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

**Caracterização cinética e molecular da (Na⁺,K⁺)-ATPase do
tecido branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi*
(Latreille,1825).**

Daniel Lima de Farias

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

Área: **Química.**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

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

**Caracterização cinética e molecular da (Na⁺,K⁺)-ATPase do
tecido branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi*
(Latreille,1825).**

Daniel Lima de Farias

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

Área de Concentração: **Química.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto / USP

Farias, Daniel Lima

Caracterização cinética e molecular da (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido
branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille,1825). Ribeirão
Preto - SP, 2017.

228 p. : il. ; 30 cm

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.
Área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Francisco de Assis Leone.

1. (Na⁺,K⁺)-ATPase; 2. *Cardisoma guanhumi* (Latreille,1825); 3.
Cinética Enzimática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Lima de Farias.

Caracterização cinética e molecular da (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille,1825).

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Área de concentração: **Química**.

Aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr.

Instituição:.

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:.

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:.

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:.

Assinatura: _____

Durante essa "caminhada" muitas vezes pensei em desistir.
As "pedras" foram muito duras, e achei que não fosse conseguir.
Mas DEUS me provou o contrário, assim como nas Muralhas de Jericó!
Pois mesmo os obstáculos sendo desafiadores e intransponíveis,
com FÉ, perseverança e incentivo de amigos e familiares,
pude seguir em frente... e chegar ao meu destino!
(Daniel Piancó-PB)

" A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido,
e não na vitória propriamente dita. " **(Mahatma Gandhi)**

" Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, sou grato a esses professores. " **(Khalil Gibran)**

" É bom ser importante. Mas é mais importante SER bom. "
Maria Inês de Almeida Gadelha (in memoriam)

DEDICATÓRIA

Ao meu **DEUS** porque és fiel e justo. Pois nada acontece se não for de Vossa vontade.
Ao meu padrinho **Pe. Cícero** Romão Batista. Pois com ele encontrei o meu caminho.

A painho (**Sr. Sancho**), mainha (**Dona Beta**), e vôzim **João Rufino** (in memoriam).
Pois o amor incondicional, e principalmente o que fizeram por mim! Os tornaram meus
ídolos em bondade e humildade... sou o reflexo de vossos ensinamentos. Amo vocês!

À futura esposa e mãe dos meus filhos, **Sayane Montenegro**. Por sempre ter estado ao
meu lado, discutindo, cuidando da minha saúde, aconselhando, aguentando meus
"xiliques e aperreios"! Te amo e amarei eternamente, pois és minha escolha!

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**) pelo incentivo na forma de bolsa de doutorado, por fomentarem este trabalho no período em questão, e agradeço também pela oportunidade do meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leone pela orientação e supervisão no Processo FAPESP N° 2013/00976-8.

Ao Prof. Dr. Malson de Lucena (UFMS) pela co-orientação nas técnicas de experimentos bioquímicos durante meu doutorado, corrigindo e dando sugestões na minha escrita. Mas acima de tudo, pela amizade e divisão do seu lanche da tarde!

Ao Prof. Dr. Arthur de Oliveira pela disponibilização do seu espaço no laboratório para realização de experimentos bioquímicos. Além, do incentivo e a sua cobrança pertinente por resultados, mesmo eu não sendo seu orientando!

À Profa Dra Daniela Garçon (UFTM) pelo incentivo e ajuda na minha vinda à Ribeirão Preto - SP. E pela atenção mesmo estando distante, corrigindo e dando sugestões na minha escrita.

Ao Prof. Dr. Fernando Mantelatto, pois sem sua ajuda nas coletas, tudo teria sido mais difícil. Como agradeço também a sua aluna Raquel Buranelli.

Ao Prof. Dr. John McNamara, pelo uso do espaço e equipamentos pertinentes aos ensaios de biologia molecular. E acima de tudo, pelo acolhimento em seu laboratório na hora que estive mais debilitado e sem "teto". Serei eternamente grato!

Aos professores Carlos Frederico L. Fontes e Júlio Mignaco, ambos do Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas e ATPases, CCS / UFRJ, pela confiança, autorizando meu livre acesso às dependências desse laboratório; bem como o apoio técnico da Geysa e Mônica.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida, do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, UNESP / São José do Rio Preto, pelo uso de equipamentos, e a Profa Dra Andréia Felício pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas pertinentes aos ensaios bioquímicos do estresse oxidativo contidos nesse trabalho.

Aos professores Pietro Ciancaglini e Abel do Cefer, sou eternamente grato por essa orientação em recursos humanos que ultrapassa a tese, contribuindo assim para o meu futuro profissional/acadêmico/didático, seguirei vossos exemplos!

Aos membros do Laboratório de Fisiologia de Crustáceos (Anieli, Mariana, Susie e Milene) gostaria de agradecer por me ensinarem o verdadeiro significado do trabalho em grupo, e pelo acolhimento e simpatia na sala de estudos!

Ao amigo Rogério Faleiros, pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas pertinentes à aos ensaios de biologia molecular contidos nesse trabalho.

À doutoranda Profa Elise Marques (IFRO), pela amizade sincera, pelas inúmeras conversas e conselhos. Obrigada por tudo, minha grande amiga!

Ao Nilton R. Alves pelo suporte técnico em várias etapas deste trabalho. Ao Prof. Dr. Marcelo Pinto pela companhia e auxílio no ano inicial do meu doutorado.

Aos estudantes e aos membros do Programa de Pós-Graduação em Química, FFCLRP/USP, na pessoa da coordenadora e do seu vice: Profa Dra Adalgiza Rodrigues e Prof. Dr. Daniel Dorta; e a Sec. Lâmia, meus sinceros agradecimentos!

Aos professores, técnicos de laboratório e funcionários do Departamento de Química da FFCLRP/USP, pelo apoio e auxílio sempre que necessário, além de terem também contribuído para minha formação.

Ao Dr. Atílio Eugênio Neto e a Érica Rovani Matioli, pela ajuda médica e psicológica, pois graças à vocês, estou me recuperando da saúde física e mental!

Aos meus amigos André Riul, Bruno Favarin, Alex, Daniel, Cesar Colômbia, Túlio Agostinho, Murilo, Joãozinho, Welligton, Wiliam, Netinho, Rafael, Lucas, Marcos, P.C., André da Física e Fabrício da Bio, pela amizade arretada!

Aos colegas de laboratório pelo bom relacionamento e ajuda sempre que foi preciso. Em especial ao amigo Marco Aurélio, que ao sair do laboratório tentou abrir "meus olhos", mas sempre se fez presente e preocupado comigo!

Às amigas-irmãs Camila Fontes e Bussola, Marcinha, Milinha, Nayara, Bruna, Thaís, Thalita, Brenda, Maila Agostinho, Michele, Malú, Amanda e Gília, pela amizade, e ajuda sempre que foi preciso e possível.

Agradeço aos meus tios (as), primos(as), e em especial aos meus irmãos amados, as gêmeas Damiana e Daniele, e o caçula Denis, cúmplices e companheiros de sangue pra vida inteira!

Aos professores Rafael Guerra, Edgard Sibrão, Carlos Gadelha e Tatiane Santi, todos da UFPB, pois mesmo estando distantes nunca deixaram de torcer por mim!

À Família Toquemada Guerra pelo carinho e acolhida familiar em Ribeirão!

E por fim, sou muito grato a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho, meu valioso **OBRIGADO!!!**

ABREVIATURAS

[γ - ^{32}P]-ATP: adenosina trifosfatada marcada com fósforo radioativo

[γ - ^{32}P]: fósforo marcado radiativamente

ADP: adenosina 5' difosfato

ATP: adenosina 5' trifosfato

ATPase: adenosina 5' trifosfatase

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

CAT: catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

Da: Dalton

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acético

EROD: 7-etóxi-resorufina-O-deetilase

ERO: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

GST: glutathione S-transferase

G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAP: 3-fosfogliceraldeído

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Hepes: ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-etanol sulfônico

K_M : constante de Michaelis-Menten

K_i : constante de inibição

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

LDH: lactato desidrogenase

mOsm Kg^{-1} : miliosmol por quilograma

n_H : número de Hill

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NBT: nitroblue tetrazolium

PCR: reação em cadeia da polimerase

Pi: fosfato inorgânico

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

PNFF: p-nitrofenilfosfato

PNFFase: p-nitrofenilfosfatase

PQ: piruvato quinase

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SDS: dodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

tBOOH: ter-butil hidroperóxido

TEA: trietanolamina

Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

v: velocidade inicial

V: velocidade máxima

‰ S: partes por mil de salinidade

RESUMO:

FARIAS, D.L. **Caracterização cinética e molecular da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase do tecido branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825).** 228p. Tese de Doutorado - FFCLRP - Departamento de Química - Universidade de São Paulo. 2017.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase é uma proteína integral da membrana plasmática que está sujeita a uma complexa regulação. Na fauna dos manguezais, dentre os crustáceos se destaca o caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825), um crustáceo decápode que desempenha um papel significativo na dinâmica deste ecossistema, considerado relevante recurso pesqueiro. Este estudo fornece o efeito das poliaminas, das enzimas do estresse oxidativo, da toxicidade do amônio, e também investiga atividade K^+ -fosfatase e atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase por estimulação sinérgica de K^+/NH_4^+ e NH_4^+/K^+ na fração microsomal de brânquias do guaiamum. A atividade K^+ -fosfatase e a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase foram determinadas continuamente, a 25°C , em um espectrofotômetro Shimadzu U1800 equipado com células termostatizadas. Todos os experimentos foram feitos em duplicata utilizando-se pelo menos três preparações diferentes ($N \geq 3$). A atividade PNFFase insensível à ouabaína representa 40% da atividade PNFFase total, e valor do K_I foi de $370,0 \pm 18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A atividade específica máxima estimada foi de $29,30 \pm 1,46 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e o $K_M = 2,90 \pm 0,14 \text{ mmol L}^{-1}$. Por outro lado, a utilização do substrato fisiológico (ATP) permitiu a determinação de parâmetros cinéticos da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase em relação aos moduladores ATP, potássio, sódio, magnésio, amônio e, ouabaína. A atividade ATPase total na fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16% S) foi aproximadamente $166 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e uma atividade ATPase insensível à ouabaína de $26,55 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, enquanto que aclimatado a 22% S a atividade ATPase total foi de $303,28 \pm 15,16 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e a atividade insensível à ouabaína de $68,60 \pm 3,43 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase presente nessas duas preparações, não apresentam uma estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ . Houve alterações na afinidade da enzima para o ATP nas três diferentes concentrações de NH_4Cl (120 mg/L; 240 mg/L; 360 mg/L) em comparação com o controle sem NH_4Cl ($K_M = 0,1 \pm 0,005 \text{ mmol L}^{-1}$). Não foram observados efeitos significativos utilizando aminas biogênicas. Nossas análises mostraram também que as enzimas do estresse oxidativo estão atuando nestas diferentes preparações para combater os oxirradicais. Análise por Western blotting com anticorpo monoclonal revelou a presença de uma banda correspondente a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase com massa molecular $\approx 110 \text{ kDa}$. A imunolocalização mostrou que a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase encontra-se predominantemente distribuída por todo o citoplasma das células pilares branquiais, incluindo a região apical abaixo da cutícula. Identificamos o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*. O estudo demonstrou que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase constitui um importante regulador da osmorregulação nesta espécie, contribuindo para um melhor entendimento dos papéis exercidos por essa enzima nos processos de osmorregulação e excreção de amônia nos crustáceos.

ABSTRACT:

The (Na⁺,K⁺)-ATPase is an integral plasma membrane protein that is subject to complex regulation. In the mangrove fauna, the crustaceans include *Cardisoma guanhumi* crab (Latreille, 1825), a decapod crustacean that plays a significant role in the dynamics of this ecosystem, considered a relevant fishing resource. This study provides the effect of polyamines, oxidative stress enzymes, ammonium toxicity, and also investigates K⁺-phosphatase activity and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by synergistic K⁺/NH₄⁺ and NH₄⁺/K⁺ stimulation in the microsomal fraction of guaiamum gills. The K⁺-phosphatase activity and (Na⁺,K⁺)-ATPase activity were determined continuously at 25°C on a Shimadzu U1800 spectrophotometer equipped with thermostated cells. All experiments were done in duplicate using at least three different preparations (N ≥ 3). The PNFFase activity insensitive to ouabain represents 40% of the total PNFFase activity, and K_i value was 370,0 ± 18,5 μmol L⁻¹. The maximum specific activity estimated was 29.30 ± 1.46 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ and K_M = 2.90 ± 0.14 mmol L⁻¹. On the other hand, the use of the physiological substrate (ATP) allowed the determination of kinetic parameters of the activity (Na⁺,K⁺)-ATPase in relation to the modulators ATP, potassium, sodium, magnesium, ammonium and ouabain. The total ATPase activity in the microsomal fraction of freshly caught *C. guanhumi* (16‰ S) gill tissue was approximately 166 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ and a 26.55 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ ouabain ATPase activity, while acclimated at 22 ‰ S the total ATPase activity was 303.28 ± 15.16 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ and the ouabain insensitive activity of 68.60 ± 3.43 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. The (Na⁺,K⁺)-ATPase present in these two preparations, do not present a synergistic stimulation by K⁺ and NH₄⁺. There were changes in the enzyme affinity for ATP at the three different concentrations of NH₄Cl (120 mg / L, 240 mg / L, 360 mg / L) compared to the control without NH₄Cl (K_M = 0.1 ± 0.005 mmol L⁻¹). No significant effects were observed using biogenic amines. No significant effects were observed using biogenic amines. Our analyzes have also shown that oxidative stress enzymes are acting in these different preparations to combat oxirradicals. Analysis by Western blotting with monoclonal antibody revealed the presence of a band corresponding to sub subunit of (Na⁺,K⁺)-ATPase with molecular mass ≈ 110 kDa. Immunolocalization showed that the (Na⁺,K⁺)-ATPase sub subunit is predominantly distributed throughout the cytoplasm of the gill pillars, including the apical region below the cuticle. We identified the constitutive gene of the nucleotide partial sequence of the cDNA of ribosomal protein L10 (PRL10) of the gills of *Cardisoma guanhumi*. The study demonstrated that (Na⁺,K⁺)-ATPase is an important regulator of osmoregulation in this species, contributing to a better understanding of the roles played by this enzyme in the processes of osmoregulation and excretion of ammonia in crustaceans.

RESUMEN

La $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ es una proteína integral de la membrana plasmática que está sujeta a una compleja regulación. En la fauna de los manglares, dentro de los crustáceos se destaca el cangrejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825), un crustáceo decápodo que desempeña un papel significativo en la dinámica de este ecosistema, a su vez considerado como un relevante recurso pesquero. Este estudio presenta el efecto de las poliaminas de las enzimas del estrés oxidativo, de la toxicidad del amonio, y también investiga la actividad K^+ -fosfatasa y actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ por estimulación sinérgica de K^+/NH_4^+ y NH_4^+/K^+ en la fracción microsomal de branquias del guaiamum. La actividad K^+ -fosfatasa y la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ fueron determinadas continuamente a 25 °C, en un espectrofotómetro Shimadzu U1800 equipado con células termostáticas. Todos los experimentos fueron hechos en duplicado utilizando por lo menos tres preparaciones diferentes ($N \geq 3$). La actividad PNFFasa insensible a ouabaína representa 40% de la actividad PNFFasa total, y el valor del K_i fue de $370,0 \pm 18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. La actividad específica máxima estimada fue de $29,30 \pm 1,46 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y el $K_M = 2,90 \pm 0,14 \text{ mmol L}^{-1}$. Por otro lado, la utilización del sustrato fisiológico (ATP) permitió la determinación de parámetros cinéticos de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ en relación a los moduladores ATP, potasio, sodio, magnesio, amonio y ouabaína. La actividad ATPasa total en la fracción microsomal del tejido branquial de *C. guanhumi* recién capturado (16‰ S) fue aproximadamente $166 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y una actividad ATPasa insensible a ouabaína de $26,55 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, mientras que aclimatado a 22‰ S la actividad ATPasa total fue de $303,28 \pm 15,16 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y la actividad insensible a ouabaína de $68,60 \pm 3,43 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. La $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ presente en estas dos preparaciones, no presenta una estimulación sinérgica por K^+ e NH_4^+ . Existieron alteraciones en la afinidad de la enzima para el ATP en las tres concentraciones diferentes de NH_4Cl (120 mg/L; 240 mg/L; 360 mg/L) en comparación con el control sin NH_4Cl ($K_M = 0,1 \pm 0,005 \text{ mmol L}^{-1}$). No fueron observados efectos significativos utilizando aminos biogénicos. Nuestros análisis muestran también que las enzimas del estrés oxidativo están actuando en estas diferentes preparaciones para combatir los oxido-radicales. Análisis por Western blotting con anticuerpos monoclonales revelaron la presencia de una banda correspondiente a la subunidad α de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ con una masa molecular $\approx 110 \text{ kDa}$. La inmunolocalización mostró que la subunidad α de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ se encuentra predominantemente distribuida por todo el citoplasma de las células pilares branquiales, incluido la región apical debajo de la cutícula. Identificamos el gene constitutivo de la secuencia parcial de nucleótidos del cDNA de la proteína ribosomal L10 (PRL10) de las branquias de *Cardisoma guanhumi*. El estudio demostró que la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ constituye un importante regulador de la osmoregulación en esta especie, contribuyendo para un mejor entendimiento de los papeles ejercidos por esta enzima en los procesos de osmoregulación y excreción de amonio en los crustáceos.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 1. Sequência dos primers degenerados (NAK10F e NAK16R) e específicos baseados nas sequências de cDNA de <i>Carcinus maenas</i> (NaK_Cm_F e NaK_Cm_R) e <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (NaK_Pmamg_F1 e NaK_Pmamg_R1, NaK_Pmamg_F2 e NaK_Pmamg_R2) utilizados na tentativa de amplificar parcialmente a subunidade α da Na^+/K^+ -ATPase do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> . Sequência dos primers específicos baseados na sequência de cDNA de <i>Callinectes sapidus</i> (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R) para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10 utilizado como controle interno constitutivo para as análises de qPCR.	74
Tabela 2	Quantidade de cada solução para amostra, em branco 1, 2 e 3 (SOD Assay Kit-WST da Sigma-Aldrich).	79
Tabela 3	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase pelo PNFF, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	90
Tabela 4	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) pelos íons potássio e amônio.	97
Tabela 5	Valores da constante de inibição, K_i , da atividade K^+ -fosfatase pela ouabaína, ortovanadato e sódio.	99
Tabela 6	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na^+,K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) pelo ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ .	112
Tabela 7	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S), pelo K^+ e NH_4^+ .	113
Tabela 8	Efeito de vários inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	124

Tabela 9	Sequências provenientes do GenBank formadas por 251 pb, de diversas espécies de caranguejos, com dados moleculares da proteína ribossomal L10 (PRL10) obtidos do tecido branquial.	127
Tabela 10	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatado à salinidade de 22‰, pelo ATP, Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ e NH ₄ ⁺ .	136
Tabela 11	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S pelos íons potássio e amônio.	142
Tabela 12	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação de ATP sobre atividade da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> submetidos a estresse de amônio.	148
Tabela 13	Estimulação da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase branquial de <i>C. guanhumi</i> pelo FXYD2.	153
Tabela 14	Atividade das enzimas de estresse oxidativo na fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	155
Tabela 15	Osmolalidade na hemolinfa de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição das brânquias no <i>Cardisoma guanhumi</i> (LATREILLE, 1825). Inserção: dimensões de uma brânquia do caranguejo.	30
Figura 2	Morfologia e estrutura fina das brânquias dos caranguejos. 1 – cutícula; 2 – células principais; 3 – células pilastra; 4 – espaço da hemolinfa ; 5 – septo intralamelar (Modificado de ONKEN & RIESTENPATT, 1998).	31
Figura 3	Esquema da estrutura das subunidades da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (modificado de HORISBERGER, 2004).	36
Figura 4	Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Modificado de Horisberger, 2004).	40
Figura 5	Modelo para a excreção ativa de amônia através das brânquias do siri eurialino <i>C. danae</i> . (1) Uma $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ localizada na membrana basolateral, que apresenta segundo sítio de ligação para o NH_4^+ quando está totalmente saturada com K^+ . (2) canais K^+ sensíveis ao Cs^+ localizados na membrana basolateral, não discriminam entre K^+ e NH_4^+ . (3) junção septada. (4) Transportador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ (H^+), localizado na membrana apical, ativo particularmente durante a extrusão transcelular de NH_4^+ . (5) Canais permeáveis a cátions sensíveis a amilorida, presentes na cutícula permitem a difusão de NH_4^+ para o meio externo. (6) Uma V-ATPase e (7) uma proteína análoga a Rhesus de mamíferos que participam da excreção (Modificado de MASUI et al., 2005).	49
Figura 6	Esquema das principais enzimas antioxidantes (retirado de <i>Nature Protocols</i> 5: 51-66 (2014)).	52
Figura 7	Estrutura molecular das aminas biogênicas. A- dopamina; B- Octopamina; C- putrescina; D- espermidina; E- espermina (Fonte: Sigma Aldrich).	54
Figura 8	Foto do caranguejo <i>Cardisoma guanhumi</i> (LATREILLE, 1825).	57
Figura 9	Atividade da SOD acoplada à redução do citocromo c (Journal of Biological Chemistry 244: 6049 (1969)).	78

Figura 10	Localização subcelular da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	85
Figura 11	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western-blotting da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	86
Figura 12	Centrifugação em gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	88
Figura 13	Efeito da concentração do PNFF na atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	91
Figura 14	Efeito dos íons magnésio na atividade K^+ -fosfatase na $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	92
Figura 15	Efeito dos íons potássio na atividade K^+ -fosfatase na $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	93
Figura 16	Efeito dos íons amônio na atividade K^+ -fosfatase na $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	94
Figura 17	Efeito da concentração dos íons amônio na estimulação da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) pelo K^+ .	95
Figura 18	Efeito da concentração dos íons potássio na estimulação da atividade K^+ -fosfatase do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) pelo NH_4^+ .	96
Figura 19	Efeito da concentração dos íons sódio na atividade PNFFase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	100
Figura 20	Efeito da concentração de ouabaína na atividade PNFFase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	101

Figura 21	Efeito da concentração do ortovanadato na atividade PNFFase na (Na^+, K^+)-ATPase de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	102
Figura 22	Efeito da concentração do Mn^{2+} sobre a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	103
Figura 23	Efeito da concentração do Hg^{2+} na atividade K^+ -fosfatase na (Na^+, K^+)-ATPase de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	104
Figura 24	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	107
Figura 25	Efeito da concentração dos íons magnésio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	108
Figura 26	Efeito da concentração do sódio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	109
Figura 27	Efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	110
Figura 28	Efeito da concentração dos íons amônio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	111
Figura 29	Efeito da concentração do K^+ na modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S), na presença de NH_4^+ .	114
Figura 30	Efeito da concentração do NH_4^+ na modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S), na presença de K^+ .	115

Figura 31	Efeito da concentração de ouabaína na atividade da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	116
Figura 32	Efeito da concentração de putrescina sobre a atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	119
Figura 33	Efeito da concentração de espermidina sobre a atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	120
Figura 34	Efeito da concentração de espermina sobre a atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	121
Figura 35	Efeito da concentração de octopamina sobre a atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	122
Figura 36	Efeito da concentração de dopamina sobre a atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S).	123
Figura 37	Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação do RNA total extraído de <i>C. guanhumi</i> (raia 1), tratado com DNase I. As bandas (<100 pb) observadas em cada raia, representam os primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R utilizados. C- e C+ representam o controle negativo (em molde) e positivo (cDNA <i>Uca burgersi</i> , amplificação do fragmento de ≈ 300 pb), respectivamente. M é o marcador molecular “1 kb DNA Ladder Plus”.	128
Figura 38	Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação do gene PRL10 tendo como molde o cDNA produzido a partir da extração de RNA total das brânquias do caranguejo <i>Cardisoma guanhumi</i> (raia 1), na qual observa-se o produto esperado (≈ 300 pb) amplificado com os primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R em cada espécie, respectivamente. C- e C+ representam o controle negativo (sem molde) e positivo (cDNA <i>Uca burgersi</i>), respectivamente. M é o marcador molecular	129

“1 kb DNA Ladder Plus”.

- Figura 39** 130
Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação, com enzima Taq DNA polimerase High Fidelity, do gene PRL10 tendo como molde o cDNA produzido a partir da extração de RNA total da brânquia do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (raia 1), observa-se o produto esperado (≈ 300 pb) amplificado com os primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R em cada espécie, respectivamente. C- e C+ representam o controle negativo (sem molde) e positivo (cDNA *Uca burgersi*), respectivamente. M é o marcador molecular “1 kb DNA Ladder Plus”.
- Figura 40** 131
Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto das PCRs diagnóstico, com o par de primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R, das culturas de bactérias (5 μ l do inóculo após crescimento por 16 horas a 37°C e 180 rpm) candidatas a conterem os fragmentos de interesse (PRL10, ± 300 pb) inicialmente amplificados a partir do cDNA das brânquias de *Cardisoma guanhumi* (raias 1 e 2). N, controle negativo (sem molde). M, marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies).
- Figura 41** 132
Fenograma com base em semelhanças específico/genérico de várias espécies de caranguejos, comparadas com o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*.
- Figura 42** 134
Centrifugação em gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade.
- Figura 43** 137
Efeito da concentração do ATP sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

Figura 44	Efeito da concentração do Mg^{2+} sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	138
Figura 45	Efeito da concentração do Na^+ sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	139
Figura 46	Efeito da concentração do K^+ sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	140
Figura 47	Efeito da concentração do NH_4^+ sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	141
Figura 48	Efeito da concentração do K^+ na modulação da atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S, na presença de NH_4^+ .	144
Figura 49	Efeito da concentração do NH_4^+ na modulação da atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S, na presença de K^+ .	145
Figura 50	Efeito da concentração de ouabaína na atividade da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	146
Figura 51	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S e sem estresse de NH_4Cl (controle).	149
Figura 52	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 120 mg L^{-1} de NH_4Cl .	150
Figura 53	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 240 mg L^{-1} de NH_4Cl .	151

Figura 54	Efeito da concentração de ATP sobre a atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 360 mg L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	152
Figura 55	Efeito do K ⁺ na estabilidade da fosfoenzima (EP).	154
Figura 56	Efeito da atividade da enzima Catalase (CAT) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	157
Figura 57	Efeito da atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	158
Figura 58	Efeito da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	159
Figura 59	Efeito da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	160
Figura 60	Efeito da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	161
Figura 61	Efeito da atividade da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6FD) na fração microsomal do tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	162
Figura 62	Análises da osmolalidade na hemolinfa de <i>C. guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.	164

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A osmorregulação em crustáceos	28
1.2 A (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase: características gerais	32
1.3 A (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase em crustáceos	42
1.4 O efeito da salinidade em crustáceos	45
1.5 A excreção de amônio em crustáceos	47
1.6 Estresse oxidativo	50
1.7 Aminoácidos biogênicos	54
1.8 O caranguejo <i>Cardisoma guanhumi</i> (LATREILLE, 1825)	56

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais	60
2.2 Objetivos Específicos	60

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material	62
3.2 Coleta dos animais	63
3.3 Aclimação dos animais	63
3.4 Preparação da fração microsomal do tecido branquial	63
3.5 Dosagem de proteína	64
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida	64
3.7 Western-Blotting	64
3.8 Localização celular da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de <i>C. guanhumi</i>	65
3.9 Determinação da atividade K ⁺ -fosfatase da fração microsomal	66
3.10 Preparação da solução de ATP	67
3.11 Preparação do gliceraldeído-3-fosfato	67
3.12 Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento	67
3.13 Determinação da atividade ATPase	68
3.14 Determinação da atividade ATPase na presença de poliaminas	70
3.15 Preparação das soluções de inibidores	70
3.16 Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose	70
3.17 Síntese de [γ - ³² P] ATP	70
3.18 Desfosforilação da [γ - ³² P]ATP (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase por K ⁺	71

3.19 Extração do FXYP de rim de porco	71
3.20 Determinação da atividade (Na^+, K^+)-ATPase na presença de FXYP exógeno	71
3.21 Tratamento dos resultados cinéticos	72
3.22 Extração de RNA total de <i>Cardisoma guanhumi</i>	73
3.23 Síntese de cDNA (Transcrição reversa)	73
3.24 Purificação, clonagem dos fragmentos parciais de cDNA, sequenciamento e confecção dos primers específicos para Qpcr	75
3.25 Preparação das células quimiocompetentes	76
3.26 Preparação das amostras de tecido branquial para a análise das enzimas de estresse oxidativo	77
3.27 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	77
3.28 Determinação da atividade da catalase (CAT)	79
3.29 Determinação da atividade da glutathione redutase (GR)	79
3.30 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx)	80
3.31 Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)	81
3.32 Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	81
4. RESULTADOS	
4.1(Na^+, K^+)-ATPase BRANQUIAL DE <i>Cardisoma guanhumi</i> RECÉM-CAPTURADO (16‰ S)	84
4.1.1. Localização da (Na^+, K^+)-ATPase branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	84
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blotting da fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	84
4.1.3. Gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	87
4.1.4. Atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	87
4.1.5. Atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	105
4.1.6. Modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) por poliaminas	117
4.1.7. Efeito de diferentes inibidores na atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	118

4.1.8. Extração de RNA total, transcrição reversa (RT) do RNAm brânquial e amplificação dos fragmentos parciais de cDNAs	125
4.1.9. Alinhamento da sequência deduzida e análise de identidade (filogenia molecular)	126
4.2(Na⁺,K⁺)-ATPase BRANQUIAL DE <i>Cardisoma guanhumi</i> ACLIMATADO À 22‰ S	133
4.2.1. Gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatado à 22‰ de salinidade	133
4.2.2. Atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatado à 22‰ de salinidade	133
4.2.3. Efeito da aclimação em NH ₄ Cl na atividade da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatado à 22‰ S.	147
4.2.4. Regulação da atividade da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase pelo FXD2	153
4.2.5. Efeito do K ⁺ na estabilidade da fosfoenzima	153
4.2.6. Análises da atividade das enzimas de estresse oxidativo	155
4.2.7. Análises da osmolalidade na hemolinfa de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio	163
5. DISCUSSÃO	
5.1 - Estudo da fração microsomal de <i>C. guanhumi</i>	167
5.2 - Localização subcelular da (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase braquial de <i>Cardisoma guanhumi</i>	168
5.3 - Atividade PNFFase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado à 16‰ de salinidade	169
5.4 - Efeito de metais divalentes na atividade PNFFase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> recém-capturado à 16‰ de salinidade	173
5.5 - (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S) e aclimatado à 22‰ de salinidade	175
5.6 - Efeito das diferentes poliaminas na atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> recém-capturado (16‰ S)	179
5.7 - Extração de RNA total, transcrição reversa (RT) do RNAm, amplificação dos fragmentos parciais de cDNAs, alinhamento da sequência deduzida e análise de identidade (filogenia molecular) do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i>	182
5.8 - Osmolalidade na hemolinfa e atividade (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio	183

5.9 - Efeito na estabilidade de EP na presença de K^+ e regulação da (Na^+, K^+) -ATPase pela FXD2, com $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP da fração microsomal do tecido branquial de <i>C. guanhumi</i>	185
5.10 - Atividade das enzimas de estresse oxidativo na fração microsomal de tecido branquial de <i>Cardisoma guanhumi</i> aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio	187
6. CONCLUSÕES	193
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196
8. APÊNDICE	

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A osmorregulação em crustáceos

Os primeiros crustáceos surgiram no mar há aproximadamente 600 milhões de anos e ainda hoje constituem um grupo essencialmente marinho (BARNES, 2000). Durante a sua evolução, os crustáceos invadiram ambientes de menor salinidade (SCHUBART et al., 1998) o qual a constitui um grande desafio osmótico e iônico para esses animais, pois eles tendem a perder íons por difusão e ganhar água por osmose (PÉQUEUX, 1995).

Os crustáceos decápodes invadiram a água doce a cerca de 3,4 milhões de anos atrás (SCHUBART et al., 1998), também ocuparam e exploraram virtualmente todos os habitats disponíveis na Terra, desde o ambiente marinho até os desertos (McNAMARA & FARIA, 2012). Os crustáceos têm desenvolvido diversas estratégias osmorregulatórias que lhes permitem ocupar diferentes ambientes e habitats (PROSSER, 1973).

A sobrevivência desses animais em águas menos salgada é determinada pela capacidade osmorregulatória de cada espécie a qual é definida como a diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e a do meio externo (CHARMANTIER & SOYEZ, 1994). 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, 2001).

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 (FREIRE et al., 2008; SÁEZ et al., 2009). 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), juntamente com a participação da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ na captura de Na^+ do meio dulcículo (FREIRE et al., 2008).

Os crustáceos podem ser classificados quanto à capacidade de sobrevivência em ambientes de diferentes salinidades. Os *estenoalinos* toleram pequenas variações na

salinidade do meio externo, enquanto os *eurialinos* podem tolerar grandes variações (PÉQUEUX, 1995). Em relação à variação da concentração osmótica da hemolinfa os crustáceos são denominados *osmoconformadores*, quando mantêm a concentração osmótica da hemolinfa semelhante à do ambiente, ou *osmorreguladores*, quando a concentração osmótica da hemolinfa é mantida dentro de certos limites abaixo (hiporregulação) ou acima (hiperregulação) daquela encontrada no meio externo (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE, 2003). Os crustáceos hiperreguladores podem ser divididos em dois grupos: os reguladores fortes, capazes de hiperregular fortemente em água doce e passar toda a vida adulta neste ambiente, e os reguladores fracos que, embora sejam capazes de viver e hiperregular em meios diluídos, mal sobrevivem em água doce (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE et al., 2003; FREIRE et al., 2008).

A colonização da água doce e habitats com baixa salinidade por espécies marinhas constituem uma das mais desafiadoras transições evolucionárias que tem ocorrido durante a história da vida na Terra (LEE et al., 2011). Os crustáceos marinhos geralmente são osmoconformadores e estenoalinos, enquanto as espécies que colonizaram com sucesso a água doce apresentam graus variados de eurialinidade, além de mecanismos eficientes de hiperosmorregulação (PÉQUEUX, 1995; ONKEN & McNAMARA, 2002; LUCU & TOWLE, 2003). Qualquer espécie que tolera seus desafios osmóticos inerentes, pode tolerar um nicho estuarino que é rico em recursos naturais com pouca competição. Onde tais pressões no processo seletivo podem ter levado ao aparecimento de mecanismos bioquímicos e fisiológicos que permitem a sobrevivência em baixa salinidade (HENRY et al., 2012).

Vários estudos também têm demonstrado 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, 2004). Os principais compostos nitrogenados excretados pelos crustáceos estão sob a forma de amônia (NH_3^+), independentemente de ocuparem ambiente marinho ou de água doce (KORMANIK & CAMERON, 1981; WEIHRAUCH et al., 1998, 1999). A maior parte da excreção de metabólitos nitrogenados ocorre através das brânquias (REGNAULT, 1987; WEIHRAUCH et al., 1999; LUCU & TOWLE, 2003; FREIRE et al., 2008). Em *C. sapidus*, menos de 2% do total de amônia excretada é eliminada através da urina (CAMERON & BATTERTON, 1978).

Em crustáceos decápodes, as brânquias (**Figura 1**) estão localizadas nas câmaras branquiais encontradas em ambos os lados do cefalotórax e, constantemente, constituem apêndices posicionados entre a parede pleural e a branquiostegal (TAYLOR & TAYLOR, 1992). Seu fino epitélio possui diversos tipos diferentes de células, incluindo aquelas especializadas na troca de íons, os ionócitos (TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995). 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 um septo intralamelar (MANTEL & FARMER, 1983; BARRA et al., 1983; GOODMAN & CAVEY, 1990; MAINA, 1990; TAYLOR & TAYLOR, 1992; ONKEN et al., 1995; ONKEN & RISTENPATT, 1998).

Figura 1. Distribuição das brânquias no *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825). Inserção: dimensões de uma brânquia do caranguejo.

As brânquias dos crustáceos fornecem uma interface seletiva entre o ambiente externo e o *internal milieu* (meio interno), constituindo um órgão multifuncional que serve na troca do gás, transporte de osmólitos, excreção de resíduos nitrogenados, volume e regulação ácido-base (BURNETT et al., 1985; GILLES & PÉQUEUX, 1985;

HENRY & WHEATLY, 1992; TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995; WEIHRAUCH et al., 2004a; FREIRE et al., 2008; HENRY et al., 2012).

Nas membranas apicais, as células do tecido epitelial branquial apresentam um grande número de evaginações (**Figura 2**), 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; BARRA et al., 1983; COPELAND & FITZJARELL, 1968; CIOFFI, 1984; TOWLE, 1984; GILLES & PÉQUEUX, 1985; TOWLE & KAYS, 1986; PÉQUEUX, 1995). 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 & KAYS, 1986; TOWLE, 1993, 1997; PÉQUEUX, 1995).

Figura 2. Morfologia e estrutura fina das brânquias dos caranguejos. 1 – cutícula; 2 – células principais; 3 – células pilastra; 4 – espaço da hemolinfa ; 5 – septo intralamelar (Modificado de ONKEN & RIENTENPATT, 1998).

Dada a importância do controle osmo-iônico e a participação da (Na^+ , 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; TOWLE, 1993,1997; ONKEN & RIENTENPATT, 1998; ZARE & GREENAWAY, 1998; LIGNOT et al., 2000; FURRIEL et al., 2000). Dois processos

distintos fornecem, no geral, homeostase osmótica dos fluidos no corpo dos crustáceos: *regulação anisosmótica extracelular*, que mantém a osmolalidade, composição e volume da hemolinfa ou fluido extracelular; enquanto que a *regulação isosmótica intracelular* ajusta o volume e composição do fluido intracelular ou citosol (FLORKIN & SCHOFFENIELS, 1969; PÉQUEUX, 1995; LANG & WALDEGGER, 1997; WEHNER et al. 2003; HENRY et al., 2012). Estes diversos padrões de capacidade osmorregulatória são resultado da adaptação para condições ambientais específicas, deriva genética e seleção natural ou podem representar uma habilidade ancestral da espécie (McNAMARA & FARIA, 2012).

A capacidade osmorregulatória extracelular anisosmótica dos crustáceos depende do transporte transbranquial do Na^+ e Cl^- entre o ambiente externo e a hemolinfa (PÉQUEUX, 1995; KIRSCHNER, 2004; FREIRE et al., 2008; HENRY et al., 2012). Essa função regulatória é energeticamente conduzida pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ localizada na membrana basal dos ionócitos branquiais que trocam ativamente Na^+ e K^+ entre seu citosol e a hemolinfa (KIRSCHNER, 2004; FREIRE et al., 2008; SÁEZ et al., 2009).

Aparentemente, os processos de transporte transepitelial dos íons sódio e cloreto em ambiente de baixa salinidade envolvem a ação coordenada de vários sistemas de transporte localizados nas regiões apicais e basolateral do tecido branquial (PÉQUEUX, 1995; TOWLE, 1997; ZARE & GREENAWAY, 1998; ONKEN & RIESTENPATT, 1998). Sendo assim, tem sido sugerido a presença de diversos transportadores de íons, 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). Além disso, existem evidências que suportam a existência de canais de potássio na membrana basolateral e que permitiriam a manutenção dos níveis de K^+ (PÉQUEUX, 1995; ONKEN & RIESTENPATT, 1998; FREIRE et al., 2008). A distribuição desses carregadores na membrana dos ionócitos depende do nicho osmótico ocupado por cada espécie de crustáceo (McNAMARA & FARIA, 2012).

1.2. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$: características gerais

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (E.C.3.6.1.37), ou bomba de sódio-potássio é uma proteína integral existente na membrana plasmática da maioria dos eucariotos. Através da

hidrólise de uma molécula de ATP essa enzima transporta ativamente dois íons K^+ para o meio intracelular e três íons Na^+ para o meio extracelular (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003; APELL, 2004; TOUSTRUP-JENSEN & VILSEN, 2005; PEDERSEN, 2007; CHOURASIA & SASTRY, 2012; CLARKE & FAN, 2011).

O transporte efetuado por essa enzima estabelece um potencial eletroquímico através da membrana, essencial para manutenção do potencial de membrana e, portanto, para a atividade excitável dos músculos e tecido nervoso (HORISBERGER, 2004; MARTIN, 2005; DEMPSKI et al., 2005). O gradiente de sódio (representado pelo potencial químico), importante para a regulação do volume celular, pH e composição intra e extracelular de outros íons, é utilizado para energizar numerosos processos de transporte secundário, que suprem as células de glicose, aminoácidos, vitaminas e outros compostos essenciais (JORGENSEN & PEDERSEN, 2001; CAPENDEGUY & HORISBERGER, 2005; MORTH et al., 2007).

Até o presente momento, quatro classes de ATPases estão bem estabelecidas: as ATPases tipo P (AXELSEN & PALMGREN, 1998), ATPases tipo F, ATPases tipo V (PEDERSEN & AMZEL, 1993) e ATPases tipo ABC. Nos eucariotos superiores, as ATPases tipo P, V e F estão acopladas ao ATP através de uma relação dominante-submissa (master-slave relation ship), o que torna difícil a sua caracterização cinética em um dado tecido ou organismo (PEDERSEN & AMZEL, 1993). Essas proteínas estão presentes em todos os tipos celulares, e através deste mecanismo é possível efetuar o transporte de diversos íons como: Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} (FAGAN & SAIER, 1994).

O ciclo reacional das ATPases do tipo P é caracterizado pela formação de um intermediário fosforilado, onde o fosfato γ da molécula do ATP se liga a um resíduo de aspartato (D^{376}) da enzima. Além disso, as ATPases do tipo P, são divididas em subfamílias e, a (Na^+, K^+) -ATPase por transportar cátions de metais alcalinos é classificada como um membro da subfamília P_{IIC} ATPase, similarmente à (H^+) -ATPase (AXELSEN & PALMGREN, 1998; CRAMBERT et al., 2000; KAPLAN, 2002; PEDERSEN, 2007; PALMGREN & NISSEN, 2011). Essa classe de proteínas constitui uma importante família de enzimas homólogas responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions através das membranas celulares em eucariotos e procariotos.

A (Na^+, K^+) -ATPase é composta por duas subunidades denominadas α e β (1:1). A subunidade α possui massa molecular da ordem de 110 kDa (aproximadamente 1000

resíduos de aminoácidos) e é considerada a subunidade catalítica da enzima (PRESSLEY, 1996; HU & KAPLAN, 2000; DONNET et al., 2001; TOUSTRUP-JENSEN & VILSEN, 2005). Nela estão localizados os sítios de ligação do ATP, o sítio de fosforilação, bem como os aminoácidos essenciais para a ligação dos íons sódio e potássio (HORISBERGER, 2004; CAPENDEGUY & HORISBERGER, 2005).

As extremidades N-terminal (FELSENFELD & SWEADNER, 1988) e C-terminal (NING et al., 1993) da subunidade α estão voltadas para o meio intracelular (**Figura 3**). De acordo com os modelos mais recentes, a subunidade α apresenta dez segmentos transmembrana (DONNET et al., 2001; HORISBERGER, 2004; MORTH et al., 2007). Grande parte da subunidade α está localizada no citoplasma sob a forma de alças que dão origem a 3 domínios: o domínio “N” ou de ligação do nucleotídeo, o domínio “P” ou de fosforilação, formados pela alça citoplasmática entre os segmentos M4-M5 da subunidade α que contém o sítio de ligação do ATP e de fosforilação da enzima (JORGENSEN & PEDERSEN, 2001; HORISBERGER, 2004; MARTIN, 2005; MORTH et al., 2007). Um terceiro domínio, denominado “A” (ou domínio atuador), é formado pela união entre o segmento N-terminal e a alça citoplasmática entre os segmentos transmembrana M2 e M3 (JORGENSEN et al., 2003; HORISBERGER, 2004; TOUSTRUP-JENSEN & VILSEN, 2005; CAPENDEGUY & HORISBERGER, 2005; POULSEN et al., 2010).

A subunidade β é uma proteína de membrana do tipo II (**Figura 3**), que possui um único segmento transmembrana cuja extremidade N-terminal está voltada para o citoplasma (RICE et al., 2001; DEMPSKI et al., 2005). A subunidade β da (Na^+ , K^+)-ATPase apresenta massa molecular da ordem de 55 kDa e é composta de aproximadamente 370 aminoácidos (HORISBERGER, 2004; DEANE & WOO, 2005; COHEN et al., 2005). Com alto grau de glicosilação, conferindo resistência a proteases (SHINODA et al., 2009), a cadeia polipeptídica extracelular apresenta seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto intracadeia e que são essenciais para a atividade da enzima (KIRLEY, 1989; BAR SHIMON et al., 1998; KAPLAN, 2002; COHEN et al., 2005). Tem sido sugerido também que a subunidade β está intimamente envolvida com o transporte ativo de Na^+ e K^+ , uma vez que desestabiliza a oclusão do potássio e altera a afinidade da (Na^+ , K^+)-ATPase por esses íons (GATTO et al., 2001; KAPLAN, 2002; VAGIN et al., 2007).

O heterodímero $\alpha\beta$ é essencial para a atividade funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (JORGENSEN et al., 2003; HORISBERGER, 2004; MORTH et al., 2007). Aparentemente, a subunidade β funciona como uma chaperona específica, e a união entre as duas subunidades é importante para o enovelamento e inserção corretos da subunidade α na membrana (LAUGHERY et al., 2003; TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009). Uma vez ligada à subunidade α , a subunidade β também parece ser importante para a modulação da atividade hidrolítica da enzima pelos íons K^+ e Na^+ , bem como para a ligação e transporte destes íons (GATTO et al., 2001; KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003; MARTIN, 2005; SHINODA et al., 2009).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pode estar associada a uma terceira subunidade (subunidade γ ou FXYD2), uma proteína pertencente a família das proteínas FXYD. A subunidade γ foi a primeira proteína da família FXYD caracterizada em associação a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (FORBUSH et al., 1978; GEERING, 2008). Esse proteolípídeo de cerca de 60 resíduos de aminoácidos e Mr ao redor de 7 kDa se associa à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de maneira tecido-específica nos vertebrados (CRAMBERT et al., 2004; LUBARSKI et al., 2007) e apresenta apenas um segmento transmembrana (THERIEN & BLOSTEIN, 2000; FÜZESI et al., 2005). Sua extremidade N-terminal está voltada para o meio extracelular (**Figura 3**). Evidências recentes indicam que ela não é um componente essencial da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, embora atue como um regulador, modulando a afinidade da enzima pelo ATP bem como para os íons potássio e sódio (GEERING et al., 2003; LI et al., 2004; GARTY & KARLISH, 2005; SILVA et al., 2012). A FXYD2 se localiza adjacente aos segmentos M2-M6-M9 e, embora durante a mudança de conformação de E1-E2 a distância entre essas subunidades não varia, ocorre uma variação da distância entre FXYD2 e a subunidade β (DEMPSKI et al., 2008).

As proteínas FXYD são no total onze membros da família de proteínas presentes em mamíferos, são caracterizados por possuírem a sequência motif FXYD, dois resíduos de glicina conservados flanqueando o segmento transmembrana e um resíduo de serina (SWEADNER, 2000; GEERING, 2008). Além disso, vários autores mostraram que ocorre uma variação na expressão das isoformas desta subunidade, durante a aclimação de peixes a diferentes salinidades (TIPSMARK, 2008; WANG et al., 2008).

Figura 3. Esquema da estrutura das subunidades da (Na⁺,K⁺)-ATPase (modificado de HORISBERGER, 2004).

A subunidade γ modula as propriedades cinéticas e a estabilidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (GEERING, 2008; CIRRI et al., 2011; MISHRA et al., 2011; SHINDO et al., 2011; YONEDA et al., 2013) e controla tanto a atividade quanto a afinidade catiônica da enzima nos microsomos das brânquias dos crustáceos (SILVA et al., 2012). O peptídeo FXYD2 pode regular a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ modulando a estrutura efetiva na superfície eletrostática da membrana, próxima ao sítio de ligação de íons (GONG et al., 2015).

Já foram identificadas quatro isoformas da subunidade α para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de vertebrados (revisto por LINGREL et al., 2007). Isoformas homólogas da subunidade α dos vertebrados ainda não foram descritas nos invertebrados (EMERY et al., 1998), e mesmo com a identificação de duas isoformas nos camarões *Artemia salina* e *Artemia franciscana*, nenhuma corresponde às descritas nos vertebrados (MACÍAS et al., 1991; JORGENSEN & PEDERSEN, 2001). Também foram identificadas duas isoformas para *Pachygrapsus marmoratus*, a diferença se deve pela inserção de 81 nucleotídeos na porção N-terminal (JAYASUNDARA et al., 2007).

Com relação à subunidade β , as três isoformas de vertebrados denominadas de 1-3 diferem apenas no número de sítios de glicosilação (VAGIN et al., 2007). Entretanto 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^+ , ATP e à inibição por ouabaína, além de diferentes respostas a mensageiros secundários (BLANCO & MERCER, 1998; CRAMBERT et al., 2000; MOBASHERI et al., 2001; MIJATOVIC et al., 2007). A relevância fisiológica dessa diversidade de isoformas ainda não está esclarecida (PRESSLEY et al., 2005; PIERRE et al., 2008).

O mecanismo da reação de hidrólise do ATP acoplada ao transporte de íons pela (Na^+,K^+)-ATPase envolve mudanças conformacionais entre duas formas da enzima. A primeira, denominada E_1 , é caracterizada por apresentar uma alta afinidade por íons Na^+ citoplasmáticos; enquanto a outra, E_2 , é caracterizada pela alta afinidade por K^+ extracelular (JORGENSEN et al., 1998; POST, 2003; VILSEN, 1999; SCHEINER-BOBIS, 2002; MARTIN, 2005).

Na literatura, já foram publicadas quatro estruturas de (Na^+,K^+)-ATPase com resolução melhor que 5 Å, essas estruturas são: cristal da enzima renal de porco com 3,5 Å de resolução, na conformação $E_2.\text{Pi}.2\text{K}^+$ ([PDB] ID: 3B8E) (MORTH et al., 2007); cristal da enzima de glândula retal de tubarão com 2,4 Å de resolução, na conformação de baixa afinidade $E_2.2\text{K}^+.\text{MgF}_4^{2-}.\text{ouabaína}$ ([PDB] ID: 2ZXE); cristal da enzima de glândula retal de tubarão com 2,8 Å de resolução, na conformação de baixa afinidade a ouabaína, $E_2.2\text{K}^+.\text{MgF}_4^{2-}.\text{ouabaína}$ ([PDB] ID: 3A3Y) (OGAWA et al., 2009) e o cristal da enzima renal de porco com 4,6 Å de resolução, na conformação de alta afinidade a ouabaína, $E_2\text{P}.\text{nH}^+.\text{ouabaína}$ ([PDB] ID: 3N23) (YATIME et al., 2011).

Estudos de cristalografia da (Na^+,K^+)-ATPase de glândula retal de tubarão, com resolução de 2,4 Å, identificaram os aminoácidos essenciais para os sítios de ligação do K^+ . O sítio I é formado essencialmente por cinco átomos de oxigênio, um oxigênio da cadeia principal do resíduo de Thr⁷⁷⁹, três da cadeia lateral de Ser⁷⁸², Asn⁷⁸³, Asp⁸¹¹ e um oxigênio de uma molécula de água. O sítio II é coordenado por três grupos carbonila da cadeia principal (Val³²⁹, Ala³³⁰ e Val³³²), três ou quatro átomos de oxigênio da cadeia lateral (Asn⁷⁸³, Glu⁷⁸⁶, Asp⁸¹¹ e possivelmente Glu³³⁴) e nenhuma molécula de água (SHINODA et al., 2009; TOYOSHIMA et al., 2011).

As mudanças conformacionais entre as formas E_1 e E_2 da (Na^+,K^+) -ATPase estão intimamente associadas ao transporte dos cátions e acopladas à hidrólise do ATP (GATTO et al., 1997; POST, 2003; GOLDSHLEGER & KARLISH, 1999; JORGENSEN & PEDERSEN, 2001; KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003; HORISBERGER, 2004). Acredita-se que a ligação do ATP ao seu sítio e a sua consequente fosforilação/desfosforilação na subunidade α , desencadearia modificações conformacionais que seriam transmitidas aos sítios de ligação/oclusão de cátions no interior da membrana (GOLDSHLEGER & KARLISH, 1999; PEDERSEN et al., 2000; RICE et al., 2001).

Desta forma, mudanças conformacionais são provocadas pela ligação dos íons aos seus sítios nos segmentos transmembrana. Tais mudanças são transmitidas ao sítio de ligação do ATP no domínio globular citoplasmático, modulando a afinidade da enzima pelo substrato e a fosforilação do resíduo de aspartato (GATTO et al., 1997; APELL et al., 1998; KAPLAN et al., 1998; GOLDSHLEGER & KARLISH, 1999; RICE et al., 2001). Assim, mudanças conformacionais transmitidas à distância permitiriam a utilização da energia química liberada pela hidrólise do ATP para alteração da orientação e especificidade dos sítios para os íons sódio e potássio, realizando o transporte deles através da membrana (JORGENSEN et al., 1997; POST, 2003; GATTO et al., 1999; PEDERSEN et al., 2000; JORGENSEN & PEDERSEN, 2001; JORGENSEN et al., 2003). 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; JACOBSEN et al., 2002; HORISBERGER, 2004; MORTH et al., 2007).

A (Na^+,K^+) -ATPase é inibida especificamente por esteróides cardiotônicos (membros da classe dos digitálicos), dos quais a ouabaína é o mais representativo (CRAMBERT et al., 2004; NESHER et al., 2007). A região de interação enzima-ouabaína parece envolver múltiplos resíduos chaves na subunidade α e, em menor extensão, também na subunidade β (MIDDLETON et al., 2000; POST, 2003; RADKOV et al., 2007; MIJATOVIC et al., 2007). A ouabaína liga-se seletivamente com alta afinidade à forma E_2P e sua interação com a enzima envolve resíduos da subunidade α (OGAWA et al., 2009; YATIME et al., 2011; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ

et al., 2015), interagindo com a porção extracelular da enzima e inibindo o transporte de íons e a hidrólise de ATP (LINGREL et al., 1997; KASTURI et al., 1998; CRAMBERT et al., 2004; NESHER et al., 2007), sendo o Asp₁₂₁ o mais relevante, localizado no segmento M1 (OGAWA et al., 2009; SANDTNER et al., 2011; CORNELIUS et al., 2013; LAURSEN et al., 2015).

A forma fosforilada da enzima, na presença do íon K⁺ e a orientação do Val₃₂₉, mostra uma afinidade de ligação maior por ouabaína (KHALID et al., 2014), onde a mesma interage com a (Na⁺,K⁺)-ATPase a partir da superfície da membrana extracelular e seu sítio de ligação, inserido na membrana, localizado em uma cavidade formada por segmentos da transmembrana M1, M2, M4, M5 e M6, muito próximo ao sítio de ligação do K⁺ (OGAWA et al., 2009; YATIME et al., 2011; LAURSEN et al., 2015). Também tem sido demonstrado a seletividade das isoformas (Na⁺, K⁺)-ATPase por componentes tipo digital (DLCs) que não contêm grupos de açúcar (WEIGAND et al., 2014), porém o açúcar e as frações hidroxila do anel de esteróide são essenciais para a potencial ação da ouabaína (CORNELIUS et al., 2013).

De acordo com o modelo proposto por Horisberger (2004), o modelo é baseado em transições conformacionais entre dois estados conformacionais principais da enzima denominados E₁ e E₂ (**Figura 4**). A forma E₁ expõe o sítio de ligação do cátion para a região intracelular, possuindo alta afinidade por Na⁺ e ATP, já a forma E₂, tem alta afinidade por K⁺ extracelular (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003; HORISBERGER, 2004). Na etapa 1, a enzima na forma E₁ATP apresenta seus domínios citoplasmáticos A, N e P afastados, onde após a ligação dos três Na⁺ extracelulares aos seus sítios com alta afinidade, ocorre uma mudança de conformação importante. Na etapa 2, uma grande rotação o domínio N posiciona o fosfato γ do ATP para proximidade do sítio de fosforilação. Na etapa 3, 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 E₁P(3Na), na qual o domínio A também sofre simultaneamente rotação de aproximadamente 30°, induzindo uma mudança conformacional no interior do domínio transmembrana, resultando no fechamento do canal transiente e da oclusão dos íons Na⁺ ligados à enzima (TOYOSHIMA & MIZUTANI, 2011; SORENSEN et al., 2004). Já na etapa 4, este estado de alta energia E₁P(3Na) é rapidamente convertido em E₂P (2Na). Durante o ciclo catalítico, a conversão de E₁ para E₂ ocorre a exposição dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular. E na etapa 5, a redistribuição dos grupos diminui a afinidade pelo Na⁺ e se

dá a liberação do primeiro Na^+ para o meio extracelular, provocando um rearranjo do canal que libera os outros dois Na^+ .

Entretanto, na etapa 6, o sítio de ligação de cátions da forma E_2P é ocupado por dois K^+ extracelulares, resultando na desfosforilação do domínio P, onde se dá a etapa 7 do ciclo, com a oclusão dos íons ligados, devido o fechamento do canal transiente voltado para o meio extracelular. Já a etapa 8 surge com a ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N, promovendo 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. Por fim, na etapa 9 ocorre um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, ocasionando uma diminuição da afinidade da enzima pelo K^+ , que caracteriza a transição conformacional da forma $\text{E}_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $\text{E}_1\text{ATP}2\text{K}$. A etapa final (etapa 10) se dá com a liberação dos K^+ para o citosol, finalizando o ciclo de bombeamento (HORISBERGER, 2004) (**Figura 4**).

Figura 4. 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 cinéticas 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; MOBASHERI et al., 2000; LINGREL et al., 2003, 2007). 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).

Uma alternativa para os ensaios cinéticos é o uso de substratos sintéticos e, um muito utilizado para estudos cinéticos da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é o p-nitrofenilfosfato (PNFF), que é um éster de fosfato e após hidrólise produz um produto cromogênico, o p-nitrofenolato. A utilização deste substrato permite o ensaio da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, que baseia-se na hidrólise do PNFF pela enzima sem consequente transporte catiônico ou fosforilação enzimática (FURRIEL et al., 2001); facilitando o procedimento experimental, uma vez que não há a necessidade de utilizar um sistema de acoplamento, além de ser útil em estudos mecanísticos, tendo em vista que a conformação E_2 aparenta ser a responsável pela atividade K^+ -fosfatase.

Através de uma variedade de fatores, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ está sujeita a regulação de curto e longo prazo. A primeira delas envolve efeitos diretos no comportamento cinético da enzima ou na translocação da enzima entre a membrana plasmática e os locais de estoque intracelulares (EWART & KLIP, 1995; MIDDLETON, 1996; PEDEMONTE et al., 1997; THERIEN & BLOSTEIN, 2000; FERAILLE et al., 2003; VINCIGUERRA et al., 2005). Esta regulação também pode ser desencadeada pela fosforilação/desfosforilação da enzima, pela translocação de subunidades para a membrana plasmática ou então pelo aumento da afinidade da enzima pelo íon Na^+ . Já a regulação de longo prazo geralmente envolve mudanças na transcrição gênica, na translação bem como na degradação da proteína (MCDONOUGH & FARLEY, 1993; EWART & KLIP, 1995; MIDDLETON, 1996; SEOK et al., 1998; THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

1.3. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase em crustáceos

Para responder as mudanças do meio ambiente e manter uma relativa constância do seu meio interno em resposta as perturbações externas, os seres vivos desenvolveram uma habilidade fundamental, onde as células vivas ativaram uma série de sistemas de transportes presentes em sua membrana plasmática, como um esforço para manter a sua homeostase. A ligação da energia metabólica para a função celular e a sinalização entre as necessidades da célula dependem de uma distribuição assimétrica de íons através de sua membrana para os meios intra e extracelular. Sendo assim, o mecanismo que conhecemos como “Bomba de sódio” foi postulado por Dean (1941), a partir da observação que íons sódio de células musculares podiam ser trocados por íons de sódio radioativos adicionados ao meio de cultura. Anos depois, Gardos (1954) descobriu uma bomba de íons em células sanguíneas que era sustentada pela hidrólise de ATP (SCHEINER-BOBIS, 2002).

As pesquisas continuaram avançando, e na Universidade de Aarhus, interessado no estudo da ATPase da membrana de axônios gigantes de lula, um cientista dinamarquês chamado Jens Skou, não obteve acesso às lulas que precisaria para suas análises. E curiosamente, como alternativa, Skou isolou nervos a partir dos pereopodos do Caranguejo de Costa Verde, *Carcinus maenas* que, assim como o axônio gigante, carecem da bainha de mielina, e em 1957 com esses experimentos se descobriu a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase (SKOU, 1957). Ele homogeneizou os nervos do crustáceo e, após uma centrifugação diferencial, isolou uma fração da membrana, realizou medidas cineticamente sistemáticas dos efeitos combinados dos íons sódio e potássio, onde revelaram que a enzima tinha dois sítios de ligação, um sítio os íons sódio foram necessários para ativação, e no outro, os íons potássio ativaram a enzima depois da ligação de íons sódio (SKOU, 1957).

As ATPases são transportadores de membrana conhecidas como “Bombas” e realizam o transporte ativo primário de íons empregando a hidrólise de um grupo fosfato a partir da molécula ATP (POST, 2003). Elas são classificadas em quatro grupos principais: ATPases P, F, M e V(H^+) (PEDERSEN & AMZEL, 1993). A superfamília P-ATPase pode ser classificada em mais cinco famílias de acordo com o alinhamento de uma sequência conservada de 159 aminoácidos: O grupo II é o mais investigado e incluem o (Ca^{2+}) , $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ e a bomba (H^+, K^+) -ATPase (BUBLITZ et al., 2010; PALMGREN & NISSEN, 2011; CHOURASIA & SASTRY, 2012).

Os loops citoplasmáticos são organizados em três principais domínios: P ou domínio de fosforilação, o A ou domínio atuador e o N ou domínio de ligação do nucleotídeo (HORISBERGER, 2004; TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009; BUBLITZ et al., 2010; PALMGREN & NISSEN, 2011). O domínio A, formado por segmentos M2-M3, desempenha um papel importante na afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por ATP, agindo assim como um regulador (DALY et al., 1997; KAPLAN, 2002). O loop M4-M5 contém os domínios N e P que incluem resíduos de amino ácidos que são importantes para enzima na ligação ATP e o resíduo aspartato, o qual é fosforilado durante o ciclo catalítico da enzima (HEBERT et al., 2003; BELOGUS et al., 2009; BUBLITZ et al., 2010). A afinidade enzimática para o Na^+ é modulada pela interação entre a subunidade- α do C-terminal e o loop citoplasmático formado por segmentos M8-M9 e M5 (TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009; YARAGATUPALLI et al., 2009; MORTH et al., 2011). Resíduos do loop extracelular formados por segmentos M3-M4 influenciam fortemente a afinidade enzimática por K^+ , sugerindo, assim, um forte sítio de ligação para estes íons. A subunidade β , uma proteína membrana tipo II, altamente glicosilada, é constituída por um único segmento transmembrana cujo N-terminal é orientado ao citoplasma (COHEN et al., 2005; DURR et al., 2009; MORTH et al., 2007; 2011). Isso influencia a afinidade da subunidade α por Na^+ e K^+ e tem um grande domínio extracelular; a presença de açúcares confere estabilidade contra proteases (MARTIN, 2005; PURHONEN et al., 2006; MORTH et al., 2007).

Nos vertebrados, assim como nos crustáceos, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pode estar associada com um proteolípido com cerca de 60 resíduos aminoácidos e uma subunidade γ (ou peptídeo FXYD2), pertencente a família FXYD, com um tecido específico de proteínas exibindo um segmento único transmembrana adjacente aos segmentos M2-M6-M9 da subunidade α , cujos terminais N estão voltados para o meio extracelular (DEMPSKI et al., 2008; GEERING, 2008; MORTH et al., 2011). A subunidade γ modula as propriedades cinéticas e a estabilidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (GEERING, 2008; CIRRI et al., 2011; MISHRA et al., 2011; SHINDO et al., 2011; YONEDA et al., 2013) e controla tanto a atividade quanto a afinidade catiônica da enzima nos microsomos das brânquias dos crustáceos (SILVA et al., 2012). O peptídeo FXYD2 pode regular a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ modulando a estrutura efetiva na superfície eletrostática da membrana, próxima ao sítio de ligação de íons (GONG et al., 2015).

A ouabaína interage com a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ a partir da superfície da membrana extracelular e seu sítio de ligação, inserido na membrana, é localizado em uma cavidade

formada por segmentos da transmembrana M1, M2, M4, M5 e M6, muito próximo ao sítio de ligação do K^+ (OGAWA et al., 2009; YATIME et al., 2011; LAURSEN et al., 2015). Um sítio de ligação de alta afinidade por ouabaína tem sido identificado em estudos usando a enzima na conformação E_2 (YATIME et al., 2011). Estruturas obtidas na conformação E_1 tem possibilitado a identificação de sítios de ligação de Na^+ (KANAI et al., 2013; NYBLOM et al., 2013).

A (Na^+,K^+) -ATPase participa de uma variedade de processos de transporte ativo secundários e está sujeito a múltiplos mecanismos de regulação específicos de tecidos (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Tal regulação envolve uma serie de fatores complexos agindo a curto e longo prazo (GLYNN, 2002; PRESSLEY et al., 2005; MIJATOVIC et al., 2007). A regulação a curto prazo envolve efeitos diretos no comportamento cinético da enzima, na translocação da enzima a partir da membrana do plasma para locais de armazenamento intracelular e depende da ATP intra e extracelular, assim como de concentrações de Na^+ e K^+ (THERIEN & BLOSTEIN, 2000; FERAILLE et al., 2003). Ajustes também podem ser desencadeados por enzima, fosforilação / desfosforilação ou pelo aumento da afinidade por Na^+ (MIJATOVIC et al., 2007). Ajustes a longo prazo normalmente envolvem mudanças na transcrição do gene, estabilidade do RNA e translação, expressão de isoforma e degradação proteica (SEOK et al., 1998; THERIEN & BLOSTEIN, 2000; COLINA et al., 2010; KARITSKAYA et al., 2010; SOTTEJEAU et al., 2010).

Desde 1997, o grupo de pesquisa ao qual participo tem analisado a (Na^+,K^+) -ATPase em frações microssomais a partir das brânquias dos crustáceos como um marcador bioquímico para examinar a adaptação dessas espécies à ambientes de diferentes salinidades. Primeiro, caracterizamos a enzima a partir das brânquias do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (FURRIEL et al., 2000), mostrando que a preparação livre de detergente foi um material conveniente para examinar as propriedades da (Na^+,K^+) -ATPase *in vitro*, uma vez que, as interações nativas entre a enzima e a bicamada membranas são aparentemente preservadas.

Nossa caracterização cinética da (Na^+,K^+) -ATPase a partir da brânquia posterior de pescado fresco (33 ‰), caranguejo eurialino *Callinectes danae*, revelou um sítio de ligação de alta afinidade por ATP, similar a enzima no vertebrado (MASUI et al., 2002). Posteriormente, foi também demonstrado esse sítio nas enzimas do caranguejo eremita *Clibanarius vittatus* (GONÇALVES et al., 2006; LUCENA et al., 2012) e no camarão de água doce *M. amazonicum* (SANTOS et al., 2007) sugerindo que esse sítio de

ligação de alta afinidade por ATP é característico da enzima. Além disso, a aclimação do *C. danae* com salinidade de 15 ‰ levou ao desaparecimento dos sítios de alta afinidade por ATP (MASUI et al., 2009).

Nosso grupo foi o pioneiro em descrever a estimulação sinérgica nos crustáceos, a partir do estudo da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial pelo K⁺ (ou NH₄⁺) e NH₄⁺ (ou K⁺) do caranguejo azul *Callinectes danae* (MASUI et al., 2002; 2005a). Exceto para o caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* (FURRIEL et al., 2010), porém o estímulo sinérgico de espécies específicas pelo NH₄⁺ mais o K⁺ ocorre em vários crustáceos: *M. amazonicum* (SANTOS et al., 2007; LEONE et al., 2014), *M. olfersi* (FURRIEL et al., 2004), *M. rosenbergii* (FRANÇA et al., 2013), *Clibanarius vittatus* (GONÇALVES et al., 2006; LUCENA et al., 2012), *Callinectes ornatus* (GARÇON et al., 2007; 2009) e o *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2015a).

Nós também realizamos uma caracterização cinética da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase na fração microsomal do tecido branquial de um caranguejo semi-terrestre do mangue, o *Cardisoma guanhumi* (FARIAS et al., 2017). E embora a (Na⁺, K⁺)-ATPase exiba uma alta especificidade para o ATP, ela também promove a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (GLYNN, 1985), que é semelhante à enzima no vertebrado, e onde caracterizamos uma atividade K⁺-fosfatase na fração microssomal da brânquia do camarão de água doce, *M. olfersi* (FURRIEL et al., 2001).

1.4. O efeito da salinidade em crustáceos

O reino animal abrange 30 filos, todos de origem marinha. Desses, 16 tem ocupado com sucesso a água doce e sete filos tem conquistado o ambiente terrestre (LEE & BELL, 1999). A salinidade baixa e/ou variável representa uma barreira físico-química importante para a invasão de habitats osmoticamente exigentes, tais como os estuários (HENRY et al., 2012). Por outro lado, as vantagens evolutivas e ecológicas de explorar o ambiente estuarino consistem em seu habitat rico em nutrientes (GROSS, 1972).

Crustáceos *Eurialinos* toleram e sobrevivem em amplas variações da salinidade de seu ambiente externo, enquanto que crustáceos *Estenoalinos* são restritos a uma variação limitada da salinidade de seu ambiente (PÉQUEUX, 1995; RANDALL et al., 2000). Em relação a regulação osmótica de seu fluido corporal, os crustáceos tanto podem osmoconformar e/ou osmoregular (PÉQUEUX, 1995; LUCU et al., 2000). Em

certos limites, *osmoconformadores* mantêm a concentração osmótica de sua hemolinfa ou fluido extracelular similar a do ambiente. Osmoreguladores, ativamente, mantêm a osmolalidade de sua hemolinfa entre os limites específicos da espécie, sejam isosmótico ou com concentração abaixo ou acima de seu ambiente externo (PÉQUEUX, 1995; LUCU et al., 2000). Tais osmorreguladores podem também osmoconformar através das partes mais extremas de sua gama de tolerância à salinidade.

Em geral, alguns crustáceos apresentam alterações nas características das brânquias quando colocados em água com menor salinidade, que incluem, diminuição da permeabilidade da membrana para a água, menor perda de íons como consequência da diminuição da superfície epitelial da brânquia, desenvolvimento da membrana basolateral rica em mitocôndrias e aumento do espaço subcuticular (FREIRE et al., 2008; GENOVESE et al., 2004). A expressão de RNAm da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase nas brânquias posteriores é fortemente afetada pela variação da salinidade, aumentando em resposta à aclimação em baixa salinidade (LUQUET et al., 2005; LOVETT & WATTS, 2006). A aclimação também pode acarretar uma variação da isoforma expressa (JAYASUNDARA et al., 2007; JORGENSEN & AMAT, 2008) bem como a quantidade da enzima presente na membrana (MASUI et al., 2005b; GARÇON et al., 2009).

Durante a aclimação, a composição lipídica e a proporção de ácidos graxos também podem variar alterando a permeabilidade da membrana e influenciando a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase (PALACIOS & RACOTTA, 2007; HAVIV et al., 2007). A exposição de animais a meios diluídos pode provocar a diferenciação das células especializadas em trocas gasosas em células ionotransportadoras. Essa diferenciação ocorre pelo aumento da superfície basolateral devido as pregas, com consequente aumento da síntese de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase (LOVETT & WATTS, 2006).

Estudos recentes da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase nas brânquias de caranguejos eurialinos com capacidade hiperosmorreguladores descobriram que atividades enzimáticas, medida em homogeneizados ou em membranas purificadas, aumentaram significativamente em resposta a variação da salinidade (MANTEL & OLSON, 1976; TOWLE et al., 1976; SIEBERS et al., 1982). As evidências vieram a partir de estudos estruturais do epitélio das brânquias, que mostraram células diferenciadas com a área da superfície basal e apical bastante aumentada, elevada densidade mitocondrial na lamela posterior, mas sem nenhuma alteração na brânquia anterior (COPELAND & FITZJARRELL, 1968; GOODMAN & CAVEY, 1990; COMPÈRE et al., 1989).

Contudo, a variação da salinidade do meio provoca um efeito notável nos mecanismos fisiológicos dos crustáceos, permitindo que estes se adaptem a mudanças de ambiente, tornando-se alvos interessantes para o estudo dos processos ocorridos durante a alteração (aumento ou diminuição) da salinidade.

1.5. A excreção de amônio em crustáceos

Amônia, nitratos e nitritos são compostos essenciais de sustentação à vida, utilizados por muitos microrganismos aquáticos. Quando ionizadas, tais substâncias constituem formas comuns de nitrogênio inorgânico dissolvido, disponíveis em ecossistemas para os organismos aquáticos. No entanto, em excesso, estes íons afetam a abundância, distribuição e respostas fisiológicas dos organismos aquáticos, incluindo crustáceos decápodes. E esta é uma questão importante quando se considera o aumento de atividades antrópicas globais que aumentam disponibilidade de nitrogênio (ROMANO & ZENG, 2013; CAMARGO & ALONSO, 2006). Como exemplo, a exposição por longo prazo a amônia, torna o *Metacarcinus magister* totalmente incapaz de excretar ativamente a amônia por meio das brânquias (MARTIN et al., 2011). No *M. amazonicum*, o aumento da amônia nitrogenada total, aumenta a expressão mRNA na subunidade β da $V(H^+)$ -ATPase em 2,5 vezes. Enquanto que a expressão na subunidade α da (Na^+, K^+) -ATPase não sofre mudança (PINTO et al., 2016). Dessa forma, uma efetiva desintoxicação de amônia ou um sistema de excreção é essencial para manter as funções celulares e os níveis de amônia nas células e fluidos corporais dentro de uma faixa tolerável (WEIHRAUCH et al., 2004).

A (Na^+, K^+) -ATPase no caranguejo marinho *C. danae* é sinergisticamente estimulada pelo NH_4^+ e K^+ (MASUI et al., 2002, 2009), e no camarão de água doce *M. olfersi* responde de forma similar (FURRIEL et al., 2004), neste caso, sugerindo que em alta concentração de NH_4^+ a enzima expõe um novo sítio de ligação para o NH_4^+ , que, após a ligação, modula a atividade de bombeamento independente do K^+ . O estímulo sinérgico da (Na^+, K^+) -ATPase branquial do K^+ mais o NH_4^+ é vista também no *C. ornatus* (GARÇON et al., 2009). Enquanto cada íon estimula a atividade enzimática na presença do outro, o $K_{0.5}$ permanece sem ser afetado e as ligações de NH_4^+ parecem induzir mudanças conformacionais que afetam o V_M com efeitos menores no $K_{0.5}$ (FRANÇA et al., 2013; LUCENA et al., 2012).

Os subprodutos gerados durante o metabolismo de compostos nitrogenados, como aminoácidos e ácidos nucleicos, são constantemente tóxicos e não podem ser acumulados no corpo em níveis elevados sem que haja sérias consequências, como a morte de um organismo (RANDALL et al., 2000). A concentração de amônia em ambientes aquáticos é normalmente baixa devido a ação de bactérias (WEIHRAUCH et al., 1999). Entretanto, nesses ambientes existem amônio (NH_4^+) e amônia (NH_3), sendo esta última a forma mais tóxica, uma vez que se difunde facilmente através da membranas plasmática e para o sangue ou hemolinfa (WEIHRAUCH et al., 2004a). Enquanto a salinidade e a temperatura exercem um efeito menor sobre o NH_4^+ , a toxicidade da NH_3 é grandemente influenciado por estes dois importantes parâmetros ambientais (ROMANO & ZENG, 2010; LIN & CHEN, 2001).

A excreção de amônia através do epitélio branquial não é completamente entendida (WEIHRAUCH et al., 2004a). O modelo mais aceito sugere que a excreção branquial de NH_4^+ está relacionada com o transporte de sódio, e assim, os íons NH_4^+ passariam da hemolinfa para o interior das células do epitélio branquial através da (Na^+ , K^+)-ATPase na membrana basal, em substituição aos íons K^+ (WEIHRAUCH et al., 2004). Esse processo pode envolver também um transportador de amônio basolateral e/ou canais de K^+ sensíveis a Cs^+ (WEIHRAUCH et al., 2002).

Masui e colaboradores (2005) ampliaram o modelo proposto por Weihrauch et al., (2004), onde a (Na^+ , K^+)-ATPase é responsável por direcionar o transporte do íon amônio para o meio externo (**Figura 5**).

Como já foi dito, a maioria dos crustáceos aquáticos excretam amônia ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) por meio de seu epitélio branquial (RANDALL et al., 2000; REGNAULT, 1987), principalmente em sua forma iônica NH_4^+ . Porém a inibição do fluxo ativo transepitelial de NH_4^+ aplicado basalmente em várias espécies de caranguejo, em seu epitélio branquial sugere, fortemente, o envolvimento da (Na^+ , K^+)-ATPase nesse processo (LUCU et al., 1989; WEIHRAUCH et al., 1998, 1999). A habilidade para excretar amônia contra seu gradiente possui importantes consequências biológicas no que se refere ao habitat disponível aos crustáceos (WEIHRAUCH et al., 2004a).

Figura 5. Modelo para a excreção ativa de amônia através das brânquias do siri euralino *C. danae*. (1) Uma (Na^+ , K^+)-ATPase localizada na membrana basolateral, que apresenta segundo sítio de ligação para o NH_4^+ quando está totalmente saturada com K^+ . (2) canais K^+ sensíveis ao Cs^+ localizados na membrana basolateral, não discriminam entre K^+ e NH_4^+ . (3) junção septada. (4) Transportador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ (H^+), localizado na membrana apical, ativo particularmente durante a extrusão transcelular de NH_4^+ . (5) Canais permeáveis a cátions sensíveis a amilorida, presentes na cutícula permitem a difusão de NH_4^+ para o meio externo. (6) Uma V-ATPase e (7) uma proteína análoga a Rhesus de mamíferos que participam da excreção (Modificado de MASUI et al., 2005).

A atividade extra-pumping da (Na^+ , K^+)-ATPase é a principal força motriz no transporte de NH_4^+ para fora da célula, onde o íon amônio pode substituir o K^+ no transporte de Na^+ ou, ser transportado através de um segundo sítio, exposto quando a enzima está saturada com K^+ . No transporte do NH_4^+ para o citoplasma das células do epitélio branquial também estão presentes canais de K^+ , que não discriminam entre K^+ e NH_4^+ e um transportador de amônia Rhesus-like descrito, que pode mediar transferência de íons NH_4^+ através das membranas celulares (MASUI et al., 2005).

Apesar de excreção de amônia em invertebrados aquáticos ter sido considerado um processo estritamente passivo (KORMANIK & CAMERON, 1981), há evidência recente mostrando que a amônia é excretada ativamente e, quando necessário, contra um gradiente dirigido para dentro da água do mar, água salobra e crustáceos de água doce (WEIHRAUCH et al., 2004a). Embora a exposição à amônia afeta ontogênese,

crescimento, troca gasosa, o equilíbrio ácido-base e respostas imunológicas, comentários abrangentes sobre os efeitos tóxicos de amônia, suas consequências fisiológicas e mecanismos adaptativos nos crustáceos são poucos (ROMANO & ZENG, 2013).

1.6. Estresse oxidativo

Os níveis de compostos químicos lançados no meio ambiente vêm aumentando de forma alarmante com o decorrer dos anos, como resultado do aumento da atividade antropogênica, que pode comprometer à saúde dos seres vivos que o habitam (CAJARAVILLE et al., 2000). Há diferentes meios de estudar o nível de contaminação aquática, como por exemplo, os testes de toxicidade, a identificação e a quantificação dos poluentes presentes na água, no sedimento e nos organismos (VAN GESTEL & VAN BRUMMELEN, 1996). Porém desde 1970, pesquisadores argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físico-químicas e análises quantitativas dos poluentes, não são suficientes para a avaliação da qualidade da mesma, sendo necessárias também, análises biológicas (CAIRNS & PRATT, 1993).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas apartir da contaminação ambiental, tais como: o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($-OH$); que são formados e degradados por organismos aeróbios e são encontradas em concentrações fisiológicas no interior das células. As ERO são produzidas continuamente nos organismos pelos produtos finais da respiração celular, causando vários efeitos deletérios nas células, se o próprio organismo não der contas de balanceá-las (HALLIWELL, 1993; LEMAIRE & LIVINGSTONE, 1993). No caso dos organismos marinhos, os níveis de peroxidação de lipídeos têm sido usados como indicador de injúria causada pelas ERO, e como resposta a essas injúrias, as células secretam uma série de enzimas antioxidantes específicas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD), entre outras, que promovem a decomposição das ERO que foram produzidas (SIES et al., 1979; KEELING & SMITH, 1982; SIES, 1993; TAN et al., 1987; REED, 1986), além da glutathione S-transferase (GST) que é uma enzima de biotransformação de fase II, mas que tem uma atuação coadjuvante no sistema oxidante (VAN DER OOST et al., 2003).

A presença de oxigênio no ambiente celular é uma ameaça constante ao organismo, pois ele leva a geração de radicais livres (ROS), graças à respiração celular, a qual pode ser favorecida pelos íons ferro e cobre (KOURY & DONANGELO, 2003). Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e capacidade de atravessar as membranas celulares, tornando-se potencialmente tóxico. Excesso de radicais livres também podem atingir o núcleo celular e causar dano nas bases nitrogenadas, comprometendo a estabilidade genômica. A principal modificação ocorre quando $OH^\bullet$ atinge a base guanina e a transforma em uma base modificada denominada 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), que pode parear tanto com citosina quanto com adenina durante a síntese de DNA (SHIBUTANI et al., 1991).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Trata-se de um sistema complexo que compreende: a) inativação dos radicais livres de oxigênio por enzimas específicas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase); b) neutralização dos radicais eventualmente formados pela ação de substâncias com propriedades sequestradoras de radicais livres (vitamina E, GSH); e reparo dos lipídeos oxidados (glutaredoxina) (CLARKSON & THOMPSON, 2000; VERCESI, 2006). Os antioxidantes são definidos como qualquer substância, presente em menor concentração do que o substrato oxidável, capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste substrato diretamente ou auxiliando o sistema enzimático nesta função (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Quando a taxa de produção das ERO excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes, dizemos que então ocorre o estresse oxidativo, podendo levar a um aumento do dano oxidativo em diferentes alvos celulares (ALMEIDA et al., 2005). Dentre as mais variadas condições, uma das mais importantes é a exposição do organismo a hipóxia ou anóxia seguida de reoxigenação (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVIN, 2002) na qual as mudanças no metabolismo celular oxidativo são moduladas por mudanças na concentração do oxigênio. O sistema de defesa antioxidante tem sido dividido em enzimático e não-enzimático, onde o sistema não-enzimático é formado por substâncias antioxidantes de origem endógena ou dietética, incluindo, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são

compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (DEVARAJ et al., 2007; FITO et al., 2007).

O sistema de defesa enzimático inclui a SOD, a CAT e as peroxidases, das quais a GPx é a mais importante. A SOD converte o o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 enquanto a CAT e GPx converte a H_2O_2 em H_2O . Se a remoção da H_2O_2 falha por algum motivo ocorre então uma toxicidade direta resultante de danos mediados por H_2O_2 . Para funcionar com alta eficiência, a GPx necessita de várias enzimas secundárias incluindo a GR e a G6PD, além de cofatores incluindo a GSH, NADPH e a glicose-6-fosfato. Se a GR é inibida por algum motivo, as células não conseguem remover o H_2O_2 através do sistema glutathiona peroxidase e consequentemente os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) aumentam. Se a síntese da glutathiona é inibida quer através da via da glutathiona sintetase (GS) ou da via γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), a concentração da glutathiona diminui e a GPx não consegue remover o H_2O_2 . Se a CAT é inibida, as células não poderão remover o H_2O_2 . Finalmente, se a captação de glicose é inibida, ocasionando uma situação de falta de glicose induzida quimicamente, então a desintoxicação do H_2O_2 também será inibida (WEYDERT & CULLEN, 2010). O esquema presente na **figura 6** ilustra a participação dos principais tipos de enzimas antioxidantes intracelulares primárias em células de mamíferos e em alguns organismos aquáticos.

Figura 6. Esquema das principais enzimas antioxidantes (retirado de *Nature Protocols* 5: 51-66 (2014)).

A presença de oxigênio no ambiente celular constitui uma ameaça constante devido à geração de radicais livres (ROS), a qual pode ser favorecida pelos íons ferro e cobre (KOURY & DONANGELO, 2003). As mitocôndrias consomem de 85% a 90% de todo oxigênio da célula, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Pequenas flutuações na concentração destes oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados dessas espécies de oxigênio conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA (FERREIRA et al., 2003).

Embora estudos com crustáceos estejam basicamente relacionados a sua ecologia e produção, diversos estudos têm demonstrado que estes organismos absorvem e bioacumulam metais em seus tecidos (PÁEZ-OSUNA & RUIZ-FERNÁNDEZ, 1995; MÉNDEZ et al., 1997; PARK & PRESLEY, 1997; CARBONELL et al., 1998; FRANCESCONI et al., 1998; MARX & BRUNNER, 1998; CULSHAW et al., 2002; POURANG & DENNIS, 2005), além de pesticidas (GALINDO-REYES et al., 1999; GORNI & WEBER, 2004) e bifenilpoliclorados (PCBs) (BAZZANTI et al., 1997), sugerindo a utilização destes animais como bioindicadores de contaminação aquática em estudos ecotoxicológicos.

Ensaio bioquímico *in vitro en vivo* são constantemente aplicados em programas de avaliação ecotoxicológica, utilizando biomarcadores bioquímicos. Biomarcadores são definidos como alterações biológicas de caráter molecular, celular e fisiológica que expressam os efeitos tóxicos causados pela presença de um xenobiótico (WALKER, 1996; 1998). Dentre os biomarcadores mais utilizados destacam-se as enzimas que combatem o estresse oxidativo e as enzimas (NIYOGIET al., 2001; FITZPATRICK et al., 1997) e as enzimas de biotransformação (VAN DER OOST et al., 2003), entretanto poucos estudos são conhecidos para crustáceos (BALDWIN & LEBLANC, 1996; ISHIZUKA et al., 1998; BHAVAN & GERALDINE, 2001; GOWLAND et al., 2002; BEATTIE et al., 2003; PINHO et al., 2003; VINAGRE et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2005).

Os sistemas estuarinos, por representarem águas costeiras abertas, apresentam mudanças cíclicas bem características em relação ao oxigênio dissolvido uma vez que estão sujeitas a ação constante das marés. Assim, várias espécies de crustáceos estuarinos têm sido usadas nos estudos da resposta antioxidante (FREIRE et al., 2011), mas somente recentemente é que esse estudo tem sido associado ao efeito da variação da salinidade. Por outro lado, não tem sido relatado um modelo consistente em relação

ao efeito da salinidade na capacidade enzimática antioxidante e nos níveis de marcação do estresse oxidativo (FREIRE et al., 2011). Aparentemente, os efeitos relatados são espécie-específicos e dependem do habitat natural onde a hipo- ou hiper-salinidade podem afetar o balanço redox através da geração das ERO e da expressão de defesas antioxidantes (FREIRE et al., 2011).

1.7. Aminas biogênicas

As poliaminas são compostos nitrogenados básicos que resultam da descarboxilação de aminoácidos ou por traminação ou transaminação de aldeídos e quetonas (ASKAR & TREPTOW, 1986; MAIJALA & EEROLA, 1993). As aminas biogênicas (**Figura 7**) possuem funções variadas e a regulação da quantidade de poliaminas livres é essencial para o crescimento, desenvolvimento e equilíbrio fisiológico normais dos mamíferos (PEGG, 2009). Existem evidências de que estas poliaminas inibem a atividade da (Na^+, K^+)-ATPase em vários tecidos de vertebrados, provavelmente por se ligarem a resíduos de aminoácidos ácidos da enzima (HEINRICH-HIRSCH et al., 1977; ROBINSON et al., 1986, KUNTZWEILLER et al., 1995). Entretanto, os efeitos das poliaminas sobre a atividade da (Na^+, K^+)-ATPase ainda são controversos. Em células medulares do rim, as poliaminas provocam uma estimulação máxima da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase quando em concentrações da ordem de 1mmol L^{-1} e, acima dessas concentrações, apresentam efeitos inibitórios (CHARLTON & BAYLIS, 1990).

Figura 7. Estrutura molecular das aminas biogênicas. A- dopamina; B- Octopamina; C- putrescina; D- espermidina; E- espermina (Fonte: SigmaAldrich).

Dentre as aminas biogênicas biologicamente ativas pode-se destacar a putrescina, espermidina e espermina, que são pequenas moléculas orgânicas carregadas positivamente, que estão presentes em quase todas as células e desempenham um importante papel na síntese proteica, divisão celular e crescimento celular (WILLIAMS, 1997). Elas são amplamente distribuídas em todas as células procarióticas e eucarióticas e são diretamente ou indiretamente essenciais para funcionamento e proliferação celular (KALAC, 2009; PEGG, 2009; IARASHI & KASHIWAGI, 2010). A putrescina, uma diamina, atua como precursora da espermidina, uma tiamina, e da espermina, uma tetra amina (JANTARO et al., 2003; PEGG, 2009).

A espermidina diminui a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase no hipocampo de ratos (CARVALHO et al., 2012). Em *Artemiasp. nauplii*, a concentração de putrescina aumenta com a diminuição da salinidade do meio externo (WATTS et al., 1994) e a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase também diminui com o aumento dessa poliamina (LEE & WATTS et al., 1994). A exposição do siri *Callinectes sapidus* a uma salinidade de 35‰, resulta no aumento dos níveis de espermidina nos 6º e 7º pares de brânquias, ocorrendo também a diminuição da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase, embora não exista uma correlação direta entre o aumento dos níveis de poliaminas e a diminuição da atividade (LOVETT & WATTS, 1995). Aparentemente, essas moléculas inibem a atividade da bomba competindo com o sódio nos sítios de ligação desse metal, bem como inibindo a desfosforilação da enzima (SILVA et al., 2008a).

A atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase em *M. amazonicum* juvenis e adultos é inibida por espermidina (60-95%) e putrescina (40-70%), enquanto a espermina tem um efeito inibitório insignificante ($\approx 10\%$). A putrescina afeta a cinética de hidrólise de ATP e afinidade enzimática (K_M) para ATP em ambas as enzimas, (Na^+ , K^+)-ATPase e $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase. A espermidina aumenta a afinidade para o Mg^{2+} , enquanto que a putrescina diminui a afinidade do Mg^{2+} em ambas as enzimas (LUCENA et al., 2016).

A dopamina e a octopamina (STANGIER & CHANG, 1986), também estão envolvidas nos mecanismos de osmorregulação de vários crustáceos (FREIRE et al., 1995; LIU et al., 2008). A dopamina e octopamina também apresentam efeitos no sistema de troca Na^+/K^+ (LOVETT & WATTS, 1995). De acordo com Hong-Yu et al., (2008), a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase pode ser regulada por ativação/desativação de aminas biogênicas. Elas são liberadas por organismos aquáticos hiperreguladores e, através do cAMP mediam a fosforilação, estimulação e atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase e captação de NaCl.

Poliaminas são rigorosamente associadas com fosfolipídios (TONER et al., 1988) e com proteínas de membrana carregada com plasma (LIN et al., 2006; TASSONI et al., 1996), mas não com proteínas citoplasmáticas. No entanto, a espermina, em particular, interage com certos canais de íons (WILLIAMS, 1997). A espermina intracelular é responsável pela supressão intrínseca e pela retificação por meio de fortes canais de potássio retificadores de entrada conectando-os diretamente ao poro do canal iônico. Esses canais de K^+ regulam o potencial de descanso da membrana nas células excitáveis e não excitáveis e o limite de excitação de neurônios e células musculares (FICKER et al., 1994; LOPATIN et al., 1994).

Por serem complemente protonadas sob condições fisiológicas, poliaminas podem interagir com ácidos nucleicos (especialmente RNA), ATP, proteínas específicas e fosfolipídios (WATANABE et al., 1991; IGARASHI & KASHIWAGI, 2010). Elas são ubíquas e sua localização na célula não está restrita a estruturas ricas em RNA ou DNA. Elas também estão presentes na hemolinfa e na brânquia de crustáceos (PÉQUEUX et al., 2002).

1.8. O caranguejo *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825)

Os crustáceos constituem um grupo zoológico de grande sucesso evolutivo, quer pelo número de espécies, quer pela diversidade de habitats que ocupam. Apresentam grande variabilidade nos ciclos de vida, com diferentes estratégias de conquista dos ambientes (FRANSOZO & NEGREIROS-FRANSOZO, 1996). Entre tais ambientes, estão os manguezais, que constituem um ecossistema costeiro com distribuição tropical e subtropical, situado na confluência entre os ambientes terrestre e marinho e sujeito ao regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991). Tal condição o caracteriza como um ecossistema único, composto por variada fauna residente e migratória. Neste grupo, estão os crustáceos decápodes, que constituem um dos mais importantes componentes da fauna dos manguezais (COELHO et al., 2004), e entre eles se destaca o caranguejo *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825), popularmente conhecido como guaiamum, gaiamum, goiamum, guaiaimú, caranguejo do mato, caranguejo azul ou guaco (**Figura 8**). Esta espécie ocorre desde as Bermudas, Flórida, Golfo do México, América Central, Antilhas até a Costa Atlântica da América do Sul (MELO, 1996). No Brasil é encontrado do Ceará até Santa Catarina (BRANCO, 1990) e representam um importante recurso pesqueiro do Nordeste brasileiro.

A designação caranguejos terrestres quase sempre se referem aos representantes da família Gecarcinidae, cujos membros são todos terrestres, e onde se inclui o gênero *Cardisoma* (BARNES, 2000). A maioria desses animais vive em buracos ou debaixo de pedras. São também, em geral, noturnos. Seus olhos são geralmente bem desenvolvidos (BARNES, 2000). A espécie *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825) (**Figura 8**). tem como hábitat principal as áreas de manguezais, podendo ser encontrados em campos, florestas costeiras, ao longo de rios, pântanos, córregos, drenagens de canais e valas, tendo um limite de distribuição aproximadamente de cinco quilômetros de distância do mar (TAISSOUN, 1974).

Esse crustáceo possui hábito semi-terrestre, porém é considerado um caranguejo terrestre por apresentar significantes adaptações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que permitem que ele permaneça fora da água por longos períodos. Possuem também hábitos noturnos, construindo galerias perto do mar, sempre onde a água pode ser alcançada (MELO, 1996) e vivendo preferencialmente em áreas de transição entre o manguezal e o ambiente terrestre. Apresentam hábito alimentar onívoro consumindo folhas, sementes, frutas, pequenos organismos e até mesmo cadáveres (HERREID, 1963; HENNING, 1975).

Figura 8. Foto do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825).

O *C. guanhumi* é considerado de grande porte entre os crustáceos, atingindo comprimento máximo da carapaça em torno de 90 mm (FENNER, 1969). Caracteriza-se pelo crescimento muito lento e grande longevidade quando comparado a outros caranguejos. Até a fase adulta os indivíduos podem passar por 60 mudas e chegar aos 13 anos de idade (HENNING, 1975).

A captura de crustáceos vem aumentando drasticamente anualmente devido a grande demanda de consumo nas principais cidades do Nordeste brasileiro, tanto por populações locais como por turistas. Dado o valor econômico, populações de espécies habitantes de manguezais, como por exemplo, o *Ucides cordatus* e o *C. guanhumi* (o guaiamum), vem diminuindo de forma acelerada. Além da captura excessiva, essas populações têm sido também impactadas pela supressão direta e indireta do seu ecossistema (SOFFIATI, 2004), acarretando a consequente diminuição dos estoques naturais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Esse trabalho têm como objetivos o estudo sistemático e comparativo das propriedades cinéticas e moleculares da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825), (Processo FAPESP Nº 2013/00976-8).

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Preparação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial;
- 2) Caracterização cinética da atividade da enzima em relação aos ligantes ATP, PNPP, sódio, potássio, magnésio e amônio;
- 3) Análise da expressão de proteínas da preparação microsomal das brânquias;
- 4) Localização subcelular da enzima através de ensaios imunohistoquímicos;
- 5) Quantificação de enzimas que participam do estresse oxidativo em animais aclimatados em diferentes salinidades;
- 6) Estudo da formação da fosfoenzima;
- 7) Regulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pela FXVD2 exógeno;
- 8) Estudo da ação das poliaminas na atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

ATP (sal de Tris), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanol sulfônico (HEPES), ácido 2(N-morfolino) etano sulfônico (MES), imidazol, tris(hidroximetil) amino metano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, glicerol, ortovanadato de sódio, taspigargina, aurovertina B, bafilomicina A₁, alameticina, ácido etacrínico, teofilina, dopamina, octopamina, putrescina, espermidina, espermina, ácido etacrínico, agarose, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD⁺, NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), dietilpirocarbonato (DEPC), ampicilina, cloreto de colina, Tween 20, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 3-fosfoglicerato dietil acetal (GAP), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 1,4-dinitro clorobenzeno (CDNB), glutatona reduzida, glutatona oxidada (GSSG), glutatona redutase, glicose-6-fosfato, FAD, NADP, NADPH, hidroperóxido de terc-butila (t-BOOH) e 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (Spectra DAB) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). O padrão de peso molecular Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa) foi adquirido da Thermo Scientific (Rockford, USA). Trietanolamina, HCl, borato de sódio, sacarose, dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrogênio 30%, clorofórmio, isopropanol, etanol e ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany).

O coquetel de inibidores de protease (leupeptina 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, antipaina 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, benzamidina 1 mmol L^{-1} , pepstatina A 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e PSMF 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi adquirido da Calbiochem (Darmstadt, Germany). As membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) e a resina AG50WX-8 (Dowex 50H⁺) foram adquiridas da BioRad (Hercules, USA). O anticorpo monoclonal α -5 contra a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase de aves (todas as isoformas) foi adquirido do Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA). O anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase Sigma Chem Co. (St. Louis, USA). Trizol, H₂O₂, DNase, Superscript III, Pure Link Gel Extract kit, PCR 2.1 TOPO TA, X-galactosídeo, isopropil tiogalactosídeo (IPTC), meio LB broth base, Pure Link Plasmid mini kit foram adquiridos da Life Technologies (Carlsbad, USA). [γ -³²P]P_i foi adquirido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). As enzimas utilizadas na síntese do [γ -³²P]ATP foram adquiridas da Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água tratada

sucessivamente em aparelhos MilliRO e MilliQ (Merck Millipore, Billerica, USA). Todos os sais foram usados na forma de seus cloretos.

3.2. Coleta dos animais

Os espécimes de *Cardisoma guanhumi* foram coletados em manguezais de Ubatuba, no litoral norte do Estado de São Paulo (23°26'S, 45°02'W). Após a coleta, os animais foram transportados para o laboratório em tanques contendo água do local da captura (25-28°C) em quantidade suficiente para molhá-los sem cobri-los totalmente.

3.3. Aclimação dos animais

Considerando-se que a salinidade dos manguezais pode variar em função de vários fatores, após a coleta os animais foram aclimatados no laboratório por um período de 10 dias em tanques, contendo água com 22‰ S, a 28-30 °C. A salinidade da água foi ajustada pela diluição da água do mar (33‰ S) com água deionizada, sendo monitorada periodicamente com um refratômetro PZO-RL3 (Warszawa, Polônia). Durante o período de aclimação os animais foram alimentados em dias alternados com pedaços de camarão.

3.4. Preparação da fração microsomal do tecido branquial

Para cada homogeneizado, foram utilizados 4 a 8 caranguejos. Cada animal foi anestesiado por resfriamento em gelo picado e imediatamente sacrificado através da retirada completa da carapaça dorsal. Em seguida, o 6°, 7° e 8° pares de brânquias posteriores foram dissecados, utilizando uma pinça de ponta curva, e rapidamente transferidos para 10 mL de tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L⁻¹, EDTA 6 mmol L⁻¹), e mantidas em banho de gelo. O excesso de tampão foi retirado com o auxílio de papel de filtro e as brânquias foram pesadas. Após a adição do tampão de homogeneização (20 mL/g de tecido úmido), as brânquias foram cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas em um homogeneizador Potter, ajustado para 600 rpm. O homogeneizado foi centrifugado a 20000 ×g, a 4 °C, durante 35 min em uma centrífuga Sorvall RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo e o *pellet* resultante foi novamente

homogeneizado com um mesmo em volume de tampão de homogeneização e submetido à nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram misturados adequadamente e a suspensão resultante foi centrifugada a 100.000 ×g, a 4 °C durante 90 min, em uma ultracentrífuga Hitachi 55P72. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (fração microsomal) foi ressuspensão em tampão (6 mL/g de tecido úmido) imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L⁻¹. Alíquotas de 0,4 mL foram congeladas em uma mistura de gelo seco/acetona e armazenadas a -20 °C por um período não superior a 4 meses, sem perda significativa da atividade.

3.5. Dosagem de proteína

A concentração de proteína da preparação microsomal e das amostras utilizadas na dosagem das enzimas de estresse oxidativo foi determinada através dos procedimentos descritos por Read & Northcote (1981) e Bradford (1976), respectivamente, usando-se soroalbumina bovina como padrão.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese da fração microsomal em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de concentração de acrilamida de 5 a 20% conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando o padrão de peso molecular Multicolor Broad Range Protein Ladder. Após a eletroforese, o gel foi cortado em duas metades. Uma delas foi submetida a uma eletrotransferência e a outra foi corada com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Blum et al. (1987).

3.7. Western-Blotting

Após a eletroforese uma das metades do gel foi submetida a uma eletrotransferência em uma membrana de PVDF, de acordo com Towbin et al. (1979). Em seguida, a membrana foi incubada sob agitação constante durante 10 h, a 25 °C, com uma solução bloqueadora de leite desnatado 5% em tampão TBS-Tween (Tris.HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo Tween-20 0,05% e NaCl 150 mmol L⁻¹). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBS-Tween e a seguir adicionou-se o anticorpo monoclonal α -5 (diluição 1:10, na mesma solução), seguida de uma nova

incubação, 4 °C, durante 16 h. Após três lavagens em tampão TBS-Tween, a membrana foi incubada a 25 °C , durante 1 h, com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:1000 no mesmo tampão). A incorporação específica de anticorpo foi revelada com uma solução de SpectraTM DAB (1 pastilha foi dissolvida em 5,0 mL de água deionizada).

3.8. Localização celular da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *C. guanhumi*

As brânquias de *C. guanhumi* foram dissecadas e incubadas em solução fixadora contendo p-formaldeído 2% em PBS (Na₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 2 mmol L⁻¹, NaCl 137 mmol L⁻¹, KCl 2,7 mmol L⁻¹, 290 mOsm kg⁻¹ H₂O), pH 7,4, durante 1 h e então embebidas em Optimal Cutting Temperature Compound (Sakura, Tissue-Tek, Torrance, CA, USA). Criocortes de 10 µm de espessura foram obtidas transversalmente ao longo do eixo axial da lamela branquial usando um criostato Microm HM 505E (Walldorf, Germany), a -25 °C, e colocados em lâminas de vidro silanizadas (Bloom 225). Os criocortes foram pré-incubados durante 20 min com glicina 100 mmol L⁻¹ em PSB e em seguida incubados durante 10 min com solução bloqueadora contendo soralbumina bovina 1% e gelatina 0,1% em PBS.

A imunolocalização (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *C. guanhumi* foi realizada utilizando-se um anticorpo monoclonal IgG α-5. O anticorpo primário, diluído em PBS (1:1,75) foi colocado nas secções, que foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente em câmara úmida. Como controle negativo foram utilizadas secções incubadas em solução de bloqueio, sem o anticorpo primário. Após lavagem (6 vezes, durante 5 min cada, em solução de bloqueio para remover os anticorpos não ligados) as secções foram incubadas durante 45 min com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488-diluído 1:450 em PBS e, em seguida, lavados seis vezes, durante 5 min cada. Para localizar os núcleos, as secções foram coradas durante 20 min com DAPI diluído em PBS 1:200.

As secções foram montadas em meio de montagem Fluoromount-G com correções Knittel Starfrost e enxertos de cobertura (Bielefeld, Alemanha). Em seguida, foram observadas e fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência Olympus BX-50 (Olympus America Inc., Melville, NY) equipado com uma câmera de 2 Mb Slider SPOT RT3 25,4 (SPOTTM Imaging Solutions Inc., Sterling Heights, EUA). As secções foram observadas utilizando microscopia de contraste de interferência

diferencial e empregando-se comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 nm (DAPI) e 495/519 nm (Alexa-Fluor 488).

3.9. Determinação da atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal

A atividade K^+ -fosfatase foi determinada continuamente, a 25 °C, através da dosagem do íon p-nitrofenolato liberado ($\epsilon_{410 \text{ nm, pH } 7,5} = 13.160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em 410 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu U1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrões dos ensaios foram: tampão HEPES 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo PNFF 15 mmol L^{-1} , $MgCl_2$ 7 mmol L^{-1} e KCl 20 mmol L^{-1} e a preparação microsomal (10-30 μL dependendo da concentração de proteínas) em um volume final de 1,0 mL. A atividade também foi determinada nas condições descritas acima, porém na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} . A diferença entre os valores obtidos para a atividade PNFFase na ausência e na presença de ouabaína representa a atividade K^+ -fosfatase da (Na^+ , K^+)-ATPase. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional. Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante pelo menos 15 min, garantindo-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5% (condição de estado estacionário).

Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, nas condições padrões. A atividade PNFFase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alamecicina (1-20 $\mu g/mg$ de proteína), a 25 °C (BONNAFOUS et al., 1982; GOSTIMSKAYA et al., 2003). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se no meio de reação existem vesículas seladas. A linearidade da liberação do íon p-nitrofenolato também foi testada em relação à concentração da enzima (10-50 μg proteína total), garantindo-se que a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação sempre esteve dentro do intervalo linear de concentração. A velocidade da reação para cada ligante sempre foi estimada em duplicata usando alíquotas idênticas da mesma preparação microsomal. O valor médio das medidas duplicadas foram usados para ajustar cada curva de saturação, que foi repetida três vezes utilizando diferentes preparações microsomais (N= 3).

3.10. Preparação da solução de ATP

A solução estoque de ATP (100 mmol L^{-1}) foi preparada utilizando ATP sal de Tris. Esta solução foi neutralizada até pH 7,5 com trietanolamina ($d= 1,12 \text{ g mL}^{-1}$). Finalmente, a concentração da solução estoque de ATP foi acertada em 100 mmol L^{-1} através da determinação da absorbância em 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 7,0} = 15.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.11. Preparação do gliceraldeído-3-fosfato

A solução de gliceraldeído-3-fosfato 20 mmol L^{-1} , foi preparada imediatamente antes do uso através da hidrólise de 12,5 mg de 3-fosfogliceraldeído dietil em 1,0 mL de água ultrapura, com 75 μL de HCl concentrado ($d= 1,18 \text{ g mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em banho de água fervente durante 2 min e finalmente neutralizada até pH 7,5 com 25 μL de trietanolamina ($d= 1,12 \text{ g mL}^{-1}$).

3.12. Tratamento das enzimas dos sistemas de acoplamento

Suspensões cristalinas (500 μL) de LDH e PQ foram centrifugadas a $20.000 \times g$, a 4°C , durante 15 min em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 e o pellet foi ressuspenso em 500 μL de HEPES $71,4 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,5. A suspensão resultante foi transferida para um filtro Microcon YM-10 (Millipore) e lavada 5 vezes com o mesmo tampão por centrifugação a $14.000 \times g$, 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 $71,4 \text{ mM}$, pH 7,5.

Para o sistema FGQ/GAFDH, as suspensões das enzimas foram tratadas exatamente conforme descrito anteriormente utilizando o tampão HEPES $71,4 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,5, contendo ditiotreitol 1 mmol L^{-1} .

3.13. Determinação da atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada continuamente, a 25 °C, empregando-se o sistema de acoplamento PQ/LDH, nesse sistema a hidrólise do ATP é acoplada a oxidação do NADH (LEONE et al., 2014).

A oxidação do NADH a NAD⁺ foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Shimadzu U1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrão dos ensaios foram: tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U de PQ e 78 U de LDH, e a preparação microsomal (10-30 µL dependendo da concentração de proteína) em um volume final de 1,0 mL. A atividade ATPase também foi determinada em condições estequiométricas de concentrações de ATP e Mg.

Alternativamente também foi utilizado o sistema de acoplamento GAFDH/FGQ, onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD⁺, para estimar a atividade ATPase. A formação do NADH foi acompanhada em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e as condições padrão dos ensaios foram: tampão HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NH₄Cl 20 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ, e a preparação microsomal (10-30 µL dependendo da concentração de proteína) em um volume final de 1,0 mL.

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

A reação sempre foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação e controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante pelo menos 15 min, garantindo-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5% (condição de estado estacionário). Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, nas condições padrões.

A atividade ATPase também foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com alameticina ($1\text{-}20 \text{ }\mu\text{g/mg}$ de proteína), a 25°C (BONNAFOUS et al., 1982; GOSTIMSKAYA et al., 2003). A atividade ATPase foi testada quanto a linearidade em relação à quantidade de enzima ($10\text{-}50 \text{ }\mu\text{g}$ proteína total), garantindo-se que a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação sempre esteve dentro do intervalo linear de concentração. A velocidade da reação para cada ligante sempre foi estimada em duplicata usando alíquotas idênticas da mesma preparação microsomal. O valor médio das medidas duplicadas foi usado para ajustar cada curva de saturação, que foi repetida três vezes utilizando diferentes preparações microsomais ($N=3$). 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 ($N=3$).

3.14. Determinação da atividade ATPase na presença de poliaminas

A atividade ATPase foi determinada continuamente, a 25°C , conforme descrito anteriormente, em condições saturantes de ATP e dos ligantes Mg^{2+} , K^+ e Na^+ , após incubação durante 10 min com diferentes concentrações ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ - $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) das poliaminas exógenas putrescina, espermina, espermidina, octopamina e dopamina. A atividade ATPase também foi estimada na presença de cloreto de colina para excluir a influência da força iônica nos efeitos das poliaminas.

3.15. Preparação das soluções de inibidores

A solução estoque de ortovanadato de sódio 1 mmol L^{-1} foi preparada segundo Gordon (1991). Uma solução de concentração aproximadamente 1 mmol L^{-1} teve seu pH acertado em 10,0 e em seguida foi fervida em banho-maria até se tornar translúcida. Após resfriamento, o pH dessa solução foi novamente ajustado para 10,0 e a concentração final da solução foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH}10,0} = 3550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Após ajustar a concentração para 1 mmol L^{-1} , alíquotas de 1 mL foram congeladas em tubos Eppendorf e estocadas a -20°C até o momento de uso. A solução estoque de bafilomicina A_1 ($20,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e tapsigargina ($2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas em DMSO e as de ácido etacrínico (20 mmol L^{-1}) e aurovertina B (5 mmol L^{-1}) em etanol. Alíquotas de 1,0 mL foram estocadas em tubos Eppendorf a -20°C e descongeladas no momento do uso.

3.16. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota da fração microsomal (0,5 mL) contendo aproximadamente 4 mg de proteína foi aplicada em um gradiente contínuo de sacarose 10 a 50% (p/p) em tampão imidazol 20 mmol L^{-1} , pH 6,8 e centrifugada a $180.000 \times g$ em uma centrífuga Hitachi 55P-72 usando um rotor vertical (PV50T2), a 4°C , durante 2 h. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A atividade ATPase total e a concentração de proteína presente em cada fração foi determinada conforme descrito anteriormente. A percentagem de sacarose nos diferentes tubos foi realizada empregando-se um refratômetro de bancada RL3 (PZO, Polônia).

3.17. Síntese de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$

O $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ foi sintetizado a partir de ATP e $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{P}_i$ utilizando-se uma sequência de reações enzimáticas e purificado em uma coluna de cromatografia contendo resina Dowex AG100 conforme descrito por Maia et al. (1983). Após a cromatografia, as amostras foram reunidas, colocadas em banho de gelo e neutralizadas com tampão MES-Tris, pH 6,0 (volume adicionado: $\approx 10\%$ do volume total eluído da coluna). Finalmente o pH foi acertado em 7,0 com uma solução concentrada de Tris.

3.18. Desfosforilação da $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Na^+ , K^+)-ATPase por K^+

Após a fosforilação da (Na^+ , K^+)-ATPase por 0.02 mL de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1,25 mmol L^{-1} , durante 5 min, a 4 °C, conforme descrito anteriormente, e a desfosforilação da enzima foi acompanhada pela adição de K^+ (5×10^{-5} - 5×10^{-5} mol L^{-1}) durante 60 s, 0 °C. Decorridos os tempos pré-estabelecidos, a reação foi encerrada pela adição de 200 μL de ácido perclórico 200 mmol L^{-1} e o conteúdo de cada tubo foi filtrado em filtros de nitrocelulose, lavado duas vezes com 2 mL de ácido perclórico 200 mmol L^{-1} e quatro vezes com 2 mL de ácido perclórico 50 mmol L^{-1} . Após a completa secagem, cada filtro foi colocado em frascos de 10 mL contendo líquido de cintilação e o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ ligado a EP foi quantificado conforme descrito anteriormente. O experimento foi repetido três vezes (N= 3) usando diferentes preparações microsomais.

3.19. Extração do FXYP de rim de porco

O FXYP foi extraído a partir de uma preparação de (Na^+ , K^+)-ATPase obtida de rim de porco (CORTES et al., 2006). Em uma amostra de 180 μL de preparação de (Na^+ , K^+)-ATPase de rim de porco foram adicionados 1840 μL de clorofórmio, 1840 μL de metanol, 320 μL de bicarbonato de amônio 750 mmol L^{-1} , pH 7,5. Após agitação, a mistura foi centrifugada durante 1 min a 1000 $\times g$. O precipitado foi descartado e o clorofórmio e metanol presentes na suspensão contendo o FXYP foram, evaporados com jato de nitrogênio. O FXYP resultante foi suspenso em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7.5 e armazenado em -20 °C até o momento do uso.

3.20. Determinação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase na presença de FXYP exógeno

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase foi ensaiada estimando a taxa de libertação de $^{32}\text{P}_i$ a partir da hidrólise de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ pela enzima de acordo com Grubmeyer & Penefsky (1981) e Fontes et al. (1992). Uma amostra de 5 μg de enzima foi diluída em um volume final de 0,5 mL de tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo NaCl 50 mmol L^{-1} , KCl 30 mmol L^{-1} e MgCl_2 5 mmol L^{-1} . A solução foi incubada a 25 °C durante 60 min e a reação foi iniciada pela adição de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 2 mmol L^{-1} (atividade

específica 100 cpm/nmol). Finalmente, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido perclórico 0,4 mol L⁻¹ e os tubos foram imediatamente colocados em banho de gelo picado. Após a adição de 0,4 mL de carvão ativo, os tubos foram centrifugados a 700 ×g, a 4 °C, durante 5 min.

Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada do sobrenadante, colocada em filtros de papel Whatman e secada em temperatura ambiente. A radiatividade devida ao ³²Pi contido nos filtros foi quantificada utilizando-se um espectrômetro de cintilação líquida Packard Tri-Carb 2100 LSC. Os experimentos também foram realizados na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹ e, a diferença entre os valores obtidos na ausência e presença da ouabaína representa a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase.

Os experimentos também foram realizados na presença do FXYP previamente extraído como descrito anteriormente. O FXYP dissolvido em 300 µL de tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 foi descongelado e 30 µL dessa solução de FXYP foram incubados com 5 µg de enzima. Após 20 min de incubação, a 25 °C, a enzima agora contendo o FXYP foi adicionada ao meio de reação para a determinação da atividade.

3.21. Tratamento dos resultados cinéticos

Os parâmetros cinéticos V (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis-Menten), K_{0,5} (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram calculados empregando-se o programa SigrafW (LEONE et al., 2005). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_I) foram determinadas graficamente conforme descrito por Marks & Seeds (1978). Para cada concentração de ligante a velocidade inicial foi determinada em duplicata e o valor médio das duplicatas foi usado para ajustar cada curva de saturação, que foi repetida três vezes utilizando três diferentes preparações microsomais (N= 3).

Os dados cinéticos foram analisados usando-se os testes de ANOVA e Student-Newman-Keuls. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para P ≤ 0.05. Para as enzimas de estresse oxidativo, a normalidade dos dados foi determinada segundo o Teste de Lilliefors e a significância estatística (P ≤ 0.05) dos resultados foi avaliada utilizando-se o Teste ANOVA para um fator e o Teste Tukey-type foi calculado usando-se o software SYSTAT 13.

3.22. Extração de RNA total de *Cardisoma guanhumi*

Os procedimentos para extração do RNA total das brânquias de *Cardisoma guanhumi* foram conduzidos seguindo protocolos previamente padronizados (FALEIROS et al. 2010; FALEIROS, 2011).

Cada animal foi anestesiado por resfriamento em gelo picado e imediatamente sacrificado através do rompimento do cordão nervoso central e retirada completa da carapaça dorsal. Os 6º e 7º pares de brânquias posteriores foram removidos e colocados imediatamente em uma solução de Trizol para extração de RNA total, mantida em gelo. Todo o procedimento foi efetuado em condição livre de RNase (tratados com H₂O₂ 3% durante 15 minutos, lavados em água tratada com DEPC e mantidos sob luz UV durante 3 minutos.

O RNA total foi extraído de cada brânquia separadamente e posteriormente agrupados em um único *pool* de RNA total. As brânquias foram homogeneizadas com Trizol® em tubos Eppendorfs com o auxílio de um micro-pistilo. As etapas seguintes foram realizadas seguindo-se protocolo do fabricante (Life Technologies), que é eficiente para a extração de quantidades limitadas de material disponível. O RNA total extraído foi quantificado utilizando Qubit® 2,0 Fluorímetro (Life Technologies) e estocado a -80 °C.

3.23. Síntese de cDNA (Transcrição reversa)

Imediatamente antes de iniciar a síntese de cDNA, 1µg do “pool” de RNA total foi tratado com 1 U de DNase (Life Technologies) seguindo-se o protocolo do fabricante.

Após a constatação no sucesso do tratamento com DNase I através de PCR convencional, o RNA total devidamente tratado, foi submetido à reação de síntese de cDNA utilizando o kit RT-PCR SuperScript III (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA sintetizado foi então utilizado como molde para amplificação dos fragmentos parciais dos genes de interesse com o primers descritos na Tabela 1. O par de primer degenerado (NaK_10F/ NaK_16R) foi utilizado para amplificação parcial de um fragmento da subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase.

O par de primers degenerados NaK_10F e NaK_16R foram obtidos de Weihrauch et al. (2001) e Towle et al. (2001). O par de primer específicos PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R foram obtidos de Faleiros et al. (2010), a partir da sequência da proteína ribossomal L10 de *Callinectes sapidus* (Genbank AY822650).

Os primers utilizados para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal (L10), foram desenhados baseados na sequência conservada de *Callinectes sapidus* (**Tabela 1**) obtida no GenBank (AY822650) (WYNN et al., 2004) que já foram utilizados com sucesso em camarões palemonídeos e em várias outras espécies de caranguejos (WEIHRAUCH et al., 2001, TOWLE et al., 2001, FALEIROS et al., 2010, FALEIROS, 2011, LEONE et al., 2015, PINTO et al., 2016).

Tabela 1. Sequência dos primers degenerados (NaK_10F e NaK_16R) e específicos baseados nas sequências de cDNA de *Carcinus maenas* (NaK_Cm_F e NaK_Cm_R) e *Pachygrapsus marmoratus* (NaK_Pmamg_F1 e NaK_Pmamg_R1, NaK_Pmamg_F2 e NaK_Pmamg_R2) utilizados na tentativa de amplificar parcialmente a subunidade α da Na^+/K^+ -ATPase do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi*. Sequência dos primers específicos baseados na sequência de cDNA de *Callinectes sapidus* (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R) para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10 utilizado como controle interno constitutivo para das análises.

Primer		Sequência	amplicon (pb)
<i>(Na⁺, K⁺)-ATPase</i>			
NaK_10F	5'	ATGACIGTIGCICAYATG	700
NaK_16R	5'	GRTGRTCICCIIGTIACCAT	
NaK_Cm_F	5'	CCAAACGTATGGCAGCCAAG	695
NaK_Cm_R	5'	GGGGAAGTTGACAGAGTCGG	
NaK_Pmamg_F1	5'	CCGTATGACAGTCGCTCACA	534
NaK_Pmamg_R1	5'	GAGGGAAGCATGTAGTCGCA	

NaK_Pmamg_F2	5'	ACAGTCGCTCACATGTGGTT	525
NaK_Pmamg_R2	5'	GGGAAGCATGTAGTCGCAGA	

Proteína ribossomal L10

(gene referência)

PRL10_Cs_F	5'	AAGAACTGCGGCAAGGACCAGTCC	304
PRL10_Cs_R	5'	CGGTCAAACCTTGGTAAAGCCCCACTT	

3.24. Purificação, clonagem dos fragmentos parciais de cDNA, sequenciamento e confecção dos primers específicos para qPCR

Os fragmentos amplificados a partir do cDNA branquial foram extraídos do gel, purificados com o PureLink Quick Gel Extract Kit (Life Technologies), clonados em vetor PCR 2.1 TOPO TA (Life Technologies) e transformados em *E. coli* DH5 α termocompetente. Para verificar a transformação e escolha dos transformantes que continham os fragmentos de interesse amplificados, as bactérias transformadas foram cultivadas a 37 °C em placa de petri contendo meio LB Ágar, ampicilina (200 mg/mL) na presença dos agentes seletivos X-Gal e IPTG, onde as colônias brancas constituem aquelas que apresentaram algum inserto. Três colônias brancas (= três clones) para cada gene de interesse foram cultivadas em 3-5 mL de meio LB broth base contendo ampicilina (200 mg/ml) por 16 h a 37 °C e 180 rpm. Para certificar a presença dos fragmentos de interesse, cada cultura (3 μ L) foi submetida a uma reação de PCR diagnóstico com os primers inicialmente utilizados de acordo com o fragmento clonado (**Tabela 1**).

Para constatar o sucesso das amplificações de uma maneira geral e da clonagem dos fragmentos obtidos, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% e submetidas à eletroforese como mencionado acima. As amostras de DNA plasmidial dos clones selecionados como candidatos a conterem sequências dos genes de interesse, foram purificadas com PureLink Plasmid Mini Kit e posteriormente sequenciadas (Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP) através do método tradicional de incorporação

de dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977) utilizando os primers específicos do próprio vetor (M13F e M13R).

Após o sequenciamento do cDNA amplificado e posterior constatação de homologia com sequências já publicadas no GenBank para o gene avaliado PRL10, a sequência amplificada foi utilizada para a confecção de primers específicos para tal gene, com o auxílio do aplicativo on-line OligoPerfect™ Designer da Life Technologies (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>).

A sequência obtida foi depositada no GenBank, e usada para criar um fenograma com base em semelhanças no gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da protein ribosomal L10 (PRL10) das brânquias de várias espécies de caranguejos.

Os critérios utilizados para a escolha dos primers específicos para qPCR foram: amplificar um fragmento entre 75 e 150 pb; apresentar uma temperatura de melting (TM) entre 59-61 °C; conter 30-80% de nucleotídeos C e G, sendo o último nucleotídeo da extremidade 3' uma G ou C quando possível. Todos os primers foram sintetizados pela empresa Exxtend (Paulínia/SP).

3.25. Preparação das células quimiocompetentes

Células competentes foram obtidas a partir de células bacterianas *E. coli*, da linhagem DH5α, seguindo o protocolo do manual de laboratório de Sambrook et al., (1989). Foram inoculados 5 mL de meio LB (Luria Bertani) com células DH5α (-80 °C) e crescidas à 37 °C sob agitação (250 rpm) durante a noite. Para expansão, uma alíquota de 50 µL do cultivo líquido foi inoculada em 50 mL de meio LB e deixado para crescer à 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma absorbância entre 0,3 – 0,4 em 595 nm. Após atingir a absorbância desejada a amostra foi dividida em diferentes tubos estéreis Corex e centrifugada a 6000 rpm durante 5 min à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado de um dos tubos ressuspenso em 5 mL de CaCl₂ 0,1M. A suspensão do primeiro tubo foi passada para o tubo seguinte, e assim por diante, até o ultimo tubo. Após ressuspende todos os precipitados, a amostra foi centrifugada a 6000 rpm durante

5 min à 4 °C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspenso com 5 mL de CaCl₂ 0,1M contendo 15% de glicerol. A solução contendo as células competentes foi dividida em alíquotas de 250 µL em tubos de crioproteção e congelada à -80 °C. Toda a vidraria e soluções utilizadas foram previamente autoclavadas à 120 °C durante 45 min.

3.26. Preparação das amostras de tecido branquial para a análise das enzimas de estresse oxidativo

Amostras do tecido branquial (≈100 mg) foram homogeneizadas na proporção 1:4 (massa:volume) com tampão Tris 20 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo sacarose 0,5 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mmol L⁻¹ e PMSF 1 mmol L⁻¹ utilizando-se um micro homogeneizador (Marconi, modelo MA 102) durante 1 min., a 4 °C. A suspensão resultante foi centrifugada a 9.000 ×g durante 20 min, a 4 °C em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O “pellet” obtido foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 50.000 ×g durante 1 h, a 4 °C, em uma ultracentrífuga Hitachi 55P72. O sobrenadante obtido (fração citosólica) foi coletada e armazenada a -80 °C, para posterior estimativa das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione redutase (GR).

3.27. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi estimada continuamente através da geração de superóxido pelo sistema xantina/xantina oxidase acoplado à redução do citocromo c, utilizando o kit Sigma 19160 para determinação da atividade da SOD, como mostra a (Figura 9).

Figura 9: Atividade da SOD acoplada à redução do citocromo c (Journal of Biological Chemistry 244: 6049 (1969)).

O método utiliza o sal de sódio do 1(2-4(iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio (WST-1) que é reduzido até o corante formazan, altamente solúvel em água, paralelamente à redução do oxigênio pelo íon superóxido, de acordo com a reação.

A reação foi efetuada em microplacas transparentes de 96 poços e a atividade foi medida continuamente em um leitor de placas Perkin Elmer modelo Enspire, em 450 nm ($\epsilon_{450 \text{ nm, pH } 10} = 37.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), durante 20 min, a $\approx 25^\circ \text{C}$ (UKEDA et al., 1999). As condições padrões do ensaio foram 200 μL da solução WST-1 (diluída 1:20 com a solução tampão do kit, pH 10), a amostra do tecido branquial (1 a 30 μL dependendo da concentração da enzima) e 20 μL de xantina oxidase (enzyme working solution do kit) em um volume final de 250 μL . A solução da xantina oxidase deve ser a última a ser adicionada ao meio de reação. A mistura de reação sempre foi lida contra branco constituído pela solução WST-1 e a “working solution”, em um volume final de 250 μL . Para o cálculo da atividade da SOD foram usados apenas os valores que resultaram em uma inibição entre 60 a 80%, calculada de acordo com a **equação 1**, a seguir:

$$\text{atividade SOD (\% inibição)} = \frac{(A_{B1} - A_{B2}) - (A_A - A_{B2})}{(A_{B1} - A_{B2})} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Baseado nas informações do fabricante, as absorbâncias que constam na equação (1) foram obtidas a partir das soluções que constam da **tabela 2** que segue, onde $A_{B1} =$

absorbância do Branco 1; A_{B2} = absorbância do Branco 2; A_{B3} = absorbância do Branco 3; A_A = absorbância da Amostra.

Tabela 2: Quantidade de cada solução para amostra, em branco 1, 2 e 3 (SOD Assay Kit-WST da Sigma-Aldrich).

	Amostra	Branco B₁	Branco B₂	Branco B₃
Amostra	20 µL	-	20 µL	-
H ₂ O	-	20 µL	-	20 µL
Solução WST-1	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Working solution	20 µL	20 µL	-	-
Tampão do kit	-	-	20 µL	20 µL

3.28. Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi estimada continuamente em 240 nm, a 25 °C, através da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio utilizando-se o método descrito por Beutler (1984).

A diminuição da absorbância em 240 nm ($\epsilon_{240 \text{ nm, pH } 8,0} = 40 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi acompanhada em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrões do ensaio foram tampão Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, EDTA 0,25 mmol L⁻¹, H₂O₂ 0,036% e a amostra do tecido branquial (10-30 µL dependendo da concentração de proteína da amostra) em um volume final de 1,0 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles apropriados foram feitos para estimar a hidrólise espontânea do substrato.

3.29. Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR)

A atividade da GR foi estimada usando o sistema de acoplamento descrito por Carlberg & Mannervik (1985) onde a redução da glutathiona oxidada (GSSG) é acompanhada indiretamente através do consumo do NADPH, a 25 °C.

A diminuição da absorbância em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.220 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi acompanhada em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrões do ensaio foram tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 7.0, contendo EDTA 1 mmol L⁻¹, glutathiona 1 mmol L⁻¹, NADPH 0,1 mmol L⁻¹ e a amostra do tecido branquial (10-30 µL dependendo da concentração de proteína da amostra) em um volume final de 1,0 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles apropriados foram feitos para estimar a hidrólise espontânea do substrato.

3.30. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi estimada continuamente em 340 nm, a 25 °C, usando o sistema de acoplamento descrito por Sies et al. (1979), onde o desaparecimento do peróxido é acompanhado indiretamente através do consumo do NADPH. Nesse sistema, a glutathiona reduzida (GSH) para transformar o peróxido orgânico (peróxido de t-butil, t-BOOH) em H₂O, a GPx gera glutathiona oxidada (GSSG), que por sua vez é reduzida (2GSH) pela GR simultaneamente à oxidação do NADPH até NADP⁺.

A diminuição da absorbância em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.220 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi acompanhada em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrões do ensaio foram tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7.0, contendo EDTA 1 mmol L⁻¹, glutathiona reduzida 1 mmol L⁻¹,

NADPH 0,2 mmol L⁻¹, 0.1 U glutathiona redutase, t-butil peróxido 7 mmol L⁻¹ e a amostra do tecido branquial (10-30 µL dependendo da concentração de proteína da amostra) em um volume final de 1,0 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles apropriados sem o t-BOOH foram feitos para estimar a hidrólise espontânea do substrato.

3.31. Determinação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi estimada continuamente em 340 nm, a 25 °C, usando o procedimento descrito por Keen et al. (1976). Nas condições do ensaio, a GST catalisa a reação do 1,4-dinitro clorobenzeno (CDNB) com o grupo SH da glutathiona reduzida formando um produto que pode ser detectado em 340 nm.

O aumento da absorbância em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 9.600 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi acompanhado em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 equipado com células termostatzadas. As condições padrões do ensaio foram tampão fosfato de potássio 0,2 mol L⁻¹, pH 6.5, contendo GSH 2 mmol L⁻¹, CDBN 2 mmol L⁻¹ e a amostra do tecido branquial (10-30 µL dependendo da concentração de proteína da amostra) em um volume final de 1,0 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles apropriados foram feitos para estimar a hidrólise espontânea do substrato.

3.32. Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD)

A atividade da G6FD foi estimada continuamente em 340 nm, a 25 °C, utilizando-se o procedimento descrito por Glock & McLean (1953).

O aumento da absorbância em 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi acompanhado em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 equipado com células termostatizadas. As condições padrões do ensaio foram tampão Tris 50 mmol L^{-1} , pH 7.4, contendo MgCl_2 20 mmol L^{-1} , G6F 20 mmol L^{-1} , NADP 1 mmol L^{-1} e a amostra do tecido branquial ($10\text{-}30 \text{ }\mu\text{L}$ dependendo da concentração de proteína da amostra) em um volume final de $1,0 \text{ mL}$. A reação sempre foi iniciada pela adição da enzima e controles apropriados foram feitos para estimar a hidrólise espontânea do substrato.

É importante salientar que os valores obtidos para a atividade da G6FD presente nas brânquias de *C. guanhumi* são aproximados e devem ser analisados com cautela uma vez que atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase não foi corrigida para a oxidação do 6-fosfogluconato pela 6-fosfogluconato desidrogenase de acordo com a reação que segue.

De fato, uma fração do 6-fosfogluconato formado na reação da G6FD é oxidado a ribulose-5-fosfato pela 6-fosfogluconato desidrogenase, de tal maneira que mais de 1 mol (quase 2) de NADP é reduzido para cada mol de glicose-6-fosfato oxidada. Essa correção poderá ser efetuada medindo-se a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase na presença de glicose-6-fosfato e 6-fosfogluconato (GLOCK & McLEAN, 1953).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. (Na⁺, K⁺)-ATPase BRANQUIAL DE *Cardisoma guanhumi* RECÉM-CAPTURADO (16‰ S)

4.1.1. Localização da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S)

A **Figura 10** mostra a imunolocalização da subunidade α da enzima (Na⁺,K⁺)-ATPase em brânquias de *C. guanhumi*. As imagens foram obtidas através de microscopia confocal (**Figura 10A**) e microscopia de fluorescência (**Figura 10B**). A **Figura 10A** mostra a estrutura de uma lamela vista longitudinalmente, onde pode se observar a organização da mesma. As células pilares (**pc**) estão localizadas na base de uma cutícula (**c**) e em ambos os lados das lamelas, formando um estreito sistema de lacunas conhecido como espaço da hemolinfa (**h**), região esta pela qual a hemolinfa flui. A **Figura 10B** mostra a estrutura da 7ª brânquia esquerda cortada longitudinalmente. Pode-se observar o canal eferente (**af**) por onde a hemolinfa é distribuída para as lamelas braquiais. A localização subcelular utilizando o anticorpo $\alpha 5$ mostrou que a (Na⁺,K⁺)-ATPase encontra-se predominantemente distribuída por todo o citoplasma das células pilares branquiais, incluindo a região apical abaixo da cutícula.

4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western blottig da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S)

A presença de várias bandas proteicas que aparecem eletroforese em gradiente de gel de poliacrilamida (5-20%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) mostra a presença de várias proteínas na fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* (**Figura 11B**). Entretanto, usando como marcador o anticorpo monoclonal para a subunidade α da (Na⁺,K⁺)-ATPase, o Western-blotting revelou a presença de uma única banda difusa com Mr de aproximadamente 110 kDa (**Figura 11C**).

Figura 10. Localização subcelular da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16% S).

Os cortes foram feitos ao longo do eixo longitudinal da 7ª brânquia do caranguejo. A subunidade α da enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi localizada através do anticorpo policlonal de camundongo α -5. O sinal fluorescente foi obtido com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (495/519 nm). (A) microscopia de fluorescência mostrando a distribuição da enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelas lamelas (setas). Escala de 50 μm . (B) microscopia confocal mostrando a estrutura lamelar obtida através da sobreposição da imagem em contraste de fase com a marcação para a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (verde); os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Cutícula (c), células pilares (pc), espaço por onde circula a água (w), espaço da hemolinfa (h) e canal aferente (af) estão apontados. A enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ encontra-se distribuída predominantemente na região basolateral das células pilares.

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western-blotting da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% usando 2,9 µg para revelação com prata (**B**) e 21,8 µg de proteína para o Western-blotting (**C**). (**A**) Padrão de peso molecular Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa).

4.1.3. **Gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S)**

A análise da centrifugação em gradiente de densidade de sacarose da fração microsomal do tecido branquial posterior do *C. guanhumi* revelou a presença de duas frações de membrana com atividade ATPase (**Figura 12**). A fração mais leve (pico I), que aparece entre 32 e 35% de sacarose apresenta atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase, e não coincide com o pico principal de proteína. A fração mais pesada (pico II), que aparece entre 35% e 40% de sacarose e também apresentou atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase, corresponde a um pico com baixa concentração de proteína. O fato da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase representar cerca de 55% da atividade ATPase total sugere que ambas as frações estão contaminados por outras enzimas que hidrolisam o ATP. A recuperação da proteína ao longo do gradiente foi de 92%.

4.1.4. **Atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S)**

A fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* apresentou uma atividade PNFFase total de cerca de 43 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. A preparação é muito estável quando armazenada a -20°C, e não foram observadas perdas significativas de atividade por períodos de até 4 meses. Quando descongeladas e mantidas em gelo picado, a atividade PNFFase mantém-se constante por períodos de até 10 h.

A atividade PNFFase estimada na presença de alameticina (43,1 ± 1,5 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹) não apresentou variação significativa quando determinada na ausência desse antibiótico (41,9 ± 2,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹) sugerindo que no meio de reação não ocorre formação de vesículas seladas.

Em condições saturantes de Mg²⁺ (7 mmol L⁻¹) e K⁺ (20 mmol L⁻¹), a estimulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo PNFF (entre 10⁻⁵ mmol L⁻¹ e 5×10⁻² mmol L⁻¹) resultou em uma simples curva de saturação que apresenta comportamento “Michaeliano”. A velocidade máxima da reação foi estimada em 29,30 ± 1,46 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e o K_M = 2,90 ± 0,14 mmol L⁻¹ (**Figura 13**).

Figura 12. Centrifugação em gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16% S).

Uma alíquota contendo 4,0 mg de proteína foi colocada na superfície do gradiente contínuo de sacarose (10–50 %, p/p). Após a centrifugação a 100.000 ×g, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas com relação à atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○); atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase (▲); concentração de proteína (■) e concentração de sacarose (□). A figura mostra a média dos valores obtidos utilizando alíquotas de três (N= 3) diferentes preparações microsomais.

Nesse mesmo intervalo de concentração de PNFF, a atividade PNFFase insensível à ouabaína foi estimulada até valores de $14,13 \pm 0,70 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, o que representa cerca de 33% da atividade PNFFase total (**inserção da Figura 13**).

Na ausência de Mg^{2+} , a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ não hidrolisa o PNFF. Entretanto, em condições saturantes de PNFF (15 mmol L^{-1}) e K^+ (20 mmol L^{-1}), a atividade K^+ -fosfatase da enzima foi estimulada por Mg^{2+} , no intervalo de concentração entre $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, até valores máximos de $32,81 \pm 1,64 \text{ nmol Pimin}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (**Figura 14**). A estimulação pelo Mg^{2+} ocorreu segundo uma curva de saturação monofásica que apresentou interações sítio-sítio ($n_H=1,7$) e $K_{0,5}= 2,5 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nesse mesmo intervalo de concentração, a atividade PNFFase insensível à ouabaína foi estimulada até valores de $\approx 12 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (**inserção da Figura 14**).

A estimulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *C. guanhum* por concentrações crescentes de K^+ entre $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em condições saturantes de PNFF (15 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}), e na ausência de NH_4^+ , alcançou uma velocidade máxima de $32,63 \pm 1,63 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, com $K_{0,5}= 4,6 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figura 15**). A interação do K^+ com a enzima ocorreu através de interações sítio-sítio ($n_H= 0,8$) e a estimulação da estimulação da atividade PNFFase insensível à ouabaína, nesse mesmo intervalo de concentração de K^+ alcançou valores máximos de $13,50 \pm 0,67 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (**inserção da Figura 15**).

A atividade K -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ também é estimulada por NH_4^+ (**Figura 16**). Em condições saturantes de PNFF (15 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}), e na ausência de K^+ , a atividade específica máxima estimada no intervalo de concentração de NH_4^+ entre $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi de $29,47 \pm 1,47 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $K_{0,5}= 1,5 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A modulação da atividade ocorreu através de uma curva de saturação monofásica que apresentou cooperatividade positiva ($n_H= 1,6$). Nesse mesmo intervalo de concentração de NH_4^+ , a atividade PNFFase insensível à ouabaína foi estimulada até $12,80 \pm 0,64 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ correspondendo a $\approx 30\%$ da atividade PNFFase total (**inserção da Figura 16**).

A **Figura 17** mostra a estimulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelos íons potássio na presença de concentrações fixas de amônio. Na ausência de NH_4^+ a atividade da enzima foi estimulada até valores máximos de $32,63 \pm 1,63 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ com $K_{0,5}= 4,6 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Quando estimada na presença de concentrações fixas de NH_4^+ , variando entre 1 mmol L^{-1} até 50 mmol L^{-1} , a estimulação da atividade pelo K^+ alcançou valores máximos de $36,97 \pm 1,84 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e o

valor do $K_{0,5}$ diminuiu cerca de 3 vezes. Independentemente da presença do NH_4^+ , a estimulação da atividade K^+ -fosfatase pelo K^+ ocorreu através de interações sítio-sítio e, na presença desses dois íons, o efeito sinérgico foi de apenas 13%.

A **Figura 18** mostra o efeito da concentração dos íons potássio na estimulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelos íons amônio. Na ausência de K^+ a atividade da enzima foi estimulada até valores máximos de $29,47 \pm 1,47 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ com $K_{0,5} = 1,5 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Efeitos de cooperatividade positiva foram observados para a estimulação da enzima pelo NH_4^+ ($n_H=1,6$). Na presença de concentrações fixas de K^+ (variando entre 1 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1}), a atividade K^+ -fosfatase foi estimulada até valores máximos de $36,60 \pm 1,83 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ à medida que a concentração de NH_4^+ variou de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ até $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Nessas condições a estimulação ocorreu através de cooperatividade negativa e, o efeito sinérgico foi da ordem de 24%.

Na **Tabela 3** estão sumarizados os valores calculados para os parâmetros cinéticos em relação à estimulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelo PNFF, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ .

Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade K^+ -fosfatase pelo PNFF, Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

Efector	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	$K_{0,5}$ ou K_M (mmol L ⁻¹)	n_H	V/K
PNFF	$29,30 \pm 1,46$	$2,9 \pm 0,1$	0,9	10,1
K^+	$32,63 \pm 1,63$	$4,6 \pm 0,2$	0,8	7,1
NH_4^+	$29,47 \pm 1,47$	$1,5 \pm 0,1$	1,6	19,6
Mg^{2+}	$32,81 \pm 1,64$	$2,5 \pm 0,1$	1,7	13,1

Figura 13. Efeito da concentração do PNFF na atividade K^+ -fosfatase da (Na^+,K^+) -ATPase do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de PNFF, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando-se alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsossomais. **Inserção:** (●) Atividade PNFFase total. (○) Atividade PNFFase insensível à ouabaína.

Figura 14. Efeito dos íons magnésio na atividade K^+ -fosfatase na (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16% S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de íons magnésio, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. **Inserção:** (●) Atividade PNFFase total. (○) Atividade PNFFase insensível à ouabaína.

Figura 15. Efeito dos íons potássio na atividade K^+ -fosfatase na (Na^+, K^+) -ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de íons potássio, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsossomais. **Inserção:** (●) Atividade PNFFase total. (○) Atividade PNFFase insensível à ouabaína.

Figura 16. Efeito dos íons amônio na atividade K^+ -fosfatase na (Na^+,K^+) -ATPase de tecido branquial de *C. guanhumí* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de íons amônio, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. **Inserção:** (●) Atividade PNFFase total. (○) Atividade PNFFase insensível à ouabaína.

Figura 17. Efeito da concentração dos íons amônio na estimulação da atividade K⁺-fosfatase do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S) pelo K⁺.

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de íons amônio, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. (■) sem NH₄Cl. (○) NH₄Cl 1 mmol L⁻¹. (●) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (□) NH₄Cl 25 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 50 mmol L⁻¹.

Figura 18. Efeito da concentração dos íons potássio na estimulação da atividade K⁺-fosfatase do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S) pelo NH₄⁺.

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. Para cada concentração de íons potássio, a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsossomais. (■) sem KCl. (□) KCl 1 mmol L⁻¹. (▲) KCl 5 mmol L⁻¹. (○) KCl 10 mmol L⁻¹. (●) KCl 20 mmol L⁻¹.

Na **Tabela 4** estão apresentados os diferentes valores dos parâmetros cinéticos estimados para a modulação da K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelos íons potássio e amônio.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S) pelos íons potássio e amônio.

[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺] (mmol L ⁻¹)	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0.5} (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K _{0.5} (×10 ³)
Variável	0	29,45 ± 1,63	4,6 ± 0,2	0,8	6,40
Variável	1	30,91 ± 1,64	4,3 ± 0,2	1,2	7,19
Variável	10	33,38 ± 1,48	2,8 ± 0,1	1,2	11,92
Variável	25	34,03 ± 1,65	4,5 ± 0,2	1,3	7,56
Variável	50	38,80 ± 1,84	6,5 ± 0,3	1,5	5,97
0	Variável	27,88 ± 1,47	14,59 ± 0,7	1,7	1,91
1	Variável	29,89 ± 1,76	9,77 ± 0,4	1,3	2,45
5	Variável	31,64 ± 1,56	11,56 ± 0,6	1,0	1,13
10	Variável	34,73 ± 1,73	5,74 ± 0,3	5,2	0,99
20	Variável	36,60 ± 1,83	-	-	-

A **Figura 19** mostra o efeito da concentração dos íons sódio sobre a atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase. Em concentração saturante de PNFF (15 mmol L⁻¹), MgCl₂ (7 mmol L⁻¹) e KCl (20 mmol L⁻¹), o aumento da concentração de Na⁺ (entre 10⁻⁶ mol L⁻¹ e 10⁻¹ mol L⁻¹) inibiu consideravelmente a atividade PNFFase. O valor do K_I calculado para a inibição da atividade PNFFase pelo Na⁺ foi de 14,72 ± 0,74 mmol L⁻¹ (**inserção da Figura 19**).

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade PNFFase da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* está mostrado na

Figura 20. Na presença de concentrações saturantes de PNFF (15 mmol L⁻¹), MgCl₂ (7 mmol L⁻¹) e KCl (20 mmol L⁻¹), o aumento da concentração de ouabaína entre 10⁻⁶ mol L⁻¹ e 10⁻³ mol L⁻¹ resultou em uma curva de inibição monofásica sugerindo a existência de um único sítio de ligação na enzima. Observa-se ainda que mesmo para concentrações de ouabaína da ordem de 3,0 mmol L⁻¹ a atividade PNFFase da fração microsomal é inibida apenas ≈60%, sugerindo a presença de outras ATPases na preparação microsomal. Na presença de NH₄⁺, a inibição da atividade PNFFase pela ouabaína apresentou similaridade com a obtida na ausência desse íon. Entretanto, concentrações de ouabaína da ordem de 3,0 mmol L⁻¹ resultaram em uma inibição parcial da atividade K⁺-fosfatase de apenas 74%, sugerido que o NH₄⁺ afeta a inibição da enzima pela ouabaína. A inibição da atividade PNFFase pela ouabaína não depende do tempo de incubação da enzima com o inibidor (**inserção A da Figura 20**). O valor de K_i determinado através da representação de Dixon foi estimado em 370,0 ± 18,50 μmol L⁻¹ e 410,0 ± 20,50 μmol L⁻¹, na ausência e presença de NH₄⁺ respectivamente (**inserção B da Figura 20**).

Na **Figura 21** é mostrado o efeito de concentrações crescentes de ortovanadato na atividade PNFFase. Na presença de concentrações saturantes de PNFF (15 mmol L⁻¹), MgCl₂ (7 mmol L⁻¹) e KCl (20 mmol L⁻¹), o aumento da concentração de ortovanadato entre 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ até 10⁻⁴ mol L⁻¹ inibiu cerca de 95% a atividade PNFFase total da fração microsomal. Essa inibição ocorreu segundo uma curva bifásica, sugerindo a presença de dois sítios para a ligação para o inibidor. Utilizando a representação de Dixon, foram estimados os valores de 6,43 ± 0,32 nmol L⁻¹ (**inserção A da Figura 21**) e 2,86 ± 0,14 μmol L⁻¹ (**inserção B da Figura 21**) para os valores das constantes de inibição da atividade K⁺-fosfatase pelo ortovanadato.

Em condições saturantes de PNFF (15 mmol L⁻¹), MgCl₂ (7 mmol L⁻¹) e KCl (20 mmol L⁻¹), concentrações de manganês da ordem de 10⁻² mol L⁻¹ inibiram totalmente a atividade K⁺-fosfatase através de uma curva bifásica bem definida (**Figura 22**). Aparentemente existem dois sítios de fixação para o Mn²⁺ que provocam a inibição da atividade K⁺-fosfatase. Um deles, de alta afinidade, aparece entre 10⁻⁸ mol L⁻¹ e 10⁻⁶ mol L⁻¹ enquanto o segundo, considerado de baixa afinidade, ocorre entre 10⁻⁶ mol L⁻¹ e 10⁻² mol L⁻¹. Os valores estimados para as constantes de inibição do complexo enzima-Mn²⁺ foram 233,0 ± 11,62 nmol L⁻¹ (**inserção A da Figura 22**) e 311,0 ± 15,50 μmol L⁻¹ (**inserção B da Figura 22**), respectivamente para o sítio de alta e baixa afinidade.

Na **Tabela 5** estão apresentados os valores de K_I e a porcentagem de inibição da atividade K^+ -fosfatase pela ouabaína, ortovanadato e sódio.

Tabela 5. Valores da constante de inibição, K_I , da atividade K^+ -fosfatase pela ouabaína, ortovanadato e sódio.

Inibidor	K_I ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Atividade residual (%)
Na^+	$14,72 \pm 0,74$	0
Ouabaína (K^+ 20 mmol L^{-1})	$370,0 \pm 18,5$	40
Ouabaína (NH_4^+ 50 mmol L^{-1})	$410,0 \pm 20,5$	26
Ortovanadato	$0,00643 \pm 0,000322$	5
	$2,86 \pm 0,14$	

Na presença de concentrações saturantes de PNFF (15 mmol L^{-1}), MgCl_2 (7 mmol L^{-1}) e KCl (20 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de Hg^{2+} entre $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ inibiu completamente a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* através de uma curva bifásica bem definida (**Figura 23**). Similarmente ao observado anteriormente, dois sítios de fixação para o Hg^{2+} provocam a inibição completa da atividade K^+ -fosfatase. Um deles, considerado de alta afinidade aparece entre $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ enquanto um segundo, considerado de baixa afinidade, ocorre entre $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores estimados para as constantes de inibição do complexo enzima - Hg^{2+} foram $238,0 \pm 11,90 \text{ nmol L}^{-1}$ (**inserção A da Figura 23**) e $320,0 \pm 16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**inserção B da Figura 23**).

Figura 19. Efeito da concentração dos íons sódio na atividade PNFFase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. A velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 µg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsossomais. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação de K_i.

Figura 20. Efeito da concentração de ouabaína na atividade PNFFase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 7 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. A velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 μg da enzima da mesma preparação. (■) NH₄Cl 50 mmol L⁻¹, (□) KCl 20 mmol L⁻¹. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microssomais. **Inserção:** (A) efeito do tempo na inibição pela ouabaína. (B) representação de Dixon para o cálculo de K_i (■) NH₄Cl 50 mmol L⁻¹. (□) KCl 20 mmol L⁻¹.

Figura 21. Efeito da concentração do ortovanadato na atividade PNFFase na (Na⁺,K⁺)-ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. A velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 μg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. **Inserção:** **A** - representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de alta afinidade pela ouabaína. **B** - representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de baixa afinidade pela ouabaína.

Figura 22. Efeito da concentração do Mn^{2+} sobre a atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. A velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 μg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. **Inserção: A-** representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de alta afinidade pelo Mn²⁺. **B-** representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de baixa afinidade pelo Mn²⁺.

Figura 23. Efeito da concentração do Hg^{2+} na atividade K^{+} -fosfatase na $(\text{Na}^{+}, \text{K}^{+})$ -ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade foi estimada a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo PNFF 15 mmol L⁻¹, MgCl₂ 7 mmol L⁻¹ e KCl 20 mmol L⁻¹, em um volume final de 1,0 mL. A velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata usando alíquotas contendo 23,7 μg da enzima da mesma preparação. Cada ponto da figura representa a média dos valores obtidos usando-se três (N= 3) diferentes preparações microsomais. **Inserção: A-** representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de alta afinidade pelo Hg^{2+} . **B-** representação de Dixon para a determinação do valor de K_I para o sítio de baixa afinidade pelo Hg^{2+} .

4.1.5. Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumí* recém-capturado (16‰ S)

A fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumí* apresentou uma atividade ATPase total de aproximadamente 166 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. A atividade ATPase insensível à ouabaína, da ordem de 26,55 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, representa 16% da atividade ATPase total. A preparação mostrou-se bastante estável quando armazenada a -20 °C, não tendo sido observadas perdas significativas de atividade até 4 meses. No momento do uso, alíquotas foram descongeladas e mantidas em gelo picado e, nessas condições, a atividade manteve-se constante por períodos de até 10 h. Com a finalidade de verificar se na fração microsomal existem vesículas seladas, foram realizados ensaios na presença e ausência de alameticina (0-20 µg totais). A preparação foi pré-incubada com o antibiótico durante 10 minutos a 25°C, e a reação iniciada pela adição de substrato ao meio reacional. Não foram observadas variações significativas nas atividades determinadas na presença e ausência dessa droga, sugerindo a inexistência de vesículas seladas nesta preparação.

O efeito da variação da concentração do ATP sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumí* está mostrado na **Figura 24**. Em condições saturantes de Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), K⁺ (30 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), a estimulação da atividade da enzima pelo ATP resultou em uma curva de saturação monofásica com comportamento “Michaeliano”. A atividade específica máxima estimada foi de 148,46 ± 7,42 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e o K_M= 0,05 ± 0,002 mmol L⁻¹. A inserção da **Figura 24** mostra a estimulação das atividades ATPase total e ATPase insensível à ouabaína em função da concentração do ATP. Observa-se também que a atividade ATPase insensível à ouabaína representa cerca de 20% da atividade ATPase total, sugerindo a presença de outras ATPases na fração microsomal.

A **Figura 25** mostra a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumí* pelo íon Mg²⁺. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), K⁺ (30 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), a atividade ATPase da enzima foi estimulada por Mg²⁺ (no intervalo de concentração entre 10⁻⁵ mol L⁻¹ e 5×10⁻³ mol L⁻¹), até valores de 136,37 ± 6,81 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. A estimulação da atividade específica seguiu o padrão de uma curva de saturação monofásica que apresenta interações sítio-sítio (n_H=1,8) com K_{0,5}= 3,24 ± 0,162 mmol L⁻¹. A atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores de aproximadamente 39,0 ±

1,95 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, sugerindo a presença de outras ATPases sensíveis ao magnésio na fração microsomal (inserção da **Figura 25**).

A dependência da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de *C. guanhumi* em relação à concentração de Na⁺ é mostrada na **Figura 26**. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹) e K⁺ (30 mmol L⁻¹), foi caracterizada uma curva de saturação, com V= 139,41 ± 6,97 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e o K_M= 4,50 ± 0,225 mmol L⁻¹. Concentrações crescentes de Na⁺, entre 10⁻⁵ mol L⁻¹ e 5×10⁻² mol L⁻¹, resultaram em uma única curva de saturação com n_H= 1,0, mostrando um comportamento “Michaeliano”. A estimulação da atividade ATPase insensível à ouabaína, até valores de 32,45 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, sugere que outras ATPases diferentes da (Na⁺,K⁺)-ATPase estão presentes na preparação (inserção da **Figura 26**).

A **Figura 27** mostra o efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de *C. guanhumi*. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), e na ausência de NH₄⁺, a atividade específica máxima da enzima foi de 140,22 ± 7,01 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e o K_{0,5} igual a 0,17 ± 0,008 mmol L⁻¹. Concentrações crescentes de K⁺, entre 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 3×10⁻² mol L⁻¹, resultaram em uma única curva de estimulação com n_H= 0,8, o que sugere cooperatividade negativa. A estimulação da atividade ATPase insensível à ouabaína, até valores de 29,84 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, sugere que essa estimulação é devida à presença de uma K⁺-ATPase na fração microsomal.

Em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), e na ausência de K⁺, a atividade específica máxima estimada no intervalo de concentração de NH₄⁺ entre 10⁻⁷ mol L⁻¹ e 2×10⁻² mol L⁻¹ foi de 149,15 ± 7,45 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (**Figura 28**). A modulação da atividade ocorreu através de uma única curva de saturação com cooperatividade negativa (n_H= 0,7) e K_{0,5}= 0,60 ± 0,030 mmol L⁻¹. A atividade ATPase insensível a ouabaína foi estimulada por NH₄⁺ até valores de 30,78 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (inserção da **Figura 28**), que corresponde a 17% da atividade ATPase total.

Figura 24. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16% S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21mmol L⁻¹, FEP 3,18mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Inserção: atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 25. Efeito da concentração dos íons magnésio sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21mmol L⁻¹, FEP 3,18mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Inserção: atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 26. Efeito da concentração do sódio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21mmol L⁻¹, FEP 3,18mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Inserção: atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 27. Efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 28. Efeito da concentração dos íons amônio sobre a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

A **Tabela 6** resume os valores parâmetros cinéticos estimados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelos moduladores ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S) pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺.

Efetor	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _M (mmol L ⁻¹)	n _H
ATP	148,46 ± 7,42	0,05 ± 0,002	0,9
Mg ²⁺	136,37 ± 6,81	3,24 ± 0,162	1,8
Na ⁺	139,41 ± 6,97	4,50 ± 0,225	1,0
K ⁺	140,22 ± 7,01	0,17 ± 0,008	0,8
NH ₄ ⁺	149,15 ± 7,45	0,60 ± 0,030	0,7

A **Figura 29** mostra a estimulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelos íons potássio na presença de concentrações fixas de amônio. Na ausência de NH₄⁺ a atividade máxima foi 140,22 ± 7,01 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e com o aumento da concentração de NH₄⁺ até 20 mmol L⁻¹ a velocidade máxima atingiu valores de 131,83 ± 6,59 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. Foi observada uma diminuição do valor da afinidade específica (V/K) em função do aumento da concentração de NH₄⁺.

A **Figura 30** mostra o efeito da concentração dos íons amônio na modulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* na presença de concentrações fixas de íons potássio (10 a 30 mmol L⁻¹). Na ausência de íons potássio, a hidrólise do substrato ocorreu com cooperatividade negativa e a atividade máxima foi de 149,15 ± 7,45 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. Observa-se também que para uma concentração fixa de 30 mmol L⁻¹ de K⁺, houve uma diminuição na atividade específica da enzima, 143,55 ± 7,17 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹.

A **Tabela 7** resume os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelos íons potássio e amônio.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S), pelo K⁺ e NH₄⁺.

[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺] (mmol L ⁻¹)	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _M (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K (×10 ³)
Variável	0	140,22 ± 7,01	0,1 ± 0,005	0,8	1402,2
Variável	5	96,30 ± 4,81	2,8 ± 0,14	0,8	34,4
Variável	10	121,65 ± 6,08	2,0 ± 0,10	1,1	60,8
Variável	20	131,83 ± 6,59	-	-	-
0	Variável	149,15 ± 7,45	0,6 ± 0,03	0,7	248,6
10	Variável	105,66 ± 5,28	2,9 ± 0,14	0,9	36,4
20	Variável	156,05 ± 7,80	0,1 ± 0,005	0,7	1560,5
30	Variável	145,65 ± 7,28	2,1 ± 0,10	0,9	69,3

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* está mostrado na **Figura 31**. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), K⁺ (30 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹), a curva monofásica obtida sugere a existência de um único sítio de ligação para o inibidor no intervalo de concentração entre 10⁻⁶ e 5×10⁻³ mol L⁻¹. Observa-se também que para concentrações de ouabaína da ordem de 3,0 mmol L⁻¹ a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal é inibida cerca de 80%, sugerindo a presença de outras ATPases. A inserção da **Figura 31** mostra a determinação gráfica da constante de inibição, K_I. De acordo com os resultados, o valor da constante de inibição é 51,99 ± 2,59 μmol L⁻¹.

Figura 29. Efeito da concentração do K^+ na modulação da atividade da (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S), na presença de NH_4^+ .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem NH₄Cl. (Δ) NH₄Cl 5 mmol L⁻¹. (■) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (○) NH₄Cl 20 mmol L⁻¹.

Figura 30. Efeito da concentração do NH_4^+ na modulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16% S), na presença de K^+ .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (●) sem KCl. (□) KCl 10 mmol L⁻¹. (■) KCl 20 mmol L⁻¹. (Δ) KCl 30 mmol L⁻¹.

Figura 31. Efeito da concentração de ouabaína na atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16% S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21mmol L⁻¹, FEP 3,18mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para o cálculo de K_i.

4.1.6. Modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16% S) por poliaminas

Concentrações crescentes de putrescina entre 10⁻⁷ e 10⁻¹ mol L⁻¹ inibiram a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase até valores da ordem de 92,22 ± 4,6 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹, em contraste com o valor de atividade de 140,00 ± 0,7 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ estimado na ausência dessa poliamina (**Figura 32**). Nesse mesmo intervalo de concentração de putrescina a atividade ATPase insensível à ouabaína também diminuiu até valores de 27,02 ± 1,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (inserção da **Figura 32**).

Concentrações crescentes de espermidina (10⁻⁴ a 10⁻¹ mol L⁻¹) inibiram consideravelmente a atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase que passou de 146,90 ± 7,34 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ para valores inferiores a 2,0 ± 0,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. (**Figura 33**) Concentrações de espermidina da ordem de 10⁻¹ mol L⁻¹ provocaram uma inibição da atividade ATPase insensível à ouabaína de 100% (inserção da **Figura 33**).

Na presença de espermina foi observada uma inibição menos acentuada da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase quando comparada com a da espermidina. Uma velocidade máxima de 126,43 ± 6,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ foi estimada para concentrações de espermidina no intervalo de concentração entre 10⁻⁴ e 10⁻³ mol L⁻¹ (**Figura 34**). Por outro lado, não foi observada nenhuma variação aparente na atividade ATPase insensível à ouabaína, da ordem de 40,01 ± 2,0 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (inserção da **Figura 34**) nesse mesmo intervalo de concentração.

A modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase também foi afetada pela presença de octopamina. Na presença de octopamina 10⁻⁵ mol L⁻¹, a atividade máxima da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi estimada 139,92 ± 6,9 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (**Figura 35**). Nessa mesma faixa de concentração, também foi observada uma inibição de ≈50% na atividade ATPase insensível à ouabaína; a velocidade máxima diminuiu de 41,76 ± 2,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ para 23,66 ± 1,2 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (inserção da **Figura 35**).

Na presença de dopamina (5×10⁻³ a 10⁻¹ mol L⁻¹) também foi observada uma inibição considerável da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase (**Figura 36**). Nessas condições, a velocidade máxima estimada em 147,86 ± 7,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ na ausência da poliamina diminuiu para 47,39 ± 2,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ na presença da poliamina. Inusitadamente, também foi observada uma estimulação na atividade insensível a ouabaína nessa mesma faixa de concentração cujo valor máximo foi estimado em 86,39 ± 4,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ (**Figura 36**).

Controle efetuados com cloreto de colina (inserções das **Figuras 32 a 36**) mostram um efeito semelhante ao observado para as diferentes poliaminas com relação à atividade ATPase total.

4.1.7. Efeito de diferentes inibidores na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S)

A utilização de ouabaína associada a diferentes inibidores revelou que a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase representa $\approx 75\%$ da atividade total de ATP hidrolisado na preparação da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* (**Tabela 8**). A atividade ATPase estimada na presença de ouabaína mais ácido etacrínico (11,1%) sugere fortemente a presença de Na^+ - ou K^+ -ATPase, corroborando os resultados apresentados nas inserções das **Figuras 26 e 27** onde se observa uma estimulação pelo Na^+ e K^+ da atividade ATPase insensível à ouabaína.

As inibições provocadas pela ouabaína mais aurovertina B e ouabaína mais bafilomicina A1 sugerem a presença da F_0F_1 -ATPase (2,6%) e $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase (6,5%), respectivamente.

A inibição da atividade ATPase provocada pela ouabaína mais tapsigargina sugere a presença de uma possível Ca^{2+} -ATPase (1,6%).

Finalmente, as inibições observadas para a ouabaína mais teofilina e ouabaína mais ortovanadato, sugerem presença de atividade de fosfatase neutra.

Figura 32. Efeito da concentração de putrescina sobre a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○); atividade ATPase total na presença cloreto de colina (Δ).

Figura 33. Efeito da concentração de espermidina sobre a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○); atividade ATPase total na presença de cloreto de colina (Δ).

Figura 34. Efeito da concentração de espermina sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○); atividade ATPase total na presença cloreto de colina (Δ).

Figura 35. Efeito da concentração de octopamina sobre a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumí* recém-capturado (16% S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○); atividade ATPase total na presença de cloreto de colina (Δ).

Figura 36. Efeito da concentração de dopamina sobre a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 31,3 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○); atividade ATPase total na presença de cloreto de colina (Δ).

Tabela 8. Efeito de vários inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S).

Inibidor	Atividade total (U mg ⁻¹)	ASO (U mg ⁻¹)	AIO (U mg ⁻¹)	Atividade ATPase residual	Atividade Relativa (%)	Provável tipo de ATPase presente
Controle	166.1 ± 0.7	-	-	-	100	ATPase Total
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹)	39.3 ± 1.2	126.8 ± 1.9	39.3 ± 1.2	-	76.4	(Na ⁺ ,K ⁺)-
Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	38.4 ± 1.1	127.7 ± 1.8	38.4 ± 1.1	-	76.9	(Na ⁺ ,K ⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ortovanadato(100 µmol L ⁻¹)	-	-	38.2 ± 1.2	1.1 ± 0.02	0.7	Fosfatase neutra
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	-	-	37.6 ± 1.1	1.7 ± 0.03	1.0	Fosfatase neutra
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Bafilomicina (0,4 µmol L ⁻¹)	-	-	28.7 ± 0.8	10.6 ± 0.1	6.4	V(H ⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Tapsigargina (0,5 µmol L ⁻¹)	-	-	36.7 ± 1.1	2.6 ± 0.08	1.6	(Ca ²⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + EGTA (1 mmol L ⁻¹)	-	-	38.4 ± 1.1	0.9 ± 0.02	0.5	(Ca ²⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ác. Etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	-	-	20.9 ± 0.6	18.4 ± 0.3	11.1	Na ⁺ - or K ⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	-	-	35.0 ± 1.0	4.3 ± 0.2	2.6	(F ₀ F ₁)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Etanol (20 µL mL ⁻¹)	-	-	36.7 ± 1.1	-	-	-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + DMSO (20 µL mL ⁻¹)	-	-	37.2 ± 1.2	-	-	-

ASO: Atividade ATPase sensível à ouabaína, **AIO:** Atividade ATPase insensível à ouabaína.

4.1.8. Extração de RNA total, transcrição reversa (RT) do RNAm brânquial e amplificação dos fragmentos parciais de cDNAs

Com a finalidade de identificar os genes codificadores da (Na⁺,K⁺)-ATPase e PRL10 em *C. guanhumi*, verificamos a eficiência no tratamento com DNase I (ausência de DNA contaminante) que foi realizada a partir de PCR convencional utilizando o par de primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R, que amplificam parcialmente o gene da proteína ribossomal L10. Assim, no caso de ocorrer alguma contaminação remanescente nas amostras de RNA total tratada com DNase I, obrigatoriamente deverá ser encontrado um fragmento de aproximadamente ≈ 300 pb (gene PRL10) no gel de agarose (**Figura 37**).

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose, e em nossos resultados o tamanho dos fragmentos foi comparado com marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Plus e para a visualização e documentação dos géis foi usado um equipamento DiImage.

Na reação de transcrição reversa usando o kit de RT-PCR SuperScript III (Life Technologies), a quantidade padronizada de RNA total tratada com DNase I (300 ng) submetida à reação de síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa em presença de dNTP (Life Technologies) e solução tampão da enzima (RT-III), resultou na produção do cDNA proveniente das amostras tratadas com DNase I.

Foi constatado sucesso na síntese por meio da amplificação por PCR convencional com a combinação de primers PRL10-Cs_F e PRL10-Cs_R. As amostras foram novamente analisadas em gel de agarose, e como resultado observou um fragmento de aproximadamente 300 pb nas reações, que podem ser visualizados na **Figura 38**.

A constatação de sucesso na síntese de cDNA foi efetuada através de uma PCR convencional, com os mesmos primers descritos acima, utilizando uma enzima Taq DNA polimerase High Fidelity, que apresenta uma fidelidade 6 vezes maior que a enzima Taq DNA polimerase convencional. E o resultado da reação foi visualizada em gel de agarose e fotodocumentada (**Figura 39**). Os fragmentos provenientes detectados no gel de agarose foram extraídos para purificação e o DNA purificado com a utilização do kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante.

Os fragmentos amplificados a partir das reações de PCR foram clonados, resultando em pelo menos três clones. Após verificação e escolha dos transformantes que apresentaram os fragmentos amplificados, as colônias, oriundas da transformação térmica, foram cultivadas em meio Luria–Bertani com os antibióticos, e digeridas com uma enzima de restrição *EcoRI* (Life Technologies), confirmando a presença do inserto.

Na constatação das ampliações de uma maneira geral e da clonagem dos fragmentos obtidos, utilizando os primers descritos na Tabela 1, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% que foi submetido a uma corrida eletroforética (**Figura 40**). A inferência do tamanho dos fragmentos foi realizada a partir da comparação destes com um marcador molecular que possui fragmentos de tamanhos conhecidos (1 kb DNA Ladder Plus – Life Technologies) que foi aplicado simultaneamente no gel.

As amostras de DNA dos clones selecionados a conterem sequências dos genes de interesse, foram submetidas ao sequenciamento (Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Modelo ABI PRISM® 3100) pelo método tradicional de incorporação de dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977), utilizando os primers específicos do próprio vetor (M13F e M13R). Sendo sequenciado (ver sequência abaixo), e a sequência obtida foi submetida ao processamento de um fenograma com dados moleculares provenientes do GenBank.

Sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da protein ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi* (GenBank / 251 pb):

```
ACGTGCGTGTGCGACTCCACCCCTTCCACGTCATCCGCATTAACAAGATGTTGTCCTGCGCC
GGGGCTGATAGGCTCCAGACGGGGATGCGAGGTGCCTTCGGTAAGCCCCAGGGGACCGTGGC
GAGGGTCCAGATTGGCCAACCCATCATGTTCGGTCCGAACGCACGACCGCCACAAGGCACATG
TGATCGAGGCACTCAGGAGGGCCAAGTTTAAGTACCCTGGGAGGCAGAAGATCTACGTCTCC
CGC
```

4.1.9. Alinhamento da sequência deduzida e análise de identidade (filogenia molecular)

As análises das sequências de diversas espécies de caranguejos com dados moleculares provenientes do GenBank (**Tabela 9**), foram realizadas com o auxílio do programa BioEdit, disponível para download <http://pt.freedownloadmanager.org/Windows-PC/BioEdit-GRATUITO.html>. Esse programa procura por regiões de similaridade (homologia) entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, e as compara com sequências depositadas em bancos de dados internacionais. O programa BioEdit é muito utilizado na edição de sequências e com alguns recursos de alinhamento.

Os alinhamentos mostraram uma hipótese de homologia entre as regiões conservadas (posições) de uma região ou entre as sequências que se supõem homólogas. Com sequências deduzidas de outras espécies de caranguejos depositadas no GenBank, foram realizadas

análises com auxílio do programa Clustal Omega (EMBL-EBI/Hinxton), disponível gratuitamente no site: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/help/>. Essas regiões conservadas foram analisadas para a confecção de um fenograma (**Figura 41**) específico/genérico para essas espécies de caranguejos serem comparadas com o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*, resultando numa maior proximidade com o *Dilocarcinus pagei* pelo maior número de sequências de nucleotídeos semelhantes.

Tabela 9. Sequências provenientes do GenBank formadas por 251 pb, de diversas espécies de caranguejos, com dados moleculares da proteína ribossomal L10 (PRL10) obtidos do tecido branquial.

Espécies de caranguejos	LOCUS GenBank
<i>Goniopsis cruenta</i>	KX855934
<i>Dilocarcinus pagei</i>	KT876051
<i>Acanthocyclus albatrossis</i>	KP954300
<i>Clibanarius claptetarius</i>	KP890669
<i>Clibanarius vittatus</i>	KP890668
<i>Callinectes ornatus</i>	KM580063
<i>Halicarcinus planatus</i>	KM360152
<i>Pachygrappus transversus</i>	KX855935
<i>Uca maracoani</i>	KM360149
<i>Aratus pisonii</i>	KJ081246
<i>Uca uruguayensis</i>	KJ081245
<i>Ucides cordatus</i>	KF826772
<i>Neohelice granulata</i>	KF442998
<i>Armases rubripes</i>	KF442997
<i>Uca rapax</i>	KC954731
<i>Uca thayeri</i>	KC954730
<i>Uca mordax</i>	KC 954728
<i>Uca leptodactyla</i>	KF 153236
<i>Uca cumulanta</i>	KF153235
<i>Uca burgersi</i>	KF153234
<i>Ocypode quadrata</i>	JX894250
<i>Callinectes danae</i>	JX888901

Figura 37. Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação do RNA total extraído de *C. guanhumi* (raia 1), tratado com DNase I. As bandas (<100 pb) observadas em cada raia, representam os primers PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R utilizados. C- e C+ representam o controle negativo (em molde) e positivo (cDNA *Uca burgersi*, amplificação do fragmento de ≈ 300 pb), respectivamente. M é o marcador molecular “1 kb DNA Ladder Plus”.

Figura 38. Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação do gene PRL10 tendo como molde o cDNA produzido a partir da extração de RNA total das brânquias do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (raia 1), na qual observa-se o produto esperado (≈ 300 pb) amplificado com os primers PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R em cada espécie, respectivamente. C- e C+ representam o controle negativo (sem molde) e positivo (cDNA *Uca burgersi*), respectivamente. M é o marcador molecular “1 kb DNA Ladder Plus”.

Figura 39. Análise da reação de PCR em gel de agarose 1%, correspondente à amplificação, com enzima Taq DNA polimerase High Fidelity, do gene PRL10 tendo como molde o cDNA produzido a partir da extração de RNA total da brânquia do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (raia 1), observa-se o produto esperado (≈ 300 pb) amplificado com os primers PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R em cada espécie, respectivamente. C- e C+ representam o controle negativo (sem molde) e positivo (cDNA *Uca burgersi*), respectivamente. M é o marcador molecular “1 kb DNA Ladder Plus”.

Figura 40. Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto das PCRs diagnóstico, com o par de primers PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R, das culturas de bactérias (5 µl do inóculo após crescimento por 16 horas a 37°C e 180 rpm) candidatas a conterem os fragmentos de interesse (PRL10, ± 300 pb) inicialmente amplificados a partir do cDNA das brânquias de *Cardisoma guanhumi* (raias 1 e 2). N, controle negativo (sem molde). M, marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies).

Figura 41. Fenograma com base em semelhanças específico/genérico de várias espécies de caranguejos, comparadas com o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*.

4.2. (Na⁺,K⁺)-ATPase BRANQUIAL DE *Cardisoma guanhumi* ACLIMATADO À 22‰ S

4.2.1. Gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade

A análise da centrifugação em gradiente de densidade de sacarose da fração microsomal do tecido branquial posterior do *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade em gradiente contínuo de sacarose (10-50%) em relação à (Na⁺,K⁺)-ATPase está mostrada na **Figura 42**. Observa-se apenas a presença de uma fração (pico I) de membrana com atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase entre 40-42% de sacarose, e que não coincide com o pico principal de proteína (27-29% de sacarose). A fração analisada apresenta outras ATPases, diferentes da (Na⁺,K⁺)-ATPase e capazes de hidrolisar o ATP nas condições experimentais empregadas.

4.2.2. Atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade

A fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S apresentou atividade ATPase total de $303,28 \pm 15,16$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e uma atividade insensível à ouabaína de $68,60 \pm 3,43$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. Não foram observadas perdas significativas de atividade nas preparações estocadas a -20°C por um período de até 4 meses. Foram usadas somente amostras que foram descongeladas imediatamente antes dos experimentos e mantidas em banho de gelo até 10 h.

A fim de verificar a existência de vesículas seladas no meio de reação nas condições de dosagem da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase, foram realizados ensaios na presença de alameticina (0-20 µg totais). A preparação foi pré-incubada com o antibiótico durante 10 minutos, a 25°C, e a reação foi iniciada pela adição do ATP ao meio reacional. Na presença de 10 µg de alameticina foi observada uma atividade de $299,01 \pm 14,95$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ enquanto na ausência dessa droga a atividade estimada foi de $66,61 \pm 3,33$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹. Essa variação significativa na atividade da enzima sugere existência de vesículas seladas no meio de reação o que implica obrigatoriamente a utilização da alameticina nos ensaios de atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase.

Figura 42. Centrifugação em gradiente de sacarose da fração microsomal do epitélio branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade.

Uma alíquota contendo 4,0 mg de proteína foi colocada na superfície do gradiente contínuo de sacarose (10–50 %, p/p). Após a centrifugação a $100.000 \times g$, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas com relação à atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○); atividade (Na^+,K^+) -ATPase (▲); concentração de proteína (■) e concentração de sacarose (□). A figura mostra a média dos valores obtidos utilizando alíquotas de três ($N=3$) diferentes preparações microsomais.

A **Figura 43** mostra o efeito do aumento da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ de salinidade. Em condições saturantes de Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}), K^+ (30 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}) foi observada uma única família de sítios e a hidrólise do ATP ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,2$), $V = 235,62 \pm 11,78$ nmol $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,12 \pm 0,006$ mmol L^{-1} . Nota-se também que a atividade insensível à ouabaína foi estimulada pelo ATP na mesma faixa de concentração (inserção da **Figura 43**), representando 22% da atividade ATPase total e também sugerindo a presença de outras ATPases.

A modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S, pelo Mg^{2+} está mostrada na **Figura 44**. Concentrações crescentes de Mg^{2+} entre 10^{-6} e 5×10^{-3} mol L^{-1} , em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), K^+ (30 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}), estimularam a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase até um valor máximo de $V = 233,39 \pm 11,66$ nmol $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 0,103 \pm 0,0051$ mmol L^{-1} e apresentando interações sítio-sítio ($n_H = 1,2$). Concentrações de íons magnésio superiores à 5 mmol L^{-1} inibiram a atividade ATPase (dados não mostrados). Na inserção da **Figura 44** está mostrado o efeito do aumento da concentração de Mg^{2+} na atividade ATPase total e na atividade insensível a ouabaína. Pode-se observar uma estimulação da atividade insensível a ouabaína de $\approx 19\%$ pelo Mg^{2+} nessa mesma faixa de concentração.

A dependência da atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S em relação ao Na^+ (**Figura 45**) foi caracterizada por uma única curva de saturação, com $V = 234,98 \pm 11,074$ nmol $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, $K_{0,5} = 3,43 \pm 0,171$ mmol L^{-1} , que apresentou interações sítio-sítio ($n_H = 1,2$). Todavia, a atividade insensível à ouabaína não foi estimulada por esse íon nessa mesma faixa de concentração (inserção da **Figura 45**), o que descarta a presença de uma Na^+ -ATPase na preparação microsomal.

A **Figura 46** mostra o efeito da concentração dos íons potássio sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}), a estimulação da atividade da enzima pelo K^+ ocorreu através de cooperatividade negativa ($n_H = 0,4$). Na faixa de concentração de K^+ entre 10^{-5} mol L^{-1} e 3×10^{-2} mol L^{-1} , a hidrólise do ATP ocorreu com $V = 240,93 \pm 12,04$ nmol $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 2,06 \pm 0,103$ mmol L^{-1} . Nesse mesmo intervalo de concentração, a estimulação da atividade ATPase insensível à ouabaína pelos íons potássio, foi de $\approx 22\%$ (inserção da **Figura 46**), e sugere a presença de K^+ -ATPase na fração microsomal.

A **Figura 47** mostra a modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* pelo NH₄⁺. Observa-se que na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), Na⁺ (50 mmol L⁻¹) e Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹) e na ausência de K⁺, a estimulação da enzima ocorreu através de interações sítio-sítio (n_H = 0,8). O aumento da concentração de NH₄⁺ entre 10⁻⁷ e 2×10⁻² mol L⁻¹ provocou um aumento na atividade até valores máximos de V = 234,58 ± 11,72 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e K_{0,5} = 2,24 ± 0,112 mmol L⁻¹. Por outro lado, a atividade ATPase insensível à ouabaína (inserção da **Figura 47**) não foi inibida por concentrações de NH₄⁺ superiores a 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Na **Tabela 10** estão reunidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo ATP e íons magnésio, sódio, potássio e amônio.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à salinidade de 22‰, pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺.

Efetor	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _M (mmol L ⁻¹)	n _H
ATP	235,62 ± 11,78	0,12 ± 0,006	1,2
Mg ²⁺	233,39 ± 11,66	1,03 ± 0,051	1,2
Na ⁺	234,98 ± 11,74	3,43 ± 0,171	1,2
K ⁺	240,93 ± 12,04	2,06 ± 0,103	0,4
NH ₄ ⁺	234,58 ± 11,72	2,24 ± 0,112	0,8

Figura 43. Efeito da concentração do ATP sobre a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 44. Efeito da concentração do Mg^{2+} sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 45. Efeito da concentração do Na^+ sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} , KCl 30 mmol L^{-1} , NADH 0,21 mmol L^{-1} , FEP 3,18 mmol L^{-1} , 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 46. Efeito da concentração do K^+ sobre a atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 47. Efeito da concentração do NH_4^+ sobre a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl_2 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD^+ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados.

Inserção: atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

A variação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S pelo K⁺, na presença de diferentes concentrações de NH₄⁺ (5 mmol L⁻¹ a 20mmol L⁻¹) está mostrada na **Figura 48**. Observa-se que independentemente da concentração do NH₄⁺ presente no meio de reação, a velocidade praticamente permaneceu constante comparada com aquela determinada na ausência de NH₄⁺ (**Tabela 11**). O mesmo ocorreu com relação ao K_{0,5} (**Tabela 11**).

A modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S pelo NH₄⁺ na presença de diferentes concentrações de K⁺ (10 mmol L⁻¹ a 30mmol L⁻¹) está mostrada na **Figura 49**. Similarmente ao observado anteriormente, o aumento da concentração de K⁺ no meio de reação também não provocou alterações significativas no valor da velocidade máxima da reação (**Tabela 11**). O mesmo ocorreu com os valores de K_{0,5} (**Tabela 11**).

Na **Tabela 11** foram resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S pelos íons potássio e amônio.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S pelos íons potássio e amônio.

[K ⁺] (mmol L ⁻¹)	[NH ₄ ⁺] (mmol L ⁻¹)	V (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _M (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K (×10 ³)
Variável	0	240,93 ± 12,04	2,0 ± 0,10	0,4	120,46
Variável	5	260,91 ± 13,04	1,7 ± 0,08	0,6	153,47
Variável	10	227,91 ± 11,39	0,2 ± 0,01	1,3	1139,5
Variável	20	224,91 ± 11,24	1,9 ± 0,09	0,9	118,37
0	Variável	234,58 ± 11,72	2,2 ± 0,11	0,8	106,62
10	Variável	168,66 ± 8,43	0,07 ± 0,003	0,8	2409,4
20	Variável	236,49 ± 11,82	2,0 ± 0,10	0,6	118,24
30	Variável	236,71 ± 11,83	3,0 ± 0,15	0,9	78,90

O efeito da concentração de ouabaína sobre a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S é mostrado na **Figura 50**. Em concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (30 mmol L^{-1}), a curva monofásica obtida sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor. Observa-se também que concentrações de ouabaína da ordem de 3 mmol L^{-1} inibiram cerca de 80% da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. O valor da constante de dissociação calculada para o complexo enzima-ouabaína foi $203,82 \pm 10,19 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (inserção da **Figura 50**).

Figura 48. Efeito da concentração do K^+ na modulação da atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S, na presença de NH_4^+ .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, NAD⁺ 2,11 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L⁻¹, 12 U GAxFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (Δ) sem NH₄Cl. (■) NH₄Cl 5 mmol L⁻¹. (○) NH₄Cl 10 mmol L⁻¹. (▲) NH₄Cl 20 mmol L⁻¹.

Figura 49. Efeito da concentração do NH_4^+ na modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S, na presença de K^+ .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L^{-1} , MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , NAD^+ 2,11 mmol L^{-1} , fosfato de sódio 1 mmol L^{-1} , gliceraldeído-3-fosfato 1,97 mmol L^{-1} , 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. (▲) sem KCl. (□) KCl 10 mmol L^{-1} . (●) KCl 20 mmol L^{-1} . (Δ) KCl 30 mmol L^{-1} .

Figura 50. Efeito da concentração de ouabaína na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 9,2 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para o cálculo de K_I.

4.2.3. Efeito da aclimação em NH_4Cl na atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S

A atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado a 22‰ salinidade na ausência de cloreto de amônio (controle) está mostrada na **Figura 51**. A atividade ATPase total foi $209,53 \pm 10,47 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e uma atividade insensível à ouabaína, $120,95 \pm 6,04 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (inserção da **Figura 51**). Tanto para o controle como nas três diferentes concentrações (120 mg L^{-1} ; 240 mg L^{-1} ; 360 mg L^{-1}) de cloreto de amônio, não foram observadas perdas significativas de atividade quando estocadas a -20°C por um período de 3 meses. Foram usadas somente amostras que foram descongeladas imediatamente antes dos experimentos e mantidas em banho de gelo durante até 10 h.

A utilização de alameticina (0-20 μg totais) no meio de reação revelou a presença de vesículas seladas no meio de reação. Após a incubação da enzima (10 minutos a 25°C), com o antibiótico, a velocidade da reação foi estimada em $291,5 \pm 14,14 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $209,53 \pm 10,47 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, na presença e ausência do antibiótico, respectivamente. Nas preparações de animais aclimatados com cloreto de amônio, as atividades estimadas na presença de alameticina, foram $194,9 \pm 9,74 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $189,6 \pm 9,48 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $161,2 \pm 8,06 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para as concentrações 120 mg L^{-1} ; 240 mg L^{-1} ; 360 mg L^{-1} , respectivamente. Na ausência da alameticina as atividades foram $174,7 \pm 8,73 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; $144,3 \pm 7,21 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; $137,5 \pm 6,87 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente. Essas variações significativas observadas sugerem a existência de vesículas seladas, o que torna necessária a utilização de alameticina nos ensaios de atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

O efeito da modulação do ATP sobre a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado a 22‰ e submetido a estresse de 120 mg L^{-1} de NH_4Cl está mostrado na **Figura 52**. Em condições saturantes de Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}), K^+ (30 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}), a estimulação da atividade da enzima pelo ATP ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ - $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) resultou em uma curva de saturação monofásica com comportamento “Michaeliano”. A atividade específica máxima estimada foi de $85,67 \pm 4,28 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e o $K_M = 0,04 \pm 0,002 \text{ mmol L}^{-1}$. A inserção da **Figura 52** mostra a estimulação das atividades ATPase total e ATPase insensível à ouabaína em função da concentração do ATP. Observa-se também que a atividade ATPase insensível à ouabaína representa $\approx 50\%$ da atividade ATPase total, sugerindo a presença de outras ATPases.

A **Figura 53** mostra o efeito do aumento da concentração de ATP (10^{-7} mol L⁻¹ - 10^{-3} mol L⁻¹) na atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S em condição de estresse com 240 mg L⁻¹ de NH₄Cl. Em concentrações saturantes de Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), K⁺ (30 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹) também foi observada uma única família de sítios e a hidrólise do ATP seguiu uma cinética “Michaeliana” com V= 88,53 ± 4,43 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e K_M= 0,07 ± 0,003 mmol L⁻¹. Nota-se também que a atividade insensível à ouabaína foi estimulada pelo ATP na mesma faixa de concentração representando ≈45% da atividade ATPase total e sugerindo a presença de outras ATPases na preparação microsomal (inserção da **Figura 53**).

O efeito do aumento da concentração de ATP (10^{-7} mol L⁻¹- 10^{-3} mol L⁻¹) na modulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado a 22‰ e submetido a estresse de 360 mg L⁻¹ de NH₄Cl está mostrada na **Figura 54**. Em concentrações saturantes de Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), K⁺ (30 mmol L⁻¹) e Na⁺ (50 mmol L⁻¹) a atividade da enzima foi estimulada até um valor máximo de V= 88,89 ± 4,45 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ e K_{0,5}= 0,1 ± 0,005 mmol L⁻¹, de acordo com cinética cooperativa (n_H=1,3). Na inserção da **Figura 54** está mostrado o efeito do aumento da concentração de ATP na atividade ATPase total e na atividade insensível a ouabaína. Pode-se observar uma estimulação de cerca de ≈45% da atividade insensível à ouabaína.

A **Tabela 12** reúne os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo ATP na fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S de salinidade e em condição de estresse de cloreto de amônio em três concentrações diferentes.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação de ATP sobre atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* submetidos a estresse de amônio.

[NH ₄ Cl] (mg L ⁻¹)	Modulador	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	n _H	V/K _{0,5} (×10 ³)
Controle	ATP	88,58 ± 4,42	0,1 ± 0,005	0,9	886
120	ATP	85,67 ± 4,28	0,04 ± 0,002	1,0	2.142
240	ATP	88,53 ± 4,43	0,07 ± 0,004	1,0	1.265
360	ATP	88,89 ± 4,45	0,1 ± 0,005	1,3	889

Figura 51. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S e sem estresse de NH_4Cl (controle).

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl_2 5 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹, KCl 30 mmol L⁻¹, NADH 0,21mmol L⁻¹, FEP 3,18mmol L⁻¹, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 5,2 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N=3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 52. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 120 mg L^{-1} de NH_4Cl .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C , em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , KCl 30 mmol L^{-1} , NADH $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, FEP $3,18 \text{ mmol L}^{-1}$, 20 U PQ e 78 U LDH . A reação foi iniciada pela adição de $4,8 \text{ }\mu\text{g}$ de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 53. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 240 mg L^{-1} de NH_4Cl .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C , em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , KCl 30 mmol L^{-1} , NADH $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, FEP $3,18 \text{ mmol L}^{-1}$, 20 U PQ e 78 U LDH . A reação foi iniciada pela adição de $5,7 \text{ } \mu\text{g}$ de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

Figura 54. Efeito da concentração de ATP sobre a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado à 22‰ S e sob estresse de 360 mg L^{-1} de NH_4Cl .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C , em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo MgCl_2 5 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} , KCl 30 mmol L^{-1} , NADH $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, FEP $3,18 \text{ mmol L}^{-1}$, 20 U PQ e 78 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de $6,1 \text{ } \mu\text{g}$ de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um dos homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade insensível a ouabaína (○).

4.2.4. Regulação da atividade da (Na⁺,K⁺)-ATPase pelo FXYD2

A **Tabela 13** reúne os valores de velocidade máxima para formação da fosfoenzima na presença de FXYD2, em *C. guanhumi* recém-capturado (16‰ S) e aclimatado a salinidade de 22‰ S. Como controle foi utilizada a (Na⁺, K⁺)-ATPase de rim de porco que, reconhecidamente apresenta o FXYD2 em sua constituição e é estimulada por FXYD exógeno.

Tabela 13. Estimulação da (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *C. guanhumi* pelo FXYD2.

Preparação	V (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	
	sem FXYD2	com FXYD2
16‰	36,16	33,66
22‰	41,78	33,90
Porco	138,73	257,60

4.2.5. Efeito do K⁺ na estabilidade da fosfoenzima

Resultados preliminares do estudo da formação da fosfoenzima mostram que a presença de K⁺ no meio reacional diminui a capacidade máxima de formação da fosfoenzima (EP) na fração microsomal de brânquias de *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S como mostrado na **Figura 55**. A capacidade de fosforilação de EP foi reduzida de $3,13 \pm 0,15$ nmol mg⁻¹ para uma defosforilação nula na presença de KCl 20 mmol L⁻¹.

Figura 55. Efeito do K⁺ na estabilidade da fosfoenzima (EP).

O ensaio de atividade específica da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi realizado através de determinação da velocidade de liberação do [³²P]Pi proveniente do [γ -³²P]-ATP. Foram colocados 30 μ g de enzima em meio reacional com Hepes 15 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 3 mmol L⁻¹, NaCl 100 mmol L⁻¹ e EGTA 0,5 mmol L⁻¹ em volume total de 0,5 mL. A reação hidrolítica ocorreu durante 5 min, a 0°C. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde a uma curva representativa de um homogeneizado.

4.2.6. Análises da atividade das enzimas de estresse oxidativo

Com a aclimação de espécimes de *C. guanhumi* por 10 (dez) dias, em diferentes grupos: salinidade de 16‰ S, salinidade de 22‰ S, 120 mg L⁻¹ de NH₄Cl, 240 mg L⁻¹ de NH₄Cl, e 360 mg L⁻¹ de NH₄Cl. Análises usando a fração microsomal do tecido branquial de cada grupo, com os tipos principais de enzimas que participam do estresse oxidativo e biotransformação de fase II, resultaram num aumento significativo na atividade enzimática quando comparamos os grupos aclimatados em diferentes salinidades com os grupos de diferentes concentrações de cloreto de amônio, os quais também apresentaram diferença quando comparados ao aumento da concentração de cloreto de amônio (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade das enzimas de estresse oxidativo na fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

<i>Grupos Aclimatados</i>	V (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)					V (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
	GR	GST	GPx	G6FD	SOD	CAT
16‰S	208±10,4	73.981±3,7	217±10,8	1.771±88,5	1,41±0,07	2.730±136,5
22‰S	237±11,8	78.882±3,9	332±16,6	1.029±51,4	1,54±0,07	3.204±160,2
120mg L⁻¹ NH₄Cl	92±4,6	52.946±2,6	96±4,8	614±30,7	1,30±0,06	1.000±50,0
240mg L⁻¹ NH₄Cl	184±9,2	62.606±3,1	430±21,5	903±45,1	1,95±0,09	6.102±305,1
360mg L⁻¹ NH₄Cl	191±9,5	88.188±4,4	322±16,1	1.540±77,0	2,27±0,11	6.249±312,4

Estes resultados nos mostram que houve variação da atividade dessas enzimas nos diferentes grupos estudados. A atividade da CAT (Figura 56) foi maior se comparada às demais enzimas, onde sua velocidade máxima foi dada em μmol min⁻¹ mg⁻¹. Já os valores das atividades nas demais enzimas foram dados em nmol min⁻¹ mg⁻¹, onde a atividade da GST (Figura 57) apresentou os maiores valores com essa unidade de medida cinética, enquanto que a atividade da SOD (Figura 58) apresentou os menores valores.

Houve uma aproximada semelhança entre os valores das atividades enzimáticas observadas na GR (**Figura 59**) e na GPx (**Figura 60**), apesar de uma ser inversamente proporcional a outra, já que a GR consome NADPH produzindo GSH a partir da GSSG, enquanto a GPx produzirá GSSG a partir da GSH. O que pode ser explicada pelo fato de uma não depender da outra para apresentarem uma melhor atividade, em muitos organismos, inclusive nos crustáceos. Entretanto, também podemos verificar que a atividade da G6PD (**Figura 61**) foi a única que apresentou o grupo de menor salinidade (16‰ S) com atividade maior que a do grupo de maior concentração de cloreto de amônio (360 mg L⁻¹ de NH₄Cl).

Figura 56. Efeito da atividade da enzima Catalase (CAT) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Figura 57. Efeito da atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Figura 58. Efeito da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Figura 59. Efeito da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Figura 60. Efeito da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Figura 61. Efeito da atividade da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) na fração microsomal do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresenta uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

4.2.7. Análises da osmolalidade na hemolinfa de *Cardisoma guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio

Os valores obtidos nas análises realizadas na hemolinfa de *C. guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio (**Tabela 15 ou Figura 62**) determina a capacidade osmorregulatória dessa espécie como *hiperregulador*, definida pela diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e a do meio externo (1‰ S $\approx$ 30 mOsm Kg⁻¹) em todos os grupos aclimatados.

Tabela 15. Osmolalidade na hemolinfa de *Cardisoma guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

<i>Grupos Aclimatados</i>	Osmolalidade (mOsm Kg⁻¹)
16‰ S	780 $\pm$ 39,0
22‰ S	786 $\pm$ 39,3
120 mg L⁻¹ NH₄Cl	835 $\pm$ 41,7
240 mg L⁻¹ NH₄Cl	845 $\pm$ 42,2
360 mg L⁻¹ NH₄Cl	841 $\pm$ 42,0

Figura 62. Análises da osmolalidade na hemolinfa de *C. guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio.

As análises na hemolinfa foram determinadas continuamente a 25°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando-se três diferentes amostras de hemolinfa de *C. guanhumi* em cada grupo aclimatado. Os dados são a média $\pm$ SEM (N=3). **Inserção:** a figura apresentada uma legenda que corresponde aos grupos das amostras analisadas.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os manguezais constituem um ecossistema costeiro com distribuição tropical e subtropical, situado na confluência entre os ambientes terrestre e marinho e sujeito ao regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991). Nos estuários tropicais a salinidade é a principal variável química que condiciona a distribuição dos organismos, uma vez que a temperatura e a radiação solar têm valores pouco variáveis ao longo do ano (SANTOS-FERNANDES, 1997). As espécies que habitam o estuário devem estar adaptadas a grandes variações diárias de salinidade, mas esta pode também ser considerada uma barreira ecológica para as espécies estenoalinas (BASTOS, 2005). Dentre os crustáceos decápodes, que constituem um dos mais importantes componentes da fauna dos manguezais (COELHO et al., 2004), se destaca o caranguejo *Cardisoma guanhumi* (LATREILLE, 1825). O ciclo biogeoquímico do nitrogênio tem sua importância voltada para a ciclagem de compostos nitrogenados. Nos oceanos, as concentrações de nitrogênio aumentam em direção às áreas costeiras, principalmente em regiões de ressurgência de águas profundas (MEYERS et al., 1994). O íon amônio (NH_4^+) é originado no primeiro estágio da oxidação da matéria orgânica nitrogenada ou excretado diretamente para o meio aquático pelos organismos (CHESTER, 1990). Alguns estudos têm mostrado a toxicidade deste íon no ecossistema, porém a variação dos resultados torna difícil a comparação e a interpretação desses resultados (HANDY & POXTON, 1993). Com o intuito de entender as modificações cinéticas da (Na^+, K^+)-ATPase durante a aclimação desta espécie a diferentes ambientes, os animais foram mantidos durante um mesmo período de tempo em tanques contendo água à 22‰ S e cloreto de amônio em três diferentes concentrações (120 mg L^{-1} ; 240 mg L^{-1} ; 360 mg L^{-1}) e um controle sem amônio. Os parâmetros cinéticos da (Na^+, K^+)-ATPase do *C. guanhumi* aclimatado à 22‰ S foram comparados com o mesmo animal recém-capturado (16‰ S).

Tem sido objeto de estudo de alguns autores, a relação entre a variação da salinidade do meio externo e a atividade específica da (Na^+, K^+)-ATPase presente no tecido branquial dos crustáceos. Sabe-se que essa atividade específica varia grandemente em resposta a alteração na salinidade do meio externo, aumentando quando animais que habitam água salgada são expostos a ambientes mais diluídos (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE, 2003; GARÇON et al., 2009). Além de atuar na regulação osmo-iônica dos crustáceos expostos a diferentes salinidades, essa enzima também participa diretamente da excreção de amônia no epitélio branquial (WIEHRAUCH, 2004). E embora esses fatores já estejam estabelecidos, ainda não se conhecem os mecanismos utilizados na regulação da atividade em resposta à alteração da

salinidade do ambiente, nem os mecanismos moleculares envolvidos no processo de excreção de amônia.

5.1 - Estudo da fração microsomal de *C. guanhumi*

A alteração do padrão de proteínas presentes nas frações microsomais do tecido branquial de *C. guanhumi*, em resposta à aclimação a diferentes salinidades, foi evidenciada pelo perfil do gradiente sacarose (**Figuras 12 e 42**). Os perfis de centrifugação em gradiente sacarose obtidos para os animais recém-capturado e aclimatado a salinidade de 22‰ são diferentes, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do *C. guanhumi* recém-capturado contém dois picos de atividades que aparecem em diferentes densidades de sacarose o que sugere, aparentemente, que se originam a partir de diferentes regiões do epitélio das brânquias (FURRIEL et al., 2010; LUCENA et al., 2012), ou possivelmente a partir do septo intralamelar e células pilares (FREIRE & McNAMARA, 1995). Diferente da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do *C. guanhumi* aclimatado a 22‰ de salinidade que possui apenas um único pico de atividade. Além disso, a presença destes dois picos no guaiumum recém-capturado é contraditória ao que sugere que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ se redistribui na brânquia em frações de membrana de densidade diferente, em resposta à aclimação em salinidade, como relatado para o siri azul *Callinectes ornatus* (GARÇON et al., 2009) e o caranguejo eremita *Clibanarius vittatus* (LUCENA et al., 2012). Essa caracterização da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. guanhumi* aqui está de acordo com resultados apresentados para o caranguejo *Dilocarcinus pagei* e para o *C. ornatus* (GARÇON et al., 2009), mas que difere de *Calinectes danae* (MASUI et al., 2002). A aclimação a diferentes salinidades resultou em uma mudança no micro-domínio da membrana, onde essa proteína é distribuída em membranas de diferentes densidades. Contudo outros estudos são necessários para elucidar a mudança na composição lipídica da membrana.

Na eletroforese desnaturante das frações microsomais do tecido branquial de *C. guanhumi*, há várias bandas protéicas observadas na revelação com prata, sugerindo a presença de outras proteínas com diferentes massas moleculares, como esperado para uma fração microsomal de tecido branquial. A presença de apenas uma banda imunorreativa (~110 kDa) na análise por Western Blotting sugere a presença de uma única isoforma da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no tecido branquial do animal recém-capturado, ou que as isoformas presentes não apresentam grande variação de massa e portanto não podem ser separadas nas condições empregadas (**Figura 11**). O peso da isoforma foi muito parecida com a encontrada em diversas espécies, como *Callinectes ornatus* recém-capturado ou aclimatado a diferentes

salinidades (GARÇON et. al., 2007; GARÇON et al., 2009); *Callinectes danae* (MASUI et al., 2002); *Macrobrachium amazonicum* (SANTOS et al., 2007) e *Clibanarius simmetrycus* recém-capturado ou aclimatado a elevada salinidade (GONÇALVES et. al., 2006; LUCENA et al., 2012).

5.2 - Localização subcelular da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase braquial de *Cardisoma guanhumi*

Em vários crustáceos, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase localiza-se na região lamelar ou basolateral das brânquias (PIERROT, 1994; LIGNOT & CHARMANTIER, 2001; TORRES et al., 2007). As brânquias são consideradas uma das principais estruturas responsáveis pela homeostase dos fluídos extracelulares em diversos grupos de animais (PÉQUEUX, 1995), no *C. guanhumi* encontramos 8 pares de brânquias (**Figura 1**). Em crustáceos, as brânquias constituem um epitélio especializado altamente amplificado e seletivamente permeável, realizando as trocas iônicas e gasosas entre o ambiente e o meio extracelular dos organismos (PÉQUEUX, 1995). Assim, acredita-se que a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase presente nas invaginações das células do septo criem um gradiente eletroquímico que dirige tanto a captação de Na^+ em meios diluídos quanto a extrusão de Na^+ em meios concentrados (McNAMARA & TORRES, 1999).

As brânquias são estruturas pouco adaptadas para a respiração terrestre por serem difíceis de serem sustentadas no ambiente aéreo e por serem particularmente vulneráveis à perda de água por evaporação. Há uma tendência para que a câmara branquial de *C. guanhumi* apresente-se modificada para atuar de maneira semelhante a um pulmão, a fim de diminuir a perda de água (RUPPERT & FOX; BARNES, 2008). Em algumas espécies como o caranguejo *Carcinus maenas* (CIELUCH et al., 2004), o camarão *Crangon crangon* (CIELUCH et al., 2005) e o camarão *M. amazonicum* (BOUDOUR & BOUCHEKER et al., 2013; LEONE et al., 2014), a ontogenia da capacidade osmorregulatória e tolerância a salinidade são relacionadas com o desenvolvimento dos ionócitos e com a expressão da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase em órgãos da câmara branquial.

A imunolocalização da subunidade α da enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (**Figura 10**) mostrou que o espaço da hemolinfa entre as duas camadas epiteliais opostas é organizado em torno das células pilares, que se projetam de cada lado da lamela das brânquias formando as lacunas. Outras células que não projetam profundamente no espaço da lamela e também estão presentes abaixo da cutícula. Este arranjo é consistente com a arquitetura lamelar das brânquias posteriores em caranguejos hiperosmorregulantes (TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2008), no qual a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase está localizada na região basolateral dos ionócitos epiteliais

entre as células pilares (TOWLE & KAYS, 1986; TAYLOR & TAYLOR, 1992). No entanto, em contraste, nossos dados imunohistoquímicos mostram que a (Na⁺,K⁺)-ATPase se localiza predominantemente na região apical das células pilares, incluindo uma ampla distribuição em todo o corpo de células pilares. Em Leone et al. (2014), a (Na⁺,K⁺)-ATPase está localizada principalmente ao longo do septo intralamelar na região basal das células pilares, assim como foi observado em *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2015). A distribuição incomum da (Na⁺,K⁺)-ATPase em toda célula pilar pode constituir uma reserva vesicular da enzima que poderia ser mobilizada para a membrana celular em condições hipo-osmóticas.

5.3 - Atividade PNFFase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado à 16‰ de salinidade

Vários pesquisadores tem focado seus esforços no estudo da capacidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase em hidrolisar o p-nitrofenilfosfato (PNFF) (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. Está bem estabelecido que, a atividade PNFFase da enzima é estimulada por K⁺ proveniente do lado intracelular da membrana, enquanto a atividade ATPase é estimulada por K⁺ extracelular (DRAPEAU & BLOSTEIN, 1980; GLYNN, 1985). A forma E₂ aparentemente é a principal conformação envolvida na hidrólise do PNFF, que parece não estar associada ao transporte de íons através da membrana (GLYNN, 1985; ROBINSON & PRATAP, 1991; BERBERIAN & BEAUGÉ, 1992; JORGENSEN et al., 1998). Gatto et al. (2007) sugerindo que a conformação predominante da enzima em presença de K⁺ e PNFF corresponderia à forma E₂(K)PNFF, na qual os K⁺ estariam ocluídos no domínio transmembrana. Por outro lado, há algumas evidências de que o PNFF é capaz de fosforilar a enzima (YAMAZAKI et al., 1994; HOMAREDA & USHIMARU, 2005), embora este ponto seja alvo de alguma controvérsia (GLYNN, 1985).

O uso de p-nitrofenilfosfato como substrato para caracterizar cineticamente a atividade de K⁺- fosfatase da enzima das brânquias de crustáceos provou ser uma alternativa conveniente para estudos comparativos da atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase não só em *M. olfersi* (FURRIEL et al. , 2001, MENDONÇA et al., 2007), mas também no caranguejo *Portunidae*, *C. danae* (MASUI et al., 2003; MASUI et al., 2005b), no camarão *M. amazonicum* (BELLI et al., 2009), e no ermitão *Clibanarius symmetricus* (GARÇON et al., 2012). A caracterização cinética da atividade K⁺- fosfatase em *M. amazonicum* juvenil e adulto ajudou a elucidar a

capacidade osmoregulatória nestes dois estágios do ciclo de vida (LEONE et al., 2013). Além disso, para *C. ornatus* aclimatado à 21‰ S, a hidrólise de PNFF foi estimulada sinergicamente por K^+ e NH_4^+ (GARÇON et al., 2013).

Neste trabalho foram empregadas preparações de membranas, que se mostraram adequadas para o estudo *in vitro* das propriedades cinéticas da (Na^+,K^+) -ATPase do tecido branquial de *C. guanhumi*. Utilizando o substrato sintético PNFF foram identificadas nas frações microsomais além da (Na^+,K^+) -ATPase, a presença de outras enzimas capazes de hidrolisar esse substrato. A atividade PNFFase total foi da ordem de $42 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, enquanto as outras enzimas que também hidrolisam esse substrato apresentaram atividade de $14 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, sendo possível caracterizar a atividade K^+ -fosfatase atribuída somente a (Na^+,K^+) -ATPase, como sendo a diferença entre essa duas atividade, de acordo com o relatado em outros trabalhos do nosso grupo (FURRIEL et al., 2001, 2004; MASUI et al., 2005; MENDONÇA et al., 2007; BELLI et al., 2009; GARÇON et al., 2012; GARÇON et al., 2013; LEONE et al., 2013). O valor de atividade máxima observado para *C. guanhumi* foi menor quando comparados aos camarões *M. amazonicum* e *M. olfersii*, ao siri *C. danae* e ao ermitão *Clibanarius vittatus* (BELLI et al., 2009; LEONE et al., 2012; FURRIEL et al., 2001; MASUI et al., 2003; GARÇON et al., 2012).

Os sítios de ligação de alta afinidade, muitas vezes observados para a hidrólise de ATP pela (Na^+,K^+) -ATPase de crustáceos (MASUI et al., 2002; GONÇALVES et al., 2006; SANTOS et al., 2007; LUCENA et al., 2012), não foram revelados para a hidrólise de p-nitrofenilfosfato, sugerindo que eles não estão disponíveis na forma E_2 da enzima de *C. guanhumi*. O valor da afinidade aparente da enzima de *C. guanhumi* para o p-nitrofenilfosfato ($K_{0.5} = 2,9 \pm 0,14 \text{ mmol L}^{-1}$) é semelhante ao do siri *C. danae* recém-capturado (MASUI et al., 2003), do camarão *M. olfersi* em água doce (FURRIEL et al., 2001), e aclimatado à 21‰ de salinidade (MENDONÇA et al., 2007), do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2005b). No siri *C. ornatus* aclimatado à 21‰ de salinidade, foi observado que o p-nitrofenilfosfato e ATP são hidrolisados no mesmo sítio de baixa afinidade, onde se liga o nucleótideo, como pode ser observado para a (Na^+,K^+) -ATPase de mamífero (ESMANN, 1988). Além disso, a hidrólise de ambos os substratos parece ocorrer no mesmo microambiente de membrana (GARÇON et al., 2013; FURRIEL et al., 2001; GACHE et al., 1976).

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; GATTO et al., 2007) e a inibição da atividade em concentrações elevadas destes íons pode ser atribuída à competição com os íons

K⁺ pela ligação aos sítios de transporte, na molécula da enzima (GATTO et al., 2007). Embora, as altas concentrações de íons sódio inibem a atividade K⁺-fosfatase aparentemente devido à competição com os íons potássio pelos sítios de ligação (GLYNN, 1985; ROBINSON & PRATAP, 1991), têm sido sugerido que os íons Na⁺ em excesso também ocupam o(s) sítio(s) de ligação dos íons Mg²⁺, contribuindo para a inibição (DRAPEAU & BLOSTEIN, 1980; ROBINSON & PRATAP, 1991). A estimulação da atividade K⁺-fosfatase pelos íons magnésio ocorreu através de cinética cooperativa com valor de afinidade (K_{0,5}= 2,5 mmol L⁻¹) maior que o relatado para outros crustáceos (FURRIEL et al., 2001; MASUI et al., 2003; MASUI et al., 2005; MENDONÇA et al., 2007; BELLI et al., 2009; GARÇON et al., 2007 e 2009).

Em presença de concentrações saturantes de PNFF e íons Mg²⁺, os íons K⁺ estimularam a atividade enzimática, através de uma única família de sítios, sugerindo a ausência de mais de uma família de sítios para os íons K⁺. A afinidade aparente da enzima branquial de *C. guanhumi* por íons K⁺ é semelhante aquela encontrada para *C. danae* aclimatado à salinidade de 15‰ S (K_{0,5}= 2,9 mmol L⁻¹) e recém capturado à 33‰ S (K_{0,5}= 2,1 mmol L⁻¹) (MASUI et al., 2005, 2003). Valores próximos foram relatados para a (Na⁺,K⁺)-ATPase de vertebrados (ROBINSON, 1981; GLYNN, 1985).

Os íons K⁺ podem ser substituídos por íons NH₄⁺ na estimulação da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺,K⁺)-ATPase de vertebrados (ROBINSON, 1970; KURTZ & BALABAN, 1986; SKOU & ESMANN, 1992), e do tecido branquial de diferentes crustáceos (HOLLIDAY, 1985; WALL, 1996; FURRIEL et al., 2004; MASUI et al., 2002, 2003). Na estimulação da atividade K⁺-fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* pelos íons NH₄⁺ em presença de concentrações saturantes de PNFF e íons Mg²⁺, e na ausência de íons K⁺, observa-se uma única curva, com cooperatividade positiva, sugerindo a presença de mais de um sítio de ligação para íons NH₄⁺ na molécula da enzima. Uma atividade K⁺-fosfatase desprezível foi observada para concentrações de íons NH₄⁺ menores que 1,0 mmol L⁻¹. O valor de K_{0,5} determinado para os íons NH₄⁺ é cerca de 2 (duas) vezes maior que o determinado para a enzima branquial de *C. danae* aclimatado à 15‰ S (MASUI et al., 2005), embora não seja significante diferente do valor determinado para animais da mesma espécie recém-coletados à 33‰ S (MASUI et al., 2003). Esse valor também é semelhante ao encontrado para *M. olfersii* capturado em seu habitat natural (FURRIEL et al., 2004) ou aclimatado à 21‰ S (MENDONÇA et al., 2007); *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 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. guanhumi* recém-capturado mostrou uma estimulação sinérgica da atividade K^+ -fosfatase por K^+ e NH_4^+ (**Figuras 17 e 18**). Este comportamento sugere, que para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *C. guanhumi* 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. Porém também foi observado para *C. ornatus* aclimatado a diferentes salinidades (GARÇON et al., 2009). Em presença de 20 mM de K^+ incrementos na concentração de NH_4^+ não estimula a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (**Figura 9**), sugerindo fortemente que os íons K^+ podem ocupar os dois sítios expostos na molécula da enzima. 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., 2005a).

Em concentrações saturantes de PNFF, K^+ e Mg^{2+} , os íons Na^+ inibiram fortemente a atividade K^+ -fosfatase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* numa faixa de concentrações entre $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $5 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Uma atividade residual de aproximadamente 100% foi observada para concentrações de sódio menor que $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os íons K^+ e Mg^{2+} são essenciais para atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ enquanto que os íons Na^+ inibem esta atividade da enzima (GLYNN, 1985; ROBINSON & PRATAP, 1991; FURRIEL et al., 2001; MASUI et al., 2003; MENDONÇA et al., 2007). Esta inibição aparentemente acontece devido a enzima está na conformação E_2 havendo uma competição entre os íons Na^+ e K^+ pelos sítios de estimulação da atividade fosfatase. Tem sido sugerido que os íons Na^+ ocupam também o (s) sítio (s) de ligação dos íons Mg^{2+} , contribuindo para a inibição (DRAPEAU & BLOSTEIN, 1980; ROBINSON & PRATAP, 1991).

A ouabaína é o inibidor específico da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (MIDDLETON et al., 2000; POST, 2003; CRAMBERT et al., 2004). Dessa forma, a inibição em cerca de 60% da atividade PNFFase total, na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} , corresponde a K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. A curva de inibição monofásica sugere a presença de um único sítio para a ligação desse inibidor à enzima. A curva de saturação simples obtida com ouabaína variando de 10^{-6} a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ exclui a presença de diferentes isoformas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Valores de K_i para a inibição da atividade K^+ -fosfatase pela ouabaína na faixa de 3 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram relatados para $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de outras fontes (GACHE et al., 1976; ROBINSON, 1981), sendo que o valor de K_i encontrado para a enzima de *C. guanhumi* ($370,0 \pm 18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) encontra-se maior que esta faixa. O K_i para a enzima de *C. guanhumi* é semelhante a relatada para o siri *C. danae* recém-capturado (MASUI et al., 2003) e do

camarão de água doce *M. olfersi* (FURRIEL et al., 2001), entretanto, é cinco vezes menor que do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2005b) e do siri *C. ornatus* aclimatado à 21‰ de salinidade.

A caracterização cinética da atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações de membrana do tecido branquial de *C. ornatus* utilizando o substrato PNFF 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; GARÇON et al., 2009; LUCENA et al., 2017). Além disso, esses resultados são de grande utilidade para uma rápida comparação entre a enzima de organismos diferentes ou aclimatados a diferentes condições.

5.4 - Efeito de metais divalentes na atividade PNFFase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado à 16‰ de salinidade

O encontro da água doce de rios com água salgada dos mares constitui um ambiente estuarino, que apresenta um gradiente longitudinal de salinidade, variável em cada estação do ano e suscetível a flutuações momentâneas. Tal ambiente é favorável para habitação de organismos que suportam tais oscilações de concentração dos sais (denominados de eurialinos, que apresentam adaptações fisiológicas para tais ambientes), uma vez que é rico em nutrientes (devida incessante movimentação dos corpos d'água, o que promove um fenômeno análogo ao da ressurgência marítima) e com baixa taxa de competição. Porém, ao mesmo tempo os estuários são regiões suscetíveis a acumulação de agentes contaminantes provenientes de atividades humanas (HENRY et al., 2012), através da disposição final ambientalmente inadequada de despejos agroindustriais, nos quais os íons de metais necessários na dieta de um organismo aquático (além da presença de cátions de metais pesados) podem apresentar toxicidade aguda ou crônica se estiverem presentes em concentrações muito elevadas no ambiente.

Embora, a (Na^+, K^+)-ATPase transporte cátions monovalentes, os cátions divalentes também podem se ligar a estes sítios de transporte. Sabe-se que existe pelo menos um sítio de ligação para o Mg^{2+} , que é importante tanto para a atividade ATPase quanto PNFFase (KARLISH, 2003; GATTO et al., 2007). Os grupos tióis (SH) da (Na^+, K^+)-ATPase são os principais sítios de ligação de metais divalentes, que alteram a atividade da enzima de diferentes modos.

Dentre os diferentes metais que podem estar presentes no ambiente estuarino, o cádmio (Cd^{2+}) exerce seu efeito inibitório sobre atividade da (Na^+, K^+)-ATPase atuando no lado citoplástico da membrana plasmática (TOKUSHIGE et al., 1984). Ao nível molecular, o chumbo (Pb^{2+}) interfere na clivagem hidrolítica do intermediário fosforilado E_2P durante a etapa de translocação do K^+ (GRAMIGNI et al., 2009). A prata (Ag^+) compete pelos sítios de ligação do Mg^{2+} na (Na^+, K^+)-ATPase, inibindo assim a fosforilação da enzima (FERGUSON et al., 1996). O mercúrio (Hg^{2+}) provoca distúrbio na membrana, que culminam na liberação da subunidade α preferencialmente na conformação E_2 (IMESH et al., 1992).

Por outro lado, os efeitos dos íons divalentes na atividade PNFFase ainda são discutidos. O Ca^{2+} na presença de Mg^{2+} e ausência de K^+ ativa a atividade PNFFase (HUANG et al., 1984), podendo ainda apresentar um efeito inibitório da atividade quando ligado ao sítio catalítico da enzima (FORBUSH, 1988; VASALLO & POST, 1986). Também foi demonstrado que o Mn^{2+} suporta a atividade PNFFase na ausência de Mg^{2+} e K^+ , sugerindo-se que ele favorece a conformação E_2 . Outros autores mostram que o Mn^{2+} pode ligar-se aos sítios de transporte (ROBINSON, 1981). GATTO et al., (2007) demonstraram que o Mn^{2+} induz alterações no padrão de fluorescência da (Na^+, K^+)-ATPase, estimulando a atividade PNFFase devido a ligação tanto ao sítio catalítico quanto aos sítios de transporte.

Foi observado que, na presença de K^+ e Mg^{2+} , o Mn^{2+} promoveu um efeito inibitório bifásico na atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+)-ATPase (**Figura 22**), apresentando dois sítios de ligação (um de alta e outro de baixa afinidades, segundo os dois valores de K_i encontrados). Abaixo de concentrações na ordem de 10^{-7} M, os íons Mn^{2+} não provocam efeito na atividade K^+ -fosfatase, cujo valor coincide com o máximo de atividade nas condições de saturação de PNFF, K^+ e Mg^{2+} ; altas concentrações (na ordem de 10^{-2} M), esta atividade é praticamente nula. Este efeito inibitório obtido (**Figura 22**) diverge daquele efeito estimulatório relatado na literatura, uma vez que ele possivelmente compete com os cofatores, diminuindo a atividade fosfohidrolítica da enzima.

O Hg^{2+} é um contaminante que bioacumula-se ao longo das cadeias alimentares e não apresenta nenhuma função metabólica conhecida (BARWICK & MAHER, 2003; GRANDJEAN et al., 2005). O mercúrio é um elemento traço encontrado em diversas formas no meio (vapor de mercúrio, sais inorgânicos e compostos orgânicos), sendo todas estas formas tóxicas e provocando efeitos deletérios principalmente no sistema neural (GRANDJEAN et al., 2005; MERGLER et al., 2007; KARAGAS et al., 2012). O cloreto de mercúrio II (HgCl_2) é uma das formas mais tóxicas de mercúrio devido a sua alta solubilidade em água (DRASCH et al., 2001).

O Hg^{2+} também liga-se ao grupos sulfidrilas de proteínas das membranas celulares, provocando peroxidação lipídica, diminuindo a incorporação de fosfolipídeos e afetando também as membranas mitocondriais (GSTRAUNTHALER et al., 1983; MEHRA & KUNWAR, 1980; HUMES & WEINBERG, 1983). Além disto, enzimas como a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ são conhecidas por serem alvos do Hg^{2+} (EMANUELLI et al., 1996; CLARKSON, 1997; ROCHA et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2003). Acredita-se ainda que, devido ao seu pequeno raio iônico, o Hg^{2+} possa interagir com sítios de ligação do ATP e catiônico, provocando a oxidação dos mesmos (OMOTAYOA et al., 2011).

Um perfil inibitório também foi obtido na modulação da atividade K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na presença do íon Hg^{2+} (**Figura 23**), obtendo uma curva bifásica. Os valores de K_i para este íon (238 ± 12 nM e 320 ± 16 μM) assemelham-se significativamente daqueles obtidos para o Mn^{2+} (233 ± 12 nM e 311 ± 16 μM), de acordo com o mesmo padrão bifásico de inibição da atividade K^+ -fosfatase.

Esta similaridade na modulação destes dois íons divalentes possivelmente é decorrente da similitude de seus raios iônicos. Desta forma, como a afinidade do Hg^{2+} e do Mn^{2+} por grupos químicos contendo enxofre é consideravelmente diferente (como demonstrado pela maior insolubilidade de sulfetos de mercúrio em relação aos de manganês), a similaridade nos parâmetros inibitórios sugere que estes metais divalentes ligam-se em sítios da enzima na ausência de grupos químicos contendo enxofre (como os aminoácidos cisteína e metionina).

Os principais grupos que interagem com o Mg^{2+} em seu sítio de ligação são os fosfatos de nucleotídeos ocluídos (como o ATP) ou oriundos de aminoácidos negativamente carregados (por interação majoritariamente eletrostática) (JORGENSEN et al., 2005); de maneira análoga, os íons Hg^{2+} e Mn^{2+} possivelmente são coordenados por estes grupos negativamente carregados nos sítios inibitórios onde ligam-se.

5.5 - $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S) e aclimatado à 22‰ de salinidade

A relação entre a variação da salinidade do meio externo e a atividade específica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente no tecido branquial dos crustáceos tem sido objeto de estudo de alguns autores (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE, 2003; LEONE et al., 2005; MENDONÇA et al., 2007; MASUI et al., 2009; LUCENA et al., 2012). Sabe-se que essa atividade específica varia grandemente em resposta a alteração na salinidade do meio externo, aumentando quando animais que habitam água salgada são expostos a ambientes mais diluídos (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE, 2003). Além de atuar na regulação osmo-

iônica dos crustáceos expostos a diferentes salinidades, essa enzima também participa diretamente da excreção de amônia no epitélio branquial (WIEHRAUCH et al., 2004). Embora esses fatores já estejam estabelecidos, ainda não se conhecem os mecanismos utilizados na regulação da atividade em resposta à alteração da salinidade do ambiente, nem os mecanismos moleculares envolvidos no processo de excreção de amônia. A fim de contribuir para o esclarecimento dessas questões, comparamos as propriedades cinéticas e moleculares da (Na⁺,K⁺)-ATPase expressa nas frações microsomais do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado e aclimatado à 22‰ de salinidade.

Dentre as enzimas de vertebrados, algumas enzimas de crustáceos apresentam dois sítios de ligação para o ATP, como a enzima do siri *C. danae* (MASUI et al., 2002), do ermitão entre marés *Clibanarius vittatus* (GONÇALVES et al., 2006) e do camarão *M. amazonicum* mantido em água doce (SANTOS et al., 2007) ou aclimatado à 21‰ de salinidade (BELLI, 2008). Contudo a enzima do tecido branquial de *C. guanhumi* apresentou apenas uma família de sítios, similarmente ao reportado para as enzima 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). Entretanto, a localização destes sítios na molécula da enzima e a caracterização cinética dos sítios de alta afinidade ainda são controversas (FEDOSOVA & ESMANN, 2007). As estruturas de alta resolução obtidas para a enzima e também para o domínio N isolado não incluem o nucleotídeo ligado, ou correspondem à forma de baixa afinidade pelo ATP (HILGE et al., 2003; HAKANSSON, 2003; MORTH et al., 2007). A hidrólise do ATP para a enzima de *C. guanhumi* recém-capturado, ocorreu segundo uma cinética michaeliana, assim como observado para o sítio de baixa afinidade das enzimas de *C. danae* (MASUI et al., 2002) e *C. vittatus* (GONÇALVES et al., 2006) e para outras (Na⁺,K⁺)-ATPases já estudadas (LUCU & TOWLE, 2003; LEONE et al., 2005b).

Com o estudo dos parâmetros cinéticos tendo como moduladores os íons sódio e os íons potássio nas frações microsomais do tecido branquial de *C. guanhumi*, em resposta da aclimação à 22‰ de salinidade, foi evidenciado alteração na atividade específica se comparado ao *C. guanhumi* recém-capturado à 16‰ S (**Tabelas 10 e 6**), observando-se que essa mudança significativa na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase, sugere que a aclimação a diferente salinidade resulta em uma mudança nos parâmetros cinéticos dessa espécie. Na ausência de íons magnésio a enzima não é capaz de hidrolisar o ATP, pois o complexo Mg-ATP é o verdadeiro substrato da (Na⁺,K⁺)-ATPase (GLYNN, 1985; FURRIEL et al., 2000; KARLISH, 2003; GARÇON et al., 2007). Porém excesso de ATP ou Mg²⁺ livre, inibem a atividade ATPase, como observado nesse estudo bem como para a enzima isolada de diversas

fontes (ROBINSON, 1981; ROBINSON e PRATAP, 1991; TENTES e STRATAKIS, 1991; FURRIEL et al., 2000; MASUI et al., 2002; GONÇALVES et al., 2006; GARÇON et al., 2007; SANTOS et al., 2007). A afinidade da enzima de tecido branquial de *C. guanhumi*, recém-capturado e aclimatado à 22‰ S, pelos íons magnésio é muito similar aos valores relatados para a enzima de vertebrados (GLYNN, 1985; ROBINSON e PRATAP, 1991), membrana axonal 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., 2005). As várias isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ dos vertebrados apresentam afinidades aparentes diferentes por ATP, Na^+ e K^+ (LEVENSON, 1994; THERIEN et al., 1996; BLANCO & MERCER, 1998; SWEENEY & KLIP, 1998; CRAMBERT et al., 2000; SEGALL et al., 2001; LOPEZ et al., 2002).

Mais recentemente tem sido proposto que a relevância fisiológica da grande diversidade de isoformas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ encontrada nos vertebrados não está diretamente relacionada às diferenças cinéticas entre elas, que parecem ser sutis, mas a interações isoforma-específicas com diversas proteínas regulatórias (PRESSLEY et al., 2005). Em contraste com os vertebrados, pouco se conhece sobre a ocorrência de isoformas da enzima nos crustáceos e ainda menos sobre diferenças cinéticas e funcionais entre elas. A afinidade aparente da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, extraída de diversas fontes, para os íons sódio varia entre 0,06 e 41,6 mmol L⁻¹ (ROBINSON & PRATAP, 1991; VILSEN, 1995; THERIEN et al., 1996; SPECHT et al., 1997; LUCU & TOWLE, 2003). Analisando os dados atualmente disponíveis para $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPases}$ branquiais de crustáceos marinhos, observa-se que as enzimas de certas espécies, tais como *C. pagurus* e *Macropipus puber*, apresentam constantes de afinidade aparente para Na^+ de 34,6 mmol L⁻¹ e 41,6 mmol L⁻¹, respectivamente, enquanto outras espécies apresentam valores 7-8 vezes menores (LEONE et al., 2005b).

Foram identificadas outras enzimas P-ATPases (através de experimentos com vários inibidores na fração microsomal do tecido branquial do guaiamum. Podemos constatar na **tabela 8** a presença de fosfatases neutras (2%) conforme relatado para *vittatus* recém capturado (GONÇALVES et al., 2006). Fosfates neutras também foram relatadas para *M. amazonicum* mantido em água doce (SANTOS et al., 2007) bem como para outros crustáceos (LOVETT et al., 1994). Por outro lado, não foi observada inibição parcial da atividade insensível à ouabaína por DMSO (dimetil sulfóxido) e etanol. A inibição por aurovertina sugere a presença de $(\text{F}_0\text{F}_1)\text{-ATPase}$ na preparação, sendo igual ao resultado encontrado para os animais recém capturados (GONÇALVES et al., 2006), *M. amazonicum* mantido em água doce (SANTOS et al., 2007) e *C. ornatus* (GARÇON et al., 2007).

A bafilomicina é um inibidor específico de V-ATPase, que inibe a enzima em concentrações da ordem de nanomolar (HUSS & WIECZOREK, 2009). O efeito da exposição a diferentes salinidades sobre a atividade V-ATPase branquial dos crustáceos tem sido muito pouco estudado e ainda não está bem estabelecido (FIRMINO, 2009). Existem evidências consideráveis da participação de uma V-ATPase no processo osmorregulatório de captura de íons através do epitélio branquial de crustáceos tolerantes à água doce (ZARE & GREENAWAY, 1998; WEIHRAUCH et al., 2001; TOWLE & WEIHRAUCH, 2001; KIRSCHNER, 2004; GENOVESE et al., 2004). No presente estudo também não foi detectada a tapsigargina e do EGTA a presença de (Ca^{2+}) -ATPase com os resultados obtidos para o guaiamum recém capturado. Portanto, a expressão desta enzima parece estar inibida em resposta à P-ATPases presentes na fração microsomal de *C. guanhumi*. Estes resultados também estão em acordo com Faleiros (2007) que relatou uma diminuição de cerca de 4 vezes na expressão do RNAm para a subunidade da V-ATPase no tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado à 25‰ S por um período de 10 dias, quando comparada àquela determinada para animais mantidos em água doce.

Houve mudanças significativas na afinidade aparente por K^+ determinada para a enzima branquial de *C. guanhumi* recém-capturado e aclimatado à 22‰ S, ($K_{0,5} = 0,17 \pm 0,008 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $K_{0,5} = 2,06 \pm 0,103 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), esses valores são diferentes aos relatados para o de *C. danae*, aclimatado à 15‰ S (MASUI et al., 2002), como também 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., 2005b) e para a enzima de membranas axonais de *C. pagurus* (GACHE et al., 1976), sugerindo portanto que a afinidade da enzima pelos íons potássio varia com a salinidade do meio que o animal habita. 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). Entre os crustáceos, estudos empregando vesículas de membrana das brânquias posteriores de *C. sapidus* demonstraram que os íons NH_4^+ podem substituir o K^+ como contra-íon para o transporte de Na^+ pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase (TOWLE & HOLLELE, 1987). Para a enzima presente no tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado e aclimatado à 22‰ S, o valor de $K_{0,5}$ para os íons NH_4^+ foi estimado em $0,60 \pm 0,030$ e $2,24 \pm 0,112 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Esses valores são similares aos relatados para a enzima do tecido branquial de *C. ornatus* recém-capturado (GARÇON et al., 2007) e para outras espécies de crustáceos, tais como *C. danae* recém-capturados (MASUI et al., 2002), *M. olfersii* (FURRIEL et al., 2004), *X. kroyeri* (LEONE et al., 2005b), bem como para a enzima de membrana axonal de caranguejo (SKOU, 1960; ROSSI et al., 1978). Fisiologicamente, a

(Na⁺,K⁺)-ATPase transporta Na⁺ e K⁺, assim, mesmo sendo possível a ligação dos íons NH₄⁺ 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., 2005), *M. olfersii* (FURRIEL et al., 2004) bem como para a enzima de vertebrados (ROBINSON, 1970). Diferentemente ao relatado para *C. ornatus* recém-capturado (GARÇON et al., 2007) e para outras espécies de crustáceos, como *C. danae* (MASUI et al., 2002), *M. olfersii* (FURRIEL et al., 2004) e *C. vittatus* (GONÇALVES et al., 2006), a (Na⁺,K⁺)-ATPase presente nas brânquias de *C. guanhumi* recém-capturado e aclimatado à 22‰ S não apresentaram uma estimulação sinérgica por K⁺ e NH₄⁺, como curiosamente, o estímulo sinérgico não é visto no caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* (FURRIEL et al., 2010). O estímulo sinérgico de espécies específicas pelo NH₄⁺ mais o K⁺ ocorre em vários crustáceos: *M. amazonicum* (SANTOS et al., 2007; LEONE et al., 2014), *M. rosenbergii* (FRANÇA et al., 2013), *Clibanarius vittatus* (GONÇALVES et al., 2006; LUCENA et al., 2012), *Callinectes ornatus* (GARÇON et al., 2009) e o *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2015a).

5.6 - Efeito das diferentes poliaminas na atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial de *Cardisoma guanhumi* recém-capturado (16‰ S)

A invasão dos ambientes de água doce é um processo evolutivo complexo que implica um considerável gasto energético em consequência de três eventos: absorção de sal pelas brânquias; produção de urina hiposmótica em algumas espécies; síntese e transporte de efetores osmóticos intracelulares em espécies diádromas (AUGUSTO et al., 2007). Além disso, algumas espécies de crustáceos ainda não conquistaram totalmente o ambiente dulcícola.

Uma forma de se adaptar a esta nova condição é alterar a atividade de enzimas envolvidas no processo de osmorregulação com a (Na⁺,K⁺)-ATPase. Assim, a atividade (Na⁺,K⁺)-ATPase da glândula antenal da lagosta de água doce, *Astacus leptodactylus*, diminui quando ela se move para ambientes de maior salinidade (KHODABEEH et al., 2005). Um fenômeno de ocorrência geral entre crustáceos decápodes aclimatados é a participação dos aminoácidos livres não essenciais ao controle do volume celular em diferentes tecidos e estágios ontogenéticos (PROSSER, 1973; CLAYBROOK, 1983; CHARMANTIER, 1998; McNAMARA et al., 2004; AUGUSTO et al., 2007). Outra forma de se tornar mais tolerante ao estresse salino é através do acúmulo de osmólitos de baixa massa molecular como as poliaminas (BOUCHEREAU et al., 1999), que são moléculas carregadas positivamente e que

se ligam aos ácidos nucleicos com alta afinidade (WU et al., 2007). Essa hipótese pode ser demonstrada pelo fato de o aumento da salinidade e o estresse osmótico regular o aumento do conteúdo celular de poliaminas em células de *Arabidopsis thaliana* (BAGNI et al., 2006) e o estresse hiperosmótico artificialmente induzido em organismos unicelulares como na cianobactéria *Synechocystis sp.* hiper-regular a biossíntese de espermidina (JANTARO et al., 2003).

Poliaminas são moléculas altamente carregadas positivamente e que podem se ligar aos ácidos nucleicos com alta afinidade, sugerindo sua importância na síntese de DNA e/ou regulação (WU et al., 2007). As poliaminas inibem a atividade (Na^+, K^+)-ATPase de vários tecidos de vertebrados, supostamente pela ligação aos resíduos carregados negativamente da enzima (ROBINSON et al., 1986; KUNTZWEILLER et al., 1995). Resultado semelhante foi encontrado por Garçon et al. (2011) em um estudo com *C. ornatus* onde também foi evidenciada a dependência da concentração das poliaminas na inibição da atividade (Na^+, K^+)-ATPase.

A diamina putrescina (**Figura 32**) mostrou-se um bom regulador da atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações microsomais de *C. guanhumi*, provocando uma inibição de pelo menos 35%. Ainda não está bem definido se a concentração de putrescina nas brânquias depende do ambiente, haja visto que em *Artemia franciscana* a concentração de putrescina aumenta durante a exposição a um meio hiposmótico (WATTS, 1994), enquanto que no *C. sapidus* a concentração de putrescina aumenta em meios hiperosmóticos (LOVETT & WATTS, 1995). Nestas duas espécies foi mostrado que quando os níveis de putrescina são aumentados, ocorre a diminuição da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase (HOLLIDAY et al., 1990; LOVETT & WATTS, 1995), sugerindo que a putrescina é um inibidor da atividade (Na^+, K^+)-ATPase como observado no presente trabalho.

A espermidina (**Figura 33**) mostrou-se um eficiente inibidor da atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações microsomais de *C. guanhumi*, em concentrações crescentes teve inibição de quase 100% da atividade. A inibição variou entre 22% no estágio III e 82% no estágio juvenil. Uma inibição de quase 100% da atividade (Na^+, K^+)-ATPase pela espermidina foi relatada para a enzima branquial de *C. ornatus* (GARÇON et al., 2011). Entretanto, foi diferente da enzima branquial de *C. danae*, para qual o inibidor mais forte foi a espermina, devido ao maior conteúdo de cargas positivas (SILVA et al., 2008). Na **Figura 34** a espermina mostrou-se um fraco regulador da atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações microsomais de *C. guanhumi*, provocando uma inibição considerável (< 20%). O papel fisiológico da espermina na modulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase ainda é incerto, uma vez que uma poliamina localiza-se geralmente no núcleo das células, interagindo

primariamente com a cromatina (TABOR & TABOR, 1984) e assim, seria difícil ela modular uma enzima de membrana.

A octopamina (**Figura 35**) mostrou-se um eficiente inibidor da atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações microsomais de *C. guanhumi*, chegando a inibir a atividade da enzima em 70%. Estes resultados são diferentes dos encontrados por Kamemoto (1991), que observou que a injeção de octopamina na hemolinfa de caranguejos eurialinos aumenta em curto prazo o influxo de sódio e atividade (Na^+, K^+)-ATPase. Muitos pesquisadores consideram que quando a salinidade é alterada, a regulação em curto prazo nos crustáceos envolve aminas biogênicas, como a dopamina, octopamina e a norepinefrina, que podem estimular a fosforilação de enzimas das brânquias como a (Na^+, K^+)-ATPase (LUCU & FLIK, 1999; MORRIS, 2001).

A regulação da atividade da (Na^+, K^+)-ATPase branquial dos crustáceos provavelmente também é controlada por fatores neuroendócrinos (MORRIS & EDWARDS, 1995). Em vertebrados, ainda é discutido se a dopamina inibe ou ativa a atividade (Na^+, K^+)-ATPase (SANTOS et al., 1996). Na **Figura 36** observamos uma inibição significativa da (Na^+, K^+)-ATPase por dopamina, esta amina foi capaz de inibir em até 68% a atividade (Na^+, K^+)-ATPase das frações microsomais de *C. guanhumi*.

Enquanto alguns organismos respondem ao stress salino aumentando os níveis de poliamina, dados para crustáceos são escassos. A atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal de *C. guanhumi* recém-capturado foi inibida por putrescina, espermidina, octopamina e dopamina, sendo a espermina a única a não apresentar inibição significativa. Deste modo parece improvável que a espermina poderia desempenhar um papel fisiológico na (Na^+, K^+)-ATPase presente na membrana plasmática das brânquias de *C. guanhumi*. Todavia, observamos também que as aminas biogênicas testadas (putrescina, espermidina, espermina, octopamina e dopamina) não apresentaram efeitos significativos em relação a atividade ATPase da fração microsomal de tecido branquial de *C. guanhumi*, pois quando a atividade foi ensaiada na presença de cloreto de colina 100 mmol L^{-1} , observamos o mesmo perfil observado na inibição da atividade ATPase total nas poliaminas testadas, comprovando que essa inibição foi ocasionada pela medida de concentração de íons (Força Iônica). Dados de vários estudos diferentes sugerem que as poliamina têm de fato um papel na regulação da função celular em organismos expostos a um ambiente sujeito a variação das condições osmóticas e iônicas. Entretanto, o mecanismo pelo qual a regulação ocorre não está totalmente esclarecido.

5.7 - Extração de RNA total, transcrição reversa (RT) do RNAm, amplificação dos fragmentos parciais de cDNAs, alinhamento da sequência deduzida e análise de identidade (filogenia molecular) do tecido branquial de *C. guanhumi*

McNamara e Faria (2012) por meio da compilação de dados acerca da fisiologia osmorregulatória em camarões palemonídeos e as respectivas salinidades dos nichos ocupados, e a partir da incorporação de uma perspectiva filogenética, reconstruíram os estados ancestrais para diversos parâmetros em camarões palemonídeos, uma família monofilética. Nesse contexto, expressão de RNAm e atividade (Na^+, K^+)-ATPase branquial, enzima relacionada primordialmente à hiperregulação em meios diluídos, vêm sendo amplamente investigados em decápodos de ambientes estuarinos e dulcícolas (Castilho *et al.*, 2001; Faleiros *et al.*, 2010; Firmino *et al.*, 2011).

Daí a importância da determinação das sequências parciais de cDNA dos transportadores iônicos (Na^+, K^+)- e $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase, e da proteína ribossomal L10 (PRL10, gene constitutivo) do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi*. Para tanto, realizamos a extração e quantificação de RNA total, como também a transcrição reversa (RT) do RNAm branquial do guaiamum como visto no **tópico 4.1.8** dos resultados deste trabalho. A clonagem e sequenciamento dos fragmentos parciais de cDNA da (Na^+/K^+)- e $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase, não tiveram êxito em inúmeros experimentos realizados, e subsequentemente os resultados dessas sequências não serão depositados no GenBank. Entretanto, a clonagem e sequenciamento dos fragmentos parciais de cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10, gene constitutivo) do tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* teve êxito com banda de aproximadamente 300 pb, resultado da amplificação do cDNA proveniente do RNAm, com os primers degenerados PRL10_Cs_F / PRL10_Cs_R, que apresentaram os tamanhos esperados.

De modo a corroborar com os dados obtidos pelo fenograma criado com dados do GenBank (**Figura 41**), onde os ramos indicaram à proximidade e/ou distanciamento com base no gene constitutivo da sequência parcial com 251 pb de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de diversas espécies de caranguejos comparados com o guaiamum, trouxe à similaridade entre do *Cardisoma guanhumi* com o *Dilocarcinos pagei*. Os ramos indicaram um distanciamento do guaiamum das espécies de caranguejos *Aratus pisonii*, *Goniopsis cruentata* e *Ucides cordatus*, distribuídas a sombra dos manguezais, contrariando a relativa consistência e proximidade desses caranguejos ao guaiamum apresentadas no trabalho de Faria (2015). Porém em Weihrauch *et al.* (2004), à dissimilaridade com base em critérios morfológicos entre *D. pagei* e *N. granulata*, entram em similaridade a análise do fenograma desse trabalho.

Dentre as sequências submetidas de espécies de caranguejos comparadas com o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da protein ribosomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*, foi encontrada grande semelhança dessa espécie, quando comparada com sequência deste gene constitutivo (PRL10) com o caranguejo *Dilocarcinus pagei*, dentre as outras espécies de crustáceos, também depositadas no banco de dados GenBank (**Tabela 9**).

5.8 - Osmolalidade na hemolinfa e atividade (Na^+, K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio

O amônio no ambiente aquático é geralmente baixo devido à nitrificação bacteriana de amônia em nitrato e nitrito (WEIHRAUCH et al., 1999), e a concentração de NH_4^+ raramente excede 5 mM, não poluído à água do mar (KOROLEFF, 1983), enquanto que as concentrações na hemolinfa é de aproximadamente 10 mM em várias espécies de braquiúros adaptados a diferentes salinidades (WEIHRAUCH et al., 1999). No entanto, quando submetidos a um estresse crônico, as concentrações de amônio na hemolinfa pode aumentar, dependendo do grau de salinidade, da concentração amônio e do tempo de exposição (ROMANO & ZENG, 2013).

Sendo assim, nossos experimentos foram realizados, e com os valores obtidos nas análises de hemolinfa de *C. guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio (**Tabela 15**) sugerindo a capacidade osmorregulatória dessa espécie como *hiperregulador*, definida pela diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e a do meio externo ($1\text{‰ S} \approx 30 \text{ mOsm Kg}^{-1}$) em todos os grupos aclimatados. A variação da concentração osmótica da hemolinfa os crustáceos são classificados como *osmoconformadores*, quando mantém a concentração osmótica da hemolinfa semelhante à do ambiente, ou *osmorreguladores*, quando a concentração osmótica da hemolinfa é mantida dentro de certos limites abaixo (hiporregulação) ou acima (hiperregulação) daquela encontrada no meio externo (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE et al., 2003). O caranguejo verde, *Carcinus maenas*, o qual é encontrado em salinidades baixas (um regulador moderado), por exemplo 10‰ podem sobreviver numa aclimação de laboratório com uma salinidade de 8‰ (ZANDERS, 1980). Osmorreguladores moderados podem sobreviver em baixa salinidade, mas não em água doce, e um osmorregulador fraco como o *C. similis* tem um limite de salinidade menor, próximo de 15‰ S (HENRY et al., 2012), sofre uma mortalidade

de 80% quando é aclimatado gradualmente para 5‰ de salinidade em laboratório e mantém um máximo gradiente osmótico da hemolinfa de 250 mOsm Kg⁻¹ H₂O (ENGEL, 1977).

O estudo do caranguejo de *Portunus trituberculatus* exposto a 0, 1 e 5 mg L⁻¹ NH₄Cl resultados mostraram um efeito dose-dependente com a concentração de exposição ao amoníaco (REN et al., 2015). Os aranguejos bêmicos, costumam se enterrar em sedimentos, onde a concentração de amônia chega a 2,8 mmol L⁻¹, e nessas condições esse animal 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, 1999). O amônio pode ser removido a partir da hemolinfa por difusão passiva (WEIHRAUCH et al., 2004a). No entanto, quando a concentração de amônio no ambiente ultrapassa o da hemolinfa, ele é excretado contra um gradiente de concentração, daí a função das células em manter os níveis de amônio nos fluidos corporais dentro de uma faixa tolerável (WEIHRAUCH et al., 2004a). Este efeito é interpretado como uma falha do tecido branquial em excretar amônio (MARTIN et al., 2011).

Modelos de trabalho que representam a eficaz desintoxicação ou excreção de amônio, incluindo a excreção ativa de NH₄⁺ impulsionado pelo (Na⁺,K⁺)- e V(H⁺)-ATPases, e o estresse causado pela concentração amoníaco, vem sendo desenvolvido (WEIHRAUCH et al., 2002, 2004a; PINTO et al., 2016). Em contraste, a expressão de RNAm de (Na⁺,K⁺)- e V(H⁺)-ATPase e outros transportadores envolvidos na excreção de amônio que são regulados negativamente após a exposição a longo prazo à amônio (WEIHRAUCH et al, 2004a; ONKEN et al., 1995; MORRIS, 2001; FALEIROS et al., 2010; FIRMINO et al, 2011; LUCENA et al., 2015; PINTO et al., 2016).

Alguns autores sugeriram que um aumento na concentração de amônio da hemolinfa em crustáceos expostos a níveis elevados de amônia no ambiente, é uma consequência do amônio gasoso que flui para as brânquias, quando se altera o acúmulo de NH₄⁺/NH₃ nesses animais, permitindo a difusão contínua de NH₃ (RACOTTA & HERNÁNDEZ-HERRERA, 2000). Níveis elevados de amônio no ambiente, prejudicam a excreção de amônio ou resulta numa absorção a partir do ambiente (TWITCHEN & EDDY, 1994). A tolerância ao aumento de amônio em larvas desenvolvidas para juvenis diminuiu com o tempo de exposição prolongada em animais aquáticos (ZHAO et al., 1997). O aumento na percentagem de mortalidade com o aumento do tempo de exposição pode ser devido a uma acumulação gradual de amônio no corpo do animal.

Embora não tenha sido realizada análise estatística neste trabalho, o estudo de parâmetros cinéticos tendo como modulador o substrato fisiológico (ATP), mostrou um pequeno aumento na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* aclimatado na maior concentração de amônio, $360 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ($V = 88,89 \pm 4,45 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Visto que o guaiamum é um animal amoniotético, quando exposto a essa elevada concentração, provavelmente ocorreu a ativação de uma resposta fisiológica mecanismo para reduzir o excesso de amônio. As pequenas alterações na afinidade da enzima para o ATP nas três diferentes concentrações (120 mg L^{-1} ; 240 mg L^{-1} ; 360 mg L^{-1}) de amônio (**Tabela 12**), em comparação com o controle sem NH_4Cl ($K_M = 0,1 \pm 0,005 \text{ mmol L}^{-1}$) sugere que, mesmo em concentrações elevadas de cloreto de amônio, várias P-ATPases são responsáveis pela hidrólise de ATP, o que é comprovado com os valores da atividade insensível à ouabaína. Curiosamente, animais recém-capturados mostram um máximo de atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de $169,9 \pm 0,7 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $K_M = 1,0 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (LEONE et al., 2014).

5.9 - Efeito na estabilidade de EP na presença de K^+ e regulação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pela FXYD2, com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ ATP}$ da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi*

A desfosforilação de E2P formado a partir de ATP é acelerada por K^+ , onde a fosforilação a partir de fosfato inorgânico é retardada pela presença deste cátion alcalino (BEAUGÉ, 2001). Diferentemente do ADP, o ATP liga-se a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na conformação E1 com uma afinidade semelhante, mas as propriedades da enzima em atuação nos complexos ATP e ADP são bastante diferentes (FEDOSOVA et al., 2003).

Nosso estudo sugere que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi*, aumenta a taxa de desfosforilação de E-P, até a defosforilação máxima de ZERO nmol mg^{-1} , na presença de $\text{KCl } 20 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figura 55**). No entanto, com a diminuição da formação de E-P, a hidrólise de ATP diminui, com um possível aumento na forma E1-Na^+ , que pode atuar como um passo limitante da velocidade no ciclo de hidrólise da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no caso do *C. guanhumi*. A fosforilação e a desfosforilação são geralmente intimamente acoplado à ligação, o transporte e remoção de ligante dos cátions (GLYNN et al., 1985), a formação de E-P a partir de ATP dependente de ligação e oclusão de Na^+ e K^+ por $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Uma extensa literatura que associa vários caminhos para a regulação e função da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ tem aparecido nos últimos anos, mas os mecanismos subjacentes da

fosforilação permanecem ainda desconhecidos até agora. Embora no tecido do coração a FXYD1 é relatada como estimulante da fosforilação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, ativando o c-AMP e conservando a proteína quinase A do sítio (Ser^{68}) na FXYD1 e nos sítios na proteína quinase C (Ser^{63} , Ser^{68} e Thr^{69}) que são descritos como muito importantes para a regulação cardíaca da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (TERIETE et al., 2009). No entanto, se a fosforilação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é importante para a sua auto-regulação, então merece uma investigação mais aprofundada (POULSEN et al., 2010).

FXYD são representantes de uma família de pequenas proteínas reguladoras (SWEADNER & RAEL, 2000; GARTY & KARLISH, 2006). As proteínas FXYD possuem um único segmento transmembrana, um terminal N extracelular e um terminal C citoplasmático, e são nomeadas após a sequência FXYD conservada no domínio extracelular. A família da FXYD é composta de sete proteínas reguladoras e pequenas, expressas de um modo tecido-específico, que se associam com a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ como subunidades auxiliares que modulam as propriedades cinéticas. A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, geralmente contém uma sub-unidade auxiliar dessa família de proteínas. Tem sido relatado que a FXYD pode atuar como estabilizadores da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$: FXYD1 (phospholemman), FXYD2 (subunidade γ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$), e FXYD4 (CHIF4) foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas, sendo associadas espontaneamente in vitro com proteína recombinante humana, para assim, com as subunidades da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ($\alpha 1\beta 1$) poderem formar complexos $\alpha 1\beta 1\text{FXYD}$. Em comparação com o controle ($\alpha 1\beta 1$), todas as três proteínas FXYD protegeram fortemente a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ contra inativação por aquecimento ou excesso de detergente (C_{12}E_8), resultados trazem a classificação com relação a eficácia, onde $\text{FXYD1} > \text{FXYD2} > \text{FXYD4}$ (MISHRA et al., 2011).

Proteínas FXYD não são especificamente essenciais para função da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, mas são importantes para modular as propriedades cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, adaptar as taxas e afinidades de ativação do transporte dos íons Na^+ e K^+ para os requisitos fisiológicos de células diferentes. Os efeitos das proteínas FXYD são significativos sobre parâmetros tais como $K_{0,5}$, $K_{0,5}\text{Na}^+$, $K_{0,5}\text{K}^+$, $K_{\text{M}}\text{ATP}$ e V_{max} , mas a magnitude é normalmente modesta (GARTY & KARLISH, 2006; GEERING, 2006; BLOSTEIN et al., 2003; SWEADNER et al., 2003). Porém valores dos parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, com e sem adição de FXYD2, pelo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ na fração microsomal do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado (16‰) e do aclimatado à 22‰ S não foram alterados, tendo em vista os valores semelhantes do parâmetro cinético calculado, com e sem adição de FXYD2, para a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (**Tabela 13**).

Em mamíferos, existem sete membros homólogos (FXYP1-7) que são expressos de uma forma específica do tecido. Eles são muitas vezes referidos por seus nomes comuns como segue: FXYP1 (phospholemman (PALMER et al., 1991)); FXYP2 (subunidade γ da (Na^+ , K^+)-ATPase (MERCER et al., 1993)); FXYP3 (Mat-8 = marcador de tumor mamário 8 (MORRIS et al., 1995)); FXYP4 (CHIF4 (ATTALI et al., 1995)); FXYP5 (proteína "relacionadas com canal iônico" (INO et al., 2002)); FXYP6 (phosphohippolin (YAMAGUCHI et al., 2001)); e FXYP7 (sem nome comum (BÉGUIN et al., 2002)). As estruturas da (Na^+ , K^+)-ATPase de rim de porco em 3.5 Å (MORTH et al., 2007) e a da glândula retal de tubarão, com resolução de 2,4 Å (SHINODA et al., 2009), foram determinadas estruturalmente.

Recentemente, a subunidade γ (FXYP2) tem sido relatada como um componente funcional dos crustáceos (SILVA et al., 2012), pois a (Na^+ , K^+)-ATPase de crustáceo é sensível a FXYP2, extraída a partir de fontes de mamífero (porco), aumentando a afinidade do amônio e a velocidade máxima de hidrólise do ATP, sem grandes alterações do ATP ou da afinidade dos íons Na^+ e K^+ (SILVA et al., 2012).

5.10 - Atividade das enzimas de estresse oxidativo na fração microsomal de tecido branquial de *Cardisoma guanhumi* aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio

As análises isoladas dos contaminantes nas águas e sedimentos fornecem poucas informações sobre o grau de exposição dos organismos aquáticos, uma vez que não evidenciam as consequências toxicológicas destas substâncias na biota (FENT, 2003). Deste modo a utilização de diferentes organismos como sentinelas ou bioindicadores é recomendado, possibilitando a detecção precoce dos efeitos tóxicos das substâncias lançadas no ambiente (NIEWEGLOWSKIET et al., 1999; LEBLANC & BAIN, 1997). Os invertebrados são comumente utilizados em estudos de avaliação da contaminação aquática, já que apresentam ampla distribuição geográfica, estão presente ao longo de todo o ano e possuem abundância populacional (FOSSI et al., 1998; REZENDE & LACERDA, 1986).

No caso dos organismos marinhos, têm sido usados como indicador de injúria causada pelas ERO, e como resposta a essas injúrias, as células secretam uma série de enzimas antioxidantes específicas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutational peroxidase (GPx), a glutational redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD), entre outras, que promovem a decomposição do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio (SIES et al., 1979; KEELING & SMITH, 1982; SIES, 1993; TAN et al., 1987;

REED, 1986), além da glutathione S-transferase (GST) que é uma enzima de biotransformação de fase II, mas que tem uma atuação coadjuvante no sistema oxidante.

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH•, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (HALLIWELL, 2000; HERMES-LIMA et al., 2001).

Várias condições ambientais podem alterar a CAT, o que foi comprovado na diferença entre as atividades cinéticas nos guaiamuns aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio, o que também foi visto na glutathione reduzida (GSH), um metabólito importante no combate às ROS, especialmente ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2), é gerada pelo ciclo de Halliwell-Asada, o qual tem, como enzima chave, a glutathione redutase (GR) (LEA et al., 1998).

Os biomarcadores bioquímicos glutathione S-transferase (GST) e metalotioneínas (MT) foram analisadas para duas espécies de camarões-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis* na Lagoa da Conceição (Florianópolis, SC). As atividades GST e MT obtidas neste estudo apresentam valores mais elevados quando comparados as atividades de outros crustáceos e poliquetas (LUCHMANN et al., 2007), surgindo a poluição da Lagoa por matéria orgânica, combustível de embarcações e metais (ORLANDO, 2001; GARCÍA, 1999; BARBOSA, 2003). Para o caranguejo estuarino *Neohelice granulata* condição de anoxia aumenta as atividades das enzimas catalase e glutathione transferase nas brânquias, enquanto, a superóxido dismutase diminui com a falta de oxigênio (DE OLIVEIRA et al., 2005).

O estudo de Gomes et al. (2012), por exemplo, mostra que a SOD é um bom biomarcador, já que após a exposição de *Mytilus galloprovincialis* a nanopartículas de óxido de cobre por 3 e 7 dias, esta enzima apresentou aumento significativo de sua atividade. Esse aumento também foi visto na atividade da SOD nos guaiamuns aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio. O estresse oxidativo também foi estudado no caranguejo *Scylla serrata* exposto à diferentes salinidades. Um aumento da salinidade

causou uma diminuição no consumo de O₂ e liberação de CO₂ e um aumento na excreção de amônia (PAITAL & CHAINY, 2010). As mesmas enzimas das ERO usadas nesse trabalho também foram medidas no tecido muscular e hepatopâncreas do caranguejo *S. serrata*, sendo que os resultados sugerem que a modulação da salinidade do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes é específica do tecido (PAITAL & CHAINY, 2010). Ainda estudando *S. serrata*, os índices de estresse oxidativo nos tecidos de caranguejo (brânquia, hepatopâncreas e músculo abdominal) foram altos no verão, quando a temperatura e salinidade são maiores e o conteúdo de oxigênio menor (KONG et al., 2008).

Para o caranguejo estuarino *Neohelice granulata* condição de anoxia aumenta as atividades das enzimas catalase e glutathione transferase nas brânquias, enquanto, a superóxido dismutase diminui com a falta de oxigênio (DE OLIVEIRA et al., 2005). No mesmo estudo os autores indicam que a atividade das enzimas é superior nas brânquias posteriores em comparação com as brânquias anteriores. Segundo os autores, este mecanismo de proteção aos danos oxidativos seria uma das estratégias adotadas por esta espécie para sobreviver em ambientes com frequentes variações de teor de oxigênio (DE OLIVEIRA et al., 2005).

A atividade de enzimas antioxidantes foi avaliada nos siris eurialinos *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* quando submetidos à exposição ao ar por 3 horas, condições hiposalina (10‰) e hipersalina (40‰). O estudo indica que espécies mais eurialinas (*C. danae*) exibem atividades constitutivas altas para as enzimas antioxidantes, enquanto espécies menos eurialinas (*C. ornatus*) exibiram ativação dessas enzimas quando necessário. O desafio hipersalino oferecido representou uma condição altamente estressante para os caranguejos, muito mais que condições hiposalina. Isto sugere que *C. ornatus*, apenas por ser menos eurialino que *C. danae*, é mais adaptado a baixa salinidade que a água do mar hiperconcentrada (FREIRE et al., 2011).

O estresse oxidativo e/ou a ativação de enzimas antioxidantes têm sido previamente relacionados a alterações de salinidade em algumas espécies animais, por períodos variáveis de exposição. Essas alterações na salinidade afetaram os sistemas antioxidantes de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* pois as atividades musculares de GPx e SOD diminuíram com aumento (30 a 50 ‰) ou redução (até 5 ‰) na salinidade (LIU et al., 2007). Para a espécie marinha *Paralichthys olivaceus*, a redução da salinidade durante 2 dias, de 35 a 4 ‰, provocou um aumento na expressão de GPx e GST hepáticos; (CHOI et al., 2008). Outros estudos indicaram que o estresse em condições hiposalinas (10 ‰) induziu aumentos na atividade e na expressão de enzimas antioxidantes hepáticas (e aumento da produção de H₂O₂ e peroxidação lipídica) no peixe blackporgy (AN et al., 2010).

Em um estudo com conchas de arca, An e Choi (2010) observaram que a exposição a águas hipersalina (45‰ S) ou hiposalina (25‰ S) causou estresse oxidativo, sendo mais intensa sob hiposalinidade. Além disso, o estresse hiposalino (10‰ S) induziu um aumento de 3 vezes na expressão de peroxirredoxina 2-Cys nas brânquias dos caranguejos de lama *Eurypanopeus depressus* (VAN HORN et al., 2010). Um aumento de expressão foi observado para glutathiona-S-transferase, Ferritina, trans-1,2-dihidrobenceno-1,2diol desidrogenase (DHDH), pró-colágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenase (PLOD2) e metaloprotease (MTP), enquanto a expressão da glutathiona peroxidase (GPX) foi diminuída (HUI et al., 2014).

Como temos observado, a salinidade também influencia a atividade das enzimas do estresse oxidativo (GST, GR e GPx). Nos guaiamuns aclimatados em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio, bem como os níveis de peroxidação lipídica para *Carcinus maenas* capturado de um estuário poluído e não poluído. Indicando que a alteração da salinidade sobrepõe ao estresse da poluição (RODRIGUES et al., 2012). A salinidade também influencia a atividade GST de *Eurytemora affinis* (CAILLEAUD et al., 2007).

As respostas de stress de *M. amazonicum* a TAN elevado incluem aumentos nas atividades (Na^+ , K^+)- e V (H^+)- ATPase e na expressão dessas enzimas nas brânquias, que são acompanhadas por mudanças nas atividades das enzimas de estresse oxidativo e efeitos no sistema imunológico. Os autores sugerem que esses achados provavelmente sustentam efeitos fisiológicos em um crustáceo como *M. amazonicum* que explora múltiplos ecossistemas durante seu ciclo de vida, bem como em condições de cultura que podem afetar significativamente a produção de camarão pela indústria de aquicultura (PINTO et al., 2016).

Em geral, a atividade das enzimas antioxidantes é aumentada em resposta ao estresse, contudo nem sempre a resposta adaptativa do sistema é suficiente para compensar e evitar danos oxidativos ao organismo. O sistema antioxidante animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo, mas a capacidade modulatória não é padronizada, sendo tecido e espécie-específica (CRAWFORD et al., 2000).

Os resultados apresentados corroboram que a SOD, a CAT e a GPx formam juntas, o sistema antioxidante, de defesa dos organismos, combatendo os oxirradicais (VAN DER OOST et al., 2003). Nossas análises mostraram também que as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) estão atuando nestes diferentes grupos de amostras para combater os oxirradicais, visando evitar os danos às biomoléculas. Onde, para funcionar com alta eficiência, necessitam das outras enzimas que também foram analisadas neste trabalho: a glutathiona redutase (GR), a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD), além da glutathiona S-transferase (GST).

A SOD, a CAT e a GPx formam juntas, o sistema antioxidante, de defesa dos organismos, combatendo os oxirradicais (VAN DER OOST et al., 2003). As análises apresentadas para o guaiamum aclimatado em diferentes salinidades e concentrações de cloreto de amônio (**Tabela 14**), mostraram também que a SOD, a CAT e a GPx, estão atuando nestes diferentes grupos de amostras para combater os oxirradicais, visando evitar os danos às biomoléculas. Onde, para funcionar com alta eficiência, necessitam das outras enzimas que também foram analisadas neste trabalho: a glutathione redutase (GR), a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), além da glutathione S-transferase (GST).

No entanto, uma caracterização completa das flutuações sazonais nos parâmetros de estresse oxidativo em ambientes estuarinos é fundamental antes de qualquer padrão biomarcador ser relacionado com a poluição (NIYOGI et al., 2001), pois os biomarcadores mostram a existência de alterações no organismo e podem proporcionar significado aos dados químicos quando analisados em conjunto (PEREIRA et al., 2007).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A utilização do substrato fisiológico (ATP) para os ensaios cinéticos com a enzima (Na^+, K^+)-ATPase presente em frações microsomais do crustáceo *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) permitiu a determinação de parâmetros cinéticos para diferentes moduladores: magnésio, sódio, potássio e, amônio;
- Não foram observadas variações na atividade (Na^+, K^+)-ATPase do tecido branquial de *C. guanhumi* recém-capturado na presença de alameticina, o que sugere fortemente a ausência de vesículas na preparação;
- Os valores do K_i para o ATP determinados para a enzima branquial de *C. guanhumi* recém-capturado e aclimatado a 22‰ S, com ouabaína foram diferentes;
- Identificamos outras enzimas P-ATPases na fração microsomal do tecido branquial do guaiamum, através do efeito de diferentes inibidores sobre a atividade ATPase em presença de ouabaína;
- Não foram observados efeitos significativos utilizando aminas biogênicas, o que prova que a inibição foi causada pela concentração de íons (Força Iônica). Nossas análises mostraram também que as enzimas do estresse oxidativo estão atuando nestas diferentes preparações para combater os oxirradicais;
- A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença de várias bandas protéicas, sugerindo a presença de várias proteínas com diferentes massas moleculares, como esperado para uma fração microsomal de tecido branquial, e a análise por Western blotting com anticorpo monoclonal para a subunidade α da (Na^+, K^+)-ATPase revelou a presença de uma banda com massa molecular em torno de 110 kDa;
- A imunolocalização da subunidade α da enzima (Na^+, K^+)-ATPase branquial do *C. guanhumi* mostrou que a mesma, encontra-se predominantemente distribuída por todo o citoplasma das células pilares branquiais, incluindo a região apical abaixo da cutícula;

- A (Na⁺,K⁺)-ATPase presente nas duas preparações, não apresentou uma estimulação sinérgica por K⁺ e NH₄⁺, sugerindo que esses íons podem ocupar o mesmo sítio na (Na⁺,K⁺)-ATPase;
- Identificamos o gene constitutivo da sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da proteína ribossomal L10 (PRL10) das brânquias de *Cardisoma guanhumi*;
- O presente estudo poderá contribuir para o entendimento dos papéis exercidos por essa enzima nos processos de osmorregulação e excreção de amônia nos crustáceos;
- Considerando a resistência a elevadas concentrações de NH₄⁺, nossa pesquisa propõe o uso do *C. guanhumi* como um modelo conveniente para sistematicamente estudar as respostas cinéticas, moleculares e celulares para a exposição in vivo dos crustáceos a concentrações elevadas de NH₄⁺.

Referências Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almansa E., Sanchez J.J., Cozzi S., Rodriguez C., Diaz M.(2003). Temperature-activity relationship for the intestinal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? J. Comp. Physiol. 173B: 231-237.
- Almeida E.A., Bainy A.C.D., Dafre A.L., Gomes O.F., Medeiros M.H.G., Di Mascio P. (2005). Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J. Exp. Marine Biol. Ecol. 318: 21-30.
- Amaral A.C.Z., Migotto A.E., Turra A., Y. Schaeffer-Novelli. (2010). Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. Biota Neotropica 10: 219-264.
- An, A M.I., Choi, C.Y., (2010). Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. Comp. Biochem. Physiol. B 155, 34–42.
- An K.W., Kima N.N., Shin H.S., Kil G.S., Choi C.Y., (2010). Profiles of antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in *black porgy* (*Acanthopagrus schlegelii*). Comp. Biochem. Physiol. A 156, 262–268.
- Apell H.J. (2004) Bioelectrochem 63: 149-156.
- Apell H.J., Schneeberger A., Sokolov V.S. (1998). Acta Physiol. Scand. 163: 235-245.
- Askar A, Treptow H (1986). Biogene amine in Lebensmitteln. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. Eugen Ulmer GmbH and Co, Stuttgart.
- Attali B., Latter H., Rachamim N., Garty H. (1995). A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K^+ channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 92: 6092–6096.
- Augusto A., Greene L. J., Laure H. J. , McNamara J. C. (2007). The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* e *M. olfersi* (Crustacea, Decapoda). J. Crust. Biol. 27, 626–634.
- Axelsen K.B., Palmgren M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J Mol Evol 46 84-101.
- Bagni N., Ruiz-Carrasco K., Franceschetti M., Fornale S., Fornasiero R. B., Tassoni A. (2006). Polyamine metabolism e biosynthetic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. Plant. Physiol. Biochem. 44, 776-786.
- Baldwin W.S., Leblanc G.A. (1996). Expression and induction of an immunochemically related class of glutathione S-transferases in *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol., v. 113B, n. 2, p. 261-267.

- Bar Shimon M., Goldshleger R., Karlish S.J.D. (1998). Bar Shimon M., Goldshleger R., Karlish S.J.D. (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 34190-34195.
- Barbosa T.C.P. (2003). *Ecolagoa: um breve documento sobre a ecologia da Bacia Hidrográfica da Lagoa da Conceição*. Gráfica Agnus, Florianópolis.
- Barnes R. S. K., Calow P., Oliver W.J.P., Golding D.W. (2008). *Os invertebrados. Uma síntese*. Atheneu, São Paulo. 495 pp.
- Barnes D.B. (2000). *Zoologia dos invertebrados*. 4ª ed. Editora Roca. p.1177.
- Barra J.A., Péqueux A.J.R. (1986). Abstracts of the 8th Conference ESCPB. ESCPB Publ. Strasbourg. France. pp.21.
- 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.
- Barwick M., Maher W. (2003). Biotransference and biomagnification of selenium, copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from lake Macquire Estuary, NSW, Australia. *Mar. Environ. Res.*, 56: 471-502.
- Bastos R. B., Feitosa F. A. do N., Muniz K. (2005). Variabilidade espaço-temporal da biomassa fitoplanctônica e hidrologia no estuário do rio Una (Pernambuco – Brasil). *Tropical Oceanography, Recife*, v.33, n.1.p.1-18.
- Bazzanti M. et al. (1997). Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems: a case study. *Environ. Int.*, v. 23, n. 6, p. 799-813.
- Beattie K.A. et al. (2003). Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemiasalina*. *Aquat. Toxicol.*, v. 62, p. 219-226.
- Beaugé L. (2001). Breakdown of Na⁺/K⁺-exchanging ATPase phosphoenzymes formed from ATP and from inorganic phosphate during Na⁺-ATPase activity. *Eur. J. Biochem.* 268: 5627-5632.
- Béguin P., Crambert G., Monnet-Tschudi F., Uldry M., Horisberger J. D., Garty H., Geering K. (2002). FXYD7 is a brain-specific regulator of Na,K-ATPase alpha-1-beta isozymes. *EMBO J.* 21: 3264–3273.
- Belli N.M., Faleiros R.O., Firmino K.C.S., Masui D.C., Leone F.A., McNamara J.C., Furriel, R.P.M. (2009). Na,K-ATPase activity e epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 152A, 431-439.
- Belogus T., Haviv H., Karlish S.J.D. (2009). Neutralization of the Charge on Asp(369) of Na⁺,K⁺-ATPase Triggers E-1 <-> E-2 Conformational Changes. *J Biol Chem* 248:31038-31051.

- Berberian G., Beaugé L. (1992). Phosphatase-activity e potassium-transport in liposomes with (Na⁺,K⁺)-ATPase incorporated. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 85-93.
- Bhavan P.S., Geraldine P. (2001). Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcomsonii* on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 27-41.
- Blanco G., Mercer R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 44: F633-F650.
- Bleutler E. (1984). Red cell metabolism. In: A manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, New York. pp 105-106.
- Blostein R., Pu H. X., Scanzano R., Zouzoulas A. (2003). Structure/function studies of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: p. 420.
- Bonnafous J.C., Dorne J., Mani, J.C. (1982). Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate-cyclase determination-application to the study of hormone responsiveness in lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 720(3), 235-241.
- Böttcher K., Siebers S. (1993). Biochemistry, localization, and physiology of carbonic anhydrase in the gills of euryhaline crabs. *J. Exp. Zool.* 265: 398-409.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999). Polyamines e environmental challenges: recent development. *Plant. Sci.* 140, 103-125.
- Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Lorin-Nebel C., Elguero C., Grousset E. (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell Tissue Res* 353:87-98.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7;72:248-54.
- Branco J.O. (1990). Aspectos ecológicos dos Brachyura (Crustacea: Decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC – Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 7: 165-179.
- Breton G., Faasse M., Noël P., Vincent T. (2002). A new alien crab in Europe: *Hemigrapsus sanguineus* (Decapoda: Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology* 22: 184-189.
- Bublitz M., Poulsen H., Morth J.P., Nissen P. (2010). In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Curr Opin Struct Biol* 20:431-439.
- Burnett L.E., Dunn T.N., Infantino J.R.L. (1985). The function of carbonic anhydrase in crustacean gills. In: Gilles R, Gilles-Baillien M (ed) *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation*, Springer-Verlag, Berlin, p 159–168.

- Cains Jr., J. & Pratt, J. R. (1993). A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* (D. M. Rosenberg & V. H. Resh, ed.), pp. 10-27, New York: Chapman & Hall.
- Cailleaud K., Maillet G., Budzinski H., Souissi S., Forget-Leray L. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 841–849.
- Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ.* Mar 20;247(2-3):295-311.
- Camargo J.A., Alonso A. (2006). Toxicity of nitrite to three species of freshwater invertebrates. *Environ. Int.* 32: 831–849.
- Cameron J.N., Batterton C.V. (1978). *J. Comp. Physiol. B* 123: 143-148.
- Freire C.A., Onken H., McNamara J.C. (2008). *Comp. Biochem. Physiol.* 151A 272–304.
- Capendeguy O., Horisberger J.D. (2005). The role of intracellular sodium (Na⁺) in the regulation of calcium (Ca²⁺)-mediated signaling and toxicity *J. Physiol* 565: 207-218.
- Carbonell G., Ramos C., Tarazona J.V. (1998). Heavy metals in shrimp culture areas from the Gulf of Fonseca, Central America II. Cultured shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 260-265.
- Carlberg I., Mannervik B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, 113, 484-490.
- Carvalho F.B., Mello C.F., Marisco P.C., Tonello R., Girardi B.A., Ferreira J., Oliveira M.S., Rubin M.A. (2012). Spermidine decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur. J Pharmacol* 684:79–86.
- Charlton J. A., Baylis P.H. (1990). Stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity by polyamines in the rat renal medullary cells of the thick ascending limb of henles loop. *J. Endocrinol.* 127, 377-382.
- Charmantier G., Soyeux C. (1994). Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biol. & Ecol.* 178: 233-246.
- Charmantier, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: A review. *Invert.Reprod. Develop* , 33:177-190.
- Chester R. (1990). *Marine Geochemistry*. London: Unwin Hyman Ltd. 698p.
- Choi C.Y., An K.W., An M.I. (2008). Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 330–337.

- Chourasia M., Sastry G.N. (2012). The nucleotide, inhibitor, and cation binding sites of P-type II ATPases. *Chem. Biol. Drug Design* 79: 617-627.
- Cieluch U., Anger K., Aujoulat F., Buchholz F., Charmantier-Daures M., Charmantier G. (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab, *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Biol.* 207: 325-336.
- Cieluch U., Charmantier G., Grousset E., Charmantier-Daures M., Anger K. (2005). Osmoregulation, immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiol Biochem Zool* 78:1017–1025
- Cioffi M. (1984) *Amer. Zool.* 24: 139-156.
- Cirri E., Katz A., Mishra N.K., Belogus T., Lifshitz Y., Garty H., Karlisch S.J.D., Apell H.J. (2011). Phospholemman (FXVD1) Raises the affinity of the human r1β1 isoform of Na,K-ATPase for Na ions. *Biochem* 50:3736–3748.
- Clarke R.J., Fan X. (2011). Pumping ions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38: 726-733.
- Clarkson P.M., Thompson H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am J Clin Nutr.* 72(2):637-46.
- Clarkson, T.W., 1997. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34, 369–403.
- Claybrook D.L. (1983). Nitrogen metabolism. Pp. 163–213 in *The Biology of Crustacea, Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*, L.H. Mantel, ed., Volume 5. New York: Academic Press.
- Coelho P.A., Batista-Leite L.M.A., Santos M.A.C., Torres M.F.A. (2004). O manguezal. In: Eskinazi-Leça E., Neumann-Leitão S., Costa M.F. (Eds.) *Oceanografia: um cenário tropical*. pp. 641-688.
- Cohen E., Goldshleger R., Shainskaya A., Tal D.M., Ebel C., le Maire M., Karlisch S.J.D. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 16610-16618.
- Colina C., Palavicini J.P., Srikumar D., Holmgren M., Rosenthal J.J.C. (2010). Regulation of Na⁺/K⁺ ATPase transport velocity by RNA. *PLoS Biology* 8:1-9
- Compère P., Wanson S., Péqueux A., Gilles R., Goffinet G. (1989). Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity *Tissue Cell*, 21, pp. 299–318
- Copeland D.E. (1968). *Amer. Zool.* 8: 417-432.
- Copeland D.E., Fitzjarrell A.T. (1968). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 92: 1-22.
- Cornelius F., Kanai R., Toyoshima C. (2013). Moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 288:6602-6616.

- Cortes V. F., Veiga-Lopes F.E., Barrabin H., Alves-Ferreira M., Fontes C.F.L. (2006). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1901-1913.
- Crambert G., Hasler U., Beggah A.T., Yu C.L., Modyanov N.N., Horisberger J.D., Lelievre L., Geering K. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 1976-1986.
- Crambert G., Li C.M., Swee L.K., Geering K. (2004). FXYP7: mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 30888-30895
- Crawford DR; Suzuki T; Davies KJA (2000). Redox regulation of gene expression, In: Antioxidant and redox regulation of gene (Sen CK; Sies H; Beauerle PA Eds). Academic Press, SanDiego 21-45.
- Culshaw C., Newton L. C., Weir I., Bird D. J. (2002). Concentrations of Cd, Zn and Cu in sediments and brown shrimp (*Crangon crangon* L.) from the Severn Estuary and Bristol Channel, UK. *Marine Environmental Research*, v. 54, p. 331-334.
- Dafnis E., Sabatini S. (1994). Biochemistry and pathophysiology of vanadium. *Nephron* 67: 133-143.
- Daly S.E., Blostein R., Lane L.K. (1997). Functional consequences of a posttransfection mutation in the H2-H3 cytoplasmic loop of the alpha subunit of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 272: 6341-6347.
- De Oliveira U.O., Araújo A.S.R., Belló-Klein A., da Silva R.S.M., Kucharski L.C. (2005). Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab (*Chasmagnathus granulata*). *Comp. Biochem. Physiol.* 140B, 51 - 57.
- Devaraj S., Tnag R., Adams-Huet B., Harris A., Seenivasan T., Lemos J.A. (2007). Effect of high-dose α -tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr.* 86(5):1392-8.
- Dean A. (1941). *Fundamentals of play directing*. New York: Farrar & Rinehart.
- Deane E.E., Woo N.Y.S. (2005). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 1229-1238.
- Dempski R.E., Friedrich T., Bamberg E. (2005). The beta subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *J. Gen. Physiol.* 125: 505-520.
- Dempski R.E., Lustig J., Friedrich T., Bamberg E. (2008). Structural arrangement and conformational dynamics of the gamma subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem.* 47 257-266.
- Donnet C., Arystarkhova E., Sweadner K.J. (2001). *J. Biol. Chem.* 276: 7357-7365.

- Drapeau P., Blostein R. (1980). Interactions of K⁺ with (NaK)-ATPase. Orientation of K⁺ phosphatase sites studied with inside-out red cell membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 7827-34.
- Drasch G., Bose-O'Reilly S., Beinhoff C., Roider G., Maydl S. (2001). The Mt. Diwata study on the Philippines 1999 - assessing mercury intoxication of the popul on by small scale gold mining. *Sci. Total Environ.* 267, 151–168.
- Durr K.L., Tavraz N.N., Dempski R.E., Bamberg E, Friedrich T. (2009). Functional significance of E₂ state stabilization by specific α/β -Subunit interactions of Na,K- and H,K-ATPase. *J Biol Chem* 284:3842–3854.
- 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., Hubert A.J. (2003). *Ann. N.Y. Acad Sc.* 986: 525-526.
- Emanuelli T., Rocha J.B.T., Pereira M.E., Porciuncula L.O., Morsch V.M., Martins A.F., Souza D.O.G. (1996). Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on deltaaminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 136–143.
- Emery A.M., Billingsley P.F., Ready P.D., Djamgoz M.B.A. (1998). *J. Insect. Physiol.* 44: 197-209.
- Engel D.W. (1977). Comparison of the osmoregulatory capabilities of two portunid crabs, *Callinectes sapidus* and *C. similis*. *Mar Biol* 41:275–279.
- Esmann M. (1988). *Methods Enzymol.* 156. 105–115.
- Ewart H.S., Klip A. (1995). Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 269: C295-311.
- Fagan M.J., Milton H. Saier Jr. (1994). P-type ATPases of Eukaryotes and Bacteria: Sequence Analyses and Construction of Phylogenetic Trees. Department of Biology, 0116, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0116, USA.
- Faleiros R.O. (2007). FFCLRP/USP. Dissertação. p.136.
- Faleiros R.O., Goldman M.H., Furriel R.P., McNamara J.C. (2010). Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺- and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Biol.* 213, 3894–3905.
- Faleiros R.O. (2011). Osmorregulação em camarões Palaemonidae (Decapoda, Caridea): uma abordagem molecular e bioquímica. Tese (Doutorado em Biologia comparada). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

- Farias D.L., Lucena M.N., Garçon D.P., Mantelatto F.L., McNamara J.C., Leone F.A. (2017). A kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the semi-terrestrial mangrove crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825 (Decapoda, Brachyura). *Journal Membrane Biology*, 16 (109).
- Fedosova N. U., Esmann, M. (2007). Nucleotide binding to Na,K-ATPase: pK values of the groups affecting the high affinity site. *Biochemistry* 46, 9116-9122.
- Fedosova N.U., Champeil P., Esmann M. (2003). Rapid filtration analysis of nucleotide binding to Na,K-ATPase. *Biochemistry* 42: 3536–3543.
- Felsenfeld D.P., Sweadner K.J. (1988). Monoclonal antibodies and the identification of functional regions of the Na⁺,K⁺-ATPase. *J.Biol. Chem.* 263: 10932-10942.
- Fenner A.C.Jr., Horton H.H.Jr. (1969). National Museum Bulletin, 292, Washington D.C. USA.
- Fent K.. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.*, 140, 353.
- Férraille E., Carranza M.L., Gonin S., Béguin P., Pedemonte C., Rousselot M., Caverzasio J., Geering K., Martin P.Y., Favre H. (1999). *Mol. Biol. Cell.* 10: 2847-2859.
- Férraille E., Doucet A. (2001). *Physiol. Rev.* 81: 345-418.
- Férraille E., Mordasini D., Gonin S., Deschenes G., Vinciguerra M., Doucet A., Vandewalle A., Summa V., Verrey F., Martin P.Y. (2003). *Ann. NY Acad. Sci.* 986: 570-578.
- Ferguson E. A., Leach D. A., Hogstrand C. (1996). “Metallothionein protects against silver blockage of the Na⁺, K⁺-ATPase,” in *Proceedings of the fourth International Conference, Transport, Fate and Effects of Silver in the Environment*, (Madison, WI: University of Wisconsin- Madison), 191–200.
- Ferreira M.V.R.; Alencastro A.C.R., Hermes-Lima M. (2003). Role of antioxidante defenses during estivation and anoxia exposure in freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* 81: 1239-1248.
- Ficker E., Taglialatela M., Wible B.A., Henley C.M., Brown A.M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 266:1068–1072.
- Firmino K.C.S. (2009). Processos osmorregulatórios no caranguejo *Dilocarginus pagei* (Decapoda Trichodactylidae) um antigo invasor da água doce: estudo das atividades NaK-ATPase e V-ATPase branquiais. FFCLRP/USP. Tese. 116 pp.
- Fito M., de la Torre R., Farre-Albaladejo M., Khymenetz O., Marrugat J., Covas M.I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Inst Super Sanita.* 43(4):375-81.

- Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R. (1997). Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of (*Mytilus edulis*) (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*. 2, 51 - 56.
- Fontes C.F.L., Barrabin H., Scofano H.M., Norby J.G. (1992). The role of Mg²⁺ and K⁺ in the phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 215–225.
- Florkin M., Schoffeniels E. (1969). *Molecular Approaches to Ecology*. Academic Press, New York.
- Forbush III B., Kaplan J.H., Hoffman J.F. (1978). Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na K-ATPase. *Biochemistry* 17: 3667-76.
- Forbush III B. (1987). Rapid release of 42K and 86Rb from an occluded state of the Na, K-pump in the presence of ATP or ADP. *J. Biol. Chem.* 262, 11104–11115.
- Fossi M.C., Savelli C., Casini S. (1998). Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*: field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121: 321-331.
- França J.L., Pinto M.R., Lucena M.N., Garçon D.P., Valenti W.C., McNamara J.C. (2013). Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Memb Biol* 246:529-543.
- Francesconi K.A., Pedersen K.L., Hojrup P. (1998). Sex-specific accumulation of Cad-metallothionein in the abdominal muscle of the coral prawn *Metapenaeopsis scississima* from a natural population. *Mar. Environ. Res.* 46: 541-544.
- Fransozo A., Negreiros-Fransozo M.L. (1996). *Biodiversity in Brazil: a first approach*. CNPq São Paulo. p. 326.
- Freire C.A., McNamara J.C. (1995). *J. Crust. Biol.* 15: 103–116.
- Freire C.A., Welker A., Storey K.B., Hermes-Lima M. (2011). Oxidative stress in estuarine and intertidal species. In: *Oxidative stress in aquatic systems*. In: Abele D., Zenteno-Savin T., Vasquez-medina J.P. (Eds). Willey Blackwell. NY. Pp 41-57.
- Freire C. A., Onken H., McNamara J. C. (2008). A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills e excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 272–304.
- Furriel R.P.M., Masui D.C., McNamara J.C., Leone F.A. (2004). *J. Exp. Zool.* 301: 63-74.
- Furriel R.P.M., McNamara J.C., Leone F.A. (2000). *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 303-315.
- Furriel R.P.M., McNamara J.C., Leone F.A. (2001). *Comp. Biochem. Physiol.* 130A: 665-676.

- Furriel R.P.M., Firmino K.C.S., Masui D.C., Faleiros R.O., Torres A.H., McNamara J.C. (2010). Structural and Biochemical Correlates of Na⁺,K⁺-ATPase Driven Ion Uptake Across the Posterior Gill Epithelium of the True Freshwater Crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J. Exp. Zool.* 509 – 523.
- Furriel R.P.M., Masui D.C., McNamara J.C., Leone F.A. (2004). Modulation of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J. Exp. Zool.* 301, 63- 74.
- Furriel R.P.M., FIRMINO K.C.S., MASUI D.C., FALEIROS R.O., TORRES A.H., McNaMARA J.C. (2010). Structural e biochemical correlates of (Na⁺,K⁺)-ATPase driven ion uptake across the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae. *J. Exp. Zool.*, 313A, 508-523.
- Fuzesi M., Gottschalk K.E., Lindzen M., Shainskaya A., Küster B., Garty H., Karlish S.J.D. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 18291-18301.
- 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., Lazdunski M. (1976). (Na⁺,K⁺)- Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes, cooperativity e control. *Eur. J. Biochem.* 65, 293-306.
- 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 e Kinetics. Academic Press, NY 301-314.
- Galindo - Reyes J.G., Fossato V.U., Villagrana-Lizarraga C., Dolci F. (1999). Pesticides in water, sediments, and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 38, n. 9, p. 837-841.
- García A.A. (1999). Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição e do Canal da Barra através de indicadores físico-químicos dos sedimentos de fundo e dos indicadores sócioambientais. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Garçon D. P., Masui D. C., Mantelatto F. L. M., Furriel R. P. M., Mcnamara J. C., Leone F. A. (2009). *Comp. Biochem. Physiol.* 154A: 44-55.
- Garçon D.P., Lucena M.N., França J.L., McNamara J.C., Fontes C.F.L., Leone F.A. (2011). Na⁺,K⁺-ATPase activity in the posterior gills of the blue crab, *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura): modulation of ATP hydrolysis by the biogenic amines spermidine and spermine. *J Membr Biol* 244:9–20.
- Garçon D.P., Lucena M.N., Pinto M.R., Fontes C.F.L., McNamara J.C., Leone F.A. (2012). Synergistic stimulation by potassium and ammonium of K⁺-phosphatase activity in

- gill microsomes from the crab *Callinectes Ornatus* acclimated to low salinity: novel property of a primordial pump. Arch. Biochem Biophys. v. 410, p. 75-93.
- Garçon D. P., Lucena M.A., Pinto M. R., Fontes Carlos F. L. ; McNamara, John C. ; Leone F. A. (2013). Synergistic stimulation by potassium and ammonium of K⁺-phosphatase activity in the gill micorsomes grom the carb *Callinectes ornatus* acclimated to low salinity: novel property of a primordial pump. Archives of Biochemistry and Biophysics (Print), v. 530, p. 55-63.
- Garçon D. P. (2007). Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microssomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae). Dissertação de mestrado. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Garçon D. P., Masui D. C., Mantelatto F. L. M., McNamara J. C., Furriel R. P. M., Leone F. A. (2007). K⁺ e NH₄⁺ modulate gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. Comp. Biochem. Physiol. 147A, 145-155.
- Gardos G. (1954). Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. Acta physiol. Hung. 6, 191-199.
- Garty H., Karlish S.J.D. (2005). Seminars in Nephrology 198.
- Garty H., Karlish S. J. D. (2006). Role of FXYD proteins in ion transport. An. Rev. Physiol. 68, 431-459.
- Gatto C., Lutsenko S., Kaplan J.H. (1997). Chemical modification with dihydro-4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate reveals the distance between K480 and K501 in the ATP-binding domain of the Na,K-ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 340: 90-100.
- Gatto C., McCloud 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., Thornewell S.J., Holden J.P., Kaplan J.H. (1999). J. Biol. Chem. 274: 24995-25003.
- Gatto C., Arnett K. L., Milanick M. A. (2007). Divalent Cation Interactions with Na,K-ATPase Cytoplasmic Cation Sites: Implications for the para-Nitrophenyl Phosphatase Reaction Mechanism. J. Membrane Biol. 216, 49-59.
- Geering K. (2008). Functional roles of Na,K-ATPase subunits. Curr Opin Nephrol Hypertens 17:526–532.
- Geering K., Beguin P., Garty H., Karlish S., Fuzesi M., Horisberger J.D., Crambert G. (2003). Ann. NY Acad. Sci. 986.
- Geering K. (2006). FXYD proteins: new regulators of Na–K-ATPase. Am. J. Physiol. 90, F241–F250.

- Genovese G., Luchetti C.G., Luquet C. M. (2004). Na^+/K^+ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper- hypo-regulating crab *Neohelice granulatus* acclimated to dilute, normal e concentrated seawater. Mar. Biol. 144, 111-118.
- Gilles R., Péqueux A. (1985). Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches. In: Gilles R. and Gilles-Baillien M. (Eds.) Transport processes iono- and osmoregulation pp.136-158 Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, Germany.
- Glock G.E., McLean P. (1953). Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. J. 55: 400-408.
- Glynn I.M. (1985). The $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -transporting adenosine triphosphatase. In: AN Martonosi (Ed) The enzymes of biological membranes. Vol 3, pp 35-114. Plenum Press, New York.
- Glynn I.M. (2002). A hundred years of sodium pumping. Rev Physiol 64:1-18.
- Goldshleger R., Karlish S.J.D. (1999). J. Biol. Chem. 274: 16213-16221.
- Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Pinheiro J.P., Cancio I., Bebiani M.J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, v. 118-119, p. 72-79.
- Gonçalves R.R., Masui D.C., McNamara J.C., Mantelatto F.L.M., Garçon D.P., Furriel R.P.M., Leone F.A. (2006). Comp. Biochem. Physiol. 145A: 346-356.
- Gong X.M., Ding Y., Yao Y., Marassi F.M. (2015). Structure of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD2b in micelles: implications for membrane-water interfacial arginines. Biochim Biophys Acta 1848:299-306.
- Goodman S.H., Cavey M.J. (1990). Cell Tissue Res. 260: 495-505.
- Gordon J.A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. Method Enzymol 201: 477-82.
- Gorni R., Weber R.R. (2004). Organochlorine pesticides residues and PCBs in benthic organisms of the inner shelf of the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. Braz. J. Ocean., v. 52, p. 141-152.
- Gostimskaya I.S., Grivennikova V.G., Zharova T.V., Bakeeva L.E., Vinogradov A.V. (2003). In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. An. Biochem. 313(1), 46-52.
- Gowland B.T.G., Moffat C.F., Stagg R.M., Houlihan D.F., Davies I.M. (2002). Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. Mar. Environ. Res. 54, 169-177.

- Gramigni E., Tadini-Buoninsegni F., Bartolommei G., Santini G., Chelazzi G., Moncelli M. R. (2009). Inhibitory effect of Pb^{2+} on the transport cycle of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1699–1704.
- Gross M.G. (1972). *Oceanography: A View of the Earth*. Prentice Hall, Englewood Cliffs: 388-394.
- Grubmeyer C., Penefsky H.S. (1981). The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 256: 3718-3727.
- Gstraunthaler G., Pfaller W., Kotanko P. (1983). Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2969–2972.
- Hakansson K. O. (2003). The crystallographic structure of Na,K-ATPase N-domain at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 332, 1175-1182.
- Halliwell B. (2000). The antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-1180.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in humans disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186(1):1-85.
- Halliwell B. (1993). Oxidative DNA damage: meaning and measurement. *DNA and Free radicals*. Halliwell B and Auroma O.I. (Ed). Ellis Horwood NY.
- Handy R.D., Poxton M.G. (1993). Nitrogen pollution in mariculture : toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 26 : 887-896.
- Haviv H., Cohen E., Lifshitz Y., Tal D. M., Goldshleger R., Karlisch S. J. (2007). *Biochemistry* 46: 12855–12867.
- Hebert H., Purhonen P., Thomsen K., Vorum H., Maunsbach A.B. (2003). Renal Na,K-ATPase structure from cryo-electron microscopy of two dimensional crystals. *Ann NY Acad Sci* 986:9-16.
- 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.
- Heinrich-Hirsch B., Ahlers J., Peter H.W. (1977). Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase from chick brain by polyamines. *Enzyme* 22:235-241.
- Henning H.G. (1975). *Forma et Function* 8: 253-304.
- Henry R.P., Lucu C., Onken H., Weihrauch D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology, Aquatic Physiology.* (3), 431 - 2.
- Henry R.P., Wheatly M.G. (2001). *Amer. Zool.* 32: 407-416.

- Henry R.P., Wheatly M.G. (1992). Interaction of respiration ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am Zool* 32:407-416.
- Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. (2002). *Comp. Biochem. Physiol.* 133C:537-556.
- Hermes-Lima M., Golçalves M.S., Rg A.J. (2001). Pyridoxalisonicotinoylhydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation. *Mol. Cel. Biochem.* 228: 73-82.
- Herreid C.F. (1963). *Crustaceana* 5: 176-180.
- Hilge M., Siegal G., Vuister G.W., Guntert P., Gloor S.M., Abrahams J.P. (2003). ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat. Struct. Biol.* 10, 468-474.
- Holliday C.W., Roice D., Roer R. (1990). Salinity-induced changes in branchial Na⁺,K⁺-ATPase activity and transepithelial potential difference in *Artemia*. *J. Exp. Biol.* 151, 279–296.
- 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.
- Hong – Yu L., Lu - Qing P., Debin Z. (2008). Effects of Salinity on Biogenic Amines, Hemolymph Osmotic Pressure, and Activity of Gill's Na⁺/K⁺-ATPase in *Charybdis japonica* (Crustacea, Decapoda). *Journals of the World Aquaculture Society.* 39(6).
- 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. (2004). *Physiol.* 19: 377-388.
- Hu Y.K., Kaplan J.H. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 19185-19191.
- Huang J., Zheng Z., Cheng C. (1984). The relation of copepods to salinity in the stuary of Jiunlong River. – *J. Xiamen Univ. Nat. Sci.* 23 (4): 497 – 505, figs.
- Hui M., Liu Y., Song C., Li Y., Shi G., Cui Z. (2014). Transcriptome Changes in *Eriocheir sinensis* Megalopae after Desalination Provide Insights into Osmoregulation and Stress Adaption in Larvae. *PLoS ONE* 9(12): e114187.
- Humes H.D., Weinberg J.M. (1983). Cellular energetics in acute renal failure. In: Brenner, B.M., Lazarus, J.M. (Eds.), *Acute Renal Failure*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 47–98.
- Huss M., Wieczorek H. (2009). Inhibitors of V-ATPases: old e new players. *J. Exp. Biol.* 212(3), 341-346.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 42:39-51.
- Imesh E., Moosmayer M., Anner, B. M. (1992). Mercury weakens membrane anchoring of Na, K-ATPase. *Am. J. Physiol.* 1992, F837–F842.

- Ino Y., Gotoh M., Sakamoto M., Tsukagoshi, K., Hirohashi S. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 365–370.
- Ishizuka M. et al (1998). Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione S-transferase in crabs *Eriocheir japonicus* from Japanese rivers. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 17, p. 1490-1498.
- Jacobsen 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. (FAGAN & SAIER, 1994).
- Jantaro S., Maenpaa P., Mulo P., Incharoensakdi A. (2003). Content e biosynthesis of polyamines in salt e osmotically stressed cells of *Synechocystis sp* PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 228:129-135.
- Jayasundara N., Towle D.W., Weihrauch D., Spanings-Pierrot C. (2007). *J. Exp. Biol.* 210 2070-2081.
- Jorgensen P.L. (2005). Impact scenario for an introduced decapod on Arctic epibenthic communities. *Biological Invasions*, 7: 949 –957.
- Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Jorgensen P.L., Nielsen J.M., Rasmussen J.H., Pedersen P.A. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 65-70.
- Jorgensen P.L., Pedersen P.A. (2001). Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1505: 57-74.
- Jorgensen P.L., Rasmussen J.H., Nielsen J.M., Pedersen P.A. (1997). *Ann. NY Acad. Sci. USA* 834: 161-174.
- Jorgensen P.L., Amat F. (2008). Regulation e Function of Lysine-Substituted Na,K Pumps in Salt Adaptation of *Artemia franciscana*. *J. Membr. Biol.* 221, 39-49.
- Kalac P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *J Appl Biomed* 7:65-74.
- Kamemoto F.I. (1991). Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zool Sci* 8: 827-833.
- Kanai R., Ogawa H., Vilsen B., Cornelius F., Toyoshima C. (2013). Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1 state. *Nature* 502:201-207.
- Kaplan J.H. (2002). Biochemistry of NaK-ATPase. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 511-35.
- Kaplan J.H., Gatto C., Holden J.P., Thornewell S.J. (1998). *Acta Physiol. Scand.* 163: Suppl 643: 99-105.

- Karagas M.R., Choi A., Oken E., Horvat M., Schoeny R., Kamai E., Cowell W., Grandjean P., Korrick, S. (2012). Evidence on the human health effects of low level methylmercury exposure. *Environmental Health Perspectives* 120, 799–806.
- Karitskaya I., Aksenov N., Vassilieva I., Zenin V., Marakhova I. (2010). Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. *Eur J Physiol* 460:777–789.
- Karlish S.J. (2003). Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986, 39–49.
- Kasturi R., Yuan J., McLean L.R., Margolies M.N., Ball Jr W.J. (1998). *Biochem.* 37: 6658-6666.
- Keeling P.I., Smith L.L. (1982). *Biochem. Pharmacol.* 31: 3243-3249.
- Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251: 6183-6188.
- Khalid M., Suliman R., Ahmed R., Salin H., Clarke R.J. (2014). The high and low affinity binding sites of digitalis glycosides to Na,K-ATPase. *Arab J Sci Eng* 39:75-85.
- Khodabeeh S., Charmantier G., Blasco C., Grousset E., Charmantier-Daures M. (2005). Ontogeny of the antennal gles in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical e cell differentiation. *Cell. Tissue Res.* 319, 153-165.
- Kirley T.L. (1989). Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analyses. *J. Biol. Chem.* 264: 7185-7192.
- Kirschner L.B. (2004) .The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207:1439-1452.
- Kong B.Y., Clarke R.J. (2004). Identification of potential regulatory sites of the Na⁺, K⁺-ATPase by kinetic analysis. *Biochemistry* 43 2241-2250.
- Kong X., Wang G., Li S. (2008). Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Biol.* 154: 269–276.
- Kormanik G.A., Cameron J.N. (1981). Ammonia excretion in the seawater blue crab (*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, p. 150-151.
- Koury J.C., Donangelo C. M. (2003). Zinco estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 4, p. 433-441.

- Kuntzweiler T.A., Wallick E.T., Johnson C.L., Lingrel J.B. (1995). Glutamic-acid-327 in the sheep alpha-1 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase stabilizes a K⁺-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* 270,2993-3000.
- 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.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lang F., Waldegger S. (1997). Regulating cell volume. *Am Sci* 85:456-463.
- Laughery M.D., Todd M.L., Kaplan J.H. (2003). *J. Biol. Chem.* 278: 34794-34803.
- Laursen M., Gregersen G.L., Yatime L., Nissen P., Fedesova N.U. (2015). Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:1755-1760.
- Lea P.J., Wellburn F.A.M., Wellburn A.R., Creissen G.P., Mullineaux P.M. (1998). Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. In: Kok LJ; Stulen I. (Ed.). *Responses of plant metabolism to air pollution and global change*. Leiden: Backhuys Publishers, 1998. P. 241-250.
- LeBlanc G.A., Bain L.J. (1997). Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. *Environ. Health Perspect.* 105, suppl. 1: 65-80.
- Lee C.E., Kiergaard M., Gelembiuk G.W., Eads B.D., Posavi M. (2011). *Evolution* 65: 2229-2244.
- Lee C.E., Bell M.A. (1999). Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends Ecol Evolution* 14:284-288.
- Lee K.J., Watts S. A. (1994). Specific activity of Na⁺ K⁺ ATPase is not altered in response to changing salinities during early development of the brine shrimp *Artemia-franciscana*. *Physiol. Zool.* 67, 910-924.
- Lemaire P., Livingstone D.R. (1993). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 1: 1119-1147.
- Leone F.A., Masui D.C., Bezerra T.M.S., Garçon D.P., Valenti V.C. (2012) Kinetic analysis of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda Palaemonidae): Interactions at ATP- and cation-binding sites. *J Memb Biol* 245: 201– 215.
- Leone F.A. (2013). Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J.Memb. Biol.* 246:529–543.
- Leone F.A., Bezerra T.M., Garçon D.P., Lucena M.N., Pinto M.R., Fontes C.F., McNamara J.C. (2014). Modulation by K⁺ Plus NH₄⁺ of microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in

- selected ontogenetic stages of the diadromous river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). PloS one 9. Volume 9, Issue 2, e89625.
- Leone F. A., Garçon D.P., Lucena M.N., Faleiros R.O., Azevedo S. V., Pinto M.R., McNamara J.C. (2015). Gill-specific (Na⁺, K⁺)-ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-salinity acclimation of the ornate blue crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology (Print) ^{JCR}, v. 186, p. 59-67.
- Leone F.A., Lucena M.N., Rezende L.A., Garçon D.P., Pinto M.R., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C. (2015a). Kinetic characterization and immunolocalization of (Na⁺, K⁺)-ATPase activity from gills of the marine seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). J Membr Biol 248:257-272.
- Leone F.A., Baranauskas J.A., Furriel R.P.M., Borin I.A. (2005). 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). (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.
- Levenson R. (1994). Isoforms of the Na,K- ATPase – Family members in search of function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 123, 1-45.
- Li C.M., Grosdidier A., Crambert G., Horisberger J.D., Michielin O., Geering K. (2004). J. Biol. Chem. 279: 38895-38902.
- Lignot J.H., Spanings-Pierrot C., Charmantier G. (2000). Aquaculture 191: 209-245.
- Lignot J.H., Charmantier G. (2001). Immunolocalization of NA⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the european *Lobster Homarus Gammarus* (Crustacea, Decapoda) J Histochem Cytochem 49:1013-1023.
- Lin X., Fenn E., Veenstra R.D. (2006). An amino-terminal lysine residue of rat connexin 40 that is required for spermine block. J Physiol 570:251–269.
- Lin Y.C., Chen J.C. (2001). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259: 109–119.
- Lingrel J., Moseley A., Dostanic I., Cougnon M., He S.W., James P., Woo A., O'Connor K., Neumann J. (2003). Ann. NY Acad. Sci. 986: 354-359.
- Lingrel J.B., Arguello J.M., VanHuysse J., Kuntzweiler T.A. (1997). Ann. NY Acad. Sci. USA 834: 194-206.
- Lingrel J.B., Williams M.T., Vorhees C.V., Moseley A.E. (2007). J. Bioenerg. Biomembr. 39: 385-389.

- Liu C.H., Tseng M.C., Cheng W. (2008). Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 34–45.
- Liu Y., Wang W.N., Wang A.L., Wang J.M., Sun R.Y. (2007). Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture* 265, 351–358.
- Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372:366–369.
- Lopez L.B., Quintas L.E.M., Noel F. (2002). Influence of development on Na⁺/K⁺-ATPase expression: isoform- e tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol.* 131A, 323-333.
- Lovett D.L., Watts S.A. (2006). *Comp. Biochem. Physiol.* 110B: 115-119.
- 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.
- Lovett D.L., Towle D.W., Faris J.E. (1994). Salinity sensitive alkaline-phosphatase activity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathburn. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109, 163-173.
- Lubarski I., Karlsh S.J.D., Garty H. (2007). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293: F1818–F1826.
- Lucena M.N., Garçon D.P., Mantelatto F.L.M., Pinto M.R., McNamara J.C., Leone F.A. (2012). *Comp. Biochem. Physiol.* 161B: 380-391.
- Lucena M.N., McNamara J.C., Leone F.A. (2017). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous polyamines on enzyme activity in juveniles and adults. *Hydrobiologia.* 789: 56-76.
- Lucena M.N., Pinto M.R., Garçon D.P., McNamara J.C., Leone F.A. (2015). A kinetic characterization of the gill V(H⁺)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a Diadromous palaemonid shrimp. *Comp Biochem Physiol* 181B:15-25.
- Lucena N.M., McNamara J.C., Leone F.A. (2016). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous biogenic amines on enzyme activity in juveniles and adults. *Hydrobiologia.* Volume 771.
- Luchmann K.H., Toledo-Silva G., Bains A.C.D., Marques M.R.F. (2007). Glutathione S-transferase cytosolic isoform in the pink-shrimp, *Farfantepenaeus brasiliensis*, from Conceicao Lagoon, Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Environ. Int.* 33, 546–549.

- 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. (1993). J. Exp. Zool. 265: 378-386.
- Lucu C., Towle D.W. (2003). Comp. Biochem. Physiol. 135A: 195-214.
- 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 (CAJARAVILLE et al., 2000).
- Lucu C., Flik G. (1999). (Na⁺,K⁺)-ATPase e Na⁺, Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. Am. J. Physiol. 276, R490-R499.
- Luquet C.M., Weihrauch D., Senek M., Towle D.W. (2005). J. Exp. Biol. 208: 3627–3636.
- Macías M.T., Palmero I., Sastre L. (1991). Cloning of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* Na⁺/K⁺ATPase alphasubunit. Gene 105: 197-204.
- Maijala R.L, Eerola S.H. (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. Meat Sci 35:387-395.
- Maina J.N. (1990). 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.) The biology of crustacea. Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press. New York. New York. pp. 53-161.
- Mantel L.H., Olson J.R (1976). Studies on the Na⁺-K-activated ATPase of crab gills. Am Zool 16: 223-223.
- Martin D.W. (2005). Seminars Nephrol. 25: 282-291.
- Martin M., Fehsenfeld S., Sourial M.M., Weihrauch D. (2011). Effects of high environmental ammonia on branchial ammonia excretion rates and tissue Rh-protein mRNA expression levels in sea water acclimated Dungeness crab *Metacarcinus magister*. Comp Biochem Physiol 160A:267–277.
- Marks M.J., Seeds N.W. (1978). Life Sc. 23: 27-35.
- Marx H., Brunner B. (1998). Heavy metal contamination of North Sea shrimp (*Crangon crangon* L) Z LebensmUntersForsch A. 204: 273-275.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Leone F.A. (2005a). J. Exp. Zool. 303A: 294–307.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., McNamara J.C., Mantelatto F.L.M., Leone F.A. (2002). Comp Biochem Physiol 132C: 471-482.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Silva E.C.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Scofano H.M., Fontes C.F.L., Leone F.A. (2005). Int. J. Biochem. Cell Biol. 37: 2521-2535.

- Masui D.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Furriel R.P.M., Leone F.A. (2009). Comp. Biochem. Physiol. 153A: 141-148.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Leone F.A. (2005b). K⁺-phosphatase activity of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab, *Callinectes danae*: Low-salinity acclimation and expression of the alpha-subunit. J Exp Zool 303A:294-307
- Masui D.C., Furriel R.P.M., McNamara J.C., Mantelatto F.L.M., Leone F.A. (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.
- McDonough A.A., Farley R.A. (1993). Curr. Opin. Nephrol. Hyperten. 2: 725-734.
- McNamara J.C., Faria S.C. (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. J Comp Physiol 182:997-1014.
- McNamara J. C., Torres A. H. (1999). Ultracytochemical location of Na⁺/K⁺-ATPase activity e effect of high salinity acclimation in gill e renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Zool. 284,617-628.
- McNamara J.C., Rosa J.C., Greene L.J., Augusto A. (2004). Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 37,193-208.
- Mehra M., Kunwar, K.C. (1980). Absorption, distribution and excretion of methyl mercury in Mice. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24, 627–633.
- Melo G.A.S. (1996). São Paulo. Plêiade FAPESP. p. 604.
- Méndez L., Acosta B., Palacios E., Mgallon F. (1997). Effect of stocking densities on trace metal concentration in three tissues of brown shrimp *Penaeus californiensis*. Aquaculture 156: 21-34.
- Mendonça N.N., Masui D.C., McNamara J.C., Leone F.A., Furriel M.P.R. (2007). Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit expression and K⁺-phosphatase activity ☆ N.N. Mendonça et al. / Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 146 (2007) 534–543.
- Mendonça J.T., Barbieri E. (2001). A pesca do siri no litoral do Estado de São Paulo. Cadernos – Centro Universitário São Camilo, vol. 7, no. 2, p. 36-46.
- Mercer R. W., Biemesderfer D., Bliss D. P., Collins J. H., Forbush B. (1993). J. Cell Biol. 121: 579–586.

- Mergler D., Anderson H. A., Chan L.H.M., Mahaffey K.R., Murray M., Sakamoto M. (2007). Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*, v. 36, p. 3-11.
- Meyer S.P.A. (1994). Preservation of source identification of sedimentary organic matter during and after deposition chemical geology. *Amsterdam*, V144, n3-4, p.289-302.
- Middleton D.A., Rankin S., Esmann M., Watts A. (2000). *PNAS* 97: 13602-13607.
- Middleton J.P. (1996). *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 293-302.
- Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R. (2007). *Biochim Biophys Acta* 1776: 32–57.
- Mishra N.K., Peleg Y., Cirri E., Belogus T., Lifshitz Y., Voelker D.R., Apell H.J., Garty H., Karlisch S.J.D. (2011). FXYP proteins stabilize Na,K-ATPase amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions. *J Biol Chem* 286:9699-9712.
- Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M.D., Trevan M., Francis M.J.O., Lamb J.F., Martin-Vasallo P. (2000). *Biosci. Reports* 20: 51-91.
- Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M.D., Trevan M., Francis M.J.O., Lamb J.F., Martin-Vasallo P. (2001). *Biosci. Reports* 20: 51-91.
- Morris S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapods crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979-989.
- Morris S., Edwards T. (1995). *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 129–136.
- Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L.M., Petersen J., Eersen J.P., Vilsen B., Nissen P. (2007). Crystal structure of the sodium–potassium pump. *Nature* 450:1043-1050.
- Nesher M., Spolansky U., Rosen H., Lichtstein D. (2007). The endogenous digitalis-like compounds - A new family of steroid hormones. *Life Sci.* 80 2093-2107.
- Neufeld G. J., Holliday C. W., Pritchard J. B. (1980). Salinity adaptation of gill Na,K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215-224.
- Nieweglowski A.M.A., Silva E.M.F.M., Knie J. (1999). Importância dos parâmetros ecotoxicológicos em estudos ambientais. In: *MAIA* 3:1-6.
- Ning G., Maunsbach A.B., Lee Y.J., Moller J.V. (1993). *FEBS Lett.* 336: 521-524.
- Niyogi S. et al. (2001). Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, v. 52, p. 13-26.
- Nogueira C.W., Quinhones E.B., Jung E.A.C., Zeni G., Rocha J.B.T. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56–63.

- Nyblom M., Poulsen H., Gourdon P., Reinhard I., Andersson M. (2013). Crystal structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state. *Science* 342:123-127.
- Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13742–13747.
- Onken H., McNamara J.C. (2002). Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol* 205:167-175.
- Onken H., Graszynski K., Johannsen A., Putzenlechner M., Riestenpatt S., Schirmer C., Siebers D., Zeiske W. (1995). *Helgol Meeresunters* 49: 715-725.
- Onken H., Riestenpatt S. (1998). *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 883-893.
- Orlando A.M. (2001). O comitê de gerenciamento da Lagoa da Conceição: gestão de recursos hídricos ou gestão costeira. Dissertação. UFSC, Florianópolis - SC, Brasil.
- Omotayoa T.I., Rocha J.B.T., Ibukuna E.O., Kade I.J. (2011). Inorganic mercury interacts with thiols at the nucleotide and cationic binding sites of the ouabain-sensitive cerebral electrogenic sodium pump. *Neurochemistry International*. 58: 776–784.
- Páez-Osuna F., Ruiz-Fernadéz C. (1995). Trace metals in the mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. *Environ. Pollut.* 87: 243-247.
- Paital B., Chainy G.B.N. (2010). Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151: 142–151.
- Palacios E., Racotta I.S. (2007). *Aquaculture* 268: 123-135.
- Palmer C. J., Scott B. T., Jones L. R. (1991). Purification and complete sequence determination of the major plasma membrane substrate for cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in myocardium. *J. Biol. Chem.* 266: 11126–11130.
- Palmgren M.G., Nissen P. (2011). P-Type ATPases. *Annu Rev Biophys* 40:243–66 Forbush III B, Kaplan JH, Hoffman JF (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: Labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochem* 17:3667–3676.
- Park J., Presley B.J. (1997). Trace metal contamination of sediments and organisms from the Swan Lake area of Galveston Bay. *Environ. Pollut.* 98 (2): 209-221.
- Pedemonte C.H., Pressley T.A., Lokhandwala M.F., Cinelli A.R. (1997). *J. Memb. Biol.* 155: 219-227.

- Pedersen P.A., Jorgensen J.R., Jorgensen P.L. (2000). Role of Conserved TGDGVND-Loop in Mg²⁺ Binding, Phosphorylation, and Energy Transfer in Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 37588-37595
- Pedersen P.L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39:349–355.
- Pedersen P.L, Amzel L.M. (1993). ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, e regulation of one Nature's most unique machines. *J Biol Chem* 268:9937-9940.
- Pegg A.E. (2009). Mammalian Polyamine Metabolism and Function. *IUBMB Life* 61:880-894.7.
- Péqueux A. (1995). Osmotic Regulation in Crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15: 1-60.
- Péqueux C., Breton C., Hagelstein M.T., Martens H., Winkler R., Geenen V., Legros J.J. (2002). Oxytocin synthesis and oxytocin receptor expression by cell lines of human small cell carcinoma of the lung stimulate tumor growth through autocrine/paracrine signaling. *Cancer Res.* Aug 15;62(16):4623-9.
- Pereira C.D.S., Abessa D.M.S., Bainy A.S.C (2007). Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil *Eviron Toxicol Chem.* 3, 462 - 469.
- Pierre S.V., Sottejeau Y., Gourbeau J., Sanchez G., Shidyak K.A., Blanco V.G. (2008). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294 F859-F866.
- Pierrot C. (1994). Physiology branchiale at osmoregulation chez *Pachygrapsus marcmoratus* (Crustacè. Decapode), Ph D, tesis, Montpellier II.
- Pinho G.L.L. et al. (2003). Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 135C, p. 459-468.
- Pinto M.R., Lucena M.N., Faleiros R.O., Almeida E.A., McNamara J.C., Leone F.A. (2016) Effects of ammonia stress in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicology.* 170:13-23.
- Post R.L. (2003). *Ann. NY Acad. Sci.* 986: 20-21.
- Poulsen H., Morth P., Egebjerg J., Nissen P. (2010). *FEBS Lett.* 584: 2589-2595.
- Pourang N., Dennis J.H. (2005). Distribution of trace elements in tissues of two shrimp species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. *Environ. Int.* 31, 325-341.
- Pressley T.A. (1996). *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 264-271. Post R.L. (1999). *Current Topics Membr.* 48: 397-417.

- Pressley T.A., Duran M.J., Pierre S.V. (2005). Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the Na,K-pump. *Front Biosci* 10:2018-2026.
- Prosser C.L. (1973). *Comparative Animal Physiology*. WB Saunders, Philadelphia.
- Purhonen P., Thomsen K., Maunsbach A.B., Hebert H. (2006). Association of renal Na,K-ATPase alpha-subunit with the beta- and gamma-subunits based on cryoelectron microscopy. *J Membr Biol* 214:139-146.
- Racotta I.S., Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125a: 437–443.
- Radkov R., Kharoubi-Hess S., Shaer D., Modyanov N.N., Geering K., Horisberger J.D. (2007). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 356: 142-146.
- Randall D., Burggren W., French K. (2000). *Animal Physiology – Mechanisms and adaptations*. 4th Ed. WH Freeman, New York.
- 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.
- Reed D.J. (1986). Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *Biochem. Pharmacol.* 35: 7-13.
- Regnault M. (1987). Nitrogen Excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biol. Rev.* 62: 1-24.
- Ren K., Pan L., Zhao Q., Si L. (2015). Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *Comp Bioch and Physiol.* 187 : 48 – 54.
- Rezende C.E., Lacerda L.D. (1986). Metais pesados em mexilhões *Perna perna* do litoral do Estado do Rio de Janeiro. *Revta.Bras. Biol.* 46: 239-247.
- Rice W.J., Young H.S., Martin D.W., Sachs J.R., Stokes D.L. (2001). *Biophys. J.* 80: 2187-2197.
- Robinson J.D., Leach C.A., Robinson L.J. (1986). Cation sites, spermine, e the reaction sequence of the (Na⁺K⁺)-dependent ATPase. *Biochim Biophys Acta* 856:536-544.
- Robinson J. D. (1970). Interactions between monovalent cations e the (Na⁺,K⁺)- dependent adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 17-27.
- Robinson J. D. (1981) Substituing manganese for magnesium alters certain reaction properties of the Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 642, 405-417.
- Robinson J. D., Pratap P. R. (1991). Na,K-ATPase : modes of inhibition Mg²⁺. *Biochim. Biophys. Acta.* 1061, 267-78.

- Rocha J.B.T., Rocha L.K., Emanuelli T., Pereira M.E. (2001). Effect of mercuric chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid post-natal brain growth on the behavioral response to chlorpromazine and on delta-ALA-D activity in weaning rats. *Toxicol. Lett.* 125, 143–150.
- Rodrigues A.P., Oliveira P.C., Guilhermino L., Guimaraes L. (2012). Effects of salinity stress on neurotransmission, energy metabolism, and anti-oxidant biomarkers of *Carcinus maenas* from two estuaries of the NW Iberian Peninsula. *Marine biology* 159: 2061–2074.
- Romano N., Zeng C. (2010). Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comp Biochem Biophys* 151C:222-228.
- Romano N., Zeng C. (2013). *Rev. Fisheries Sci.* 21: 1–21.
- Rossi B., Gache C., Lazdunski M. (1978). Specificity e interactions at the cationic sites of the axonal (Na⁺,K⁺)-activated adenosinetriphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 85, 561- 570.
- Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. (2005). *Zoologia dos invertebrados*, 7 ed., Editora Roc. 1168p.
- Sáez A.G., Lozano E., Zaldívar-Riverón A. (2009). Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica.* 136: 479-490.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sánchez-Rodríguez J.E., Khalili-Araghi F., Miranda P., Roux B., Holmgren M., Bezanilla F. (2015). A structural rearrangement of the Na,K-ATPase traps ouabain within the external ion permeation pathway. *J Mol Biol* 427:1335-1344.
- Sandtner W., Egwolf B., Khalili-Araghi F., Sánchez-Rodríguez J.E., Roux B., Bezanilla F., Holmgren M. (2011). Ouabain binding site in a functioning Na/K ATPase. *J Biol Chem* 286:38177–38183.
- Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A. (1977). Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* Feb 24;265(5596):687–695.
- Santos L.C.F., Belli N.M., Augusto A. Masui D.C., Leone F.A., McNamara J.C., Furriel R.P.M. (2007). *Comp. Biochem. Physiol.* 148A: 178-188.
- Santos-Fernandes T. L. (1997). Fitoplâncton do estuário do rio Jaguaribe (Itamaracá, Pernambuco, Brasil): ecologia, densidade, biomassa e produção. Dissertação (Mestrado em Oceanografia). Recife: UFPE, 175p.

- Santos F. H., McNamara J. C. (1996) Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 206, 109-120.
- Schaeffer-Novelli Y. (1991). Manguezais brasileiros. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo São Paulo (SP). p. 42.
- Scheiner-Bobis G. (2002). Eur. J. Biochem. 269: 2424-2433.
- Schubart C.D., Diesel R., Hedges S.B. (1998). Rapid evolution to terrestrial life in jamaican crabs. Nature 393:363-365.
- Segall L., Daly S.E., Boxenbaum N., Lane L.K., Blostein R. (2000). Distinct catalytic properties of the 1, 2 e 3 isoforms of the rat (Na^+ , K^+)-ATPase. Biophys J 78:78A-78A.
- Segall L., Daly S.E., Blostein R. (2001). 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). Biochem. Mol. Biol. Int. 46: 667-672.
- Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. (1991)..Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxoG.Nature. 349: 431-434.
- Shindo Y., Morishita K., Kotake E., Miura H., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Hino A., Kanda T., Kusakabe Y. (2011). FXYD6, a Na,K-ATPase regulator, is Expressed in type II taste cells. Biosci Biotech Biochem 75:1061-1066.
- Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. (2009). Nature 459 446-450.
- Siebers D., Leweck K., Markus H., Winkler A. (1982). Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity Mar. Biol., 69, pp. 37–43.
- Sies H. (1993). Eur. J. Biochem. 215: 213-219.
- Sies H., Koch O.R., Martino E., Boveris A. (1979). FEBS Leters 103: 287-290.
- Silva E.C.C., Masui D.C., Furriel R.P.M., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Leone F.A., Scofano H.M., Fontes C.F.L. (2008a). Comp. Biochem. Physiol. 149B: 622-629.
- Silva E.C.C., Masui D.C., McNamara J.C., Mantelatto F.L.M., Barrabin H., Scofano H.M., Leone F.A., Fontes C.F.L. (2012). Biochim. Biophys. Acta 1818: 2588-2597.
- Silva E.C.C., Masui D.C., Furriel R.P.M., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Leone F.A., Scofano H.M., Fontes C.F.L. (2008). Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae). Comp. Biochem. Physiol. 149 B, 622-629.
- Skou J.C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta 23:394-401.
- Skou J.C., Esmann M. (1992). The Na,K-ATPase. J. Bioenerg. Biom. 24, 249-261.

- Skou J.C. (1960). Further investigations on a $Mg^{2+}Na^{+}$ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. *Biochim Biophys Acta* 42, 6-23.
- Soffiati A. (2004). Da mão que captura o caranguejo à globalização que captura o manguezal. *Anais do II Encontro da ANPPAS*. São Paulo.
- Sorensen T.M.L., Moller J.V., Nissen P. (2004). Phosphoryl transfer e calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304:1672-1675.
- Nottebohm Y., Belliard A., Duran M.J., Pressley T.A., Pierre S.V. (2010). Critical role of the isoform-specific region in R1-Na,K-ATPase trafficking and protein kinase C-dependent regulation. *Biochem* 49:3602–3610.
- Specht S. C., Rodriguez C., Quiñones L., Velazquez S. (1997). Effect of high ionic strength e inhibitors of HK-ATPase on the ouabain-sensitive K-p-Nitrophenyl phosphatase activity in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 217-224.
- Stangier J., Chang E.S. (1986). Identification and immunocytochemical localization of proctolin in pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maena*. *Peptides*. 7. 67 – 72.
- Sweadner K. J., Rael, E. (2000). *Genomics* 68: 41–56.
- Sweadner K. J., Arystarkhova E., Donnet C., Wetzel R. K. (2003). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: 382–387.
- Sweeney G., Klip A. (1998). Regulation of the Na^{+}/K^{+} -ATPase by insulin: Why e how? *Mol. Cell. Biochem.* 182, 121-133.
- Tabor C.W., Tabor H. (1984). Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53,749-790.
- Taissoun E.N. (1974). Universidad Del Zulia – Maracaibo-Venezuela. p. 40-44.
- Tan K.H., Meyer D.J., Coles B., Gillies N., Kettterer B. (1987). *Biochem. Soc. Trans.* 15: 628-629.
- Tashima Y., Hasegawa M., Mizunuma H. (1978). Activation of $(Na^{+}K^{+})$ -adenosine triphosphatase by spermine. *Biochem Biophys Res Comm* 82:13-18.
- Tassoni A., Antognoni F., Bagni N. (1996). Polyamines binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol* 110:817–824.
- Taylor H.H., Taylor E.W. (1992). Gills and lungs: The exchange of gases and íons. In: F.W. Harrison and A.G. Humas (Eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates Vol 10 Decapod crustacea*. Wiley-Liss. New York. pp.203-293.
- Tentes I., Stratakis E. (1991). Partial purification e properties of (Na^{+},K^{+}) - ATPase from *Potamon – potamios*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 619-624.

- Teriete P., Thai K., Choi J., Marassi F.M. (2009). Effects of PKA phosphorylation on the conformation of the Na, K-ATPase regulatory protein FXYD1. *Biochim Biophys Acta* 1788:2462–2470.
- 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.
- 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.* 271(12), 7104-7112.
- Tipsmark C.K. (2008) *Am. J. Physiol.* 294: R1367-R1378.
- Tokushige A., Higashino H., Searle B.M., Tamura H., Kino M., Bogden J. D., et al. (1984). Effect on the Na, K-ATPase system in cultured vascular smooth muscle cell. *Hypertension* 6, 20 – 26.
- Toner M., Vaio G., McLaughlin A., McLaughlin S. (1988). Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem* 27:7435–7443.
- Torres G., Charmantier-Daures M., Chifflet S., Anger K. (2007). Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺ - K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 460-465.
- Toustrup-Jensen M.S, Vilsen B. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 10210-10218.
- Toustrup-Jensen M.S., Holm R., Einholm A.P., Schack. V.R., Morth J.P., Nissen P., Andersen J.P., Vilsen B. (2009). *J. Biol. Chem.* 284: 18715-18725.
- Towle D.W., Weihrauch D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. *Am. Zool.* 41, 770–780.
- Towle D.W. (1984). *Amer. Zool.* 24: 177-185.
- Towle D.W. (1993). *J. Exp. Zool.* 265: 387-396.
- Towle D.W. (1997). *Amer. Zool.* 37: 575-584.
- Towle D.W., Kays W.T. (1986). *J. Exp. Zool.* 239: 311-318.
- 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). *J. Exp. Biol.* 200: 1003-1014.
- Towle D.W., Palmer G.E., Harris J.L. (1976). III Role of gill Na⁺+K⁺-dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity *J. Exp. Zool.*, 196, pp. 315–322.

- Towle D. W., Hollele T. (1987). Ammonium ion substitutes for K⁺ in ATP-dependent Na⁺ transport by basolateral membrane-vesicles. *Am. Journal. Physiol.* 252R, 479-489.
- Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. (2011). *Structure* 7: 1732-1738.
- Twitchen I.D., Eddy F.B., (1994). *Aquat.Toxicol.* 30: 27–45.
- Ukeda H., Kwana D., Maeda S., Sawamura M. (1999). *Biosc. Biothechnol. Biochem.* 63: 485-488.
- Vagin O., Turdikulova S., Tokhtaeva E. (2007). Polarized membrane distribution of potassium-dependent ion pumps in epithelial cells: different roles of the N-glycans of their beta subunits. *Cell Biochem. Biophys.* 47: 376-391.
- Van der Oost R., Beyer J. , Vermeulen N.P.E. (2003). Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- Van Gestel C.A.M., Van Brummelen T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5: 217-225.
- Van Horn J., Malhoe V., Delvina M., Thies M., Tolley S.G., Ueda T. (2010). Molecular cloning and expression of a 2-Cys peroxiredoxin gene in the crustacean *Eurypanopeus depressus* induced by acute hypo-osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol. B* 155, 309–315.
- Vassalo M.P., Post R.L. (1989). Identification of a pupative isoform of the (Na⁺K⁺) - ATPase beta subunit. Primary structure and tissue specific expression. *J. Biol. Chem.* 1989. 264:4613-8.
- Vercesi A.E., Komaltowski A.J., Oliveira H.C.F., Castilho R.F. (2006). Mitochondrial C²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front. Biosc. Machasset.* 11: 2554-2564.
- Vilsen B. (1999). *Biochem.* 38: 11389-11400.
- Vilsen B. (1995). Mutant Glu781--Ala of the rat kidney Na⁺K⁺-ATPase displays low cation affinity e catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry* 34, 1455-63.
- Vinagre T.M. et al. (2003). Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 135C, p. 67-75.
- 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.

- Walker C.H. (1998). Biochemical biomarkers and potentiation of toxicity. *Biotherapy*, v. 11, p. 113-117.
- Walker C.H. et al. (1996). Principles of ecotoxicology. Londres: Taylor & Francis. 321 p.
- Wang P., Lin C., Hwang H., Lee T. (2008). *J. Exp. Biol.* 211 3750-3758.
- Wanson S., Péqueux A., Roer R. (1984). Na⁺ regulation e (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte) *Comp. Biochem. Physiol.* 79A, 673-678.
- Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H., Igarashi K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 266:20803–20809.
- Watts S.A., Lee K.J., Cline G.B. (1994). Elevated ornithine decarboxylase activity e polyamine levels during early development in the brine shrimp *Artemia-franciscana*. *J Exp Zool* 270: 426-431.
- Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinnesaffran E., Kinne R.K.H. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1–80.
- Weigand K.M., Messchaert M., Swarts H.G.P., Russel F.G.M., Koenderink J.B. (2014). Alternating hemiplegia of childhood mutations have a differential effect on Na⁺,K⁺-ATPase activity and ouabain binding. *Biochim Biophys Acta* 1842:1010-1016.
- Weihrauch D., Morris S., Towle D.W. (2004a). Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. *J Exp Biol* 207:4491-4504.
- 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., Ziegler A., Siebers D., Towle D.W. (2001). Molecular characterization of VtypeHp-ATPase (B subunit) in gill of euryhaline crab and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J ExpBiol* 204:25–37.
- Weihrauch D., Becker W., Postel U., Luck-Kopp S., Siebers D. (1999). *J. Comp. Physiol.* 169B: 25-37.
- Weihrauch D., Becker W., Postel U., Riestenpatt S., Siebers D. (1998). *J. Comp. Physiol.* 168B: 364-376.
- Weihrauch D., Morris S., Towle D.W. (2004). *J. Exp. Biol.* 207: 4491-4504.
- Weydert C.J., Cullen J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.*5:51–66.

- Wheatly M.G., Henry R.P. (1987). Branchial and antennal Na^+/K^+ -dependent ATPase and carbonic-anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Exp. Biol. 133, 73-86.
- Williams K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. Biochem J 325:289–97.
- 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.
- Wu F., Grossenbacher D., Gehring H. (2007). New transition state-based inhibitor for human ornithine decarboxylase inhibits growth of tumor cells. Mo. Cancer Ther. 6, 1831-1839.
- Wynn A., Shafer T.H., Coblentz F.E. (2004). Sequence of a large ribosomal subunit cDNA from *Callinectes sapidus*. Unpublished. 2 (bases 1 to 779).
- Yamaguchi T. (2001). Dimorphism of chelipeds in the fiddler crab, *Uca arcuata*. Crustaceana, Leiden, 74 (9): 913-923.
- Yamazaki A., Kaya S., Tsuda T., Araki Y., Hayashi Y., Taniguchi K. (1994). An extra phosphorylation of $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ by para-nitrophenylphosphate (p-PNPP): evidence for the oligomeric nature of the enzyme. J. Biochem. 116, 1360-1369.
- Yaragatupalli S., Olivera J.F., Gatto C., Artigas P. (2009). Altered Na^+ transport after an intracellular α -subunit deletion reveals strict external sequential release of Na^+ from the Na/K pump. Proc Natl Acad Sci 106:15507–15512.
- Yatime L., Laursen M., Morth J.P., Esmann M., Nissen P., Fedesova N.U. (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPase}$. J Struct Biol 174:296-306.
- Yoneda J.S., Rigos C.F., Ciancaglini P. (2013). Addition of subunit c, K^+ ions, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na,K -ATPase. Arch Biochem Biophys 530:93–100.
- Zanders I.P. (1980). Regulation of blood ions in *Carcinus maenas* (L.). Comp Biochem Physiol 65A:97–108.
- Zare S., Greenaway P. (1998). Comp. Biochem. Physiol. 119A: 739-745.
- Zeiske W., Onken H., Schwarz H-J., Graszynski K. (1992). Biochim. Biophys. Acta 1105: 245-252.
- Zhao J.H., Lam T.J., Guo J.Y., (1997). Aquac. Res. 28: 517–525.

Apêndice