sido observadas curvas bifásicas para a estimulação da atividade (Na,K)-ATPase da enzima de *D. pagei* pelo ATP, Na^+ e Mg^{2+} , apesar das evidências da presença de duas isoformas na fração microsomal do tecido branquial do animal, sugere que também entre os crustáceos diferentes isoenzimas possam ter afinidades muito semelhantes pelo substrato e íons.

A maioria dos crustáceos aquáticos é amoniotética, excretando amônia principalmente através do epitélio branquial. Segundo os modelos mais recentes, a excreção ativa de amônia através das brânquias dos crustáceos envolve a participação direta da (Na,K)-ATPase (Weihrauch et al., 2004; Freire et al., 2008). A estimulação sinérgica da atividade da enzima por NH_4^+ e K^+ , observada para várias espécies de caranguejos e ermitões tem sido relatada como um fator importante da sua resposta fisiológica a níveis elevados de amônia no meio externo, possivelmente relacionados ao seu hábito de enterrar-se no sedimento (Masui et al., 2002; Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2005a; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007). Já entre animais pelágicos, como os camarões dulcícolas *M. amazonicum* e *M. olfersi*, em que também se observa uma estimulação sinérgica da enzima branquial por NH_4^+ e K^+ , foi proposto que íons NH_4^+ da hemolinfa, translocados para o citosol das células branquiais pela (Na,K)-ATPase basolateral, poderiam ser trocados por íons Na^+ via um trocador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ apical, contribuindo para a captura de Na^+ em meios diluídos (Mangum & Towle, 1977; Armstrong et al., 1978, 1981; Furriel et al., 2004; Santos et al., 2007).

Curiosamente, a atividade (Na,K)-ATPase da enzima branquial de *D. pagei* mantido em água doce não foi estimulada sinergisticamente por íons NH_4^+ e K^+ . Entretanto, a presença de um dos íons no meio reacional provoca o aumento da afinidade aparente da enzima pelo outro em cerca de 3 vezes. Este fato sugere que haja pelo menos dois sítios de ligação distintos para estes íons na molécula da enzima. Possivelmente, a ligação de K^+ a um dos sítios de ligação provoca uma mudança conformacional no outro sítio, que resulta num aumento da afinidade aparente por NH_4^+ até valores próximos daqueles determinados para K^+ na ausência de NH_4^+ . Entretanto, em concentrações elevadas de K^+ , os íons NH_4^+ não podem ligar-se à enzima, como se observa pela ausência de estimulação por NH_4^+ em presença de K^+ em concentração 1 e 5 mmol L^{-1} . Já a ligação de NH_4^+ a um dos sítios da enzima parece ter efeito similar no que diz respeito ao aumento da afinidade do outro sítio por K^+ . Entretanto, mesmo em concentração saturante de NH_4^+ , os íons K^+ podem ligar-se à enzima. Fisiologicamente, esta característica cinética pode ser importante para garantir o transporte de ambos os íons pela enzima, mesmo em presença de concentrações relativamente elevadas do outro.

A inibição bifásica da atividade ATPase total pela ouabaína, inibidor específico da (Na,K)-ATPase, com estequiometria de ligação de 1:1 (Hansen, 2004), indica a presença de duas isoformas da enzima na fração microsomal em estudo, com diferentes afinidades pelo inibidor. Entre os vertebrados, está bem estabelecido que existam isoenzimas da (Na,K)-ATPase com alta (K_i na faixa do n mol L^{-1}) e baixa (K_i na faixa do μ mol L^{-1}) afinidades pela ouabaína (Blanco & Mercer, 1998; Segall et al., 2001, 2003). Assim, as isoformas de *D. pagei*, com seus valores de K_i de 6,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 101,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, parecem ser menos sensíveis a este inibidor.

Curvas monofásicas de inibição da atividade ATPase total pela ouabaína foram observadas para as frações microsomais do tecido branquial de *C. danae* recém coletado a 33‰ (Masui et al., 2003) e aclimatado à salinidade de 15‰ (Masui et al., 2006), para *M. olfersi* (Furriel et al., 2000), *M. amazonicum* (Santos et al., 2007), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007) e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006). Dentre as espécies de crustáceos estudadas até o momento, o valor de K_i para a ouabaína variou entre 0,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *C. maenas* e 790 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *E. sinensis*.

A curva bifásica de inibição da atividade ATPase total pelo ortovanadato reforça os resultados anteriores no sentido de demonstrar a existência de duas isoformas da (Na,K)-ATPase nas brânquias posteriores de *D. pagei*. Curvas monofásicas de inibição da atividade ATPase total por ortovanadato foram observadas para frações microsomais do tecido branquial de *C. danae*

recém coletado a 33 ‰ (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007), *M. olfersi* (Furriel et al., 2000), *M. amazonicum* (Santos et al., 2007), e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006).

A atividade residual de cerca de 24% da atividade ATPase total determinada em presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹ confirma a presença de outras ATPases, além da (Na,K)-ATPase, responsável por 76% da atividade total, no tecido branquial posterior de *D. pagei*.

Em conjunto, o efeito dos diferentes inibidores testados sobre a atividade ATPase insensível à ouabaína sugere a presença de Ca²⁺-ATPase, também presente em preparações do tecido branquial de outros crustáceos (Morris & Greenaway, 1992; Flik et al., 1994; Santos et al., 2007), bem como de F₀F₁-ATPase. Também foi identificada a presença de Na⁺ e/ou K⁺-ATPase nesta preparação, similarmente a resultados apresentados por outros autores para o tecido branquial de vários crustáceos (Moretti et al., 1991; Provérbio et al., 1991; Lima et al., 1997; Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007; Belli, 2008). Por fim, a inibição da atividade insensível à ouabaína por bafilomicina A₁ indica a presença de V-ATPase, o que motivou a caracterização posterior desta enzima.

A resposta da atividade (Na,K)-ATPásica presente no tecido branquial de *D. pagei* à aclimação a 21‰ por diferentes intervalos de tempo mostra a ocorrência de mecanismos de curto prazo, dada a diminuição de 3 vezes na atividade já após 1h de exposição, persistindo até 24h. Resultados similares foram relatados para outras espécies (Neufeld et al., 1980; Henry et al., 2002; Lucu & Flik, 1999; Tresguerres et al., 2003; Bianchini et al., 2008). A longo prazo, curiosamente se observa um aumento da atividade da enzima a níveis mais elevados que os encontrados em água doce, após 5 dias. Porém, após 10 dias atinge-se valores cerca de 5 vezes menores em relação a atividade da enzima no animal mantido em água doce, similarmente ao observado para inúmeras espécies de crustáceos já estudadas (Péqueux et al., 1995; Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005; Freire et al., 2008).

Acredita-se que, em água doce, fatores neuroendócrinos atuam de maneira coordenada possibilitando a manutenção de uma permeabilidade reduzida e alta atividade (Na,K)-ATPase branquial, levando a um gradiente osmótico e iônico elevado entre a hemolinfa e o meio externo (revisto por Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Freire et al., 2008). Quando *D. pagei* é transferido para água salobra (21‰), inicialmente a concentração de íons Na⁺ no meio externo é muito maior que a sua concentração na hemolinfa (190 mmol L⁻¹), resultando num influxo passivo de íons Na⁺, que se soma ao componente transportado ativamente para a hemolinfa via

(Na,K)-ATPase. Esse influxo leva a um aumento rápido da $[Na^+]$ na hemolinfa, que atinge 266,5 mmol L⁻¹ após 5h de exposição e atinge 379,5 mmol L⁻¹ já após 1 dia. Após 5 dias, a concentração atinge níveis constantes, ao redor de 390-400 mmol L⁻¹, próxima da do meio externo. Um comportamento similar foi relatado por Augusto et al. (2007), estudando a aclimação de *D. pagei* à salinidade de 25‰. A diminuição da atividade da (Na,K)-ATPase branquial é considerada um elemento importante da resposta osmorregulatória do animal, tanto a curto quanto a longo prazo, diminuindo a captação de Na⁺ do meio externo para a hemolinfa. Por meio dessas respostas osmorregulatórias coordenadas, o influxo total de íons Na⁺ diminui a um nível em que ocorre um equilíbrio entre sua excreção e influxo, resultando numa $[Na^+]$ na hemolinfa constante e praticamente isosmótica em relação ao meio externo (Augusto et al., 2007).

5.3. Atividade V-ATPase branquial de *D. pagei*.

O pH ótimo determinado para a atividade V-ATPase da fração microsomal de *D. pagei* é próximo àquele relatado para a enzima presente em pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* (Pan et al., 2007), bem como de outras fontes (Bandani et al., 2000). Em concordância com nossos resultados, Oliveira et al. (2004) relataram que a atividade V-ATPase do mexilhão *Anodonta cygnea* diminui consideravelmente quando o pH se aproxima de 8,0. Este resultado é relevante, uma vez que a atividade V-ATPase em tecidos de crustáceos tem sido determinada rotineiramente em pH 7,0 (Zare & Greenaway, 1998) ou 8,0 (Weihrach et al., 2004; Onken & Putzenlechner, 1995; Onken et al., 2000), embora outros autores tenham empregado pH ao redor de 7,5 (Tsai & Lin, 2007). Isto leva à dificuldade de comparação e interpretação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios.

Há poucos estudos sobre o efeito do pH do meio externo sobre a atividade V-ATPase em crustáceos (Pan et al., 2007). Segundo Rastogi & Girvin (1999), em pH ácido (≈ 5) a subunidade c apresenta uma conformação alterada, com o sítio protonável escondido. Desta forma, em pH ácido os sítios de ligação de prótons podem estar isolados, impedindo a troca de prótons (Muller et al., 2002).

A atividade V-ATPase específica da fração microsomal de *D. pagei* mantido em água doce determinada neste trabalho é cerca de 70 vezes maior que aquela estimada para as brânquias posteriores do mesmo animal, em água doce, por Weihrach et al. (2004). Esta discrepância pode ser atribuída a diferenças metodológicas, uma vez que aqueles autores mediram a atividade em pH

8,0 e empregaram o extrato bruto total do tecido branquial. Valores próximos ao encontrado para *D. pagei* foram relatados para homogeneizados totais das brânquias posteriores do caranguejo *E. sinensis* aclimatado à água doce (Onken et al., 2000; Onken & Putzenlechner, 1995). Em contraste, valores cerca de 7 vezes menores foram estimados para o caranguejo *U. formosensis* em salinidade de 5 ‰ (Tsai & Lin, 2007) e para o lagostim *Cherax destructor* (Zare & Greenaway, 1998).

Como já mencionado, não existem estudos de caracterização cinética da V-ATPase originária de crustáceos. A afinidade aparente da enzima branquial de *D. pagei* mantido em água doce para o ATP é cerca de 10 vezes menor que a observada para a V-ATPase de tecido renal de rato (Wada et al., 2005). Afinidades ainda maiores para o ATP, cerca de 30 vezes maiores que a encontrada para *D. pagei*, foram descritas para a V-ATPase do fungo *Thermus thermophilus* (Nakano et al., 2008).

A bafilomicina é um inibidor específico de V-ATPase que inibe a enzima em concentrações da ordem de nanomolar (Bowman & Bowman, 2005; Huss e Wieczorek, 2009). O valor da constante de inibição por bafilomicina encontrado para a V-ATPase branquial em *D. pagei* mantido em água doce ($K_i = 55,0 \text{ nmol L}^{-1}$) é maior que aqueles relatados para a enzima de alguns microorganismos, como *Saccharomyces cerevisiae* ($K_i = 0,04 \text{ nmol L}^{-1}$, Kane et al., 1989) e *Neurospora crassa* ($K_i = 4,6 \text{ nmol L}^{-1}$, Bowman et al., 2004). Entretanto, a inibição completa da atividade V-ATPase de *D. pagei* ocorreu com uma concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto para a enzima de embriões de *Artemia franciscana* foi necessária uma concentração acima de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Covi et al., 2005).

O efeito da exposição a diferentes salinidades sobre a atividade V-ATPase branquial dos crustáceos tem sido muito pouco estudado e ainda não está bem estabelecido. Os resultados deste trabalho mostram que a atividades V-ATPase da fração microsomal de tecido branquial posterior de *D. pagei* diminuiu acentuadamente em resposta à exposição à salinidade de 21‰. Apenas uma hora de exposição a esta salinidade é necessária para a diminuição da atividade da enzima em cerca de 3 vezes, chegando a 4 vezes após 24h, o que indica a atuação de mecanismos eficientes de regulação a curto prazo. A regulação rápida da atividade V-ATPase em brânquias de crustáceos tem sido pouco estudada. Segundo Onken et al. (2000), a atividade V-ATPase branquial do caranguejo *E. sinensis* mantido em água doce é modulada por fatores neuroendócrinos, aumentando cerca de 3 vezes em resposta a um aumento da concentração celular de AMPc. Estimulação dependente de AMPc e GMPc também foi relatada para a V-ATPase dos túbulos de Malpighi, em insetos (O'Donnel et al., 1996, Onken et al., 2000).

Curiosamente, a atividade V-ATPase nas frações microsomais de *D. pagei* é cerca de 2 vezes maior para um tempo de aclimação de 120h a 21‰, comparado a 24 h, embora 2 vezes menor que a estimada em água doce. Passadas 240 h, entretanto, a atividade volta aos baixos níveis observados entre 1 e 24h de exposição, sendo cerca de 3 vezes menor que a estimada para os animais mantidos em água doce, o que indica a ação de mecanismos de regulação a longo prazo. Similarmente aos nossos resultados, Pan et al. (2007) relataram uma diminuição da atividade V-ATPase em pós-larvas do camarão estuarino *L. vannamei* em resposta ao aumento de salinidade. Coerentemente ao observado neste trabalho, Tsai & Lin (2007) relataram também um aumento de cerca de 3 vezes na atividade V-ATPase branquial no caranguejo marinho *U. formosensis* em resposta à aclimação por 7 dias à salinidade de 5‰.

Alguns trabalhos sugerem que a regulação a longo prazo da atividade V-ATPase em resposta à alteração de salinidade envolve indução/inibição da síntese ou retenção de RNAm. Estudando o caranguejo *C. granulatus*, Luquet et al. (2005) relataram um aumento de 5 a 8 vezes nos níveis de RNAm para a subunidade B da enzima em resposta à exposição por 24h de animais mantidos em 30‰ à salinidade de 2‰, mantendo-se níveis 4 vezes maiores após 8 dias de aclimação a baixa salinidade. Analogamente, Faleiros (2007) relatou uma diminuição acentuada nos níveis de RNAm para a subunidade B no tecido branquial do camarão dulcícola *M. amazonicum* após transferência da água doce para um meio mais salino (25‰), atingindo níveis 3 a 4 vezes menores que os observados em água doce já após 5h, mantendo-se até 10 dias.

Entretanto, Tsai & Lin (2007) não observaram variação da abundância relativa de V-ATPase nas brânquias posteriores de *U. formosensis* em resposta à alteração de salinidade. Segundo estes autores, que estudaram 13 diferentes espécies de caranguejos, aquelas capazes de sobreviver em água doce apresentaram V-ATPase localizada preferencialmente na membrana apical das brânquias posteriores, enquanto naquelas incapazes de sobreviver neste ambiente, a enzima tem distribuição preferencialmente citoplasmática. Resultados similares mostraram distribuição citoplasmática da V-ATPase no caranguejo *C. maenas*, que tolera uma salinidade mínima de 8‰ (Weihrauch et al., 2001). Dados estes resultados, foi sugerido que, a longo prazo, a atividade da V-ATPase branquial poderia ser modulada por translocação de moléculas da enzima entre vesículas citoplasmáticas e a membrana apical, possivelmente envolvendo a associação/dissociação dos complexos V_0 e V_1 (Tsai & Lin, 2007).

Outro mecanismo que pode estar envolvido na regulação da atividade V-ATPase de crustáceos em resposta à aclimação a diferentes salinidades é a expressão de isoformas diferentes de subunidades da enzima, como descrito para V-ATPases de diferentes origens (Jefferies et al, 2008; Cipriano et al., 2008).

Neste trabalho, de maneira bastante inesperada, além da diminuição da atividade específica da V-ATPase branquial também foi observado um aumento acentuado da afinidade da enzima por ATP (12 vezes) e Mg^{2+} (3 vezes) em resposta à exposição dos animais à salinidade moderadamente elevada. Similarmente, ocorreu um aumento de cerca de até 190 vezes na afinidade da enzima pelo inibidor específico bafilomicina, retornando a valores similares aos determinados para a enzima de animais mantidos em água doce após 240h de aclimação.

É bem conhecido que o sítio de ligação da bafilomicina à V-ATPase encontra-se na subunidade c, e que a interação enzima-inibidor pode impedir a rotação do **anel c**, bloqueando o transporte de prótons (Bowman & Bowman, 2002; Bowman et al., 2004; Wang et al., 2005, Fernandes et al., 2006; Huss e Wieczorek, 2009). Já o ATP e o Mg^{2+} ligam-se ao domínio catalítico, V_1 (Crider et al., 2003, Landolt-Marticorena et al., 1999). Assim, pode-se sugerir que, em resposta à alteração de salinidade, ocorram mudanças conformacionais tanto em V_1 quanto V_0 , resultando numa maior exposição do sítio para bafilomicina e no aumento da afinidade por Mg^{2+} e ATP. Como estes aumentos de afinidade são observados já após 1h de exposição a 21‰, este mecanismo parece ser independente da expressão protéica e, portanto, não estaria relacionado com a possível expressão de isoformas diferentes de alguma das subunidades da enzima. Além disso, a diferença de afinidade por bafilomicina aparentemente é independente da dissociação do complexo V_0V_1 , uma vez que a dissociação causa a inibição completa da atividade catalítica (Jefferies et al., 2008).

A diminuição da atividade V-ATPase branquial de *D. pagei* em resposta à exposição a uma salinidade elevada é compatível com os mecanismos propostos para a atuação desta enzima no processo de captura ativa de Na^+ em crustáceos dulcícolas (Kirschner, 2004; Freire et al., 2008). É importante destacar que, após 10 dias de aclimação a 21‰, ainda se tem atividade V-ATPase detectável nas frações microsomais das brânquias posteriores do animal, possivelmente envolvida nas funções de regulação ácido-base e excreção de amônia (Weihrauch et al., 2001, 2004; Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008).

Os resultados obtidos para a aclimação de *D. pagei* por um período de 10 dias a salinidades entre 5 e 21‰ mostram também uma diminuição acentuada da atividade V-ATPase em resposta ao aumento da salinidade. Entretanto, com exceção da salinidade mais baixa (5‰) não se observou aumento da afinidade da enzima por bafilomicina, sugerindo que esta alteração seja limitada a tempos de aclimação mais curtos. Entretanto, também se verifica um aumento acentuado da afinidade da enzima por ATP e Mg^{2+} .

A separação de dois picos com atividade (Na,K)-ATPase após a centrifugação da fração microsomal das brânquias posteriores de *D. pagei* mantido em água doce em gradiente de sacarose é coerente com os dois picos de atividade K^+ -fosfatase observados quando a análise foi realizada empregando PNFF como substrato. De modo bastante interessante, estes picos apresentaram, além de atividade (Na,K)-ATPase, também atividade V-ATPase.

Estudos recentes mostraram que as brânquias posteriores de *D. pagei* são estruturalmente assimétricas, apresentando um epitélio proximal espesso e um epitélio distal fino (Onken & McNamara, 2002; Torres, 2006). A marcação ultracitoquímica da atividade (Na,K)-ATPase nas brânquias posteriores de *D. pagei* mostrou ainda a presença de (Na,K)-ATPase tanto na membrana basolateral do lado distal quanto na membrana basolateral do lado proximal do epitélio (Torres, 2006). Dessa forma, os dois picos das atividades K^+ -fosfatase e (Na,K)-ATPase observados na análise da preparação microsomal por centrifugação em gradiente de sacarose poderiam corresponder a membranas de diferentes origens, ou seja, dos lados proximal e distal do epitélio. O resultado obtido sugere, entretanto, também a presença de V-ATPase em membranas distintas, possivelmente as membranas apicais dos lados proximal e distal do epitélio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong DA, Chippendale D, Knight AW, Colt JE (1978) Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull* **154**: 15-31.
- Armstrong DA, Strange K, Crowe J, Knight A, Simmons M (1981) High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii* - uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen-compounds. *Biol. Bull* **160**: 349-365.
- Armbruster A, Svergun DI, Coskun U, Juliano S, Bailer SM & Gruber G (2004) Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution. *FEBS Letters* **570**:119-125.
- Augusto A, Greene LJ, Laure HJ & McNamara JC (2007) Adaptive Shifts in Osmoregulatory Strategy and the Invasion of Freshwater by Brachyuran Crabs: Evidence from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae) *J Exp ZOO* **307A**:688-698.
- Bageshwar UK, Taneja-Bageshwar S, Moharram HM & Binzel ML (2005) Two isoforms of the A subunit of the vacuolar H⁺-ATPase in *Lycopersicon esculentum*: highly similar proteins but divergent patterns of tissue localization. *Planta* (2005) **220**: 632-643.
- Bandani A, Amiri B, Butt TM & Weeks RG (2000) Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1510** : 367-377.
- Barnes DB (1990) In: *Zoologia dos invertebrados*. 4ª ed. Editora Roca. 1177 páginas.
- Baxter-Lowe LA, Guo JZ, Bergstrom EE & Hokin LE (1989) Molecular cloning of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit in developing brine-shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett* **257**: 181-187.
- Beaugé LA, Gadsbuey DC & Garrahan PJ (1997) (Na,K)-ATPase and related transport ATPases. Structure, mechanism and regulation. *Ann NY Acad. Sci.* **834**: 1-694.
- Becker S, Schneider H & Scheiner-Bobis G (2004) The highly conserved extracellular peptide, DSYG (893-896), is a critical structure for sodium pump function. *Eur J Biochem* **271** (19): 3821-3831.
- Belli NM (2008) Osmorregulação e excreção de amônia nos camarões palemonídeos: o papel da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KC, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RP (2009) Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **152(3)**:431-9.
- Berberian G & Beaugé L (1992) Phosphatase-activity and potassium-transport in liposomes with (Na⁺, K⁺)-ATPase incorporated. *Biochim Biophys Acta* **1103**: 85-93.
- Beyenbach KW (2005) Mechanism and regulation of secretory epithelial transport in the distal segment of Malpighian tubules. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **141**: S105-S105.
- Beyenbach KW & Wiczeorek H (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology* **209**: 577-589
- Bhattacharyya, K.K.; Bergstrom, E.E. & Hokin, L.E. (1990) Molecular-cloning of the β - subunit of the Na,K-atpase in the brine shrimp, *Artemia* - the cdna-derived aminoacid-sequence shows low homology with the β -subunits of vertebrates except in the single transmembrane and the carboxy- terminal domains *FEBS Lett* **269**: 233-238.
- Bilgalke T (1986) Charakterisierung der Na,K-ATPase und des NaH Austauschers aus dem ionotransportierenden Kiemenepithel der Wollhand Krabbe *Eriocheir sinensis*, PhP Dissertation, Frei Universität Berlin.
- Binachini A, Lauer MM, Nery LEM, Colares EP, Monserrat JM & Filho EAS (2007) Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **151**: 423-436.
- Blake-Palmer KG, Su Y, Smith AN & Karet FE (2007) Molecular cloning and characterization of a novel form of the human vacuolar H⁺-ATPase e-subunit: An essential proton pump component. *Gene*, **393(1/2)**: 94-100.
- Blanco, G (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Front. in Biosci.* **10**: 2397-2411.
- Blanco G & Mercer RW (1998) Isozymes of the (Na, K)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* **275**: F633-F650.
- Blum H, Beier H & Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Boxenbaum N, Daly SE, Javaid ZZ, Lane LK & Blostein R (1998) Changes in steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the NaK-ATPase α -subunit. *J Biol Chem* **273**: 23086-92.

- Bowman EJ & Bowman BJ (2005) V-ATPases as drug targets. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**: 431–435
- Bowman EJ, Graham LA, Stevens TH & Bowman BJ (2004) The Bafilomycin/Concanamycin Binding Site in Subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae** The Journal Of Biological Chemistry **279**: 33131–33138.
- Bowman BJ, McCall ME, Baertsch R & Bowman EJ (2006) A Model for the Proteolipid Ring and Bafilomycin/Concanamycin-binding Site in the Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. The Journal of Biological Chemistry **281**: 31885–31893.
- Bowman EJ, O'Neill FJ & Bowman BJ (2002) Mutations in subunit c of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 3965–3972.
- Bowman EJ, O'Neill FJ & Bowman BJ (1997) Mutations of *pma-1*, the Gene Encoding the Plasma Membrane H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*, Suppress Inhibition of Growth by Concanamycin A, a Specific Inhibitor of Vacuolar ATPases. The Journal of Biological Chemistry **272**: 14776–14786.
- Bowman EJ, Siebers A & Altendorf K (1988) Bafilomycins - A Class of Inhibitors of Membrane ATPases from Microorganisms, Animal-Cells and Plant-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 7972–7976.
- Castilho PC, Martins IA & Bianchini A (2001) Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **256**: 215–227.
- Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J & Forgac M (2008) Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**: 599–604.
- Chung KF, Lin HC (2006) Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **144**: 48–57
- Cornelius F (2008) Cholesterol-dependent interaction of polyunsaturated phospholipids with Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry*, **47**: 1652–1658.
- Corotto F S & Holliday C W (1996) Branchial (Na,K)-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* **113A**: 361–368.
- Covi JA & Hand SC (2005) V-ATPase expression during development of *Artemia franciscana* embryos: potential role for proton gradients in anoxia signaling. *Journal of Experimental Biology* **208**: 2783–2798.
- Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu CL, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelievre L & Geering K (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human isozymes. *J Biol Chem* **275**: 1976–1986.
- Crambert G, Li CM, Swee LK & Geering K (2004) FXYD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **279**: 30888–95.
- Crider BP & Xie XS (2003) Characterization of the Functional Coupling of Bovine Brain Vacuolar-type H⁺-translocating ATPase: Effect of divalent cations, phospholipids, and subunit H (Sfd)*. *J Biol Chem* **278**: 44281–44288.
- Crisma M, Peggion C, Baldini C, MacLean EJ, Vedovato N, Rispoli G & Toniolo C (2007) Crystal Structure of a Spin-Labeled, Channel-Forming Alamethicin Analogue. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**: 2047–2050.
- Croyle ML, Woo AL & Lingrel JB (1997) 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* **248**: 488–495.
- Da Silva, N Shum WW, El-Annan J, Păunescu TG, McKee M, Smith PJ, Brown D & Breton S (2007) Relocalization of the V-ATPase B2 subunit to the apical membrane of epididymal clear cells of mice deficient in the B1 subunit. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**: 199–210.
- Davis-Kaplan SR, Compton MA, Flannery AR, Ward DM, Kaplan J, Stevens TH & Graham LA (2006) PKR1 encodes an assembly factor for the yeast V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**: 32025–32035.
- Demenis MA, Furriel RP & Leone FA. (2003) Characterization of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase I activity in alkaline phosphatase-depleted rat osseous plate membranes: possible functional involvement in the calcification process. *Biochim Biophys Acta.* **1646**: 216–25.
- Dempski RE, Friedrich T & Bamberg E (2005) The β Subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase Follows the Conformational State of the Holoenzyme. *J Gen Physiol* **125**(5): 505–520.
- Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **55**: 170–171.
- D'Orazio SE & Holliday CW (1985) Gill (Na,K)-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab *Uca pugilator*. *Physiol Zool.* **58**: 364–373.
- Dostanic-Larson I, Lorenz JN, Van Huysse JW, Neumann JC, Moseley AE & Lingrel JB (2006) Physiological role of the α 1- and α 2-isoforms of the (Na,K)-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**(3):R524–8.

- Dostanic-Larson I, Van Huysse JW, Lorenz JN & Lingrel JB (2005) The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44):15845-50.
- Drapeau P & Blostein R (1980) Interactions of K^+ with (Na,K)-ATPase. Orientation of K^+ -phosphatase sites studied with inside-out red cell membrane vesicles. *J Biol Chem* **255**: 7827-34.
- Dröse S & Altendorf K. (1997) Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. **200**(Pt 1):1-8.
- Dröse S, Bindseil KU, Bowman EJ, Siebers A, Zeeck A & Altendorf K (1993) Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*. **32**(15):3902-6.
- Else PL, Wu BJ, Storlien LH & Hulbert AJ (2003) Molecular activity of (Na,K)-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Ann NY Acad Sci* **986**: 525-526.
- Faleiros RO (2007) Ultraestrutura, atividade enzimática (Na,K)-ATPásica e expressão de RNAm dos ionotransportadores (Na,K)-ATPase e V-ATPase nas brânquias do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) em função da capacidade osmorregulatória. Dissertação de mestrado. Biologia Comparada, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Fedosova NU, Cornelius F & Klodos I (1998) E2P phosphoforms of (Na,K)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and P_i by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochemistry* **37**: 13634-42.
- Fernandes F, Loura LMS, Fedorov A, Dixon N, Kee TP, Prieto M, Hemming MA (2006) Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**: 1777–1786
- Flik G, Verboost PM, Atsma W & Lucu C (1994) Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na^+ gradient. *J Exp Biol* **195**:109-22.
- Forgac M (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews* **8**: 917-929.
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EM, Torres AH & McNamara JC (2003) Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps *Comp Biochem Physiol A* **136**: 771-778.
- Freire CA, Onken H, & McNamara JC (2008) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol In press*. doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.008.
- Fuller W, Howie J, McLatchie LL, Weber RJ, Hastie CJ, Burness K, Pavlovic D & Shattock MJ (2009) FXD1 Phosphorylation *in vitro* and in adult rat cardiac myocytes: Threonine 69 is a novel substrate for protein kinase c. *Am J Physiol Cell Physiol* doi:10.1152/ajpcell.00523.2008.
- Furriel RPM, McNamara JC & Leone FA (2001) Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na,K)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp Biochem Physiol* **130A**: 665-676.
- Furriel RPM, McNamara JC & Leone FA (2000) Characterization of (Na,K)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp Biochem Physiol* **126B**: 303-315.
- Furriel RPM, Masui DC, McNamara JC & Leone FA (2004) Modulation of gill (Na,K)-ATPase activity by ammonium ions: Putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J Exp Zool* **301A**: 63-74.
- Gache C, Rossi B & Lazdunski M (1977) Mechanistic Analysis of the (Na,K)-ATPase using new pseudosubstrates. *Biochemistry* **16**: 2957-2965.
- Garçon DP (2007) Caracterização cinética da (Na,K)ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* ordway, 1863 (Crustácea, Portunidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM & Leone FA (2007) K^+ and NH_4^+ modulate gill (Na,K)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol* **147A**: 145-155.
- Gatto C, Arnett KL & Milanick MA (2007) Divalent Cation Interactions with (Na,K)-ATPase Cytoplasmic Cation Sites: Implications for the para-Nitrophenyl Phosphatase Reaction Mechanism. *J. Membrane Biol.* **216**: 49-59.
- Geering K (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg. Biomemb.* **33**: 425-438.
- Genovese G, Luchetti CG & Luquet CM (2004) Na^+/K^+ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Mar Biol* **144**: 111-118.
- Genovese G, Luquet CM, Paz DA, Rosa G. & Pellerano GN (2000) The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. *J Anatomy* **197**: 239-246, Part 2.
- Gibbs AG (1998) The role of lipid physical properties in lipid barriers. *Am. Zool.* **38**: 268–279.

- Glynn IM (1985) The Na⁺,K⁺-transporting adenosine triphosphatase. In: AN Martonosi (Ed) The enzymes of biological membranes. Plenum Press. New York **3**: 35-114. Plenum Press. New York.
- Gonçalves RR; Masui DC; McNamara JC; Mantelatto FLM; Garçon DP; Furriel RPM & Leone FA (2006) A kinetic study of the gill (Na, K)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal, hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **145** (3):346-56.
- Gordon JA (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Method Enzymol* **201**: 477-82.
- Gostimskaya IS, Grivennikova VG, Zharova TV, Bakeeva LE & Vinogradov AD (2003) In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Analyt Biochem* **313**: 46-52.
- Graham LA, Flannery AR & Stevens TH (2003) Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**:301–312.
- Greenaway P (1981) Sodium regulation in the freshwater/land crab *Holthuisana transversa*. *J Comp Physiol B* **142**: 451-6.
- Haines, TH (1994) Water transport across biological membranes. *FEBS Lett.* **346**: 115–122.
- Halperin J, Genovese G, Tresguerres M & Luquet CM (2004) Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulata* by dopamine and cAMP. *Comp. Biochem. Physiol. A* **139**: 103–109.
- Hanada H, Moriyama Y, Maede M & Futai M (1990) Kinetic studies of chromaffin granule H⁺-ATPase and effects of bafilomycin A1. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **170**: 873–878.
- Hansen O (2004) Quantification of α - subunit isoforms of (Na,K)-ATPase in rat resistance vessels. *Acta Pysiol Scand* **180**: 49-56.
- Harris RR (1975) Urine production rate and urinary sodium loss in the freshwater crab *Potamon edulis*. *J Comp Physiol* **96**:143-53
- Harris RR & Bayliss D (1988) Gill (Na,K)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na⁺ regulation. *Comp Biochem Physiol* **90A**: 303-308.
- Harris RR & Micallef H (1971) osmotic and ionic regulation in potamon-edulis, fresh-water crab from malta. comparative biochemistry and physiology **38** (4a): 769-& 1971
- Hasler U, Mordasini D, Bens M, Bianchi M, Cluzeaud F, Rousselot M, Vandewalle A, Feraille E & Martin PY (2002) Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells. *J Biol Chem.* **277**(12):10379-86.
- Hasler U, Crambert G, Horisberger JD & Geering K (2001) Structural and functional features of the transmembrane domain of the beta subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* **276**(19): 16356-16364.
- Heinonen JK & Lahti RJ (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem* **113**: 313-317.
- Henry RP, Garrelts EE, McCarty MM & Towle DW (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and (Na,K)-ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J Exp Zool* **292**: 595-603.
- Hermolin J & Fillingame RH (1998) H⁺-ATPase activity of Escherichia coli F1F0 is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F0 complex. *J Biol Chem.* **264**(7):3896-903.
- Hirata T, Iwamoto-Kihara A, Sun-Wada GH, Okajima T, Wada Y & Futai M (2003) Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J.Biol. Chem.* **278**: 23714–23719.
- Hirose GL, Gregati RA, Suzuki RB, Bonjovani JP & Taddei FG (2000) Desenvolvimento epimórfico em *Dilocarcinus pagei* da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP. XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Cuiabá-MT. Resumos, p. 104.
- Holliday CW (1985) Salinity-induced changes in gill (Na,K)-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *J Exp Zool* **233**: 199-208.
- Homareda H & Ushimaru M (2005) Stimulation of p-nitrophenylphosphatase activity of (Na,K)-ATPase by NaCl with oligomycin or ATP. *Febs Journal* **272**: 673-684.
- Horisberger JD (2004) Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump *Physiol* **19**: 377-88.
- Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoin S, Casanova J, Wildeman A, Bechoua S, Ausiello DA, Brown D & Marshansky V (2006) V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nature Cell Biol.* **8**: 124–136.
- Huss M & Wiczorek H (2007) Influence of ATP and ADP on dissociation of the V-ATPase into its V1 and VO complexes *FEBS Letters* **581**: 5566–5572.
- Huss M & Wiczorek H (2009) Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *The Journal of Experimental Biology* **212**: 341-346.

- Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M & Yokoyama K (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2312–2315.
- Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A & Forgac M (2005) Structure and Regulation of the V-ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, No. 6, **37**: 393–398
- Ivanov AV, Zhao H. & Modyanov NN (2000) Intramembrane moiety of (Na, K)-ATPase: Spatial structure probing by zero-length cross-linking. *Biophys J* **78**: 446.
- Jayasundara N, Towle DW, Weihrauch D & Spanings-Pierrot C (2007) Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *The Journal of Experimental Biology* **210**: 2070–2081.
- Jefferies K, Cipriano DJ & Forgac M (2008) Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**: 33–42.
- Jiang W, Hermolin J & Fillingame RH (2001) The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4966–4971.
- Jorgensen PL, Hakansson KO & Karlsh SJD (2003) Structure and mechanism of (Na,K)-ATPase: Functional sites and their interactions. *Ann Rev Physiol* **65**: 817–849.
- Jorgensen PL, Nielsen JM, Rasmussen JH & Pedersen PA (1998) Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in (Na,K)-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163**: 79–87.
- Kamemoto, F.I. (1991) Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zool Sci.* **8**: 827–833.
- Kane PM (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 177–191.
- Kane PM, Yamashiro CT, Stevens TH (1989) Biochemical characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Biol Chem* **264**(32): 19236–44.
- Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Rev Biochem.* **71**: 511–35.
- Karet FE (2005) Physiological and metabolic implications of V-ATPase isoforms in the kidney. *J Bioenerg Biomembr.* **37**(6): 425–9.
- Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers CW, Di Pietro A, Hoffbrand BI, Winiarski J, Bakkaloglu A, Ozen S, Dusunsal R, Goodyer P, Hulton SA, Wu DK, Skvorak AB, Morton CC, Cunningham MJ, Jha V & Lifton RP (1999) Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* **21**: 84–90.
- Karlsh SJ (2003) Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage. *Ann N Y Acad Sci.* **986**: 39–49.
- Kawamura M & Nagano K (1984) Evidence for essential disulfide bonds in the beta-subunit of (Na,K)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **774**: 188–192.
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T & Forgac (2001) Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa α -subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *M J. Biol. Chem.* **276**: 17941–17948.
- Kawasaki-Nishi S, Bowers K, Nishi T, Forgac M & Stevens TH (2001) The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase α subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **276**: 47411–47420.
- Keenan SM, DeLisle RK, Welsh WJ, Paula S & Ball Jr. WJ (2005) Elucidation of the (Na,K)-ATPase digitalis binding site. *J Mol Graphics Modelling* **23**: 465–475.
- Kirley TL (1990) Inactivation of (Na,K)-ATPase by beta-mercaptoethanol. Differential sensitivity to reduction of the three beta subunit disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **265**: 4227–4232.
- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* **207**: 1439–52.
- Kosiol B, Bigalke T & Graszynski K (1988) Purification and characterization of gill (Na,K)-ATPase in the freshwater crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque. *Comp. Biochem. Physiol. B* **89**: 171–177.
- Kurtz I & Balaban RS (1986) Ammonium as a substrate for (Na,K)-ATPase in rabbit proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **250**: (3) F497–F502 Part 2.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature (London)* **227**: 680–685.
- Landolt-Marticorena C, Kahr WH, Zawarinski P, Correa J & Manolsoon MF (1999) Substrate- and Inhibitor-induced Conformational Changes in the Yeast V-ATPase Provide Evidence for Communication between the Catalytic and Proton-translocating Sectors. *J Biol Chem* **274**: 26057–26064.
- Laughery MD, Todd ML & Kaplan JH (2003) Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**: 34794–34803.

- Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RPM & Borin IA (2005a) An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem Mol Biol Educ* **33**: 399-403.
- Leone FA, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Masui DC, Rezende LA, Gonçalves RR & Garçon DP (2005b). *Trends Comp. Biochem. Physiol. Trends Comp Biochem Physiol* **11**: 1-15.
- Leray, C., Chapelle, S., Duportail, G. & Florentz, A. (1984) Changes in fluidity and 22:6 (n₃) content in phospholipids of trout intestinal brush-border membrane as related to environmental salinity. *Biochim. Biophys. Acta* **778**: 233– 238.
- Levenson, R. (1994) Isoforms of the Na,K- ATPase – Family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **123**: 1-45.
- Lima AG, McNamara JC & Terra WR (1997) Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺/K⁺-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann 1836) (Decapoda Palaemonidae). *J Exp Marine Biol Ecol* **215**: 81-91.
- Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV & Moseley AE (2007) Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *J Bioenerg Biomembr* **39**: 385-389.
- Lockwood APM (1977) Transport and osmoregulation in Crustacea. In: *Transport of ions and water in animals*. Pp: 673-707. Academic Press. London.
- Lopez LB, Quintas LEM & Noel F (2002) Influence of development on Na⁺/K⁺-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol.* **131A**: 323-333.
- Lovett DL, Verzi MP, Burgents JE, Tanner CA, Glomski K, Lee JJ & Towle DW (2006) Expression profiles of (Na,K)-ATPase during acute and chronic hypo-osmotic stress in the blue crab *Callinectes sapidus* biological bulletin *Biol Bull.* **211** (1): 58-65.
- Lucu C & Flik G (1999) (Na⁺, K⁺)-ATPase and Na⁺, Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am J Physiol* **276**: 490–499.
- Lucu C & Towle DW (2003) (Na,K)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol* **135A**: 195-214.
- Lucu C, Pavicić J, Ivanković D, Pavicić-Hamer D, Najdek M (2008) Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **149(4)**:362-72.
- Lucu C, Devescov M, Skaramuca B & Kozul B (2000) Gill (Na,K)-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. *J Exp Mar Biol Ecol* **246**: 163-178.
- Luquet CM, Rosa GA, Ferrari CC, Genovese G & Pellerano G N (2000) Gill Morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus Granulatus* dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. *Crustaceana*, **73**: 53-67(15).
- Luquet CM, Genovese G, Rosa GA & Pellerano GN (2002a) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathys granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. *Mar. Biol.* **141**: 753-760.
- Luquet CM, Weihrauch D, Senek M & Towle DW (2005) Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* **208**: 3627-3636.
- Lutsenko S & Kaplan JH (1993) An essential role for the extracellular domain of the (NaK)-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochem.* **32**: 6737-43.
- Luvizotto-Santos R, Lee J, Branco Z, Bianchini A & Nery L (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* dana, 1851 (crustacea-grapsidae). *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol.* **295(2)**:200-5.
- Macías MT, Palmero I & Sastre L (1991) Cloning of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* α -subunit. *Gene* **105**: 197-204.
- Magalhães C, Bueno SLS, Bond-Buckup G, Valenti WC, Da Silva HLM, Kiyohara F, Mossolin EC & Rocha SS (2005) Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of Sao Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. *Biodivers. Conserv.* **14**: 1929-1945.
- Maeshima M & Yoshida S (1989) Purification and Properties of Vacuolar Membrane Protontranslocating Inorganic Pyrophosphatase from Mung Bean. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 20068-20073.
- Mangum, C. & Towle, D. (1977) Physiological adaptations to unstable environments. *Am Sci* **65** (1): 67-75
- Mallery CH (1983) A carrier enzyme basis for ammonium excretion in teleost gill: NH₄⁺ stimulated Na-dependent ATPase activit in *Opsanus beta*. *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**: 889-897.
- Malkus P, Graham LA, Stevens TH & Schekman R (2004) Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase. *Mol. Biol. Cell* **15**: 5075–5091.
- Manolson MF, Wu B, Proteau D, Taillon BE, Roberts BT, Hoyt MA & Jones EW (1994) STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H⁺-ATPas subunit Vph1p. *J. Biol. Chem.* **269**: 14064–14074.

- Manolson MF, Yu H, Chen Y, Yao Y, Li K, Lees RL & Heersche JNM (2003) The α_3 isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (10 nuclei) and small (5 Nuclei) osteoclasts, J. Biol. Chem. **278**: 49271–49278.
- Marshansky V & Futai F (2008) The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. Curr Opin Cell Biol. **20**(4):415-26.
- Mantel LH & Farmer LL (1983) Osmotic and ionic regulation. In: LH Mantel (Ed.) & DE Bliss (Ed.) The biology of crustacean. Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press New York **5**: 53-161.
- Martin DW (2005) Structure-function relationships in the Na⁺,K⁺-pump. Semin. Nephrol. **25**: 282-291.
- Masui DC (2006) Caracterização cinética da (Na,K)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial do siri *Callinectes danae* aclimatado a salinidade de 15 ‰. Tese de doutorado. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Masui DC, Furriel RPM & Mantelatto FLM (2005a) 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 **303A**: 294-307.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC & Leone FA (2003) Gill (Na,K)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K⁺-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. Comp Biochem Physiol **134B**: 631-640.
- Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM & Leone FA (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na,K)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. Comp Biochem Physiol **132**: 471-482.
- Mendonça NN, Masui DC, McNamara JC, Leone FA & Furriel RPM (2007) Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na,K)-ATPase α -subunit expression and K⁺-phosphatase activity. Comp Biochem Physiol **146**: 534-543.
- Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F & Kiss R (2007) Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochim Biophys Acta **1776**: 32–57.
- Mo JL & Greenaway P (2001) cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. Comparative. biochemistry and physiology a-molecular and integrative physiology **129**: 843-849.
- Mo JL, Devos P & Trausch G (1998) Dopamine as a modulator of ionic transport and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Crustacean Biol **18**: 442-448.
- Mo JL, Devos P & Trausch G (2003) Active absorption of Cl⁻ and Na⁺ in posterior gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*: Modulation by dopamine and camp. J. Crustac. Biol. **23**: 505-512.
- Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF & Martin-Vasallo P (2000) Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci. Reports **20**: 51-91.
- Moretti R, Martín M, Provérbio T, Provérbio F & Marin R (1991) Ouabain-insensitive Na-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. Comp Biochem. Physiol **98**: 623-626.
- Morris MA & Greenaway P (1992) High Affinity Ca²⁺ specific ATPase and (Na, K)-ATPase in the gills of a supralittoral crab *Leptograpsus Variegatus*. Comp Biochem Physiol **102A**: 15-18.
- Morris S & Van Aardt WJ (1998) Salt and water, and nitrogen excretion, in the amphibious African freshwater crab *Potamonautes warreni* in water and in air. J Exp Biol **201**: 883-93.
- Morth JP, Pedersen BP, Jensen MT, Sorensen T, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B & Nissen P (2007) Crystal structure of the sodium–potassium pump. Nature **450**: 1111-U19.
- Mottamal M & Lazaridis T (2006) Voltage-dependent energetics of alamethicin monomers in the membrane. Bioph. Chem. **122**, 50–57.
- Muller ML & Taiz L (2002) Regulation of the lemon-fruit V-ATPase by variable stoichiometry and organic acids. J Membr Biol. **185**(3):209-20.
- Murata T, Yamato I, Kakinuma Y, Shirouzu M, Walker JE, Yokoyama S & Iwata S. (2001) Ion binding and selectivity of the rotor ring of the Na⁺-transporting V-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. **105**(25):8607-12.
- Murata Y, Sun-Wada G-H, Yoshimizu T, Yamamoto A, Wada Y & Futai M (2002) α_4 , a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H⁺-ATPase subunit a. J. Biol. Chem. **277**: 36296–36303.
- Nakano M, Imamura H, Toei M, Tamakoshi, Yoshida M & Yokoyama (2008) ATP Hydrolysis and Synthesis of a Rotary Motor V-ATPase from *Thermus thermophilus*. The Journal of Biological Chemistry **283**: 20789–20796.
- Nery LE, Santos EA, Bianchini A & Gonçalves AA (1993) Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. Braz J Med Biol Res. **26**(12):1291-6.
- Nesher M, Shpolansky U, Rosen H & Lichstein D (2007) The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. L. Sciences **80**: 2093- 2107.

- Neufeld GJ, Holliday CW & Pritchard JB (1980) Salinity adaptation of gill (Na,K)-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J Exp Zool **211**: 215-224.
- Nishi T & Forgac M (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **3**: 94-103.
- Nishi T, Kawasaki-Nishi S & Forgac M (2003) Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms. J. Biol. Chem. **278**: 46396-46402.
- Oliveira PF, Lopes IA, Barrias C & Rebelo da Costa AM (2004) H⁺-ATPase of crude homogenate of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. Comp. Biochem. Physiol. **139**: 425-432.
- Onken H & McNamara JC (2002) Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. J Exp Biol **205**: 167-175.
- Onken H, Schöbel A, Kraft J & Putzenlechner M (2000) Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*: stimulation by eyestalk extract. J Exp Biol. **203**:1373-81.
- Onken H & Putzenlechner M (1995) A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. J Exp Biol. **198**(Pt 3):767-74.
- Onken H & Riestenpatt S (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperegulating brabs: Transport mechanisms and their regulation. Comp Biochem Physiol **119A**: 883-893.
- Palacios E, Bonilla A, Luna D & Racotta, IS (2004) Survival (Na⁺,K⁺)-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture **234**: 497-511.
- Pan LQ, Zhang LJ & Liu HY (2007) Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture **273**: 711-720.
- Parrie, L. & Towle, D.W. (2002) Induction of (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit mRNA in branchial tissues of the American lobster *Homarus americanus*. Integr. Comp. Biol. **42**: 1291-1291.
- Paula S, Tabet MR & Ball Jr WJ (2005) Interactions between Cardiac Glycosides and Sodium/Potassium-ATPase: Three-Dimensional Structure-Activity Relationship Models for ligand Binding to the E2-Pi Form of the Enzyme versus Activity Inhibition. Biochem. **44**: 498-510.
- Paunescu, TG Da Silva N, Marshansky V, McKee M, Breton S, Brown D (2004) Expression of the 56-kDa B2 subunit isoform of the vacuolar H⁺-ATPase in protonsecreting cells of the kidney and epididymis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **287**: C149-C162.
- Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. J Crust Biol **15**: 1-60.
- Peterson GL, Ewing RD, Hootman SR & Conte FP (1978) Large-scale partial purification and molecular and kinetic properties of the (Na,K)-activated adenosine triphosphatase from *Artemia salina* nauplii. J. Biol. Chem. **253b**: 4762-4770.
- Peterson, GL & Hokin LE (1981) Molecular weight and stoichiometry of the sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase subunits. J. Biol. Chem. **256**: 3751-3761.
- Pierre SV, Sottejeau Y, Gourbeau JM, Sánchez G, Shidyak A & Blanco G (2008) Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. Am J Physiol **294**: F859-F866.
- Porter RK, Hulbert AJ & Brand MD (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. Am. J. Physiol. **271**: 1550-1560.
- Postel U, Petrusch G, Riestenpatt S, Weihrauch D, Malykh J, Becker W & Siebers D (1998) Inhibition of (Na,K)-ATPase and of active ion-transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium. Marine Biol. **130**: 407- 416.
- Pressley TA, Duran MJ & Pierre SV (2005) Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the Na⁺,K⁺-pump. Frontiers Biosci **10**: 2018-U2 Suppl. S.
- Proverbio F, Marin R & Proverbio T (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. Comp Biochem Physiol **99A**: 279-83.
- Qi J, Wang Y & Forgac M (2007) The vacuolar (H⁺)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation. J Bioenerg Biomembr **39**:423-426.
- Qiu LY, Krieger E, Schaftenaar G, Swarts HGP, Willems PHGM, De Pont JJHHM & Koenderink JB (2005) Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of (Na,K)-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids. J. Biol. Chem. **280** (37): 32349-32355.
- Qiu LY, Swarts HGP, Tonk ECM, Willems PHGM, Koenderink JB & De Pont JJHHM (2006) Conversion of the low affinity ouabain-binding site of non-gastric H,K-ATPase into a high affinity binding site by substitution of only five amino acids. J. Biol. Chem. **281** (19): 13533-13539.
- Radkov R, Kharoubi-Hess S, Schaer D, Modyanov NN, Geering K & Horisberger JD (2007) Role of homologous ASP334 and GLU319 in human non-gastric H,K- and Na,K-ATPases in cardiac glycoside binding. Biochem Biophys Res Commun. **356**(1):142-6.

- Rastogi VK & Girvin ME (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* **402**: 263-269.
- Rathmayer M & Siebers D (2001) Ionic balance in the freshwater-adapted Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *J. Comp. Physiol.* **171B**: 271-281.
- Read SM & Northcote DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-g dye-binding assay for protein. *Analyt Biochem* **116**: 53-64.
- Rice WJ, Young HS, Martin DW, Sachs JR & Stokes DL (2001) Structure of (Na,K)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca^{2+} -ATPase in E1 and E2 states. *Biophys. J.* **80**: 2187-2197
- Ritov VB, Tverdislova IL, Yu T, Avakyan, Menshikova EV, Leikin YN, Bratkovskaya LB & Shimon RG (1992) Alamethicin-induced pore formation in biological-membranes. *Gen Physiol Biophys* **11**: 49-58.
- Robinson JD (1970) Interactions between monovalent cations and the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -dependent adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **139**: 17-27.
- Robinson JD & Pratap PR (1991) (Na, K)-ATPase: modes of inhibition by Mg^{2+} . *Biochim Biophys Acta* **1061**: 267-78.
- Rodrigues-Mascarenhas S, Oliveira AS, Amoedo ND, Affonso-Mitidieri OR, Rumjanek FD & Rumjanek VM (2009) Modulation of the Immune System by Ouabain Neuroimmunomodulation **1153**: 153-163.
- Rojas JD, Sennoune SR, Maiti D, Martínez GM, Bakunts K, Wesson DE & Martínez-Zaguilán R (2004) Plasmalemmal V-H(+)-ATPases regulate intracellular pH in human lung microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **320(4)**: 1123-32.
- Rossi B, Gache C & Lazdunski M (1978) Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal $(\text{Na}^+ \text{K}^+)$ -activated adenosinetriphosphatase. *Eur J Biochem* **85**: 561-570.
- Santos LCF, Belli NM, Augusto A, Masui DC, Leone FA, Mcnamara JC & Furriel RPM (2007) Gill (Na,K)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps : Species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression *Comp Biochem Physiol* **148A**: 178-188.
- Seelert H, Poetsch A, Dencher NA, Engel A, Stahlberg H & Müller DJ. 2000 Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature.* **405**: 418-9.
- Sennoune SR, Luo D & Martínez-Zaguilán R (2004) Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell Biochem Biophys.* **40(2)**: 185-206.
- Shainskaya A, Schneeberger A, Apell HJ & Karlsh SJ (2000) Entrance port for Na(+) and K(+) ions on (Na,K)-ATPase in the cytoplasmic loop between trans-membrane segments M6 and M7 of the alpha subunit. Proximity Of the cytoplasmic segment of the beta subunit. *J Biol Chem.* **275(3)**: 2019-28.
- Shaw, JH (1959) Salt and water balance in the East African freshwater crab, *Potamon niloticus* (M. Edw.). *J. Exp. Biol.* **36**: 157-179.
- Schein V, Wache Y, Etges R, Kucharski LC, vanWormhoudt A & Da Silva RSM (2004) Effect of hyperosmotic on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Lett.* **561**: 202-206.
- Schein V, Chittó ALF, Etges R, Kuscharski LC, Wormhoudt A & Da Silva RSM (2005b) Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* seasonal differences. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **316**: 203-212.
- Schleich CE, Goldemberg LA & López Mañanes AA (2001) Salinity dependent (Na,K)ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen Physiol Biophys.* **20(3)**: 255-66.
- Schmidt-Nielsen, K. (1996). *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. Editora Santos, 5ª edição. 600 páginas.
- Schubart CD, Diesel R & Hedges SB (1998) Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs *Nature* **393**: 363-5.
- Segall L, Daly SE, Boxenbaum N, Lane LK & Blostein R (2000) Distinct catalytic properties of the alpha 1, alpha 2 and alpha 3 isoforms of the rat (Na,K)-ATPase. *Biophys J* **78**: 456
- Siebers D, Winkler A, Leweck K & Madian A (1983) Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helv. Meer.* **36**: 303-312.
- Skou JC & Esmann M (1992) The (Na,K)-ATPase. *J. Bioenerg. Biom.* **24**: 249-261.
- Spanings-Pierrot, C.; Soyey, D.; Van Herp, F.; Gompel, M.; Skaret, G.; Grousset, E. & Charmantier, G. (2000) Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**: 340-350.
- Specht SC, Rodrigues C, Quiñónez L & Velazquez S (1997) Effect of high ionic strength and inhibitors of H,K-ATPase on the ouabain sensitive K-p-nitrophenylphosphatase activity in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Comp Biochem Physiol* **117B**: 217-224.
- Smith AN, Borthwick KJ & Karet FE (2002) Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* **297**: 169-177.

- Sommer MJ & Mantel LH (1991) Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab, *Carcinus maenas* (L). *Gen Comp Endocrinol.* **82**(3):364-8.
- Sun-Wada GH, Yoshimizu T, Imai-Senga Y, Wada Y, Futai M (2003) Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* **302**: 147-153.
- Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na^+, K^+ -ATPase *Biochim. Biophys. Acta.* **988**: 185-220.
- Tapper H & Sundler R (1995) Bafilomycin A1 inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H^+ -ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J Cell Physiol.* **163**(1):137-44.
- Taylor HH & Taylor EW (1992) Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: FW Harrison and AG Humas (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates, Decapod crustacean*. Wiley-Liss, New York **10**: 203-293.
- Tentes I & Stratakis E (1991) Partial purification and properties of (Na,K)-ATPase from *Potamon potamios*. *Comp Biochem Physiol* **100C**: 619.
- Therien AG, Nestor NB, Ball WJ, Ball WJ & Blostein R (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J of Biol Chem* **271**: 7104-7112.
- Tieleman DP, Breed J, Berendsen HJ, Sansom MS (1998) Alamethicin channels in a membrane: molecular dynamics simulations. *Faraday Discuss.* 1998;(111):209-23; discussion 225-46.
- Tierney, A.J.; Kim, T. & Abrams, R. (2003) Dopamine in crayfish and other crustaceans: Distribution in the central nervous system and physiological functions. *Microsc. Res. Tech.* **60**: 325-335
- Tomashek JJ & Brusilow WS (2000) Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J Bioenerg Biomembr.* **32**(5):493-500.
- Torres AH Jr (2006) Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (Crustacea, Decapoda) Tese de doutorado. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
- Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada GH, Wada Y & Futai M. (2003) From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H^+ -ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* **278**(24):22023-30.
- Toyoshima C & Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* **73**:269-92.
- Toyoshima C, Norimatsu Y, Iwasawa S, Tsuda T & Ogawa H (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 19831-19836.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *The national academy of sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354.
- Towle DW, Paulsen RS, Weihrauch D, Kordylewski M, Salvador C, Lignot JH & Spanings-Pierrot C (2001) (Na,K)-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of alpha-subunit mRNA and protein. *J Exp Biol* **204**: 4005-4012.
- Towle DW, Palmer GE & Harris JL (1976) Role of gill Na^+ , K^+ dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J. Exp. Zool.* **196** (3): 315-321.
- Tresguerres, M.; Onken, H.; Perez, A.F. & Luquet, C.A. (2003) Electrophysiology of posterior, Na/Cl absorbing gills of *Chasmagnathus granulatus*: rapid responses to osmotic variations. *J. Exp. Biol.* **206**: 619-626.
- Tsai JR & Lin HC (2007) V-type H^+ -ATPase and NaK-ATPase in the gills of 13 euryaline crabs during salinity acclimation. *J Exp Biol* **210**: 620-7.
- Turner N, Hulbert AJ & Else PL (2003) Molecular activity of sodium pumps in the kidney of mammals and birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **986**: 606-607
- Umata T, Moriyama Y, Futai M & Mekada E (1990) The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar type H^+ -ATPase. *J. biol. Chem.* **265**: 21940-21945.
- Vagin O, Turdikulova S & Tokhtaeva E (2007) Polarized membrane distribution of potassium-dependent ion pumps in epithelial cells: Different roles of the N-glycans of their beta subunits *Cell Biochem Biophys* **47**: 376-391.
- Vilsen B (1995) Mutant Glu-781 Ala of the rat kidney (Na,K)-ATPase displays low cation affinity and catalyses ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry* **34**: 1455-1463.
- Vonck J, von Nidda TK, Meier T, Matthey U, Mills DJ, Kühlbrandt W & Dimroth P (2002) Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na^+ -ATP synthase. *J Mol Biol.* **321**(2):307-16.
- Xiao YT, Xiang LX & Shao JZ (2008) Vacuolar H^+ -ATPase. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**(10):2002-6.
- Yamazaki A, Kaya S, Tsuda T, Araki Y, Hayashi Y & Taniguchi K (1994) An extra phosphorylation of (Na,K)-ATPase by para-nitrophenylphosphate (p-PNPP): evidence for the oligomeric nature of the enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**: 1360-1369.

- Wall SM (1996) Ammonium transport and the role of the (Na,K)-ATPase. *Miner Electrol Metal* **22**: 311-317.
- Wallick ET & Schwartz A (1988) Interaction of cardiac-glycosides with Na⁺, K⁺-ATPase. *Methods in enzymology* **156**: 201-213 1988.
- Warburg MR & Goldenberg S (1984) Water loss and haemolymph osmolarity of Potamon potamios, an aquatic land crab, under stress of dehydration and salinity *Comp. Biochem. Physiol.* **79A** : 451-5
- Ward DG & Cavieres JD (1993) Solubilized alpha-beta (Na,K)-ATPase remains protomeric during turnover yet shows apparent negative cooperativity toward atp. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **90** (11): 5332-5336.
- Wang Y, Inoue T & Forgac M, Subunit a of the yeast V-ATPase participates in binding of bafilomycin, *J. Biol. Chem.* **280**: 40481–40488.
- Wanson S, Péqueux A, Roer R (1984) Na⁺ regulation and (Na,K) ATPase activity in euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Leconte). *Comp. Biochem. Physiol.* **A 79**: 673–678.
- Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D & Geibel JP (2004). Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev* **84**: 1263-1314.
- Winkler, A., 1986. Effects of inorganic seawater constituents on branchial Na–K-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* **92**: 537–544.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D & Towle DW (2001) Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* **204**: 25-37.
- Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D & Towle DW (2002) Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *carcinus maenas*: participation of (Na,K)-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules *J. Exp. Biol.* **205**: 2765-2775.
- Weihrauch D, Morris S & Towle DW (2004a) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Bio* **207**: 4491-4504.
- Weihrauch D, McNamara JC, Towle DW & Onken H (2004b) Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J Exp Biol* **207**: 4623-4631.
- Weiner ID & Hamm LL (2007) Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Annu Rev Physiol*, **69**: 317-40.
- White PJ (1994) Bafilomycin A1 is a non-competitive inhibitor of the tonoplast H⁺-ATPase of maize coleoptiles. *J. exp. Bot.* **45**, 1397–1402.
- Whiteside G, Meek PJ, Ball SK, Dixon N, Finbow ME, Kee TP, Findlay JBC & Harrison MA (2005) Concanamycin and indolyl pentadieneamide inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase bind with high affinity to the purified proteolipid subunit of the membrane domain. *Biochemistry* **44**: 15024–15031.
- Whitney, JO (1974) The effect of external salinity upon lipid synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun and in the spider crab *Libinia emarginata* Leech. *Comp. Biochem. Physiol.* **49**: 433– 440.
- Wilder MN, Huong DTT, Atmomassono M, Tran TTH, Phu TQ & Yang WJ (2000) Characterization of (Na,K)-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **125A**: 377-388.
- Wilson JM, Laurent P, Tufts BL, Benos DJ, Donowitz M, Vogl AW & Randall DJ (2000) NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J. Exp. Biol.* **203**: 2279-2296.
- Zare S & Greenaway P (1998) 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.* **119A**: 739-745.
- Zeidel ML (1996) Low permeabilities of apical membranes of barrier epithelia: what makes watertight membranes watertight? *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **271**: F243–F245.

CURRICULUM VITAE

Kelly Cristina Silva Firmino

(09/11/1983) Natural de Barretos, SP.

1. Formação

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Bacharel em Química com atribuições tecnológicas, 2007.

2. Artigos publicados em revistas de circulação internacional

Belli NM, Faleiros RO, Firmino KC, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RP (2009). Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **152(3):431-9.**

3. Trabalhos científicos apresentados em congressos

V-ATPase activity in the posterior gills of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei* during salinity acclimation.

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- Sbbq, 2008, Águas de Lindóia-SP.

Two (Na⁺,K⁺)-ATPase isoenzymes coexist in the posterior gills of the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae).

7th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2007, Salvador-BA.

The colonization of freshwater by the Crustacea: biochemical characterization of the gill (Na⁺,K⁺)-ATPase of the hololimnetic red crab *Dilocarcinus pagei*.

XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- Sbbq, 2005, Águas de Lindóia-SP.