



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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de  
*Callinectes danae* submetido a estresse por cobalto**

Maria Izabel Cardoso da Costa

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

## RESUMO

COSTA, M.I.C. Caracterização cinética e molecular da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *Callinectes danae* submetido a estresse pelo cobalto. 95p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

A poluição por metais é uma preocupação para a saúde dos ambientes marinhos devido a ampla aplicabilidade, e o *Callinectes danae* é uma das espécies de caranguejos recomendadas como biomonitor ambiental, capaz de fornecer respostas biológicas em áreas contaminadas. O cobalto é um metal essencial em alguns processos celulares e, como não é regulado nos crustáceos decápodes, pode biomagnificar ou bioacumular na cadeia trófica. O tecido branquial é o primeiro órgão em contato com poluentes externos. Assim, a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase branquial pode ser usada como sistema modelo na investigação dos efeitos tóxicos de íons metálicos. Esse trabalho faz parte da linha de pesquisa “(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase como marcador molecular da adaptação dos crustáceos a ambientes de diferentes salinidades” e tem como objetivo avaliar o efeito do íon cobalto na atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial de *C. danae* usando o substrato sintético *p*-nitrofenil fosfato. Estudos anteriores confirmam que esse substrato possui uma estrita correlação com o ATP, substrato fisiológico, na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. Além disso, a utilização desse substrato sintético resulta em procedimentos experimentais mais simples comparados ao substrato fisiológico. Os resultados obtidos nesse trabalho revelaram que o cobalto estimula a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima em substituição ao magnésio. Entretanto, o cobalto inibe a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima quando na presença de magnésio. Comparada com o magnésio ( $K_{0,5} = 2,98 \pm 0,59 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a afinidade da enzima pelo cobalto é cerca de 4 vezes maior ( $K_{0,5} = 0,60 \pm 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$ ). O magnésio consegue deslocar o cobalto ligado à enzima até concentrações menores que  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ . O cobalto não interfere na inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima pelo sódio ( $IC_{50} \approx 16 \text{ mmol L}^{-1}$ ), nem a inibição pela ouabaína ( $K_I \approx 2 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

**Palavras-chave:** (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, *Callinectes danae*, Cobalto, Metais Pesados

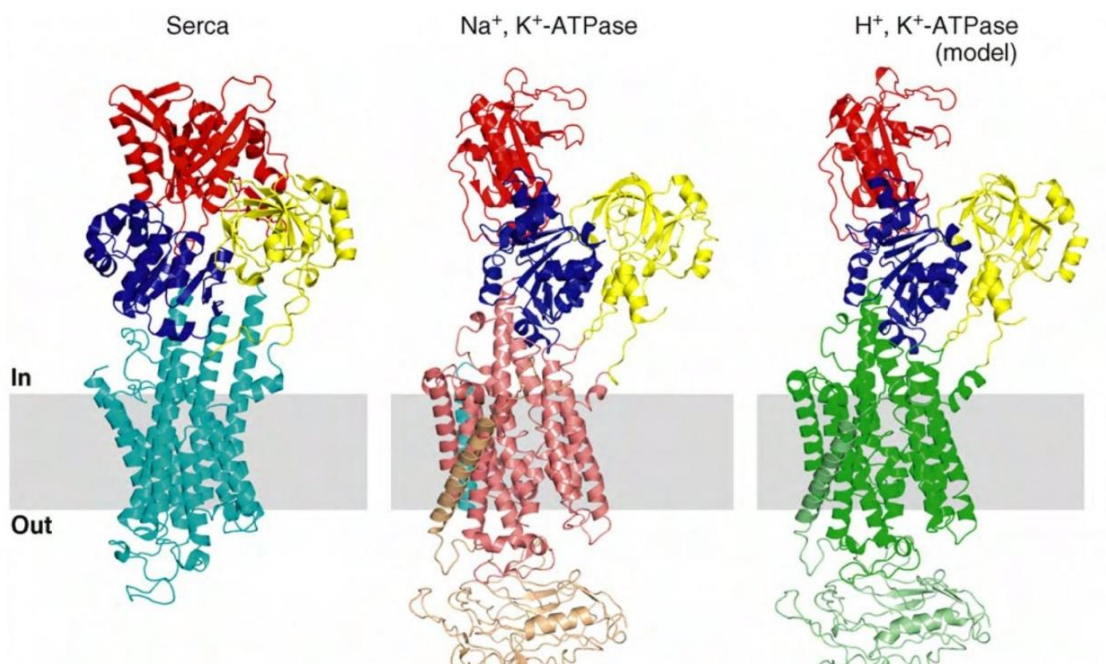
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase

As ATPases do tipo P (Figura 1) constituem uma superfamília de bombas catiônicas e lipídicas (Palmgren, Nissen, 2011), envolvidas no transporte de íons através das membranas biológicas, incluindo Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (Geering, 2000; Clarke, 2009). Também são reconhecidas pela formação de um intermediário fosforilado, onde o grupo fosfato  $\gamma$  da molécula de ATP se liga, temporariamente, a um resíduo de aspartato (D<sub>376</sub>) encontrado na sequência conservada DKTGT(I/L) como parte de seu mecanismo de reação (Geering, 2000; Clarke, 2009; Bublitz *et al.*, 2010; Palmgren, Nissen, 2011; Chourasia, Sastry, 2012).

A primeira bomba descoberta foi a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase (EC 3.6.1.37), também conhecida como adenosina trifosfatase estimulada por sódio e potássio, uma proteína integral de membrana da família PII<sub>c</sub> (Clarke, 2009; Palmgren, Nissen, 2011). Nas células animais a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase é responsável por manter ativamente gradientes eletroquímicos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana biológica (Geering, 2006; Clarke, 2009; Azarias *et al.*, 2013; Cornelius, Tsunekawa, Toyoshima, 2018) necessários para uma variedade de funções fisiológicas (Cornelius, Tsunekawa, Toyoshima, 2018).

**Figura 1- Estrutura das ATPases do grupo II**



Fonte: Bublitz *et al.*, 2010.

A enzima transporta simultaneamente três  $\text{Na}^+$  do meio intracelular para o meio extracelular e dois  $\text{K}^+$  em sentido oposto, em um processo acoplado à hidrólise do fosfato  $\gamma$  da molécula de ATP (Jorgensen, Pedersen, 2001; Shinoda *et al.*, 2009; Bublitz *et al.*, 2010; Palmgren, Nissen, 2011; Apell, 2017). Esse transporte iônico assimétrico gera uma força eletromotriz que é essencial para a viabilidade celular, sendo responsável por vários processos fisiológicos fundamentais, como regulação do volume celular, transmissão do impulso nervoso, manutenção da termogênese, regulação do pH, transporte ativo secundário e equilíbrio iônico (Jorgensen, Pedersen, 2001; Faller, 2008; Poulsen *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011; Aperia, 2012; Clarke *et al.*, 2013; Clausen, Hilbers, Poulsen, 2017; Zoroddua *et al.*, 2019)

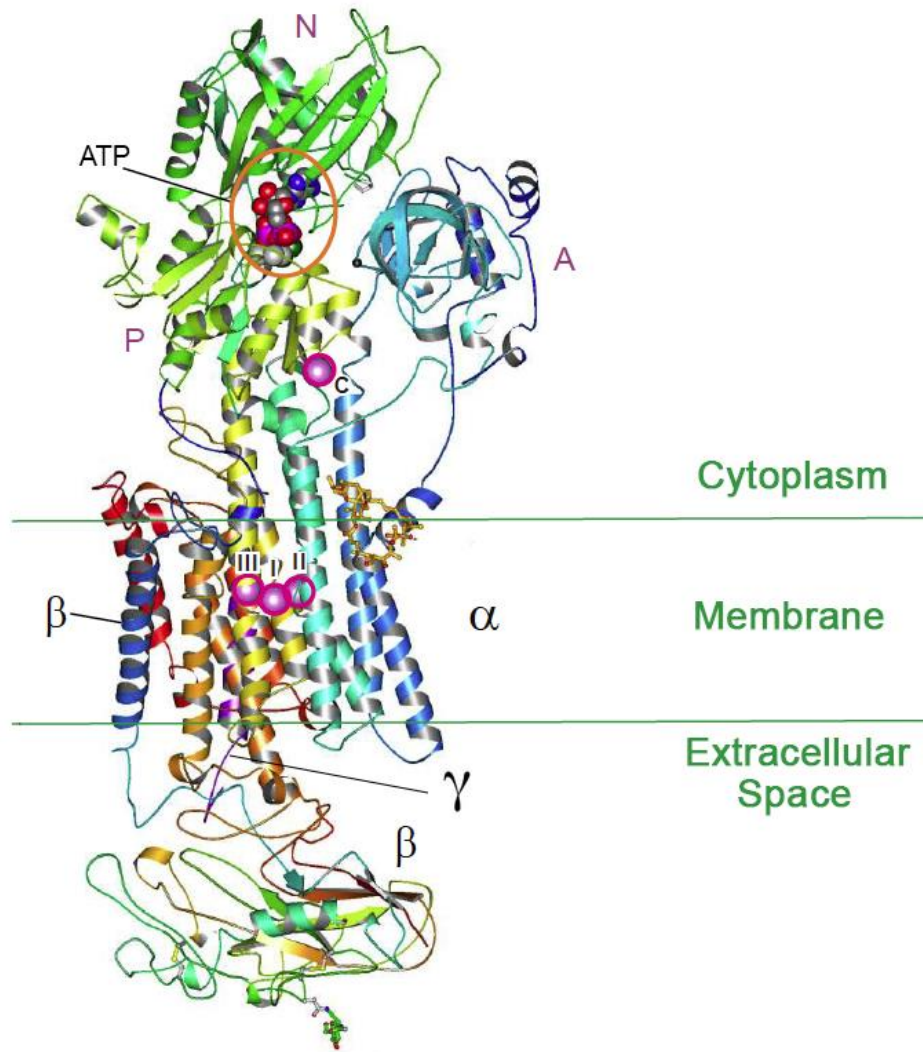
A  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  nativa (Figura 2) é um heterodímero ternário constituído por duas cadeias peptídicas: a subunidade  $\alpha$ , responsável pela atividade catalítica, a subunidade  $\beta$  que é altamente glicosilada e, em algumas células, apresenta ainda o peptídeo da família das proteínas FXYD, a subunidade  $\gamma$  (Kaplan, 2002; Morth *et al.*, 2007; Geering, 2008; Poulsen *et al.*, 2010; Li, Langhans, 2015; Clausen, Hilbers, Poulsen, 2017).

A subunidade  $\alpha$ , com  $M_r \approx 110$  kDa (Figura 3) é a subunidade catalítica, responsável pelas atividades de transporte da enzima, apresentando os sítios de ligação do ATP, de fosforilação e resíduos de aminoácidos que são essenciais para a ligação dos íons sódio e potássio (Geering, 2000; 2008; Kaplan, 2002; Jorgensen, Hakansson, Karlsh, 2003; Horisberger, 2004; Capendeguy, Horisberger, 2005; Li, Langhans, 2015). Esta subunidade apresenta, aproximadamente, 1000 resíduos de aminoácidos, arranjados em 10 segmentos transmembrana ( $M_1$  a  $M_{10}$ ) formando uma  $\alpha$ -hélice cujas as extremidades N- e C-terminal estão voltadas para o meio intracelular formando alças intra- e extracelulares (Kaplan, 2002; Jorgensen, Hakansson, Karlsh, 2003; Toustrup-Jensen, Vilsen, 2005).

As alças citoplasmáticas da subunidade catalítica estão dispostas em três domínios principais: o domínio A (âncora ou atuador), o domínio P (fosforilação) e o domínio N, (nucleotídeo) (Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen, Vilsen, 2005; Bublitz *et al.*, 2010; Palmgren, Nissen, 2011). O domínio âncora é composto pela alça citoplasmática entre os segmentos  $M_2$ - $M_3$  que contém o motivo TGES envolvido na desfosforilação da enzima e que atua como regulador exercendo um papel essencial na afinidade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  pelo ATP (Kaplan, 2002; Martin, 2005; Morth *et al.*, 2009). O domínio P e o domínio N estão posicionados na mesma alça citoplasmática entre os segmentos  $M_4$ - $M_5$ . Neles estão localizados, respectivamente, os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação do ATP

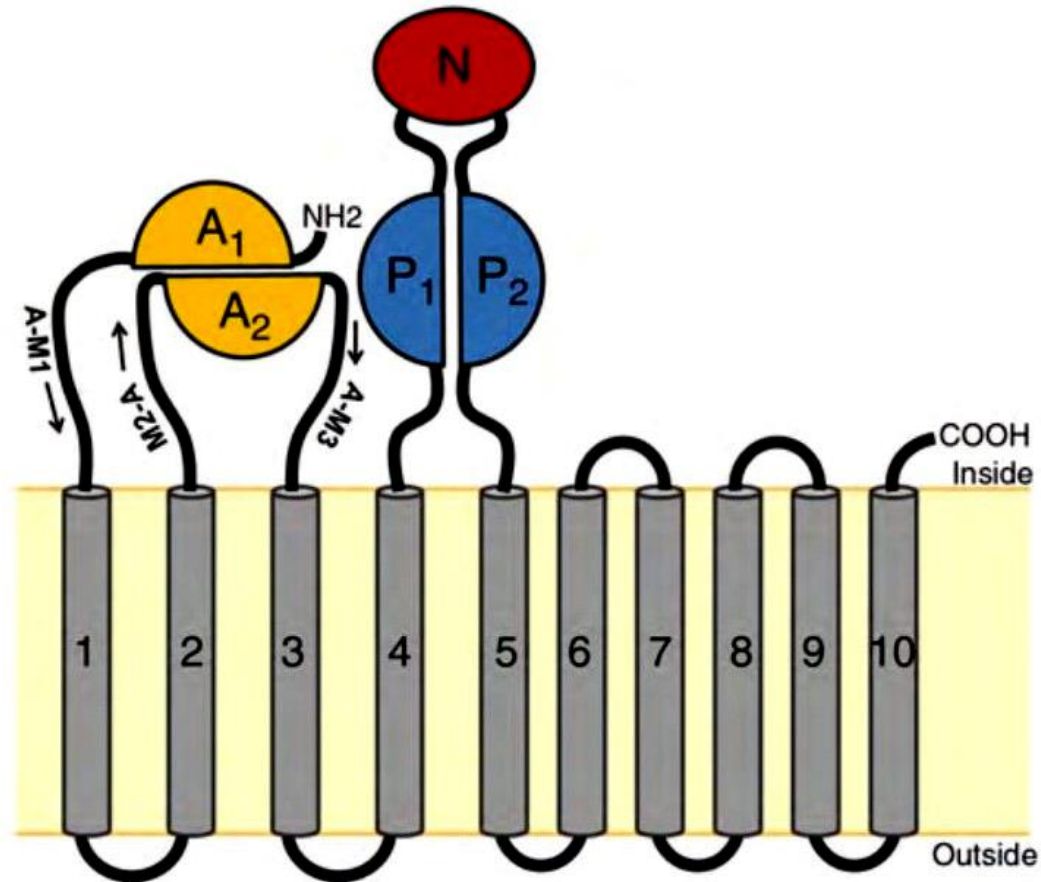
à enzima e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o ciclo reacional (Kaplan, 2002; Bublitz *et al.*, 2010; Palmgren, Nilsen, 2011).

**Figura 2 - Estrutura molecular do complexo  $(\text{Na}^+, \text{K}^+) \text{-ATPase } \alpha\beta\gamma$**



As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  estão representadas na forma de fita, em vermelho na extremidade C-terminal e em azul na extremidade N-terminal. A subunidade FXYD está representada em roxo na parte posterior da figura. Três  $\text{Na}^+$  ligados na região intramembrana (I, II, III) e um na região citoplasmática são mostrados em círculos rosas. Fonte: Kanai *et al.*;2013.

**Figura 3 - Topologia da subunidade  $\alpha$  com 10 hélices transmembrana**



Fonte: Bublitz *et al.*, 2010.

A subunidade  $\beta$  atravessa a membrana plasmática apenas uma vez apresentando o domínio N-terminal voltado para o meio intracelular e um domínio C-terminal extracelular (Morth *et al.*, 2007; 2011). Esta subunidade é constituída por aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos e  $M_r \approx 55$  kDa e está associada com as hélices transmembranares  $\alpha M_7 - \alpha M_{10}$ . Esta subunidade, com cerca de 80% da sua cadeia peptídica voltada para o espaço extracelular, apresenta três ligações dissulfeto e é altamente glicosilada conferindo estabilidade à  $(Na^+, K^+)$ -ATPase e tornando-a resistente a proteases (Martin, 2005; Morth *et al.*, 2007; Li, Langhans, 2015). Além disso, a subunidade  $\beta$  modula a afinidade da enzima pelo  $Na^+$  e  $K^+$  (Blanco, Sánchez, Mercer, 1998) e funciona como uma molécula de adesão celular (Rajasekaran *et al.*, 2001; Vagin *et al.*, 2012). Na ausência da subunidade  $\beta$ , a subunidade  $\alpha$  fica reclusa no retículo endoplasmático indicando que a subunidade  $\beta$  apresenta um papel de chaperona (Toustrup-Jensen, Vilsen, 2005).

Embora as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  constituam a estrutura básica funcional da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , em alguns organismos a bomba pode estar agregada a um proteolípídeo que se associa especificamente ao dímero  $\alpha\beta$ . Esse peptídeo com cerca de 60 resíduos de aminoácidos com  $M_r \approx 7$  kDa pertencente à família das proteínas FXYD e, nos vertebrados, se associa à  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  de maneira tecido-específica (Cortes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Pirkmajer, Chibalin, 2019).

A família FXYD é um grupo de proteínas pequenas de membrana, sendo caracterizadas por um motivo FXYD, dois resíduos de glicina conservados e um resíduo de serina. Estas exibem um único segmento transmembranar, localizado adjacente aos segmentos  $M_2$ - $M_6$ - $M_9$  da subunidade  $\alpha$ , em que a parte N-terminal se encontra no meio extracelular e o C-terminal no citoplasma (Geering, 2008; Shinoda *et al.*, 2009; Morth *et al.*, 2011; Li, Langhans, 2015). A subunidade  $\gamma$  interage de maneira específica com a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , modificando as afinidades aparentes da enzima para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ATP (Dempski *et al.*, 2008). Além disso, essa subunidade modula as propriedades cinéticas e a estabilidade da bomba (Geering, 2006; 2008; Li, Langhans, 2015; Pirkmajer, Chibalin, 2019). A interação desse peptídeo com a enzima aumenta sua versatilidade e constitui um importante mecanismo de regulação da homeostase em peixes e crustáceos (Yang *et al.*, 2019). Esse peptídeo está presente em *Callinectes danae* como componente funcional da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  desses invertebrados (Silva *et al.*, 2012).

Até o momento foram identificadas em vertebrados quatro diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1 - \alpha_4$ ) e três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta_1 - \beta_3$ ), todas codificadas por diferentes genes (Blanco, 2005; Jimenez *et al.*, 2010; Azariaz *et al.*, 2013). Cada uma dessas isoformas é expressa em um padrão específico nas células (Jimenez, 2010) possuindo diferentes afinidades e propriedades cinéticas (Clausen, Hilbers, Poulsen, 2017). Em humanos, existe um alto grau de identidade na sequência de aminoácidos entre as isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\approx 85\%$ ) enquanto nas isoformas da subunidade  $\beta$  ocorre uma maior discrepância ( $\approx 37\%$ ) com diferentes sítios de glicosilações (Li, Langhans, 2015; Clausen, Hilbers, Poulsen, 2017).

O mecanismo reacional da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  é fundamentado em mudanças entre dois estados conformacionais principais o  $E_1$  e o  $E_2$  (Alberts, 1967; Geering, 2000; Kaplan, 2002; Clark, 2009). Durante a transição do estado conformacional  $E_1$  para o  $E_2$ , no qual os sítios de ligação dos íons mudam de acessíveis ao meio citoplasmático para acessíveis ao meio extracelular da célula, a ligação do  $\text{K}^+$  acelera a desfosforilação da forma  $E_2$  (Morth *et al.*, 2009; Clausen, Hilbers, Poulsen, 2017). Na presença de  $\text{Na}^+$ , a conformação  $E_1$  liga-se ao ATP com alta afinidade (Kanai *et al.*, 2013; Nyblon *et al.*, 2013). Em contrapartida, na

presença de  $K^+$  a conformação  $E_2$  se liga ao ATP com baixa afinidade (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009). O sítio de ligação de ATP no domínio N, é separado do domínio P onde se localiza o sítio de fosforilação. Quando o ATP se liga à conformação  $E_2$ , pelo qual possui baixa afinidade, rapidamente ocorre a transição para a conformação  $E_1$  da enzima, que apresenta alta afinidade pelo  $Na^+$  (Chourasia, Sastry, 2012).

De acordo com o modelo de Albers-Post, o ciclo catalítico da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase (Figura 4), se inicia pela ligação de uma molécula de ATP à forma  $E_2(2K)$  (etapa 1), na qual possui uma baixa afinidade aparente. Nesta conformação, os dois  $K^+$  estão ocluídos no interior da enzima (Kaplan, 2002). A ligação da molécula de ATP faz com que ocorra uma mudança conformacional na enzima que passa do estado  $E_2ATP(2K)$  para  $E_1ATP2K$  (etapa 2) no qual os  $K^+$  estão desocluídos, ocorrendo concomitantemente à reorientação dos sítios de ligação dos cátions do meio extracelular para o meio intracelular. Consequentemente, ocorre uma diminuição da afinidade por  $K^+$  que resulta em sua liberação no citoplasma (etapa 3). A liberação do  $K^+$  no citoplasma e a sua substituição por dois  $Na^+$  originam a forma  $E_1ATP2Na$ , que é muito rápida e controlada por difusão (Apell, 2017). A ocupação do sítio de ligação por dois  $Na^+$  permite a ligação de um terceiro íon  $Na^+$  citoplasmático dando origem à forma  $E_1ATP3Na$  (etapa 4), ocasionando um rearranjo dos segmentos da subunidade catalítica (Kaplan, 2002; Kanai *et al.*, 2013). Este rearranjo se propaga para os domínios citoplasmáticos levando a disposição adequada do resíduo de aspartato que será fosforilado pelo ATP já ligado à enzima (Kaplan, 2002). Após a fosforilação da enzima, que resulta na liberação de ADP, ocorre uma transição para a conformação  $E_1P(3Na)$  (etapa 5), na qual os três  $Na^+$  permanecem ocluídos. A enzima passa por uma rápida isomerização mudando para a forma  $E_2P2Na$  e libera um íon  $Na^+$  para o meio extracelular (etapa 6) (Kaplan, 2002). Devido a essa mudança conformacional ocorre uma perda de afinidade da enzima pelo  $Na^+$  resultando na liberação dos outros dois  $Na^+$  para fora da célula (etapa 7). Finalmente, a ligação de dois  $K^+$  extracelulares (etapa 8) à forma  $E_2P$  origina a forma  $E_2P2K^+$  (Ogawa *et al.*, 2015), catalisando a desfosforilação da enzima (etapa 9) que retorna à forma  $E_2(2K)$  reiniciando assim o ciclo catalítico (Myers *et al.*, 2011).

Apesar da especificidade da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase pelo o ATP, a enzima também hidrolisa substratos sintéticos como o p-nitrofenil fosfato (Furriel, McNamara, Leone, 2001; Masui *et al.*, 2005). A utilização de substratos sintéticos, permite uma análise mais simples da atividade da enzima, entretanto, não ocorre o transporte de íons ou fosforilação da enzima (Furriel, McNamara, Leone, 2001). Embora o mecanismo de hidrólise do p-nitrofenil fosfato não esteja completamente elucidado, a forma  $E_2$  parece ser a principal envolvida neste



processo. Na ausência de  $\text{Na}^+$ , os íons  $\text{K}^+$  podem ativar a reação nos sítios citoplasmáticos correspondentes aos locais de ligação do  $\text{Na}^+$  na enzima (Glynn, 1985; Masui *et al.*, 2003). Tanto o ATP como o p-nitrofenil fosfato são hidrolizados no mesmo sítio da enzima (Furriel, McNamara, Leone, 2001) e, essa correlação estrita entre as atividades  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  e  $\text{K}^+$ -fosfatase valida o uso desse substrato orgânico em investigações comparativas da atividade enzimática (Masui *et al.*, 2003).

**Figura 4 - Esquema de Albers-Post**

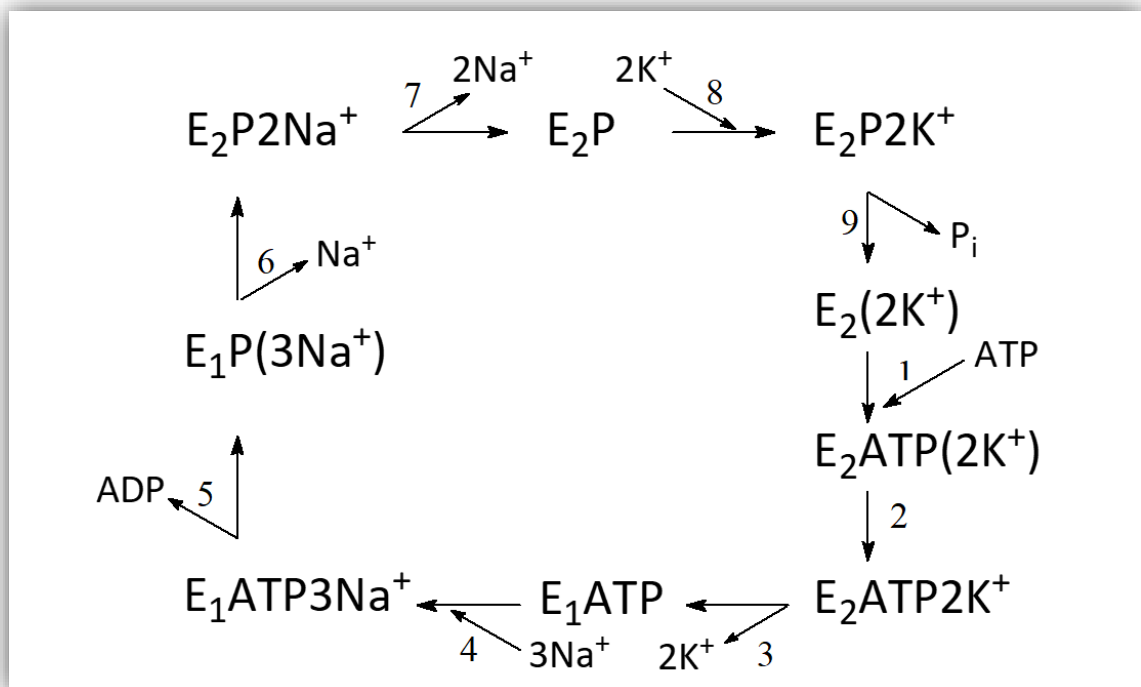
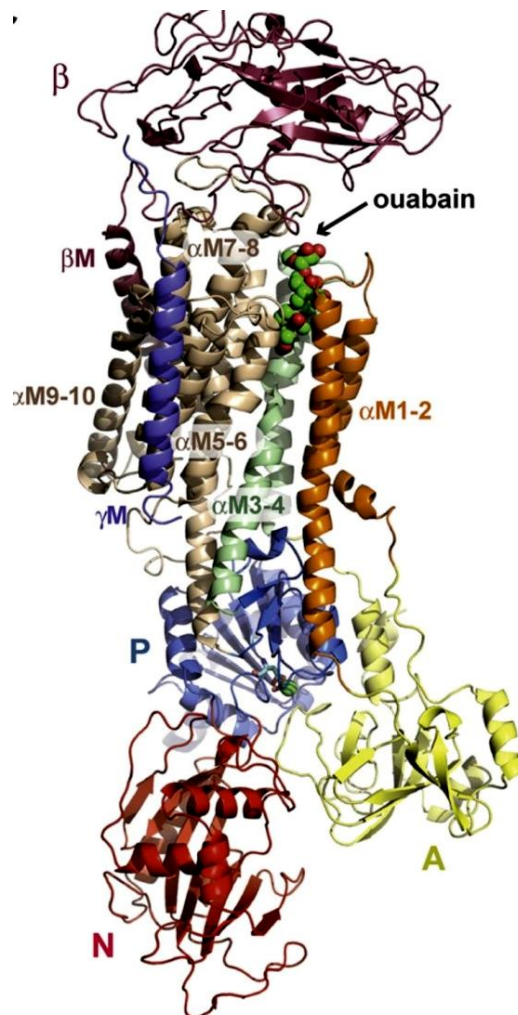


Ilustração do mecanismo descrito acima, o qual foi proposto por Albers-Post. Os íons ocluídos estão mostrados entre parênteses. Fonte: Modificado de Kaplan, 2002.

A  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  pode ser inibida especificamente pela ouabaína, um esteróide cardiotônico, que inibe a atividade e o transporte iônico da enzima (Kaplan, 2002; Crambert *et al.*, 2004; Neshar *et al.*, 2007; Cornelius, Mahmoud, 2009; Cornelius *et al.*, 2011; Khalid *et al.*, 2014). Essa afinidade da enzima por esse glicosídeo cardíaco tornou o sítio deste inibidor um dos primeiros alvos para o estudo de mutagênese sítio-dirigida (Faller, 2008). A ouabaína, encontrada em baixas concentrações nos organismos (Aperia *et al.*, 2016), liga-se com alta especificidade à conformação  $E_2\text{P}$  na região extracelular da subunidade catalítica

(Crambert *et al.*, 2004; Nesher *et al.*, 2007; Aperia, 2012) atuando fisiologicamente como moduladora da atividade enzimática. A conformação E<sub>2</sub>P da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase pode ser alcançada quando Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, e P<sub>i</sub> estão presentes no meio reacional. A enzima fosforilada e o inibidor formam um complexo fosfoenzima-ouabaína, denominado E<sub>2</sub>P ouabaína (Figura 5) (Khalid *et al.*, 2014). De acordo com a fosforilação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, existem dois tipos de complexos de ouabaína, que se diferenciam nas características cinéticas e no modo de interação de seus sítios de ligação de cátions e ATP (Yatime *et al.*, 2011).

**Figura 5 - Representação do complexo E<sub>2</sub>-P ouabaína**



A molécula de ouabaína está representada em verde e vermelho dentro do segmento transmembrana. Fonte: Modificado de Yatime *et al.* (2011).

O ortovanadato também inibide as P-ATPases na faixa nanomolar dada a sua estrutura tetraédrica ser altamente similar à do fosfato (Fedosova, Cornelius Klodos, 1998; Montes, Monti, Rossi, 2012). Esse inibidor se liga covalentemente ao resíduo de aspartato no sítio de fosforilação inibindo o ciclo catalítico, mantendo a enzima em um estado semelhante ao E<sub>2</sub> (Fedosova, Cornelius, Klodos, 1998; Montes, Monti, Rossi, 2012), originando um complexo enzima-ortovanadato em uma conformação aberta ou fechada (Montes, Monti, Rossi, 2012).

A (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase é importante para diversos transportes ativos secundários e é alvo de mecanismos reguladores tecido-específicos (Therien, Blostein, 2000; Pirkmajer, Chibalin, 2019). Essa regulação pode ser local (curto prazo) ou sistêmica (longo prazo), envolvendo uma série de fatores complexos (Pressley, Duran, Pierre, 2005; Mijatovic *et al.*, 2007; Cornelius, Mahmmoud, 2009). A regulação local pode ser alcançada por meio de efeitos diretos no comportamento cinético da enzima através da fosforilação da proteína cinase A (PKA), proteína cinase B (PKB), proteína cinase C (PKC), ou da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) que depende das concentrações intra- e extracelulares de ATP, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e que pode ocorrer de minutos a horas (Blanco, 1998; Therien, Blostein, 2000; Cornelius, Mahmmoud, 2009). Já a regulação sistêmica, geralmente ocorre a nível molecular e envolve mudanças na transcrição gênica, degradação da proteína, estabilidade e tradução de mRNA (Therien, Blostein, 2000; Li, Langhans, 2015; Pirkmajer, Chibalin, 2019). Além disso, a enzima pode ser regulada por uma série de moléculas tais como como dopamina, espermina, espermidina, putrescina, insulina, aldosterona, entre outras (Phakdeekitcharoen *et al.*, 2011; Oubaassine *et al.*, 2012, Salyer *et al.*, 2013).

## **1.2. A osmorregulação nos crustáceos**

Os crustáceos apareceram pela primeira vez no mar primitivo há 600 milhões de anos (Barnes, 1990) e, através de processos evolutivos, tornaram-se capazes de habitar ambientes terrestres e marinhos, ficando sujeitos a desafios homeostáticos (Thurman, McNamara, 2017). A transição desses invertebrados para habitats com alta e/ou baixa salinidade causou mudanças na regulação iônica e representa uma das colonizações evolutivas mais desafiadoras da história da vida na Terra (Lee *et al.*, 2011). A manutenção desses invertebrados em tais habitats descende da evolução adaptativa na regulação osmótica e iônica (Silva *et al.*, 2012). Mudanças na salinidade podem causar modificações na estrutura genética da população, na fisiologia e biologia geral de espécies individuais (McNamara *et al.*, 2015). Uma transição bem sucedida para meios diluídos ou concentrados depende de mecanismos eficientes de

captação e secreção de íons (Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012; McNamara, Faria, 2012).

Devido à ocupação em diversos ambientes esses invertebrados desenvolveram estratégias osmorregulatórias que são classificadas com relação à capacidade de sobrevivência em diferentes salinidades e quanto à regulação de seus fluidos corporais (Péqueux, 1995). Com relação à salinidade, os crustáceos podem ser classificados como estenoalinos ou eurialinos (Randall, Burggren, French, 2000; Péqueux, 1995). Os estenoalinos não são capazes de tolerar grandes variações na salinidade, em contraste com os eurialinos conseguem tolerar grandes variações na salinidade do meio externo (Péqueux, 1995). Com relação ao controle dos fluidos corporais, os crustáceos podem ser divididos em osmoconformadores e osmorreguladores. Nos osmoconformadores, a osmolalidade da hemolinfa é próxima à do meio externo, enquanto nos crustáceos osmorreguladores a osmolalidade da hemolinfa é distinta daquela do meio externo, podendo ser menor (hiporregulação) ou maior (hiperregulação). Os hiperreguladores podem ser classificados em fracos, que não conseguem sobreviver em água doce, e em fortes, capazes de manter a osmolalidade da hemolinfa até mesmo no ambiente dulcícola (Péqueux, 1995; Lucu *et al.*, 2000). Em geral, a maioria dos crustáceos que vivem na água do mar são osmoconformadores e estenoalinos (Onken, McNamara, 2002; Lucu, Towle, 2003; Henry *et al.*, 2012).

O epitélio branquial é o órgão mais operante na osmorregulação dos crustáceos (Péqueux, 1995) e está envolvido nas trocas gasosas (Péqueux, 1995), na regulação do equilíbrio ácido-base (Henry, Wheatly, 1992) e na excreção de compostos nitrogenados (Péqueux, 1995; Weihrauch, Morris, Towle, 2004). Mecanismos coordenados no transporte de íons através das brânquias mantêm equilíbrios iônicos e osmóticos da hemolinfa, além de compensar as perdas difusivas de íons (Péqueux, 1995; Lucu, Towle, 2003). Ademais, esse órgão é um dos principais locais de absorção de metais tóxicos uma vez que representa uma interface seletiva entre o ambiente externo e o interno, levando à distribuição nos órgãos internos do caranguejo (Martins *et al.*, 2011; Kumar, Padhi, Satpathy, 2019). Portanto, o tecido branquial desempenha um papel importante na toxicologia desses invertebrados (Henry *et al.*, 2012).

As brânquias (Figura 6) encontradas em ambos os lados do cefalotórax dos caranguejos normalmente contêm tipos de células que refletem sua capacidade de transporte, variando amplamente em sua morfologia (Taylor, Taylor, 1992; Towle *et al.*, 2001). Elas são revestidas por epitélios contendo células osmorregulatórias ou ionócitos, incluindo microvilosidades apicais, mitocôndrias e dobramentos basolaterais (Lignot *et al.*, 1999). Existem dois tipos

funcionais de epitélio nas brânquias: o respiratório que é caracterizado por células finas (1–2 µm de espessura) e o epitélio de transporte de íons que é caracterizado por células espessas que variam entre 10 e 20 µm de espessura (Taylor e Taylor, 1992; Freire *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012). As características das células epiteliais incluem uma superfície de membrana muito elaborada particularmente na região basolateral voltada para o fluido corporal (Towle *et al.*, 2001). Esses dois tipos de células em geral possuem uma distribuição heterogênea entre as brânquias, com as células espessas transportadoras de íons mais concentradas nos três pares posteriores (Henry *et al.*, 2012).

**Figura 6 - Brânquias de *Callinectes danae***



*Callinectes danae* sem a carapaça, antes da retirada do tecido branquial. Foto: M.I.C. Costa.

As brânquias posteriores de caranguejos osmorreguladores apresentaram maior atividade ATPase  $\approx 75\%$ , sendo específicas para o transporte iônico (Neufeld, Holliday, Pritchard, 1980; Holliday, 1985; Siebers *et al.*, 1982; Wanson, Péqueux, Roer, 1984; Harris, Santos, 1993). Em parte, isso pode ser justificado devido à maior abundância de mRNA da subunidade  $\alpha$  em seus extratos totais de RNA (Towle *et al.* 2001; Weihrauch, Morris, Towle, 2004).

A capacidade osmorregulatória dos crustáceos depende principalmente do fluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  entre o meio externo e a hemolinfa (Péqueux, 1995; Kirschner, 2004). Acredita-se que a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , presente na membrana basolateral do epitélio branquial dos crustáceos, atua transportando ativamente íons sódio e potássio entre o meio extracelular e a hemolinfa, representando a principal força motriz para o estabelecimento de um gradiente eletroquímico, que energiza uma variedade de outros transportadores, tais como: trocador  $\text{Na}^+, \text{K}^+/2\text{Cl}^-$  apical, canais de cloreto basolaterais, canais de  $\text{K}^+$  apicais e basolaterais,  $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$  apical, trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  apical (Kirschner, 2004; Freire *et al.*, 2008; Sáez, Lozano, Zaldívar-Riverón, 2009).

A grande maioria dos crustáceos são amoniotélicos, isto é, excretam a amônia na forma de  $\text{NH}_4^+$  através das brânquias (Weihrauch *et al.*, 1998; 1999) e o processo de excreção mais aceito envolve a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (Weihrauch, Morris, Towle, 2004; Freire *et al.*, 2008). Independente de ocuparem o ambiente marinho ou de água doce, os principais compostos nitrogenados excretados pelos crustáceos estão na forma  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  (Weihrauch *et al.*, 1998).

Existem vários estudos sobre o papel da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  no transporte de  $\text{NH}_4^+$  (Masui *et al.*, 2002; Lucu, Towle, 2003; Weihrauch, Morris, Towle, 2004) mostrando que o  $\text{NH}_4^+$  pode substituir o  $\text{K}^+$  durante o ciclo catalítico de hidrólise do ATP (Masui *et al.*, 2002). Além disso, a estimulação sinérgica por  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  durante a hidrólise do ATP pela  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , em uma variedade de crustáceos, sugere um papel fisiológico significativo na excreção de nitrogênio ativo pelo epitélio branquial (Masui *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2006; Garçon *et al.*, 2007). A capacidade de um organismo excretar amônia contra o gradiente de concentração, provavelmente, está relacionada com a permeabilidade do epitélio branquial. Este fator está diretamente relacionado com a habilidade osmorregulatória do animal, quanto maior for a permeabilidade do epitélio branquial, mais eficiente o mecanismo de excreção (Weihrauch *et al.*, 1999).

#### **1.4. O siri *Callinectes danae***

Dentre as espécies bentônicas que vivem em ambientes estuarinos, os crustáceos são os mais utilizados nos estudos (Santos, Coelho, 2000). Os crustáceos formam um grupo de sucesso evolutivo, tanto pela quantidade de espécies existentes, como pela diversidade dos ambientes que eles ocupam (Fransozo, Negreiros-Fransozo, 1996). Estes invertebrados podem

apresentar uma série de adaptações que lhes permitem viver em diferentes habitats (Péqueux, 1995).

A fauna Portunidae das Américas é diversificada, com 15 espécies pertencentes ao gênero *Callinectes*, sendo três mais abundantes no Atlântico Ocidental: *C. danae* Smith, 1869, *C. sapidus*, Rathbun, 1986, e *C. ornatus* Ordway, 1863 (Melo, 1996). A distribuição desta família está relacionada a fatores físicos, químicos e climáticos onde a temperatura e a salinidade representam fatores mais importantes (Costa, 1995; Guerin, Stickle, 1997; Chacur, 1998).

*Callinectes danae* Smith, 1869 (Figura 7) é um portunídeo eurialino, distribuído no Atlântico Ocidental da Flórida ao sul do Brasil (Melo, 1996), podendo ser encontrado em estuários, ambientes de água salobra, com registros de até 75 m de profundidade (Costa, Negreiros-Fransozo 1998; Masui *et al.*, 2002). Esta espécie representa um recurso pesqueiro em muitas regiões do Brasil, seja pela pesca artesanal ou associada à pesca de camarão (Barreto *et al.*, 2006; Sforza *et al.*, 2010).

**Figura 7 - *Callinectes danae* Smith, 1869**



Vista dorsal de um macho adulto. Foto: M.I.C. Costa.

O siri-azul tem predileção por baixa salinidade e por sedimentos arenosos finos. Os Portunídeos, de modo geral, apresentam o hábito de se enterrarem no sedimento para proteção

contra predadores e para facilitar a captura de presas ágeis (Schöne, 1961). Apesar dos caranguejos serem considerados predadores vigorosos que consomem principalmente bivalves e gastrópodes, eles também consomem matéria orgânica em decomposição (Warner, 1977) podendo extrai-la do sedimento (Chacur *et al.*, 2000), além disso, utilizam o sedimento como auxiliador na digestão (Mantelatto, Christofolletti, 2001). Na baía de Ubatuba, o *C. danae* é frequentemente encontrado na água do mar afetada pelo escoamento de água doce e está exposto a salinidades moderadas (25-33‰ S) ao longo de todo o ano (Mantelatto, Fransozo, 1999).

Estudos da morfologia das brânquias de *C. danae* (Figura 8) demonstraram a presença de oito pares de brânquias dispostas lateralmente, apresentando grande semelhança com as estruturas já descritas para espécies de crustáceos relacionadas (Onken, Riestenpatt, 1998; Masui *et al.*, 2009). 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, que circula através de uma câmara formada por células epiteliais uniestratificadas que, dependendo da espécie, apresenta um septo intralamelar completo ou parcial (Towle, Kays, 1986; Taylor, Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken, Riestenpatt, 1998). Nas membranas apicais, as células do tecido epitelial branquial apresentam um grande número invaginações, que aumentam a superfície de contato com o meio ambiente. Já a superfície basolateral dessas células, onde está localizada a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) -ATPase, é banhada pela hemolinfa e apresenta um grande número de invaginações associadas a mitocôndrias (Gilles, Péqueux, 1985; Towle, Kays, 1986; Taylor, Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken, Riestenpatt, 1998). Estas invaginações da membrana associadas a mitocôndrias, denominadas "bombas mitocondriais", são características de epitélios transportadores de íons (Péqueux, 1995; Onken, Riestenpatt, 1998).

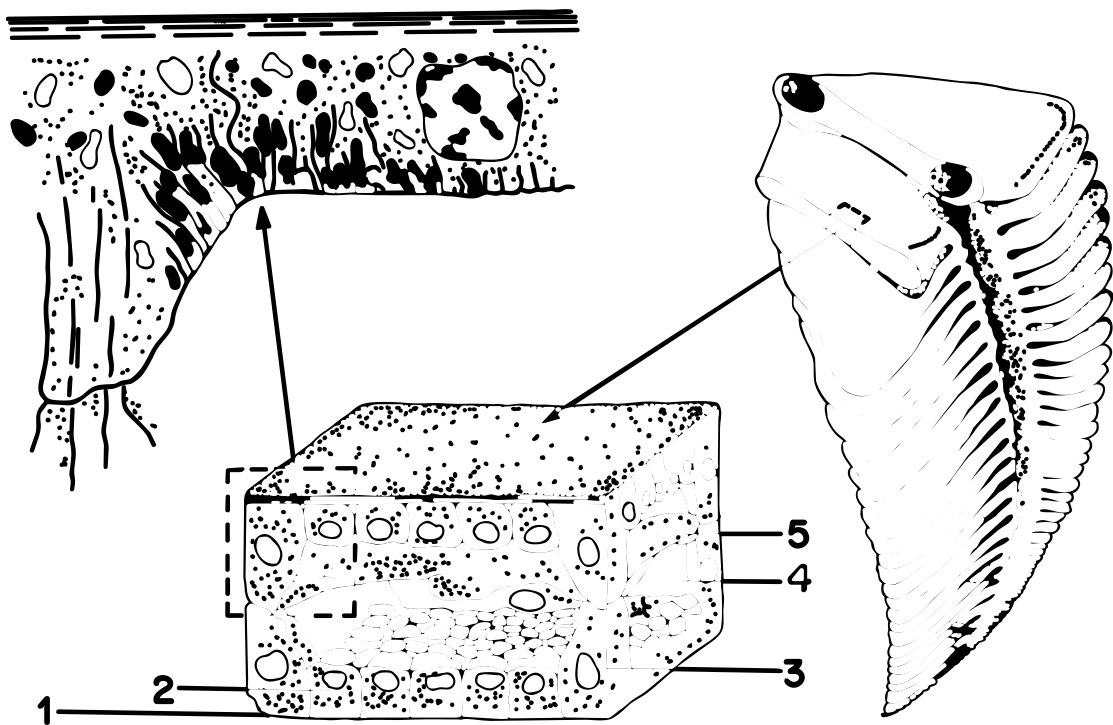
O epitélio branquial de espécies *Callinectes* consiste em uma única camada de células que revestem a cutícula em ambos os lados das lâmelas branquiais, com células pilares formando conexões através do espaço da hemolinfa (Towle, Kays, 1986). As células epiteliais delgadas, que atuam nas trocas gasosas, predominam nas brânquias anteriores, enquanto as células espessas ou ionócitos, cuja superfície da membrana é altamente amplificada por invaginações basolaterais profundas, na qual ocorre o transporte de íons, predomina nas brânquias posteriores (Towle, Kays, 1986; Péqueux, 1995).

Devido às mudanças na salinidade que o *C. danae* fica exposto ao longo de todo o ano, mecanismos eficientes de hiperosmorregulação são necessários para a sua sobrevivência (Mantelatto, Fransozo, 1999; Masui *et al.*, 2009). Foi demonstrado que o *C. danae* possui



capacidade hiporregulatória moderada em meios diluídos e baixa capacidade hiporregulatória em meios concentrados, sendo essa capacidade osmorregulatória um processo fisiológico sustentado pela cinética da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase e pela expressão do mRNA (Garçom *et al.*, 2021).

**Figura 8 - Representação esquemática da morfologia das brânquias dos caranguejos**



1. Cutícula; 2. Célula principal; 3. Célula pilastra; 4. Espaço da hemolinfa. 5. Septo intralamelar. A figura é baseada em estudos de microscopia em *Uca sp.* Fonte: Onken, Riestenpatt (1998).

*Callinectes danae* é uma das várias espécies de caranguejos recomendadas como biomonitor ambiental, capaz de fornecer respostas biológicas em áreas contaminadas (Bordon *et al.* 2012, 2015). A sobrevivência desses invertebrados depende da qualidade ambiental do estuário, sendo assim, as concentrações de metais nos tecidos dos siris-azuis devem ser monitoradas, já que esta espécie é um recurso pesqueiro importante nas comunidades locais (Severino-Rodrigues *et al.* 2001).

### 1.5. Efeito da poluição por metais pesados

Os ambientes estuarinos e costeiros são acumuladores de produtos tóxicos provenientes de fenômenos naturais e de atividades antrópicas (Henry *et al.*, 2012). Como consequência, os organismos são frequentemente expostos a vários poluentes, incluindo uma grande variedade de íons metálicos, compostos orgânicos e nanopartículas (Sharma *et al.*, 2014; Pathania *et al.*, 2016; Caparelli *et al.*, 2019). Especificamente, os metais de transição se destacam como os poluentes mais abundantes encontrados em ambientes aquáticos, uma vez que muitos deles podem formar compostos com diferentes estados de valência, o que contribui para o potencial de toxicidade (Appenroth, 2010). Embora possam atuar como transportadores de elétrons ou formar complexos participando como cofatores em inúmeras reações enzimáticas (Duffus, 2002), a contaminação por metais tornou-se motivo de grande preocupação devido à toxicidade inerente aos organismos vivos, potenciais efeitos ecológicos, persistência, não degradabilidade, bioacumulação e segurança alimentar pública (Suami *et al.*, 2019).

“Metais pesados” é definido como um termo coletivo que faz referência a qualquer elemento metálico com alta densidade ( $>5\text{g/cm}^3$ ), sendo considerado tóxico mesmo em baixas concentrações (Duffus, 2002). Entretanto, o termo não pode estar limitado apenas às propriedades físicas do elemento, mas também deve-se levar em consideração suas propriedades químicas (Duruibe, Ogwuegbu, Egwurugwu, 2007). As interações biológicas dos metais são baseadas na ampla gama de potenciais redox (Henry *et al.*, 2012), eles podem ser bioacumulados pelos organismos marinhos e até biomagnificados através da cadeia alimentar, resultando em altas concentrações nos organismos predadores (Suami *et al.*, 2019). Um dos maiores problemas enfrentados no momento é a compreensão e previsão das interações desses poluentes e, os estresses naturais que podem causar aos animais (Nimmo, Bahner, 1974).

Alguns metais têm grande importância biológica e são fundamentais para manter várias funções importantes nos organismos vivos quando em concentrações fisiológicas necessárias, entretanto, podem se tornar um risco à saúde ao exceder determinado limite (Jaishankar *et al.*, 2014). Para cada espécie, os metais essenciais possuem uma faixa de concentração considerada ótima para o funcionamento metabólico normal do organismo que geralmente é determinada pelas concentrações naturais biodisponíveis do metal no habitat e pela capacidade homeostática do animal (Van Assche, Van Tilborg, Waeterschoot, 1997). Apesar disso, essa capacidade homeostática é limitada, de tal modo que se a concentração externa de um metal essencial ser muito elevada ou muito baixa a regulação falhará, ocasionando em toxicidade ou deficiência, respectivamente (Janssen, Muysen, 2001).

Alguns elementos metálicos não são regulados por crustáceos decápodes, e possuem alto potencial bioacumulativo e biomagnificativo (Rainbow, 1985; 1995). Em contraste, alguns íons, como os  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , estão sujeitos à regulação metabólica nos tecidos desses crustáceos (Rainbow, White, 1989; Rainbow, 2002). A absorção dos metais pelos invertebrados é considerada um processo passivo, não requerendo gasto de energia (Combs, George, 1978; Mason, Jenkins, Sullivan, 1988), e ocorre mediante o consumo de alimentos, pelo ar, sedimentos e água, podendo bioacumular com o tempo (Mason, Jenkins, Sullivan, 1988). A concentração corporal ( $\mu\text{g/g}$ ) de metal em invertebrados marinhos, que depende da estratégia de regulação e é única em cada espécie (Rainbow, 2002), é resultado da diferença líquida nas quantidades absolutas ( $\mu\text{g}$ ) de metal absorvido e perdido pelo corpo, conforme este for diluído pelo tecido corporal presente. Qualquer alteração na absorção, perda de metal, ou no peso corporal, conseqüentemente, poderá alterar a concentração do metal no organismo (Rainbow, White, 1989; Rainbow, 2002).

Propriedades físico-químicas como a salinidade, dureza, pH, temperatura, equilíbrio termodinâmico e a cinética de complexação, afetam a biodisponibilidade do metal (Tchounwou *et al.*, 2012; Magalhães *et al.*, 2015; Atli, 2019). A biodisponibilidade é um conceito bastante abrangente e complexo de definir, podendo incluir a disponibilidade físico-química no meio de exposição, a demanda real no habitat e o comportamento toxicológico no organismo (Reuther, 1999). Um significado mais restrito é descrito por Morton, Hayes, Semrau (2000), que associa a quantidade de metal que pode ser absorvida por microorganismos a uma resposta fisiológica observável. Contudo, a biodisponibilidade deve ser considerada como um processo dinâmico que consiste em uma dessorção direcionada físicoquimicamente e um processo de absorção impulsionado fisiologicamente (Peijnenburg *et al.*, 2002).

Os íons metálicos são absorvidos pelas cutículas branquiais, transportados para a hemolinfa, chegando aos órgãos (Péqueux, 1995; Caparelli *et al.*, 2019). Uma vez dentro da célula, além de inibir enzimas, podem alterar a função mitocondrial e retardar a mitose (Figerman *et al.*, 1996). Acredita-se que esses poluentes inibem enzimas de membrana, como ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase (Figerman *et al.*, 1996) através da ligação a grupos sulfidríla (Colovic *et al.*, 2018). Em vertebrados, os metais pesados podem prejudicar o funcionamento do cérebro, pulmões, rins, fígado, composição do sangue, e sua exposição a longo prazo está relacionado à progressão gradual de processos degenerativos físicos, musculares e neurológicos, causando doenças como esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e distrofia muscular (Jaishankar *et al.*, 2014). Alguns estudos revelaram que a exposição ao cádmio,

mercúrio e chumbo provocam doenças neurodegenerativas e, através da utilização de espécies transgênicas de peixes obtiveram-se resultados promissores para a compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade de tais metais (Green, Planchard, 2018).

O cobalto está presente nas funções vitais como componente da molécula de vitamina B<sub>12</sub> (Figura 9) (cobalamina), fundamental em diversos processos biológicos, principalmente na transferência de grupos metil para o DNA (Caçador *et al.*, 2012; Nasri, Heydarnejad, Nematollahi, 2019; Zoroddua *et al.*, 2019). Entre os problemas relacionados a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> estão a anemia perniciosa, patologias neurológicas e hematológicas (Yamada, 2013; Zoroddua *et al.*, 2019), isso ocorre devido a inativação das enzimas metionina sintase e metilmalonil-CoA mutase, que são dependentes desta vitamina (Zoroddua *et al.*, 2019).

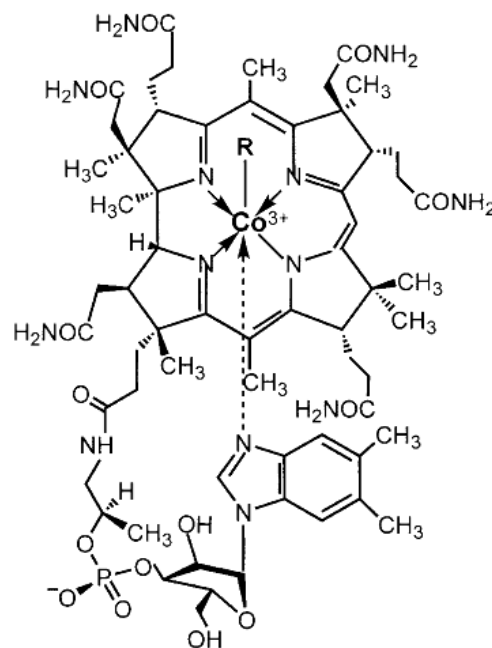
As principais fontes antropogênicas de cobalto no meio ambiente são provenientes de processos de mineração, fundição, queima de combustíveis fósseis e uso de fertilizantes fosfatados (Rai, Ullah, Haider, 2015). A exposição excessiva ao cobalto resulta em um conjunto complexo de déficits de saúde clínica produzindo lesões genotóxicas (Kasten, Hartwig, Beyersmann, 1992; Kasprzak *et al.* 1994; Lison *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2001; Magaye *et al.*, 2012; Garoui *et al.*, 2013; Karthikeyan *et al.*, 2019). Os malefícios causados por estes íons estão relacionados com sua capacidade de participar de reações do tipo Fenton (Valko *et al.*, 2007), desencadeando a produção de radicais livres, e causando estresse oxidativo (Garoui *et al.*, 2013; Karthikeyan *et al.*, 2019). A produção do estresse oxidativo pode induzir quebras de fitas simples de DNA, formar ligações cruzadas DNA-proteína (Kasten, Hartwig, Beyersmann, 1992; Kasprzak *et al.* 1994; Magaye *et al.*, 2012), modificar cadeias laterais de aminoácidos, oxidar frações sulfidríla (Garoui *et al.*, 2013), bloquear canais de cálcio, bem como provocar danos através da modificação oxidativa de lipídios, de proteínas e de células neurais (Hassoun *et al.*, 2001).

Em humanos, este metal foi relacionado também ao comprometimento de gestação, já que o Co<sup>2+</sup> consegue atravessar a placenta, causando muitos distúrbios em recém-nascidos (Kratchler, Rossipal, Irgolic, 1998). Além disso, acredita-se que o Co<sup>2+</sup> em concentrações excessivas, tenha efeitos neurotóxicos, como indicado em um estudo feito com trabalhadores expostos ao metal, tanto na forma de pó quanto névoa, que relataram déficit de memória entre outros agravantes (Jordan, Whitman, Harbut, 1997; Garoui *et al.*, 2013).

Apesar de pequenas concentrações de cobalto serem uma necessidade para o funcionamento normal do cérebro, este metal pode causar depleção de neurotransmissores (Hasan, Ali, Anwar, 1980) e inibir a transmissão sináptica através do bloqueio pré-sináptico dos canais de cálcio (Gerber, Gahwiler, 1991; Czarnota, Whitman, Berman, 1998). A

neurotoxicidade está relacionada com o dano oxidativo que o metal pode causar, que afeta a estrutura e maturação do cérebro (Garoui *et al.*, 2013). A inibição nas atividades da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  e  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  foi relatada após tratamento com  $\text{Co}^{2+}$ , esta redução da  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  pode causar diminuição na produção de ATP que por sua vez, altera a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , produzindo disfunção neuronal (Mohiyuddin *et al.*, 2010).

**Figura 9 - Vitamina B<sub>12</sub>**



Estrutura da cobalamina. Fonte: Bannerjee, Ragsdale (2003).

Os íons de cobalto atuam bloqueando o transporte ativo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas brânquias em peixes de água doce e interferem nas vias metabólicas de algas de água doce (Niyogi, Wood, 2003). As escassas informações sobre os riscos potenciais do  $\text{Co}^{2+}$  para o ambiente aquático, e informações insuficientes sobre o mecanismo de toxicidade tem prejudicado o conhecimento dos possíveis riscos ambientais que este íon pode causar, especialmente em organismos marinhos (Richards, 1988; Nasri, Heydarnejad, Nematollahi, 2019).

Para monitorar a poluição por metais tem sido utilizadas determinadas espécies que são conhecidas como bioindicadores, já que os poluentes químicos ao entrar no organismo deixam marcas que refletem essa exposição (Rainbow, 2002; Bordon *et al.* 2012, 2015; Magalhães *et al.*, 2015). O biomonitoramento pode oferecer informações sobre as concentrações das substâncias químicas naturais e antrópicas que entraram e permaneceram nos organismos, bem como os efeitos induzidos, refletindo o grau de contaminação no ambiente (Bordon *et al.*,

2015). Além disso, o uso de bioindicadores pode fornecer uma resposta identificável à baixa concentração do metal em curto tempo de exposição, por exemplo, a inativação ou ativação de proteínas e a indução de estresse oxidativo com subsequente dano celular. Entre os principais grupos de organismos utilizados como bioindicadores estão: microrganismos (bactérias, microalgas, leveduras), zooplâncton, macroinvertebrados bentônicos (insetos, crustáceos, moluscos) e peixes, representando diferentes níveis tróficos e funções do ecossistema (Magalhães *et al.*, 2015).

O estresse osmótico causado por metais pesados está envolvido na interrupção do equilíbrio iônico em organismos aquáticos, incluindo peixes, crustáceos, mexilhões e anfípodas de água doce (Kim *et al.*, 2016). Um obstáculo na avaliação dos efeitos destes poluentes é a capacidade de medir com precisão o estresse em peixes e outros animais aquáticos (Rainbow, 2002). Considera-se que o comprometimento da capacidade osmorregulatória está relacionado com a inibição da atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase e da anidrase carbônica no sistema de transporte de sal (Péqueux, 1995; McGeer, Wood, 1998). Considerando-se que a bomba sódio desempenha um papel fundamental na osmorregulação através da membrana celular epitelial tem sido sugerido que a atividade da enzima pode ser usada como um biomarcador de estresse osmótico (Kim *et al.*, 2016) uma vez que ela é vulnerável a esses poluentes (Canli, Stagg, 1996; Capparelli, McNamara, Grosell, 2020).

Os metais podem se combinar com enzimas de várias maneiras, principalmente, por ligação covalente a grupos sulfidrilas inibindo inúmeras reações e levando à interrupção de várias funções fisiológicas (Boitel, Truchot, 1989; Ali, Khan, Ilahi, 2019). Os íons metálicos possuem diferentes afinidades para o grupo sulfidrilas e as constantes de estabilidade para a coordenação segue a série Irving-Williams (Cu<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> = Zn<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Fe<sup>2+</sup> > Mn<sup>2+</sup>) que está relacionada com a dureza do cátion. Quando a concentração livre dos metais aumenta essas reações de substituição se tornam significativas, podendo ocorrer inibição da atividade enzimática ou desestabilização de componentes estruturais de moléculas celulares (George, 1988), assim, o Cu<sup>2+</sup> poderá deslocar o Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, etc. Consequentemente, a exposição aos cátions metálicos pode causar alterações conformacionais nas enzimas, na resposta a cofatores, temperatura, pH e na constante de Michaelis-Menten (Jackim, 1974).

O modelo do ligante biótico (MLB), proposto na década de 70, tem o objetivo de avaliar quantitativamente como a química da água, incluindo a salinidade, afeta a especiação e a viabilidade biológica dos metais em sistemas aquáticos e, portanto, prevê a toxicidade de metais nos organismos e ambientes aquáticos (DiToro *et al.*, 2001; Santore *et al.*, 2001; Monserrat *et al.*, 2007). Este modelo fundamenta-se no equilíbrio químico que considera dois

processos principais: a troca cinética na superfície celular das espécies com os metais livres e a internalização (Wang, 2013). O modelo considera que a toxicidade por metal ocorre como resultado da reação de íons metálicos com locais de ligação na interface organismo-água, representados como um complexo ligante biótico do metal (metal-LB). A concentração deste complexo de metal-LB determina a magnitude do efeito tóxico, independentemente das características físico-químicas do meio (De Schamphelaere, Janssen, 2002). O modelo MLB assume que o íon do metal livre é a principal espécie de metal que causa efeitos adversos, e leva em consideração que outros cátions competem com o íon para se ligarem aos locais LB, podendo afetar a toxicidade do metal (Ardestani, Van Straalen, Van Gestel, 2015).

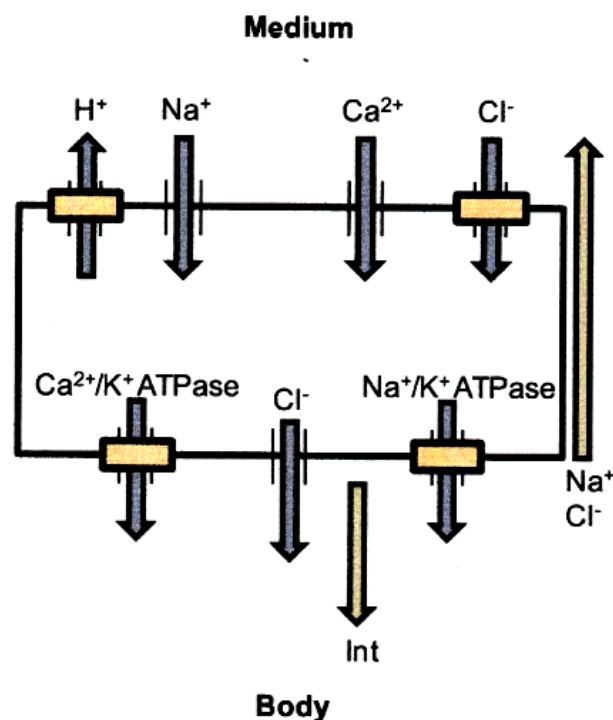
De acordo com o modelo MLB os metais podem ser divididos em monovalentes, divalentes e outros. Apesar do modelo do ligante biótico ter sido desenvolvido preferencialmente para os metais  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^+$  ele também pode ser aplicado para avaliar a toxicidade fisiológica de outros metais (Paquin *et al.*, 2002). O modelo prevê a toxicidade crônica para vários íons incluindo  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Adams *et al.*, 2020). Os metais monovalentes,  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^+$ , interrompem a captação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  diretamente no sítio de transporte e inibem a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ . Já os metais divalentes,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , afetam o transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  localizado na membrana apical, afetando o transporte de cálcio e, conseqüentemente, o seu metabolismo. O terceiro grupo é representado por metais que conseguem atravessar as brânquias, atuando em outros tecidos (Playle, Dixon, Burnison, 1993; Paquin *et al.*, 2002; Ardestani, Van Straalen, Van Gestel, 2015). Esses mecanismos de transporte através das membranas ou interações nos locais LB dos organismos podem estar relacionados ao raio iônico, carga nuclear efetiva, solubilidade e número de oxidação do elemento (Ardestani, Van Straalen, Van Gestel, 2015).

A Figura 10 mostra esquematicamente um modelo de sítios de captura de um ligante biótico em um organismo de água doce (Paquin *et al.*, 2002; Niyogi, Wood, 2003). Não existem relatos de um modelo para organismos marinhos. Os metais essenciais presentes no meio externo entram na célula por meio de canais e transportadores existentes na membrana apical, e, através da hemolinfa, se difundem para outras células utilizando canais e transportadores existentes na membrana basolateral (Rainbow, 2002).

Cerca de um terço da população mundial vive em zonas costeiras, causando intensa pressão sobre os ecossistemas (Araújo *et al.*, 2020). Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de desenvolver metodologias baseadas em biomarcadores para avaliar possíveis riscos ecológicos. Devido à complexidade dos padrões toxicocinéticos, o uso de biomarcadores e bioindicadores tem se mostrado como uma

alternativa mais simples e consistente para determinar as condições ambientais podendo ser utilizado como mecanismo de rastreamento de toxicidade e avaliação do impacto toxicológico de metais (Rainbown, 1995; Magalhães *et al.*, 2015; Bordon *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2020). Os biomarcadores fornecem respostas a nível subindividual, podendo variar de efeitos moleculares a alterações comportamentais (Araújo *et al.*, 2020). Na Baía de Ubatuba deságuam quatro pequenos rios (Rio Indaiá, Rio Grande, Rio Lagoa e Rio Acaraú), que contribuem para o aumento de matéria orgânica, efluentes industriais e dejetos de pescas (Mantelatto, Fransozo, 1999). Sendo assim, há uma grande preocupação ecológica e com a saúde pública associada à contaminação por metais.

**Figura 10 - Modelo esquemático dos sítios de captura do ligante biótico na célula epitelial de um organismo habitante de água doce**



Fonte: Paquim *et al.*, 2002; Niyogi, Wood, 2003.

Apesar dos esforços realizados, até o presente momento muito pouco se conhece acerca do efeito tóxico dos metais a nível molecular. Levando em consideração o grande número de estudos envolvendo íons metálicos, e diferentes condições de exposição dos organismos aquáticos, é necessário desenvolver protocolos que permitam a compreensão de como esses poluentes afetam os organismos em seus habitats a fim de prever mudanças que possam corrigir efeitos tóxicos nesses sistemas (Rainbow, 2002; Sathya *et al.*, 2012; Magalhães *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Ali, Khan, Ilahi, 2019).



## 2. CONCLUSÃO

O cobalto estimulou a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima em substituição ao magnésio. Entretanto, na presença de magnésio, o metal inibiu a atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima.

Comparada com o magnésio ( $K_{0,5} = 2,98 \pm 0,59 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a afinidade da enzima pelo cobalto é  $\approx 4,5$  vezes maior ( $K_{0,5} = 0,60 \pm 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Desta forma, o magnésio consegue deslocar o cobalto ligado à enzima até concentrações menores que  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Além disso, o cobalto não interferiu na inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase da enzima pelo sódio ( $IC_{50} \approx 16 \text{ mmol L}^{-1}$ ), bem como não afetou a inibição da atividade K<sup>+</sup>-fosfatase pela ouabaína ( $K_I \approx 2 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos com  $Co^{2+}$  podem permitir estudos futuros com outras ATPases que requerem  $Mg^{2+}$ . Informações sobre os efeitos do  $Co^{2+}$  nas funções fisiológicas, como osmorregulação, ainda é superficial e escasso. A maior parte das informações não permitem uma distinção clara entre efeitos sinérgicos do metal com os mecanismos envolvidos na regulação da osmolaridade sanguínea e celular

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi M, Rainba A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticide and oxidative stress: a review. *Med Sci Monitor* 10:RA141–RA147, 2004.
- Adams W, Blust R, Dwyer R, Mount D, Nordheim E, Rodriguez PH, et al. Comparing impacts of metal contamination on macroinvertebrate and fish assemblages in a northern Japanese river. *Environ. Toxicol. Chem.* 39: 48-59; 2020.
- Albers RW. Biochemical aspects of active transport. *Ann. Rev. Biochem.* 6, 727– 756; 1967.
- Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 1–14; 2019.
- Alves ANL, Rosa HVD. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 39, n. 2, 2003.
- Apell HJ. Finding Na,K-ATPase II - From fluxes to ion movements. *Substantia* 3(1): 19-41, 2019.
- Apell HJ, Hitzler T, Schreiber G. Modulation of the Na,K-ATPase by magnesium ions. *Biochem.* 56, 1005-1016; 2017.
- Aperia A. Homer Smith Award: To Serve and Protect: Classic and Novel Roles for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase. *J Am Soc Nephrol.* 23:1283–1290; 2012.
- Aperia A, Akkuratov EE, Fontana JM, Brismar H. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am. J. Physiol.* 310, C491–C495; 2016.
- Appenroth KJ. What are “heavy metals” in Plant Sciences? *Acta Physiologiae Plantarum.* 32(4), 615–619, 2010.
- Araujo GS, Gusso-Choueri PK, Favaro DIT, Rocha RCC, Saint’Pierre TD, Hauser-Davis R A, et al. Metal-Associated Biomarker Responses in Crabs from a Marine Protected Area in Southeastern Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 78, 463–477; 2020
- Ardestani MM, Van Straalen NM, Van Gestel CAM. Biotic ligand modeling approach: Synthesis of the effect of major cations on the toxicity of metals to soil and aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 34(10), 2194–2204; 2015.
- Atli G. The Effect of Waterborne Mercury and Nickel on the ATPases and AChE Activities in the Brain of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Depending on the Ca<sup>2+</sup> Concentrations. *Turk. J. Fish.& Aquat. Sci.* 19(5), 363-371; 2019.
- Azarias G, Kruusmagi M, Connor S, Akkuratov EE, Liu XL, Lyons D, et al. A Specific and Essential Role for Na,K-ATPase  $\alpha 3$  in Neurons Co-expressing  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$ . *J. Biol. Chem.* 288, 2734–2743; 2013.
- Bader H, Wilkes B, Jean DH. The effect of hydroxylamine, mercaptans, divalent metals and chelators on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) – ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 583-593, 1970.
- Banerjee R, Ragsdale SW. The Many Faces of Vitamin B12: Catalysis by Cobalamin-Dependent Enzymes. *Annual Review of Biochemistry.* 72(1), 209–247, 2003.
- Barnes DB. *Zoologia dos invertebrados.* 4<sup>a</sup> Ed. Editora Roca, São Paulo, 1990.
- Barreto AV, Leite LMAB, Aguiar MCA. Maturidade sexual das fêmeas de *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) nos estuários dos rios Botafogo e Carrapicho, Itamaracá-PE Brasil. *Iheringia. Série Zoologia, Porto Alegre*, 96: 141–146, 2006.
- Beaugé L, Berberian G. The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase and the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> pump. *Biochim. Biophys. Acta* 727: 336-50, 1983.

- Berberián G, Beaugé L. Phosphatase activity and potassium transport in liposomes with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase incorporated. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1103(1), 85–93, 1992.
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KC, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RP. Na, K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol* 152A:431–439, 2009.
- Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin.Nephrol.* 25, 292-303, 2005.
- Blanco G, Sánchez G, Mercer RW. Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 359, 139–150, 1998.
- Boitel F, Truchot J. Effects of sublethal and lethal copper levels on hemolymph acid-base balance and ion concentrations in the shore crab *Carcinus maenas* kept in undiluted sea water. *Mar. Biol.* 103, 495–501, 1989.
- Bonnafous JC, Dornand J, Mani JC. Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate cyclase determination. *Biochimica et Biophysica Acta*, 720, 235-241, 1982.
- Bordon ICAC, Sarkis JES, Tomas ARG, Souza MR, Scalco A, Lima M, et al. A preliminary assessment of metal bioaccumulation in the blue crab, *Callinectes danae* S., from the Sao Vicente Channel, Sao Paulo State, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:577–581, 2012.
- Bordon ICAC, Sarkis JES, Andrade NP, Hortellani MA, Favaro DIT, Kakazu MH, et al. An environmental forensic approach for tropical estuaries based on metal bioaccumulation in tissues of *Callinectes danae*. *Ecotoxicology*, 25(1), 91–104, 2015.
- Bublitz M, Poulsen H, Morth JP, Nissen P. In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Curr OpinStruc Biol* 20:431-439, 2010.
- Butter, E. Chemistry of the elements. *Crystal Research and Technology*, 20(5), 662–662, 1985.
- Buxbaum E, Schoner W. Phosphate binding and ATP-binding sites coexist in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-transporting ATPase, as demonstrated by the inactivating MgPO<sub>4</sub> complex analogue Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>. *European Journal of Biochemistry*, 195(2), 407–419, 1991.
- Caçador I, Costa JL, Duarte B, Silva G, Medeiros JP, Azeda C, et al. Macroinvertebrates and fishes as biomonitors of heavy metal concentration in the Seixal Bay (Tagus estuary): Which species perform better? *Ecological Indicators*, 19, 184–190, 2012.
- Canli M, Stagg RM. The effects of In Vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 494–501, 1996.
- Capendeguy O, Horisberger JD. The role of the third extracellular loop of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase  $\alpha$ -subunit in a luminal gating mechanism. *J. Physiol.* 565, 207-218, 2005.
- Capparelli MV, Bordon IC, Araujo G, Gusso-Choueri PK, De Souza Abessa DM, McNamara JC. Combined effects of temperature and copper on oxygen consumption and antioxidant responses in the mudflat fiddler crab *Minuca rapax* (Brachyura, Ocypodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 223:35-41, 2019.
- Capparelli MV, McNamara JC, Grosell MG. Tissue Accumulation and the Effects of Long-Term Dietary Copper Contamination on Osmoregulation in the Mudflat Fiddler Crab *Minuca rapax* (Crustacea, Ocypodidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 104, 755–762, 2020.
- Chacur MM. Distribuição ecológica do siri azul *Callinectes danae* Smith, 1863 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na enseada de Ubatuba (SP) UNESP, 1998.

- Chacur MM, Mansur CB, Negreiros-Fransozo ML. Distributional patterns, seasonal abundance and moult cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Ubatuba region, Brazil. *Nauplius, Botucatu*, 8 (2): 215-226, 2000.
- Chourasia M, Sastry N. The Nucleotide, Inhibitor, and Cation Binding Sites of P-type II ATPases. *Chem Biol Drug Design* 79:617–627, 2012.
- Clarke RJ. Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases. *Eur. Biophys. J.* 39, 3–17, 2009.
- Clarke RJ, Catauro M, Rasmussen HH, Apell HP. Quantitative calculation of the role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in thermogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827, 1205–1212, 2013.
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol.* 8, 371, 2017.
- Coleman RD, Coleman RL, Rice EL. Zinc and cobalt bioconcentration and toxicity in selected algal species. *Bot Gaz* 132:102–109, 1971.
- Colovic MB, Vasic VM, Djuric DM, Krstic DZ. Sulphur-containing amino acids: protective role against free radicals and heavy metals. *Current medicinal chemistry*, 25(3), 324–335, 2018.
- Combs TL, George SG. Mechanisms of immobilisation and detoxification of metals in marine organisms, in *Proc. 12th Eur. Symp. Marine Biology, Physiology and Behaviour of Marine Organisms*, McLusky, D. S. and Berry, A. J., Eds., Pergamon Press, Oxford, 179, 1978.
- Cornelius F, Mahmmoud YA. Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase: Effects of pH and ouabain induced changes in enzyme conformation. *Biochem* 48:10056-10065, 2009.
- Cornelius F, Tsunekawa N, Toyoshima C. Distinct pH dependencies of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> selectivity at the two faces of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 293, 2195–2205, 2018.
- Cornelius F, Yasser A, Mahmmoud YA, Toyoshima C. Metal fluoride complexes of Na,K-ATPase: characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotonic steroids. *J Biol Chem* 286:29882–29892, 2011.
- Cortes VF, Ribeiro IM, Barrabin H, Alves-Ferreira M, Fontes CFL. Regulatory phosphorylation of FXYD2 by PKC and cross interactions between FXYD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na,K-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 75-82, 2011.
- Costa TM. Ciclo reprodutivo de *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) na região de Ubatuba. 94 pp. UNESP, 1995.
- Costa TM, Negreiros-Fransozo ML. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba Region, Brazil. *Crustaceana* 71: 615-627, 1998.
- Crambert G, Li CM, Swee LK, Geering, K. FXYD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with e regulation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 30888-30895, 2004.
- Cuenda A, Henao F, Gutierrez-Merino C. Distances between functional sites of the Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum using Co<sup>2+</sup> as a spectroscopic ruler. *Eur J Biochem* 194: 663-670, 1990.
- Czarnota M, Whitman D, Berman R. Activity and passive avoidance learning in cobalt-injected rats. *Int J Neurosci* 93:29–33, 1998.
- Dempski RE, Lustig J, Friedrich T, Bamberg E. Structural arrangement and conformational dynamics of the  $\gamma$  subunit of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem* 47:257-266, 2008.
- De Schamphelaere KAC, Janssen CR. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 48-54, 2002.

- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2383-2396.
- Duffus H. "Heavy metals" a meaningless term? *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807, 2002.
- Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Egwurugwu JN. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences.* 2(5): p. 112-118, 2007.
- Esmann M. ATPase and phosphatase activity of Na,K-ATPase: Molar and specific activity, protein determination. *Methods Enzymol.* 156: 105-115, 1988.
- Fabri LM, Lucena MN, Garçon DP, Moraes CM, McNamara JC, Leone FA. Kinetic characterization of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 227, 64–74, 2019.
- Faller LD. Mechanistic studies of sodium pump. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476 (2008) 12–21, 2008.
- Fedosova NU, Cornelius F, Klodos I. E<sub>2</sub>P phosphoforms of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. I: Comparison of phosphointermediates formed from ATP e Pi by their reactivity toward hydroxylamine e vanadate. *Biochem* 37:13634-13642, 1998.
- Ferguson JL, Von Franqué O, Schock, MR. Corrosion of Copper in Potable Water Systems. *Internal Corrosion of Water Distribution Systems. AwwaRF and DVGW Forschungsstelle, Denver, 1996.*
- Ferrer L, Andrade S, Asteasuain R., Marcovecchio, J. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahia Blanca, Argentina. *Ecotoxicology and Environment Safety*, v. 65, n. 2, p. 209-217, 2006.
- Fingerman M, Devi M, Reddy PS, Katyayani R. Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. *Zool Studies*;35:1–8, 1996.
- Fontes CFL, Barrabin H, Scofano HM, Norby JG. The role of Mg<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in the phosphorylation of NaK-ATPase by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na<sup>+</sup>. *Biochim Biophys Acta* 1104:215–225, 1992.
- Fransozo A, Negreiros-Fransozo ML. Crustacea Decapoda from Brazilian Coastal, 275-287, In: Bicudo, C. E. e Menezes, M. N. A. (eds) *Biodiversity in Brazil: A first approach*, CNPq, São Paulo, 326p, 1996.
- Freire CA, Onken H, McNamara JC. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 151, 272-304, 2008.
- Furriel RPM, McNamara JC, Leone FA. Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp Biochem Physiol* 130A: 665-676, 2001.
- Gache C, Rossi B, Lazdunski M. Mechanistic analysis of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase using new pseudosubstrates. *Biochem.* 16:2957-2965, 1977.
- Gache C, Rossi B, Lazdunski M. (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-Activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes, cooperativity and control. *Eur. J. Biochem.* 65: 293-306, 1976.
- Garçon DP, Leone FA, Faleiros RO, Pinto MR, Moraes CM, Fabri LM, et al. Osmotic and ionic regulation, and kinetic characteristics of a posterior gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae* on acclimation to salinity challenge. *Mar. Biol.* 168, 79, 2021.
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM, Leone FA. K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> modulate gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 145-155, 2007.

- Garoui E, Ben Amara I, Driss D, Elwej A, Chaabouni SE, Boudawara T, Zeghal N. Effects of Cobalt on Membrane ATPases, Oxidant, and Antioxidant Values in the Cerebrum and Cerebellum of Suckling Rats. *Biol Trace Elem Res.* 154:387–395, 2013.
- Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:526–532, 2008.
- Gatto C, Arnett KL, Milanick MA. Divalent Cation Interactions with Na,K-ATPase Cytoplasmic Cation Sites: Implications for the para-Nitrophenyl Phosphatase Reaction Mechanism. *Journal of Membrane Biology*, 216(1), 49–59, 2007.
- Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.* 290, F241–F250, 2006.
- Geering K. Topogenic motifs in P-type ATPases. *J. Membr. Biol.* 174, 181-190, 2000.
- George SG. Biochemical and Cytological Assessments of Metal Toxicity in Marine Animals. In: Furness, R. W.; Rainbow, P.S. (Org.). *Heavy Metals in the Marine Environment*. 1 ed. Taylor & Francis Group, New York, p123, 1988.
- Gerber U, Gahwiler BH. Cobalt blocks postsynaptic responses induced by neurotransmitters in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett* 134:53–56, 1991.
- Gilles R, Péqueux A. Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches. In: R. Gilles, & M. Gilles-Baillien(Org.). *Transport processes, iono- and osmoregulation: Current comparative approaches.* (pp136-158). Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 1985.
- Glynn IM. The (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-transporting adenosine triphosphatase. In: A. N. Martonosi (Org.). *The enzymes of biological membranes*. V. 3 (pp. 35-114). Plenum Press, New York, 1985.
- Gomes EG, Freitas LS, Maciel FE, Jorge MB, Martins CMG. Combined effects of waterborne copper exposure and salinity on enzymes related to osmoregulation and ammonia excretion by blue crab *Callinectes sapidus*. *Ecotoxicology*, 2019.
- Gonçalves RR, Masui DC, McNamara JC, Mantelatto FLM, Garçon DP, Furriel RPM, Leone, FA. A kinetic study of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145A, 346-356, 2006.
- Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Protein Phosphorylation Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, and Protein Phosphatases*, 477–482, 1991.
- Gostimskaya IS, Grivennikova VG, Zharova TV, Bakeeva LE, Vinogradova AD. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Analytical Biochemistry*. 313, 46–52, 2003.
- Gramigni E, Tadini-Buoninsegni F, Bartolommei G, Santini G, Chelazzi G, Moncelli, MR. Inhibitory Effect of Pb<sup>2+</sup> on the Transport Cycle of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Chemical Research in Toxicology*, 22(10), 2009.
- Green AJ, Planchard A. The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. *Comp. Biochem. Physiol.* 208C: 12-19, 2018.
- Grosell M, Nielsen C, Bianchini A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(1-2), 287–303, 2002.
- Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 8), 1179-88, 2002.
- Guerin L, Stickle WB. Effect of salinity on survival and bioenergetics of juvenile lesser blue crabs *Callinectes similis*. *Marine Biol.* 129: 63-69, 1997.

- Hajem S, Hannaert P, Moreau T, Lellouch J, Huel G, Orssaud G, Girard F, Sahuquillo J, Claude JR, Garay RP. Cadmium and Membrane Ion Transport in a French Urban Male Population. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47:850-857, 1991.
- Handy RD, Eddy FB, Baines H. Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochim Biophys Acta* 1566:104–115, 2002.
- Harris RR, Santos MCF. Sodium uptake and transport (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)ATPase changes following Na<sup>+</sup> depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). *Comp Biochem Physiol* 105A:35–42, 1993.
- Has C, Pan S. Vesicle formation mechanisms: an overview. *Journal of Liposome Research*, 31(1), 90–111, 2020.
- Hasan M, Ali S, Anwar J. Cobalt-induced depletion of dopamine, norepinephrine & 5-hydroxytryptamine concentration in different regions of the rat brain. *Indian J Exp Biol.* 18(9):1051–1053, 1980.
- Hassoun EA, Li F, Abushaban A, Stohs SJ. Production of superoxide anion, lipid peroxidation and DNA damage in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure to mixture of TCDD and its congeners. *J Appl Toxicol* 21:211–219, 2001.
- Henry RP, Lucu C, Onken, H, Weihrauch D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physiol.* 3, 1-33, 2012.
- Henry RP, Wheatly MG. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32: 407-416, 1992.
- Holliday CW. Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase activity in the mud fiddler crab *Uca pugnax*. *J Exp Zool* 233:199-208, 1985.
- Howe PL, Reichelt-Brushett AJ, Clark MW. Investigating lethal and sublethal effects of the trace metals cadmium, cobalt, lead, nickel and zinc on the anemone *Aiptasia pulchella*, a cnidarian representative for ecotoxicology in tropical marine environments. *Marine and Freshwater Research*, 65(6), 551, 2014.
- Horisberger JD. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiol.* 19, 377-388, 2004.
- Jackim E. Enzyme responses to metals in fish: Environmental Protection Agency National Marine Water Quality Laboratory Narragansett, Rhode Island 02882. In: Vernberg, FJ.; Vernberg WB. (Org.). Academic Press, New York. p58, 1974.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72, 2014.
- Janssen C, Muyssen B. Essentiality of metals: Consequences for environmental risk assessments. *Fact Sheet on Environmental Risk Assessment*, No. 5, Sept. 2001. ICME, Ottawa, Ontario, 2001.
- Jimenez T, Sanchez G, Wertheimer E, Blanco G. Activity of the Na,K-ATPase  $\alpha$ 4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. *Reproduction* 139, 835-845, 2010.
- Jordan CM, Whitman RD, Harbut M. Memory deficits and industrial toxicant exposure: a comparative study of hard metal, solvent and asbestos workers. *Int J Neurosci.* 90:113–128, 1997
- Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJD. Structure and mechanism of functional sites and their interactions. *Ann. Review Physiol.* 65, 817-849, 2003.
- Jorgensen PL, Pedersen PA. Structure-function relationships of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, or Mg<sup>2+</sup> binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1505: 57-74, 2001.

- Kanai R, Ogawa H, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of a Na<sup>+</sup>-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase preceding the E1 state. *Nature* 502:201-207, 2013.
- Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Ann Rev Biochem* 71:511-35, 2002.
- Karthikeyan P, Marigoudar SR, Nagarjuna A, Sharma KV. "Toxicity Assessment of Cobalt and Selenium on Marine Diatoms and Copepods." *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, vol. 1, Elsevier B.V, pp. 36–42, 2019.
- Kasprzak KS, Zastawny TH, North SL, Riggs CW, Diwan BA, Rice JM, et al. Oxidative DNA base damage in renal, hepatic, and pulmonary chromatin of rats after intraperitoneal injection of cobalt(II) acetate. *Chem Res Toxicol* 7:329-335, 1994.
- Kasten U, Hartwig A, Beyersmann D. Mechanisms of cobalt(II) uptake into V79 Chinese hamster cells. *Arch Toxicol*. 66: 592- 597, 1992.
- Khalid M, Suliman R, Ahmed R, Salin H, Clarke RJ. The high and low affinity binding sites of digitalis glycosides to Na,K-ATPase. *Arab. J. Sci. Eng.* 39, 75-85, 2014.
- Kim H, Lim B, Kim B, Kim B, Lee YM. Effects of Heavy Metals on Transcription and Enzyme Activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the Monogonont Rotifer, *Brachionus koreanus*. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 8, 128–134, 2016.
- Kirschner LB. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207, 1439-1452, 2004.
- Kratchler M, Rossipal SLE, Irgolic KJ. Changes in the concentrations of trace elements in human milk during lactation. *J Trace Elem Med Biol.* 12:159–176, 1998.
- Kumar SB, Padhi RK, Satpathy KK. Trace metal distribution in crab organs and human health risk assessment on consumption of crabs collected from coastal water of South East coast of India. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 273–282, 2019.
- Lee CE, Kiergaard M, Gelembiuk GW, Eads BD, Posavi M. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65, 2229-2244, 2011.
- Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RPM, Borin IA. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 33, 399–403, 2005.
- Li Z, Langhans SA. Transcriptional regulators of Na, K-ATPase subunits. *Front. Cell Develop. Biol.*, 3, 66, 2015.
- Lignot J, Charmantier-Daures M, Charmantier G. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase nos órgãos da cavidade branquial da lagosta europeia *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* 296, 417–426, 1999.
- Lison D, De Boeck M, Verougstraete V, Kirsch-Volders M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med.* 58(10):619–62, 2001.
- Lucu C, Devescovi M, Skaramuca B, Kozul V. 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, 2000.
- Lucu C, Towle DW. (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol* 135A:195-214, 2003.
- Magalhães DP, Marques MRD, Baptista DF, Buss DF. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environmental Chemistry Letters*, 13(1), 69–87, 2015.
- Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). *Experimental and therapeutic medicine.* 4: 551-561, 2012.
- Mantelatto FLM, Christofolletti RA. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex, size and molt stage. *Marine Biology*, 138(3), 585–594, 2001.



- Mantelatto FLM, Fransozo, A. Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Rev. Brazil. Biol.* 59: 23-31, 1999.
- Marks MJ, Seeds NW. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci.* 23, 2735-2744, 1978.
- Martin DW. Structure-Function. Relationships in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -Pump. *Seminars Nephrol.* 198, 282-291, 2005.
- Martins, C.D.M.G., Barcarolli, I.F., de Menezes, E.J., Giacomini, M.M., Wood, C.M., Bianchini, A.. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: in vivo and in vitro studies. *Aquat. Toxicol.* 10 (1), 88–99, 2011.
- Mason AZ, Jenkins KD, Sullivan PA. Mechanisms of trace metal accumulation in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*, *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 68, 61, 1988.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC, Leone FA. Gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K<sup>+</sup>-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comp Biochem Physiol* 134B:631-640, 2003.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC, Leone FA. K<sup>+</sup>-phosphatase activity of gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab, *Callinectes danae*: Low-salinity acclimation and expression of the alpha-subunit. *J Exp Zool* 303A:294-307, 2005.
- Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Leone FA. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 132C, 471-482, 2002.
- Masui DC, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM, Leone FA. (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: Novel perspectives on ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol* 153A:141–148, 2009.
- McGeer JC, Wood CM. Protective effects of water Cl<sup>-</sup> on physiological responses to waterborne silver in rainbow trout. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55 pp: 2447-2454, 1998.
- McNamara JC, Faria SC. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J. Comp. Physiol.* 182: 997- 1014, 2012.
- McNamara JC, Freire CA, Torres AH, Faria SC. The conquest of fresh water by the palaemonid shrimps: an evolutionary history scripted in the osmoregulatory epithelia of the gills and antennal glands. *Biol. J. Linn. Soc.* 114, 673-688, 2015.
- Melo GAS. Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral brasileiro. São Paulo, Ed. Plêiade, FAPESP, 604p, 1996.
- Mendonça NN, Masui DC, McNamara JC, Leone FA, Furriel RPM. Long- term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)- ATPase  $\alpha$ -subunit expression e K<sup>+</sup> -phosphatase activity. *Compd. Biochem. Physiol.* 146A 534–543, 2007.
- Mijatovic T, vanQuaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anticancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776:32-57, 2007.
- Mohiyuddin SS, Reddy SR, Kumar LA, Doss PJ. Acephate induced alterations in Mg<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPases of different brain regions of albino rats. *Biasean* 5:153–156, 2010.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Lund Amado L, Martinez Gaspar Martins C, Lopes Leães Pinho G, et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 221–234, 2007.

- Montes MR, Monti JLE, Rossi RC. E2→E1 transition and Rb<sup>+</sup> release induced by Na<sup>+</sup> in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Vanadate as a tool to investigate the interaction between Rb<sup>+</sup> and E2. *Biochim Biophys Acta* 1818:2087–2093, 2012.
- Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, et al. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. *Nature Mol. Cell Biol.* 60, 60-70, 2011.
- Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sorensen TLM, Petersen J, Eersen JP, Vilsen B, Nissen P. Crystal structure of the sodium–potassium pump. *Nature* 450:1043-1050, 2007.
- Morth JP, Poulsen J, Toustrup-Jensen MS, Schack VR, Egebjerg J, Andersen JP, et al. The structure of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Phil. Trans. Royal Soc. Biol. Sci.* 364, 217-227, 2009.
- Morton JD, Hayes KF, Semrau JD. Bioavailability of chelated and soil-adsorbed copper to *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Environ. Sci. Technol.*, 34(23): 4917-4922, 2000.
- Myers SL, Cornelius F, Apell HJ, Clarke RJ. Kinetics of K<sup>+</sup> occlusion by the phosphoenzyme of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biophys. J.* 100, 70–79, 2011.
- Nasri F, Heydarnejad S, Nematollahi A. Sublethal cobalt toxicity effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Croatian Journal of Fisheries*, 77, 243-252, 2019.
- Nesher M, Spolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The endogenous digitalis-like compounds - A new family of steroid hormones. *Life Sci.* 80, 2093-2107, 2007.
- Neufeld GJ, Holliday CW, Pritchard JB. Salinity adaptation of gill Na,K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215-224, 1980.
- Nimmo DR, Bahner LH. Some physiological consequences of polychlorinated biphenyl- and salinity-stress in penaeid shrimp. In: Vernberg, F.J., Vernberg, W.B. (Eds.), *Pollution and Physiology of Marine Organisms*. Academic Press, New York, pp. 427–443, 1974.
- Niyogi S, Wood CM. Effects of Chronic Waterborne and Dietary Metal Exposures on Gill Metal-Binding: Implications for the Biotic Ligand Model. *Hum. Ecol. Risk Assess* 9: 813-843, 2003.
- Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard I, Andersson M. Crystal structure of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the Na<sup>+</sup>-bound state. *Science* 342:123-127, 2013.
- Ogawa H, Cornelius F, Hirata A, Toyoshima C. Sequential substitution of K(+) bound to Na(+),K(+)-ATPase visualized by X-ray crystallography. *Nature Commun.* 6, 8004, 2015.
- Onken H, McNamara JC. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol* 205:167-175, 2002.
- Onken H, Riestenpatt S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 883–893, 1998.
- Oubaassine R, Weckring M, Kessler L, Breidert M, Roegel JC, Eftekhari P. Insulin interacts directly with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and protects from digoxin toxicity. *Toxicol.* 299, 1–9, 2012.
- Palmgren MG, Nissen P. P-Type ATPases. *Annu. Review Biophys.* 40, 243–266, 2011.
- Pathania D, Sharma G, Naushad M, Priya V. A biopolymer-based hybrid cation exchanger pectin cerium (IV) iodate: synthesis, characterization, and analytical applications. *Desalin. Water Treat.* 57: 468-475, 2016.

- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, et al. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 13C: 3-35, 2002.
- Peijnenburg W, Sneller E, Sijm D, Lijzen J, Traas T, Verbruggen E. Implementation of bioavailability in standard setting and risk assessment? *Journal of Soils and Sediments*, 2(4), 169–173, 2002.
- Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1-60, 1995.
- Phakdeekitcharoen B, Kittikanokrat W, Kijkunasathian C, Chatsudthipong V. Aldosterone increases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in skeletal muscle of patients with Conn's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 74, 152–159, 2011.
- Pirkmajer S, Chibalin AV. (2019). Hormonal regulation of  $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{ATPase}$  from the evolutionary perspective. *Curr. Topics Membr.* 83, 315-351, 2019.
- Playle RC, Dixon DG, Burnison K. Copper and cadmium binding to fish gills: Estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 50: 2678-2687, 1993.
- Poulsen H, Morth P, Egebjerg J, Nissen P. Phosphorylation of the  $\text{Na}^+ ,\text{K}^+ -\text{ATPase}$  and the  $\text{H}^+ ,\text{K}^+ -\text{ATPase}$ . *FEBS Lett.* 584, 2589–2595, 2010.
- Pressley TA, Duran MJ, Pierre SV. Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the  $\text{Na},\text{K}$ -pump. *Front. Biosci.* 10, 2018-2026, 2005.
- Rai AN, Ullah A, Haider J. Determination of Acute Toxicity of Copper and Cobalt for *Tilapia nilotica*, *Journal of Bioresource Management*, 2 (1), 2015.
- Rainbow PS. Accumulation of Zn, Cu, Cd by crabs and barnacles. *Estuarine Coast Shelf Sci* 21:669–686, 1985.
- Rainbow PS. Physiology, physicochemistry and metal uptake a crustacean perspective. *Mar Pollut Bull* 31:55–59, 1995.
- Rainbow PS. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.*, 120(3): 497-507, 2002.
- Rainbow PS, White SL. Comparative accumulation of cobalt by three crustaceans: a decapod, an amphipod and a barnacle. *Aquatic Toxicol.* 16, 113-126, 1990.
- Rainbow PS, White SL. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans : Zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, 174: 245-262, 1989.
- Rajasekaran SA, Palmer LG, Quan K, Harper JF, Ball WJ Jr, Bander NH, et al.  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. *Mol. Biol. Cell* 12, 279–295, 2001.
- Randall D, Burggren W, French K. *Animal Physiology – Mechanisms and adaptations*. 4<sup>th</sup> Ed. WH Freeman, New York, 2000.
- Reuther R. Trace metal speciation in aquatic sediments: methods, benefits and limitations. In: *Manual of Bioassessment of Aquatic Sediment Quality* (chapter 1); Mudroch, A., Azcue, J.M. and Mudroch, P. (Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL., 1-54, 1999.
- Rezende LA, Mantelatto FLM, McNamara JC, Furriel RPM, Leone FA. Characterization of nitrophenylphosphatase activity of the  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)$ -ATPase from gill tissue of the seawater shrimp *Xyphopenaeus kroyeri*. Program and Abstracts pp 131. XXXI Reunião Anual da SBBq. Caxambu, MG. Brasil, 2002.
- Richards DE. Occlusion of cobalt ions within the phosphorylated forms of the  $\text{Na}^+ -\text{K}^+$  pump isolated from dog kidney. *The Journal of Physiology*, 404(1), 497–514, 1988.
- Robinson J.D. Interactions between monovalent cations and the  $(\text{Na},\text{K})$ -dependent adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 17–27, 1970.
- Robinson JD. Substituting manganese for magnesium alters certain reaction properties of the  $(\text{Na},\text{K})$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 642, 405–417, 1981.

- Rossi B, Gache C, Lazdunski M. Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-activated adenosine triphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 85: 561-570, 1978.
- Sáez AG, Lozano E, Zaldívar-Riverón A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica*, 136, 479-490, 2009.
- Saili KS, Cardwell A., Stubblefield WA. Chronic Toxicity of Cobalt to Marine Organisms: Application of a Species Sensitivity Distribution Approach to Develop International Water Quality Standards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(5), 1405–1418, 2021.
- Salyer SA, Parks J, Barati MT, Lederer ED, Clark BJ, Klein JD, Khundmiri SJ. Aldosterone regulates  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochem.Biophys.Acta*, 1833, 2143– 2152, 2013.
- Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE, Meyer JS. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2397-2402, 2001.
- Santos LCF, Belli NM, Augusto A, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM. Gill ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and  $\alpha$ -subunit expression. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A, 178–188, 2007.
- Santos MC, Coelho PA. Crustáceos Decápodos estuarinos do Nordeste do Brasil. In: *Anais do Mangrove 2000, Sustentabilidade de estuários e manguezais: Desafios e perspectivas*, Recife, 2000.
- Sastre MP, Reyes P, Ramos H, Romero R, Rivera J. Heavy metal bioaccumulation in Puerto Rican Blue Crabs (*Callinectes* spp.). *Bull Mar Sci* 64(2):209–217, 1999.
- Sathya V, Ramesh M, Poopal RK, Dinesh B. Acute and sublethal effects in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala* exposed to silver nitrate: Gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, plasma electrolytes and biochemical alterations. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5), 862–868, 2012.
- Scheiner-Bobis G; Fahlbusch K; Schoner W. Demonstration of cooperating alpha subunits in working ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase by the use of the MgATP complex analogue cobalt tetrammine ATP. *European Journal of Biochemistry*, 168(1), 123–131, 1987.
- Schöne H. Complex behavior. In: Waterman TH (ed.) *The Physiology of Crustacea*. Volume II. Academic Press, New York. pp 465–520, 1961.
- Severino-Rodrigues EPJB, Graça-Lopes R. Pesca artesanal de siris (Crustacea, Portunidae) na região estuarina de Santos e São Vicente (SP). *Brasil Bol Inst Pesca* 27(1):7–19, 2001.
- Sforza R, Nalesso RC, Joyeux JC. Distribution and population structure of *Callinectes danae* (Decapoda: Portunidae) in a tropical Brazilian estuary. *J. Crust. Biol.* 30: 597-606, 2010.
- Sharma G, Pathania D, Naushad M, Kothiyal NC. Fabrication, characterization and antimicrobial activity of polyaniline Th(IV) tungstomolybdophosphate nanocomposite material: Efficient removal of toxic metal ions from water. *Chemical Engineering Journal*, 251, 413–421, 2014.
- Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459, 446-450, 2009.
- Siebers D, Leweck K, Markus H, Winkler A. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar Biol* 69:37-43, 1982.
- Silva ECC, Masui DC, Furriel RP, McNamara JC, Barrabin H, Scofano HM, et al. Identification of a crab gill FXYD2 protein and regulation of crab microsomal Na,K-ATPase activity by mammalian FXYD2 peptide. *Biochim.Biophys. Acta* 1818, 2588–2597, 2012.
- Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomemb.* 24: 249-261, 1992.

- Suami RB, Al Salah DMM, Kabala CD, Otamonga JP, Mulaji CK, Mpiana PT, et al. Assessment of metal concentrations in oysters and shrimp from Atlantic Coast of the Democratic Republic of the Congo. In: Heliyon, 2019, vol. 5, n° 12, p. e03049, 2019.
- Taylor HH, Taylor EW. Microscopic anatomy of invertebrates. In: F. W. Harrison, & A. G. Humas (Org.) Decapod Crustacea. Vol. 10, (pp. 203-293). Wiley-Liss, New York, 1992.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133–164, 2012.
- Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279, C541-C566, 2000.
- Thurman CL, Faria SC, McNamara JC. Variação geográfica nas habilidades osmorregulatórias entre populações de dez espécies de caranguejos violinistas da costa atlântica do Brasil: uma análise macrofisiológica. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 497, 243-253, 2017.
- Toustrup-Jensen MS, Vilsen B. Interaction between the Catalytic Site e the AM3 Linker Stabilizes E<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>P Conformational States of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chemist.* 280, 10210-20218, 2005.
- Towle DW, Kays WT. Basolateral localization of Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* 239: 311-318, 1986.
- Towle DW, Paulsen RS, Weihrauch D, Kordylewski M, Salvador C, Lignot JH, et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing e salinity related expression of  $\alpha$ -subunit mRNA e protein. *J. Exp. Biol.* 204, 4005-4012, 2001.
- Vagin O, Dada LA, Tokhtaeva E, Sachs G. The Na-K-ATPase alpha(1)beta(1) heterodimer as a cell adhesion molecule in epithelia. *Am. J. Physiol. CellPhysiol.* 302, C1271–C1281, 2012.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44–48, 2007.
- Van Assche F, Van Tilborg W, Waeterschoot H. Environmental risk assessment for essential elements. Case study: zinc. In: Langley, A. and Mangas, S. (Eds.) *Zinc: Report of an international meeting*, National Environmental Health Forum Monographs. Adelaide, Australia. pp. 33-47, 1997.
- Virga RH, Geraldo LP. Investigação dos teores de metais pesados em espécies de siris azuis do gênero *Callinectes* sp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 943-948, 2008.
- Vujisić L, Krstić D, Vucetic J. Chemical aspects of the influence of cobalt ions on ATPase activity. *Journal of the Serbian Chemical Society* 65.7: 507-515, 2000.
- Wang WX. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. *Chin Sci Bull* 58:194–202, 2013.
- Wanson SA, Péqueux A, Roer RD. Na<sup>+</sup> regulation and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (La Conte). *Comp Biochem Physiol* 79A:673–678, 1984.
- Warner GF. *The Biology of Crabs*. Elek Science, London. 202 pp, 1977.
- Weihrauch D, Becker W, Postel U, Riestenpatt S, Siebers D. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol.* 168B, 364-376, 1998.
- Weihrauch D, Becker W, Postel U, Luck-Kopp S, Siebers D. Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol.* 169B, 25-37, 1999.

- Weihrauch D, Morris S, Towle DW. Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491-4504, 2004.
- Yang W, Yang I, Chuang H, Chao T, Hu Y, Wu W, Wang Y, Tang C, Lee T. Positive correlation of gene expression between branchial FXYD proteins and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of euryhaline milkfish in response to hypoosmotic challenges. *Comp. Biochem. Physiol.* 231A: 177-187, 2019.
- Yamada, K. Cobalt: Its Role in Health and Disease. In: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. (eds) *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. Springer, Dordrecht, 2013.
- Yamada S, Ikemoto N. Reaction mechanism of calcium-ATPase of sarcoplasmic reticulum - substrates for phosphorylation reaction and back reaction, and further resolution of phosphorylated intermediates. *J Biol Chem* 255: 3108-3119, 1980.
- Yatime L, Laursen M, Morth JP, Esmann M, Nissen P, Fedesova NU. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup> , K<sup>+</sup> - ATPase. *J. Struct. Biol.* 174, 296-306, 2011.
- Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS. Cardio protection induced by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiov. Res.* 89, 51–59, 2011.
- Zoroddua MA, Aasethb J , Crisponid G, Medicia S, Peanaa M , Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 195, 120–129, 2019.
- Zou W, Yan M, Xu W, Huo H, Sun I, Zheng Z, Liu X. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *J Neurosci Res* 67(6):646–653, 2001.