Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Caracterização cinética da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração
microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus*
Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae)**

Aluna: Daniela Pereira Garçon

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
– USP, como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM
CIÊNCIAS – Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* ordway, 1863 (Crustácea, Portunidae)

Daniela Pereira Garçon

Orientador: Francisco de Assis Leone

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Garçon, Daniela Pereira

Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* ordway, 1863 (Crustácea, Portunidae)
Ribeirão Preto, 2007.
106 pág.

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

Orientador: Leone, Francisco de Assis.

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

*“Que os nossos esforços desafiem as
impossibilidades. Lembrai-vos de
que as grandes proezas da história
foram conquistas do que parecia
impossível”.*

Charlie Chaplin.

Dedico

A minha mãe,

“Você deixou seus sonhos para que eu sonhasse.
Derramou lágrimas para que eu fosse feliz.
Você perdeu noites de sono para que eu dormisse tranqüila.
Acreditou em mim, apesar dos meus erros.
Jamais esqueça que eu levarei para sempre
Um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser...”

Augusto Cury

Ao meu pai

Você só me viu nos seus sonhos (no futuro que a vida lhe negou).
Eu o vejo na lembrança, no sorriso maroto, no andar apressado, que o
tempo não irá apagar.
Não tenho sua presença física, mas você é e sempre será um pai presente
na minha vida. Agradeço a Deus por ter tido você.

Prof. Dr. Francisco de Assis Leone,

Exemplo de verdadeiro mestre e cientista, que se destaca no meio universitário pela sua constante preocupação na formação de seus alunos. Agradeço por seu precioso tempo dedicado a minha formação, durante o período que estive em seu laboratório. Sinto-me honrada e feliz pelas oportunidades de aprendizado e constantes discussões científicas que me foram proporcionadas por ele, apesar das “divergências”. As palavras são poucas para expressar minha profunda gratidão. Muito obrigada.....

AGRADECIMENTOS

A *Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes*, pela incansável colaboração científica, atenção, carinho, compreensão e amizade dedicados a mim, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Medina Mantelatto, e seus alunos Ivana, Mariana, Douglas e outros, pela realização das coletas e colaboração científica na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara, pelas discussões científicas na realização deste trabalho.

Ao querido amigo e doutor Douglas Chodi Masui, pelo carinho e companheirismo dedicados em todos os anos de convivência.

Ao Sergio Vicente de Azevedo, pelo companheirismo, estando presente nos bons e maus momentos, sempre atencioso e compreensivo. Muito obrigado. Te adoro.

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

Aos colegas e amigos do laboratório Nara, Kelly Cristina, Luciana, Rúbia, Flávio, Carlos, Ana Lúcia, Sandra, Camila, Ricardo e aos colegas dos laboratórios de bioquímica do departamento de química, que conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

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

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

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

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

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

ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5'difosfato

ATP: adenosina 5'trifosfato

ATPase: adenosina 5'trifosfatase

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

Da: Dalton

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAF: 3-fosfogliceraldeído

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

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

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_I : constante de inibição

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

LDH: lactato desidrogenase

n_H : número de Hill

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NBT: nitroblue tetrazolium

Pi: fosfato inorgânico

PQ: piruvato quinase

PNFF: p-nitrofenilfosfato

PNFFase: p-nitrofenilfosfatase

Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

U: Unidade de atividade enzimática

v: velocidade inicial

V: velocidade máxima

RESUMO

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

Uma fração microsomal rica em $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi preparada por centrifugação diferencial a partir de um homogeneizado do tecido branquial de *Callinectes ornatus*. A centrifugação em gradiente de sacarose revelou a presença de um único pico de proteína com atividade ATPase, mas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes revelou a presença de várias bandas protéicas. O uso do anticorpo monoclonal $\alpha 5$ contra a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, revelou a presença de uma única banda proteica de 110 kDa com atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ hidrolisou o PNPP ($V = 52,0 \pm 2,0$ U/mg e $K_{0,5} = 1,1 \pm 0,1$ mM) através de interações sítio-sítio ($n_H = 1,6$). A modulação da enzima pelos íons magnésio ($V = 52,3 \pm 1,3$ U/mg e $K_{0,5} = 1,1 \pm 0,05$ mM), potássio ($V = 51,4 \pm 1,5$ U/mg e $K_{0,5} = 2,3 \pm 0,1$ mM) e amônio ($V = 56,7 \pm 2,6$ U/mg e $K_{0,5} = 9,8 \pm 0,4$ mM) ocorreu através de interações sítio-sítio. Os íons sódio atuaram como inibidores da atividade K^+ -fosfatase da enzima ($K_i = 1,7 \pm 0,1$ mM) e a ouabaína inibiu cerca de 80% a atividade PNPPase independentemente da presença de íons amônio.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ hidrolisou o ATP de acordo com cinética de Michaelis-Menten, com $K_M = 0,16 \pm 0,01$ mM e $V = 116,3 \pm 5,6$ U/mg, enquanto a modulação da atividade da enzima pelos íons magnésio ($V = 111,0 \pm 5,4$ U/mg e $K_{0,5} = 0,54 \pm 0,03$ mM), sódio ($V = 110,6 \pm 5,3$ U/mg e $K_{0,5} = 6,3 \pm 0,3$ mM), potássio ($V = 116,0 \pm 5,5$ U/mg e $K_{0,5} = 1,5 \pm 0,1$ mM) e amônio ($V = 173,3 \pm 5,4$ U/mg e $K_{0,5} = 5,4 \pm 0,3$ mM) ocorreram através de interações sítio-sítio. Também foi observado que na presença de concentrações crescentes de íons amônio, a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo íons potássio acarretou um aumento de 50% na atividade específica da enzima. A ouabaína inibiu cerca de 86% a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ com $K_i = 74,5$ μM , sugerindo a presença de 14% de fosfatases e/ou outras ATPase contaminantes.

Este é o primeiro trabalho onde se observa uma estimulação sinérgica da atividade K-fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de crustáceo pelos íons potássio e amônio. Os resultados cinéticos obtidos para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase branquial de *Callinectes ornatus*, analisados em conjunto com os já descritos para outras espécies de crustáceos poderão abrir novas perspectivas em relação ao papel dessa enzima na adaptação fisiológica-bioquímica, bem como para a sobrevivência desses animais em diferentes ambientes.

ABSTRACT

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

A (Na⁺, K⁺)-ATPase-rich microsomal fraction was prepared by differential centrifugation from *Callinectes ornatus* homogenized branchial tissue. The sucrose gradient sucrose centrifugation showed the presence of a single protein peak with ATPase activity, and SDS-PAGE revealed the presence of several proteins bands. The use of the α 5 monoclonal antibody, against the α subunit, revealed the presence of a unique protein band of 110 kDa corresponding to the (Na⁺, K⁺)-ATPase.

(Na⁺, K⁺)-ATPase hydrolyzed the PNPP ($V = 52.0 \pm 2.0$ U/mg and $K_{0.5} = 1.1 \pm 0.1$ mM) through the site-site interactions ($n_H = 1.6$). The modulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by magnesium ($V = 52.3 \pm 1.3$ U/mg and $K_{0.5} = 1.1 \pm 0.05$ mM), potassium ($V = 51.4 \pm 1.5$ U/mg and $K_{0.5} = 2.3 \pm 0.1$ mM) and ammonia ions ($V = 56.7 \pm 2.7$ U/mg and $K_{0.5} = 9.8 \pm 0.4$ mM) followed cooperative kinetics. However, sodium ions inhibited PNPPase activity of (Na⁺, K⁺)-ATPase with $K_i = 1.7 \pm 0.1$ mM. Ouabain also inhibited up to 80% the total activity PNPPase independent of the presence of ammonium ions.

The hydrolysis of ATP by (Na⁺, K⁺)-ATPase followed Michaelis-Menten kinetics with $K_m = 0.16 \pm 0.01$ mM and $V = 116.3 \pm 5.6$ U/mg, while enzyme modulation by magnesium ($V = 111.0 \pm 5.4$ U/mg and $K_{0.5} = 0.54 \pm 0.03$ mM), sodium ($V = 110.6 \pm 5.3$ U/mg and $K_{0.5} = 6.3 \pm 0.3$ mM), potassium ($V = 116.0 \pm 5.5$ U/mg and $K_{0.5} = 1.5 \pm 0.1$ mM) and ammonium ions ($V = 173.3 \pm 8.5$ U/mg e $K_{0.5} = 5.4 \pm 0.3$ mM) occurred through site-site interactions. Interestingly, the stimulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase activity by potassium ions in the presence of increasing concentration of ammonium ions to K⁺ resulted in a 50% higher specific activity. Ouabain inhibited approximately 86% the activity (Na⁺, K⁺)-ATPase with ($K_i = 74.5$ μ M), suggesting the presence of about 14% of phosphatases and/or other ATPases.

This is the first work showing synergistic stimulation of crustacean (Na⁺, K⁺)–ATPase by potassium and ammonium ions when PNPP is used a substrate. The results reported herein for *Callinectes ornatus* branchial (Na⁺, K⁺)–ATPase might open new perspectives concerning the physiological adaption and the survival of these animals in different environmental.

ÍNDICE

	Pág.
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 A (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase.	1
1.2 O siri <i>Callinectes ornatus</i> .	10
2.0 Objetivos.	16
2.1 Objetivos gerais.	17
2.2 Objetivos específicos.	19
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Coleta dos animais.	22
3.2 Dissecção das brânquias.	22
3.3 Preparação da fração microsomal do tecido branquial.	22
3.4 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.	23
3.5 Determinação da atividade PNPPase.	23
3.6 Determinação da atividade ATPase .	24
3.7 Tratamento dos sistemas de associação PQ/LDH e FGQ/GAFDH.	25
3.8 Preparação da solução de ortovanadato.	25
3.9 Preparação da solução de gliceraldeído 3-fosfato.	25
3.10 Dosagem de proteína.	26
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida.	26
3.12 Western blotting	26
3.13 Tratamento dos dados cinéticos.	26
4.0 RESULTADOS	27
5.0 DISCUSSÃO	67
5.1 Estudo da fração microsomal.	68
5.2 Caracterização da atividade PNPPase.	69
5.3 Caracterização da atividade ATPase.	72
6.0 BIBLIOGRAFIA	81
7.0 CURRICULUM VITAE	91

INTRODUÇÃO

1.1. – A (Na⁺,K⁺)-ATPase

A (Na⁺,K⁺)-ATPase, ou bomba de sódio (E.C.3.6.1.37), é uma proteína integral, responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio através da membrana plasmática da maioria dos eucariontes superiores. A energia para esse trabalho é obtida a partir da hidrólise do fosfato terminal da molécula de ATP, transportando 3 íons Na⁺ para o meio extracelular e 2 íons K⁺ para o meio intracelular (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). Esse transporte estabelece um gradiente eletroquímico, essencial para a manutenção dos potenciais de membrana responsáveis pela atividade excitável de células musculares e nervosas, proporcionando também a regulação do volume e pH intracelulares e a captação de nutrientes extracelulares, como a glicose, aminoácidos, vitaminas e outros compostos essenciais às células (Crambert et al., 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001; Horisberger, 2004; Martin, 2005).

O ciclo reacional da (Na⁺,K⁺)-ATPase é caracterizado pela formação de um intermediário fosforilado (ligação do fosfato terminal da molécula de ATP com um resíduo de aspartato da proteína), o que a classifica como uma ATPase do tipo P. Contudo, como as ATPases do tipo P, são divididas em subfamílias, a (Na⁺,K⁺)-ATPase é uma P₂-ATPase, por transportar cátions de metais alcalinos (Crambert et al., 2000; Kaplan, 2002).

Essa proteína de membrana é um heterodímero, constituído pelas subunidades α e β . A subunidade α contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular da ordem de 110 kDa (Hu & Kaplan, 2000; Donnet et al., 2001; Kaplan 2002). Nela estão localizados os sítios de ligação do ATP e de fosforilação, bem como os aminoácidos essenciais para a ligação do Na⁺ e K⁺ (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003).

A subunidade α apresenta as extremidades N- (Felsenfeld & Sweadner, 1988) e C- terminal (Ning et al., 1993) localizadas no meio intracelular e 10 segmentos transmembrana (**Painel 1**), que dão origem às alças intra- e extracelulares (Sweadner & Donnet, 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). Os segmentos transmembranas são nomeados a partir da extremidade N-terminal. Estudos de mutação sítio-dirigida têm sido usados para determinar quais são os aminoácidos importantes para o funcionamento da enzima. No segmento transmembrana M₁ estão presentes duas glicinas, Gli⁹³ e Gli⁹⁴, que são importantes para a interação com o Na⁺ e K⁺ e também

favorecem a forma E_2P , no equilíbrio E_1P-E_2P (Einholm et al., 2005). Para o transporte de Na^+ , os aminoácidos Thr⁷⁷⁴, Val⁹²⁰, Glu⁹⁵⁴, localizados respectivamente nos segmentos transmembranas M₅, M₈ e M₉ são importantes, já que a variação desses aminoácidos modifica a afinidade aparente da enzima para este íon (Imagawa et al., 2005). Os primeiros quatro segmentos dão origem a uma alça citoplasmática pequena entre M₂-M₃, que é responsável pela regulação da atividade da enzima (Daly, Blostein and Lane, 1997). A alça extracelular entre M₃-M₄ possui dois resíduos altamente conservados Glu³¹⁹ e Leu³¹⁸, que parecem estar envolvidos na seletividade a cátions, principalmente ao potássio (Eguchi et al., 2005). Entre os segmentos M₄ e M₅ existe uma grande alça citoplasmática que é formada por cerca de 430 resíduos de aminoácidos, que representa 30% da cadeia polipeptídica, onde se localiza o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional e o sítio de ligação do ATP (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Entre os segmentos M₇ e M₈ existe uma grande alça extracelular, identificada como uma importante região de contato com a subunidade β , principalmente os aminoácidos intermediários a 63-123 (Kaplan, 2002; Laughery, 2003).

Painel 1 - Topologia de membrana das cadeias α e β da (Na^+,K^+) -ATPase dos vertebrados. (Modificado de Horisberger, 2004).

A subunidade α está organizada na forma de três domínios globulares distintos, voltados para a região citoplasmática e conectados por hastes estritas a um domínio transmembrana de forma aproximadamente cilíndrica e compacta (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). O domínio atuador, A, constituído pelo segmento N-terminal e a alça citoplasmática que une os segmentos transmembranas M_2 - M_3 , contém o motivo TGES que está envolvido no processo de desfosforilação. O domínio de fosforilação, P, localizado na alça citoplasmática entre os segmentos transmembranas M_4 - M_5 contém o motivo DKTGT com o resíduo de aspartato para o qual o fosfato do ATP é transferido transitoriamente. O domínio de ligação do nucleotídeo N, também localizado na mesma alça citoplasmática que o domínio P, contém o sítio de ligação do ATP.

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

A subunidade γ é um proteolípídeo de cerca de 60 resíduos de aminoácidos e M_r ao redor de 7 kDa que se associa à (Na^+, K^+) -ATPase de maneira tecido-específica nos vertebrados (Therien & Blostein, 2000; Füzesi et al., 2005). Ele faz parte de uma família de proteínas denominadas FXYD (Horisberger, 2004; Füzesi et al., 2005; Jones et al., 2005), caracterizadas por apresentar apenas um único segmento transmembrana (**Painel 1**). Sua extremidade N-terminal está voltada para o meio extracelular e considera-se que essa subunidade seja uma terceira subunidade da enzima (Béguin et al., 1997; Blanco & Mercer, 1998). Evidências recentes indicam que ela não é um componente essencial da (Na^+, K^+) -ATPase, embora atue como um regulador, modulando a afinidade da enzima pelo ATP bem como para os íons potássio e sódio (Crambert et al., 2004; Geering et al., 2003; Li et al., 2004; Garty & Karlish, 2005).

O heterodímero $\alpha\beta$ é a unidade funcional da enzima, pois é sabido que, a subunidade β estabiliza o enovelamento correto da subunidade α (Geering, 2001; Jorgensen et al., 2003). Na ausência da subunidade β , a subunidade α é retida no

retículo endoplasmático, o que comprova o papel de chaperona exercido pela subunidade β (Laughery et al., 2003). Tem sido sugerido também que a subunidade β esteja intimamente envolvida com o transporte ativo de Na^+ e K^+ , uma vez que desestabiliza a oclusão do potássio e altera a afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por esses íons (Gatto et al., 2001; Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Martin, 2005). As ligações dissulfeto presentes na subunidade β são importante para o translocamento do heterodímero, porém não afetam sua formação (Laughery et al., 2003).

Até o momento, foram identificadas quatro isoformas para a subunidade α e três para a subunidade β da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados. (Blanco & Mercer, 1998; Blanco et al., 1999; Mobasheri et al., 2000; Pressley et al., 2005). Isoformas homólogas da subunidade α dos vertebrados ainda não foram descritas nos invertebrados (Emery et al., 1998), além disso, mesmo com a identificação de duas isoformas nos camarões *Artemia salina* e *Artemia franciscana*, nenhuma corresponde às descritas nos vertebrados. (Macías et al., 1991; GarciaSaez et al., 1997; Jorgensen & Pedersen, 2001). Com relação à subunidade β apenas uma isoforma foi relatada para os crustáceos e nenhuma isoforma da subunidade γ foi observada para esses animais (Lucu & Towle, 2003). A combinação dessas isoformas dá origem a uma série de isoenzimas com propriedades cinéticas distintas em relação à estimulação por Na^+ , K^+ e ATP (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000; Mobasheri et al., 2000). A relevância fisiológica dessa diversidade de isoformas ainda não está esclarecida ainda (Pressley et al., 2005).

Atualmente, o modelo mais aceito para explicar o ciclo catalítico da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ está representado no **Painel 2**. O modelo é baseado em transições conformacionais entre dois estados principais da enzima denominados E_1 e E_2 . A forma E_1 expõe o sítio de ligação do cátion para a região intracelular, possuindo alta afinidade por Na^+ e ATP, já a forma E_2 , tem alta afinidade por K^+ extracelular. (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004).

Na etapa ① o ATP se liga a forma $E_2(2\text{K})$ com baixa afinidade aparente, e dois K^+ estão ocluídos no interior da enzima (Nielsen et al., 1998; Jorgensen et al., 2003; Post, 1999). A ligação da molécula de ATP ao seu sítio favorece a mudança conformacional para a forma $E_1\text{ATP}2\text{K}$, desocluiendo os dois K^+ (etapa ②) e reorganizando o sítio de ligação do cátion para o lado citoplasmático.

Painel 2 – Modelo proposto para o mecanismo da reação de hidrólise do ATP pela $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Modificado de Kaplan, 2002).

Na etapa ③ ocorre a liberação dos dois K^+ para a região citoplasmática, seguida inicialmente pela ligação de dois Na^+ , dando origem à forma $\text{E}_1\text{ATP}2\text{Na}$ (não mostrada). A ligação do terceiro Na^+ citoplasmático (etapa ④) promove um rearranjo dos segmentos transmembrana da subunidade α , que é propagado para os domínios citoplasmáticos, posicionando adequadamente o resíduo de aspartato que será fosforilado pelo ATP (Jorgensen et al., 1998b; Domaszewicz & Apell, 1999; Rice et al., 2001). A fosforilação da enzima promove a liberação de uma molécula de ADP, originando a forma $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na})$ com os Na^+ ocluídos (etapa ⑤). Esta forma sofre uma transição conformacional liberando um Na^+ para o meio extracelular (etapa ⑥). A desocclusão dos dois íons sódio restantes provoca a liberação desses íons para fora da célula (etapa ⑦). Finalmente, dois K^+ se ligam à forma E_2P (etapa ⑧), catalisando a desfosforilação da enzima (etapa ⑨), que retorna à forma $\text{E}_2(2\text{K})$, reiniciando assim o sítio catalítico.

Embora a hidrólise de ATP e o transporte de cátions sejam atividades coordenadas da (Na⁺,K⁺)-ATPase, elas ocorrem em domínios diferentes da molécula. Como já foi descrito, o sítio de ligação do ATP à enzima e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o sítio catalítico estão localizados nos domínios citoplasmáticos N e P, respectivamente (Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen, 2001; Jacobsen et al., 2002). Já os resíduos de aminoácidos importantes para a coordenação dos cátions localizam-se no interior dos segmentos transmembrana M₄, M₅, M₆ e M₈ (Jorgensen & Pedersen, 2001; Koenderink et al., 2000; Guennoun & Horisberger, 2002; Ogawa & Toyoshima, 2002). Acredita-se que existe um único sítio para a ligação de Na⁺ e K⁺ (Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen, 2003; Sanchez & Blanco, 2004; Eguchi et al., 2005). A conversão de um sítio altamente específico para o K⁺, na forma E₂, para um específico para Na⁺ na forma E₁, está acoplado a mudanças no número de grupos coordenadores e nas distâncias existentes entre eles, possibilitando que um mesmo sítio de ligação se ajuste a íons com diferentes raios atômicos (raio atômico do Na⁺ - 1,9Å; raio atômico do K⁺ - 2,7Å). Esse ajuste parece ocorrer através de rotações, inclinações e torções das hélices transmembrana (Mense et al., 2002; Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen, 2001). Com relação ao terceiro íon Na⁺ transportado, existem evidências de que ele interaja com a conformação E₁ATP2Na em um sítio específico, distinto do mencionado anteriormente (Apell et al., 1998; Schneeberger & Apell, 2001; Hakansson & Jorgensen, 2003).

A oclusão dos íons é fundamental para que no ciclo reacional da (Na⁺,K⁺)-ATPase não ocorra hidrólise de ATP sem o transporte simultâneo de íons através da membrana. A fase inicial ocorre com o reconhecimento do íon e posteriormente ocorre a mudança conformacional para o estado ocluído (Schneeberger & Apell, 1999, 2001; Holmgren et al., 2000; Kaplan, 2002).

O mecanismo de bombeamento dos íons pela (Na⁺,K⁺)-ATPase é fundamentado em estruturas de alta resolução encontradas para a Ca²⁺-ATPase em diferentes estados conformacionais e pode ser utilizado para a (Na⁺,K⁺)-ATPase devido ao alto grau de homologia entre as P-ATPases (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Apell, 2004; Horisberger, 2004). A validade dessas conformações atribuídas a (Na⁺,K⁺)-ATPase vem sendo reforçada por dados experimentais obtidos por outras metodologias (para revisão veja Horisberger, 2004). De acordo com o modelo proposto por Horisberger (2004), (**Painel 3**), a enzima na forma E₁ATP apresenta seus

domínios citoplasmáticos A, N e P afastados (etapa ①). Após a ligação dos três Na^+ extracelulares aos seus sítios com alta afinidade, ocorre uma mudança de conformação importante. Após uma grande rotação o domínio N posiciona o fosfato γ do ATP próximo ao sítio de fosforilação (etapa ②). A hidrólise do ATP é acoplada a transferência do fosfato γ para o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional, dando origem à forma $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na})$ (etapa ③). Simultaneamente o domínio A também sofre rotação de aproximadamente 30° , (etapa ③), induzindo uma mudança conformacional no interior do domínio transmembrana, resultando no fechamento do canal transiente e oclusão dos Na^+ ligados à enzima (Toyoshima & Mizutani, 2004; Sorensen et al., 2004). Durante o ciclo catalítico, este estado de alta energia $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na})$ é rapidamente convertido em $\text{E}_2\text{P}(2\text{Na})$ (etapa ④). Concomitantemente à conversão de E_1 para E_2 ocorre a exposição dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular. A redistribuição dos grupos diminui a afinidade pelo Na^+ e a liberação do primeiro Na^+ para o meio extracelular provoca um rearranjo do canal liberando os outros dois Na^+ (etapa ⑤). O sítio de ligação de cátions da forma E_2P é então ocupado por dois K^+ extracelulares (etapa ⑥), resultando na desfosforilação do domínio P e na oclusão dos íons ligados, devido ao fechamento do canal transiente voltado para o meio extracelular (etapa ⑦). A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N (etapa ⑧) promove o afastamento dos domínios N e P, que induz uma movimentação dos segmentos transmembrana da molécula, resultando na abertura do canal transiente e liberando o acesso aos sítios de ligação de cátions do meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, traduzido pela diminuição da afinidade da enzima pelo K^+ , caracteriza a transição conformacional da forma $\text{E}_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $\text{E}_1\text{ATP}(2\text{K})$ (etapa ⑨). A próxima etapa (⑩) é a liberação dos K^+ para o citosol, finalizando o ciclo de bombeamento (Horisberger, 2004). Apesar dos recentes avanços, este mecanismo não está totalmente compreendido (Capendeguy & Horisberger, 2005; Gatto et al., 2005).

A $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ é especificamente inibida por esteróides cardiotônicos, dentre eles o mais representativo é a ouabaína, que se liga com alta afinidade à forma E_2P . A região de interação enzima-ouabaína parece estar localizada nas alças $\text{M}_3\text{-M}_4$ e $\text{M}_5\text{-M}_6$ da subunidade α , embora outros resíduos espalhados pela superfície extracelular também possam contribuir para a interação (Croyle et al., 1997;

Koenderink et al., 2000; Middleton et al., 2000; Post, 2003; Crambert et al., 2004). Como todas as P-ATPases, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase também é inibida pelo vanadato, que se liga ao sítio de fosforilação bloqueando o ciclo catalítico e originando a forma $\text{E}_2\text{-V}$ (Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998; Rice et al., 2001).

Painel 3 – Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase.
(Modificado de Horisberger, 2004).

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

Existem evidências de que a composição lipídica da membrana em que a enzima está inserida modula sua afinidade por ATP, Na^+ e K^+ (Else & Wu, 1999; Therien & Blostein, 1999; Cornelius et al., 2003; Else et al., 2003; Almansa et al., 2003). Essa afinidade também pode ser modulada por proteínas da família FXFD, particularmente o peptídeo γ (Geering et al., 2003; Sweadner et al., 2003; Crambert et al., 2004; Li et al., 2004).

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

1.2. O crustáceo *Callinectes ornatus*

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

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

Callinectes ornatus é um siri eurialino encontrado, principalmente em ambientes de moderada salinidade (28-30‰) a 28-32°C (machos) ou 16-20°C (fêmeas). A ocorrência de formas imaturas tende a aumentar em salinidades entre 30-32‰ (Mantelatto, 1999). Por outro lado, Brues (1927) mencionou a ocorrência desta espécie em águas com 9‰ de salinidade. De grande valor comercial esse animal está distribuído ao longo da costa Atlântica oeste incluindo a costa brasileira (Mantelatto & Fransozo, 2000). Ele pode ser encontrado perto de estuários e em baías habitando areia, lodo ou fundo de conchas e ocorre da zona intertidal até a profundidades de 75 metros (Melo, 1996; Mantelatto & Christofolletti, 2001).

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

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

A presença de mecanismos eficientes de controle osmo-iônico nos crustáceos é de grande importância devido a grande variabilidade das condições ambientais a que podem estar expostos (Péqueux, 1995). Desta forma o tecido branquial dos crustáceos desempenha um papel fundamental na osmorregulação e nas trocas gasosas (Böttcher & Siebers, 1993; Péqueux, 1995), bem como na regulação do equilíbrio ácido-base da hemolinfa (Henry & Wheatly, 1992). O tecido branquial atua como uma interface seletiva entre o animal e o seu meio ambiente e é considerado o sítio primário de captação ativa de sódio e cloreto de ambientes de baixa salinidade para a hemolinfa nos crustáceos hiperosmorreguladores. O mecanismo de bombeamento de sódio e potássio realizado pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é um dos principais fatores envolvidos neste processo (Péqueux, 1995; Furriel et al., 2000).

Vários estudos têm sugerido a participação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial na excreção ativa de compostos nitrogenados, na forma de íons amônio, em um processo ainda pouco compreendido (Cameron & Batterton, 1978; Lucu, 1993; Péqueux, 1995; Weihrauch et al., 1998, 1999). Os principais compostos nitrogenados excretados pelos crustáceos estão sob a forma de amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), independentemente de ocuparem ambiente marinho ou de água doce (Kormanik & Cameron, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999). A maior parte da excreção de amônia ocorre através das brânquias (Regnault, 1987; Weihrauch et al., 1999). Em *C. sapidus*, menos de 2% do total de amônia excretada é eliminada através da urina (Cameron & Batterton, 1978).

Apesar de existirem detalhes que variam de uma espécie para outra, a micro-anatomia e a ultraestrutura das brânquias dos caranguejos, já bem conhecidas, podem ser consideradas como representativas da organização básica das brânquias dos

crustáceos em geral (Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Towle, 1997). Estudos preliminares da morfologia das brânquias de caranguejos têm demonstrado a presença de oito pares de brânquias, dispostos lateralmente e apresentando uma grande semelhança (**Painel 4**) com as estruturas já descritas para as espécies de crustáceos relacionadas (Copeland & Fitzjarell, 1968; Onken & Riestenpatt, 1998). As brânquias são compostas basicamente por estruturas multilamelares onde cada lamela forma um envelope cuticular, com o seu exterior em contato com a água do ambiente e o seu interior preenchido pela hemolinfa através de uma câmara formada por células epiteliais uniestratificadas que apresentam, na maioria das vezes, um septo intralamelar (Mantel & Farmer, 1983; Barra et al., 1983; Goodman & Cavey, 1990; Maina, 1990; Taylor & Taylor, 1992; Onken et al., 1995; Onken & Riestenpatt, 1998). Nas membranas apicais, as células do tecido epitelial branquial apresentam um grande número de invaginações, que aumentam a superfície de contato com o meio ambiente. Já a superfície basolateral dessas células é banhada pela hemolinfa e apresenta um grande número de invaginações associadas a mitocôndrias (Copeland, 1968; Cioffi, 1984; Towle, 1984; Gilles & Péqueux, 1985; Towle & Kays, 1986). Acredita-se que as mitocôndrias associadas às invaginações são características de epitélios transportadores de íons e, desta forma, as mitocôndrias forneceriam ATP para o bombeamento ativo desses íons (Barra & Péqueux, 1986; Towle, 1993, 1997; Péqueux, 1995).

Dada a importância do controle osmo-iônico e a participação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase nesse processo, estudos relacionados à captação e regulação da concentração osmótica de íons sódio e cloreto têm sido realizados em várias espécies de crustáceos (Péqueux, 1995; Zare & Greenaway, 1998; Lignot et al., 2000; Furriel et al., 2000). Aparentemente, os processos de transporte transepitelial de íons sódio e cloreto em ambiente de baixa salinidade envolvem a ação coordenada de vários sistemas de transporte localizados tanto nas regiões apical e basolateral do tecido branquial (Towle et al., 1997; Zare & Greenaway, 1998; Onken & Riestenpatt, 1998). Tem sido sugerido a presença de diversos transportadores de íons (**Painel 5**), destacando-se entre eles um trocador Na^+/H^+ (ou $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$), um canal de sódio e também um co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, localizados na região apical das células do tecido branquial (Zeiske et al., 1992; Péqueux, 1995; Towle 1997; Towle et al., 1997).

Painel 4 – Representação esquemática da morfologia das brânquias dos caranguejos. 1. Cutícula; 2. Célula principal; 3. Célula pilastra; 4. Espaço da hemolinfa. 5. Septo intralamelar. A figura é baseada em estudos de microscopia em *Uca sp.* (Modificado de Onken & Riestenpatt, 1998).

Além disso, existem evidências que suportam a existência de canais de potássio na membrana basolateral e que permitiriam a manutenção dos níveis de K^+ compatíveis com a funcionalidade da célula (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998).

Acredita-se que a (Na^+,K^+) -ATPase, presente na membrana basolateral do epitélio branquial dos caranguejos eurialinos (**Painel 5**), atua transportando ativamente íons sódio e potássio entre o meio intracelular e a hemolinfa, contribuindo para a manutenção do equilíbrio osmo-iônico desses animais em ambientes de baixa salinidade e, promovendo a principal força motriz para o estabelecimento de um gradiente eletroquímico que energiza uma variedade de outros transportadores (Towle, 1993, 1997, 1999; Onken & Puntzenlechner, 1995; Wilder et al., 2000).

Embora a importância adaptativa da (Na^+,K^+) -ATPase branquial dos crustáceos osmorreguladores esteja bem estabelecida, existem poucos estudos relacionados com sua caracterização bioquímica (Péqueux, 1995; Furriel et al., 2000). Dentro do gênero *Callinectes*, algumas características cinéticas da (Na^+,K^+) -ATPase

branquial foram relatadas para *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980; Savage & Robinson, 1983; Towle & Holleland, 1987; Lucu, 1990; Towle, 1993; Piller et al., 1995) e *C. danae* (Masui et al., 2003), entretanto para *C. ornatus* dados cinéticos e estruturais são praticamente inexistentes.

Painel 5 – Modelo proposto para o transporte dos íons sódio através do tecido branquial de caranguejos osmorreguladores. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase, localizada na membrana basolateral, transporta íons sódio do meio intracelular para a hemolinfa, em troca de íons potássio. Transportadores localizados na membrana apical seriam responsáveis pela captura de íons sódio do meio externo para o meio intracelular. ①. Trocador Na^+/H^+ . ②. V-ATPase. ③. Trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$. ④. Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. ⑤. $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. ⑥. Canal Cl^- . (Modificado de Towle & Weihrauch, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O projeto desenvolvido em nosso laboratório tem como objetivo geral o estudo sistemático e comparativo das propriedades estruturais e cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase do tecido branquial de diferentes espécies de crustáceos decápodos (caranguejos, ermitões e siris) habitantes de distintos biótopos de variada salinidade, a fim de estabelecer o papel dessa enzima na adaptação desses animais a ambientes de diferentes salinidades (**Painel 6**). As espécies que estão sendo estudadas são as seguintes: *Callinectes ornatus*, *Xiphopenaeus kroyeri*, *Callinectes danae*, *Clibanarius vittatus*, *Macrobrachium olfersii*, *Dilocarcinus pagei* e *Macrobrachium amazonicum*. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase será preparada a partir do tecido branquial dos animais capturados em seus habitats ou aclimatados a diferentes salinidades. Com isso, pretende-se estudar a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase do tecido branquial no sentido de contribuir para uma melhor compreensão das adaptações fisiológicas e bioquímicas associadas à ocupação desses diferentes ambientes. Na nossa opinião, esse estudo, além de contribuir para a elucidação de importantes aspectos sobre a evolução, relação filogenética e a conquista do ambiente dulcícola/terrestre, poderão contribuir ainda para o estabelecimento de um modelo dos mecanismos de regulação osmótica, a longo prazo, que atuam nos crustáceos decápodos.

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

Contribuição do trabalho para o tema em estudo

O trabalho que está inserido no projeto *$(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de microssoma de brânquias de crustáceos: um marcador molecular para avaliar a adaptação a biótopos de diferentes salinidades* foi iniciado em 1997, com a caracterização bioquímica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase do tecido branquial do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*. O estudo sistemático realizado com a enzima mostrou que as suas características cinéticas são consistentes com o modelo proposto para a captura de íons Na^+ através do epitélio branquial deste animal em água doce e que, a

baixa afinidade aparente da enzima por Na^+ pode refletir a recente invasão desse ambiente por este animal (Furriel et al., 2000).

PAINEL 6 – Representação do ambiente aquático e a distribuição de algumas espécies de crustáceos aquáticos encontrados no estado de São Paulo.

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

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

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ também foi caracterizada no tecido branquial do siri portunídeo *Callinectes danae* e, ao contrário do que tem sido relatado para as

(Na⁺,K⁺)-ATPases dos invertebrados, a enzima apresenta um sítio de alta afinidade para o ATP similarmente à enzima dos mamíferos e também é estimulada sinergisticamente pelo K⁺ e NH₄⁺ (Masui et al., 2002). Este fato pode ter um importante significado fisiológico do ponto de vista do processo de excreção de amônio pelos crustáceos, que ocorre através das brânquias (Furriel et al., 2004), e é coerente com o modelo proposto para outros caranguejos estuarinos. O estudo da modulação da atividade da enzima por diferentes cátions revelou que a (Na⁺,K⁺)-ATPase pode ter um importante papel na excreção de amônia e resultou na proposição de um modelo que é conforme mostrado no **Painel 7** (Masui et al., 2005a). Embora o efeito sinérgico desses íons não tenha sido observado para a atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase desses animais (Masui et al., 2005b), a análise por Western blot de preparações de *C. danae* aclimatado a salinidade de 15‰ revelou um aumento expressivo da (Na⁺,K⁺)-ATPase comparado com a de animais aclimatados a 33‰ (Masui et al., 2005b).

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram: i) obtenção de frações microsomais ricas em (Na⁺,K⁺)-ATPase a partir das brânquias de siris da espécie *C. ornatus*, coletados em seu habitat; ii) caracterização cinética da atividade da enzima em relação aos ligantes PNPP, sódio, potássio, magnésio e amônio e ATP; iii) Análise da preparação submetida a um gradiente contínuo de sacarose; iv) caracterização da (Na⁺,K⁺)-ATPase por imunoblotting.

Painel 7. Modelo hipotético para a excreção ativa de amônia através das brânquias do siri eurialino *Callinectes danae*.

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.0. Materiais e Métodos

Tris, ATP, fosfoenolpiruvato, NAD^+ , NADH, lactato desidrogenase, piruvato quinase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato quinase, ditioneíto, p-nitrofenilfosfato, 3-fosfogliceraldeído dietil acetal, ouabaína, ortovanadato de sódio, imidazol, nitoblue tetrazolium, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanolsulfônico (Hepes) foram adquiridos da Sigma. Chem. Co. Trietanolamina, ácido etilenodiamino tetracético e ácido clorídrico foram adquiridos da Merck. O anticorpo monoclonal alfa-5 foi adquirido do Hybridoma BanK da Universidade de Iowa (USA). A resina AG50WX-8 foi adquirida da Biorad (USA). Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura aprotogênica tratada em equipamentos MilliRO e MilliQ (Millipore Co., USA).

3.1. Coleta de animais

Machos e fêmeas adultos de siri *Callinectes ornatus* foram coletados na baía de Ubatuba (23°26'S, 45°02'W) no litoral norte do estado de São Paulo. Os animais foram transportados e mantidos no laboratório (de 2 a 5 dias), em tanques contendo água do mar (33‰ de salinidade), a 25°C, sendo alimentados em dias alternados com pedaços de camarão.

3.2. Dessecção das brânquias

Para cada homogeneizado foram sacrificados de 3 a 5 animais. Esses animais foram anestesiados por resfriamento em gelo picado e imediatamente sacrificados através da retirada completa da carapaça dorsal. Os 6°, 7° e 8° pares de brânquias posteriores foram removidos, utilizando pinça de ponta curva (9 cm), e transferidos rapidamente para 10 mL de tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mM, pH 6,8, contendo sacarose 250 mM, EDTA 6 mM e um coquetel de inibidores de proteases contendo benzamidina 1 mM, antipaína 5 μM , leupeptina 5 μM e pepstatina A 1 μM), sendo a solução mantida em banho de gelo.

3.3. Preparação da fração microsomal do tecido branquial

Após retirada do excesso de tampão as brânquias foram pesadas. Após a adição de tampão de homogeneização (Imidazol 20 mM, pH 6,8 contendo sacarose

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

3.4. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota da fração microsomal contendo 937 µg de proteína foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p) em tampão imidazol 20 mM, pH 6,8. Após centrifugação a 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 e imediatamente analisadas quanto à atividade PNPPase e ATPase, concentração protéica e índice de refração.

3.5. Determinação da atividade PNPPase

A atividade PNPPase foi determinada continuamente, a 25°C, através da liberação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon_{410 \text{ nm, pH } 7,5} = 13.160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas (Furriel et al., 2001). As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM, MgCl_2 7 mM e KCl 10 mM, em um volume final de 1 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima. Todos os ensaios foram realizados em duplicata utilizando-se três diferentes preparações ($N = 3$). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto.

3.6 . Determinação da atividade ATPase

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

A oxidação do NADH a NAD⁺ foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 equipado com células termostatizadas. As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 50 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U de PQ e 94 U de LDH, em um volume final de 1 mL.

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

A formação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As condições padrão dos ensaios foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, NaCl 50 mM, NAD⁺ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ em um volume final de 1 mL.

A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação e controles sem adição de enzima foram empregados com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por min, em condições padrões. Todos os experimentos sempre foram feitos em duplicata

usando-se pelo menos três preparações diferentes. A atividade ATPase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alameticina (1 mg/mg de proteína), a 25°C (Gostinskaya et al., 2003). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se na fração microsomal existem vesículas seladas.

3.7. Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento

Suspensões cristalinas (500 µL) de LDH e PQ foram centrifugadas a 14000 rpm, a 4°C, durante 15 min em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O pellet foi ressuspenso em 500 µL Hepes 50 mM, pH 7,5 e após ser transferido para um filtro Microcon YM-10 foi lavado 5 vezes com o mesmo tampão através de centrifugação a 10000 rpm, a 4°C, durante 15 min para completar a remoção de íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, o pellet foi ressuspenso em 500 µL de tampão Hepes 50 mM pH 7,5. Para o sistema FGQ e GAFDH, a suspensão foi tratada exatamente como descrito acima exceto que o tampão utilizado foi trietanolamina 50 mM, pH 7,5, contendo DTT 1 mM.

3.8. Preparação da solução de ortovanadato

A solução estoque de ortovanadato de sódio 1 mM foi preparada de acordo com Gordon (1991). Uma solução de concentração aproximada de 1 mM, teve seu pH acertado em 10,0 e em seguida foi fervida em banho-maria até ficar translúcida. Após resfriamento, o pH dessa solução foi novamente reajustado em 10,0 e a concentração final da solução foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{260\text{nm}, \text{pH } 10,0} = 3,550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Finalmente, após ajustar a concentração para 1 mM, alíquotas de 1 mL foram congeladas em frascos plásticos e estocadas a – 20°C até o momento do uso.

3.9. Preparação do gliceraldeído-3-fosfato

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

3.10. Dosagem de proteína

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

3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida (5 a 20%) conforme descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, metade do gel foi submetida a uma eletrotransferência e a outra foi corada com nitrato de prata. O padrão de peso molecular empregado foi Benchmark Prestained Protein Ladder (Gibco).

3.12. Western blotting

Após a eletroforese (SDS-PAGE), metade do gel foi submetida a uma eletrotransferência em membranas de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 (diluído 1:10) a 25°C, durante 1h. Após 3 lavagens com Tris.HCl 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%, a membrana foi incubada com fosfatase alcalina (diluída 1:7500), a 25°C, durante 1 h. A incorporação específica do anticorpo foi revelada em Tris.HCl 100 mM, pH 9,5, contendo NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NBT 0,2 mM e BCIP 0,8 mM. O padrão de peso molecular empregado foi Benchmark Prestained Protein Ladder (Gibco).

3.13. Tratamento dos dados cinéticos

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

4. RESULTADOS

A fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* obtida usando da metodologia descrita anteriormente apresentou uma atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da ordem de 116,3 U/mg e uma atividade K⁺-fosfatase de 49,8 U/mg. Estudos utilizando ouabaína sugeriram a presença de outras enzimas na fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus*. Não foram detectadas perdas significativas de atividade em preparações estocadas a -20°C por um período de cerca de seis meses. A utilização de alameticina nos ensaios de atividade sugere que as frações de membrana obtidas não estão na forma de vesículas seladas no meio reacional.

A ultracentrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* em gradiente contínuo de sacarose (10 a 50%) está mostrada na Figura 1. Observa-se que apenas um único pico protéico, compreendido entre 35 e 45% de sacarose, apresentou atividade K⁺-fosfatase total da ordem de 28 U/mL e atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase total da ordem de 56 U/mL. A inibição de 85,7% dessa atividade pela ouabaína (dados não mostrados) sugere fortemente que o pico corresponde a (Na⁺,K⁺)-ATPase. Por outro lado, os 14,3% representando atividade insensível à ouabaína sugere a presença de outras ATPases e fosfohidrolases contaminantes na preparação microsomal.

A Figura 2 mostra a eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (5 a 20%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e o Western blotting da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus*. A presença de várias bandas no gel, reveladas com nitrato de prata, mostra a presença de diferentes proteínas (Figura 2A). A utilização do anticorpo monoclonal para a cadeia α da (Na⁺,K⁺)-ATPase resultou no aparecimento de uma única banda no gel, o que demonstra que a fração microsomal de brânquias de *C. ornatus* contém uma (Na⁺,K⁺)-ATPase de PM= 110 kDa.

O efeito da concentração do PNPP sobre a atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* está mostrado na Figura 3. Em condições saturantes de íons Mg²⁺ (7 mM) e K⁺ (10 mM), o aumento da concentração de PNPP resultou em uma única curva de saturação apresentando interações sítio-sítio ($n_H = 1,6$). A atividade específica máxima estimada foi da ordem de $V = 52,0$ U/mg e o $K_{0,5} = 1,1$ mM. A atividade basal estimada para a estimulação da atividade K⁺-fosfatase foi de 0,34 U/mg. A inserção da figura mostra o efeito do aumento da

concentração do PNPP na atividade PNPPase total e na atividade PNPPase insensível a ouabaína (que corresponde a 25% da atividade total).

A Figura 4 mostra a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons magnésio. Em condições saturantes de PNPP (10 mM) e KCl (10 mM), observou-se uma estimulação da atividade K^+ -fosfatase da enzima por Mg^{2+} . No intervalo de concentração entre 10^{-4} e 10^{-2} M, a estimulação por Mg^{2+} resultou em uma curva de saturação monofásica que apresenta interações sítio-sítio ($n_H = 1,4$). A atividade específica para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase foi de 52,3 U/mg e o $K_{0,5} = 1,1$ mM. Na inserção da figura está mostrado o efeito do aumento da concentração dos íons magnésio na atividade PNPPase total e na atividade PNPPase insensível a ouabaína.

A modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* por K^+ está mostrada na Figura 5. Em condições saturantes de PNPP (10 mM) e $MgCl_2$ (7 mM), e na ausência de NH_4^+ , a atividade específica máxima da enzima foi de $V = 51,4$ U/mg e o $K_{0,5} = 2,3$ mM. O aumento da concentração dos íons potássio (10^{-4} a 10^{-2}) resultou em uma única curva de estimulação com $n_H = 2,1$, sugerindo a ocorrência de interações sítio-sítio. As curvas correspondentes às atividades total e insensível à ouabaína são mostradas na inserção da figura. Observa-se que a atividade PNPPase insensível à ouabaína representa cerca de 26 % da atividade total.

A estimulação da atividade K^+ -fosfatase pelos íons amônio está mostrada na Figura 6. Em condições saturantes de PNPP (10 mM) e Mg^{2+} (7 mM), a atividade da enzima estimada na presença de NH_4^+ (10^{-3} a 10^{-1} M) foi da ordem de 56,7 U/mg e a modulação da atividade ocorreu através de interações sítio-sítio ($n_H = 2,4$), $K_{0,5} = 9,8$ mM. Concentrações de íons amônio superiores a 70 mM provocaram inibição da atividade enzimática (não mostrado). Na inserção estão apresentados a estimulação da atividade em função do aumento da concentração dos íons amônio em relação a atividade PNPPase total e a atividade PNPPase insensível a ouabaína.

Na Tabela 1 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos moduladores PNPP, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ .

Figura 1. Centrifugação da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*, em gradiente contínuo de sacarose.

Uma amostra de 937 µg de proteína foi aplicada no gradiente de sacarose (10-50%) em tampão imidazol 20 mM pH 6,8, e centrifugada a 180000g durante 3 horas, a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e em cada uma delas foram analisadas: (●) atividade ATPase; (○) atividade K⁺-fosfatase; (□) dosagem de proteína e (▲) concentração de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. O experimento foi realizado empregando-se pelo menos três diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blot da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5% a 20% usando 45 µg de proteína. Após a corrida, uma das metades do gel foi corada com nitrato de prata e a outra submetida a eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 (diluído 1:10) durante 1h, a 25°C, com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado a fosfatase alcalina. **A-** Coloração com nitrato de prata. **B-** Western blotting.

Figura 3. Efeito da concentração de PNPP sobre a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 7 mM e KCl 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μ g de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

Figura 4. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons magnésio.

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

Figura 5. Modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM e $MgCl_2$ 7 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μ g de proteína, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados de brânquias. **Inserção:** atividade PNPPase (●); atividade PNPPase insensível à ouabaína (○).

Figura 6. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio.

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

Tabela 1. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos moduladores PNPP e íons magnésio, potássio e amônio.

Efector	V (U/mg)	$K_{0,5}$ (mM)	n_H
PNPP	$52,0 \pm 2,0$	$1,1 \pm 0,1$	1,6
Mg^{2+}	$52,3 \pm 2,3$	$1,1 \pm 0,05$	1,4
K^+	$51,4 \pm 2,5$	$2,3 \pm 0,1$	2,1
NH_4^+	$56,7 \pm 2,6$	$9,8 \pm 0,4$	2,4

A modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* por K^+ na presença de concentrações fixas de NH_4^+ está mostrado na Figura 7. Observou-se que para concentrações fixas de amônio (entre 10 e 50 mM), embora o aumento da atividade específica tenha sido apenas de 1,2%, é importante salientar que NH_4^+ e K^+ estimularam sinergisticamente a atividade PNPPase uma vez que sem NH_4^+ a atividade K^+ -fosfatase foi da ordem de $51,4 \pm 2,5$, enquanto na presença de NH_4^+ 50 mM esse valor aumentou para $54,9 \pm 2,1$ U/mg, para K^+ da ordem de 10^{-4} M. Nessas condições foi observado uma diminuição no valor de $K_{0,5}$ que passou de $2,3 \pm 0,1$ mM para $0,74 \pm 0,02$ mM. Entretanto, independentemente da concentração de NH_4^+ , as interações heterotrópicas referentes aos íons K^+ corresponderam a efeitos de cooperatividade positiva.

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* por K^+ , em diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 8. Embora o valor de n_H diminua com o aumento da concentração de NH_4^+ , sempre foi observada cooperatividade positiva no intervalo de concentrações utilizado (Figura 8A). O aumento da concentração de NH_4^+ no meio de reação provocou uma diminuição de 3,1 vezes no valor do $K_{0,5}$ (Figura 8B), sugerindo uma maior afinidade da enzima por K^+ na presença de concentrações crescentes de NH_4^+ . Embora a atividade K^+ -

fosfatase foi estimulada sinergisticamente, essa estimulação foi de apenas 1,2% (Figura 8C).

A Figura 9 mostra o efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus*, na presença de concentrações fixas de íons potássio (1 a 10 mM). Observa-se que para concentrações fixas de K^+ , o aumento da concentração dos íons amônio entre 0,1 mM e 50 mM, não acarretou variações significativas na atividade específica da enzima: $V = 56,7 \pm 2,6$ U/mg (para $K^+ = 0$) e $V = 57,5 \pm 2,8$ U/mg ($K^+ = 10$ mM). Nestas condições a hidrólise do substrato ocorreu através de cooperatividade positiva e o valor de $K_{0,5}$ diminuiu de 9,8 mM para 3,0 mM.

A variação dos parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* por NH_4^+ na presença de concentrações fixas de K^+ , é mostrada na Figura 10. Observa-se que n_H permaneceu praticamente constante ($n_H = 2$) em todo o intervalo de concentração estudado (Figura 10A), enquanto a atividade da enzima aumentou cerca de 3 vezes (Figura 10B).

Na Tabela 2 foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons potássio e amônio.

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* é mostrado na Figura 11. Em condições saturantes de PNPP, Mg^{2+} e K^+ , a curva obtida sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor e, para concentrações de ouabaína da ordem de 3,0 mM a atividade PNPPase da fração microsomal é inibida 76%. A constante de dissociação calculada para o complexo enzima-ouabaína é da ordem de 201,4 μM (inserção da Figura 11).

O efeito do aumento da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial, em presença de NH_4^+ 50 mM, é mostrado na Figura 12. Na presença de concentrações saturantes de PNPP e de íons Mg^{2+} e NH_4^+ , a inibição pela ouabaína também ocorreu através de uma simples curva, sugerindo a presença de um único sítio de fixação para o inibidor e a inibição foi de 80,2% sugerindo que os íons NH_4^+ não influenciam a ação da

Figura 7. Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi estimada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM e MgCl₂ 7 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (n= 3). Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (○) NH₄Cl 10 mM. (■) NH₄Cl 20 mM. (□) NH₄Cl 30 mM. (△) NH₄Cl 40 mM. (▲) NH₄Cl 50 mM.

Figura 8. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

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

Figura 9. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio.

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

Figura 10. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.

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

Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio e amônio.

[K ⁺] (mM)	[NH ₄ ⁺] (mM)	V (U/mg)	K _{0,5} (mM)	n _H	V/K
Variável	0	51,4 ± 2,5	2,3 ± 0,1	2,1	22,3
Variável	10	52,1 ± 2,6	1,8 ± 0,1	1,9	27,4
Variável	20	55,7 ± 2,7	1,2 ± 0,1	1,8	30,9
Variável	30	58,8 ± 2,9	0,90 ± 0,04	1,8	32,7
Variável	50	59,4 ± 2,9	0,74 ± 0,02	1,4	42,4
0	Variável	56,7 ± 2,6	9,8 ± 0,5	2,4	21,9
1	Variável	57,0 ± 2,7	8,7 ± 0,4	2,0	28,5
2	Variável	58,2 ± 2,7	7,2 ± 0,3	2,2	26,5
3	Variável	58,0 ± 2,5	3,6 ± 0,1	4,1	14,1
5	Variável	58,2 ± 2,8	3,0 ± 0,1	1,7	34,2
10	Variável	57,8 ± 2,6	-	-	-

Figura 11. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM, MgCl_2 7 mM e KCl 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $58,8 \pm 2,2$ U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para o cálculo do K_I .

Figura 12. Efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNPPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de *Callinectes ornatus*, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM, MgCl_2 7 mM e NH_4Cl 50 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $60,0 \pm 2,3$ U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_i .

Figura 13. Efeito da concentração de íons sódio sobre a atividade PNPPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo PNPP 10 mM, MgCl_2 7 mM e KCl 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. A atividade específica correspondente a 100% é $58,8 \pm 2,2$ U/mg. Os experimentos foram realizados em duplicata usando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N= 3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_I .

Figura 14. Modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelo ATP.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se pelo menos três (N= 3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** (●) Atividade ATPase total, (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.

ouabaína. Da mesma forma, o valor do K_I , da ordem de 194,8 μM (inserção da Figura 12), foi muito similar ao estimado na ausência de NH_4^+ .

Na Figura 13 é mostrado o efeito da concentração do Na^+ sobre a atividade PNPPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial *C. ornatus*. Em condições saturantes de PNPP, K^+ e Mg^{2+} , os íons sódio inibiram cerca de 90,3% a atividade K^+ -fosfatase. O valor de K_I calculado para a inibição da atividade PNPPase pelos Na^+ foi da ordem de $1,7 \pm 0,1 \text{ mM}$ (inserção Figura 13).

A Figura 14 mostra o efeito do aumento da concentração de ATP sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus*, em concentrações saturantes de Mg^{2+} (5 mM), Na^+ (50 mM) e K^+ (10 mM). Nestas condições foi observada uma única família de sítio e a variação da velocidade da reação com a concentração de ATP seguiu uma cinética michaeliana, com $V = 116,3 \pm 5,6 \text{ U/mg}$ e $K_{0,5} = 0,16 \pm 0,01 \text{ mM}$. Nota-se também que a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada pelo ATP na mesma faixa de concentração (inserção Figura 14), o que sugere a presença de ATPases contaminantes na preparação.

A modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons magnésio está mostrada na Figura 15. Em condições saturantes de ATP (2 mM), Na^+ (50 mM) e K^+ (10 mM), observou-se uma significativa estimulação da atividade da enzima para concentrações de MgCl_2 entre 10^{-4} e 10^{-2} M , resultando em uma curva de saturação monofásica que apresenta interações sítio-sítio ($n_H = 1,7$). A atividade específica para a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi de $111,0 \pm 5,4 \text{ U/mg}$ e o $K_{0,5} = 0,54 \pm 0,03 \text{ mM}$. Na inserção da figura está mostrado o efeito do aumento dos íons magnésio na atividade ATPase total e na atividade ATPase insensível à ouabaína.

O efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* é mostrado na Figura 16. Na presença de concentrações saturantes de ATP (2 mM), MgCl_2 (5 mM) e Na^+ (50 mM), os íons potássio estimularam a atividade da enzima através de interações sítio-sítio ($n_H = 1,3$). Na faixa de concentração de K^+ entre 0,1 mM e 10 mM, a hidrólise do ATP ocorreu com $V = 116,0 \pm 5,5 \text{ U/mg}$ e $K_{0,5} = 1,5 \pm 0,1 \text{ mM}$. Para o mesmo intervalo de concentração, a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada pelos íons potássio, onde esta estimulação representa aproximadamente 5 % da atividade ATPase total, sugerindo a presença de $\text{K}^+\text{-ATPase}$.

A Figura 17 mostra a modulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons sódio. Em concentrações saturantes de ATP (2mM), MgCl_2 (5 mM) e KCl (10 mM), a enzima foi estimulada até valores máximos de $V = 110,6 \pm 5,3$ U/mg e $K_{0,5} = 6,3 \pm 0,3$ mM. No intervalo de concentração de Na^+ entre 1 mM e 100 mM a estimulação da enzima ocorreu através de interações sítio-sítio ($n_H = 1,8$). Para o mesmo intervalo de concentração, a atividade ATPase insensível à ouabaína não foi estimulada por Na^+ , o que descarta a presença de $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

A modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons amônio está mostrada na Figura 18. Observa-se que na presença de concentrações saturantes de ATP (2 mM), MgCl_2 (5 mM) e Na^+ (50 mM) e na ausência de K^+ , a enzima apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,5$). O aumento da concentração de NH_4^+ entre 0,1 mM e 50 mM provocou um aumento na atividade até valores máximos de $V = 173,2 \pm 8,5$ U/mg, com $K_{0,5} = 5,4 \pm 0,3$ mM. Mesmo para concentrações de NH_4^+ inferiores a 10^{-4} M, a enzima apresentou uma atividade basal de 5,35 U/mg. A atividade ATPase insensível à ouabaína representada na inserção é inibida por concentrações de NH_4^+ superiores a 5 mM.

Na Tabela 3 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelo ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.

Efector	V (U/mg)	$K_{0,5}$ (mM)	n_H
ATP	$116,3 \pm 5,6$	$0,16 \pm 0,01$	0,9
Mg^{2+}	$111,0 \pm 5,4$	$0,54 \pm 0,03$	1,7
K^+	$116,0 \pm 5,5$	$1,5 \pm 0,1$	1,3
Na^+	$110,6 \pm 5,3$	$6,3 \pm 0,3$	1,8
NH_4^+	$173,3 \pm 8,5$	$5,4 \pm 0,3$	1,4

Figura 15. Modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons magnésio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 µg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três (N= 3) diferentes preparações de (Na⁺,K⁺)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** (●) Atividade ATPase total, (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.

Figura 16. Modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, NAD^+ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N= 3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** (●) Atividade ATPase total, (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.

Figura 17. Modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons sódio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N= 3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** (●) Atividade ATPase total. (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.

Figura 18. Modulação da atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio.

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

A modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* por K^+ , em diferentes concentrações de NH_4^+ está mostrada na Figura 19. Observa-se que para concentrações crescentes de NH_4^+ , a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por K^+ assumem valores de atividade maiores, passando de 116,0 U/mg quando a concentração de NH_4^+ é nula, para 174,0 U/mg em presença de 50 mM de NH_4^+ . Os resultados indicam que quando a enzima está saturada por NH_4^+ , o K^+ consegue deslocar o primeiro íon de seu sítio e se ligar a enzima, porém em presença de 50 mM de NH_4^+ , o K^+ não consegue deslocar o NH_4^+ deste sítio.

Os parâmetros cinéticos calculados para cada experimento de estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por K^+ em presença de concentrações fixas de NH_4^+ está mostrado na Figura 20. O valor de n_H permaneceu praticamente constante com o aumento da concentração de NH_4^+ , e apresentando cooperatividade positiva no intervalo de concentração utilizado (Figura 20A). O aumento da concentração de NH_4^+ no meio de reação provocou uma diminuição progressiva e significativa no valor de $K_{0,5}$, passando de 1 mM para 0,037 mM com concentrações de amônio de 5 e 20 mM respectivamente (Figura 20B), sugerindo uma maior afinidade da enzima pelos íons K^+ na presença de concentrações crescentes de íons NH_4^+ . A estimulação sinérgica da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi de 27%, passando de 116,0 U/mg para 174,0 u/mg para concentração de NH_4^+ igual a 0 e 50 mM, respectivamente (Figura 20C).

A modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *C. ornatus* pelos íons NH_4^+ na presença de concentrações fixas de íons K^+ está mostrado na Figura 21. Observa-se que na presença de 50 mM de NH_4^+ , esse íon estimula a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ até valores em torno de 175 U/mg, independentemente da presença de K^+ , sugerindo que o NH_4^+ pode se ligar tanto em seu sítio, quanto no sítio para K^+ .

Os parâmetros cinéticos calculados para cada experimento de estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por NH_4^+ em presença de concentrações fixas de K^+ está mostrado na Figura 22. O aumento da concentração de K^+ no meio de reação provocou um aumento progressivo no valor de $K_{0,5}$, passando de 5,4 mM para 10,4 mM com concentração de K^+ de 0 à 10 mM respectivamente (Figura 22B). Nessas condições, a hidrólise do substrato ocorreu através de cooperatividade positiva (Figura 22A).

Figura 19. Efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, NAD^+ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH_4Cl . (■) NH_4Cl 5 mM. (▲) NH_4Cl 10 mM. (◆) NH_4Cl 20 mM. (▼) NH_4Cl 40 mM.

Figura 20. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade ATPase da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio, em diferentes concentrações de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, NAD^+ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de (Na^+ , K^+)-ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V , $K_{0.5}$ e n_H .

Figura 21. Efeito da concentração dos íons potássio na modulação da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, NAD^+ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. Cada curva apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (■) KCl 1 mM. (▲) KCl 3 mM. (◆) KCl 10 mM.

Figura 22. Variação dos parâmetros cinéticos obtidos para a modulação da atividade ATPase da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons amônio, em diferentes concentrações de íons potássio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 50 mM, NAD^+ 2,17 mM, fosfato de sódio 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 2 mM, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μ g de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N= 3$) diferentes preparações de (Na^+, K^+) -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. Cada ponto representa uma curva de saturação necessária para determinar V , $K_{0.5}$ e n_H .

Na Tabela 4 foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons potássio e amônio. A estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase por K⁺ em concentrações crescentes de NH₄⁺ apresentou um aumento na eficiência catalítica da enzima, sugerindo que na presença de concentrações crescentes de NH₄⁺, a enzima passa a trabalhar de uma maneira mais próxima a ideal. Porém para a estimulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase em concentrações fixas e crescentes de K⁺, não foi observada uma mudança significativa na eficiência catalítica.

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* é mostrado na Figura 23. Em concentrações saturantes de ATP, Mg²⁺, Na⁺ e K⁺, a curva obtida sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Observa-se também que concentrações de ouabaína da ordem de 3 mM inibiram 86,5 % da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da enzima. A constante de dissociação calculada para o complexo enzima-ouabaína é da ordem de 74,5 µM (inserção Figura 23).

O efeito do aumento da concentração de ouabaína sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial, em presença de NH₄⁺, é mostrado na Figura 24. Na presença de concentrações saturantes de ATP, Mg²⁺, Na⁺ e NH₄⁺, a inibição pela ouabaína também ocorreu através de uma simples curva, sugerindo a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Na presença de NH₄⁺, a ouabaína foi mais eficiente, visto que concentrações de 1 mM inibiram 91 % da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal. Na presença de NH₄⁺, a constante de dissociação do complexo enzima-ouabaína foi estimada em 26,6 µM (inserção Figura 24).

A inibição da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* por ortovanadato está mostrada na Figura 25. De acordo com a curva de inibição, observou-se que concentrações de ortovanadato da ordem de 0,05 mM inibiram 86,5 % da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal. A constante de dissociação do complexo enzima-ortovanadato foi estimada em 0,65 ± 0,03 µM.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* pelos íons potássio e amônio.

$[\text{K}^+]$ (mM)	$[\text{NH}_4^+]$ (mM)	V (U/mg)	$\text{K}_{0,5}$ (mM)	n_H	V/K
Variável	0	$116,0 \pm 4,1$	$1,46 \pm 0,05$	1,28	79,5
Variável	5	$130,4 \pm 6,5$	$1,00 \pm 0,05$	2,48	130,4
Variável	10	$147,2 \pm 5,8$	$0,97 \pm 0,04$	1,96	151,8
Variável	20	$158,7 \pm 6,6$	$0,037 \pm 0,001$	1,32	4289,0
Variável	40	$174,0 \pm 6,1$	-	-	-
0	Variável	$173,2 \pm 7,8$	$5,4 \pm 0,2$	1,41	32,0
1	Variável	$173,6 \pm 6,1$	$9,1 \pm 0,3$	2,18	19,0
3	Variável	$175,6 \pm 8,8$	$7,3 \pm 0,2$	1,82	23,9
10	Variável	$185,9 \pm 7,4$	$10,4 \pm 0,4$	1,38	17,8

Figura 23. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

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

Figura 24. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 44,6 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de (Na^+, K^+) -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação do K_i .

A Figura 26 mostra o efeito da concentração de ortovanadato sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus* na presença de concentrações saturantes de ATP, Mg^{2+} , Na^+ e NH_4^+ . De acordo com a curva de inibição, observa-se que a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi inibida 81% para concentrações de ortovanadato da ordem de 0,01 mM. A constante de dissociação do complexo enzima-ortovanadato foi estimada em $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Similarmente ao observado para a ouabaína, os íons NH_4^+ afetam a inibição pelo ortovanadato.

Para esclarecer a natureza das ATPases insensíveis à ouabaína presentes na fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus*, foram empregados diferentes inibidores para testar a atividade ATPase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 27. A atividade ATPase residual em presença de ouabaína 3 mM é da ordem de 13,5 %, indicando que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é responsável por cerca de 86,5 % da atividade ATPase total. Um valor similar foi estimado na presença de ortovanadato, o que elimina a presença de fosfatases. Os valores estimados na presença de ouabaína mais tapsigargina e ouabaína mais bafilomicina A_1 , similares aos obtidos para a ouabaína, excluem a presença de Ca-ATPase e V-ATPase. A inibição parcial da atividade ATPase insensível à ouabaína por oligomicina sugere fortemente a presença de uma ATPase do tipo F na preparação, correspondendo a cerca de 7,8 % da atividade ATPase total. O valor de atividade ATPase estimado na presença de ouabaína mais ácido etacrínico sugere a presença de Na^+ - ou K^+ -ATPase. Entretanto, os dados da Figura 17 permitem excluir a presença de Na^+ -ATPase. Isso significa que aparentemente a preparação apresenta cerca de 6% de K^+ -ATPase.

Figura 25. Efeito da concentração de ortovanadato na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 36,2 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Figura 26. Efeito da concentração de ortovanadato na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Callinectes ornatus*, na presença de íons amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, NADH 0,20 mM, FEP 3,2 mM, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 44,6 μg de proteína. O experimento foi realizado empregando-se três ($N=3$) diferentes preparações de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de brânquias. A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Tabela 5. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Callinectes ornatus*.

Inibidor	V (U/mg)	Atividade residual (%)
Controle	124,8 ± 6,4	100
Ouabaína (3 mM)	16,9 ± 2,2	13,5
Vanadato (100 µM)	16,0 ± 0,4	12,9
Ouabaína (3 mM) + etanol (10 µL/mL)	15,2 ± 0,6	12,2
Ouabaína (3 mM) + DMSO (20 µL/mL)	16,9 ± 0,6	13,5
Ouabaína (3 mM) + Oligomicina (1 µg/mL)	9,80 ± 1,8	7,9
Ouabaína (3 mM) + Tapsigargina (0,5 µM)	14,3 ± 1,2	11,4
Ouabaína (3 mM) + Bafilomicina A ₁ (0,4 µM)	16,9 ± 1,6	13,5
Ouabaína (3 mM) + Ácido etacrínico (2 mM)	7,0 ± 0,4	5,6
Ouabaína (3 mM) + Teofilina (5 mM)	16,0 ± 1,5	12,9

Figura 27 – Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus*.

A atividade da fração microsomal foi realizada usando-se 36,2 µg de proteína em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo 2 mM de ATP, 5 mM de MgCl₂, 50 mM NaCl e 10 mM KCl num volume final de 1,0 mL. Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão e foram calculados a partir de três preparações diferentes (N= 3). Atividade ATPase total (■); Atividade residual relativa ao(s) inibidor(es) (■); Atividade ATPase contaminante (■) e Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase (■). Ctl: controle, Oua: ouabaína, Van: ortovanadato, Eta: ácido etacrínico, Oli: oligomicina, DMSO: dimetilsulfóxido, Tap: tapsigargina, Baf: bafilomicina e Teo: teofilina.

5.0. DISCUSSÃO

5.1. Estudo da fração microsomal.

A (Na^+ , K^+)-ATPase apresenta um papel importante no processo de regulação osmótica e iônica (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003), além de desempenhar um papel crucial na excreção de metabólitos nitrogenados nos crustáceos aquáticos, incluindo o siri *C. ornatus*. Esse processo de excreção tem sido estudado por diversos pesquisadores, tendo sido estabelecido que em pH fisiológico, 99% da amônia na hemolinfa está na forma de NH_4^+ . Embora não haja comprovação experimental, o modelo atualmente aceito sugere que esses íons são excretados pela (Na^+ , K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral das células do epitélio branquial, por substituição aos íons K^+ (Péqueux, 1995; Weihrauch et al, 1998 e 1999; Towle et al, 2001; Lucu & Towle, 2003; Weihrauch et al 2004; Masui et al, 2005). Portanto a caracterização cinética da (Na^+ , K^+)-ATPase presente neste tecido, representa uma nova e importante ferramenta que poderá contribuir para o esclarecimento acerca dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos nos quais a enzima participa.

A análise da fração microsomal de tecido branquial de *C. ornatus* em gradiente contínuo de sacarose, mostrou a presença de um pico protéico, 30 e 40% de sacarose, similarmente ao encontrado para *Callinectes danae* (Masui et al., 2003, 2005), *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2001) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b). Este pico apresentou uma atividade K^+ -fosfatase total da ordem de 28 U/mL e a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase de 54,6 U/mL. A inibição parcial pela ouabaína sugere fortemente que este pico inclui a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, embora outras enzimas com atividade fosfatase e ATPase estejam presentes na preparação microsomal, similarmente ao relatado para o siri *C. danae* aclimatado a uma salinidade de 15‰ (Masui et al., 2005). A presença de apenas um pico com atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, sugere que a enzima se encontra em frações homogêneas de membrana (densidades próximas), possivelmente de origem basolateral (Towle & Kays, 1986; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998).

A presença de uma única banda imuno específica, com Mr da ordem de 110 kDa, nos microsomas de tecido brânquial de *C. ornatus* obtidos a partir de animais recém-capturados sugere a presença de uma única isoforma da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase. Valores de Mr semelhantes foram relatados para a enzima de várias fontes (Pressley, 1996; Furriel et al., 2000; Donnet et al., 2001; Towle et al., 2001; Masui et al., 2002, 2005a; Lucu & Towle, 2003).

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

A capacidade da (Na^+,K^+) -ATPase em hidrolisar o p-nitrofenilfosfato, tem sido foco de estudo para vários pesquisadores (Gache et al., 1977; Glynn, 1985; Berberian & Beaugé, 1992; Specht et al., 1997; Furriel et al., 2001; Homareda & Ushimaru, 2005). Entretanto, existem controvérsias a respeito do mecanismo de reação da enzima quando esse substrato não fisiológico é utilizado, sobretudo em relação ao fato se ele pode promover a fosforilação ou o transporte de íons (Glynn, 1985; Berberian & Beaugé, 1992; Yamazaki et al., 1994; Homareda & Ushimaru, 2005). Na conformação E_2 a enzima apresenta o sítio de ligação dos íons expostos para o citosol. Desta forma, os íons potássio são capazes de se ligar aos sítios onde originalmente se ligariam os íons sódio e ativar a reação de hidrólise (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Jorgensen et al., 1998a, b). Estudos de caracterização cinética da enzima em brânquias de crustáceos empregando o PNPP como substrato são muito escassos (Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003, 2005a).

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

A atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* estimada em cerca de 58,8 U/mg, é acentuadamente menor que a observada para o siri *C. danae*, da ordem de $V = 120$ U/mg (Masui et al., 2003). Esse resultado é coerente com o fato de *C. danae* habitar a região estuarina, enquanto *C. ornatus* é encontrado preferencialmente a salinidades de 28-30‰, comprovando que, quanto menor a salinidade, maior a atividade específica da enzima (Harris & Bayliss, 1988; Corotto & Holliday, 1996; Henry et al, 2002; Lucu & Towle, 2003). Quando essa atividade é comparada à do *Xiphopenaeus kroyeri* (60 U/mg), um crustáceo que, como *C. Ornatus*, habita áreas de alta salinidade, os valores são muito similares. O mesmo ocorre em relação ao *C. danae* aclimatado a 33‰ (55 U/mg). Porém, quando comparada com a atividade do *M. olfersii*, um camarão de água doce, a atividade é aproximadamente 4 vezes menor (Furriel et al., 2001). A afinidade aparente (K_m) da enzima pelo PNPP é da ordem de $1,1 \pm 0,1$ mM. Afinidades similares para esse

substrato também foram relatadas para a enzima do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001), *C. danae* (Masui et al., 2002), *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), de membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1976; 1977) e para a enzima de vertebrados (Beaugé & Berberian, 1983; Davis & Robinson, 1988).

Os íons magnésio são essenciais para a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+) -ATPase de diferentes fontes (Rossi et al., 1978; Gache et al., 1979; Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991; Berberian & Beaugé, 1992). O valor de $K_{0,5} = 1,0 \pm 0,05$ mM determinado para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da enzima das brânquias de *C. ornatus* por Mg^{2+} é similar ao observado para a enzima branquial de *M. olfersii* recém coletado (Furriel et al., 2001) ou aclimatado à salinidade de 21‰ (Mendonça et al., 2006); de *C. danae* recém capturado à salinidade de 33‰ (Masui et al., 2003) ou aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b). Valores similares também foram relatados para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* obtida de diferentes fontes (Gache et al., 1976, 1979) bem como para a enzima de vertebrados (Robinson, 1981; Beaugé & Berberian, 1983).

Altas concentrações de íons sódio inibem a atividade K^+ -fosfatase aparentemente devido à competição com os íons sódio pelos sítios de ligação (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991). A atividade K^+ -fosfatase da enzima do tecido branquial de *C. ornatus* foi inibida por altas concentrações de íons Na^+ , similarmente ao relatado para enzima de outras fontes (Gache et al., 1976; Glynn, 1985; Furriel et al., 2001; Masui et al., 2003; Rezende, 2005).

O valor de 2,3 mM determinado para o $K_{0,5}$ em relação à estimulação da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons potássio é similar aos relatados para a enzima obtida do tecido branquial de *M. olfersii* recém capturados ou aclimatados a salinidade de 21‰ (Furriel et al., 2001; 2004; Mendonça et al., 2006), *C. danae* (Masui et al., 2003), *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), de membranas axonais de *C. pagurus* (Gache et al., 1976, 1979), e tecidos de vertebrados (Robinson, 1981; Glynn, 1985).

Já está estabelecido que os íons potássio podem ser substituídos pelos íons amônio na estimulação da atividade da (Na^+, K^+) -ATPase de vertebrados (Robinson, 1970; Kurtz & Balaban, 1986; Skou & Esmann, 1992) e de crustáceos (Holliday, 1985; Towle et al., 1976; Wall, 1996; Towle et al., 2001; Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2002, 2003; Furriel et al., 2004). O valor de $K_{0,5} = 9,8$ mM determinado

para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase do tecido branquial de *C. ornatus* por esses íons, é semelhante ao relatado para a enzima de *C. danae* recém capturado a 33 ‰ (Masui et al., 2003) e aclimatado a 15 ‰ (Masui et al., 2005); *M. olfersii* capturado em seu habitat natural (Furriel et al., 2004) ou aclimatado a 21‰ (Mendonça et al., 2006); *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b); para enzima de membranas axonais de caranguejo *C. pagurus* (Skou, 1960; Rossi et al., 1978), e de cérebro de rato (Robinson, 1970).

A estimulação sinérgica da atividade K^+ -fosfatase por K^+ e NH_4^+ (ver Figura 7) é um resultado inédito para todas as (Na^+,K^+) -ATPase já descritas. Além disso, este comportamento sugere que para a (Na^+,K^+) -ATPase de *C. ornatus* um segundo sítio de ligação do NH_4^+ na forma E_2 da enzima está acessível aos íons em solução. Esses resultados não foram observados para *C. danae* (Masui et al., 2002) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), onde o sítio de ligação para o NH_4^+ só é observado utilizando o substrato ATP. Por outro lado, a estimulação da atividade da enzima por NH_4^+ a valores similares, tanto em presença quanto ausência de íons K^+ (ver Figura 9), sugere fortemente que os íons NH_4^+ podem ocupar tanto seu sítio como o sítio para os íons K^+ . Como não foi observada nenhuma inibição da atividade da enzima por excesso de íons potássio quando na presença de íons amônio, pode-se sugerir que não ocorre competição entre esses dois cátions (Robinson, 1970; Gache et al., 1976; Masui et al., 2005).

A inibição parcial da atividade PNPPase total pela ouabaína sugere a presença de outras enzimas, diferentes da (Na^+,K^+) -ATPase, capazes de hidrolisar o PNPP nas condições experimentais usadas. Relatos da literatura mostram que o valor da constante de inibição aparente para a inibição da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase pela ouabaína pode variar de 3 μM (Robinson 1981) a 200 μM (Gache et al., 1976). Os valores de K_i encontrados para a enzima de *C. ornatus* (201,4 μM para atividade com K^+ e 194,8 μM com NH_4^+) são próximos ao relatado para *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005) e aclimatado a 33‰, como também para *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2005b), mas é cerca de 4 vezes menor quando comparado ao valor relatado para a enzima de *C. danae* recém capturado (Masui et al., 2003) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2002).

A caracterização cinética da atividade (Na^+,K^+) -ATPase das frações de membrana do tecido branquial de *C. ornatus* utilizando o substrato PNPP apresenta

vantagens em relação à utilização do substrato fisiológico ATP, pois utiliza um método espectrofotométrico contínuo simples e direto, não necessitando o emprego de técnicas indiretas de medida da atividade hidrolítica da enzima como a dosagem do fosfato inorgânico (Heinonen & Lathi, 1981) ou método espectrofotométrico contínuo acoplado indireto (Masui et al., 2002; Furriel et al., 2000, 2004). Além disso, esses resultados são de grande utilidade para uma rápida comparação entre a enzima de organismos diferentes ou aclimatados a diferentes condições.

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

A atividade específica da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. ornatus* em relação à hidrólise do ATP é de $116,3 \pm 5,6$ U/mg. Esse valor encontra-se na faixa relatada para homogenizados de brânquias de outras espécies de *Callinectes*, compreendidos de 35 a 225 U/mg (Lovett & Watts, 1995; Piller et al., 1995; Lucu et al., 2000), porém é cerca de três vezes menor que o reportado para *C. danae* ($306,9 \pm 17,2$ U mg⁻¹). Esse resultado já era esperado, pois em salinidades menores existe uma maior necessidade de transporte de íons sódio e potássio. Assim como em nosso laboratório, outros pesquisadores têm demonstrado que quanto menor a salinidade, maior a atividade específica, como foi relatado para *C. Maenas*, quando o animal é aclimatado a uma salinidade de 10 e 35‰, observou-se que a atividade diminui (Siebers et al., 1983). Porém quando comparamos esse valor com o determinado para a enzima do camarão de água salgada *X. kroyeri* a velocidade assume valores praticamente idênticos (112,1 U/mg), sugerindo fortemente que existe uma relação entre o valor da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase e a salinidade do meio ambiente onde esses animais habitam (Pequeux, 1995; Corotto & Holliday, 1996; Lucu & Towle, 2003, Leone et al., 2005b).

O coeficiente de Hill de aproximadamente 0,9 sugere que a hidrólise do ATP na faixa de concentração de 10^{-5} M to $5 \cdot 10^{-3}$ M ocorre com através de um comportamento Michaeliano, similarmente ao relatado para as (Na⁺,K⁺)-ATPases já estudadas (Lucu & Towle, 2003, Leone et al., 2005b).

A caracterização dos sítios de ligação para o ATP na (Na⁺,K⁺)-ATPase ainda é controversa (Beaugé et al., 1997; Martin & Sachs, 2000). Sítios de alta afinidade com K_{0,5} entre 0,1 e 1,0 µM, e de baixa afinidade, com K_{0,5} entre 0,01 e 0,2 mM têm sido relatados para a enzima de vertebrados (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998), embora

as velocidades máximas correspondentes aos sítios de alta afinidade representem somente cerca de 1-10 % da atividade específica total (Glynn, 1985; Ward & Cavieres, 1998). A enzima presente no tecido branquial de *C. ornatus* apresenta apenas uma família de sítios, similarmente aos resultados reportados para as enzimas de membranas axonais de *Cancer pagurus* (Gache et al., 1977), de brânquias do camarão de água doce *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *C. sapidus* (Wheatly & Henry, 1987) e de certos caranguejos braquiúros eurialinos (Holliday, 1985; D'Orazio & Holliday, 1985; Corotto & Holliday, 1996). Entretanto, esse resultado contrasta com o comportamento observado para as enzimas de *C. danae* (Masui, 2002), e *Clibanarius vittatus* (Gonçalves et al., 2006), que apresentam duas famílias de sítios para o ATP. O valor estimado do $K_{0,5}$ para o sítio de baixa afinidade de ligação do ATP, da ordem de $0,16 \pm 0,01$ mM, é muito próximo ao do estimado para a enzima do tecido branquial de outros crustáceos decápodos como *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980), *M. rosenbergii* (Wilder et al., 2000) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2000). Entretanto esse valor é cerca de 10 vezes maior que o relatado para as enzimas das membranas axonais de *C. pagurus* (Balerna et al., 1975; Gache et al., 1977) e do tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b).

Já está bem estabelecido que o verdadeiro substrato da (Na^+, K^+) -ATPase é o complexo Mg-ATP e que na ausência de magnésio a enzima não é capaz de hidrolisar o ATP (Glynn, 1985; Furriel et al., 2000). Entretanto, o número de sítios de ligação para os íons magnésio na molécula da enzima bem como os passos da reação de hidrólise que são afetados por eles ainda permanecem a ser esclarecidos (Glynn, 1985; Jorgensen & Pedersen, 2001). Contudo, tem sido relatado que este íon divalente exerce um papel central na transição conformacional envolvida no acoplamento entre a hidrólise do ATP e o transporte de K^+ e Na^+ , ligando-se a sítios específicos localizados no lado citoplasmático da membrana (Grisham & Mildvan, 1974; Jorgensen, 1998a). A afinidade da enzima de tecido branquial de *C. ornatus* pelos íons magnésio ($K_{0,5} = 0,54 \pm 0,03$ mM) é muito similar aos valores relatados para a enzima de vertebrados (Glynn, 1985; Robinson & Pratap, 1991), membranas axonais de caranguejo (Gache et al., 1976; Rossi et al., 1978) e tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b). Porém para outros caranguejos braquiúros

eurialinos os valores encontrados são menores, em torno de 2,6 a 3,5 mM (Corotto & Holliday, 1996; Holliday, 1985; Dórazio & Holliday, 1985).

Similarmente ao observado para a enzima da membrana axonal de caranguejo (Gache et al., 1976) e para a enzima de tecido branquial de *C. danae* (Masui et al., 2002), o aumento da velocidade de hidrólise do ATP com o aumento da concentração de íons magnésio ocorre segundo uma cinética cooperativa ($n_H = 1,3$), sugerindo a existência de múltiplos sítios ligantes para os íons magnésio.

A afinidade aparente da (Na^+, K^+) -ATPase, extraída de diversas fontes, para os íons sódio varia entre 0,06 e 41,6 mM (Robinson & Pratap, 1991; Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Specht et al., 1997; Lucu & Towle, 2003). A afinidade aparente da enzima das brânquias de *C. ornatus* ($6,3 \pm 0,3$ mM) é similar às relatadas para *Carcinus maenas* aclimatado a 10‰, *M. olfersii* e *C. danae* (Lucu & Towle, 2003). A afinidade aparente da enzima de *C. ornatus* para os íons sódio é semelhante às de certos crustáceos estabelecidos em água doce e estuários. Essa afinidade é significativamente maior quando comparada com a de outras espécies estabelecidas em água salgada, como *Carcinus maenas* (aclimatado a 35‰), *C. pagurus* e *Macropipus puber*, cujos valores de $K_{0,5}$ são 14, 34,6 e 41,6 mM respectivamente (Lucu & Towle, 2003). Já para *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), um camarão marinho, valores semelhantes de afinidade foram relatados.

A afinidade aparente da (Na^+, K^+) -ATPase presente nas brânquias de *C. ornatus* para os íons potássio, foi estimada em $1,5 \pm 0,1$ mM. Esse valor coincide com os já relatados na literatura e que mostram uma pequena variação de afinidade para K^+ entre as isoenzimas que oscilam de 0,5 a 2,5 mM (Vilsen, 1995; Therien et al., 1996; Specht et al., 1997). O valor de $K_{0,5}$ estimado para a enzima de *C. ornatus* é similar ao relatado para o de *C. danae*, aclimatado a salinidade 15‰ (Masui et al., 2002) ou recém-capturado a 33‰ (Masui et al., 2005), como para a enzima branquial de *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *C. sapidus* (Neufeld et al., 1980), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005) e para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* (Gache et al., 1976), sugerindo portanto que a afinidade da enzima pelos íons potássio não varia com a salinidade do meio que o animal habita preferencialmente. Porém, é importante salientar que valores elevados para a constante de afinidade para K^+ foram relatados para *Uca minax* (Wanson et al., 1984) e *Carcinus maenas* (Winkler, 1986).

A presença de múltiplos sítios para a ligação de K^+ ($n= 1,3$) também foi relatada para *C. danae* aclimatado a salinidade 15‰ (Masui et al., 2002) ou recém-capturado a 33‰ (Masui et al., 2005), resultados que contrastam com os relatados para *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), que apresentam cooperatividade negativa, bem como para a (Na^+,K^+) -ATPase de *U. pugnax* (Holliday, 1985) e *U. pugilator* (D'Orazio & Holliday, 1985), que apresentam comportamento michaeliano.

A ligação dos íons NH_4^+ ao sítio de ligação dos íons K^+ na (Na^+,K^+) -ATPase foi descrita para a enzima de vertebrados (Robinson, 1970; Wall, 1996; Wilkie, 1997; Wall et al., 1999) e também de crustáceos (Holliday, 1985; Lucu & Towle, 2003; Weihrauch et al., 2002, 2004; Masui et al., 2002; Furriel et al., 2004). A comprovação da ação do NH_4^+ como contra-íons no transporte de Na^+ , foi realizada utilizando-se vesículas de membrana obtidas a partir do tecido branquial de *C. sapidus* (Towle & Holleland, 1987) e posteriormente estes resultados foram confirmados através de estudos de perfusão em brânquias isoladas de *C. maenas* (Lucu et al., 1989). Para a enzima presente no tecido branquial de *C. ornatus*, o valor de $K_{0,5}$ para os íons NH_4^+ foi estimado em $5,4 \pm 0,3$ mM. Esse valor é similar aos relatados para a enzima do tecido branquial de outras espécies de crustáceos, tais como *C. danae* recém-capturados (Masui et al., 2002) e aclimatados a salinidade de 15‰ (Masui et al., 2005), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), assim como para a enzima de membrana axonal de caranguejo (Skou, 1960; Rossi et al., 1978). O valor da afinidade aparente da enzima de crustáceos para os íons NH_4^+ também é similar aos valores relatados para a enzima de vertebrados, que varia entre 3 e 6 mM (Landon & Norris, 1963; Robinson, 1970). Fisiologicamente, a (Na^+,K^+) -ATPase transporta Na^+ e K^+ . assim, mesmo sendo possível a ligação dos íons NH_4^+ ao sítio do K^+ , é de se esperar que a afinidade observada para o amônio seja menor do que a observada para o potássio, o que realmente ocorre para a enzima das brânquias de *C. Ornatus*, *C. danae* (Masui et al., 2002), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) bem como para a enzima de vertebrados (Landon & Norris, 1963; Robinson, 1970). No caso do *C. ornatus*, a modulação da atividade pelos íons amônio apresentou cooperatividade positiva ($n_H= 1,4$), similarmente ao descrito para *C. danae* aclimatado a 15‰ (Masui et al., 2005) e membranas axonais de *C. pagurus* (Rossi et al., 1978), porém diferente da característica michaeliana observada para *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) e *X.*

kroyeri (Leone et al., 2005b). Observou-se também que os NH_4^+ estimularam a atividade da enzima até valores cerca de 30% maiores que os determinados em presença de íons potássio, similarmente ao observado para as enzimas branquiais de *C. danae* recém-capturado (Masui et al., 2002) e aclimado a 15‰ (Masui et al., 2005), *P. potamios* (Tentes & Stratakis, 1991), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *U. pugnax* (Holliday, 1985), *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b), bem como para a enzima obtida de outras fontes (Robinson, 1970; Landon & Norris, 1963; Skou, 1962; Schoner et al., 1967).

Similarmente ao relatado para *C. danae* (Masui et al., 2002), *M. olfersii* (Furriel et al., 2004) e *C. vittatus* (Gonçalves et al., 2006), a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente nas brânquias de *C. ornatus* apresentou uma estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ . Contudo, o mecanismo de estimulação em *C. ornatus* é aparentemente diferente do reportado para *C. danae*. Quando o NH_4^+ substitui o K^+ , a atividade específica aumenta 50% em relação à atividade apenas na presença de K^+ (ver Tabela 3). Esse resultado pode ser interpretado considerando-se que acima de 10 mM, uma mudança de conformação causada pela ligação do NH_4^+ pode levar a exposição de um sítio adicional e a ocupação desse novo sítio pelo NH_4^+ resulta em um considerável incremento da atividade específica. Além disso, a afinidade desse sítio exposto na presença de concentrações elevadas de íons amônio, é muito similar à observada para o sítio acessível na ausência de concentrações saturantes de NH_4^+ . Isso é sustentado pela simples curva de saturação observada para concentrações de NH_4^+ compreendidas entre 10^{-4} a $5 \cdot 10^{-2}$ M (ver Figura 18). Valores sutilmente diferentes de $K_{0,5}$ para K^+ e NH_4^+ sugerem que ambos os íons se ligam ao sítio de ligação do K^+ inicialmente exposto.

O aumento na atividade específica da enzima, de 116 U/mg, na presença de K^+ apenas (ver Figura 19), para 174 U/mg em presença de concentrações fixas de NH_4^+ , com uma significativa diminuição no valor de $K_{0,5}$, sugere que o K^+ desloca o NH_4^+ deste sítio e o NH_4^+ se liga ao sítio recentemente exposto pela mudança de conformação, originando uma conformação com alta afinidade por K^+ . Finalmente quando a enzima está completamente saturada com NH_4^+ (50 mM) não é observado o deslocamento de NH_4^+ por K^+ para concentrações de K^+ compreendidas entre 10^{-6} e 10^{-2} M.

A concentração de amônia em água do mar não poluída raramente excede 5 μM (Koroleff, 1983; Weihrauch et al., 1999). Em contraste, as concentrações de amônia na hemolinfa de diferentes espécies de caranguejos braquiúros adaptados a diferentes salinidades estão ao redor de 100 μM (Weihrauch et al., 1999; Lucu et al., 1989). Nessas condições, a excreção poderia ocorrer principalmente por difusão passiva a favor de seu gradiente. Caranguejos bênticos, principalmente do gênero *Callinectes*, entretanto se enterram nos sedimentos para sua proteção. Como tais sedimentos podem conter altas concentrações de amônia (cerca de 2,8 mM), enquanto esse animal permanece enterrado ele deve ser capaz de excretar ativamente amônio contra o gradiente de concentração, mantendo a concentração de íons amônio abaixo do valor considerado letal (Weihrauch et al., 1999). A excreção ativa de íons amônio através das brânquias, contra uma concentração externa elevada foi relatada para *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* e *Cancer pagurus* (Weihrauch et al., 1998 e 1999). Além disso, estudos em brânquias isoladas perfundidas dessas espécies revelaram que o fluxo do transporte ativo transepitelial de NH_4^+ é sensível à ouabaína aplicada do lado basolateral do epitélio, sugerindo fortemente o envolvimento da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ neste processo (Lucu et al., 1989; Péqueux & Gilles, 1981; Weihrauch et al., 1998, 1999).

De acordo com o modelo (ver Painel 7) atualmente mais aceito para o mecanismo molecular do processo de excreção de amônio (Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2005), canais de K^+ , sensíveis a Cs^+ , (Riestenpatt et al., 1996) seriam incapazes de discriminar entre os íons K^+ e NH_4^+ , e dessa forma, translocariam íons NH_4^+ da hemolinfa para o citoplasma (Weihrauch et al., 2002, 2004; Lucu et al., 1989; Towle & Holleland, 1987). Tem sido sugerido ainda, a participação de um transportador de amônia (RhCM) neste processo (Marini et al., 2000; Weihrauch et al., 2004). No citoplasma, os íons NH_4^+ dissociam-se em NH_3 e H^+ , e a NH_3 resultante se difunde para o interior de vesículas acidificadas por uma $\text{H}^+\text{-ATPase}$. Essas vesículas, contendo NH_4^+ , são transportadas via microtúbulos até o lado apical da célula, onde se fundem com a membrana liberando os íons NH_4^+ no espaço subcuticular *via* exocitose. Finalmente, os íons NH_4^+ passam para o meio externo através de estruturas cuticulares sensíveis a amiloride (Weihrauch et al., 1998, 2002, 2004).

A seleção evolucionária de uma $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial com características cinéticas particulares para a estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ , pode ser reflexo de diferenças na permeabilidade do epitélio branquial de *C. ornatus* e *C. danae*, uma vez

que o primeiro é usualmente encontrado em águas de moderada à alta salinidade (Melo, 1996) enquanto o segundo é encontrado em estuários e áreas com influência de água doce (Guerin & Stickle, 1997; Mantelatto & Fransozo, 2000). Aparentemente, animais que vivem em áreas de moderada salinidade ou água doce possuem uma menor permeabilidade da superfície corporal, quando comparados às espécies marinhas. Dessa forma, enquanto as brânquias da espécie marinha *C. pagurus* exibem alta permeabilidade aos íons, *E. sinensis*, aclimatado a água doce, mostra uma permeabilidade a íons cerca de 63 vezes menor. Assumindo que essa diferença de permeabilidade possa também ocorrer para o NH_4^+ , essa diferença poderia limitar o influxo de NH_4^+ do ambiente (Weihrauch et al., 1999). Devido a essa diferença de permeabilidade, a velocidade de excreção de amônia em *C. pagurus* é duas vezes maior, quando comparada a *E. sinensis*, sugerindo que *C. pagurus* aparentemente desenvolveu um mecanismo eficiente de excreção ativa de amônia para contrabalançar o influxo (Weihrauch et al., 1999).

A atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. ornatus* na presença de concentrações ótimas de ATP e íons magnésio, sódio e potássio ou amônio (substituindo os íons potássio) foi inibida por ouabaína em concentrações de 3 e 1 mM, respectivamente. Essa inibição de 86,5% na presença de íons potássio e 91,0% na presença de íons amônio, é uma forte evidência que os íons amônio estimulam a atividade hidrolítica da própria $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Os valores de K_i para a inibição da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial do siri *C. ornatus* pela ouabaína estimado em 74,5 μM na presença de íons potássio e 26,5 μM , na presença de íons amônio são coerentes com o valor estimado para a constante de dissociação da enzima-ouabaína na presença de íons amônio relatado para *C. danae* (Masui et al., 2005) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2005b). Para a enzima de caranguejos estuarinos, foram relatados valores de K_i que variam de 73 μM e 290 μM (Neufeld et al., 1980; D'Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Lucu, 1990; Corotto & Holiday, 1996; Postel et al., 1998). Diferentes sensibilidades à ouabaína têm sido atribuídas às diversas isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados, onde as menos sensíveis apresentam constantes de dissociação aparente entre 0,2 e 100 μM , enquanto as mais sensíveis, ao redor de 10 nM (Sweadner, 1989; Horisberger et al., 1991; Skou & Esmann, 1992; Doris, 1994; Pedersen et al., 1996; Pressley, 1996; Crambert et al., 1997; Noel et al., 1997). Até o momento não foram relatadas isoformas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de crustáceos que apresentam alta afinidade pela ouabaína.

A atividade ATPase do tecido branquial do siri *C. ornatus* também foi inibida por ortovanadato em proporções de 86,5 e 81 % em presença e potássio e amônio, respectivamente. Essa porcentagem de inibição é a mesma observada quando o homogenado está em presença de ouabaína, sugerindo portanto que o ortovanadato está inibindo somente a (Na⁺,K⁺)-ATPase e que fosfatases neutras e/ ou outras ATPases do tipo P não estão presentes.

A inibição parcial da atividade insensível à ouabaína por oligomicina sugere fortemente a presença de uma ATPase do tipo F na preparação, correspondendo à cerca de 8% da atividade ATPase total. Este resultado não é inesperado, uma vez que o tecido branquial é rico em mitocôndrias (Towle & Kays, 1986; Copeland & Fitzjarrel, 1968). A tapsigargina, um inibidor específico da Ca²⁺-ATPase, não inibiu a atividade insensível à ouabaína, sugerindo a ausência desta enzima na preparação. A presença de fosfatases neutras também é improvável, dada a ausência de inibição por teofilina. A bafilomicina A₁, um inibidor específico de V-ATPase, não apresentou nenhum efeito na atividade ATPase insensível à ouabaína da fração microsomal do tecido branquial de *C. Ornatus*, sugerindo a ausência de V-ATPase na preparação. Aparentemente a V-ATPase é essencial para a captação de íons em meios diluídos, dessa forma seria improvável a existência dessa enzima nas brânquias de um animal marinho. A inibição da atividade insensível à ouabaína por ácido etacrínico sugere fortemente a presença de uma atividade Na⁺- e/ou K⁺-ATPase na preparação microsomal, correspondendo a 5% da atividade ATPase total. Observando a inserção da Figura 17, podemos descartar a presença de uma Na⁺-ATPase, uma vez que não foi observada nenhuma estimulação da atividade insensível à ouabaína por íons Na⁺. Entretanto, a inserção da Figura 16 sugere a presença de uma K⁺-ATPase na preparação uma vez que ocorreu uma estimulação de 5% da atividade insensível a ouabaína pelos íons potássio. A presença de atividade K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase em homogeneizados do tecido branquial de *M. amazonicum* foi relatada por Provérbio et al. (1990). Masui et al. (2005) também relata a presença de atividade K⁺-ATPase em frações microsomais do tecido branquial de *C. danae* aclimatado a 15‰. Entretanto, estas atividades não foram detectadas na fração microsomal de tecido branquial de *M. olfersii* mantido em água doce (Furriel et al., 2000), bem como no tecido branquial de *C. danae* recém capturados em seu habitat natural (Masui et al., 2002).

Resta finalmente mencionar que esses estudos cinéticos deverão ser efetuados com a (Na⁺,K⁺)-ATPase isolada da fração microsomal de animais aclimatados a baixas

salinidades e posteriormente complementados com a análise bio-molecular no sentido de contribuir para um melhor entendimento dos papéis exercidos por essa enzima nos processos de osmorregulação e excreção nos crustáceos decápodos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, J. (1980) Distribuição e ecologia dos decápodos numa área estuarina de Ubatuba (SP) Bolm. Inst. Oceanogr. 29 (2): 1-3.
- Almansa, E.; Sanchez, J.J.; Cozzi, S.; Rodriguez, C. & Diaz, M. (2003) Temperature-activity relationship for the intestinal (Na⁺,K⁺)-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? J Comp Physiol 173B: 231-237.
- Apell, H.J.; Schneeberger, A. & Sokolov, V.S. (1998) Partial reactions of the: kinetic analysis and transport properties. Acta Physiol. Scand. 163: 235-245.
- Apell, H.J. (2004) How do P-type ATPases transport ions? Bioelectrochem 63: 149-156.
- Balerna, M.; Fosset, M.; Chicheportiche, R.; Romey, G. & Lazdunski, M. (1975) Constitution and properties of axonal membranes of crustacean nerves. Biochemistry 14: 5500-5511.
- Barra, J.A.; Péqueux, A.J.R. & Humbert, W. (1983) A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. Tissue Cell 15: 583-596.
- Barra, J.A. & Péqueux, A.J.R. (1986) Abstracts of the 8th Conference ESCPB, p.21, ESCPB Publ. Strasbourg, France.
- Beaugé, L. & Berberian, G. (1983) The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and the Na⁺ K⁺ pump. Biochim. Biophys. Acta 727: 336-50.
- Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Claeys, D.; Horisberger, J.D. & Geering, K. (1997) The γ -subunit is a specific component of the (Na⁺,K⁺)-ATPase and modulates its transport function. EMBO J. 16: 4250-4260.
- Berberian, G. & Beaugé, L. (1992). Phosphatase-activity and potassium-transport in liposomes with (Na⁺,K⁺)-ATPase incorporated. Bichim. Biophys. Acta 1103: 85-93.
- Blanco, G. & Mercer, R.W. (1998) Isozymes of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. - Renal Physiol. 44: F633-F650.
- Blanco, G.; Melton, R.J.; Sanchez, G. & Mercer, R.W. (1999) Functional characterization of a testes-specific α -subunit isoform of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. Biochemistry 38: 13661-13669.
- Böttcher, K. & Siebers, S. (1993) Biochemistry, localization, and physiology of carbonic anhydrase in the gills of euryhaline crabs. J. Exp. Zool. 265: 398-409.
- Boxenbaum, N.; Daly, S.E.; Javaid, Z.Z.; Lane, L.K. & Blostein, R. (1998) Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit. J. Biol. Chem. 273: 23086-23092.
- Brues, T.C. (1927) Occurrence of the marine crab *Callinectes ornatus*, in brackish and fresh water, Am. Nat. 61: 566-568.
- Cameron, J.N. & Batterton, C.V. (1978) Antennal gland function in the freshwater crab *Callinectes sapidus*: water, electrolyte acid-base and ammonia excretion. J. Comp. Physiol. B 123: 143-148.
- Capendeguy, O. & Horisberger, J.D. (2005) The role of the third extracellular loop of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit in a luminal gating mechanism. J Physiol 565: 207-218.
- Chacur, M.M. (1998) Distribuição ecológica do siri azul *Callinectes danae* Smith, 1863 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na enseada de Ubatuba (SP) UNESP.
- Cioffi, M. (1984) Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. Amer. Zool. 24: 139-156.
- Copeland, D.E. (1968) Amer. Zool. 8: 417-432.
- Copeland, D.E. & Fitzjarrell, A.T. (1968) The salt absorbing cells in gills of blue crab (*Callinectes sapidus* (Rathbun) with notes on modified mitochondria. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 92: 1-22.
- Cornelius, F.; Turner, N. & Christensen, H.R.Z. (2003) Modulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. Biochemistry 42: 8541-8549.
- Corotto, F.S. & Holliday, C.W. (1996) Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). Comp Biochem Physiol 113A: 361-368.
- Costa, T.M. (1995) Ciclo reprodutivo de *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região de Ubatuba. 94 pp. UNESP.
- Crambert, G.; Hasler, U.; Beggah, A.T.; Yu, C.L.; Modyanov, N.N.; Horisberger, J.D.; Lelievre, L. & Geering, K. (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human isozymes. J. Biol. Chem. 275: 1976-1986.
- Crambert, G.; Li, C.M.; Swee, L.K. & Geering, K. (2004) FXD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase. J Biol Chem 279: 30888-30895.

- Croyle, M.L.; Woo, A.L. & Lingrel, J.B. (1997) Extensive random mutagenesis analysis of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity. *Eur. J. Biochem.* 248: 488-495.
- Daly, S.E.; Biostein, R. & Lane, L.K. (1997) Functional consequences of a posttransfection mutation in the h2-h3 cytoplasmic loop of the α subunit of NaK-ATPase. *J Biol Chem* 272: 6341-6347.
- Davis, R.L. & Robinson, J.D. (1988) Substrate sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase: pertinence of the adenine and fluorescein binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 953: 26-36.
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55: 170-171.
- Domaszewicz, W. & Apell, H.J. (1999) Binding of the third Na⁺ ion to the cytoplasmic side of the NaK-ATPase is electrogenic. *FEBS letters* 458: 241-246.
- Donnet, C.; Arystarkhova, E. & Sweadner, K.J. (2001) Thermal denaturation of the NaK-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and γ subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 276: 7357-7365.
- D'Orazio, S.E. & Holliday, C.W. (1985) Gill Na,K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab *Uca pugnator*. *Physiol Zool* 58: 364-373.
- Dunbar, L.A. & Caplan, M.J. (2001) Ion pumps in polarized cells: Sorting and regulation of the Na⁺,K⁺- and (H⁺,K⁺)-ATPases. *J Biol Chem* 276: 29617-29620.
- Einholm, A.P.; Toustrup-Jensen, M.; Andersen, J.P. & Vilven, B. (2005) Mutation of Gly-94 in transmembrane segment M₁ of Na⁺, K⁺-ATPase interferes with Na⁺ and K⁺ binding in E₂P conformation. *PNAS.* 102: 11254-11259.
- Else, P.L. & Wu, B.J. (1999) What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms? *J Comp Physiol* 169B: 296-302.
- Else, P.L.; Wu, B.J.; Storlien, L.H. & Hulbert, A.J. (2003) Molecular activity of Na⁺,K⁺-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Ann NY Acad Sci* 986: 525-526.
- Emery, A.M.; Billingsley, P.F.; Ready, P.D. & Djamgoz, M.B.A. (1998) Insect (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Insect Physiol.* 44:197-209.
- Eguchi, H.; Takeda, K.; Schwarz, W.; Shirahata, A. & Kawamura, M. (2005) Involvement in K⁺ access of Leu³¹⁸ at the extracellular domain flanking M3 and M4 of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit. *Biochemical and Biophysical Research communications* 330: 611-614.
- Fedosova, N.U.; Cornelius, F. & Klodos, I. (1998) E₂P phosphoforms of (Na⁺,K⁺)-ATPase. I. Comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their reactivity toward hydroxylamine and vanadate. *Biochem.* 37:13634-13642.
- Felsenfeld, D.P. & Sweadner, K.J. (1988) specificity mapping and topography of an isozyme-specific epitope of the catalytic subunit. *J.Biol. Chem.* 263: 10932-10942.
- Fransozo, A.; Negreiros-Fransozo, M.L.; Mantelatto, F.L.M.; Pinheiro, M.A.A. & Santos, S. (1992) Composição e distribuição dos Brachyura (Crustácea, Decapoda) no sublitoral não consolidado na Enseada da Fortaleza, Ubatuba, SP. *Ver. Brasil Biol.* 52: 667-675.
- Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C. & Leone, F.A. (2000) Characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 303-315.
- Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C. & Leone, F.A., (2001). Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 130A: 665-676.
- Furriel, R.P.M.; Masui, D.C.; McNamara, J.C. & Leone FA (2004) Modulation of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J. Exp. Zool.* 301: 63-74.
- Füzesi, M.; Gottschalk, K.E.; Lindzen, M.; Shainskaya, A.; Küster, B.; Garty, H. & Karlsh, S.J.D. (2005) Covalent Cross-links between the γ Subunit (FX₂YD₂) and α and β -Subunits of Na,K-ATPase *J Biol Chem* 280: 18291-18301.
- Gache, C.; Rossi, B. & Lazdunski, M. (1976) (Na⁺,K⁺)-Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes cooperativity and control. Steady-state analysis. *Eur J Biochem* 65: 293-306.
- Gache, C.; Rossi, B. & Lazdunski, M. (1977) Mechanistic Analysis of the (Na⁺,K⁺)-ATPase using new pseudosubstrates. *Biochemistry* 16: 2957-2965.
- Gache, C.; Rossi, B.; Leone, F.A. & Lazdunski, M. (1979) Pseudo-substrates to analyze the reaction mechanism of the Na,K-ATPase. In: JC Skou (Ed) & JG Norby (Ed) Na,K-ATPase, Structure and Kinetics. Academic Press, NY 301-314.
- GarcíaSaez, A.; Perona, R. & Sastre, L. (1997) Polymorphism and structure of the gene coding for the alpha subunit of the *Artemia franciscana*. *Biochem. J.* 321:509-518.

- Garty, H. & Karlish, S.J.D. (2005) FXYD Proteins: Tissue Specific Regulators of Na,K ATPase. *Seminars in Nephrology* 198.
- Gatto, C.; McLoud, S.M. & Kaplan, J.H. (2001) Heterologous expression of (Na⁺,K⁺)-ATPase in insect cells: intracellular distribution of pump subunits. *Am J Physiol* 281C: 982-992.
- Gatto, C.; Helms, J.B.; Prasse, M.C.; Arnett, K.L. & Milanick, M.A. (2005) Kinetic characterization of tetrapropylammonium inhibition reveals how ATP and Pi alter access to the (Na⁺,K⁺)-ATPase transport site. *Am J Physiol* 289: C302-C311.
- Geering, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg. Biomemb.* 33: 425-438.
- Geering, K.; Beguin, P.; Garty, H.; Karlish, S.; Fuzesi, M.; Horisberger, J.D. & Crambert, G. (2003) FXYD proteins: New tissue- and isoform-specific regulators of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Ann NY Acad Sci* 986: 388-394.
- Gilles, R. & Péqueux, A. (1985) Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches. In: R. Gilles and M. Gilles-Baillien (Eds.), *Transport processes, iono- and osmoregulation*, pp. 136-158, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Glynn, I.M. (1985) The (Na⁺,K⁺)-transporting adenosine triphosphatase. In: AN Martonosi (Ed) *The enzymes of biological membranes*. Vol 3, pp 35-114. Plenum Press, New York.
- Gonçalves, R.R.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Garçon, D.P.; Furriel, R.P.M. & Leone, F.A. (2006). A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* Vol 145/3: 346-356.
- Goodman, S.H. & Cavey, M.J. (1990) Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 260: 495-505.
- Gordon, J.A. (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201: 477-482.
- Gostimskaya, I.S.; Grivennikova, V.G.; Zharova, T.V.; Bakeeva, L.E. & Vinogradov, A.D. (2003) In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Analytical Biochemistry* 313 (1): 46-52.
- Grisham, C.M. & Mildvan, A.S. (1974) Magnetic resonance and kinetic studies of the mechanism of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 249: 3187-3197.
- Guenoun, S. & Horisberger, J.D. (2002) Cysteine-scanning mutagenesis study of the sixth transmembrane segment of the α -subunit. *FEBS Letters* 513: 277-281.
- Guerin, L. & Stickle, W.B. (1997) Effect of salinity on survival and bioenergetics of juvenile lesser blue crabs *Callinectes similis*. *Marine Biol.* 129: 63-69.
- Hakansson, K.O. & Jorgensen, P.L. (2003) Homology modeling of - A putative third sodium binding site suggests a relay mechanism compatible with the electrogenic profile of Na⁺ translocation. *Ann NY Acad Sci* 986: 163-167.
- Harris, R.R. & Bayliss, D. (1988) Gill (Na⁺,K⁺)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na⁺ regulation. *Comp Biochem Physiol* 90A: 303-308.
- Hasler, U.; Crambert, G.; Horisberger, J.D. & 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.
- Hebert, H.; Purhonen, P.; Vorum, H.; Thomsen, K. & Maunsbach, A.B. (2001) Three-dimensional structure of renal (Na⁺,K⁺)-ATPase from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals. *J Mol Biol* 314: 479-494.
- Heinonen, S.K. & Lahti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* 113: 313-317.
- Henry, R.P. & Wheatly, M.G. (1992) Interaction of respiration ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Amer. Zool.* 32: 407-416.
- Henry, R.P.; Garrelts, E.E.; McCarty, M.M. & Towle, D.W. (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J Exp Zool* 292: 595-603.
- Holliday, C.W. (1985) Salinity-induced changes in gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the mud fiddler crab *Uca pugnax*. *J. Exp. Zool.* 233: 199-208.
- Holmgren, M.; Wagg, J.; Bezanilla, F.; Rakowski, R.F.; De Weer, P. & Gadsby, D.C. (2000) Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Nature* 403: 898-901.
- Homareda, H. & Ushimaru, M. (2005) Stimulation of *p*-nitrophenylphosphatase activity of Na⁺/K⁺-ATPase by NaCl with oligomycin or ATP. *FEBS J* 272: 673-684.

- Horisberger, J.D.; Kharoubi-Hess, S.; Guennoun, S. & Michielin, O. (2004) The fourth transmembrane segment of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit - A systematic mutagenesis study. *J Biol Chem* 279: 29542-29550.
- Hu, Y.K. & Kaplan, J.H. (2000) Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein - The topology of the α -subunit. *J. Biol. Chem.* 275: 19185-19191.
- Imagawa, T.; Yamamoto, T.; Kaya, S.; Sakaguchi, K. & Taniguchi, K. (2005) Thr-774 (Transmembrane Segment M5), Val-920 (M8), and Glu-954 (M9) are involved in Na⁺ transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na,K-ATPase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 18736-18744.
- Jacobse, M.D.; Pedersen, P.A. & Jorgensen, P.L. (2002) Importance of Na,K-ATPase residue alpha 1-Arg(544) in the segment Arg(544)-Asp(567) for high-affinity binding of ATP, ADP, or MgATP. *Biochemistry* 41: 1451-1456.
- Jones, D.H.; Li, T.Y.; Arystarkhova, E.; Barr, K.J.; Wetzel, R.K.; Peng, J.; Markham, K.; Sweadner, K.J.; Fong, G.H. & Kidder, G.M. (2005) Na,K-ATPase from mice lacking the γ -subunit (FXD2) exhibits altered Na⁺ affinity and decreased thermal stability. *J Biol Chem* 280: 19003-19011.
- Jorgensen, P.L. & Pedersen, P.A. (2001) Structure-function relationships of Na⁺, K⁺, ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1505: 57-74.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H. & Pedersen, P.A. (1998a) Structure-function relationships of E₁-E₂ transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 65-70.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H. & Pedersen, P.A. (1998b) Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* 163, Suppl 643: 79-87.
- Jorgensen, P.L. (2001) Aspects of gene structure and functional regulation of the isozymes of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Cell Mol Biol* 47: 231-238.
- Jorgensen, P.L.; Hakansson, K.O. & Karlsh S.J.D. (2003) Structure and mechanism of : Functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review Biochemistry.* 71: 511-35.
- Koenderink, J.B.; Hermesen, H.P.H.; Swarts, H.G.P.; Willems, P.H.G.M. & De Pont, J.J.H.H.M. (2000) Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11209-11214.
- Kong, B.Y. & Clarke, R.J. (2004) Identification of potential regulatory sites of the (Na⁺,K⁺)-ATPase by kinetic analysis. *Biochemistry* 43: 2241-2250.
- Kormanik, G.A. & Cameron, J.N. (1981) Ammonia excretion in the seawater bluecrab (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion and not Na⁺/NH₄⁺ exchange. *J. Comp. Physiol.* 141B: 457-462.
- Koroleff, F.; 1983. Determination of ammonia, Methods of seawater analysis. In: Grasshoff, K., Ehrhart M., Kremling K. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 150-151.
- Kurtz, I. & Balaban, R.S. (1986) Ammonium as a substrate for Na⁺-K⁺-ATPase in rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* 250: (3) F497-F502 Part 2.
- Lacerda, T.P. & Sawaya, P. (1986) Effects of hypoosmotic conditions on hemolymph glucose-concentration in *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Comp. Biochem. Phys.* 85A: 509-512.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Landon, E.J. & Norris, J.L. (1963) Sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase activity in a rat-kidney endoplasmic reticulum fraction. *Biochim Biophys Acta* 71: 266-276.
- Laughery, M.D.; Todd, M.L.; Kaplan, J.H. (2003) Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J Biol Chem* 278: 34794-34803.
- Leone, F.A.; Baranauskas, J.A.; Furriel, R.P.M. & Borin, I.A. (2005a) *Biochem. Mol. Biol Educ.* 33: 399-403.
- Leone, F.A. ; Furriel, R.P.M. ; McNamara, J.C. ; Mantelatto, F.L.M. ; Masui, D.C. ; Rezende, L.A. ; Gonçalves, R.R. & Garçon, D.P. (2005b). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 11: 1-15.
- Li, C.M.; Grosdidier, A.; Crambert, G.; Horisberger, J.D.; Michielin, O. & Geering, K. (2004) Structural and functional interaction sites between (Na⁺,K⁺)-ATPase and FXD proteins. *J Biol Chem* 279: 38895-38902.
- Lignot, J.H.; Spanings-Pierrot, C. & Charmantier, G. (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191: 209-245.
- Lingrel, J.; Moseley, A.; Dostanic, I.; Cougnon, M.; He, S.W.; James, P.; Woo, A.; O'Connor, K. & Neumann, J. (2003) Functional roles of the α isoforms of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Ann NY Acad Sci* 986: 354-359.

- Lovett, D.L. & Watts, S.A. (1995) Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp Biochem Physiol* 110B: 115-119.
- Lucu, C.; Devescovi, M. & Siebers, D. (1989) Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? *J Exp Zool* 249: 1-5.
- Lucu, C. (1990) regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A: 297-306.
- Lucu, C. (1993) Ion transport in the gill epithelium of aquatic crustacea. *J. Exp. Zool.* 265: 378-386.
- Lucu, C.; Devescovi, M. & Siebers, D. (1989) Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? *J Exp Zool* 249: 1-5.
- Lucu, C.; Devescovi, M.; Skaramuca, B. & Kozul, V. (2000) Gill NaK-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J Exp Mar Biol Ecol* 246: 163-178.
- Lucu, C. & Towle, D.W. (2003) (Na⁺,K⁺)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol A* 135: 195-214.
- Macías, M.T.; Palmero, I. & Sastre, L. (1991) of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* α -subunit. *Gene* 105: 197-204.
- Maina, J.N. (1990) The morphology of gills of the freshwater African crac *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): A scanning and transmission electron microscopio study. *J. Zool. London* 221: 499-515.
- Mantel, L.H. & Farmer, L.L. (1983) Osmotic and ionic regulation. In: L.H. Mantel (Ed.) and D.E. Bliss (Ed.-in-chief), *The biology of crustacea*, Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation, pp. 53-161, Academic Press, New York, New York.
- Mantelatto, F.L.M. & Dias, L.L. (1999) Extension of the know distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1967) (Decapoda, Portunidae) along the western tropical South Atlantic. *Crustaceana* 70: 214-226.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1996) Size at sexual maturity in *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba Region (SP), Brazil. *Nauplius* 4: 29-38.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1997) Fecundity of the crab *Callinectes ornatus* ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 70: 214-226.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1999a) Reproductive biology and moulting cycle of the crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Portunidae) from the Ubatuba Region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 72: 63-76.
- Mantelatto, F.L.M. (1999) Allocation of portunid crab *Callinecte ornatus* (Decapoda, Brachyura) in the Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*, Amsterdam, The Netherlands. 431-43.
- Mantelatto, F.L.M. & Chritofolletti, R.A. (2001) Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex size and molt stage. *Marine Biology* 138: 585-94.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1999) Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Rev. Brasileira Biol.* 59: 23-31.
- Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (2000) Brachyuran community in Ubatuba Bay, northern coasr of São Paulo Satate, Brazil. *J. Shellfish Research* 19: 701-709.
- Mantelatto, F.L.M. & Martinelli, J.M. (1999) Carapace width-weight relationships of *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from Ubatuba Bay, Brazil. *Iheringia Ser Zool* 87: 111-116.
- Marini, A.M.; Matassi, G.; Raynal, V.; Andre, B.; Cartron, J.P. & Cherif-Zahar, B. (2000) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genetics* 26, 341-344.
- Martin, D.W. & Sachs, J.R. (2000) Ligands presumed to label high affinity and low affinity ATP binding sites do not interact in an ($\alpha\beta$)(2) diprotomer in duck nasal gland (Na⁺,K⁺)-ATPase, nor do the sites coexist in native enzyme. *J Biol Chem* 275: 24512-24517.
- Martin, D.W. (2005) Structure-Function. Relationships in te Na⁺,K⁺-Pump. *Seminars in Nephrology* 198:282-291.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M. & Leone, F.A. (2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol* 132: 471-482.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M. & Leone FA (2003) Characterization of gill (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, D.C.; Furriel, R.P.M.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C. & Leone FA (2005a) K⁺-phosphatase activity of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the swimming crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the α -subunit. J. Exp. Zool. 303A: 294-307.
- Masui, D.C.; Furriel, R.P.M.; Silva, E.C.; Mantelatto, F.L.M.; McNamara, J.C.; Barrabin, H.; Scofano, H.M.; Fontes, C.F. & Leone, F.A. (2005b) Gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. Int J Biochem Cell Biol 37: 2521-2535.
- Melo, G.A.S. (1996) Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade Ed, São Paulo 1-603.
- Mendonça, N.N.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Leone, F.A. & Furriel, R.P.M. (2006) 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. No prelo
- Mense, M.; Rajendran, V.; Blostein, R. & Caplan, M.J. (2002) Extracellular domains, transmembrane segments, and intracellular domains interact to determine the cation selectivity of (Na⁺,K⁺)- and gastric (H⁺,K⁺)-ATPase. Biochemistry 41: 9803-9812.
- Middleton, D.A.; Rankin, S.; Esmann, M. & Watts, A. (2000) Structural insights into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. PNAS 97: (25) 13602-13607.
- Mobasher, A.; Avila, J.; Cozar-Castellano, I.; Brownleader, M.D.; Trevan, M.; Francis, M.J.O.; Lamb, J.F. & Martin-Vasallo, P. (2000) (Na⁺,K⁺)-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci. Reports 20: 51-91.
- Negreiros-Fransozo, M.L. & Fransozo, A. (1995) On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. Iheringia Ser Zool 79: 13-25.
- Negreiros-Fransozo, M.L.; Mantelatto, F.L.M. & Fransozo, A. (1999) Population biology of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Portunidae) from Ubatuba (SP), Brazil. Sci Mar 63: 157-163.
- Neufeld, G.J.; Holliday, C.W. & Pritchard, J.B. (1980) Salinity adaption of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211: 215-224.
- Nielsen, J.M.; Pedersen, P.A.; Karlsh, S.J.D. & Jorgensen, P.L. (1998) Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K⁺ ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase. Biochem. 37: 1961-1968.
- Ning, G.; Maunsbach, A.B.; Lee, Y.J. & Moller, J.V. (1993) Toology of the α subunit epitopes analyzed with oligopeptide-specific antibodies and double-labeling immunoelectron microscopy. FEBS Lett. 336: 521-524.
- Ogawa, H. & Toyoshima, C. (2002) Homology modeling of the cation binding sites of (Na⁺,K⁺)-ATPase. PNAS USA 99: 15977-15982.
- Onken, H. & Putzenlechner, M. (1995) A V-ATPase drives active electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. J. Exp. Biol. 198: 767-774.
- Onken, H. & Riestenpatt, S. (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. Comp. Biochem. Physiol. 119A: 883-893.
- Péqueux, A. & Gilles, R. (1981) Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Exp Biol 92: 173-186.
- Péqueux, A. (1995) Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. 15: 1-60.
- Piller, S.C.; Henry, R.P.; Doeller, J.E. & Kraus, D.W. (1995) A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. J. Exp. Biol. 198: 349-358.
- Pinheiro, M.A.A.; Fransozo, A. & Negreiros-Fransozo. (1996) Distributional patterns of *Areneus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Portunidae) in Fortaleza Bay, Ubatuba (S.P.), Brazil. Rev. Brasileira Biol. 56(4): 705-716.
- Post, R.L. (1999) Active transport and pumps. Current Topics in Membranes 48: 397-417.
- Post, R.L. (2003) How does conformation change ouabain binding from rejection (E₁) to acceptance (E₂)? Ann NY Acad Sci 986: 20-21.
- Postel, U.; Petrusch, G.; Riestenpatt, S.; Weihrach, 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. Mar Biol 130: 407-416.
- Pressley, T.A. (1996) Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. Miner Electrolyte Metab 22: 264-271.
- Pressley, T.A.; Duran, M.J. & Pierre, S.V. (2005). Frontiers Bioscience 10: 2018-U2 Suppl. S.

- Proverbio, T.; Zanders, I.P.; Marín, R.; Rodríguez, J.M. & Proverbio, F. (1990) Effects of Na⁺ and/or K⁺ on the Mg²⁺-dependent ATPase activities in shrimp (*Macrobrachium amazonicum*) gill homogenates. *Comp Biochem Physiol* 97B: 383-390.
- Read, S.M. & Northcote, D.H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue-g dye-binding assay for protein. *Analyt. Biochem.* 116: 53-64.
- Regnault, M. (1987) Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biol. Rev.* 62: 1-24.
- Rice, W.J.; Young, H.S.; Martin, D.W.; Sachs, J.R. & Stokes, D.L. (2001) Structure of (Na⁺,K⁺)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E₁ and E₂ states. *Biophys. J.* 80: 2187-2197.
- Riestenpatt, S.; Onken, H.; Siebers, D.; 1996. Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: Voltage-clamp and ion-flux studies. *J. Exp. Biol.* 99, 1545-1554.
- Robinson, J.D. (1970) Interactions between monovalent cations and the (Na⁺,K⁺)- dependent adenosine triphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 139:17-27.
- Robinson, J.D. & Pratap, P.R. (1991) (Na⁺,K⁺)-ATPase: modes of inhibition by Mg²⁺. *Biochim Biophys Acta* 1061: 267-78.
- Robinson, J.D. (1981) Substituting manganese for magnesium alters certain reaction properties of the Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 642: 405-417.
- Rossi, B.; Gache, C. & Lazdunski, M. (1978) Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na⁺,K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. *Eur J Biochem* 85: 561-570.
- Sanchez, G. & Blanco, G. (2004) Residues within transmembrane domains 4 and 6 of the Na,K-ATPase alpha subunit are important for Na⁺ selectivity. *Biochemistry* 43: 9061-9074.
- Savage, J.P. & Robinson, G.D. (1983) Inducement of increased gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75: 65-69.
- Schneeberger, A. & Apell, H.J. (1999) Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J Membr Biol* 168: 221-228.
- Schneeberger, A. & Apell, H.J. (2001) Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the: II. Competition of various cations. *J Membrane Biol* 179: 263-273.
- Schoner, W.; Von Ilberg, C.; Kramer, R. & Seubert, W. (1967) On the mechanism of Na⁺- and K⁺-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1. Purification and properties of a Na⁺- and K⁺-activated ATPase from ox brain. *Eur J Biochem* 1: 334-343.
- Segall, L.; Daly, S.E.; Boxenbaum, N.; Lane, L.K. & Blostein, R. (2000) Distinct catalytic properties of the α 1, α 2 and α 3 isoforms of the rat (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Biophys J.* 78: (1) 456.
- Segall, L.; Daly, S.E. & Blostein, R. (2001) Mechanistic basis for kinetic differences between the rat α 1, α 2, and α 3 isoforms of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 276: 31535-31541.
- Seok, J.H.; Kim, J.B.; Hong, J.H.; Sung, J.Y.; Hur, G.M.; Lim, K. & Lee, J.H. (1998) Regulation of Na,K-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rat. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 667-672.
- Siebers, D.; Winkler, A.; Leweck, K. & Madian, A. (1983) Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgolander Meeresunters* 36: 303-312.
- Skou, J.C. (1960) Further investigations on a Mg²⁺+Na⁺-activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta* 42: 6-23.
- Skou, J.C. (1962) Preparation of mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na⁺ and K⁺. *Biochim Biophys Acta* 58: 314-325.
- Skou, J.C. & Esmann, M. (1992) The (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J. Bioenerg. Biomemb.* 24: 249-261.
- Sorensen, T.M.L.; Moller, J.V. & Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the alcium pump. *Science* 304: 1672-1675.
- Specht, SC.; Rodriguez, C.; Quiñones, L. & Velazquez, S. (1997) Effect of high ionic strength and inhibitors of H,K-ATPase on the ouabain-sensitive K-p-Nitrophenylphosphatase activity in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Comp Biochem Physiol* 117B: 217-224.
- Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 988: 185-220.
- Sweadner, K.J. & Donnet, C. (2001) Structural similarities of (Na⁺,K⁺)-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 356: 685-704.
- Sweadner, K.J.; Arystarkhova, E.; Donnet, C. & Wetzell, R.K. (2003) FXYD proteins as regulators of the (Na⁺,K⁺)-ATPase in the kidney. *Ann NY Acad Sci* 986: 382-387.
- Taissoun, E.N. (1973) Biogeografía y ecología de los cangrejos de la familia "Portunidae" (Crustáceos, Decapodos, Brachyura) em la costa Atlántica de América. *Bolm. Cent. Invest. Biol.* 7: 7-23.

- Taylor, H.H. & Taylor, E.W. (1992) Gills and lungs: The exchange of gases and ions. In: F.W. Harrison and A.G. Humas (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol 10, *Decapod crustacea*, pp.203-293, Wiley-liss, New York.
- Tentes, I. & Stratakis, E. (1991) Partial purification and properties of Na,K-ATPase from *Potamon potamios*. *Comp Biochem Physiol* 100C: 619-624.
- Therien, A.G.; Nestor, N.B.; Ball, W.J. & Blostein, R. (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 272: 32628-32634.
- Therien, A.G. & Blostein, R. (1999) K⁺/Na⁺ antagonism at cytoplasmic sites of (Na⁺,K⁺)-ATPase: a tissue-specific mechanism of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 277: C891-C898.
- Therien, A.G. & Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279: C541-C566.
- Towle, D.W.; Palmer, G.E. & Harris, J.L. (1976) Role of gill Na⁺++K⁺-dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J Exp Zool* 196: 315-321.
- Towle, D.W. (1984) Membrane-bound ATPases in arthropod ion-transporting tissues. *Amer. Zool.* 24: 177-185.
- Towle, D.W. & Kays, W.T. (1986) Basolateral localization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in gill epithelium of 2 osmoregulating crabs, *callinectes-sapidus* and *carcinus-maenas*. *J. Exp. Zool.* 239: 311-318.
- Towle, D.W. & Holleland, T. (1987) Ammonium ion substitutes for K⁺ in ATP-dependent Na⁺ transport by basolateral membrane-vesicles. *Am. J. Physiol.* 252: R479-R489.
- Towle, D.W. (1993) Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J. Exp. Zool.* 265: 387-396.
- Towle, D.W. (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *Amer. Zool.* 37: 575-584.
- Towle, D.W.; Rushton, M.E.; Heidysch, D.; Magnani, J.J.; Rose, M.J.; Amstutz, A.; Jordan, M.K.; Shearer, D.W. & Wu, W.S. (1997) Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: Molecular cloning, expression, and tissue distribution. *J. Exp. Biol.* 200: 1003-1014.
- Towle, D.W. (1999) Osmoregulation by gills of aquatic animals. *Amer. Zool.* 39: 35.
- Towle, D.W. & Weihrauch, D. (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am. Zoologist* 41: 770-780.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430: 529-535.
- Vasilets, L.A. (2002) Mechanisms of short-term regulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase by protein kinases. *Biologicheskie Membrany* 19: 77-82.
- Vilsen, B. (1995) Mutant Glu781→Ala of the rat kidney (Na⁺,K⁺)-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry* 34: 1455-1463.
- Vinciguerra, M.; Mordasini, D.; Vandewalle, A. & Feraille, E. (2005) Hormonal and Nonhormonal Mechanisms of Regulation of the Na,K-Pump in Collecting Duct Principal Cells. *Seminars in Nephrology*. 198: 1-10.
- Wall, S.M. (1996) NH₄⁺ augments net acid secretion by a ouabain-sensitive mechanism in isolated perfused inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol-Renal* 39F: 432-439.
- Wall, S.M.; Davis, B.S.; Hassell, K.A.; Mehta, P. & Park, S.J. (1999) In rat tIMCD, NH₄⁺ uptake by Na⁺,K⁺-ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. *Am J Physiol Physiol* 277: F866-F874.
- Wanson, S.; Pequeux, A. & Roer, R. (1984) Na⁺ regulation and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte) *Comp Biochem Physiol* 79A: 673-678.
- Ward, D.G. & Cavieres, J.D. (1998) Affinity labeling of two nucleotide sites on Na,K-ATPase using 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) 8-azidoadenosine 5'-[alpha-P-32]diphosphate (TNP-8N(3)-[alpha-P-32]ADP) as a photoactivatable probe - Label incorporation before and after blocking the high affinity ATP site with fluorescein isothiocyanate. *J Biol Chem* 273: 33759-33765.
- Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Riessenpatt, S. & Siebers, D. (1998) Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol.* 168B: 364-376.
- Weihrauch, D.; Becker, W.; Postel, U.; Luck-Kopp, S. & Siebers, D. (1999) Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol.* 169B: 25-37.
- Weihrauch, D.; Ziegler, A.; Siebers, D. & Towle, D.W. (2002) Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of (Na⁺,K⁺)-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J Exp Biol* 205: 2765-2775.
- Weihrauch, D.; Morris, S. & Towle, D.W. (2004) Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol* 207: 4491-504.

- Wheatly, M.G. & Henry, R.P.; 1987. Branchial and antennal gland Na⁺K⁺-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Exp. Biol. 133, 73–86.
- Wilder, M.N.; Huong, D.T.T.; Atmomarsono, M.; Tran, T.T.H.; Phu, T.Q. & Yang, W.J. (2000) Characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. Comp. Biochem. Physiol. 125A: 377-388.
- Wilkie, M.P. (1997) Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comp Biochem Physiol 118A: 39-50.
- Winkler, A. (1986) Effects of inorganic sea-water constituents on branchial Na,K-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. Mar Biol 92: 537-544.
- Yamazaki, A.; Kaya, S.; Tsuda, T.; Araki, Y.; Hayashi, Y. & Taniguchi, K. (1994) An extra phosphorylation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by para-nitrophenylphosphate (pNPP): evidence for the oligomeric nature of the enzyme. J Biochem (Tokyo) 116: 1360-1369.
- Zare, S. & Greenaway, P. (1998) The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺ and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Decapodidae). Comp. Biochem. Physiol. 119A: 739-745.
- Zeiske, W.; Onken, H.; Schwarz, H-J. & Graszynski, K. (1992) Invertebrate epithelial Na⁺ channels: Amiloride-induced current noise in crab gill. Biochim. Biophys. Acta 1105: 245-252.

CURRICULUM VITAE

Daniela Pereira Garçon

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

1. Formação

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

Bacharel em Química, 2004.

Licenciada em Química, 2004.

2. Artigos publicados em revistas de circulação internacional

Leone FA, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Masui DC, Rezende LA, Gonçalves RR & Garçon DP (2005). (Na⁺,K⁺)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. Trends Comp. Biochem. Physiol. 11: 1-15.

Rúbia R. Gonçalves, Douglas C. Masui, John C. McNamara, Fernando L.M. Mantelatto, Daniela P. Garçon, Rosa P.M. Furriel and Francisco A. Leone (2006). A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Vol 145/3: 346-356.

Garçon D.P., Masui D.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Furriel R.P.M. and Leone F.A. (2006). K⁺ and NH₄⁺ modulate gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: fine tuning of ammonia excretion. Comparative Biochemistry and Physiology (no prelo)

3. Trabalhos científicos apresentados em congressos

Solubilization, purification and kinetic characterization of an ectonucleosidetriphosphate diphosphohydrolase 1 activity of alkaline phosphatase-depleted rat osseous plate membranes.

XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica de Biologia Molecular
- SBBq, 2004, Caxambu - MG.

Solubilização, Purificação e Caracterização Cinética de uma NTPDase1 de membrana
de placa óssea de rato.

11o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo,
2003, Ribeirão Preto.

Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to 21‰
salinity: effects on gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity.

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

A characterization of the (Na⁺,K⁺)-ATPase K⁺-phosphatase activity in gill
microsomes from the marine crab *Callinectes ornatus*.

XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica de Biologia Molecular
- SBBq, 2006, Águas de Lindóia - SP.