



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

Estudo bioquímico comparativo da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) habitante de regiões continentais

Leonardo Milani Fabri

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

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Leonardo Milani Fabri

Estudo bioquímico comparativo da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) habitante de regiões continentais

Versão corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Química

Orientador: Francisco de Assis Leone

Ribeirão Preto - SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Fabri, Leonardo Milani

Estudo bioquímico comparativo da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) habitante de regiões continentais. Leonardo Milani Fabri; Orientador: Francisco de Assis Leone -- Ribeirão Preto, 2019. 194p. : il. ; 30cm

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química

1. (Na⁺, K⁺)-ATPase. 2. *Macrobrachium amazonicum*. 3. Osmorregulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Milani Fabri

Estudo bioquímico comparativo da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) habitante de regiões continentais.

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

**Área de Concentração: Química
Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone.**

Aprovado em: ____/ ____/ ____

Banca examinadora

Profº(a) Drº (a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº(a)Drº(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Profº (a) Drº (a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICO

Aos meus pais e irmã por todo apoio e confiança depositada em mim. Além de toda doação, sacrifícios, amor e compreensão durante esta caminhada.

À minha namorada Natália por todo apoio, compreensão e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Sem vocês eu não seria capaz de realizar esta conquista, que também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Leone pela confiança depositada em mim e por permitir o desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos, orientações e direcionamentos que me permitiu evoluir e aprender tanto durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Leite Fontes pelo acolhimento em seu laboratório para a realização dos experimentos com ATP radioativo, pela disponibilidade e discussões que contribuíram tanto para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Malson Neilson Lucena por todos ensinamentos, discussões, amizade e conselhos que contribuíram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara pela colaboração científica.

Ao Dr. Marcelo Rodrigues Pinto pelos cortes para a microscopia e colaboração científica.

À Prof. Dra. Daniela Pereira Garçon e Prof. Dr. Rogério Oliveira Faleiros pela captura dos animais e pela colaboração e discussões.

Ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira pela colaboração científica.

Aos meus amigos de laboratório, Cintya, Bruno e Elise por todas discussões, apoio, amizade e risadas que tornaram esta caminhada mais leve e engrandecedora.

Aos demais amigos e colegas que passaram pelo laboratório e contribuíram na minha caminhada.

Ao técnico André Justino pelo suporte técnico.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A toda minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim. Que muitas vezes me deu forças para continuar buscando meus sonhos.

Meus amigos de Borborema pela compreensão da ausência, por todo carinho, apoio e companheirismo que foi importante durante esta caminhada.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação e que foram de extrema importância na minha caminhada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

FABRI, L. M. Estudo bioquímico comparativo da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) habitante de regiões continentais. 196p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

O camarão *Macrobrachium amazonicum* é um espécie diádroma, que apresenta uma ampla distribuição na América do Sul. Os camarões palemonídeos hiperregulam em água doce, sendo este processo energizado pela (Na⁺, K⁺)-ATPase e V(H⁺)-ATPase presentes no tecido branquial desses animais. Este trabalho teve como objetivo caracterizar e comparar as propriedades moleculares, bioquímicas e cinéticas da (Na⁺, K⁺)-ATPase e V(H⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* de populações que habitam a Bacia do Rio da Prata (Paraná-Paraguai), proporcionando um melhor entendimento do processo osmorregulatório envolvido na invasão do ambiente dulcícola desta espécie. A (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturado nos Rios Tietê e Grande apresentou atividade máxima de aproximadamente 130 nmol P_i min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, representando cerca de 75% da atividade ATPase total. As propriedades cinéticas da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial destas duas populações apresentam grande semelhança entre si, porém são divergentes se comparadas a outras populações de *M. amazonicum*. De forma inédita, neste trabalho foi realizada a caracterização cinética da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* após a aclimação em alta salinidade, utilizando os animais do Rio Tietê aclimatados em salinidade em 21 ‰ durante 10 dias. Essa aclimação resultou na provocou a diminuição de aproximadamente 60% na atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial (52,1 ± 1,9 nmol P_i min⁻¹ mg⁻¹ de proteína). A afinidade da enzima para os seus diferentes moduladores também foi alterada, sugerindo alterações na regulação da enzima com a aclimação. Nos animais recém capturados a atividade insensível à ouabaína é composta principalmente pelas atividades da V(H⁺)-ATPase, Na⁺ e/ou K⁺-ATPase e F-ATPase, enquanto nos animais aclimatados ela é constituída pelas atividades da Ca²⁺-ATPase, Na⁺- e/ou K⁺-ATPase e F-ATPase. Atividade V(H⁺)-ATPase foi encontrada somente nos animais recém capturados. A V(H⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturado apresentou uma atividade de 27,2 nmol P_i min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Rio Tietê) e 16,7 nmol P_i min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Rio Grande). As afinidades aparentes da V(H⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* de Rio Tietê para os seus moduladores foram inferiores aos valores encontrados para a população do Rio Grande. A eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* sugere algumas diferenças de expressão proteica, sendo que a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase apresentou apenas uma única banda imunorreativa (≈110kDa). A (Na⁺, K⁺)-ATPase localiza-se predominantemente ao longo do septo intralamelar nas brânquias e a aclimação em alta salinidade durante 10 dias não causou mudanças nesta distribuição, sugerindo que a adaptação dos animais não depende da disponibilidade da enzima na membrana celular. A atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* é alterada tanto pela presença do peptídeo FXYD2 exógeno, quanto pela fosforilação pelas proteínas quinases A e C endógenas em uma proteína da família FXYD presente na fração microsomal destes animais. Considerando que a alteração da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase é dependente da salinidade, os resultados deste trabalho podem ser relevantes para uma melhor compreensão do processo osmorregulatório do *M. amazonicum*.

ABSTRACT

FABRI, L. M. A comparative biochemical study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from populations of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) inhabiting continental waters. 196 pp. Dissertação de Mestrado. – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

The freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* is a diadromous species that has a wide distribution throughout South America. The palaemonid shrimps hyper-osmoregulate their hemolymph in fresh water, a process energized by the (Na⁺, K⁺)-ATPase and V(H⁺)-ATPase present in their gill tissue. In this study, we characterized and compared the molecular, biochemical and kinetic properties of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase and V(H⁺)-ATPase in two populations of *M. amazonicum* inhabiting the Paraná-Paraguay (La Plata) river basin, providing a better understanding of the osmoregulatory process involved in the invasion of the freshwater by this specie. The gill (Na⁺, K⁺)-ATPase of fresh-caught *M. amazonicum* from both the Tietê River population and Grande River population showed maximum activities of approximately 130 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ protein, which represents about 75% of the total ATPase activity. The kinetic properties of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase of these two populations are very similar to each other but are divergent when compared to other *M. amazonicum* populations. In this work, for the first time, the kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase *M. amazonicum* was performed after high salinity acclimatization, using Tietê River animals acclimatized in salinity at 21 ‰ for 10 days. This acclimatization caused the decrease in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity (52.1 ± 1.9 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ protein) by ≈60%. The enzyme affinity for different modulators also changed, suggesting alterations in enzyme regulation with acclimatization. In fresh-caught shrimps the ouabain insensitive ATPase activity consisted mainly of V(H⁺)-ATPase, Na⁺- and/or K⁺-ATPase and F-ATPase activity, while in acclimated animals the activity is constituted by Ca²⁺-ATPase, Na⁺- and/or K⁺-ATPase and F-ATPase activity. V(H⁺)-ATPase was found only in fresh-caught shrimps. The V(H⁺)-ATPase activity from the fresh-caught shows a maximum activity of 27.2 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ protein for those from the Tietê River and 16.7 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ protein for the Grande River population. The apparent affinities by modulators of the gill V(H⁺)-ATPase of *M. amazonicum* from the Tietê River were less than those for Grande River population. SDS-PAGE analysis of the microsomal fraction from *M. amazonicum* gill tissue in the two populations suggests some differences in protein expression, while a single immunoreactive band for the (Na⁺, K⁺)-ATPase α -subunit (≈110kDa) was revealed. The (Na⁺, K⁺)-ATPase is located predominantly along the intralamellar septum of the gill lamella, and the acclimation to 21 ‰ salinity for 10 days did not change this distribution, suggesting that shrimp adaptation does not depend on the availability of the enzyme in the cell membrane. The gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity from *M. amazonicum* is altered both by the presence of exogenous FXD2 peptide and by endogenous protein kinases A and C phosphorylation in a protein of the FXD family present in the microsomal fraction of these shrimps. Whereas the change in (Na⁺, K⁺)-ATPase activity is salinity dependent, the results of this work may be relevant for a better understanding of the in the osmoregulatory process of *M. amazonicum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Macrobrachium amazonicum</i>	18
Figura 2. Estrutura das bombas iônicas pertencentes à família das ATPases P _{II}	21
Figura 3. Diagrama da topologia da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase.....	23
Figura 4. Modelos de homologia para as isoformas da subunidade α de humanos.....	25
Figura 5. Modelo de Alberts-Post para o ciclo catalítico da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase.....	27
Figura 6. Estrutura cristalina da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase do estado de transição antecedente ao intermediário fosforilado E1P onde os três íons sódio estão ocluídos.....	29
Figura 7. Diagrama da ligação da ouabaína na subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase e estrutura química da ouabaína.....	31
Figura 8. Representação esquemática da câmara branquial de <i>Macrobrachium olfersii</i>	39
Figura 9. Modelo de hiper/hiposmorregulação em camarões palemonídeos.....	43
Figura 10. Representação esquemática da V(H ⁺)-ATPase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figura 11. Estrutura do subdomínio A ₃ B ₃ de <i>E. hirae</i>	48
Figura 12. Mecanismo reacional da V(H ⁺)-ATPase.....	50
Figura 13. Regulação da atividade da V(H ⁺)-ATPase.....	52
Figura 14. Inibidores da V(H ⁺)-ATPase.....	54
Figura 15. Efeito da concentração do ATP (como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	73
Figura 16. Efeito da concentração de Mg ²⁺ e ATP, em condições estequiométricas, na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	74
Figura 17. Efeito da concentração de Mg ²⁺ (como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	75
Figura 18. Efeito da concentração de Na ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	76
Figura 19. Efeito da concentração de K ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	77
Figura 20. Efeito da concentração de NH ₄ ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	79
Figura 21. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	80

Figura 22. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	84
Figura 23. Efeito da concentração de ATP e Mg ²⁺ , em condições estequiométricas, na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	86
Figura 24. Efeito da concentração de Mg ²⁺ (como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	87
Figura 25. Efeito da concentração de Na ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	88
Figura 26. Efeito da concentração de K ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	90
Figura 27. Efeito da concentração de NH ₄ ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	91
Figura 28. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	92
Figura 29. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	96
Figura 30. Efeito da concentração de ATP, em condições estequiométricas de ATP e MgCl ₂ , na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	97
Figura 31. Efeito da concentração de Mg ²⁺ (Como MgATP) na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	99
Figura 32. Efeito da concentração de Na ⁺ na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	100
Figura 33. Efeito da concentração de K ⁺ na atividade ATPase da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	101
Figura 34. Efeito da concentração de NH ₄ ⁺ na atividade ATPase da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	103

Figura 35. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	104
Figura 36. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	108
Figura 37. Efeito da concentração de Mg ²⁺ (como MgATP) na atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	109
Figura 38. Efeito da concentração de bafilomicina na atividade insensível a ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	110
Figura 39. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	113
Figura 40. Efeito da concentração do Mg ²⁺ (como MgATP) na atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	114
Figura 41. Efeito da concentração de bafilomicina na atividade insensível a ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	115
Figura 42. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 5-20%) da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i>	117
Figura 43. Western blotting na fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> para a subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase.....	118
Figura 44. Imunolocalização da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase na brânquia de <i>M. amazonicum</i> do Rio Tietê.....	119
Figura 45. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	120
Figura 46 - Fosforilação da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase pelas quinases A e C endógenas presentes na fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> do Rio Tietê aclimatado durante 10 dias a 21 ‰.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Osmolalidade da hemolinfa e ponto isosmótico de camarões do gênero <i>Macrobrachium</i>	41
Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	81
Tabela 3. Efeito de diversos inibidores na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Tietê.....	82
Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	93
Tabela 5. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.....	94
Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	105
Tabela 7. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> coletado no Rio Grande.....	106
Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> , coletado no Rio Tietê, pelo ATP, Mg ²⁺ e inibição pela bafilomicina.....	111
Tabela 9. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> , coletado no Rio Grande, pelo ATP, Mg ²⁺ e inibição pela bafilomicina.....	112
Tabela 10. Efeito do polipeptídeo FXVD2 exógeno na atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i>	121
Tabela 11. Efeito de proteínas quinases endógenas na atividade da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> do Rio Tietê.....	122
Tabela 12. Atividade específica e afinidade pelo ATP da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial em crustáceos decápodes selecionados de habitats de diferentes salinidades e/ou aclimatados em várias salinidades experimentais.....	128

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros cinéticos para a estimulação da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase pelo ATP, Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ e NH ₄ ⁺ e inibição pela ouabaína em diferentes populações de camarões do gênero <i>Macrobrachium</i>	135
Tabela 14. Atividade relativa das prováveis ATPases presentes na fração microsomal do tecido branquial em diversas populações de camarões do gênero <i>Macrobrachium</i>	139
Tabela 15. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém capturado e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰.....	143
Tabela 16. Atividade relativa das prováveis ATPases presentes na fração microsomal do tecido branquial do <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém capturado e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰.....	146
Tabela 17. Comparação dos parâmetros cinéticos para a estimulação da V(H ⁺)-ATPase pelo ATP e Mg ²⁺ e inibição pela bafilomicina em diferentes populações de crustáceos decápodes de água doce.....	150

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Camarão <i>Macrobrachium amazonicum</i>	16
1.2. (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	20
1.3. (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de crustáceos	32
1.4. Osmorregulação nos crustáceos.....	36
1.5. V(H ⁺)-ATPase	44
1.6. A V(H ⁺)-ATPase branquial de crustáceos.....	54
2. OBJETIVOS	57
2.1. Objetivo geral	58
2.2. Objetivos específicos.....	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1. Materiais	60
3.2. Coleta dos animais.....	62
3.3. Aclimação dos camarões do Rio Tietê em salinidade de 21 ‰.....	62
3.4. Extração das brânquias e preparação da fração microsomal	62
3.5. Dosagem de proteína	63
3.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	63
3.7. Western blotting	63
3.8. Determinação da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal	64
3.9. Determinação da atividade V(H ⁺)-ATPase da fração microsomal.....	65
3.10. Cálculo de espécies livres no meio de reação.....	65
3.11. Tratamento dos dados cinéticos.....	65
3.12. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	66
3.13. Imunolocalização da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase branquial de <i>M. amazonicum</i> do Rio Tietê	66
3.14. Síntese do [γ - ³² P]-ATP	67
3.15. Determinação da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase através da liberação do [³² P]-P _i	67
3.16. Estudo do efeito do FXD2 exógeno na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	68
3.17. Fosforilação por proteína quinase A.....	68
3.18. Fosforilação por proteína quinase C	68
3.19. Análise por SDS-PAGE da fosforilação das subunidades da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase pelas proteínas quinases A e C de <i>M. amazonicum</i> do Rio Tietê	69
4. RESULTADOS	70
4.1. Caracterização cinética da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	71
4.1.1. <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado no Rio Tietê	71
4.1.2. <i>Macrobrachium amazonicum</i> coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰.....	83

4.1.3. <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado no Rio Grande.....	95
4.2. Caracterização cinética da V(H ⁺)-ATPase	107
4.2.1. V(H ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado no Rio Tietê	107
4.2.2. V(H ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado no Rio Grande	111
4.3. Caracterização bioquímica da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> ..	116
4.4. Efeito do FXYD2 na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	121
4.5. Efeito de quinases na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> .	122
5. DISCUSSÃO	125
5.1. Caracterização cinética da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	126
5.1.1. <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado	126
5.1.2. <i>Macrobrachium amazonicum</i> aclimatado a 21 ‰ durante 10 dias	140
5.2. Caracterização cinética da V(H ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	147
5.3. Caracterização bioquímica da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> ..	151
5.4. Efeito do FXYD2 na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i> .	154
5.5. Efeito de quinases na atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	157
6. CONCLUSÃO.....	159
7. BIBLIOGRAFIA	161
CURRICULUM VITAE	195

1. INTRODUÇÃO

1.1. Camarão *Macrobrachium amazonicum*

O gênero *Macrobrachium* (Bate, 1868) pertence à família monofilética Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) e apresenta uma ampla distribuição geográfica, presente nos mais diversos nichos ecológicos dos cinco continentes (Pereira, 1997). Os camarões desse gênero têm sua origem em ancestrais marinhos no início do Pleistoceno que obtiveram sucesso na conquista do ambiente dulcícola (Jalihal et al., 1993; Short, 2004; Freire et al., 2003; Bauer, 2004). Existem evidências de que esta migração tenha ocorrido mais de uma vez, já que seus membros são encontrados desde águas marinhas até águas interiores (Jalihal et al., 1981; Freire et al., 2003). Dentre um total aproximado de 240 espécies de *Macrobrachium* atualmente reconhecidas, cerca de 57 têm sido relatadas vivendo na região neotropical (deGrave & Fransen, 2011) e destas, 19 são encontradas no Brasil (Vera-Silva et al., 2016). O interesse da academia pelo gênero aumenta progressivamente desde a década de 1980, onde o *Macrobrachium rosenbergii*, o *Macrobrachium nipponense* e o *Macrobrachium amazonicum* são as espécies mais estudadas neste período. A Universidade de São Paulo foi responsável por aproximadamente 10% desta produção científica, colocando o Brasil em um local de destaque no estudo deste gênero (Chong-Carrillo et al., 2015).

Os vários eventos de migração para o ambiente dulcícola resultaram em diferentes padrões de desenvolvimento dentro desse gênero, tendo em vista que algumas espécies conseguiram conquistar completamente o ambiente dulcícola, não necessitando, portanto, de água salobra para o seu desenvolvimento. Isso permitiu a elas habitarem rios continentais e, por isso, elas são consideradas espécies *hololimnéticas*, como é o caso do *Macrobrachium brasiliense*. Espécies que não conquistaram totalmente o ambiente dulcícola e ainda necessitam de águas estuarinas para o desenvolvimento larval, retornando para a água doce na fase pós-larval, são consideradas espécies *diádromas*, sendo que o *Macrobrachium olfersii* e o *M. amazonicum* são exemplos (Jalihal et al., 1993; Freire et al., 2003; McNamara et al., 2004).

Esta diferença de desenvolvimento levou ao surgimento de duas estratégias reprodutivas dentro desse gênero (Liu et al., 2007). Os animais hololimnéticos apresentam um desenvolvimento larval abreviado, constituído de no máximo duas fases larvais, sendo caracterizado pela produção de poucos ovos com um grande diâmetro (Jalihal et al., 1993). Nas espécies diádromas ocorre um desenvolvimento larval prolongado, com vários estágios larvais, cuja característica é a produção de ovos menores em maior quantidade (>150.000 ovos) (Murphy & Austin, 2005). A história evolutiva destas duas estratégias ainda apresenta

controvérsias, uma vez que enquanto análises filogenéticas de marcadores moleculares utilizando espécies americanas mostraram que as duas estratégias surgiram várias vezes (Pileggi & Mantelatto, 2010), para espécies asiáticas tem sido sugerido que as espécies do primeiro grupo apresentam uma ancestralidade comum, enquanto o segundo grupo apresenta cinco origens diferentes (Womor et al., 2009).

Macrobrachium amazonicum (Heller, 1862), popularmente conhecido como camarão canela ou camarão do Rio Amazonas (Figura 1), apresenta uma ampla distribuição na região neotropical da América do Sul, ocorrendo naturalmente nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Paraguai (revisto por Magalhães et al., 2005), podendo ocupar uma grande diversidade de ambientes, desde regiões estuarinas até águas interiores distantes 3.000 km do mar (Odinetz-Collart & Rabelo, 1996; Montoya, 2003; Magalhães et al., 2005; Bentes et al., 2011). *Macrobrachium amazonicum* é registrado em uma área geográfica de ocorrência com aproximadamente 4.000 km de diâmetro, que se estende desde o norte da Argentina e Paraguai, até a costa norte da América do Sul compreendendo a Venezuela, a Colômbia e a Guiana (Magalhães, 2000; Melo, 2003; Valencia & Campos, 2007), nas bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins, São Francisco, Paraná-Paraguai, bem como em outros rios menores da bacia do Atlântico Sul no Brasil (ver Pileggi et al., 2013 para localidades brasileiras). Nem todas as populações *M. amazonicum* são consideradas naturais, as populações da região superior da Bacia do Rio Paraná e do nordeste do Brasil resultam de uma dispersão antrópica (Pinto, 1977; Torloni et al., 1993; Magalhães et al., 2005).

A grande plasticidade ecológica e fisiológica do *M. amazonicum* que ocupa habitats tão distintos e até mesmo de populações que habitam diferentes regiões do Rio Tocantins/Araguaia (J. L. Freire et al., 2017) representa um aspecto intrigante. Entretanto, a caracterização genética de diferentes populações do Brasil utilizando marcadores mitocondriais 16S e citocromo oxidase I, revelou que todas estas populações compõem um clado monofilético caracterizando, portanto a existência de uma única espécie (Pileggi & Mantelatto, 2010; Vergamini et al., 2011) e corroborando com dados morfológicos que chegaram a mesma conclusão (Holthuis, 1952). Entretanto, algumas divergências genéticas, resultantes de variações intraespécie permite a estruturação das populações brasileiras dessa espécie em três grupos: i. populações de águas interiores da Bacia Amazônica; ii. populações da Bacia Paraná-Paraguai e iii. populações costeiras do norte e nordeste (Vergamini et al., 2011). Esta ampla variabilidade intraespécie pode ser devido à isolamento genética das populações representando um sinal de um incipiente processo de especiação (Anger et al., 2009; Vergamini et al., 2011).



Figura 1. *Macrobrachium amazonicum*. Maciel & Valenti, 2009.

Vários estudos mostram que a parte superior da Bacia Paraná-Paraguai está isolada das bacias do norte, como as bacias Amazônica, São Francisco e Orinoco (Buckup, 2011; Carvalho & Albert 2011). Conseqüentemente, a população de *M. amazonicum* do Pantanal está isolada das demais populações, impedindo o fluxo gênico desta população com as demais. Os animais que habitam o Pantanal brasileiro apresentam diferenças em relação às demais populações quanto à biologia larval (Anger & Hayd, 2009; Anger et al., 2009; Urzúa & Anger, 2011), ao tamanho e composição química das larvas (Urzúa & Anger, 2011), aos seus padrões alimentares (Anger & Hayd, 2010), aos padrões de osmorregulação durante o desenvolvimento ontogenético (Charmantier & Anger, 2011; Boudour-Bouchecker et al., 2016) e outras características morfológicas, ecológicas, fisiológicas e reprodutivas (Hayd & Anger, 2013; Meireles et al., 2013). Com base nessas diferenças e contrariando dados genéticos e morfológicos de adultos a população de *M. amazonicum* do Pantanal foi descrita como uma nova espécie e denominada *Macrobrachium pantanalense* (Santos et al., 2013).

O *M. amazonicum* é considerado um invasor recente do ambiente dulcícola, uma vez que várias populações dependem da água salobra para o seu desenvolvimento (McNamara et al., 1983; Magalhães, 1985; Moreira et al., 1986; Anger, 2003; Augusto et al., 2007). A fase embrionária nos camarões tem duração de 12 a 18 dias, com as fêmeas se mantendo em água doce (Guest, 1979; Véga-Perez, 1984; Magalhães, 1985). A fase larval apresenta de 9 a 11 estágios larvais diferentes estendendo-se por um período de 20-23 dias e necessitando de ambientes com salinidade em torno de 10 a 12 ‰ (Guest, 1979; Anger et al., 2009; Anger &

Hayd, 2009). Na fase juvenil, com início após 20-22 dias, em média, após a eclosão das larvas, os animais ainda não apresentam maturação gonadal e as estruturas morfológicas que permitem diferenciar os órgãos reprodutivos, não são aparentes (Anger, 2001; Moraes-Riodades & Valenti, 2004; Vetorelli, 2008; Anger et al., 2009; Maciel & Valenti, 2009). Nesse estágio, os animais retornam à água doce. Em contraste, algumas populações desse camarão que habitam águas interiores e não possuem acesso à água salobra completam todo o seu ciclo de vida na água doce (Pantaleão et al., 2012; Boudour-Bouchecker et al., 2014).

Os machos de *M. amazonicum* apresentam quatro morfotipos, que se diferem quanto às características morfológicas, com destaque ao tamanho dos quelípedes e à coloração (Moraes-Riodades & Valenti, 2004; Santos et al., 2006). Além das diferenças morfológicas, os diferentes grupos também apresentam diferenças fisiológicas entre si (Augusto & Masui, 2014; Augusto & Valenti, 2016).

A distribuição destes diferentes morfotipos aparentemente depende do ambiente em que a população habita e da disponibilidade de nutrientes (Santos et al., 2014) sendo mais comumente encontradas em populações estuarinas embora apresente um registro em águas interiores (Santos et al., 2006; Silva et al., 2009; Vergamini, 2009; Pantaleão et al., 2014). Este registro em águas interiores ocorreu no Rio Tietê, à jusante da barragem da hidroelétrica de Ibitinga, que apresenta uma grande disponibilidade de nutrientes, porém a montante desta mesma barragem não foram encontrados indivíduos dos maiores morfotipos (Pantaleão et al., 2012; 2014).

M. amazonicum é ecologicamente importante em muitas cadeias alimentares pois representa uma fonte preferencial de alimentação para diversos peixes (Almeida et al., 1997; Boscolo et al., 2004). Além disto, o *M. amazonicum* é um biomarcador da qualidade de corpos d'água contaminados com herbicidas (Coler et al., 1999).

Entre as espécies de decápodes de água doce do Brasil importantes ecológica e economicamente (Magalhães, 1999; Almeida et al., 2008; Cavalcante et al., 2012), o *M. amazonicum* é o de maior importância econômica no norte e nordeste, sendo amplamente pescado e consumido nestas regiões (Moraes-Riodades & Valenti, 2001, 2004; Marques & Moraes-Valenti, 2012). A espécie apresenta um grande potencial para a aquicultura, pois apresenta características altamente favoráveis ao cultivo em cativeiros, pois trata-se de uma espécie nativa (Moraes-Valenti & Valenti, 2010) que apresenta crescimento rápido, resistência a doenças, alta taxa de sobrevivência, fácil manutenção (Marques & Moraes-Valenti, 2012), reprodução contínua ao longo de todas as estações do ano (Sampaio et al., 2007; Pantaleão et al., 2018) e a possibilidade de produção de larvas em salinidades de apenas

1 ‰S, permitindo a sua produção em regiões interioranas próximas das fazendas de engorda (Araujo & Valenti, 2010). Tais características têm intensificado os esforços para o uso desta espécie em cultivos artesanais em diferentes regiões do país. (Kutty, 2005; New, 2005; Araujo & Valenti, 2007; Moraes-Valenti & Valenti, 2007; Maciel & Valenti, 2009; Hayd et al., 2014; 2017; Mazzarelli et al., 2015).

A diversidade de habitats e mecanismos de reprodução do *M. amazonicum*, sua plasticidade fisiológica e ecológica, sua ampla distribuição no território brasileiro e a sua importância na aquicultura tornam esta espécie alvo de estudos dos mecanismos de regulação osmótica e iônica, bem como do papel dos transportadores branquiais no processo de invasão de água doce. Vários estudos foram realizados para a compreensão desta adaptação podendo ser destacada a avaliação do efeito de diferentes salinidades na sobrevivência e na muda de larvas (McNamara et al., 1983), o papel dos aminoácidos e a tolerância à salinidade em diferentes estágios ontogenéticos (Augusto et al., 2007; 2009), a caracterização cinética da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase em indivíduos adultos e em diferentes estágios ontogenéticos (Santos et al., 2007; Leone et al., 2012; 2014; Fabri et al., 2019), a caracterização cinética da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase em diferentes condições de salinidade (Belli et al., 2009), a caracterização ultraestrutural das brânquias (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010), o efeito da salinidade do meio na atividade e expressão de (Na⁺, K⁺)-ATPase e V(H⁺)-ATPase (Faleiros et al., 2010), os efeitos da presença de amônia no meio em diferentes transportadores e enzimas do estresse oxidativo (Pinto et al., 2016), a caracterização cinética da atividade V(H⁺)-ATPase em diferentes estágios ontogenéticos (Lucena et al., 2015), a regulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase por aminas biogênicas exógenas (Lucena et al., 2017a; Lucena et al., 2019a) e regulação da fosforilação/desfosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase por aminas biogênicas exógenas (Lucena et al., 2017b).

1.2. (Na⁺, K⁺)-ATPase

As ATPases realizam o transporte ativo primário de íons a partir da hidrólise do fosfato γ da molécula de ATP (Post, 1999). Elas são divididas em quatro grupos bem definidos, as superfamílias das P-, F-, V- e M-ATPases (Pedersen & Amzel, 1993). As P-ATPases (Figura 2) são caracterizadas por receberem o grupo fosfato em um resíduo de aspartato presente na sequência conservada DKTGT(I/L) (Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nissen, 2011; Chourasia & Sastry, 2012).

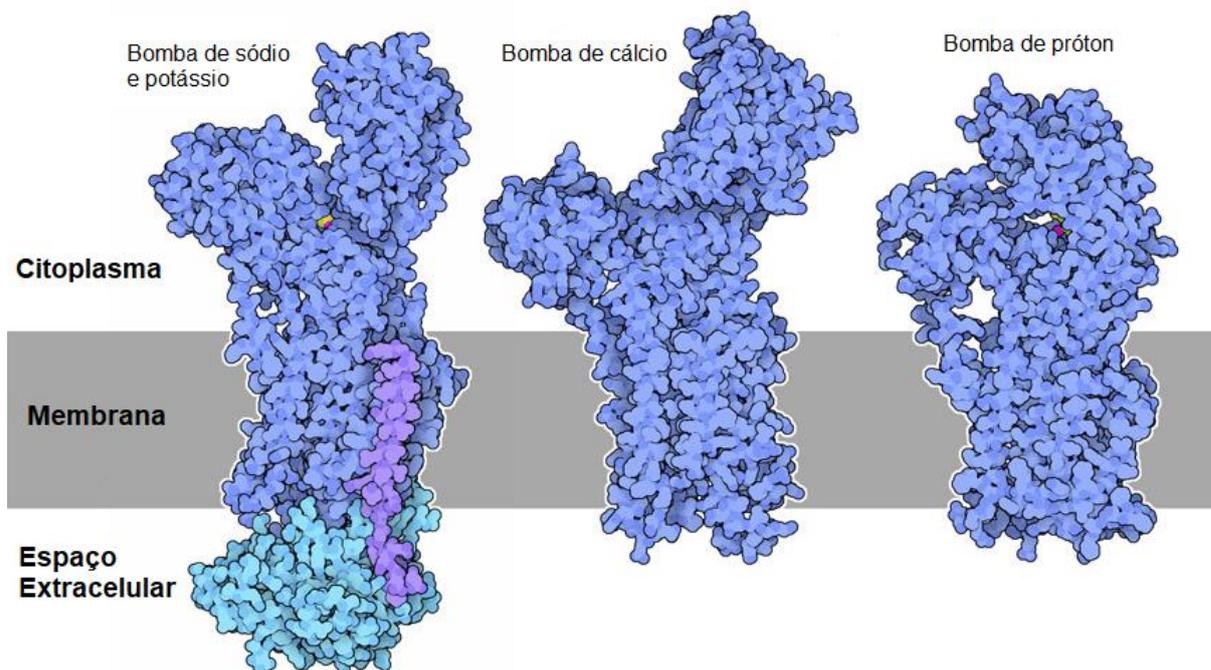


Figura 2. Estrutura das bombas iônicas pertencentes à família das ATPases P_{II}.
Modificado de Goodsell, 2009.

As P-ATPases são classificadas em cinco diferentes famílias: I, II, III, IV e V, baseado no alinhamento de uma sequência conservada de 159 aminoácidos (Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nissen, 2011; Chourasia & Sastry, 2012). Dentre eles, o grupo II é o mais bem estudado e inclui a Ca²⁺-ATPase, a (Na⁺, K⁺)-ATPase e a (H⁺, K⁺)-ATPase. A P-ATPase melhor estruturalmente caracterizada é a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático, denominada SERCA (Toyoshima et al., 2000; Toyoshima & Mizutani, 2004; Toyoshima & Cornelius, 2013). A Ca²⁺-ATPase apresenta uma grande semelhança com a (Na⁺, K⁺)-ATPase apresentando os mesmos resíduos de aminoácidos no sítio de ligação de íons (Morth et al., 2007).

A (Na⁺, K⁺)-ATPase (E.C. 7.2.2.13) ou adenosina trifosfatase estimulada por sódio e potássio, é uma enzima da classe das ATPases transportadoras associadas à membrana plasmática e denominadas “bombas”. A bomba de sódio-potássio, pertence à subfamília P_{IIc}, que é caracterizada por apresentar a subunidade β (Palmgren & Nissen, 2011). A enzima realiza o transporte simultâneo de três íons Na⁺ do meio intracelular para o meio extracelular e dois íons K⁺ no sentido contrário, utilizando a energia fornecida pela hidrólise do fosfato γ de uma molécula de ATP com uma eficiência energética da ordem de 70% em condições fisiológicas (Skou, 1957; Shinoda et al., 2009; Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nissen, 2011; Apell, 2017). Esse transporte assimétrico estabelece um gradiente eletroquímico através da

membrana plasmática de todas as células animais e fornece a força eletromotriz que é responsável por várias funções celulares, tais como: estabelecimento do potencial de membrana, regulação do volume da célula, transporte ativo secundário, sinalização neural, acidificação do estômago, transporte de substâncias vitais, manutenção da termogênese e do balanço iônico e regulação do pH (Post, 1999; Crambert et al., 2000; Capendeguy & Horisberger, 2005; Martin, 2005; Pedersen, 2007; Poulsen et al., 2010a; Tidow et al., 2010; Zheng et al., 2011; Aperia, 2012; Clarke et al., 2013; Clausen et al., 2017; Pivovarov et al., 2019).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é amplamente expressa em células animais e consome 19 a 28% do ATP produzido através dos processos oxidativos (Rolfe & Brown, 1997). Em alguns casos específicos este gasto energético pode chegar até dois terços da energia gasta por uma célula (Howarth et al., 2012). A participação da enzima em diferentes níveis de organização fisiológica necessita de uma coordenação precisa de suas funções na célula, nos órgãos, bem como em todo o organismo (Pirkmajer & Chibalin, 2016; 2019). Devido a sua abundância nos mais diversos tipos celulares a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresenta uma grande importância em diversas doenças e seus diferentes reguladores podem apresentar um grande valor terapêutico (Aperia, 2007; Slingerland et al., 2013; Holm et al., 2016; Ziff & Kotecha, 2016; Clausen et al., 2017; Obradovic et al., 2017; Amarelle & Lecuna, 2018; Bolotta et al., 2018; Khalaf et al., 2018; Pivovarov et al., 2019; Orlov et al., 2019).

A unidade funcional básica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é formada por duas cadeias peptídicas distintas, a subunidade α , responsável pela atividade catalítica e a subunidade β , altamente glicosilada. Em algumas células, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresenta ainda uma proteína de baixa M_r pertencente à família das proteínas FXYD (Kaplan, 2002; Garty & Karlish, 2006; Morth et al., 2007; Geering, 2008; Poulsen et al., 2010a; Li & Langhans, 2015; Clausen et al., 2017). A subunidade α apresenta M_r de cerca de 110 kDa onde se localizam os sítios de ligação do ATP, de fosforilação, bem como os resíduos de aminoácidos essenciais para a ligação dos íons sódio e potássio (Geering, 2000; Horisberger, 2004; Capendeguy & Horisberger, 2005). Esta subunidade possui 10 segmentos transmembrana (M1-M10) formando uma α -hélice cujas extremidades estão voltadas para o citoplasma originando alças intra- e extracelulares (Figura 3) (Jorgensen et al., 2003; Toustrup-Jensen & Vilsen, 2005).

As alças citoplasmáticas da subunidade α se arranjam em três domínios: o domínio P onde ocorre a fosforilação, o domínio A denominado âncora e o domínio N onde ocorre a ligação de nucleotídeos (Horisberger, 2004; Toustrup-Jensen et al., 2009; Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nissen, 2011). O domínio A é formado pela alça citoplasmática entre os

segmentos M2-M3 e atua como regulador, apresentando uma importante atuação na afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo ATP (Daly et al., 1997; Kaplan, 2002). Na alça formada entre os segmentos M4-M5 estão os domínios N e P, onde estão localizados os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação do ATP (o ATP se liga a eles na forma do complexo MgATP) e o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o ciclo catalítico, respectivamente (Hebert et al., 2003; Belogus et al., 2009; Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nilsen, 2011).

A subunidade β , uma proteína de membrana do tipo II, apresenta apenas um segmento transmembrana em α -hélice com a extremidade N-terminal voltada para o citoplasma e a sua interação com a subunidade α pode afetar a afinidade pelos íons sódio e potássio (Cohen et al., 2005; Durr et al., 2009; Morth et al., 2007; 2011). Esta subunidade apresenta um grande domínio extracelular, altamente glicosilado, que confere estabilidade à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, tornando-a mais resistente a proteases (Martin, 2005; Purhonen et al., 2006; Morth et al., 2007). O domínio YXXYF da subunidade β é importante para as interações entre as subunidades α (hélice M5) e β , também atuando na estabilização da conformação E2 da enzima (Hasler et al., 2001; Durr et al., 2009; Shinoda et al., 2009; Morth et al., 2011). Esta subunidade parece exercer um papel de chaperona, uma vez que na sua ausência, a subunidade α é retida no retículo endoplasmático (Laughery et al., 2003; Toustrup-Jensen et al., 2009).

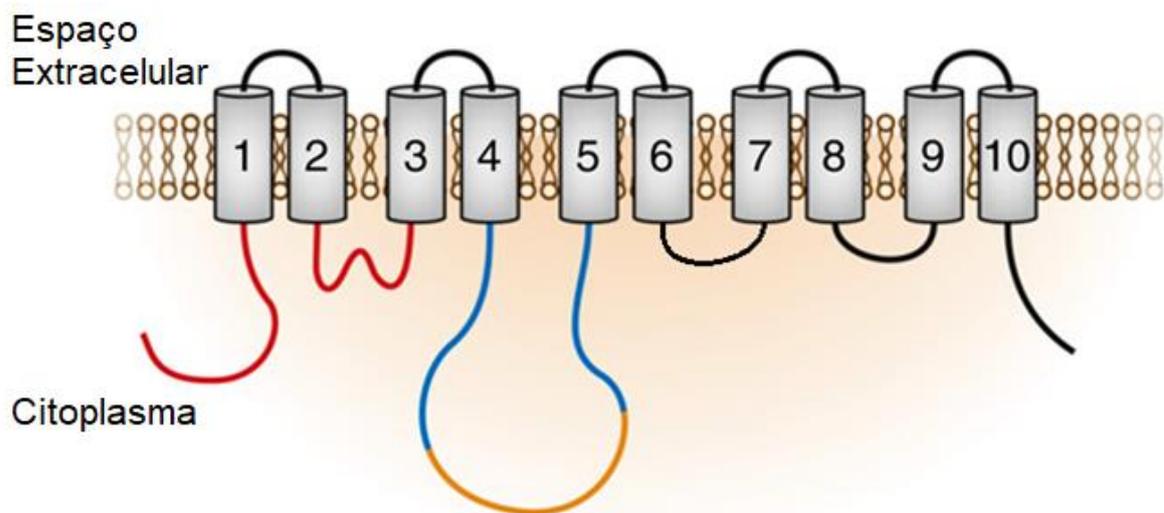


Figura 3. Diagrama da topologia da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Os segmentos transmembrana em α -hélice mostram os domínios P (azul), A (vermelho) e o N (amarelo) e demais alças (preto). Modificado de Aperia, 2012.

Estas duas subunidades formam a unidade básica funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Entretanto, em alguns organismos ela pode estar associada a um terceiro polipeptídeo, pertencente à família das proteínas FXYD, com aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, onde o FXYD2, também chamada de subunidade γ , é a mais comumente encontrada associada a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Therien & Blostein, 2000; Crambert et al., 2004; Füzesi et al., 2005, Lubarski et al., 2007; Cortes et al., 2011; Silva et al., 2012; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

As proteínas FXYD são caracterizadas por apresentar um único segmento transmembrana, localizado adjacente ao segmento M9 da subunidade α e cuja extremidade N-terminal está voltada para o meio extracelular (Dempski et al., 2008; Geering, 2008; Shinoda et al., 2009; Morth et al., 2011; Morth & Hein, 2013). Estas proteínas são expressas de modo tecido-específico associadas à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, modulando suas propriedades cinéticas bem como sua estabilidade (Geering, 2008; Cirri et al., 2011; Mishra et al., 2011; Shindo et al., 2011; Yoneda et al., 2013; Pirkmajer & Chibalin, 2019). Em mamíferos são expressas sete proteínas FXYD, que apresentam de 43 a 51% de identidade entre si (Li & Langhans, 2015). Embora possam exercer outras funções, a maioria delas afeta a afinidade da enzima pelos seus moduladores e/ou valores de V_M (Geering, 2005; Clausen et al., 2017; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

As subunidades α e β da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresentam diferentes isoformas, como resultado de diferentes genes. Os mamíferos apresentam quatro isoformas da subunidade α (Figura 4) e três da subunidade β , em humanos as isoformas α_2 e α_4 resultam do mesmo gene, diferenciando-se por splicing alternativo (Lingrel et al., 2003; Blanco, 2005; Pressley et al., 2005; Jimenez et al., 2010; 2011; Parekh et al., 2010; Schaefer et al., 2011; Lucas et al., 2012; Azarias et al., 2013; Lai et al., 2013; Mladinov et al., 2013; Radzyukevich et al., 2013; Li & Lingrel, 2015; Clausen et al., 2017; Pirkmajer & Chibalin, 2019). Uma quarta isoforma da subunidade β está presente em répteis, aves e peixes (Pestov et al., 2007; 2011). Em humanos as isoformas da subunidade α apresentam uma alta identidade (80%) da sequência de aminoácidos. Já a subunidade β é mais diversa, apresentando identidade em torno de 35%, com diferentes sítios de glicosilações entre as isoformas (Shamraj & Lingrel, 1994; Tokhtaeva et al., 2010; Li & Langhans, 2015; Clausen et al., 2017).

A combinação de diferentes isoformas das subunidades α e β , bem como a associação com de diferentes proteínas da família FXYD origina isoenzimas com propriedades cinéticas distintas com relação à estimulação por Na^+ , K^+ , e ATP, inibição pela ouabaína ou que apresentam diferentes respostas a mensageiros secundários (Segall et al.,

2000; Mobasheri et al., 2000; Pressley et al., 2005; Mijatovic et al., 2007; Pierre et al., 2008; Tokhtaeva et al., 2012; Hilbers et al., 2016). Em organismos complexos a expressão destas isoformas ocorre de forma tecido-específico. Assim, a expressão das isoformas da subunidade α_1 ocorre em diferentes tecidos; a subunidade α_2 ocorre principalmente no cérebro e nos músculos esquelético e cardíaco; a subunidade α_3 ocorre nos tecidos nervoso e cardíaco e a subunidade α_4 , encontrada principalmente em células germinativas masculinas, é a mais divergente entre elas uma vez que apresentam alta pressão evolutiva entre as isoformas (Shamraj & Lingrel, 1994; Blanco, 2005; Bottger et al., 2012; Blom et al., 2016; Clausen et al., 2017).

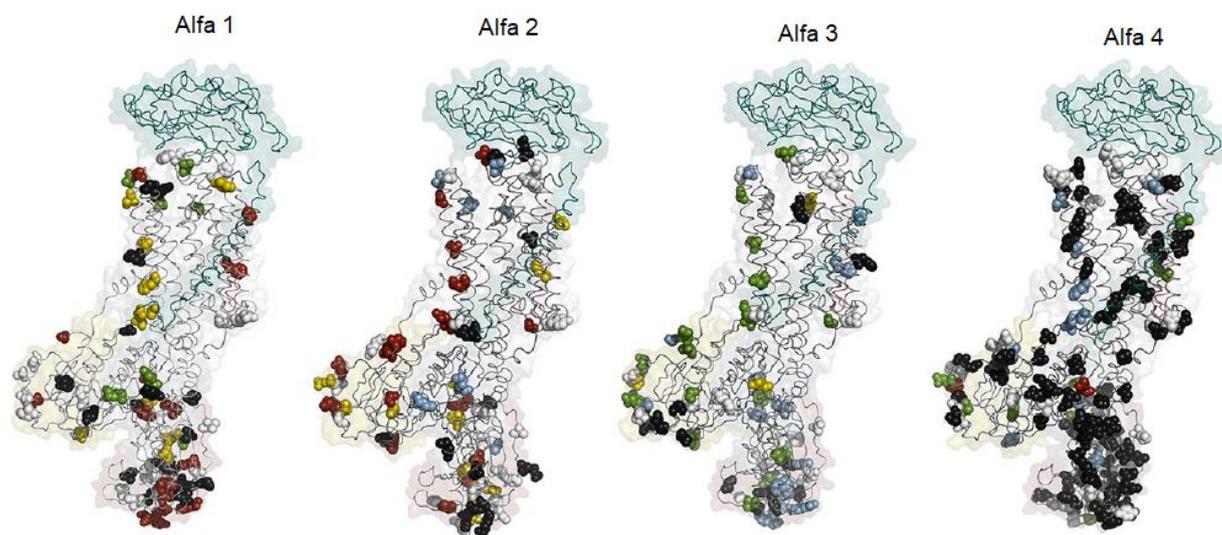


Figura 4. Modelos de homologia para as isoformas da subunidade α de humanos.

Os modelos foram construídos a partir da estrutura 3KDP com o K^+ ocluído (Morth et al., 2007) e as diferenças nas isoformas estão representadas pelos círculos coloridos. Preto: resíduo único na isoforma e conservado nas demais. Branco: resíduo único na isoforma e não conservado nas demais. Azul: resíduo compartilhado com α_1 . Verde: resíduo compartilhado com α_2 . Vermelho: resíduo compartilhado com α_3 . Amarelo: resíduo compartilhado com α_4 . Clausen et al., 2017.

O modelo mais aceito para explicar o ciclo catalítico da (Na^+, K^+) -ATPase é o de Alberts-Post ou modelo E_1 - E_2 (Figura 5), que é baseado em transições conformacionais entre os dois estados principais da enzima: E_1 e E_2 (Alberts, 1967; Post et al., 1972; Kaplan, 2002; Scheiner-Bobis, 2002; Clarke, 2009). Resumidamente, o ciclo ocorre através da alteração de afinidade e acessibilidade do Na^+ e K^+ aos sítios de ligação presentes nos segmentos transmembrana (Apell et al., 2011; Toyoshima et al., 2011; Gadsby et al., 2012). A forma E_1 permite o acesso ao sítio de ligação do cátion exclusivamente pela região intracelular e possui

alta afinidade por Na^+ e ATP, já a forma E_2 , tem alta afinidade pelo K^+ e está voltada para o meio extracelular, não sendo possível o acesso ao sítio de ligação dos íons pelo citoplasma (Sokolov et al., 2001; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004; Poulsen et al., 2010a; Monti et al., 2013; Khalid et al., 2014). Em condições fisiológicas, com alta concentração citoplasmática de potássio e baixa de sódio, a maior parte das enzimas da célula está em conformação E_1 (Schneeberger & Apell, 2001).

De acordo com o modelo, a etapa inicial do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ocorre com a ligação de uma molécula de ATP (etapa ①) à forma $E_2(2\text{K})$, onde os dois K^+ estão ocluídos no interior da enzima (Jorgensen et al., 1998; 2003; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). A energia da ligação do ATP ao seu sítio permite a mudança conformacional $E_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $E_1\text{ATP}2\text{K}$ (etapa ②), que é caracterizado pela reorientação dos sítios de ligação de cátions do lado extracelular para o citoplasma, desocluidindo os íons K^+ . A alteração da conformação da enzima de E_2 para E_1 , causa a diminuição da afinidade por K^+ e a sua liberação para o citoplasma (etapa ③). A substituição destes íons por dois Na^+ dá origem à forma $E_1\text{ATP}2\text{Na}$, não mostrada na Figura 5, que é controlada por difusão sendo, portanto, muito rápida (Apell, 2017). A ocupação do sítio de ligação por dois Na^+ permite a ligação de um terceiro íon Na^+ citoplasmático originando a forma $E_1\text{ATP}3\text{Na}$ (etapa ④), o que provoca um rearranjo dos segmentos transmembrana da subunidade α (Kaplan, 2002; Kanai et al., 2013). Esse rearranjo se propaga para os domínios citoplasmáticos, induzindo o posicionamento adequado do resíduo de aspartato do domínio P que será fosforilado pelo ATP já ligado à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Rice et al., 2001; Kaplan, 2002; Horisberger, 2004).

A liberação de ADP, após a fosforilação da enzima (etapa ⑤), provoca uma transição para a forma $E_1\text{P}(3\text{Na})$, ocorrendo a oclusão dos íons de sódio. A bomba sofre então nova isomerização retornando para a conformação E_2 voltada para o meio extracelular, passando para a forma $E_2\text{P}2\text{Na}$ com a liberação simultânea de um Na^+ (etapa ⑥) para o meio extracelular (Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). Com a mudança conformacional ocorre a perda de afinidade da enzima pelos íons sódio, ocorrendo a liberação dos outros dois Na^+ para fora da célula (etapa ⑦). A ligação de dois K^+ extracelulares (etapa ⑧) à forma $E_2\text{P}$ origina a forma $E_2\text{P}2\text{K}^+$ onde o sítio I é sempre o primeiro a ser ocupado pelo K^+ (Ogawa et al., 2015). A desfosforilação (etapa ⑨) leva a enzima de volta à forma $E_2(2\text{K})$ (Myers et al., 2011), reiniciando o ciclo catalítico.

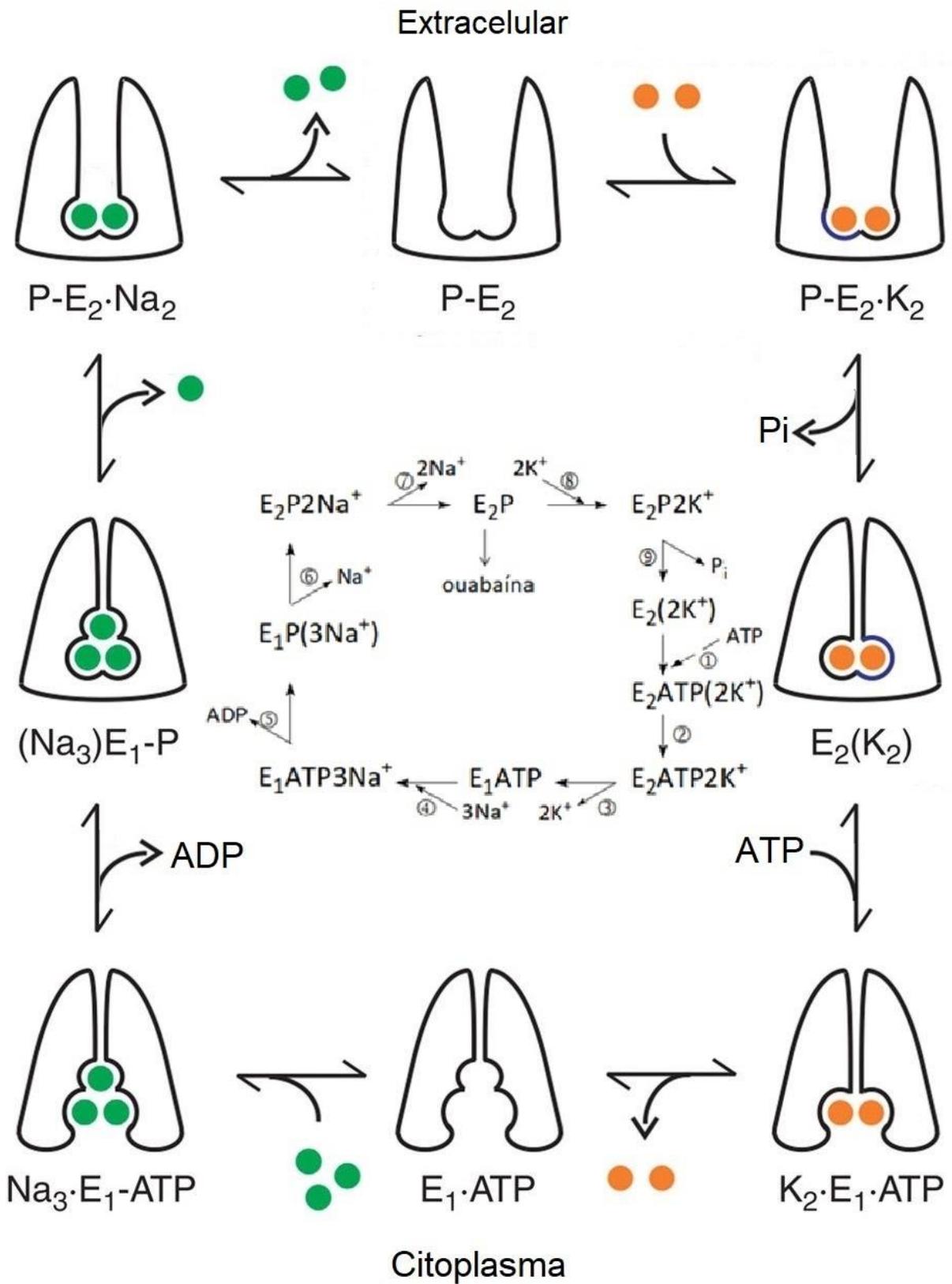


Figura 5. Modelo de Alberts-Post para o ciclo catalítico da (Na^+, K^+) -ATPase. Modificado de Kaplan, 2002; Castillo et al., 2015.

As estruturas dessas duas conformações da (Na⁺, K⁺)-ATPase já foram resolvidas utilizando-se análogos de fosfatos, diferentes íons e diferentes esteroides cardiotônicos (Morth et al., 2007; Ogawa et al., 2009; 2015; Shinoda et al., 2009; Toyoshima et al., 2011; Toyoshima & Cornelius 2013; Kanai et al., 2013; Gregersen et al., 2016). A primeira estrutura cristalina da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi obtida na conformação E2, com uma resolução de 3,5 Å, sendo isolada da medula externa de rim de porco (Morth et al., 2007). A partir da estrutura do complexo $\alpha\beta\gamma$ da (Na⁺, K⁺)-ATPase da glândula retal de tubarão obtida com resolução de 2,4 Å foram identificados os aminoácidos essenciais para os sítios de ligação do K⁺ (Shinoda et al., 2009). Um K⁺ localizado no domínio P citoplasmático também foi encontrado, confirmando a presença de um sítio não transportador para K⁺ (Sorensen et al., 2004; Schack et al., 2008; Shinoda et al., 2009).

A estrutura da conformação E1 da (Na⁺, K⁺)-ATPase (Figura 6) analisada em alta resolução permitiu a identificação dos sítios de ligação para o Na⁺ que interagem com os mesmos aminoácidos relatados para a ligação do K⁺, tanto na região transmembrana quanto no sítio citoplasmático não transportador (Kanai et al., 2013; Nyblom et al., 2013). Estas estruturas mostraram que o tamanho do sítio de ligação dos íons em cada uma das conformações é o maior responsável pela seletividade dos íons, embora a protonação de resíduos importantes também afeta a seletividade dos mesmos (Yu et al., 2011; Cornelius et al., 2018).

A análise do sítio de ligação para a ouabaína com resolução de 2,8 Å de um estado análogo ao E2-2K⁺ permitiu a identificação do sítio de ligação de baixa afinidade para a ouabaína (Ogawa et al., 2009). A análise da estrutura da enzima na conformação E2 ligada a diferentes esteroides cardiotônicos (ouabaína, bufalin e digoxina) possibilitou caracterizar o sítio de ligação de alta afinidade para estes esteroides (Yatime et al., 2011; Laursen et al., 2013; 2015).

Resíduos de aminoácidos importantes para o funcionamento da (Na⁺, K⁺)-ATPase têm sido identificados nos últimos anos (Eguchi et al., 2005; Morth et al., 2007; 2009; 2011; Imagawa et al., 2005; Toustrup-Jensen et al., 2009; Ratheal et al., 2010; Poulsen et al., 2010b; 2012; Roenn et al., 2018). Os resíduos Gli93 e Gli94, localizados no segmento transmembrana TM1 modificam o equilíbrio E1P-E2P, favorecendo a conformação E2P e são importantes para a interação com o Na⁺ e K⁺ (Einholm et al., 2005). A mutação dos resíduos Tre774, Val920 e Glu954 localizados respectivamente nos segmentos transmembranas M5, M8 e M9 altera a afinidade aparente da enzima para o Na⁺ sugerindo que eles são importantes para o transporte deste íon (Imagawa et al., 2005).

Os resíduos Tir1017, Tir768, Arg935 e Lis768 favorecem a fosforilação de E1 e, conseqüentemente também influenciam a interação da enzima com o Na^+ (Toustrup-Jensen et al., 2009). O motivo KETYY na extremidade C-terminal é conservado e neste local se localiza o terceiro sítio de ligação do Na^+ onde os resíduos de Tir desta sequência são essenciais para a oclusão e a afinidade deste íon (Meier et al., 2010; Poulsen et al., 2010b; 2012; Vedovato & Gadsby, 2010; Paulsen et al., 2013).

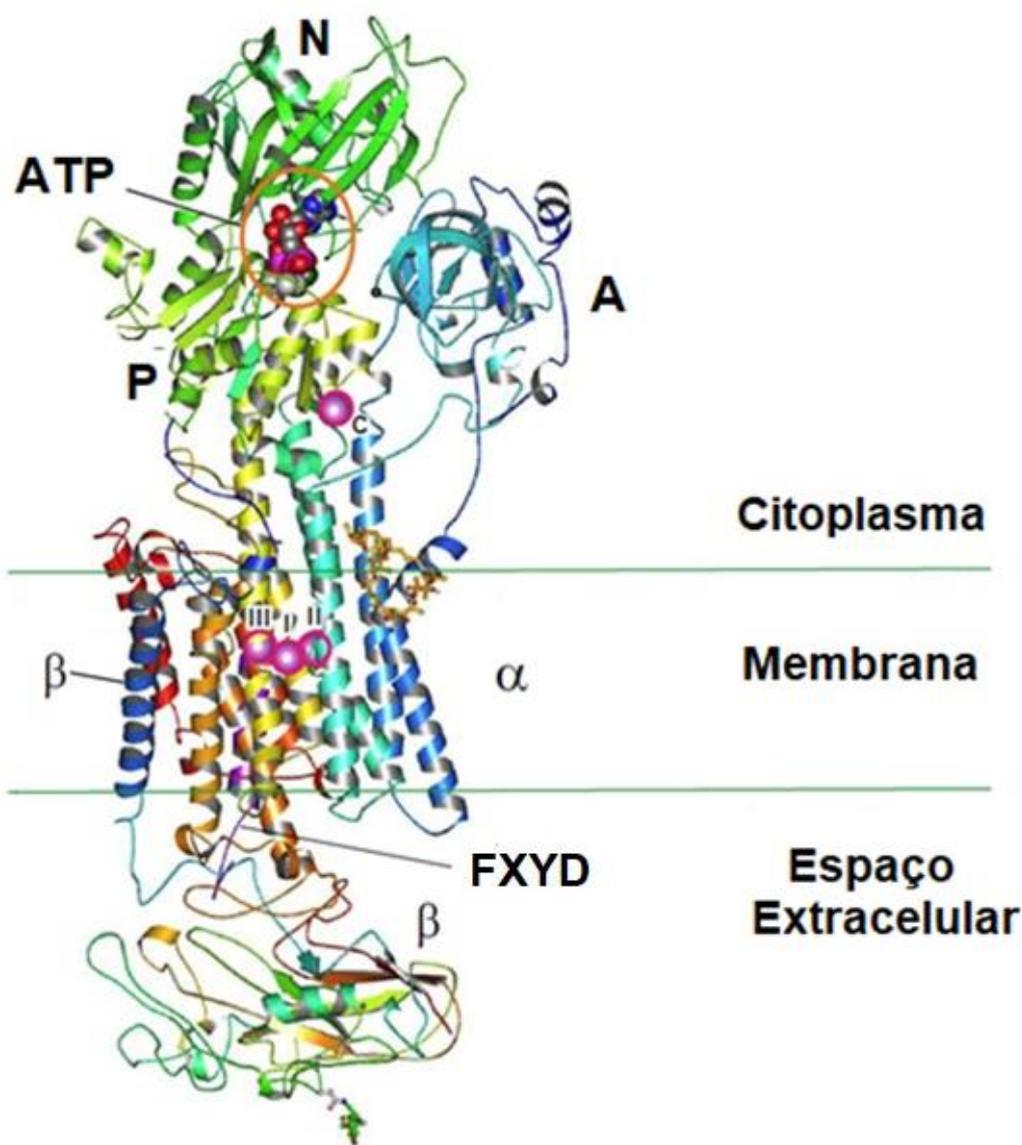


Figura 6. Estrutura cristalina da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do estado de transição antecedente ao intermediário fosforilado E1P onde os três íons sódio estão ocluídos.

As subunidades α e β são mostradas na forma de fita, em azul na extremidade N-terminal e em vermelho na extremidade C-terminal. A subunidade FXYP em roxo na parte posterior da figura. Três Na^+ ligados na região intramembrana (I, II, III) e um na região citoplasmática são mostrados como círculos roxos. Modificado de Kanai et al., 2013.

Na alça extracelular entre M3-M4 estão localizados dois resíduos altamente conservados Glu319 e Leu318, que parecem estar envolvidos na seletividade a cátions, principalmente ao K^+ (Eguchi et al., 2005). Os resíduos Glu334, Glu786 e Asp815 também são importantes para a seletividade a cátions e a protonação destes resíduos é necessária para definir a seletividade ao K^+ (Yu et al., 2011).

A mutação no resíduo de Glu818 presente na alça citoplasmática entre M6 e M7, característica da isoforma α_3 na síndrome de CAPOS (E818K), reduz a afinidade aparente da enzima pelo Na^+ (Roenn et al., 2019). O resíduo Asp742 é importante para o sítio não transportador para K^+ presente no domínio P, participando na desfosforilação da enzima (Sorensen et al., 2004; Schack et al., 2008). Entre os segmentos M4 e M5 existe uma grande alça citoplasmática com cerca de 430 resíduos de aminoácidos onde estão localizados os domínios N e P, que apresenta o resíduo Asp369 que sofre fosforilação durante o ciclo reacional (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003; Horisberger, 2004). Os resíduos Asp443 e Arg544 são importantes para a ligação da enzima com o ATP formando ligações de hidrogênio e interações iônicas com essa molécula, respectivamente (Middleton et al., 2011). Mutações nos resíduos Tre797, Gln111 e Asn122 diminuem a inibição da enzima pela ouabaína (Lingrel, 2010; Dalla et al., 2013).

Esteroides cardiotônicos, encontrados em baixa concentração nos organismos (Aperia et al., 2016), inibem a (Na^+, K^+) -ATPase ligando-se na região extracelular da enzima (Figura 7) e apresentando maior afinidade pela fosfoenzima (E₂P) (Laursen et al., 2015). A ouabaína (Figura 7) é o composto mais representativo desta classe de esteroides e apresenta inibição específica da enzima tanto para a atividade catalítica quanto para o transporte iônico (Kaplan, 2002; Neshet et al., 2007; Cornelius & Mahmmound, 2009; Lingrel, 2010; Liu & Xie, 2010; Cornelius et al., 2011; Miles et al., 2013; Slingerland et al., 2013). Com relação à estrutura da ouabaína, a porção açúcar e as hidroxilas do anel esteroide são essenciais para o potencial de inibição desta molécula (Cornelius et al., 2013).

A ligação da ouabaína à enzima com alta afinidade ocorre na forma E₂P, embora também possa ocorrer interação com outras conformações. A interação enzima-ouabaína ocorre em um bolsão inserido na membrana voltado para o meio extracelular, que envolve resíduos das subunidades α , principalmente nos segmentos M1-M6, e em menor extensão, resíduos da subunidade β (Ogawa et al., 2009; Yatime et al., 2011; Laursen et al., 2013; 2015). No segmento M1 da subunidade α está localizado o resíduo Asp121, o mais relevante para a inibição pela ouabaína (Ogawa et al., 2009; Sandtner et al., 2011; Cornelius et al., 2013; Laursen et al., 2013).

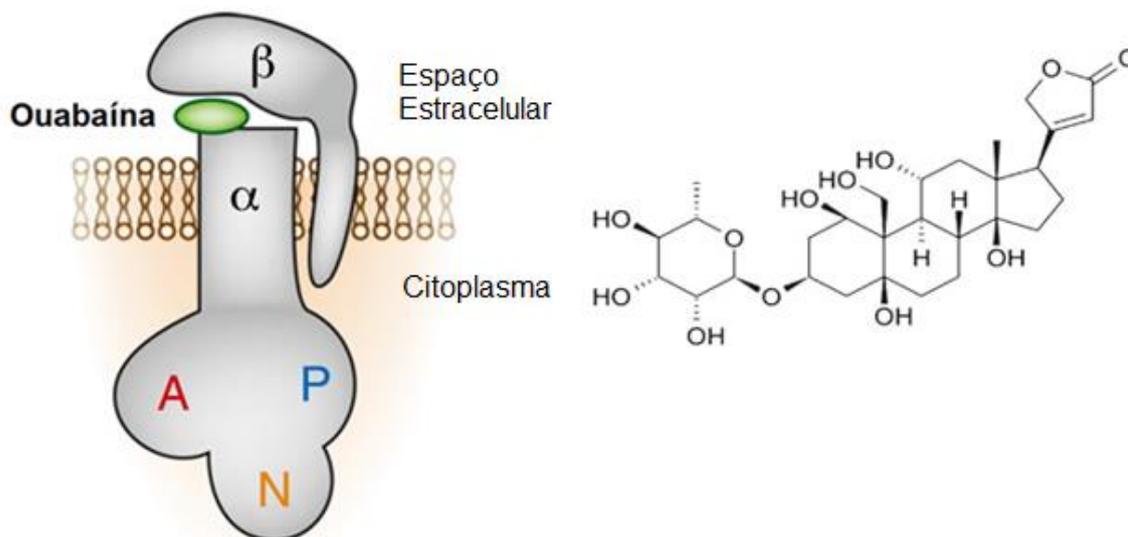


Figura 7. Diagrama da ligação da ouabaína na subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e estrutura química da ouabaína.

Modificado de Aperia, 2012; Slingerland et al., 2013.

O ortovanadato apresenta uma estrutura tetraédrica altamente semelhante à do fosfato e, devido a essa semelhança o ortovanadato inibe as P-ATPases (Boxenbaum et al., 1998; Fedosova et al., 1998; Montes et al., 2012). A inibição ocorre através da ligação do ortovanadato ao aspartato que é fosforilado no ciclo catalítico bloqueando o ciclo reacional e mantendo a enzima num estado semelhante a E2 (Fedosova et al., 1998; Montes et al., 2012).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é fundamental para a manutenção da homeostase sendo importante em uma variedade de transportes ativos secundários e por isso ela é alvo de múltiplos mecanismos regulatórios que são tecido-específicos (Therien & Blostein, 2000; Pirkmajer & Chibalin, 2019). A regulação da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pode ocorrer tanto de forma local, quanto em evento sistêmico, envolvendo um conjunto variável e complexo de fatores (Glynn, 2002; Pressley et al., 2005; Mijatovic et al., 2007; Pirkmajer & Chibalin, 2019). A regulação local envolve efeitos diretos no comportamento cinético da enzima, dependendo inclusive das concentrações intra- e extracelulares de ATP, Na^+ e K^+ , bem como da sua disponibilidade na membrana causada pela sua translocação entre a membrana plasmática e locais de estoque intracelulares (Therien & Blostein, 2000; Feraille et al., 2003). A disponibilidade de energia na célula, eventos de hipóxia, estresse oxidativo, pH, a presença de purinas e NO também contribuem para a regulação da enzima (Clausen, 2003; Pirkmajer & Chibalin, 2016). A regulação também ocorre a nível molecular envolvendo mudanças na transcrição gênica, na tradução e na degradação da proteína, bem como na estabilidade do

RNAm e expressão das diferentes isoformas (Seok et al., 1998; Therien & Blostein, 2000; Colina et al., 2010; Karitskaya et al., 2010; Sottejeau et al., 2010; Li & Langhans, 2015; Pirkmajer & Chibalin, 2019). Vários fatores de transcrição, hormônios, lipídeos, fatores de crescimento, estímulos extracelulares e mecanismos epigenéticos alteram a expressão da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Li & Langhans, 2015).

Modificações covalentes também são capazes de regular a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, sendo a mais relevante delas a fosforilação/desfosforilação. Na subunidade α estão presentes três sítios de fosforilação, um resíduo de Ser, um de Tir e um de Ter e a fosforilação desses resíduos pode afetar a atividade da enzima (Chibalin et al., 1998, 1999, 2001; Feraille et al., 1999; Al-Khalili et al., 2004; Pirkmajer & Chibalin, 2019). A glutationilação, que ocorre nos resíduos de cisteína das subunidades α e β , também tem função na regulação da enzima (Figtree et al., 2009; Liu et al., 2012; Petrushanko et al., 2012; Juel, 2014; Juel et al., 2015). A presença de um peptídeo da família FXYD permite controlar a atividade da enzima bem como a afinidade e capacidade de transportar íons, a partir da interação com a subunidade catalítica (Cornelius & Mahmoud, 2003; Geering, 2006; 2008).

A regulação tanto a curto quanto a longo prazo da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ocorre através de uma série de hormônios e outras moléculas tais como fosfatases (El-Beialy et al., 2010), insulina (Oubaassine et al., 2012), aldosterona (Phakdeekitcharoen et al., 2011; Salyer et al., 2013), cascatas envolvendo proteínas quinases A (Lecuona et al., 2013) e C (Gallo et al., 2010; Wengert et al., 2013), hormônios da tireoide (Shao et al., 2000; Phakdeekitcharoen et al., 2007), progesterona (Cochrane et al., 2012; Deng et al., 2013) e glicocorticoides (Clausen, 2003; Pirkmajer & Chibalin, 2016). Inibidores endógenos semelhantes à ouabaína, as endobaínas, também são importantes na regulação da enzima (Therien & Blostein, 2000; Scheiner-Bobis, 2002; Hansen, 2003).

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

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é a principal força promotora do movimento transepitelial de íons monovalentes em vários tecidos, inclusive nas brânquias. Nos crustáceos, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é a principal força promotora do movimento transepitelial de íons monovalentes através das brânquias e outros tecidos (Lucu & Towle, 2003). A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de crustáceos é constituída por uma subunidade α catalítica e uma subunidade β glicosilada (Peterson et al., 1978). A subunidade α da enzima de crustáceos apresenta 70 a 74% de identidade com a sequência de aminoácidos da enzima dos vertebrados (Macías et al., 1991;

Pressley, 1992; Towle et al., 2001; Faleiros et al., 2010). A presença de um peptídeo FXYD2, a subunidade γ , associada à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi confirmada no tecido branquial do siri *Callinectes danae*, apresentando um papel importante na regulação da atividade da enzima (Silva et al., 2012). A presença de diferentes proteínas da família FXYD durante a aclimação de peixes a diferentes salinidades mostra a importância dessa subunidade no mecanismo de osmorregulação (Tipsmark, 2008; Wang et al., 2008; Yang et al., 2013).

Nos caranguejos braquiúros, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é encontrada predominantemente em células ricas em mitocôndrias que são bioquímica e morfologicamente especializadas para mediar a captação de NaCl do meio ambiente. Essas células são mais comuns nas brânquias posteriores quando comparada às anteriores (Compère et al., 1989; Goodman & Cavey, 1990; Harris & Santos, 1993; Lucu & Towle, 2003). Entretanto, nos camarões palemonídeos aparentemente não existe diferenciação funcional entre as brânquias anteriores e posteriores (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Palacios & Racotta, 2007). O camarão *Macrobrachium amazonicum* possui sete pares de pleurobrânquias, localizadas na câmara branquial cefalotorácica e constituídas de duas hemi-lamelas filobranquiadas, projetando-se de uma base triangular, caracterizadas pela presença de um ou mais eixos de simetria (Freire et al., 2008). Assim como no tecido branquial de *Macrobrachium olfersii*, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *M. amazonicum* estão localizados nas invaginações de membrana das células do septo intralamelar (McNamara & Torres, 1999; Belli et al., 2009).

A pequena concentração da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no tecido branquial de crustáceos e o fato de estar associada à membrana são dois fatores fundamentais que têm impedido a sua purificação, cristalização e realização de estudos estruturais. Assim sendo, a maioria dos estudos já publicados relacionados com a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de crustáceos são baseados na caracterização cinética da enzima do tecido branquial de diferentes espécies, em estudos de aclimação em diferentes salinidades, avaliação de sua expressão em diferentes condições e estudos da ação de poluentes, sempre utilizando homogeneizados ou fração microsomal do tecido branquial.

Há mais de 20 anos, o nosso laboratório iniciou o estudo de caracterização cinética e bioquímica da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de camarões e caranguejos com o objetivo de propor um mecanismo para avaliar a adaptação deste grupo a meios de diferentes salinidades. Esse estudo foi iniciado com a caracterização da atividade ATPase e K^+ -fosfatase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2000; 2001). A caracterização cinética da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial do siri eurialino *C. danae* recém capturado a 33 ‰ revelou, de maneira inédita, a presença de um sítio de alta afinidade para o

ATP, similarmente ao relatado para a enzima de mamíferos (Masui et al., 2002). Posteriormente, também foi relatada a presença desse sítio de alta afinidade na enzima do ermitão *Clibanarius symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012), do camarão *M. amazonicum* (Santos et al., 2007), do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* (Furriel et al., 2010), do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Lucena et al., 2019) e do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata* (Moraes, 2019). Entretanto, para algumas populações de *M. amazonicum* não foi encontrado esse sítio de alta afinidade (Leone et al., 2012; Fabri et al., 2019; este trabalho).

Para o siri eurialino *C. danae* foi relatado que a modulação dos sítios de alta e baixa afinidade para o ATP é muito similar àquela dos íons sódio e potássio. Entretanto, no caso do potássio existe uma concentração limiar que provoca o aparecimento dos sítios de alta afinidade para o ATP (Masui et al., 2008). Por outro lado, a aclimação de *C. danae* a salinidades de 15 ‰ resultou no desaparecimento da família de sítios de ligação de alta afinidade para o ATP (Masui et al., 2009). Isso foi relatado para *Ucides cordatus* aclimatado em baixas salinidades (Lucena et al., 2019b). Já para *Goniopsis cruentata*, o excesso de Mg^{2+} resulta no aparecimento deste sítio (Moraes, 2019).

Nos crustáceos, o NH_4^+ apresenta um importante papel na modulação da atividade da (Na^+, K^+) -ATPase branquial. A interação da enzima de *C. danae* com K^+ e NH_4^+ é diferente daquela dos mamíferos, uma vez que em concentrações saturantes de sódio e potássio ela exibe um sítio adicional para o amônio que estimula sinergicamente a atividade da enzima devido ao aparecimento de um segundo sítio para NH_4^+ (Masui et al., 2002; 2005a). Essa estimulação pelo K^+ e NH_4^+ também foi observada para a enzima de *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012), *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Leone et al., 2014), *Macrobrachium rosenbergii* (França et al., 2013) e *Callinectes ornatus* (Garçon et al., 2007; 2009). Esses resultados levaram à proposição de uma mudança no atual modelo hipotético para a excreção ativa de amônia devido à atividade “extra-pumping” da (Na^+, K^+) -ATPase estimulada pelo NH_4^+ e inibida por Mg^{2+} (Masui et al., 2005a; Leone et al., 2005a; 2017). A aclimação de *M. amazonicum* em diferentes concentrações de NH_4^+ comprovou o modelo proposto (Masui et al., 2005a; Leone et al., 2005a) uma vez que a atividade da (Na^+, K^+) -ATPase aumentou com o incremento da concentração do NH_4^+ (Pinto et al., 2016).

A caracterização cinética da atividade K^+ -fosfatase da (Na^+, K^+) -ATPase do tecido branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2001; 2004; Mendonça et al., 2007), *C. danae* (Masui et al., 2003, 2005b), *M. amazonicum* (Belli et al., 2009; Leone et al., 2013), *C. ornatus*

(Garçon et al., 2013) e *C. symmetricus* (Garçon et al., 2012) mostrou que o p-nitrofenilfosfato, um substrato sintético, pode ser utilizado em estudos comparativos de osmorregulação apresentando uma excelente correlação com a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da enzima. Interessantemente, apenas para *C. ornatus* aclimatado a 21 ‰ e 33 ‰, foi observada uma estimulação sinérgica da atividade K⁺-fosfatase pelo amônio e potássio, representando mais um resultado inédito obtido (Garçon et al., 2013).

Uma vez que os níveis de poliaminas aumentam durante a adaptação dos crustáceos a meios hiperosmóticos, a investigação do efeito de poliaminas exógenas na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase das brânquias posteriores de *C. danae* mostrou que essas moléculas inibem a atividade da bomba competido com o sódio nos sítios de ligação desse cátion bem como inibido a desfosforilação da enzima (Silva et al., 2008) e que o peptídeo FXYD2 controla a atividade enzimática da enzima bem como a sua afinidade por cátions (Silva et al., 2008). A presença desse peptídeo FXYD2 também foi observada em preparações microsomais da (Na⁺, K⁺)-ATPase de brânquia posterior de *C. danae* e aparentemente apresenta um importante papel na regulação da enzima (Silva et al., 2012). Espermina e espermidina inibem a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase de *C. ornatus* (Garçon et al., 2011). Espermidina e putrescina também inibem consideravelmente a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase de *M. amazonicum* afetando não somente as características cinéticas da enzima mas, sobretudo, o mecanismo da reação em animais juvenis e adultos (Lucena et al., 2017a) e, esses efeitos estão relacionados com a fosforilação/desfosforilação da enzima (Lucena et al., 2017b). As poliaminas exógenas inibem a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase de *M. amazonicum* de maneira espécie e estágio específica, sendo que a inibição é devida a diferenças na formação/decomposição da enzima fosforilada (Lucena et al., 2017a, b). Contrariamente, a dopamina atua como um ativador da (Na⁺, K⁺)-ATPase ligando-se diretamente à molécula da enzima em região diferente da ouabaína (Lucena et al., 2019a).

O estudo da ontogenia da osmorregulação em *M. amazonicum* revelou uma importante atividade osmorregulatória da (Na⁺, K⁺)-ATPase nas etapas iniciais do desenvolvimento, porém sendo menos significativa nas fases juvenil e adulta (Leone et al., 2012).

Estudos realizados com brânquias posteriores de *C. ornatus* mostraram que elas respondem de maneira diferente ao estresse osmótico. A diminuição da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase sinaliza a necessidade de síntese de nova enzima, constatado pelo aumento da expressão de mRNA para a subunidade α (Leone et al., 2015b). Cerca de 1 h após a transferência dos animais para salinidade de 21 ‰ a atividade da enzima diminui. Entretanto

a atividade inicial é recuperada após 24 h e aumenta cerca de 3 vezes após aclimatação durante 10 dias (Leone et al., 2015b).

1.4. Osmorregulação nos crustáceos

Os crustáceos surgiram no ambiente marinho há aproximadamente 600 milhões de anos e ainda hoje constituem um grupo essencialmente marinho (Barnes, 2000). Um dos maiores desafios evolutivos ao longo da história de vida é a colonização do ambiente de água doce por espécies marinhas (Lee et al., 2011). Durante todo esse tempo de evolução, vários grupos de crustáceos enfrentaram o desafio osmótico ao invadir ambientes tais como o estuário, a água doce e o ambiente terrestre (Schubart & Diesel, 1998). Dos 30 filos que compreendem o reino animal, todos com origem marinha, apenas 16 invadiram a água doce e apenas sete conquistaram o ambiente terrestre (Lee & Bell, 1999). Um grupo que se destaca entre os crustáceos na invasão de outros ambiente são os decápodes, capazes de explorar e ocupar virtualmente todos os habitats disponíveis no globo terrestre, desde o ambiente marinho até desertos (McNamara & Faria, 2012). Essa invasão do ambiente dulcícola ocorreu há cerca de 3,4 milhões de anos (Schubart et al., 1998).

A ocupação desses diversos ambientes pelos crustáceos levou ao desenvolvimento de vários padrões de estratégias osmorregulatórias nesse grupo de animais (Prosser, 1973). Estas estratégias podem ser classificadas em relação à capacidade dos animais de sobreviverem em diferentes salinidades e quanto à capacidade de regularem os seus fluidos corporais (Péqueux, 1995). Quanto à salinidade, os animais podem ser classificados em *estenoalinos* e *eurialinos*. Os eurialinos podem tolerar grandes variações na salinidade do meio externo, enquanto os estenoalinos não sobrevivem a grandes variações na salinidade (Péqueux, 1995; Randall et al., 2000).

Com relação ao controle de fluidos corporais, os crustáceos podem ser considerados *osmoconformadores* ou *osmorreguladores* (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000). Nos crustáceos osmoconformadores a osmolalidade da hemolinfa é próxima à do ambiente externo enquanto os animais osmorreguladores conseguem manter a osmolalidade da hemolinfa diferente do meio externo, seja ela menor (*hiporregulação*) ou maior (*hiperregulação*) à do ambiente ocupado por estes animais, apresentando capacidades osmorregulatórias diferentes de forma espécie-específica (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000). Os crustáceos hiperreguladores ainda podem ser subdivididos em dois grupos: hiperreguladores fracos e fortes (Péqueux, 1995). Os

hiperreguladores fortes são capazes de manter a osmolalidade da hemolinfa até mesmo no ambiente dulcícola, enquanto os hiperreguladores fracos não conseguem sobreviver em água doce, pois só conseguem hiperregular em meios salobres e por isto habitam estuários (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000).

A diferença entre crustáceos osmorreguladores e osmoconformadores pode ser explicada pela ação de dois sistemas de regulação osmótica, a **regulação anisomótica extracelular** (RAE) e a **regulação isomótica intracelular** (RII) (Thabet et al., 2017), que são caracterizados pela manutenção da osmolalidade e composição da hemolinfa, e a manutenção do volume e a composição do meio intracelular, respectivamente (Florkin & Schoffeniels, 1969; Péqueux, 1995; Lang & Waldegger, 1997; Wehner et al., 2003; Henry et al., 2012; Thabet et al., 2017). A RAE é realizada pelas alterações na permeabilidade de diferentes superfícies corporais em relação a íons e água do meio externo, bem como pela absorção ou secreção ativa de sais (Mantel & Farmer, 1983; Péqueux, 1995). Já a RII é constituída pelo ajuste do nível intracelular dos efetores osmóticos tais como íons, peptídeos e aminoácidos livres, bem como o controle do volume celular (Péqueux, 1995; Schmidt-Nielsen, 1996). A maior eficiência da RAE em manter a osmolalidade da hemolinfa estável causa uma maior proteção das células e tecidos a variações no volume, reduzindo a dependência de RII (Augusto et al., 2007).

Crustáceos marinhos geralmente são osmoconformadores e estenoalinos, não realizando RAE, já que este ambiente apresenta uma pressão osmótica alta e constante. Porém algumas espécies podem se apresentar como osmorreguladores fracos em salinidade menores que a do mar, suportando certa diminuição da salinidade (Péqueux, 1995; Schubart & Diesel, 1998; Thabet et al., 2017). Animais que vivem em estuários são eurialinos e em grande maioria são reguladores fracos. Uma menor permeabilidade para a água do meio externo, uma forte presença do processo RII e um aumento da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e anidrase carbônica em comparação com os animais marinhos permitiu a invasão deste ambiente que é marcado por grandes mudanças de salinidade (Thabet et al., 2017).

Crustáceos de água doce apresentam uma carapaça com menor permeabilidade para água e íons, bem como maior ação dos dois sistemas citados para manter a osmolalidade de sua hemolinfa. Estas características permitiram o sucesso da colonização do ambiente dulcícola, mantendo uma alta osmolalidade de sua hemolinfa em relação ao meio externo. Estes animais apresentam graus variados de sobrevivência em salinidades maiores. (Péqueux, 1995; Morris & Aardt, 1998; Onken & McNamara, 2002; Lucu & Towle, 2003; McNamara & Faria, 2012). Esse diversificado padrão de mecanismos osmorregulatórios é resultado da

variação genética e seleção natural em condições ambientais específicas a que cada espécie foi submetida ao longo do processo evolutivo (McNamara & Faria, 2012).

Espécies habitantes em água doce apresentam o epitélio da parede corporal menos permeável do que o de outros crustáceos, isto foi fundamental para a invasão deste ambiente e enfrentar o influxo de água e a perda passiva de sais (Morris & Aardt, 1998; McNamara & Faria, 2012). Alguns órgãos são importantes para que os crustáceos regulem a osmolalidade da hemolinfa destacando-se dentre eles as brânquias, o intestino e as glândulas antenais (Péqueux, 1995; Lima et al., 1997; Thabet et al., 2017).

As brânquias são órgãos multifuncionais envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como: excreção de amônio, regulação do equilíbrio ácido-base, trocas gasosas e manutenção da osmolalidade da hemolinfa (Henry & Wheatly, 1992; Péqueux, 1995; Weihrauch et al., 2004a; Henry et al., 2012). Elas se localizam em câmaras branquiais formadas entre a parede torácica corporal e branquiostegito (carapaça lateral) dos crustáceos (Taylor & Taylor, 1992) apresentando iônócitos, células especializadas em trocas iônicas (Péqueux, 1995). Em camarões palemonídeos, as brânquias são filobrânquias que não se diferenciam morfológicamente entre anteriores e posteriores, desempenhando as funções de trocas gasosas e transporte iônico enquanto o epitélio branquial apresenta um septo intralamelar bem desenvolvido e não fenestrado (Taylor & Taylor, 1992; Freire & McNamara, 1995; Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010). Nos camarões palemonídeos as células pilares estão ligadas às células do septo intralamelar por junções intercelulares, criando dois compartimentos simétricos e dirigindo o fluxo da hemolinfa pela lamela no sentido do canal marginal aferente para o canal marginal eferente (Freire & McNamara, 1995; Belli et al., 2009). Além disso, os iônócitos das brânquias de decápodes eurialinos apresentam invaginações basais ricas em mitocôndrias e invaginações apicais formando o espaço subcuticular e uma cutícula robusta (Taylor & Taylor, 1992). A Figura 8 mostra uma representação esquemática da câmara branquial de *M. olfersii* bem como detalhes de uma única lamela de uma filobrânquia posterior e a disposição dos vasos sanguíneos na região basal.

As glândulas antenais são importantes na regulação do volume dos fluídos corporais, mantendo a concentração de alguns solutos orgânicos e inorgânicos, com destaque para os íons bivalentes e, em algumas espécies, também participam da reabsorção de NaCl (Baldwin & Kirschner, 1976; Mantel & Farmer, 1983; Péqueux, 1995).

Os camarões da família Palemonidae são hiper/hipoosmorreguladores e apresentam diferentes padrões de regulação iônica e osmótica da hemolinfa, o que permite a ocupação de

diferentes nichos osmóticos, refletindo tanto em características morfológicas e fisiológicas quanto no ciclo de vida destas espécies (Freire et al., 2003). As espécies que formam o gênero *Macrobrachium* apresentam diferentes graus de dependência da água salgada (algumas populações se desenvolvem inteiramente em água doce), sendo que o *M. amazonicum* é considerado uma espécie diádroma, dependendo da água salobra nos seus estágios larvais (Moreira et al., 1983; Freire et al., 2003; McNamara et al., 2004; Pantaleão et al., 2012; Boudour-Bouchecker et al., 2014).

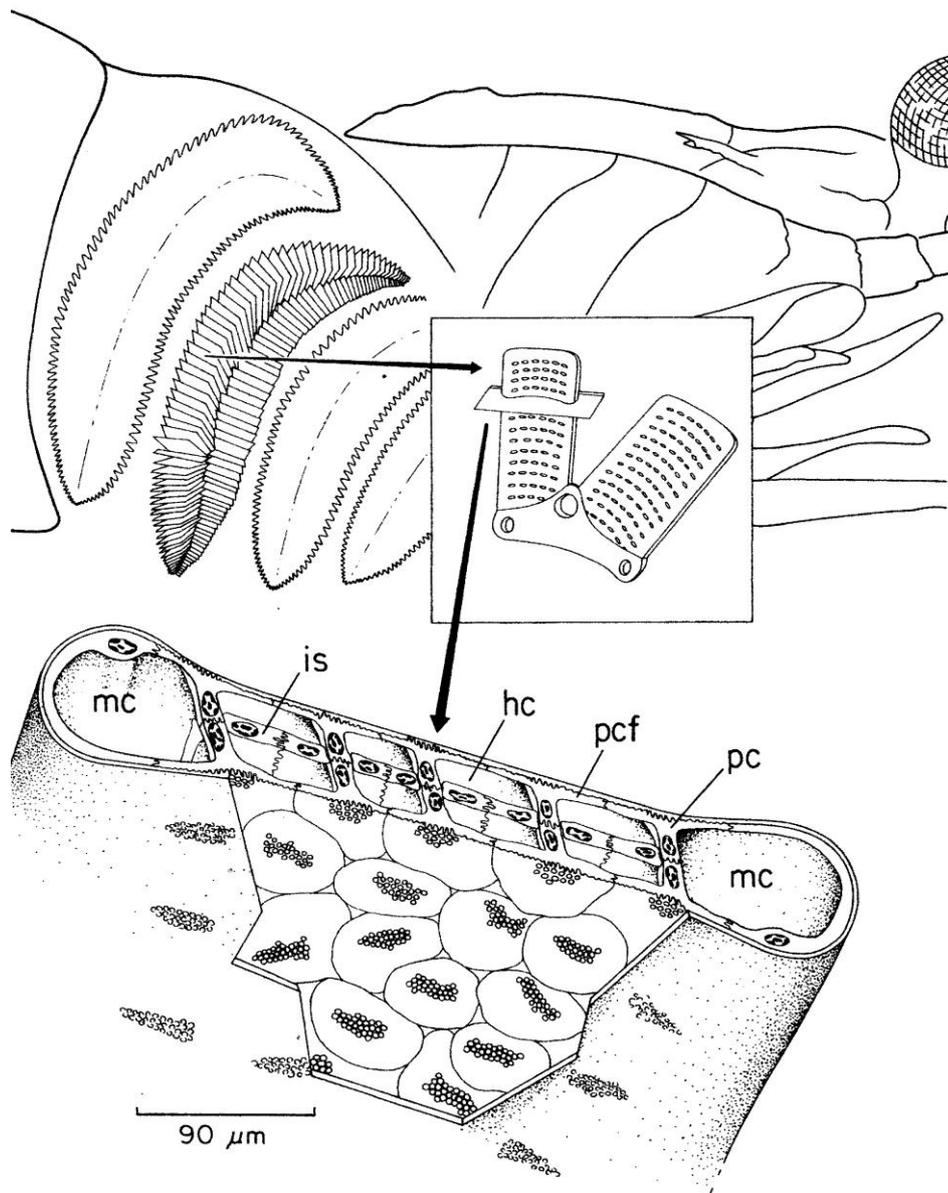


Figura 8. Representação esquemática da câmara branquial de *Macrobrachium olfersii*. A reconstrução tridimensional de uma seção transversal da lamela ao longo de seu eixo curto mostra as células pilares (pc), as franjas das células pilares (pcf), o septo intralamelar (is), os canais de hemolinfa (hc) e os canais marginais laterais (mc). Freire & McNamara, 1995.

M. amazonicum em suas fases juvenil e adulta são hiperreguladores em água doce, semelhantemente a outras espécies do gênero *Macrobrachium* (Tabela 1). O valor de osmolalidade da hemolinfa dos juvenis é menor que a dos adultos, lógica esta que se inverte em *M. rosenbergii* (Wilder et al., 1998 ; Singh, 1980; Sandifer et al., 1975; Armstrong et al., 1981). Considerando que a existência de um menor gradiente entre a osmolalidade do meio externo e da hemolinfa necessita menor energia (Augusto et al., 2007), aparentemente estas espécies se adaptaram de forma distinta ao longo da evolução provavelmente necessitando de um maior gasto energético em outras funções nos diferentes estágios ontológicos (Fabri, 2019, este trabalho).

A osmolalidade da hemolinfa do *M. amazonicum* apresenta valores próximos ao de outras espécies do gênero *Macrobrachium*, como por exemplo *M. olfersii*, *M. tuxtlaense*, *M. rosenbergii*, *M. brasiliense* e *M. nipponense*. Entretanto estas espécies apresentam desenvolvimentos diferentes. Enquanto o *M. nipponense*, o *M. brasiliense* e o *M. tuxtlaense* são espécies hololimnéticas, os demais são animais que necessitam da água salobra para seu desenvolvimento, sendo portanto menos adaptados ao ambiente dulcícola em relação ao primeiro grupo (Wilder et al., 1998; Freire et al., 2003; Ordiano et al., 2005; Lucena, 2014; Huang et al., 2019). Um parâmetro que melhor reflete a adaptação dessas espécies à água doce é o valor do ponto isosmótico da hemolinfa, que será menor quanto melhor a adaptação da espécie à água doce (Mantel & Farmer, 1983). O *M. amazonicum* ainda depende da água salobra para se desenvolver sendo, portanto, menos adaptado ao ambiente dulcícola que espécies hololimnéticas. Isto se reflete no ponto isosmótico da sua hemolinfa que é maior comparado com a de espécies hololimnéticas do gênero *Macrobrachium*, tais como *M. nipponense*, *M. equidens*, *M. potiana*, e *M. brasiliense* (Denne, 1968; Moreira et al., 1983; Freire et al., 2003; Augusto et al., 2007; Huang et al., 2019).

A capacidade osmorregulatória dos crustáceos de água doce depende do movimento transbranquial do Na^+ e Cl^- do meio externo para a hemolinfa (Péqueux, 1995; Kirschner, 2004; Freire et al., 2008; Henry et al., 2012). Esta função regulatória é energeticamente dirigida principalmente pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, presente na membrana basolateral do epitélio branquial dos crustáceos e que transporta ativamente em sentidos opostos o Na^+ e o K^+ entre o meio intracelular e a hemolinfa (Kirschner, 2004; Freire et al., 2008; Sáez et al., 2009; Boudour-Bouchecker et al., 2014). Uma outra força motriz é uma $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ apical, que também apresenta importante papel osmorregulatório durante a transição da água do mar para a água doce (Morris, 2001; Weihrauch et al., 2004a; Boudour-Bouchecker et al., 2014).

Tabela 1. Osmolalidade da hemolinfa e ponto isosmótico de camarões do gênero *Macrobrachium*.

Espécie	Osmolalidade*	Ponto isosmótico*	Referência
<i>M. amazonicum</i> juvenil cultivado	265	-	Lucena, 2014
<i>M. amazonicum</i> adulto cultivado	338	-	Lucena, 2014
<i>M. amazonicum</i> da Represa da Usina São Geraldo	403	684	Augusto et al., 2007
<i>M. amazonicum</i> da Represa Santa Elisa	400	720	Faleiros et al., 2010
<i>M. olfersii</i>	336	428	Freire et al., 2003
	520	620	Moreira et al., 1983
	340	≈870	Lima et al., 1997
<i>M. nipponense</i>	297	490	Huang et al., 2019
<i>M. tuxtlaense</i>	407	700	Ordiano et al., 2005
<i>M. brasiliense</i>	412	521	Freire et al., 2003
<i>M. potiuna</i>	418	562	Freire et al., 2003
	493	552	Moreira et al., 1983
<i>M. rosenbergii</i> adulto	425	≈500	Wilder et al., 1998
	360	485	Singh, 1980
<i>M. rosenbergii</i> juvenil	473	515	Sandifer et al., 1975
	450	693	Armstrong et al., 1981
<i>M. carcinus</i>	461	492	Moreira et al., 1981
<i>M. equidens</i>	-	529	Denne, 1968
<i>M. australiense</i>	520	-	Denne, 1968
<i>M. tenellum</i>	485	533	Aguilar et al., 1998
<i>M. petersii</i>	475	-	Read, 1984
<i>M. acanthurus</i>	440	640	Moreira et al., 1983
	409	-	Maraschi et al., 2015
	400	≈450	C. A. Freire, et al., 2017
<i>M. heterochirus</i>	425	647	Moreira et al., 1983
<i>M. ohione</i>	462	643	Castille & Lawrence, 1981

* Valores em mOsm kg⁻¹ H₂O. 1 ‰S= 30 mOsm kg⁻¹ H₂O.

Além das ATPases existem outros transportadores que contribuem para regulação osmótica energizando o processo e participando na absorção de NaCl do meio externo tais como o trocador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ apical, canais de cloreto basolaterais, canais de K^+ apicais e basolaterais, trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical, trocador Na^+/H^+ (Kirschner, 2004; Freire et al., 2008; Sáez et al., 2009; Towle et al., 2011; Yang et al., 2011; Rahi et al., 2017).

A anidrase carbônica, a calreticulina, diferentes hormônios peptídicos, fatores de transcrição e as enzimas do estresse oxidativo também apresentam um papel crítico nas funções osmorregulatórias das brânquias dos crustáceos (Henry, 1988a, b; Skaggs & Henry, 2002; Thabet et al., 2017; Moshtaghi et al., 2017; 2018).

A distribuição destes transportadores depende do ambiente onde se encontra uma dada espécie. A Figura 9 descreve um mecanismo hipotético de hiper/hipoosmorregulação para camarões palemonídeos (McNamara & Faria, 2012).

Na absorção de NaCl existem duas forças motrizes espacialmente separadas: a primeira representada pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, localizada nas invaginações da membrana plasmática das células do septo (McNamara & Torres, 1999; Belli et al., 2009), a segunda representada pela $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, localizada nas membranas apicais das franjas das células pilares (Faleiros et al., 2010).

O Na^+ do meio externo passa para o citosol das células pilares através de canais de Na^+ apicais, energizado pelo potencial de membrana criado pela extrusão de H^+ pela $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ causando hiperpolarização destas células (Onken & Riestenpatt, 1998; Ituarte et al., 2016). Então canais de Na^+ levam estes íons para as células do septo, graças à baixa concentração de sódio intracelular nessas células causada pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, que bombeia esses íons para a hemolinfa (Onken & Riestenpatt, 1998; McNamara & Faria, 2012). Já a absorção do Cl^- ocorre através do antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical na célula pilar (Torres, 2006). Estes íons podem passar para a hemolinfa diretamente através de canais de Cl^- localizados na membrana inferior das células pilares ou através de canais de Cl^- basais passando pelas células do septo e depois para a hemolinfa, acompanhando o Na^+ (McNamara & Faria, 2012).

Quando expostos a altas salinidades os camarões palemonídeos hiperregulam, necessitando secretar Na^+ e Cl^- (Péqueux, 1995; McNamara & Faria, 2012). Esta exposição causa alterações na expressão e na atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ no tecido branquial, sendo estas alterações são espécie-dependente e muitas vezes também tempo-dependente, porém algumas espécies não apresentam alterações significativas (Mendonça et al., 2007; Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010; 2017; Leone et al., 2014; Lucena et al., 2015;

Maraschi et al., 2015; Ituarte et al., 2016; Freire et al., 2018; Huang et al., 2019).

Os diferentes efeitos que estes animais sofrem quando em alta salinidade mostram que a regulação osmótica muitas vezes não depende apenas da expressão e atividade de suas principais forças motrizes, mas também de outras formas de regulação, como a expressão de diferentes isoformas destas enzimas, regulação por fosforilação das mesmas, ou envolvimento de outras enzimas e transportadores nesse processo (Leone et al., 2014; Maraschi et al., 2015; Lucena, 2017b). As diferentes estratégias de adaptação ao estresse osmótico destes animais permitem que eles ocupem uma ampla variedade de nichos osmóticos (Faleiros et al., 2017).

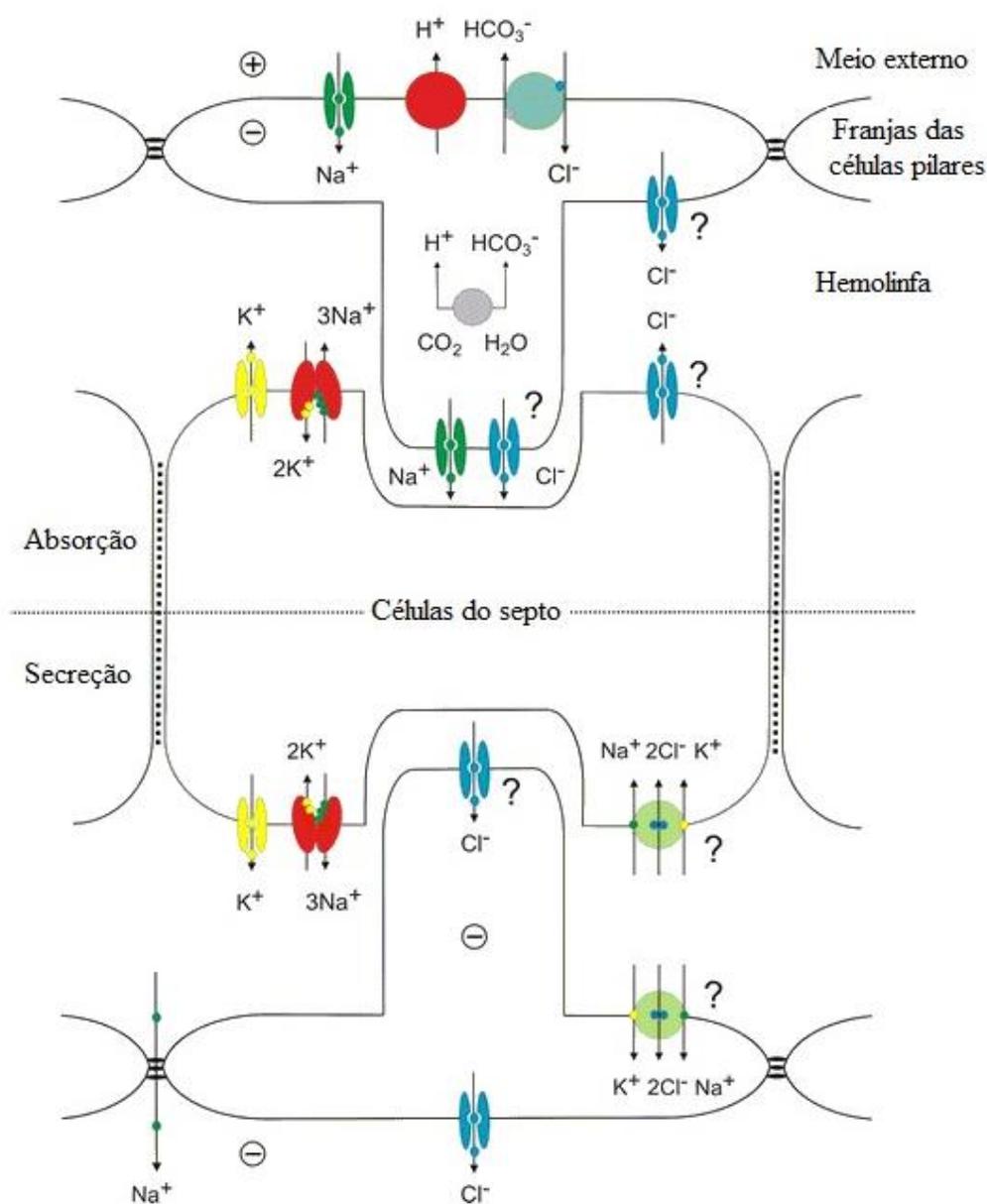


Figura 9. Modelo de hiper/hiposmorregulação em camarões palemonídeos.
Modificado de McNamara & Faria, 2012.

A secreção de NaCl pelos camarões palemonídeos aparentemente é movida pelo simporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ e pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (parte inferior da Figura 9; McNamara & Faria, 2012). O Na^+ e o Cl^- da hemolinfa entra nas células do septo através do simporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ presente na membrana basal, favorecidos pelo gradiente favorável de Na^+ causado pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ que, por sua vez, leva os íons sódio de volta para a hemolinfa (Luquet et al., 2005), com os íons K^+ sendo reciclados por canais basais de K^+ (McNamara & Faria, 2012). Estes canais sustentam o potencial negativo da célula permitindo o transporte do Cl^- através de canais basais de Cl^- através das células pilares até finalmente serem secretados para o meio externo através de canais apicais de Cl^- (McNamara & Faria, 2012). O efluxo de Cl^- cria um potencial elétrico negativo no espaço subcuticular energizando o efluxo de Na^+ paracelular entre as franjas das células pilares (McNamara & Faria, 2012).

1.5. $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$

A regulação do pH dos diferentes compartimentos intracelulares e do ambiente extracelular é crucial para a homeostase celular e de importância fundamental para a ocorrência de transportes através da membrana, degradação proteica, reabsorção óssea, desenvolvimento dos espermatozoides e vários processos de sinalização celular (Kane, 2006; Forgac et al., 2007; Toei et al., 2010; Wang & Hiesinger, 2013; Cotter et al., 2015). A $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, vacuolar $(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, é um grande complexo proteico que realiza o transporte de prótons utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP e que apresenta uma estequiometria de transporte de 2 a 3,3 prótons por molécula de ATP (Cross & Muller, 2004; Malkus et al., 2004; Forgac, 2007). A distribuição da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ ocorre nos mais diversos tipos celulares nas membranas dos compartimentos intracelulares, principalmente lisossomos, endossomos e vesículas secretoras, sendo responsável pela acidificação destas (Cipriano et al., 2008; Wang & Hiesinger, 2013; Cotter et al., 2015). Em alguns tipos celulares a $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ também está presente na membrana celular, como nas células renais, osteoclastos e macrófagos realizando o transporte de prótons para o meio extracelular (Cipriano et al., 2008; Toei et al., 2010).

Embora as $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPases}$ desempenham um papel fisiológico distinto das F-ATPases ($\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$), elas apresentam muitas semelhanças tanto estruturalmente quanto em relação ao mecanismo (Forgac, 2007; Marshanky & Futai, 2008; Futai et al., 2012). As $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPases}$ têm uma relação evolutiva e estrutural ainda mais próxima com as ATPases de arqueias (A-ATPases) (Cross & Müller, 2004; Forgac, 2007).

A $V(H^+)$ -ATPase (Figura 10) é um grande complexo proteico formado por 14 subunidades diferentes, que se arranjam em duas estruturas funcionais, o domínio integral de membrana V_0 , responsável pelo transporte de prótons e o domínio V_1 hidrofílico, voltado para o citoplasma, que realiza a hidrólise do ATP, ambos atuando de forma colaborativa através de um mecanismo rotatório para permitir o transporte de prótons (Ohira et al., 2006; Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Toei et al., 2010; Marshansky et al., 2014; Collins & Forgac, 2018). Em leveduras, o domínio V_0 apresenta M_r de 260 kDa e possui seis subunidades seguindo a estequiometria **ac₄₋₅c'c''de**. Em mamíferos a subunidade **c'** é substituída por uma proteína auxiliadora Ac45 (Forgac, 2007; Toei et al., 2010; Marshansky et al., 2014; Cotter et al., 2015). O domínio V_1 é um complexo citoplasmático periférico formado por oito subunidades distintas, seguindo a estequiometria **A₃B₃CDE₂FG₃H**, apresentando M_r de 650 kDa (Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010; Scott et al., 2011; Benlekbir et al., 2012).

No domínio V_0 , as subunidades **c**, **c'** e **c''** são hidrofóbicas e estão embebidas na membrana, sendo compostas de quatro (**c** e **c'**) ou cinco (**c''**) hélices transmembrana, denominadas proteolipídeos e se arranjam em forma de anel apresentando uma subunidade **c'**, uma **c''** e várias **c** (Wilkins & Forgac, 2001; Forgac, 2007; Wang et al., 2007; Toei et al., 2010). Cada uma destas subunidades proteolipídicas apresenta um resíduo de glutamato altamente conservado que, durante o transporte de prótons, é protonado reversivelmente (Hirata et al., 1997; Toei et al., 2010). A subunidade **a** também tem um papel crucial no transporte de prótons, possuindo dois domínios, o domínio N-terminal, hidrofílico e voltado para o citosol, enquanto a porção C-terminal é hidrofóbica e está presente na membrana, sendo formada por 8 ou 9 hélices transmembranas (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008). A organização do domínio C-terminal da subunidade **a** origina dois hemi-canais, um voltado para o citosol e outro em direção contrária, utilizados para a passagem dos prótons durante o transporte. Um dos hemi-canais é formado pelas alças TM7-8 e TM3, enquanto o outro é formado por TM4 e TM7, na alça TM7 está presente um resíduo de arginina que auxilia a desprotonação do resíduo de glutamato do anel, permitindo o transporte de prótons (Forgac, 2007; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010; 2011; Cotter et al., 2015). Já a subunidade **d** conecta o anel proteolipídico **c** à haste central de V_1 (Toei et al., 2010).

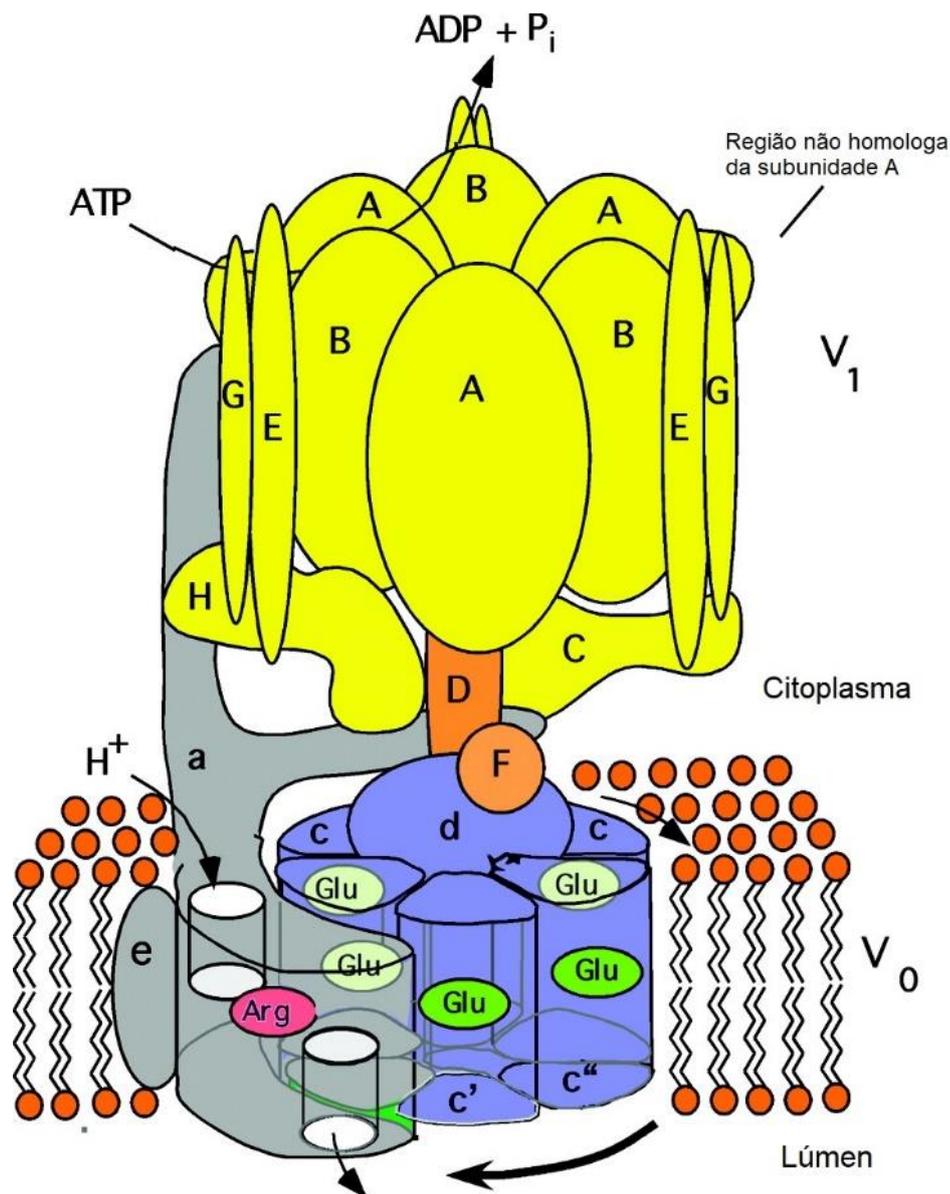


Figura 10. Representação esquemática da V(H⁺)-ATPase de *Saccharomyces cerevisiae*.

O domínio V₁ (amarelo e laranja) e o domínio V₀ (azul e cinza).

Modificado de Toei et al., 2010.

As subunidades **A** e **B** do domínio V₁ apresentam três cópias de cada subunidade que se arranjam em posições alternadas formando um hexâmero. Em três intersecções das subunidades **A** e **B**, se localizam os três sítios catalíticos onde ocorre a hidrólise do ATP que são formados principalmente pelos resíduos da subunidade **A** (MacLeod et al., 1998; Forgac, 2007; Toei et al., 2010). Nas outras faces da intersecção **A-B** também estão presentes sítios de ligação de ATP, sendo formados principalmente pelos resíduos da subunidade **B**. Entretanto nestes sítios não ocorre a hidrólise de ATP e aparentemente apresentam função regulatória (MacLeod et al., 1998; Vasilyeva et al., 2000; Forgac, 2007; Toei et al., 2010). A principal diferença estrutural entre estas subunidades é a presença de uma protuberância no topo da

subunidade **A**, constituída de 80-90 aminoácidos e denominada região não homologa da subunidade **A** (Hilario & Gogarten, 1998; Maegawa et al., 2006; Schafer et al., 2006; Marshansky et al., 2014).

As demais subunidades do domínio V_1 se arranjam em hastes, que ligam os dois domínios, sendo uma haste central, composta das subunidades **D** e **F**, que penetra na cavidade do anel **A₃B₃** e se liga com a subunidade **d** do domínio V_0 , mantendo a distância entre os dois domínios em 100 Å e rotacionando para permitir o acoplamento da energia proveniente da hidrólise do ATP com a rotação do anel do domínio V_0 (Maher et al., 2009; Numoto et al., 2009; Toei et al., 2010; Arai et al., 2013; Nagamatsu et al., 2013; Marshansky et al., 2014; Ueno et al., 2018). As outras subunidades **C**, **E**, **G** e **H**, formam duas hastes que atuam de forma conjunta com a subunidade **a** do domínio V_0 para manter o subdomínio **A₃B₃** estático durante o ciclo catalítico (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010).

Estruturas cristalinas resolvidas em alta resolução do subdomínio **A₃B₃** de *Enterococcus hirae* têm revelado mais sobre a dinâmica da hidrólise de ATP no domínio V_0 (Figura 11) (Ueno et al., 2018; Singharoy et al., 2019). As subunidades **A** e **B** são compostas por três domínios: na parte N-terminal por barril β , uma porção central de α/β e um domínio helicoidal na parte C-terminal (Figura 11A) (Arai et al., 2013; Ueno et al., 2018). Ao contrário do domínio F_1 das F-ATPase, os sítios de hidrólise de ATP do anel **A₃B₃** da $V(H^+)$ -ATPase são assimétricos. Quando uma subunidade (**A** e **B**) apresenta uma conformação fechada (**C**), as outras duas apresentam uma conformação aberta (**O** e **O'**) que se combinam para originar três sítios distintos entre si, denominados de “vazio”, “ligado” e “ligável” (Figura 11A) (Shirakihara et al., 1997; Uchihashi et al., 2011; Arai et al., 2013; Ueno et al., 2018).

A presença da haste central, subunidades **D** e **F**, na estrutura cristalina provoca mudanças de conformações nas subunidades **A** (**C**) e **B** (**O'**) para uma conformação mais fechada (**CR**), gerando alterações nos sítios ligável e ligado, gerando os sítios “ligado” e “restrito”, respectivamente (Figura 11B). A ausência ou ocupação dos sítios ligado e restrito por um análogo de ATP (adenosina 5'-(β,γ imida)trifosfato, AMPPNP) não altera as conformações das subunidades **A** e **B**, enquanto o sítio vazio não é ocupado mesmo em concentrações da ordem de 2 mol L⁻¹ (Arai et al., 2013; Ueno et al., 2018). Estruturas com duas moléculas de ADP ligados ao sítio restrito e ligado revelaram alterações de conformações no sítio restrito (subunidade **A** de **CR** para **C** e **CR** para **C'** na subunidade **B**). No sítio vazio algumas alterações cooperativas também acontecem, porém nenhuma alteração

foi detectada no sítio ligado (Figura 11C) (Suzuki et al., 2016; Ueno et al., 2018). A ligação de uma terceira molécula de ADP ainda é responsável por outras mudanças nesta estrutura nas subunidades A e B, além de apresentar a ligação de um sulfato no sítio similar ao ligável (Suzuki et al., 2016; Ueno et al., 2018).

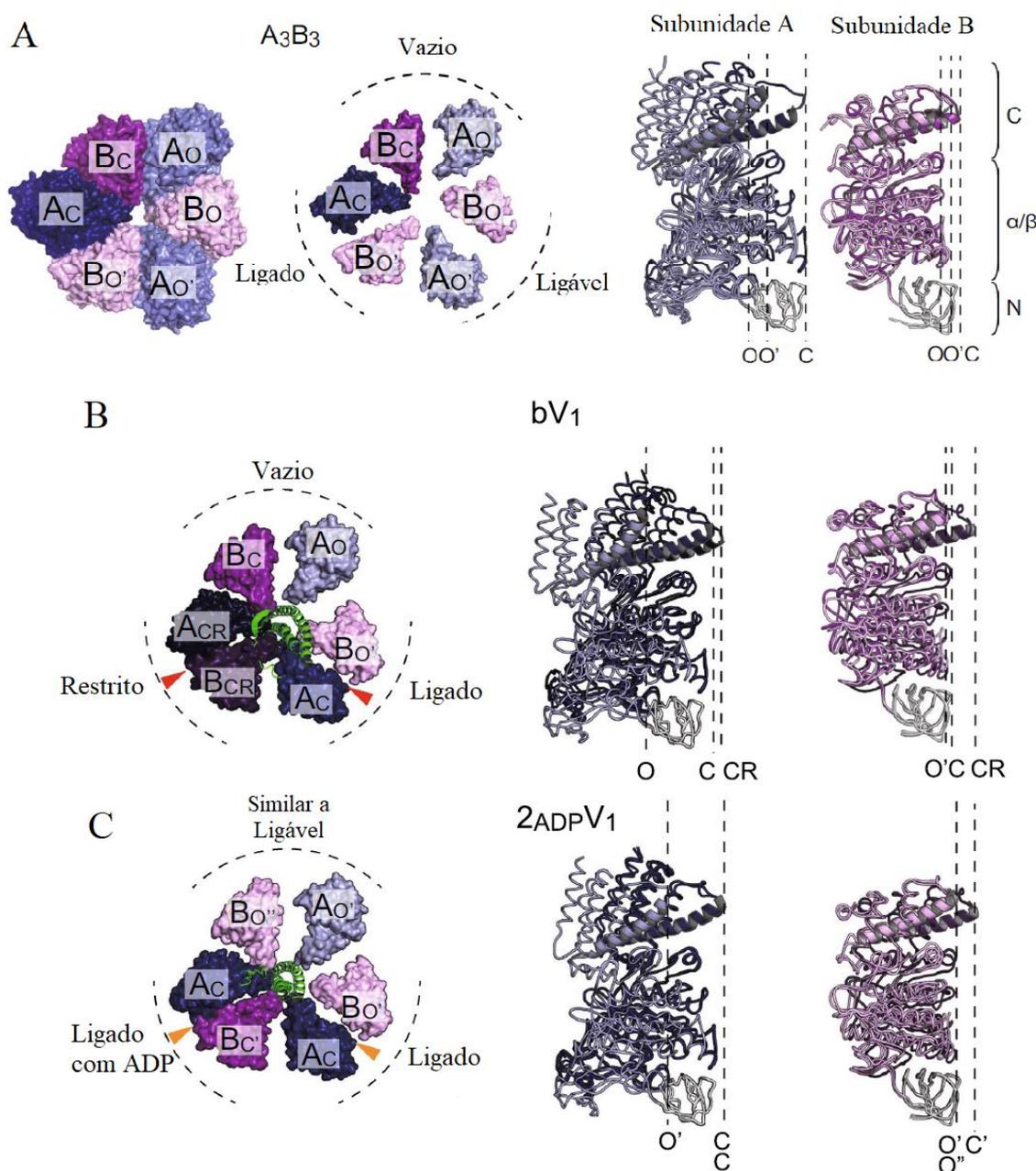


Figura 11. Estrutura do subdomínio A_3B_3 de *E. hirae*.

A- Estrutura cristalina do subdomínio A_3B_3 na ausência de nucleotídeo. **B-** Estrutura cristalina do subdomínio A_3B_3 com dois AMPPNP ligados. **C-** Estrutura cristalina do subdomínio A_3B_3 com dois ADP ligados.

Modificado de Ueno et al., 2018.

O ciclo catalítico das $V(H^+)$ -ATPases ocorre através de um mecanismo rotacional que considera que o hexâmero A_3B_3 seja estacionário em relação à subunidade **a**. Isto é garantido pelas hastes periféricas, formadas pelas subunidades **C**, **E**, **G** e **H**, e pelo domínio N-terminal da subunidade **a**. Isto ocorre através da interação das subunidades **G** e **E** entre si e com a subunidade **B** do hexâmetro, o par **GE** interage com a subunidade **C** ou **H** e estas com a subunidade **a** (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010). Esta cadeia de interações permite que o hexâmero A_3B_3 permaneça imobilizado em relação a subunidade **a** durante a hidrólise do ATP, a energia da hidrólise do ATP provoca a rotação da haste central (subunidade **D**, **F** e **d**) provocando a rotação do anel proteolipídico **c** que permite o transporte de prótons (Forgac, 2007; Cotter et al., 2015; Collins & Forgac, 2018).

Na Figura 12 está representado o modelo do acoplamento da hidrólise do ATP com o transporte de prótons. Seguindo este modelo, a catálise rotacional ocorre em quatro etapas: **1.** passagem do próton do citosol pelo hemi-canal da subunidade **a** e a posterior protonação do grupo carboxílico do resíduo de Glu de uma subunidade **c** (painel a e b da Figura 12) (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010); **2.** hidrólise do ATP na interface das subunidades **A** e **B** que provoca a rotação do anel **c** através da haste central (painel c da Figura 12); **3.** rotação do anel **c** que provoca o encontro do resíduo de Glu protonado com o hemi-canal da subunidade **a** voltado para o meio extracelular, onde se localiza o resíduo de Arg conservado; **4.** desprotonação do Glu promovido pelo resíduo de Arg permitindo ao próton alcançar o meio extracelular (painel d da Figura 12) (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Toei et al., 2010).

O transporte de prótons realizado pela $V(H^+)$ -ATPase presente nas membranas dos compartimentos intracelulares, entre eles os lisossomos, os endossomos e diversas vesículas, está associado ao processo de acidificação destes. Isso permite diversas funções, como o transporte e controle do tráfico nas membranas intracelulares, endocitose mediado por receptores, dissociação de complexos ligante-receptor, citotoxicidade de vírus e toxinas bacterianas, degradação proteica e captação de neurotransmissores (Nishi & Forgac, 2002; Maxfield & McGraw, 2004; Gruenberg & Van Der Goot, 2006; Kane, 2006; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Wang & Hiesinger, 2013). As $V(H^+)$ -ATPases presentes na membrana plasmática das células são importantes na homeostase do pH renal, reabsorção óssea, maturação dos espermatozoides, metástases em células tumorais e desenvolvimento de doenças como acidose tubular renal e osteoporose (Frattini et al., 2000; Smith et al., 2000; Toyomura et al., 2003; Sennoune et al., 2004; Wagner et al., 2004; Pietrement et al., 2006; Gocheva et al., 2007).

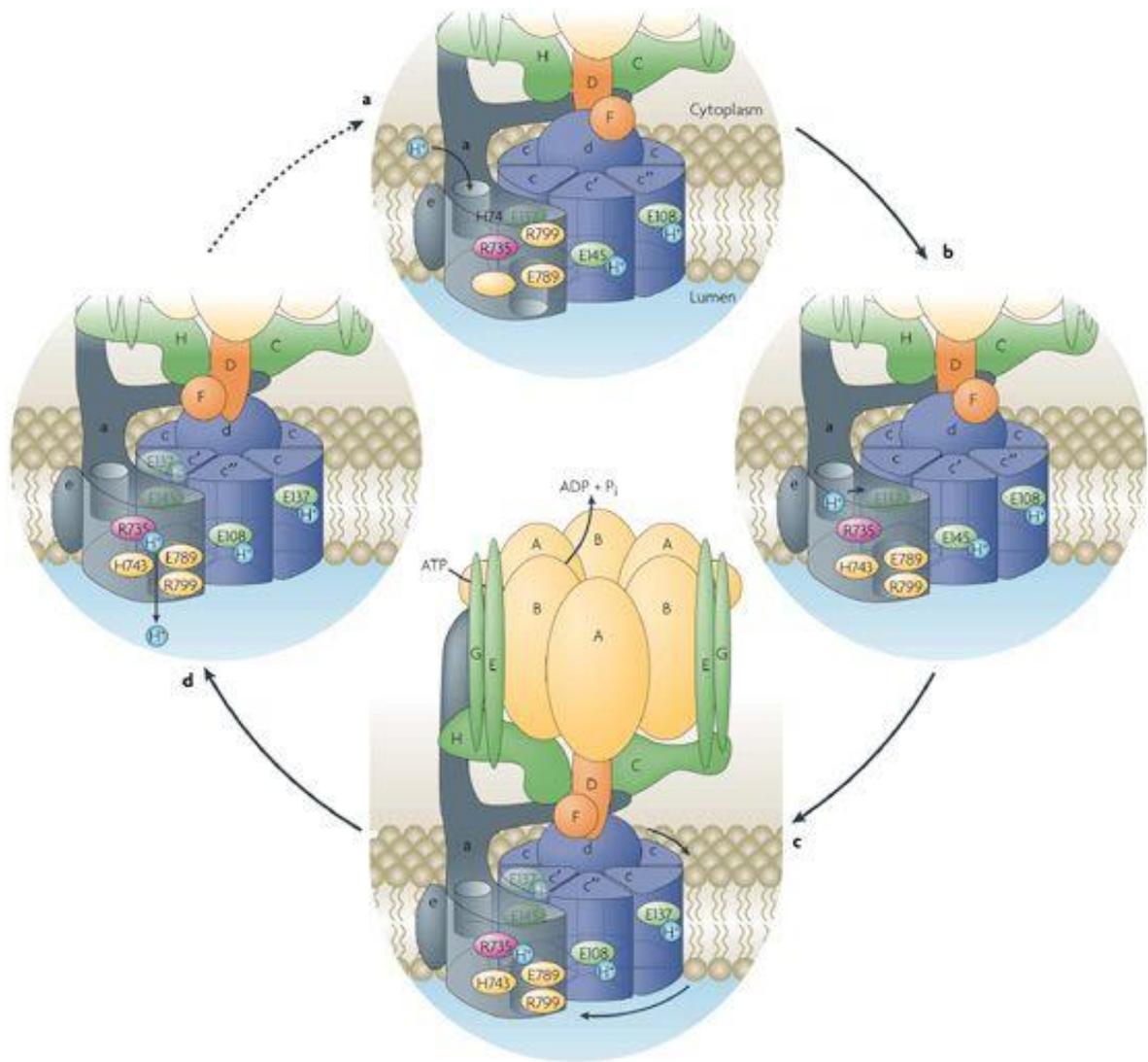


Figura 12. Mecanismo reacional da $V(H^+)$ -ATPase.
Forgac, 2007.

Em leveduras, todas as subunidades, com exceção da subunidade **a**, apresentam uma única isoforma, porém nos mamíferos seis das quatorze subunidades são expressas em mais de uma isoforma (Forgac, 2007; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010; Cotter et al., 2015). A expressão destas isoformas ocorre de modo tecido-específico, com estas isoformas distintas sendo relacionadas com funções e regulações independentes (Nishi et al., 2003; Forgac, 2007; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010; Cotter et al., 2015). As subunidades **B**, **E**, **H** e **d** apresentam duas isoformas, enquanto que as subunidades **C** e **G** apresentam três isoformas (Murata et al., 2002; Smith et al., 2002; Nishi et al., 2003; Wagner et al., 2004; Da Silva et al., 2007; Jefferies et al., 2008).

A subunidade **a** do domínio V_0 apresenta duas isoformas nas leveduras (genes *VPH1* e *STV1*), apresentando 54% de identidade entre si, enquanto os mamíferos apresentam quatro isoformas (*a1-a4*), apresentando entre 47 e 61% de identidade (Manolson et al., 1994; Wagner et al., 2004; Toei et al., 2010). As diferentes isoformas são capazes de direcionar a localização da $V(H^+)$ -ATPase, em leveduras, enzimas com a isoforma *Vph1p* estão presentes nos vacúolos, enquanto a isoforma *Stv1p* está presente na $V(H^+)$ -ATPase do complexo de Golgi (Manolson et al., 1994; Kawasaki-Nishi et al., 2001; Toei et al., 2010). Nos mamíferos, as isoformas *a1* e *a2* direcionam para as membranas intracelulares, respectivamente nas vesículas sinápticas e nos endossomos, enquanto as isoformas *a3* e *a4* estão presentes na membrana plasmática de osteoclastos e de células renais, respectivamente (Wagner et al., 2004; Forgac, 2007; Jefferies et al., 2008; Cotter et al., 2015; Collins & Forgac, 2018).

A regulação da atividade $V(H^+)$ -ATPase (Figura 13) ocorre tanto de modo espacial quanto temporal (Forgac, 2007; Toei et al., 2010). Uma vez que a enzima apresenta uma grande variedade de funções, existe a necessidade de um conjunto complexo de mecanismos regulatórios de sua atividade, incluindo dissociação reversível de seus dois domínios, controle da localização celular e alterações na eficiência de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de prótons (Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008).

A dissociação reversível dos domínios V_1 e V_0 (Figura 13A) representa o mecanismo de regulação da atividade da $V(H^+)$ -ATPase mais bem caracterizado, ocorrendo em células de leveduras, insetos e mamíferos (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010; Oot et al., 2012; Hayek et al., 2019). Este mecanismo resulta na interrupção da hidrólise do ATP e do transporte de prótons, sendo geralmente desencadeado em resposta à diminuição dos níveis de glicose (Nishi & Forgac, 2002; Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010). A dissociação dos domínios é importante para economia de energia quando em baixas concentrações de ATP e glicose, uma vez que o domínio V_1 isolado não realiza a hidrólise do ATP e o domínio V_0 é bloqueado durante o processo para que não ocorra o transporte passivo de prótons (Parra et al., 2000; Cipriano et al., 2008; Diab et al., 2009; Benlekbier et al., 2012; Couoh-Cardel & Wilkens, 2015; Sharma et al., 2018; Hayek et al., 2019). Durante o processo de dissociação, a subunidade **C** tem um papel fundamental para que o processo ocorra e se separa completamente dos domínios V_1 e V_0 (Iwata et al., 2004; Jefferies et al., 2008; Tabke et al., 2014). Outras regiões também são importantes tais como o domínio não-homólogo da subunidade **A** e a subunidade **H**, que impede a hidrólise de ATP no domínio V_1 dissociado (Shao et al., 2003; Shao & Forgac, 2004; Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Toei et al., 2010).

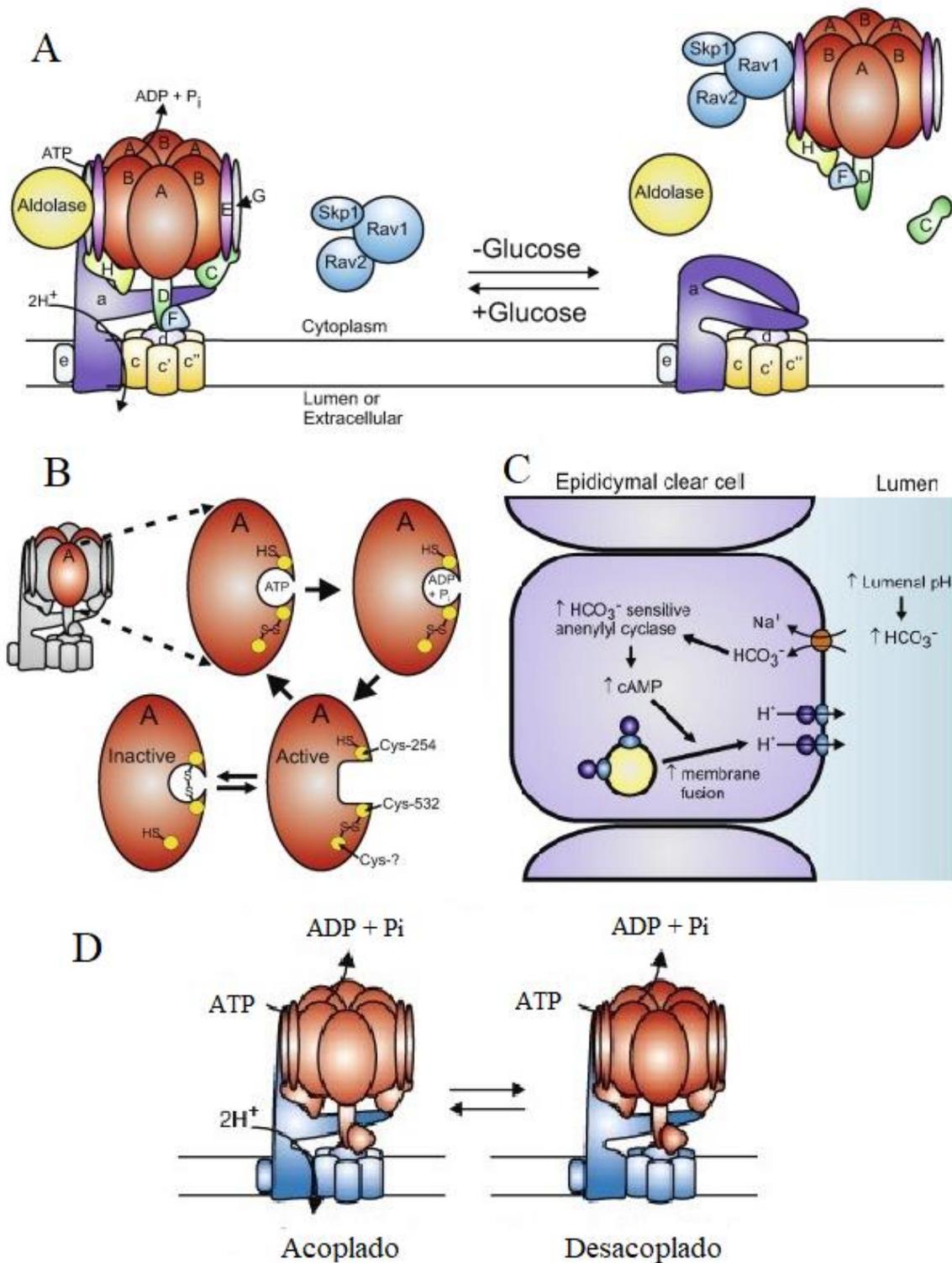


Figura 13. Regulação da atividade da V(H⁺)-ATPase.

A – Dissociação reversível. **B** – Formação de pontes dissulfeto reversíveis. **C** – Mudanças na densidade da V(H⁺)-ATPase da membrana. **D** – Eficiência de acoplamento.

Modificado de Jefferies et al., 2008.

Em leveduras este processo é mediado pela RAVE (Regulador de ATPases de Vacúolos e Endossomos), uma chaperona constituída de três subunidades, Skp1p, Rav1p e Rav2p, que tem função de estabilizar V_1 e permitir que a subunidade **C** retorne ao complexo V_1V_0 (Smardon et al., 2002; 2014; 2015; Cipriano et al., 2008; Hayek et al., 2019). A presença de dois resíduos de cisteína altamente conservados na subunidade **A** (Cis₂₅₄ e Cis₅₃₂) permitem a regulação das $V(H^+)$ -ATPases através da formação de ligações dissulfeto reversíveis entre estes resíduos presentes no sítio catalítico da subunidade **A** (Figura 13B), impedindo mudanças conformacionais da enzima e causando a sua inativação (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Toei et al., 2010).

Outro mecanismo regulatório da atividade da $V(H^+)$ -ATPase é a alteração de densidade de moléculas da enzima na membrana plasmática (Figura 13C), sendo características das células renais e epididimais. Esta regulação ocorre através da exocitose de vesículas intracelulares que armazenam muitas moléculas de $V(H^+)$ -ATPase que se fundem com a membrana plasmática causando o aumento da densidade da enzima na membrana celular. Esse processo é mediado por uma adenilato ciclase dependente de bicarbonato, em resposta a diminuição do pH citoplasmático, aumentando o AMPc e estimulando a atividade da proteína quinase A que direciona a $V(H^+)$ -ATPase na membrana apical (Forgac, 2007; Cipriano et al., 2008; Jefferies et al., 2008; Alzamora et al., 2010; Paunescu et al., 2010; Toei et al., 2010).

A regulação da $V(H^+)$ -ATPase também ocorre através de alterações na eficiência de acoplamento da hidrólise e do transporte de prótons (Figura 13D), isto ocorre através da expressão de diferentes isoformas (Jefferies et al., 2008) ou mutações em determinadas subunidades tais como a subunidade **D** e **a** (Shao et al., 2003; Owegi et al., 2006; Jefferies et al., 2008). Em leveduras, a $V(H^+)$ -ATPase contendo Vph1p é 4-5 vezes mais eficiente que aquelas que contêm Stv1p, levando os vacúolos a apresentarem um pH menor que o complexo de Golgi (Kawasaki-Nishi et al., 2001; Forgac, 2007; Toei et al., 2010).

A inibição da atividade da $V(H^+)$ -ATPase de forma específica apresenta grande importância terapêutica no tratamento de osteoporose e câncer, tendo importância fundamental para o desenvolvimento de drogas para estas doenças (Toei et al., 2010). A bafilomicina A_1 e concanamicina (Figura 14) inibem especificamente a $V(H^+)$ -ATPase em concentrações nanomolares, estes dois compostos apresentam grande relação estrutural entre si e ambos se ligam no anel proteolipídico **c** (Drose et al., 1993; Fernandes et al., 2006; Huss & Wiczorek, 2009; Osteresch et al., 2012; Cotter et al., 2015).

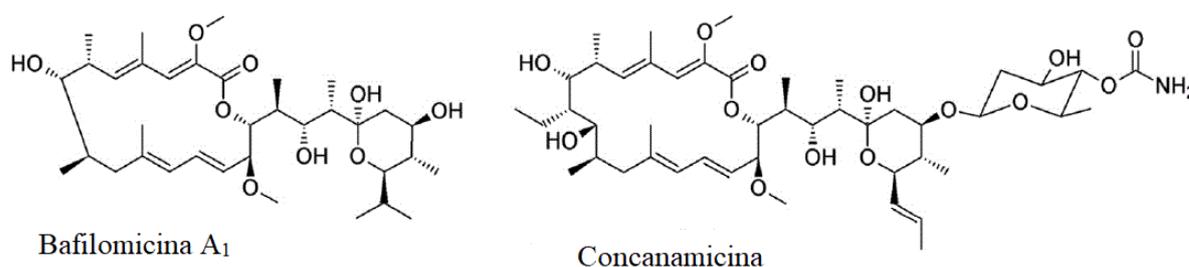


Figura 14. Inibidores da V(H⁺)-ATPase.

Adaptado de Osteresch et al., 2012.

A bafilomicina A₁ foi isolada de *Streptomyces griseus* e a concanamicina de *Streptomyces diastatochromogenes*. Ambas têm função de antibiótico e apresentam um anel lactona de 16 átomos e 18 átomos, respectivamente (Drose et al., 1993). O sítio de ligação do inibidor se encontra no domínio V₀, sendo dependente das subunidades **c** e **a**, a interação inibidor-enzima causa o bloqueio do transporte de prótons, já que impede a rotação do anel **c** (Wang et al., 2005; Huss & Wieczorek, 2009).

1.6. A V(H⁺)-ATPase branquial de crustáceos

A importância da V(H⁺)-ATPase em crustáceos está relacionada principalmente com o seu papel na adaptação dos animais de água doce (Morris, 2001; Weihrauch et al., 2004b; Tsai & Lin, 2007; Faleiros et al., 2010; Firmino et al., 2011; Lee et al., 2011; McNamara & Faria, 2012; Zhang et al., 2018; Bozza et al., 2019), participando ativamente na captação de íons no epitélio branquial dos crustáceos tolerantes a água doce (Zare & Greenaway, 1998; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2001; Lee et al., 2011). A V(H⁺)-ATPase também é importante no processo de excreção de amônia (Weihrauch et al., 2002, 2004b; Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008), bem como no equilíbrio ácido-base (Tresguerres et al., 2008).

A presença da V(H⁺)-ATPase nas brânquias é fundamental para o transporte de prótons nas mais variadas espécies de crustáceos que enfrentam diferentes gradientes de concentração entre o meio externo e o meio interno (Ehrenfeld & Klein, 1997; Weihrauch et al., 2004b; Tsai & Lin, 2007). Em camarões de água doce como o *M. amazonicum*, a V(H⁺)-ATPase se localiza apicalmente nas franjas das células pilares do epitélio branquial (Boudour-Bouchecker et al., 2014; Pinto et al., 2016). Em *M. amazonicum* e *M. olfersii* a superfície das células pilares são aumentadas por um extenso sistema de evaginações associadas à

mitocôndrias na região citoplasmática subapical (Freire & McNamara, 1995; McNamara & Lima, 1997; Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010; Boudour-Bouchecker et al., 2014) permitindo o aumento da área da membrana apical disponível para inclusão da $V(H^+)$ -ATPase bem como do trocador Cl^-/HCO_3^- (Faleiros et al., 2010). Nestes animais, a $V(H^+)$ -ATPase representa uma força motriz independente da (Na^+, K^+) -ATPase, que está presente nas invaginações das células dos septos intralamelares fornecendo energia para a absorção de NaCl a partir de água doce (McNamara & Lima, 1997; Towle et al., 1997; McNamara & Torres, 1999; Faleiros et al., 2010; McNamara & Faria, 2012).

O potencial elétrico através da membrana apical dos iônócitos criado pelo bombeamento de H^+ para o meio extracelular pela $V(H^+)$ -ATPase permite a criação do gradiente elétrico que direciona a entrada de Na^+ através de canais Na^+ na membrana apical (Zare & Greenaway, 1998; Morris, 2001; Arata et al., 2002). Tanto a $V(H^+)$ -ATPase como a (Na^+, K^+) -ATPase estão envolvidas na absorção de Cl^- em camarões hiper-reguladores fortes (Freire et al., 2008; Belli et al., 2009) onde a primeira também parece ser essencial para a absorção de Cl^- através do epitélio distal das lamelas das brânquias posteriores do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* (Weihrauch et al., 2004b). Apesar do importante papel desempenhado na osmorregulação em espécies tolerantes a água doce como *Eriocheir sinensis* e caranguejos marinhos como *Carcinus maenas*, a $V(H^+)$ -ATPase não atua na absorção transbranquial de NaCl, uma vez que sua função provavelmente está relacionada com a acidificação de organelas intracelulares (Weihrauch et al., 2001).

Outro fator importante para a atividade da $V(H^+)$ -ATPase é o pH, uma vez que em muitos crustáceos a sua atividade máxima ocorre em pH 7,5 (Onken & Putzenlechner, 1995; Zare & Greenaway, 1998; Onken et al., 2000; Weihrauch et al., 2004b; Pan et al., 2007; Firmino et al., 2011; Lucena et al., 2015). Em pHs menores a atividade é menor e resulta de modificações na sua estrutura, revelando um sítio de protonação oculto (Rastogi & Girvin, 1999; Muller et al., 2002). Alterações no pH extracelular também são capazes de modular a atividade e a expressão da $V(H^+)$ -ATPase em diversos crustáceos (Pan et al., 2007; 2010; Tresguerres et al., 2008; Wang et al., 2012).

A $V(H^+)$ -ATPase de crustáceos também apresenta um papel importante na excreção de amônio sendo responsável pela protonação de NH_3 no interior das vesículas intracelulares dos iônócitos branquiais. O NH_3 no citoplasma é protonado pela $V(H^+)$ -ATPase formando NH_4^+ que é excretado por exocitose (Weihrauch et al., 2002; 2004a; 2009; Henry et al., 2012).

Comparado com a (Na^+, K^+) -ATPase, os estudos relacionados com a $V(H^+)$ -ATPase branquial nos processos osmorregulatórios de crustáceos são mais escassos. A atividade da

enzima foi caracterizada cineticamente em *M. amazonicum* selvagem (Faleiros et al., 2010), *D. pagei* (Weihrauch et al., 2004b; Firmino et al., 2011), *E. sinensis* (Onken & Putzenlechner, 1995; Morris., 2001) e *M. amazonicum* adultos e juvenis provenientes de aquicultura (Lucena et al., 2015). Em contrapartida, não foi encontrada atividade V(H⁺)-ATPase significativa para *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Garçon et al., 2009) e *M. amazonicum* aclimatado a 21 ‰S (Faleiros et al., 2010; este trabalho). Além dos estudos cinéticos, métodos eletrofisiológicos são usualmente utilizados para investigar o papel da V(H⁺)-ATPase na osmorregulação de crustáceos (Onken & McNamara, 2002, Genovese et al., 2005).

Estudos acerca dos níveis de expressão da subunidade B e localização da V(H⁺)-ATPase também mostram o papel crucial dessa enzima na adaptação de crustáceos ao ambiente de água doce, corroborando com os dados cinéticos do efeito em função da salinidade do meio (Weihrauch et al., 2004b, Tsai & Lin, 2007; Faleiros et al., 2010; Firmino et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar e comparar as propriedades moleculares, bioquímicas e cinéticas da (Na⁺, K⁺)-ATPase e da V(H⁺)-ATPase branquial do camarão *M. amazonicum* de populações que habitam a Bacia do Rio da Prata (Paraná-Paraguai).

Contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na osmorregulação de crustáceos que invadiram a água doce e para um melhor entendimento da relação bioquímica e fisiológica entre populações de *M. amazonicum*.

2.2. Objetivos específicos

1. Obter frações de membrana ricas em (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de camarões *M. amazonicum* adultos recém capturados no Rio Tietê e no Rio Grande, bem como de animais do Rio Tietê após a aclimação em alta salinidade (21 ‰) durante 10 dias.
2. Caracterização cinética da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturado, avaliando o efeito dos seus diferentes moduladores.
3. Comparar as características cinéticas da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* destas populações com as de outras populações deste animal e bem como de outros crustáceos.
4. Avaliar o efeito da aclimação a 21 ‰ nas características cinéticas da (Na⁺, K⁺)-ATPase do tecido branquial de *M. amazonicum*.
5. Analisar da presença de outras ATPases na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* nos animais recém-capturados e aclimatados, bem como comparar a presença destas em diferentes populações de camarões do gênero *Macrobrachium*.
6. Caracterização cinética da V(H⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturados nos Rios Tietê e Grande, comparando suas características cinéticas com as de outros crustáceos.
7. Caracterização bioquímica da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial do camarão *M. amazonicum*, utilizando SDS-PAGE, western blotting e gradiente de sacarose.
8. Determinar a localização da (Na⁺, K⁺)-ATPase nas brânquias de *M. amazonicum* recém capturado e aclimatado em a 21 ‰.
9. Avaliar o efeito do FXD2 exógeno e da ação proteínas quinases endógenas na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Todas as soluções utilizadas nesse trabalho foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida a partir dos tratamentos sucessivos em aparelhos MilliRO e MilliQ (Merck Millipore, USA). ATP (sal de Tris), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanol sulfônico (Hepes), imidazol, tris (hidroximetil) aminometano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, ortovanadato de sódio, dibutilil cAMP, taspigargina, aurovertina B, bafilomicina A₁, alameticina, ácido etacrínico, teofilina, ácido etacrínico, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD⁺, NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfatidil serina, queleritrina, H89, forbol meristato acetato (PMA), Tween-20, 3-fosfogliceraldeído dietil acetal (GAP), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT), leupeptina, antipainá, benzamidina, pepstatina, fluoreto de fenil sulfonil metila (PMSF) e 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). Trietanolamina, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), CaCl₂, etileno glicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra ácido acético (EGTA) e filtros Microcon Y foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A membrana de nitrocelulose e a resina AG50WX-8 (Dowex 50H⁺) foram adquiridas da BioRad (Hercules, USA). O padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (M_r 10-260 kDa) foi adquirido da Thermo Scientific (Massachusetts, EUA). O anticorpo monoclonal α-5 contra a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase de aves (todas as isoformas) foi adquirido do Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA). O anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adquirido da Promega Corporation (Madison, USA).

Antes do uso, as soluções de enzimas LDH e PQ, comercializadas em suspensões cristalinas de (NH₄)₂SO₄ 3,2 mol L⁻¹ foram tratadas para a remoção do íon amônio. Uma alíquota de 500 μL da enzima (PQ ou LDH) foi centrifugada a 20.000 ×g durante 15 min, a 4°C, em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 500 μL de Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e após foi transferido para um filtro Microcon YM-10, foi lavado 5 vezes com o mesmo tampão por centrifugação a 14.000 ×g, durante 10 min, a 4°C, para completar a remoção total dos íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, foi adicionado tampão Hepes 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 até completar o volume inicialmente utilizado. Para a enzima FGQ a suspensão foi tratada exatamente como descrito acima. Todas as soluções foram usadas dentro de um período máximo de três dias. Enquanto

que a GAFDH foi preparada em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo DTT 1 mmol L⁻¹ logo antes do seu uso.

O coquetel de inibidores de protease utilizado nas preparações da fração microsomal contém leupeptina 5 μmol L⁻¹, antipaina 5 μmol L⁻¹, benzamidina 1 mmol L⁻¹, pepstatina A 1 μmol L⁻¹ e PSMF 5 μmol L⁻¹. A solução estoque dos inibidores foi preparada 100 vezes mais concentrada sendo diluída no tampão de homogeneização no momento do uso na concentração final indicada. As massas de pepstatina e o PMSF foram inicialmente dissolvidos em 500 μL de metanol e etanol, respectivamente e os demais inibidores em água. Finalmente a solução estoque foi completada até um volume de 10 mL de água MilliQ.

A solução estoque de ATP foi preparada utilizando ATP sal de Tris e sua concentração final (100 mmol L⁻¹) foi acertada através da determinação da absorbância da solução em 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 7,0} 15.400 \text{ mol L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

A solução de gliceraldeído-3-fosfato (20 mmol L⁻¹), foi preparada imediatamente antes do uso, através da hidrólise de 15 mg de 3-fosfogliceraldeído dietil acetal dissolvido em 1 mL de água ultrapura MilliQ, com 150 μL de HCl concentrado ($d=1,18 \text{ g mL}^{-1}$). A mistura foi mantida em banho-maria a 90 °C durante 2 minutos e em seguida, o cloreto de bário formado na reação foi removido com uma resina Dowex 50H⁺, seguindo as recomendações do fabricante (ver Sigma Chem. Co. Product Information. Número do produto: 65376). Após a remoção da resina, a solução resultante foi neutralizada até pH 7,5 com 50 μL de trietanolamina pura ($d=1,12 \text{ g mL}^{-1}$).

A solução estoque de ortovanadato de sódio (1 mmol L⁻¹) foi preparada de acordo com Lucena et al. (2015). O pH da solução de concentração aproximada de 1 mmol L⁻¹ foi acertado em 10,0 e, em seguida, a solução foi fervida em banho-maria até ficar translúcida. Após resfriamento, o pH dessa solução foi novamente reajustado em 10,0 e a concentração final da solução foi determinada espectrofotometricamente em 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 10,0} = 3.550 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O pH dessa solução diluída não é afetado significativamente. Finalmente, alíquotas de 1 mL foram congeladas em tubos Eppendorf e estocadas a - 20° C até o momento do uso.

A solução estoque de aurovertina B foi preparada em etanol e as soluções estoques de bafilomicina A1 e taspigargina foram preparadas utilizando dimetilsulfóxido como solvente. As soluções estoques de teofilina, EGTA e ácido etacrínico foram preparadas em água.

3.2. Coleta dos animais

Espécimes adultos de camarões *Macrobrachium amazonicum* com aproximadamente 9 cm e cerca de 10 g foram coletados no Rio Tietê, município de Santo Antônio do Aracanguá/SP (20° 58' 40,8" S, 50° 32' 20,4" W) e no Rio Grande (19° 47' S, 50° 05' W) próximo à cidade de Iturama, MG. Os camarões foram transportados para o laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da FFCLRP/USP em tanques adequados contendo água do local da coleta, com aeração contínua e mantidos nessas condições até o momento da preparação da fração microsomal.

3.3. Aclimação dos camarões do Rio Tietê em salinidade de 21 ‰

Uma coleção de 80 animais foi separada em quatro grupos de 20 camarões cada e foram aclimatados durante 10 dias em salinidade de 21 ‰ em tanques contendo 32 L de água, a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 h. A salinidade foi ajustada através da adição de sal marinho Tropic Marin® à água sem cloro e checada diariamente através de um refratômetro manual (Atago 1000) durante o período de aclimação.

3.4. Extração das brânquias e preparação da fração microsomal

Para cada preparação foram utilizados aproximadamente 60 camarões. Os animais foram anestesiados em gelo picado e as brânquias foram imediatamente removidas e transferidas para tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L⁻¹, Tris 6 mmol L⁻¹ e o coquetel de inibidores de proteases) mantido a 4° C. As brânquias foram pesadas após remover o excesso de tampão com papel filtro Whatman e em seguida homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 mL/g brânquia) utilizando um homogeneizador Potter, ajustado para 1.200 rpm.

O homogeneizado obtido foi submetido a centrifugação de 14.000 ×g, durante 35 min, a 4° C, em uma centrífuga Sorvall RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo picado e o *pellet* resultante foi novamente homogeneizado no mesmo volume inicial do tampão de homogeneização. Esse novo homogeneizado foi submetido à nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes resultante das duas centrifugações foram gentilmente misturados e submetidos a uma nova centrifugação a 100.000 ×g durante 90 min,

a 4° C em uma ultracentrífuga Hitachi 55P-72. Finalmente, o *pellet* resultante (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão de homogeneização (13 mL/g de brânquia) e alíquotas de 0,5 mL foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C por um período não superior a 3 meses. Quando necessário os tubos foram descongelados e mantidos em gelo picado durante um período de até 4 hs.

3.5. Dosagem de proteína

A concentração de proteínas da fração microsomal foi determinada conforme descrito por Read & Northcote (1981), empregando-se soroalbumina bovina como padrão. A absorvância das amostras e do padrão foi estimada em 595 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800.

3.6. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida (5 a 20%, p/v) utilizando 4µg de proteína, conforme descrito por Laemmli (1970). Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata. Para determinação da escala de peso molecular foi utilizado 10 µL do padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, EUA).

3.7. Western blotting

Foi realizada a eletroforese (SDS-PAGE) utilizando 50 µg, após a corrida o gel foi submetido a uma eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose, com a aplicação de uma corrente de 300 mA com voltagem livre durante 90 minutos, a 4 °C utilizando o sistema Gibco BRL Mini-V 8-10 (Gaithersburg, USA) de acordo com Towbin et al. (1979). A membrana foi bloqueada com uma solução de soroalbumina bovina 10% em tampão TBS-Tween (Tris/HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ e Tween-20 0,05%), durante 90 minutos, sob agitação constante e temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada cinco vezes com tampão TBS-Tween e a seguir foi encubada durante 16 horas, a 5 °C, com o anticorpo α-5 monoclonal de camundongo, produzido contra a subunidade alfa da (Na⁺, K⁺)-ATPase de galinha (diluição 1:150 em uma solução de

soroalbumina bovina 5% em tampão TBS-Tween). Após cinco lavagens em tampão TBS-Tween a membrana foi incubada durante 1 hora, a 25 °C, com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:5000 na mesma solução que o anticorpo primário). Finalmente, a incorporação específica de anticorpo foi revelada em Tris/HCl 100 mmol L⁻¹, pH 9,5, contendo NaCl 100 mmol L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol L⁻¹, NBT 0,2 mmol L⁻¹ e BCIP 0,8 mmol L⁻¹. Para a determinação da M_r da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi utilizado 25 µL do padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, EUA).

3.8. Determinação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal

A atividade ATPase total foi determinada continuamente, a 25 °C empregando-se o sistema de acoplamento piruvato quinase/lactato desidrogenase, no qual a hidrólise do ATP é acoplada à oxidação do NADH (Leone et al., 2015a). A oxidação do NADH foi estimada em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm, pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas. Para o estudo do efeito do potássio e amônio, a atividade ATPase foi quantificada empregando-se o sistema de acoplamento gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/fosfogliceratoquinase, onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD⁺ (Leone et al., 2015a). A redução do NAD⁺ foi estimada em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm, pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas. A atividade ATPase também foi determinada na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹. A diferença entre a medida efetuada na ausência e presença da ouabaína foi considerada como correspondente à atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal de *M. amazonicum*. A hidrólise do ATP também foi estimada após a incubação da amostra com 10 µg de alameticina durante 10 min, a 25 °C, para verificar a presença de vesículas seladas no meio de reação. Controles sem a adição da enzima foram incluídos nos experimentos para estimar a hidrólise espontânea do substrato nas condições do ensaio. A linearidade das medidas da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase foi checada entre 10 e 50 µg proteína total e a quantidade de proteína microsomal sempre foi usada dentro desse intervalo. Para cada concentração de ligante analisado (ATP, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e o inibidor ouabaína) a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata utilizando alíquotas idênticas da mesma preparação e a média desses valores foi usada para ajustar a curva de saturação correspondente. Os ensaios foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido

empregando-se três preparações diferentes (N= 3). Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de ATP por minuto, a 25 °C nas condições padrões do ensaio e a atividade específica é dada em nmol de P_i min^{-1} mg^{-1} de proteína ou U mg^{-1} .

3.9. Determinação da atividade $V(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal

A atividade ATPase foi medida após 10 min de pré-incubação da preparação com ortovanadato 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e/ou bafilomicina 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A hidrólise do ATP foi acompanhada continuamente, a 25 °C, empregando-se o sistema de acoplamento piruvato quinase/lactato desidrogenase (Lucena et al., 2015). A diferença entre o valor da atividade ATPase estimada na presença de ortovanadato e a estimada na presença de ortovanadato mais bafilomicina A_1 representa a atividade da $V(\text{H}^+)\text{-ATPase}$. Controles sem a adição da enzima foram utilizados com a finalidade de se determinar a hidrólise espontânea do substrato nas condições do ensaio. Os ensaios foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido empregando-se três preparações diferentes (N= 3).

3.10. Cálculo de espécies livres no meio de reação

A concentração das espécies livres de Mg^{2+} , ATP e MgATP no meio de reação foram calculados de acordo com Fabiato (1988).

3.11. Tratamento dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos V_M (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis), $K_{0,5}$ (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram calculados usando o software SigrafW (Leone et al., 2005b). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor, K_I , foram determinadas graficamente de acordo com Marks & Seeds (1978). Todos os experimentos foram realizados em duplicata utilizando-se três preparações diferentes (N= 3).

3.12. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota da fração microsomal (2,5 mg) foi aplicada a um gradiente contínuo de sacarose de 10 a 50% (p/p) em tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8. Após centrifugação a 180000 × g em uma centrífuga Hitachi 55P-72, usando o rotor vertical PV50T2, durante 3 h, a 4°C, frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo com o auxílio de uma bomba peristáltica e imediatamente analisadas quanto à atividade ATPase conforme descrito em 3.8., concentração proteica conforme descrito em 3.5. e índice de refração empregando-se um refratômetro de bancada RL3 (PZO, Poland), para a determinação da porcentagem de sacarose de cada fração.

3.13. Imunolocalização da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê

A quarta brânquia lateral direita de cada animal foi dissecada e incubada em uma solução fixadora contendo 2% de p-formaldeído diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, durante 1 hora. A osmolalidade da solução fixadora foi ajustada de acordo com as condições de salinidade nas quais os camarões foram submetidos. Para camarões expostos a 21 ‰S, a osmolalidade da solução fixadora foi ajustada para ≈670 mOsm kg⁻¹ H₂O (Na₂HPO₄ 26,6 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 4,7 mmol L⁻¹, NaCl 282 mmol L⁻¹ e KCl 7,1 mmol L⁻¹). Para camarões recém-capturados a osmolalidade da solução fixadora foi ajustada para a condição natural do rio, ≈290 mOsm kg⁻¹ H₂O (Na₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 2 mmol L⁻¹, NaCl 137 mmol L⁻¹, KCl 2,7 mmol L⁻¹). Em seguida, as brânquias foram embebidas em Tissue-Tek *Optimal Cutting Temperature Compound* (Sakura, Tissue-Tek, Torrance, EUA) e congeladas com uma mistura de acetona/gelo seco. Secções transversais de 12 μm de espessura foram obtidas ao longo da região lamelar de cada brânquia com auxílio do criostato Microm HM 505E, modelo Microtome Criostato (Walldorf, Alemanha). Os cortes foram feitos a -20 °C e recolhidos em lâminas previamente siliconizadas (Sakura, Knittel Starfrost®). Os “criocortes” foram pré-incubados durante 20 min com glicina 100 mmol L⁻¹ em PBS 290 mOsm kg⁻¹ H₂O (PBS 1x), para mascarar os grupos aldeídos livres e em seguida foram incubadas durante 10 min em solução de bloqueio contendo 1% de BSA e 0,1% de gelatina em PBS.

A imunolocalização da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi realizada utilizando anticorpo α-5 monoclonal de camundongo, produzido contra a subunidade alfa da (Na⁺, K⁺)-ATPase de

galinha (Takeyasu et al., 1988). Gotas do anticorpo primário, diluído a 20 mg mL^{-1} em PBS 1x foram colocadas sobre as lâminas contendo os cortes e as lâminas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente em uma câmara úmida. Como controle negativo, alguns cortes foram incubados em solução de bloqueio, sem o anticorpo primário. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas de 4 a 5 vezes durante 5 min cada em solução de bloqueio para remover anticorpos não ligados. Após as lavagens, as secções foram incubadas durante 45 min com um anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (1:450 em PBS 1x). Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 1x, como descrito anteriormente. Para localizar os núcleos, os cortes foram corados durante 20 min com DAPI diluído 1: 200 em PBS 1x.

As secções foram montadas com o auxílio do meio de montagem Fluoromount-G e sob lamínulas de vidro da marca Knittel Starfrost (Bielefeld, Alemanha), sendo posteriormente seladas, observadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio confocal da marca Leica, modelo TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha), utilizando o laser de argon para a marcação com Alexa-fluor 488 (495/519 nm) e o laser de diodo para a marcação com DAPI (358/461 nm). Além disso, as secções foram observadas utilizando microscopia de contraste de fase.

3.14. Síntese do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

O $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ foi sintetizado através de uma sequência de reações enzimáticas conforme descrito por Maia et al. (1983). O $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ foi purificado através de cromatografia em coluna de resina Dowex AG100. As amostras contendo o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ foram separadas, colocadas em banho de gelo e neutralizadas pela adição de aproximadamente 10% do volume total eluído com MES-Tris pH 6,0, corrigindo-se com Tris até pH 7,0.

3.15. Determinação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase através da liberação do $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_i$

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase foi estimada a 25°C através da liberação do $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ proveniente do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Grubmeyer & Penefsky, 1981; Fontes et al., 1999). Uma alíquota ($20 \mu\text{L}$) da fração microsomal foi adicionada ao tampão Hepes 20 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo MgCl_2 2 mmol L^{-1} , NaCl 50 mmol L^{-1} e KCl 10 mmol L^{-1} e, em um volume final de

0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol L⁻¹ [γ -³²P]-ATP (atividade específica 400-800 cpm/nmol) e após 60 min foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido perclórico 0,4 mol L⁻¹. Os tubos foram colocados em um banho de gelo (4 °C) e após a adição de 0,4 mL de carvão ativo 25% p/v (dissolvido em HCl 0,1 N) foram centrifugados a 700 ×g durante 5 min. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foram aplicadas em uma tira de papel de filtro Whatman, secadas e a radiação correspondente ao [³²P]-Pi liberado pelas amostras foi quantificada usando-se um espectrômetro de cintilação líquida Beckman Modelo LS 6500.

3.16. Estudo do efeito do FXYD2 exógeno na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase

A (Na⁺, K⁺)-ATPase de *M. amazonicum* foi pré-incubada na presença de diferentes concentrações da subunidade γ extraída a partir da (Na⁺, K⁺)-ATPase purificada de medula de rim de porco (Cortes et al., 2006) durante 20 min e a reação de hidrólise do [γ -³²P]-ATP foi estimada conforme descrito em 2.15.

3.17. Fosforilação por proteína quinase A

A fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi realizada incubando-se uma alíquota (20 μ g) da fração microsomal de brânquia de *M. amazonicum* em tampão Hepes 20 mmol L⁻¹ pH 7,4, ATP 0,2 mmol L⁻¹, EGTA 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, dibutilil cAMP 3 mmol L⁻¹ e queleritrina-Cl 3,5 μ mol L⁻¹, em um volume final de 100 μ L. Após 30 min de incubação a 25 °C, o meio de reação da fosforilação foi submetido a determinação da atividade ATPase conforme descrito em 3.15. Controles contendo H-89 200 nmol L⁻¹ (inibidor específico da proteína quinase A), também foram realizados nas mesmas condições descritas acima.

3.18. Fosforilação por proteína quinase C

A fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi realizada incubando-se uma alíquota (20 μ g) da fração microsomal de brânquia de *M. amazonicum* em tampão Hepes 20 mmol L⁻¹ pH 7,4, ATP 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, CaCl₂ 10 mmol L⁻¹, fosfatidil serina 80 μ g/ μ L, PMA 100 nmol L⁻¹ e H89 200 nmol L⁻¹ em um volume final de

100 μL . Após 30 min de incubação a 25 °C, o meio de reação da fosforilação foi submetido a determinação da atividade ATPase conforme descrito em 3.15 (Cortes et al., 2011). Controles contendo queletetrina 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (inibidor específico da proteína quinase C), também foram realizados nas mesmas condições descritas acima.

3.19. Análise por SDS-PAGE da fosforilação das subunidades da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelas proteínas quinases A e C de *M. amazonicum* do Rio Tietê

A eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) utilizada para a análise da fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi realizada conforme descrita por Laemmli (1970). Utilizando o gel de empilhamento com 4% de acrilamida e o gel de corrida com 15% de acrilamida. Uma alíquota (12 μg de proteína) foi submetida a fosforilação conforme descrita em 3.17 e 3.18, utilizando ATP 0,2 mmol L^{-1} (250.000 cpm/nmol [γ -³²P]-ATP) para iniciar a reação. Após 30 min de incubação a 25 °C a reação foi interrompida pela adição de seis volumes de tampão desnaturante. Os marcadores de massa molecular foram corados com Comassie Blue coloidal. Após a secagem, a placa do gel foi auto radiografada por 16 horas usando o Cyclone Phosphor Imager apparatus (Perkin Elmer). As imagens foram produzidas utilizando escaneamento direto com o software OptiQuant.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização cinética da (Na⁺, K⁺)-ATPase

4.1.1. *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado no Rio Tietê

A fração microsomal do tecido branquial de camarões *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê apresentou uma atividade ATPase total de $175,5 \pm 3,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sendo que a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase representa $129,9 \pm 2,3$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, enquanto $47,9 \pm 2,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína é correspondente a atividade insensível a ouabaína, determinada na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹.

Com o objetivo de verificar a presença de vesículas seladas na preparação da fração microsomal, a atividade ATPase foi determinada na presença ($V_M = 173,62 \pm 4,9$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e ausência ($V_M = 175,5 \pm 3,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) de alameticina. Imediatamente antes da determinação da atividade, a enzima foi incubada com o antibiótico durante 10 minutos, a 25 °C. Os valores obtidos mostram que nas condições iônicas utilizadas para a determinação da atividade da enzima não existem vesículas presentes e que a atividade ATPase total foi estimada.

Na Figura 15 está mostrada a modulação pelo ATP (como MgATP) da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê. Na presença de concentrações saturantes de íons potássio (10 mmol L⁻¹), sódio (50 mmol L⁻¹) e magnésio (2 mmol L⁻¹), o aumento da concentração de ATP (10⁻⁶ a 10⁻³ mol L⁻¹) acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação indicando, portanto, um único sítio de ligação para o substrato. A velocidade máxima foi estimada em $V_M = 130,3 \pm 4,8$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e $K_{0,5} = 0,068 \pm 0,0019$ mmol L⁻¹ através de cinética cooperativa ($n_H = 1,7$). Nas condições do ensaio o aumento da atividade está relacionado com a variação da concentração do MgATP e não do ATP livre (inserção A da Figura 15). A atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase representa cerca de 75% da atividade ATPase total, enquanto a atividade ATPase insensível a ouabaína foi estimulada até valores da ordem de 50 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (inserção B da Figura 15). Esses valores sugerem que na fração microsomal existem outras ATPases além da (Na⁺, K⁺)-ATPase.

A estimulação pelo ATP também foi estudada em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂ (Figura 16). Em condições saturantes de Na⁺ (50 mmol L⁻¹) e K⁺ (10 mmol L⁻¹), a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi estimulada através de uma curva de saturação monofásica no intervalo de concentração de MgATP de $1,5 \cdot 10^{-8}$ a $7,7 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em condições estequiométricas de ATP e Mg²⁺ os resultados obtidos sugerem a presença de um único sítio

de ligação para o ATP e que a estimulação da atividade é proporcional à concentração de MgATP e não do Mg^{2+} ou ATP livre (inserção A da Figura 16). Nessas condições a atividade máxima foi estimada em $V_M = 114,6 \pm 6,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,062 \pm 0,0032 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentando interações cooperativas (Tabela 2). A atividade ATPase insensível a ouabaína, representando 20% da atividade ATPase total no mesmo intervalo de concentração foi estimulada até $50 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 16).

A modulação da atividade da $(Na^+, K^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo magnésio (Figura 17) foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}). No intervalo de $5 \cdot 10^{-5}$ a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ o aumento da concentração dos íons magnésio estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 130,6 \pm 6,8 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,33 \pm 0,0042 \text{ mmol L}^{-1}$ através de interações cooperativas (Tabela 2). Os resultados confirmam que o complexo MgATP é o verdadeiro substrato da enzima (inserção A da Figura 17). A atividade da $(Na^+, K^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 70% da atividade total e a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada por Mg^{2+} até valores da ordem $50 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 17), corroborando a presença de ATPases estimuladas por magnésio.

Na Figura 18 está mostrada a modulação pelo Na^+ da atividade $(Na^+, K^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), K^+ (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de Na^+ (10^{-4} a $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação. Nestas condições valores máximos de $V_M = 127,5 \pm 5,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 5,3 \pm 0,42 \text{ mmol L}^{-1}$ foram obtidos através de cinética cooperativa ($n_H = 2,2$). A atividade ATPase insensível a ouabaína foi estimulada até valores da ordem $50 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína nesse mesmo intervalo de concentração, sugerindo a presença de $Na^+\text{-ATPase}$ na fração microsomal (inserção na Figura 18).

A modulação da atividade da $(Na^+, K^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo K^+ (Figura 19) foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}) no intervalo de $5 \cdot 10^{-5}$ a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O aumento da concentração dos íons potássio estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 126,7 \pm 7,7 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,65 \pm 0,079 \text{ mmol L}^{-1}$, através de interações cooperativa (Figura 19). A atividade $(Na^+, K^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 73% da atividade total e a atividade insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem de $50 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 19).

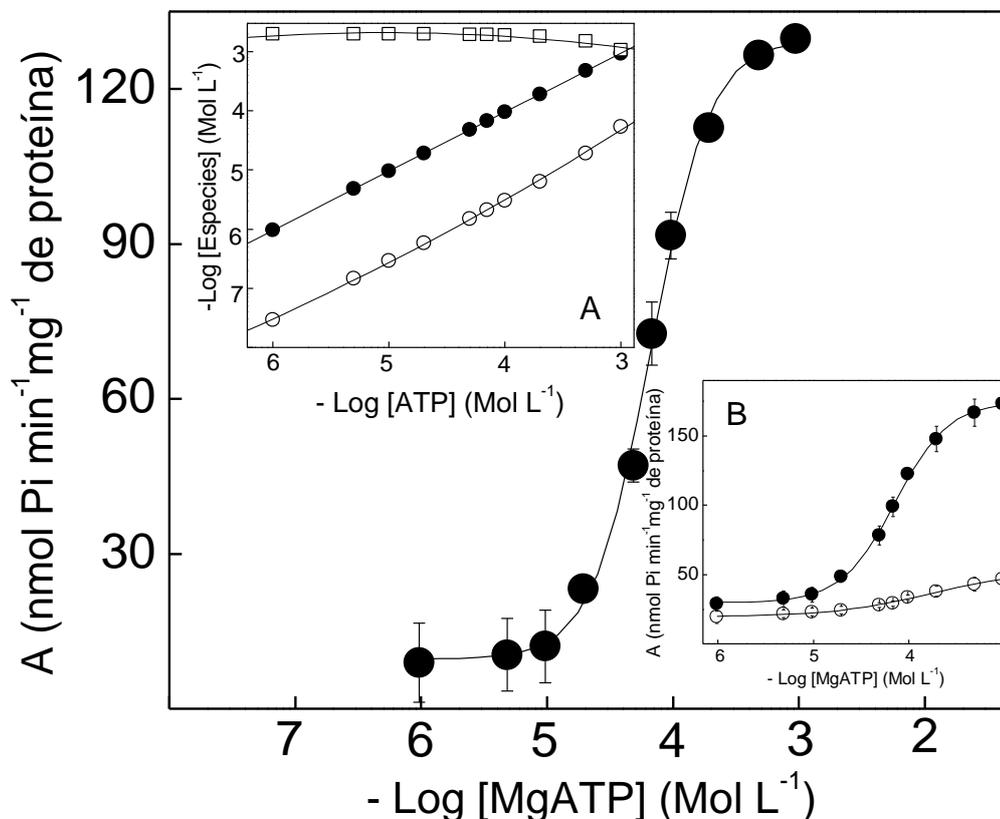


Figura 15. Efeito da concentração do ATP (como MgATP) na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** **A-** Concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** Atividade ATPase total (●); Atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

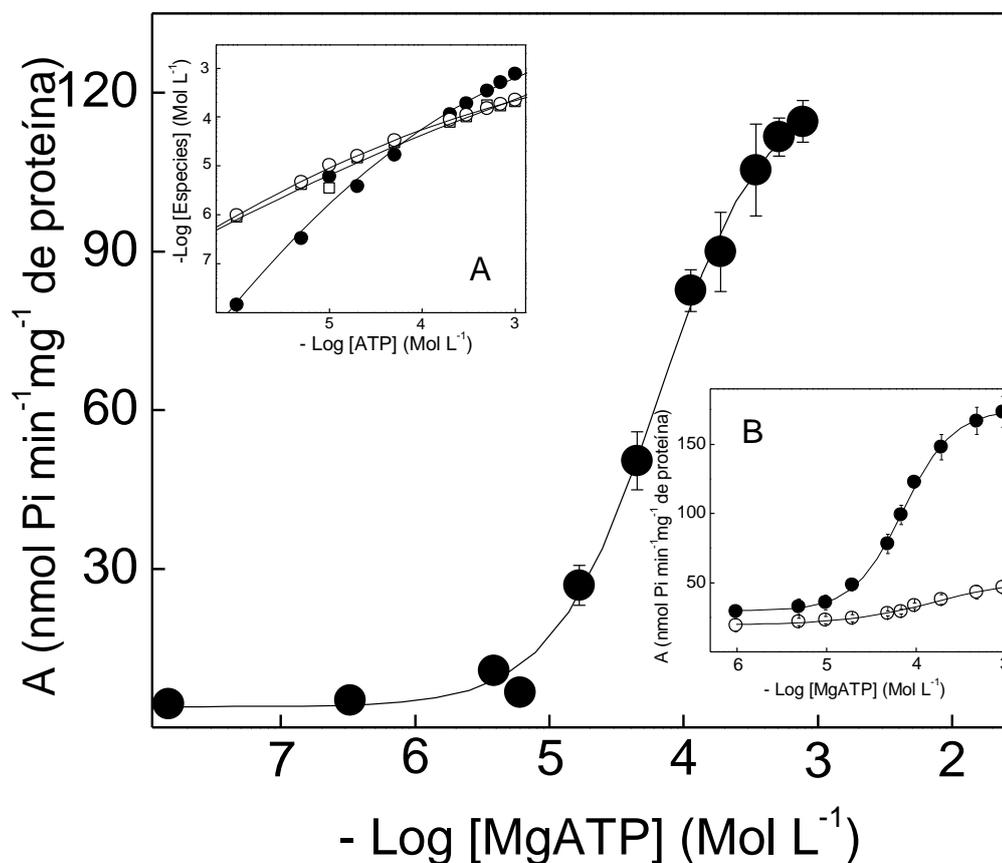


Figura 16. Efeito da concentração de Mg^{2+} e ATP, em condições estequiométricas, na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações estequiométricas de ATP e MgCl₂ e concentrações saturantes de NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** Atividade ATPase total (●); Atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

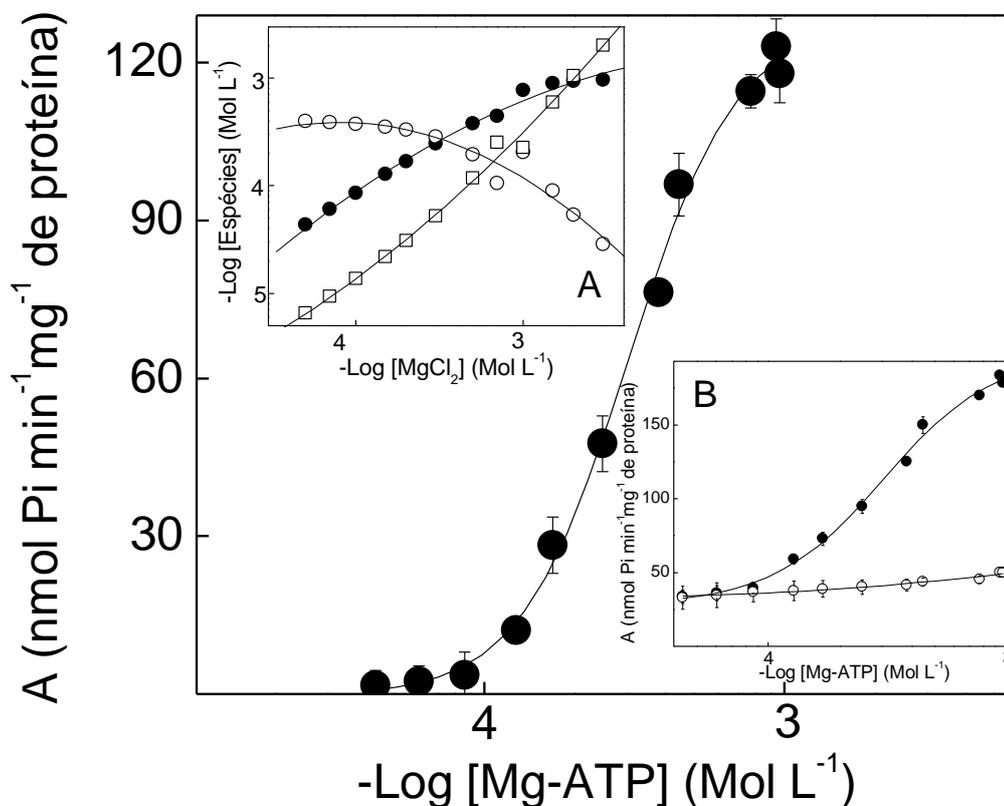


Figura 17. Efeito da concentração de Mg^{2+} (como MgATP) na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Heps 50 $mmol L^{-1}$, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 $mmol L^{-1}$), NaCl (50 $mmol L^{-1}$), KCl (10 $mmol L^{-1}$) contendo NADH 0,21 $mmol L^{-1}$, FEP 3,14 $mmol L^{-1}$, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios \pm SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (\square), ATP livre (\circ) e MgATP (\bullet). **B-** Atividade ATPase total (\bullet); Atividade ATPase insensível à ouabaína (\circ).

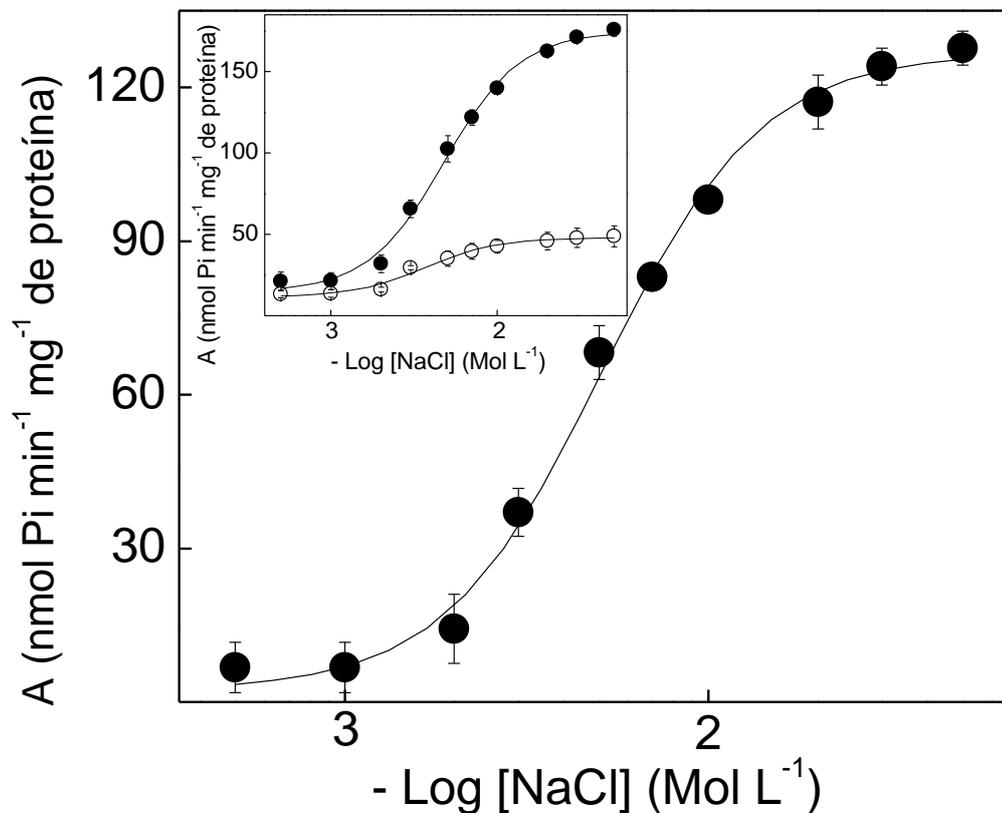


Figura 18. Efeito da concentração de Na⁺ na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

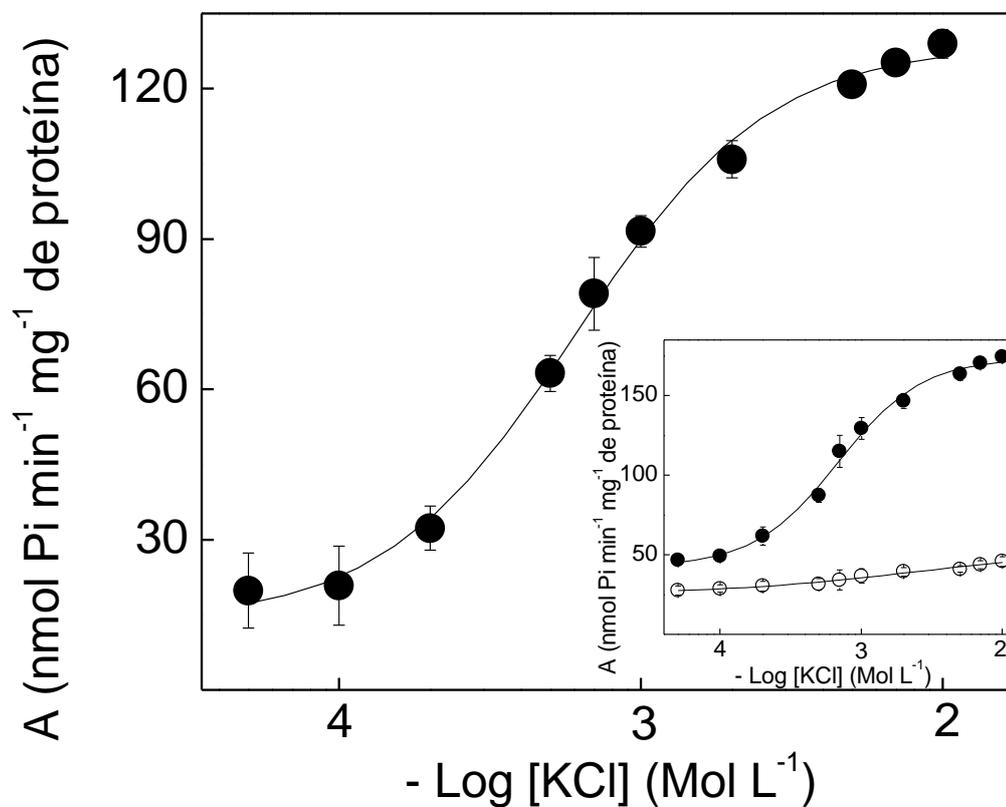


Figura 19. Efeito da concentração de K^+ na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 24 U GAFDH e 9 U FGQ em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

Na Figura 20 está mostrada a modulação pelo íon amônio da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de NH_4^+ ($5 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) acarretou a estimulação da atividade através de uma única curva de saturação através de cinética cooperativa ($n_H = 1,5$). A velocidade máxima foi estimada em $V_M = 134,4 \pm 8,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 1,28 \pm 0,44 \text{ mmol L}^{-1}$. A atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase representa 74% da atividade ATPase total e não foi observada uma estimulação significativa da atividade ATPase insensível a ouabaína nesse mesmo intervalo de concentração de íons amônio (inserção da Figura 20).

Concentrações crescentes de ouabaína ($1 \cdot 10^{-5}$ a $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) inibiram a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê em 70% (Figura 21). Os valores iniciais da atividade ATPase total de $156,1 \pm 7,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína diminuíram até $52,4 \pm 6,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína para concentrações de ouabaína da ordem de $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A determinação da constante de inibição através da representação de Dixon (inserção da Figura 21) resultou em um valor de $K_I = 0,18 \pm 0,058 \text{ mmol L}^{-1}$. O aspecto monofásico da curva de inibição da atividade ATPase com o aumento da concentração de ouabaína sugere a existência de um único sítio de ligação para a ouabaína na molécula da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

Na Tabela 2 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos dos diferentes ligantes que modulam a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase presente na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê. Independentemente do ligante, a modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase sempre ocorreu através de interações sítio-sítio.

Para esclarecer a natureza das ATPases insensíveis à ouabaína presentes na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê, foram utilizados diferentes inibidores da atividade ATPase combinados com a ouabaína. Os efeitos desses inibidores são mostrados na Tabela 3. A atividade ATPase total foi estimada em $171,2 \pm 11,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e a atividade ATPase insensível a ouabaína 3 mmol L^{-1} , em $49,3 \pm 2,5 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, confirmando mais uma vez que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase é responsável por cerca de 71% ($121,9 \pm 13,8 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) da atividade ATPase total presente na brânquia de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

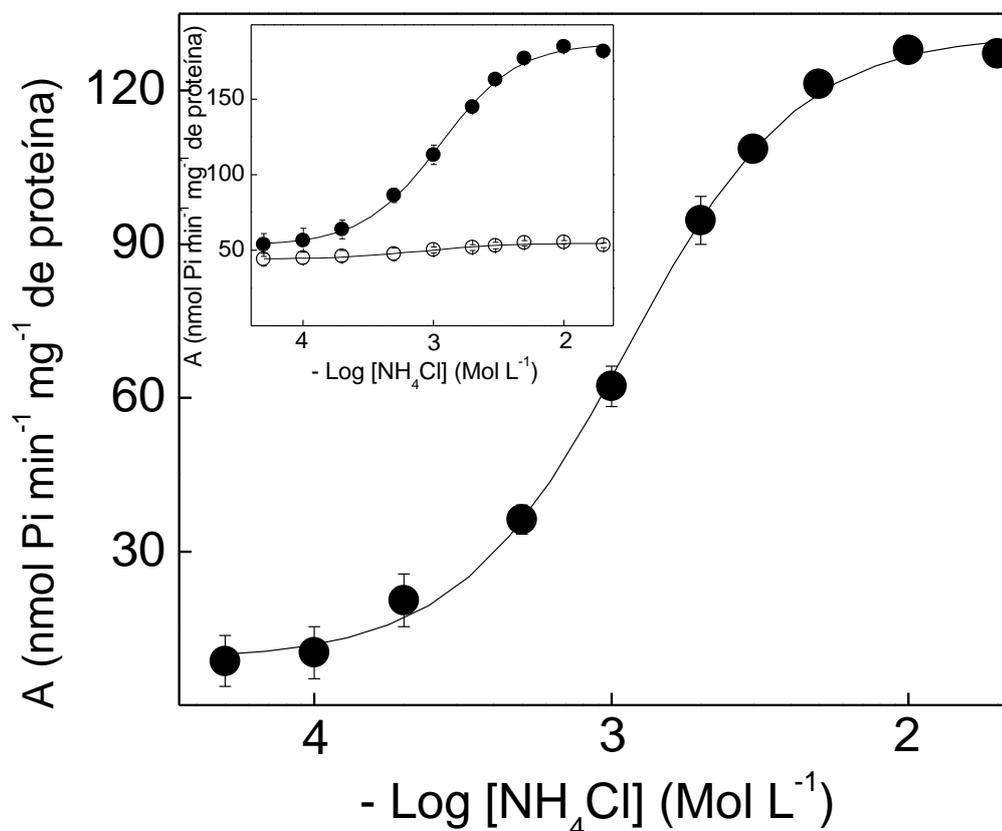


Figura 20. Efeito da concentração de NH_4^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 24 U GAFDH e 9 U FGQ em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

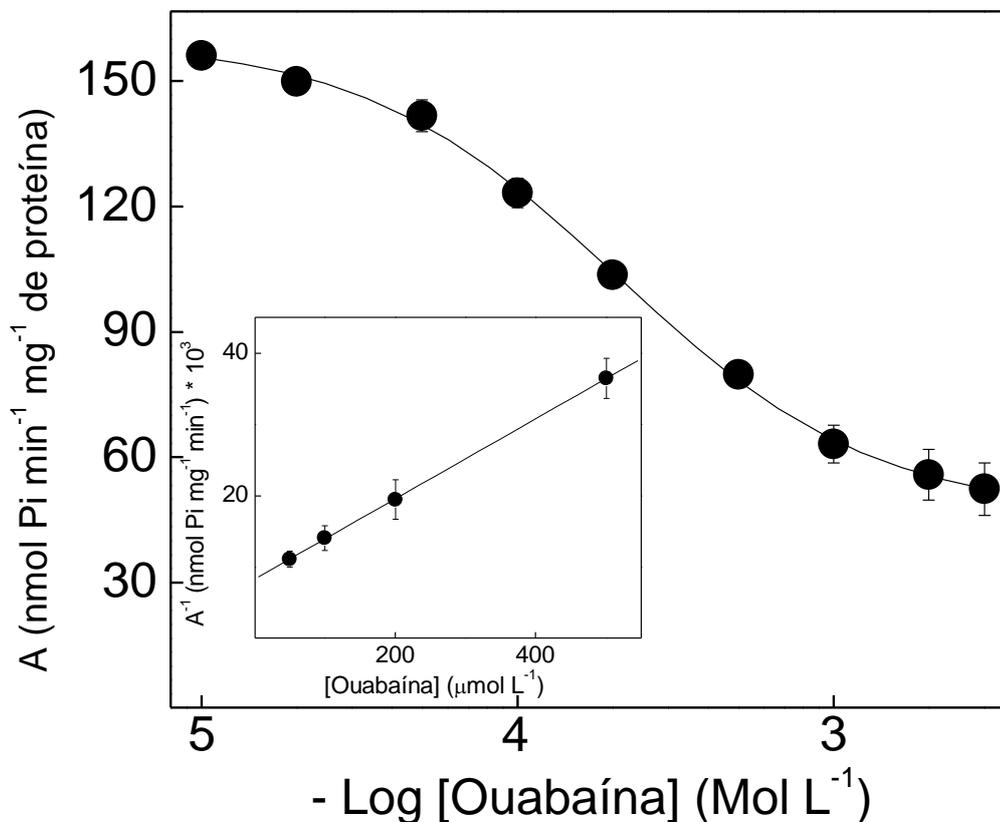


Figura 21. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_i.

A atividade residual de $4,0 \pm 2,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína estimada na presença de teofilina 5 mmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ indica a presença de 2,3% de fosfatases neutras na preparação. A atividade residual de $6,4 \pm 2,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína estimada na presença de ortovanadato 100 μmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ corrobora a sugestão da presença de fosfatases neutras e indica a presença de outras P-ATPases na fração microsomal.

A inibição da atividade insensível à ouabaína observada para a tapsigargina 0,5 μmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ e para o EGTA 1 mmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ indicam a presença de aproximadamente 4% de Ca²⁺-ATPase na fração microsomal. A associação da aurovertina 10 μmol L⁻¹ à ouabaína 3 mmol L⁻¹ revelou uma atividade residual de $13,8 \pm 0,6$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sugerindo, portanto, a presença de 8,1% de F₀F₁-ATPase na fração microsomal.

Além disso, a atividade residual de $23,3 \pm 0,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, correspondendo a 13,6% da atividade ATPase total, estimada na presença de bafilomicina A₁ 0,4 μmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugere a presença de V(H⁺)-ATPase na preparação microsomal. Finalmente, a atividade residual $17,2 \pm 0,9$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína estimada na presença de ácido etacrínico 2 mmol L⁻¹ mais ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugere a presença de atividade de Na⁺- e/ou K⁺-ATPase na preparação microsomal, correspondendo a 10% da atividade ATPase total.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* coletado no Rio Tietê.

Modulador	V _M (U mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	n _H	K _I (mmol L ⁻¹)
ATP	130,3 ± 4,8	0,065 ± 0,0016	1,7	-
MgATP*	114,6 ± 6,3	0,062 ± 0,0032	1,2	-
Mg ²⁺	130,6 ± 6,8	0,33 ± 0,042	2,5	-
Na ⁺	127,5 ± 5,3	5,3 ± 0,42	2,2	-
K ⁺	126,7 ± 7,7	0,65 ± 0,079	1,7	-
NH ₄ ⁺	134,5 ± 8,6	1,28 ± 0,44	1,5	-
Ouabaína	-	-	-	0,18 ± 0,058

*Estimado em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂

Tabela 3. Efeito de diversos inibidores na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

Inibidor	Atividade ATPase (U mg ⁻¹)	ASO (U mg ⁻¹)	Atividade ATPase Residual (U mg ⁻¹)	Atividade Relativa (%)	Provável Presente
Controle	171,2 ± 11,3	-	-	100	Total
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹)	49,3 ± 2,5	121,9 ± 13,8	-	71,2	(Na ⁺ , K ⁺)-
Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	46,6 ± 4,2	124,6 ± 14,5	-	72,8	P-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	42,9 ± 5,0	-	6,4 ± 2,5	3,7	FN
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	45,3 ± 5,0	-	4,0 ± 2,5	2,3	FA
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Bafilomicina (0,4 µmol L ⁻¹)	26,0 ± 3,0	-	23,3 ± 0,5	13,6	V(H ⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Tapsigargina (0,5 µmol L ⁻¹)	42,6 ± 3,4	-	6,7 ± 0,9	3,9	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + EGTA (1 mmol L ⁻¹)	41,8 ± 3,6	-	7,5 ± 1,1	4,4	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ácido etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	32,1 ± 3,4	-	17,2 ± 0,9	10,1	Na ⁺ - ou K ⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	35,5 ± 1,9	-	13,8 ± 0,6	8,1	FoF ₁ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Etanol (20 µL mL ⁻¹)	48,3 ± 3,1	-	-	-	-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + DMSO (20 µL mL ⁻¹)	48,1 ± 3,0	-	-	-	-

ASO- Atividade ATPase sensível a ouabaína e/ou ortovanadato. FN- fosfatases neutras. FA- fosfatase alcalina.

4.1.2. *Macrobrachium amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S

Os camarões *Macrobrachium amazonicum* foram coletados no Rio Tietê, no município de Santo Antônio do Aracanguá, São Paulo e aclimatados durante 10 dias a 21 ‰S conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para verificar a presença de vesículas seladas na fração microsomal do tecido branquial, a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase foi determinada em condições saturantes de íons potássio (10 mmol L⁻¹), sódio (50 mmol L⁻¹), magnésio (0,5 mmol L⁻¹) e ATP (1 mmol L⁻¹) na presença ($V_M = 87,4 \pm 4,2$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e ausência ($V_M = 62,5 \pm 2,9$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) de alameticina. Imediatamente antes da determinação da atividade, a enzima foi incubada com 10 µg do antibiótico durante 10 min, a 25°C. Essa diferença de cerca de 30% observada na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase sugere a presença de vesículas seladas na preparação microsomal. Consequentemente, a determinação da atividade ATPase foi realizada na presença de 10 µg de alameticina.

A fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*, aclimatados durante 10 dias a 21 ‰S apresentou uma atividade ATPase total de $87,4 \pm 4,2$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na ausência de ouabaína e $35,3 \pm 2,3$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na presença de ouabaína. Esses resultados mostram que a (Na⁺, K⁺)-ATPase representa cerca de 60% da atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial *Macrobrachium amazonicum* aclimatados durante 10 dias a 21 ‰S.

Na Figura 22 está mostrada a modulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo ATP (como MgATP). Em condições saturantes de íons potássio (10 mmol L⁻¹), sódio (50 mmol L⁻¹) e magnésio (0,5 mmol L⁻¹), o aumento da concentração de ATP entre 10⁻⁶ e 10⁻³ mol L⁻¹ acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação indicando um único sítio de ligação para o substrato. A velocidade máxima foi estimada em $V_M = 54,9 \pm 1,8$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e $K_{0,5} = 0,050 \pm 0,0034$ mmol L⁻¹ de acordo com cinética de Michaelis-Menten (Tabela 4). O verdadeiro substrato da enzima é o MgATP (inserção A da Figura 22). Nesse mesmo intervalo de concentração de ATP, a atividade ATPase insensível à ouabaína que representa 35% da atividade ATPase total e foi estimulada até 35 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (inserção B da Figura 22). Esses resultados sugerem que na fração microsomal existem outras ATPases além da (Na⁺, K⁺)-ATPase.

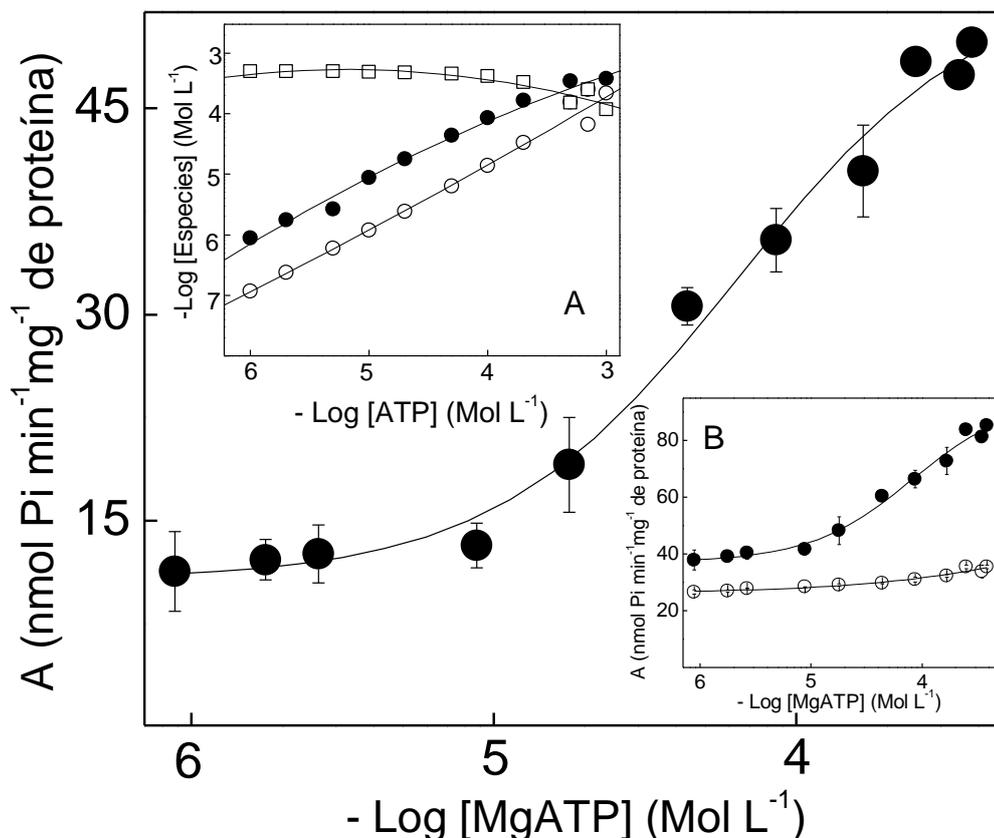


Figura 22. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de MgCl₂ (0,5 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios ± SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

A estimulação pelo ATP também foi estudada em condições estequiométricas de ATP e MgCl_2 (Figura 23). Em condições saturantes de Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}), a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi estimulada através de uma única curva de saturação no intervalo de concentração de MgATP entre $1,5 \cdot 10^{-8}$ e $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos sugerem a presença de um único sítio de ligação para o ATP e a atividade máxima foi estimada em $V_M = 49,8 \pm 2,7 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,062 \pm 0,0032 \text{ mmol L}^{-1}$ (Tabela 4). Nessas condições, o verdadeiro substrato da enzima é o MgATP e não o ATP livre (inserção A da Figura 23), a atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 60% da atividade ATPase total, enquanto a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem de $35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 23).

A Figura 24 mostra a modulação pelo Mg^{2+} da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}), o aumento da concentração dos íons magnésio no intervalo de 10^{-6} e $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 51,5 \pm 1,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,032 \pm 0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ através de interações cooperativas (Tabela 4). Nessas condições, o verdadeiro substrato da enzima é o MgATP (inserção A da Figura 24) e a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 58% da atividade total. Observa-se ainda que a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada pelo magnésio até valores da ordem de $37 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B na Figura 24).

A modulação pelo Na^+ da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), K^+ (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) no intervalo de 10^{-4} a $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 25). O aumento da concentração dos íons sódio estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 51,5 \pm 2,0 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 3,12 \pm 0,18 \text{ mmol L}^{-1}$ através de interações cooperativa (Tabela 3). A atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 62% da atividade total e a atividade insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem de $30 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 25).

Na Figura 26 está mostrado o efeito dos íons K^+ na modulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado a 21 ‰. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), o aumento da concentração de K^+ entre $5 \cdot 10^{-5}$

e 10^{-2} mol L⁻¹ acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação de acordo com cinética “Michaeliana”.

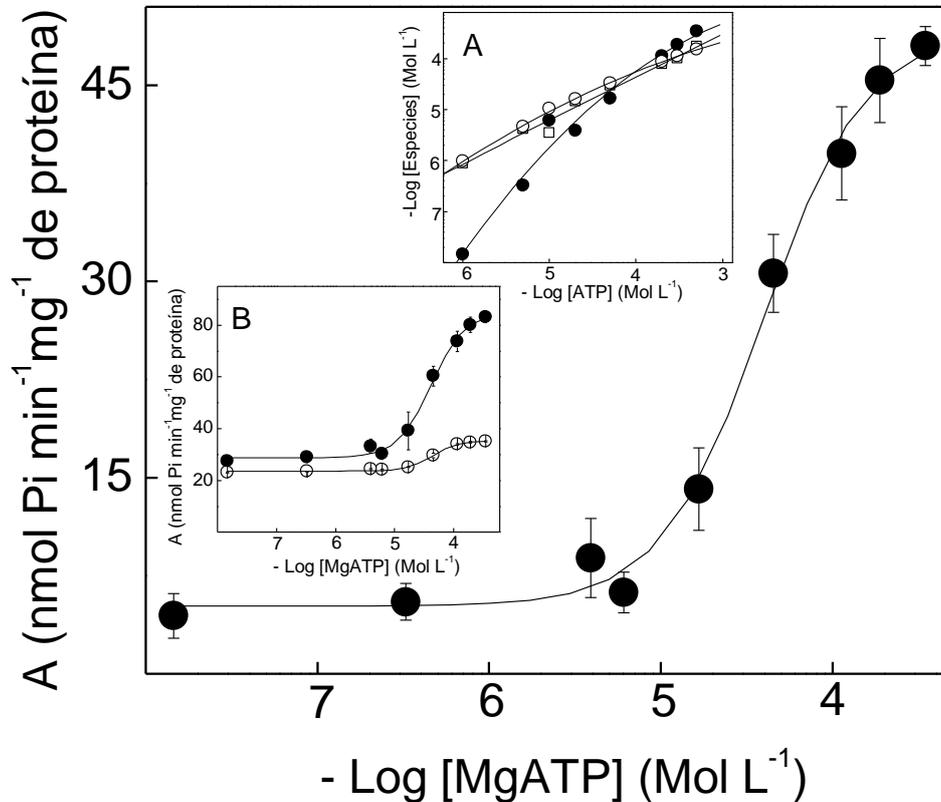


Figura 23. Efeito da concentração de ATP e Mg²⁺, em condições estequiométricas, na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações estequiométricas de ATP e MgCl₂ e concentrações saturantes de NaCl (50 mmol L⁻¹) e KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A**– Concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B**- atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

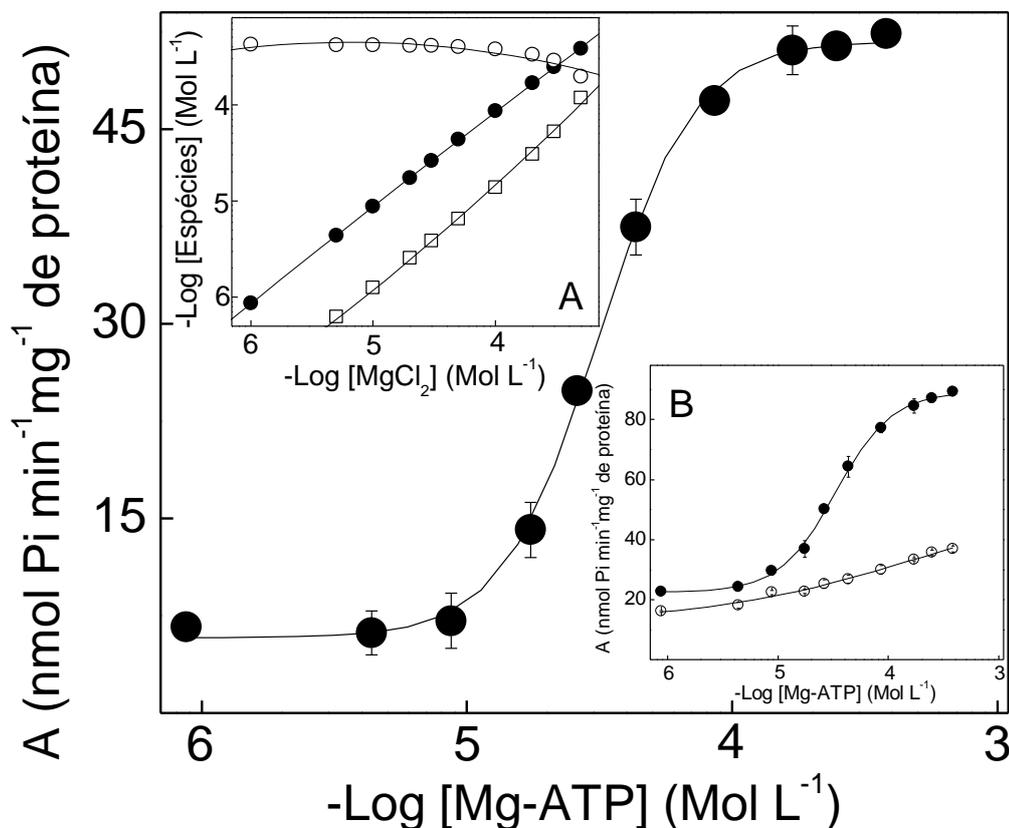


Figura 24. Efeito da concentração de Mg^{2+} (como MgATP) na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

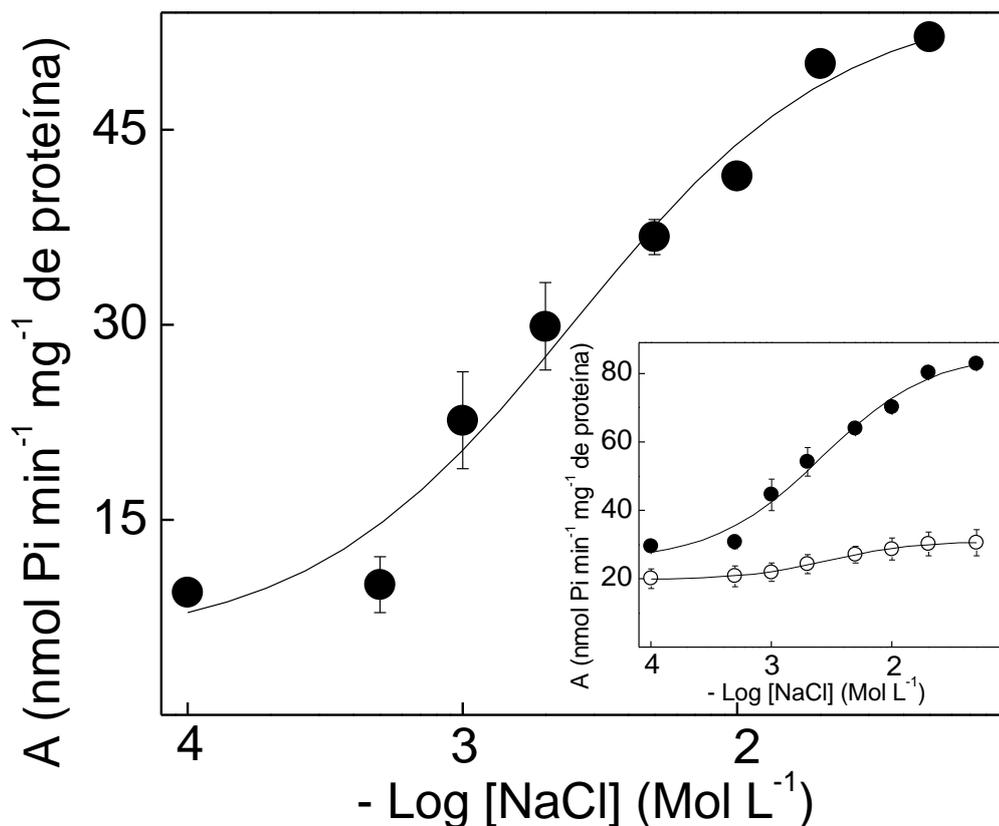


Figura 25. Efeito da concentração de Na^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), MgCl_2 (0,5 mmol L^{-1}), KCl (10 mmol L^{-1}) e contendo NADH 0,21 mmol L^{-1} , FEP 3,14 mmol L^{-1} , 10 μg de alameticina 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios \pm SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

Nestas condições foram obtidos valores máximos de $V_M = 52,8 \pm 3,1$ nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 1,86 \pm 0,14$ mmol L^{-1} (Tabela 4). A atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem de 35 nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 26) nesse mesmo intervalo de concentração, sugerindo a presença de K^+ -ATPase na fração microsomal.

O efeito do NH_4^+ na modulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*, aclimatado a 21 ‰ está mostrada na Figura 27. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (0,5 mmol L^{-1}), o aumento da concentração dos íons amônio entre 10^{-4} e 10^{-2} mol L^{-1} estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 60,8 \pm 2,1$ nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 1,96 \pm 0,11$ mmol L^{-1} através de interações cooperativas (Tabela 4). A atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 63% da atividade total e a atividade insensível à ouabaína foi estimulada até valores de ≈ 35 nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 27).

O aumento da concentração de ouabaína entre 10^{-5} e $3 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} acarretou uma inibição da atividade ATPase total da fração microsomal obtida de animais aclimatados a 21 ‰, da ordem de 63% (Figura 28). Os valores iniciais da atividade ATPase total de $89,1 \pm 1,6$ nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína diminuíram até $32,4 \pm 0,7$ nmol Pi $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína para uma concentração final de ouabaína da ordem de $3 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} . A determinação da constante de inibição, utilizando a representação gráfica de Dixon resultou em um valor de $K_I = 0,15 \pm 0,004$ mmol L^{-1} (inserção da Figura 28). O aspecto monofásico da curva de inibição da atividade ATPase com ouabaína sugere a existência de um único sítio de fixação para o inibidor na molécula da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de *M. amazonicum* aclimatado a 21 ‰.

Na Tabela 4 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para os diferentes ligantes que modulam a atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado durante 10 dias em salinidade de 21 ‰. Observa-se que, enquanto para os animais recém-capturados a modulação da atividade hidrolítica da enzima ocorre através interações sítio-sítio independente do ligante, o mesmo não ocorre para os animais aclimatados.

Para esclarecer a natureza das ATPases insensíveis à ouabaína que estão presentes na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado durante 10 dias a 21 ‰, foram utilizados diferentes inibidores da atividade ATPase associados à ouabaína $3 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1} (Tabela 5).

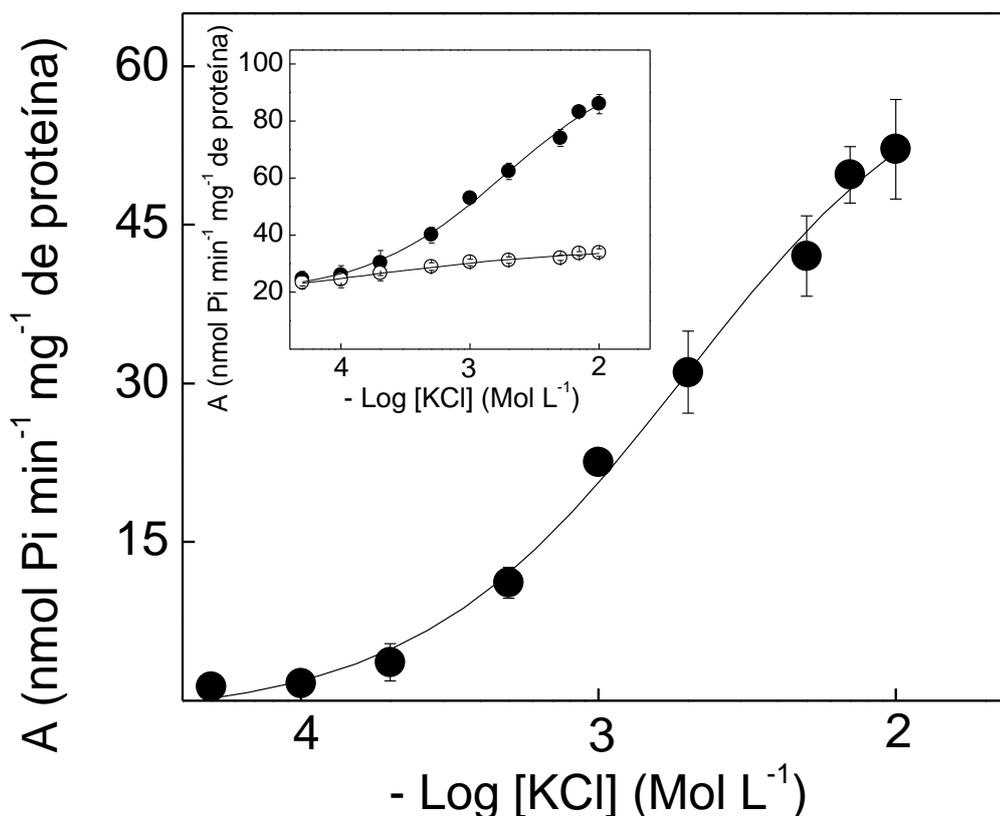


Figura 26. Efeito da concentração de K^+ na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (0,5 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 24 U GAFDH e 9 U FGQ em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

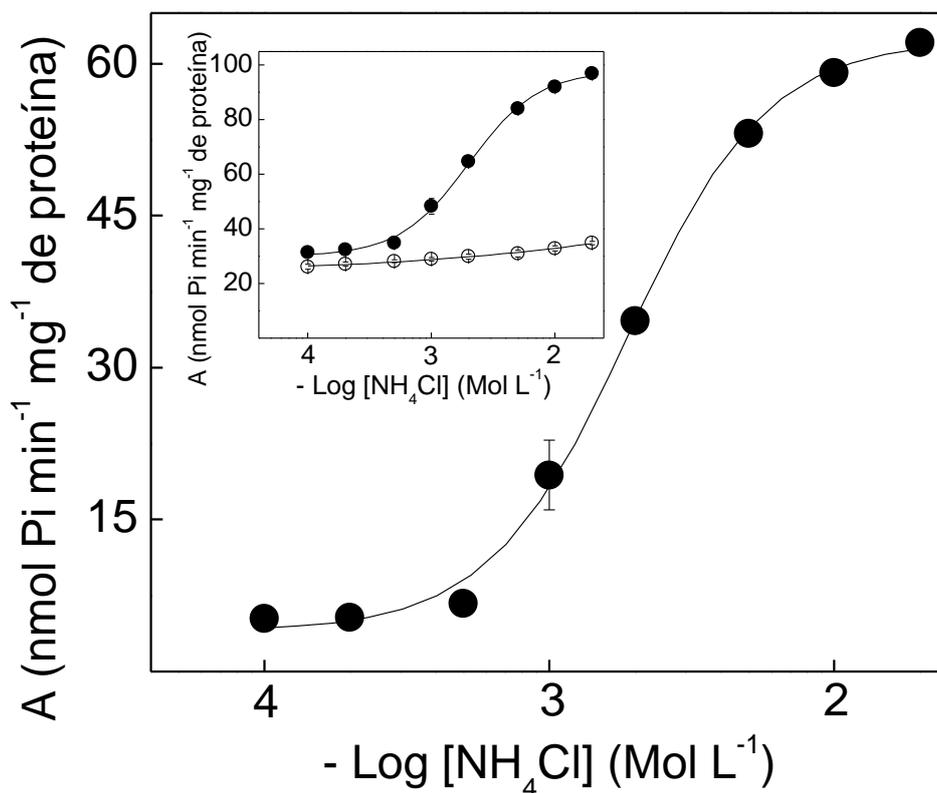


Figura 27. Efeito da concentração de NH_4^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (0,5 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 24 U GA FDH e 9 U FGQ em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios ±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

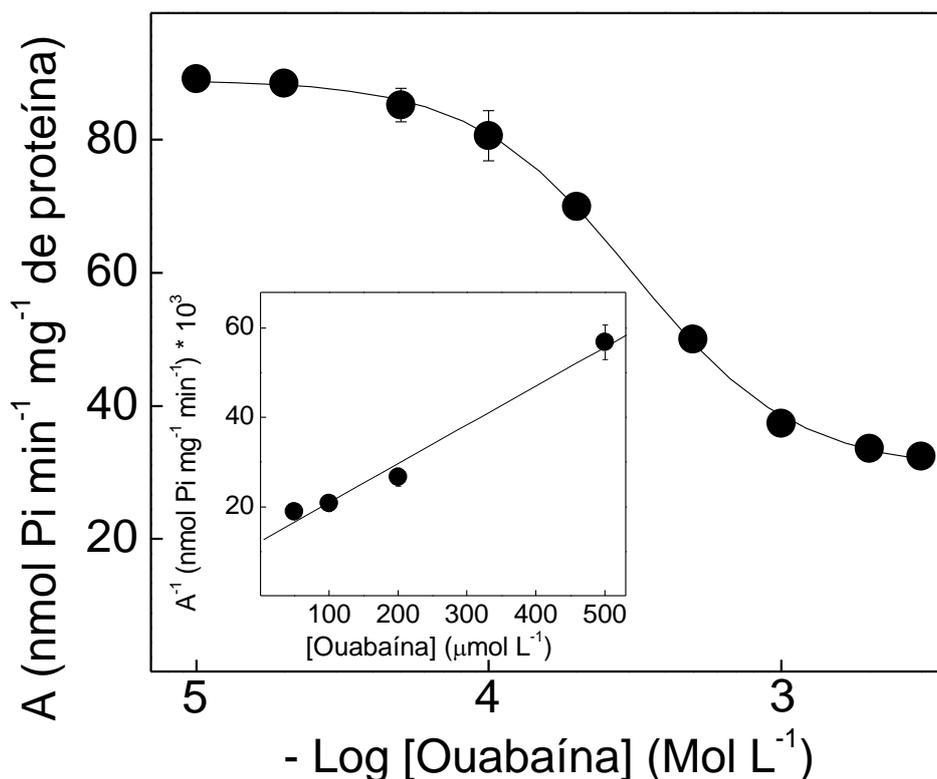


Figura 28. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado Rio Tietê e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (0,5 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 μg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 10,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_I.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

Modulador	V _M (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _M (mmol L ⁻¹)	n _H	K _I (mmol L ⁻¹)
ATP	54,9 ± 1,8	0,050 ± 0,003	1,1	-
MgATP*	49,8 ± 2,7	0,038 ± 0,005	1,3	-
Mg ²⁺	51,5 ± 1,3	0,032 ± 0,005	2,4	-
Na ⁺	51,5 ± 2,0	3,12 ± 0,18	1,4	-
K ⁺	52,8 ± 3,1	1,86 ± 0,14	1,1	-
NH ₄ ⁺	60,8 ± 2,1	1,96 ± 0,11	1,9	-
Ouabaína	-	-	-	0,15 ± 0,004

*Estimado em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂

A atividade ATPase total, da ordem de 88,2 ± 5,2 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína foi inibida até valores de 36,3 ± 3,5 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹. Esses resultados confirmam mais uma vez que a (Na⁺, K⁺)-ATPase é responsável por cerca de 60% da atividade ATPase total existente na fração microsomal obtidas das brânquias dos animais aclimatados.

Os valores determinados na presença de ortovanadato 100 µmol L⁻¹ associado à ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugerem a presença de 1,2% de fosfatases neutras na preparação. Considerando-se que a tapsigargina 0,5 µmol L⁻¹ e o EGTA 1 mmol L⁻¹ inibiram a atividade ATPase insensível à ouabaína, os resultados sugerem a presença de Ca²⁺-ATPase na preparação dos animais aclimatados. A associação da aurovertina 10 µmol L⁻¹ com a ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugere a presença de F-ATPases na preparação.

A inibição da atividade insensível à ouabaína por ácido etacrínico 2 mmol L⁻¹ e ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugere a presença de Na⁺- e/ou K⁺-ATPase na preparação microsomal. Essa possibilidade é corroborada pelos resultados apresentados nas inserções das Figuras 25 e 26. A ausência de inibição observada na presença de bafilomicina 0,4 µmol L⁻¹ e ouabaína 3 mmol L⁻¹ sugere a baixa prevalência de V(H⁺)-ATPases na fração microsomal.

Tabela 5. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

Inibidor	Atividade ATPase (U mg⁻¹)	ASO (U mg⁻¹)	Atividade ATPase Residual (U mg⁻¹)	Atividade Relativa (%)	Provável ATPase Presente
Controle	88,2 ± 5,2	-	-	100,0	Total
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹)	36,3 ± 3,5	51,9 ± 1,7	-	58,8	(Na ⁺ , K ⁺)-
Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	35,7 ± 2,8	52,5 ± 2,4	-	59,5	P-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	35,2 ± 2,1	-	1,1 ± 0,4	1,2	FN
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	35,6 ± 1,9	-	0,7 ± 0,3	0,8	FA
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Bafilomicina (0,4 µmol L ⁻¹)	35,8 ± 2,3	-	0,5 ± 0,2	0,6	V(H ⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Tapsigargina (0,5 µmol L ⁻¹)	23,1 ± 3,1	-	13,2 ± 0,8	15,0	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + EGTA (1 mmol L ⁻¹)	25,1 ± 3,6	-	11,2 ± 1,1	12,7	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ácido etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	26,1 ± 1,8	-	10,2 ± 0,7	11,6	Na ⁺ - ou K ⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	25,8 ± 2,8	-	10,5 ± 0,3	11,9	F ₀ F ₁ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Etanol (20 µL mL ⁻¹)	35,7 ± 2,1	-	-	-	-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + DMSO (20 µL mL ⁻¹)	35,9 ± 1,5	-	-	-	-

ASO- Atividade ATPase sensível a ouabaína e/ou ortovanadato. FN- fosfatases neutras. FA- fosfatase alcalina.

4.1.3. *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado no Rio Grande

Com o objetivo de verificar a presença de vesículas seladas na preparação da fração microsomal, a atividade ATPase foi determinada na presença ($V_M = 164,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) e ausência ($V_M = 107,8 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) de alameticina. Esses resultados indicam a presença de vesículas seladas na preparação. Desse modo, as demais determinações de atividade ATPase da enzima sempre foram efetuadas na presença de alameticina.

A fração microsomal do tecido branquial de camarões *M. amazonicum* coletados no Rio Grande apresentou uma atividade ATPase total de $166,4 \pm 3,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína enquanto $33,6 \pm 2,5 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína corresponde à atividade ATPase insensível a ouabaína. Em *M. amazonicum* recém-capturado no Rio Grande, a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase corresponde a $132,8 \pm 6,1 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína ($\approx 80\%$ da atividade ATPase total). Os resultados sugerem que a fração microsomal contém outras enzimas com atividade de ATPase.

A estimulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase pelo ATP (como MgATP), na presença de excesso de íons magnésio está mostrada na Figura 29. Em condições saturantes de Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}), a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase foi estimulada através de uma curva monofásica no intervalo de concentração de MgATP entre 10^{-6} e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Nessas condições a atividade máxima foi estimada em $V_M = 137,3 \pm 8,1 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_M = 0,083 \pm 0,010 \text{ mmol L}^{-1}$, não tendo sido observadas interações sítio-sítio (Tabela 6). O cálculo da concentração das espécies em solução mostra que a estimulação da atividade é devida ao MgATP e não ao ATP livre (inserção A da Figura 29). Nessas condições, a atividade ATPase insensível à ouabaína representa 20% da atividade ATPase total e foi estimulada até valores da ordem de $35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 29).

Na Figura 30 está mostrada a modulação da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase pelo MgATP em condições estequiométricas de ATP e MgCl_2 . Na presença de concentrações saturantes de K^+ (10 mmol L^{-1}) e Na^+ (50 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de MgATP entre $1,5 \cdot 10^{-8}$ e $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação atingindo valores máximos de $V_M = 128,9 \pm 1,9 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,052 \pm 0,0086 \text{ mmol L}^{-1}$ através de cinética cooperativa (Tabela 6). O cálculo da concentração das

espécies em solução confirma que a estimulação da atividade é devida ao MgATP e não ao ATP livre (inserção A da Figura 30).

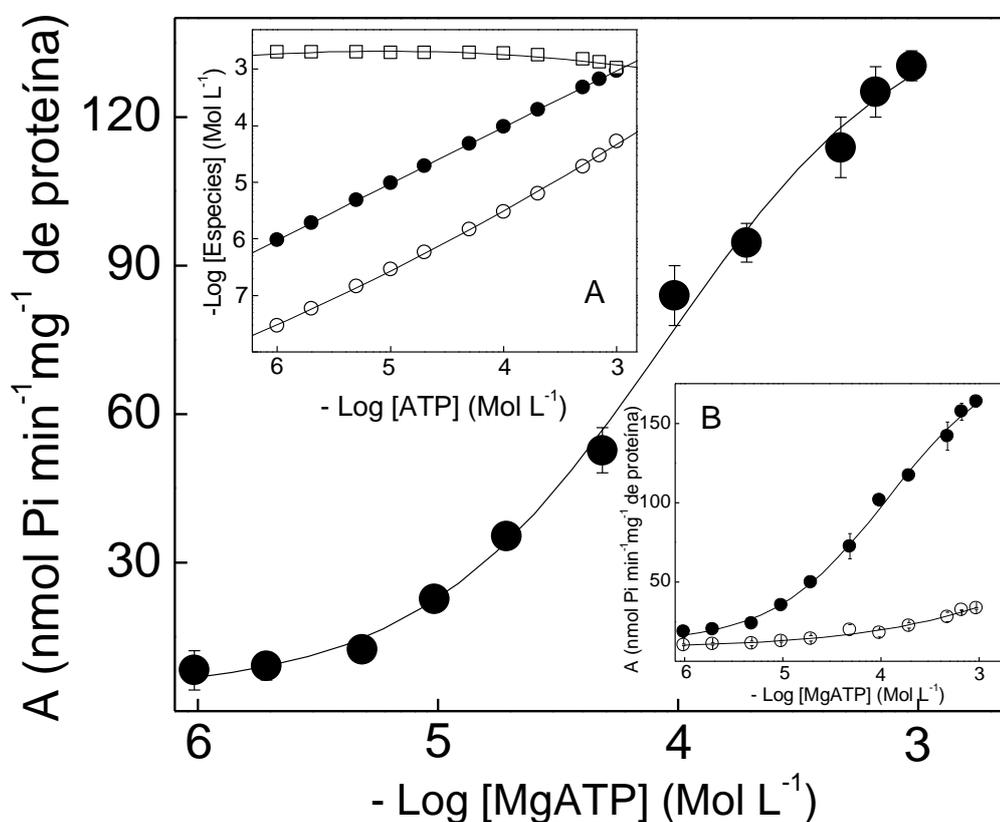


Figura 29. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

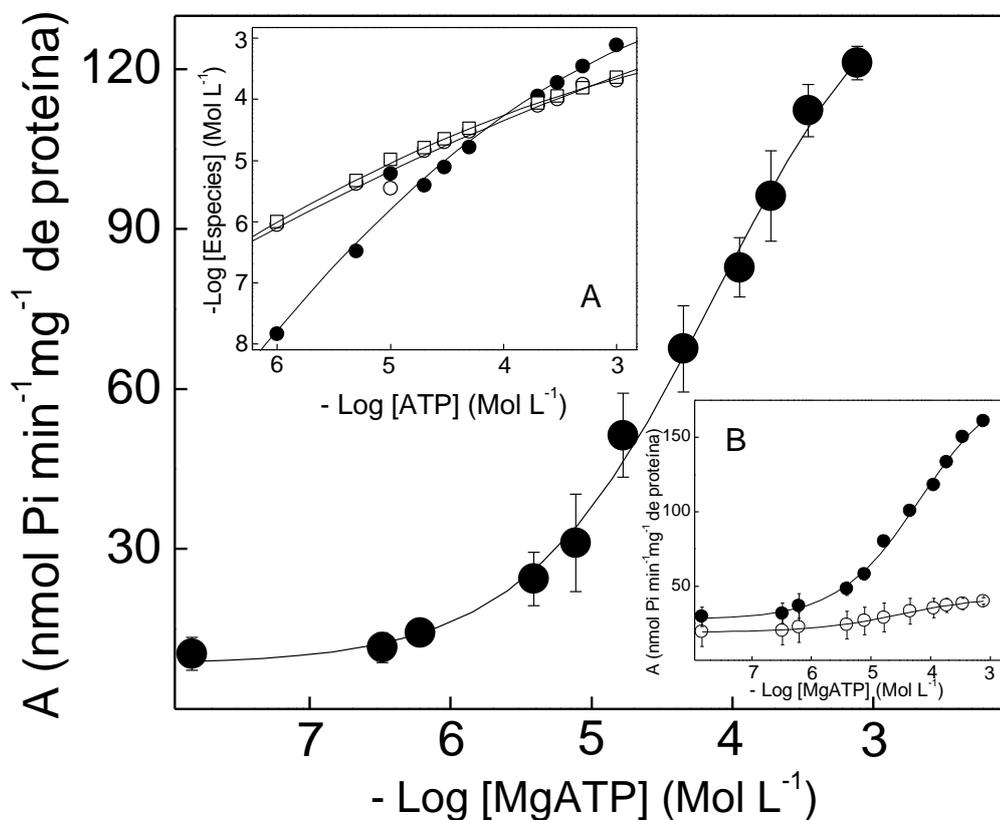


Figura 30. Efeito da concentração de ATP, em condições estequiométricas de ATP e MgCl_2 , na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, na presença de concentrações estequiométricas de ATP e MgCl_2 e concentrações saturantes de NaCl (50 mmol L^{-1}) e KCl (10 mmol L^{-1}) e contendo NADH 0,21 mmol L^{-1} , FEP 3,14 mmol L^{-1} , 10 μg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios \pm SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

Nessas condições, a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase representa cerca de 75% da atividade ATPase total enquanto a atividade ATPase insensível à ouabaína, representando apenas 25%, foi estimulada até valores da ordem de $35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 30).

A modulação da atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo Mg^{2+} (Figura 31) foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e K^+ (10 mmol L^{-1}). No intervalo de concentração de MgCl_2 entre $8 \cdot 10^{-6}$ e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, o aumento da concentração do MgATP estimulou a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase até valores máximos de $V_M = 135,6 \pm 2,5 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,16 \pm 0,0011 \text{ mmol L}^{-1}$, através de interações cooperativas (Tabela 6). O cálculo da concentração das espécies em solução confirma que a estimulação da atividade é devida ao MgATP e não ao ATP livre (inserção A da Figura 31). Nessas condições, a atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase representa cerca de 80% da atividade total e a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem $40 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção B da Figura 31) sugerindo a presença de outras ATPases estimuladas por magnésio na preparação.

Na Figura 32 está mostrada a modulação pelo Na^+ da atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande. Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), K^+ (10 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de íons sódio entre $5 \cdot 10^{-4}$ e $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ estimulou a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase até valores máximos de $V_M = 134,2 \pm 4,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 5,5 \pm 0,48 \text{ mmol L}^{-1}$ através de cinética cooperativa (Tabela 6). A atividade ATPase insensível à ouabaína foi ligeiramente (10%) estimulada nesse mesmo intervalo de concentração de íons sódio até valores máximos da ordem de $35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 32).

A modulação da atividade da (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo K^+ (Figura 33) foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}) no intervalo de $5 \cdot 10^{-5}$ a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O aumento da concentração dos íons potássio estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 132,3 \pm 5,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,75 \pm 0,014 \text{ mmol L}^{-1}$, através de interações cooperativas (Tabela 6). Os resultados mostram que a atividade (Na^+ , K^+)-ATPase representa cerca de 80% da atividade ATPase total e que a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada $\approx 10\%$ no intervalo de concentração estudado até valores máximos da ordem de $35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (inserção da Figura 33).

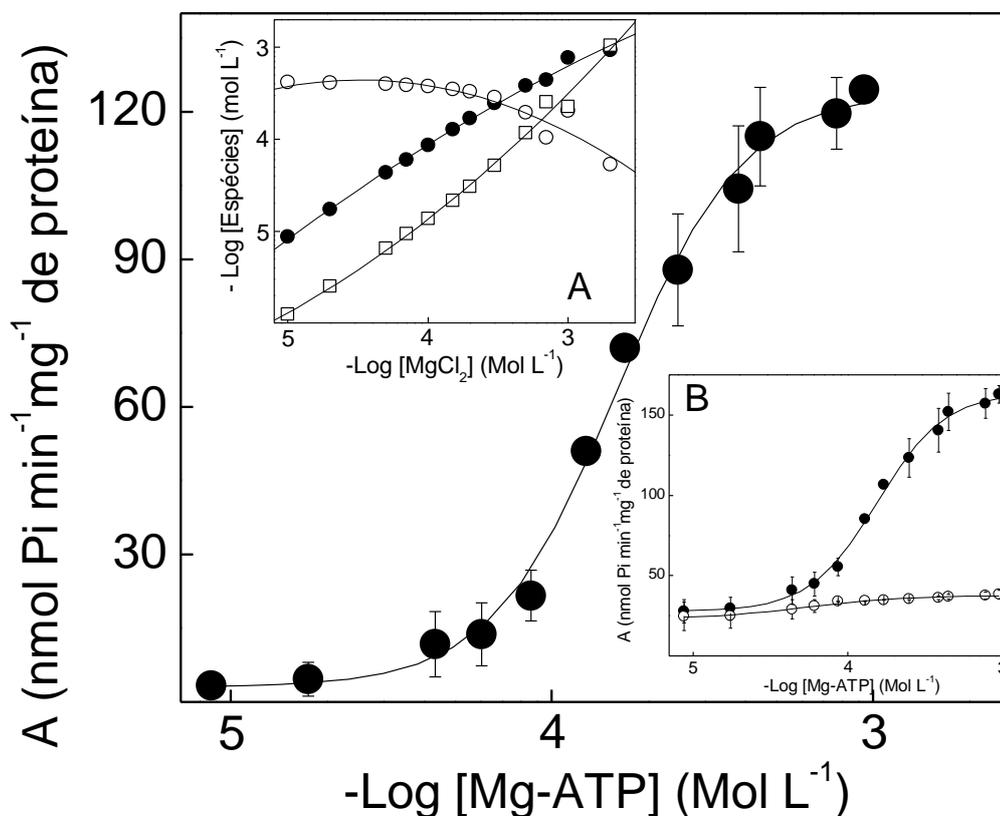


Figura 31. Efeito da concentração de Mg^{2+} (Como MgATP) na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), NaCl (50 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

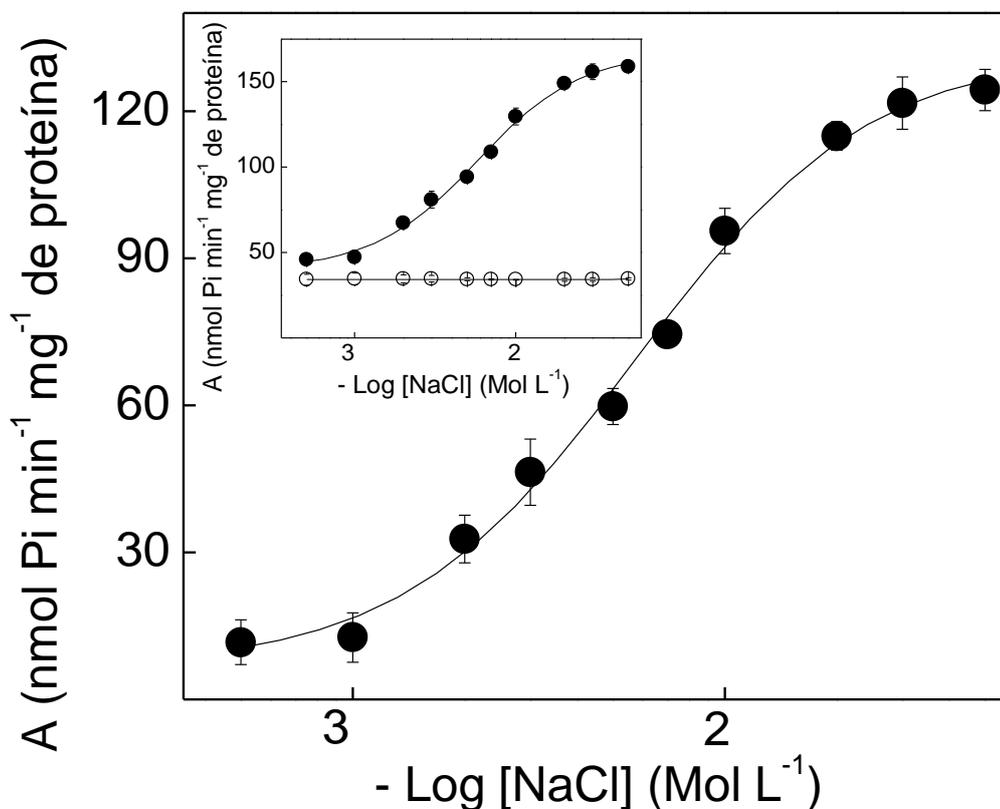


Figura 32. Efeito da concentração de Na^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), MgCl_2 (2 mmol L^{-1}), KCl (10 mmol L^{-1}) e contendo NADH 0,21 mmol L^{-1} , FEP 3,14 mmol L^{-1} , 10 μg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N= 3$). A figura apresentada corresponde aos valores médios \pm SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

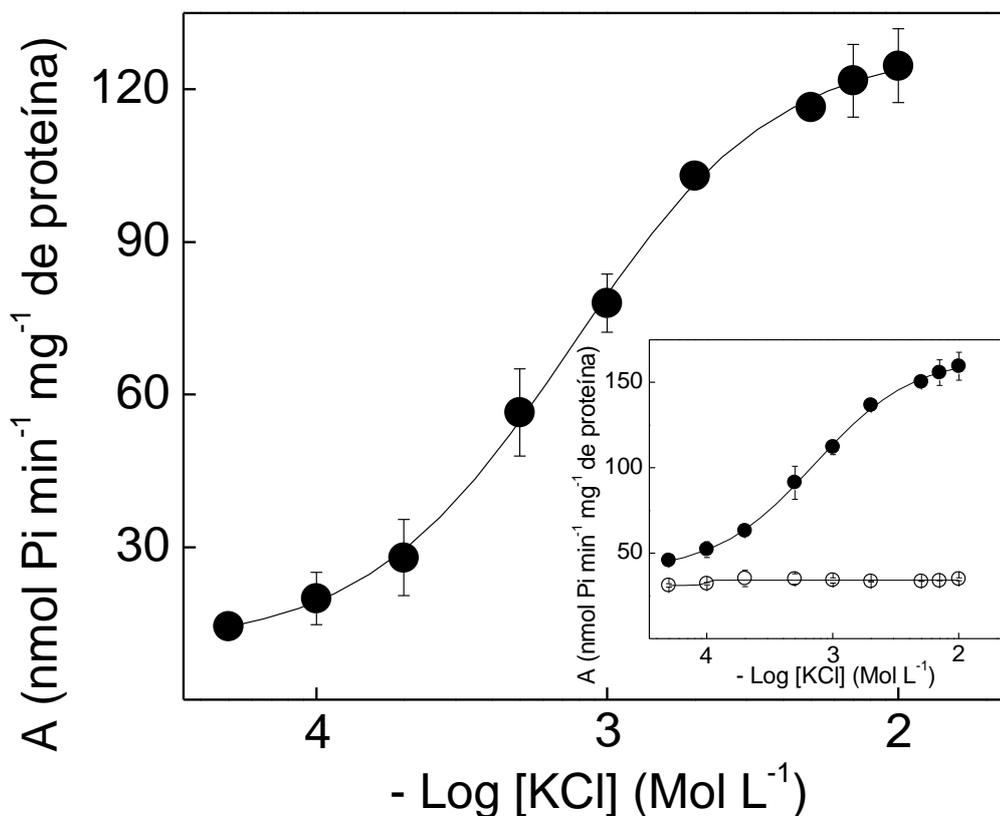


Figura 33. Efeito da concentração de K⁺ na atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹) e NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NAD⁺ 2,14 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 1 mmol L⁻¹, 10 µg de alameticina, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande também é estimulada por íons amônio (Figura 34). Na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), Na^+ (50 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de NH_4^+ entre 10^{-4} e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ acarretou a estimulação da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ através de uma curva única de saturação com valores máximos de $V_M = 149,2 \pm 7,1 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 2,5 \pm 0,27 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa estimulação ocorreu através de interações sítio-sítio (Tabela 6). Observa-se que a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ representa cerca de 80% da atividade ATPase total e que a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores de $\approx 35 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína nesse mesmo intervalo de concentração (inserção na Figura 34).

Concentrações crescentes de ouabaína entre 10^{-5} e $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ inibiram a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande em $\approx 75\%$ (Figura 35). Os valores iniciais da atividade ATPase, $155,8 \pm 1,9 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, diminuíram até $37,6 \pm 1,8 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína na presença de ouabaína $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A determinação gráfica da constante de inibição utilizando a representação de Dixon resultou em um valor de $K_I = 0,138 \pm 0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ (inserção da Figura 35). O aspecto monofásico obtido para a curva de inibição da atividade ATPase pela ouabaína sugere a existência de um único sítio de ligação na molécula da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

Na Tabela 6 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para os diferentes moduladores da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

Para esclarecer a natureza das ATPases insensíveis à ouabaína presentes na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Grande, foram utilizados diferentes inibidores combinados com a ouabaína (Tabela 7). Observa-se que a atividade ATPase total é da ordem de $164,3 \pm 4,9 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína enquanto a atividade ATPase insensível a ouabaína, estimada na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} é de $36,5 \pm 1,7 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, confirmando portanto que $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ corresponde a cerca de 78% ($127,8 \pm 6,6 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) da atividade ATPase total.

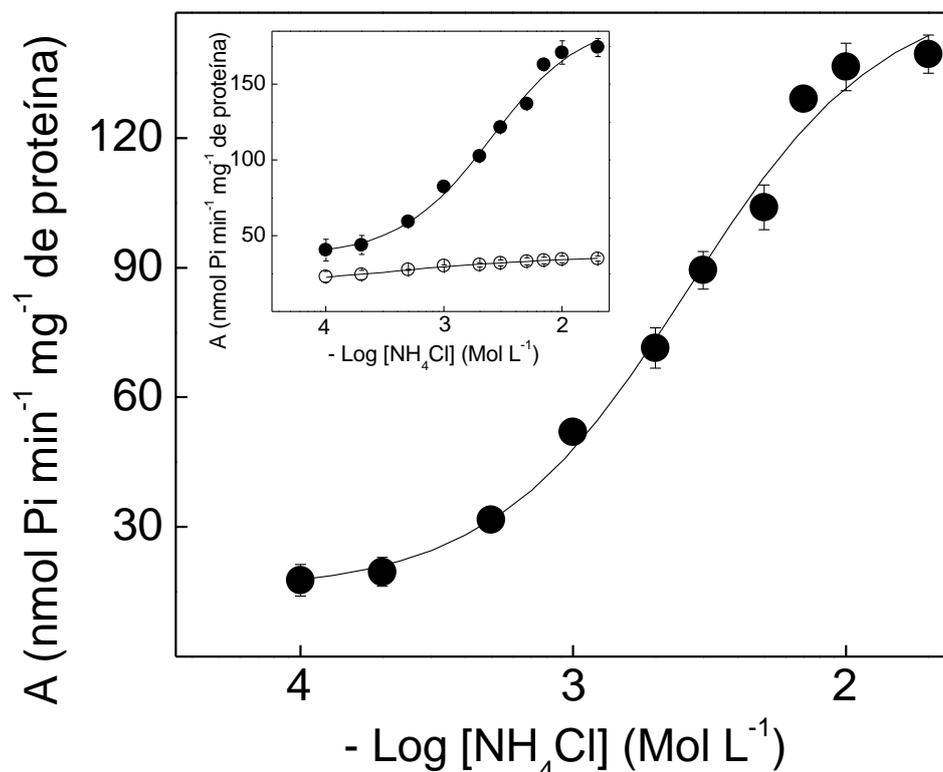


Figura 34. Efeito da concentração de NH_4^+ na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), MgCl_2 (2 mmol L^{-1}), NaCl (50 mmol L^{-1}) e contendo NAD^+ 2,14 mmol L^{-1} , fosfato de sódio 1 mmol L^{-1} , gliceraldeído-3-fosfato 1 mmol L^{-1} , 10 μg de alameticina, 12 U GAFDH e 9 U FGQ. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde aos valores médios \pm SD de três homogeneizados. **Inserção:** atividade ATPase total (●); atividade ATPase insensível à ouabaína (○).

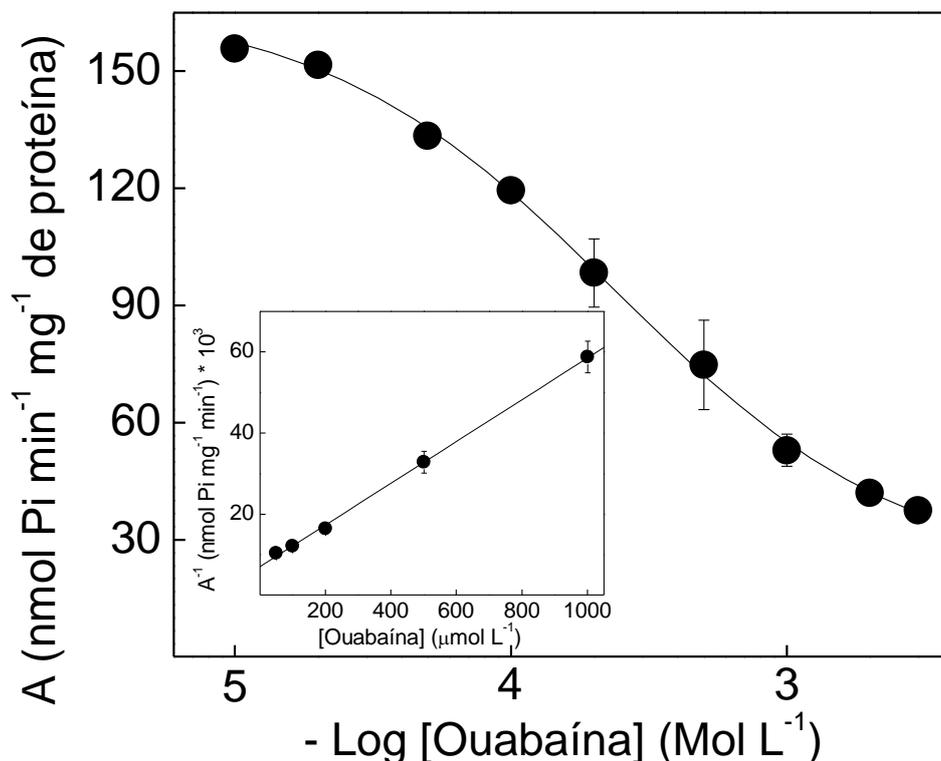


Figura 35. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, na presença de concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹), MgCl₂ (2 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e NaCl (50 mmol L⁻¹) e contendo NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 10 μg de alameticina, 49 U PQ e 94 U LDH. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogêneos de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios ± SD de três homogêneos. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_I.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* coletado no Rio Grande.

Modulador	V _M (nmol Pi min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _m (mmol L ⁻¹)	n _H	K _I (mmol L ⁻¹)
ATP	137,3 ± 8,1	0,083 ± 0,010	1	-
MgATP*	128,9 ± 1,9	0,052 ± 0,0086	1,2	-
Mg ²⁺	135,6 ± 2,5	0,16 ± 0,011	2,2	-
Na ⁺	134,2 ± 4,3	5,5 ± 0,48	1,5	-
K ⁺	132,3 ± 5,6	0,75 ± 0,14	1,4	-
NH ₄ ⁺	149,2 ± 7,1	2,5 ± 0,27	1,3	-
Ouabaína	-	-	-	0,138 ± 0,005

*Estimado em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂

A inibição observada na presença de ouabaína mais ortovanadato (atividade residual 5,0 ± 3,0 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e na presença de ouabaína mais teofilina (atividade residual de 4,3 ± 2,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) indica a presença de fosfatases na preparação. A inibição observada na presença de ouabaína mais tapsigargina ou EGTA sugere a presença de ≈4% de Ca²⁺-ATPase na fração microsomal. A inibição (atividade residual de 14,1 ± 3,6 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) observada para a bafilomicina A₁ combinada com a ouabaína sugere a presença de ≈8,6% de V(H⁺)-ATPase na preparação. A inibição da atividade insensível à ouabaína pelo ácido etacrínico (atividade residual 9,4 ± 2,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) sugere a presença de Na⁺- e/ou K⁺-ATPases na preparação microsomal, correspondendo a 5,7% da atividade ATPase total. A preparação microsomal aparentemente não apresenta atividade de F₀F₁-ATPase uma vez que uma inibição não significativa foi estimada na presença de ouabaína mais aurovertina.

Tabela 7. Efeito de diversos inibidores sobre a atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

Inibidor	Atividade ATPase (U mg⁻¹)	ASO (U mg⁻¹)	Atividade ATPase Residual (U mg⁻¹)	Atividade Relativa (%)	Provável ATPase Presente
Controle	164,3 ± 4,9	-	-	100,0	Total
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹)	36,5 ± 1,7	127,8 ± 6,6	-	77,8	(Na ⁺ , K ⁺)-
Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	34,0 ± 2,2	130,3 ± 7,1	-	79,3	P-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ortovanadato (100 µmol L ⁻¹)	31,5 ± 1,9	-	5,0 ± 3,0	3,0	FN
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	32,2 ± 2,8	-	4,3 ± 2,1	2,6	FA
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Bafilomicina (0,4 µmol L ⁻¹)	22,4 ± 1,3	-	14,1 ± 3,6	8,6	V(H ⁺)-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Tapsigargina (0,5 µmol L ⁻¹)	29,6 ± 1,6	-	6,9 ± 3,3	4,2	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + EGTA (1 mmol L ⁻¹)	30,3 ± 2,4	-	6,2 ± 2,5	3,8	Ca ²⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Ácido etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	27,1 ± 2,6	-	9,4 ± 2,3	5,7	Na ⁺ - ou K ⁺ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Aurovertina (10 µmol L ⁻¹)	36,2 ± 3,0	-	0,3 ± 0,2	0,2	F ₀ F ₁ -
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + Etanol (20 µL mL ⁻¹)	37,2 ± 2,3	-	-	-	-
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹) + DMSO (20 µL mL ⁻¹)	36,8 ± 2,2	-	-	-	-

ASO- Atividade ATPase sensível a ouabaína e/ou ortovanadato. FN- fosfatases neutras. FA- fosfatase alcalina.

4.2. Caracterização cinética da V(H⁺)-ATPase

4.2.1. V(H⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado no Rio Tietê

A fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê apresentou uma atividade ATPase insensível a ortovanadato de aproximadamente $42,8 \pm 3,8$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sendo que $19,3 \pm 1,7$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína corresponde a atividade insensível à bafilomicina (determinada na presença de ortovanadato 100 μmol L⁻¹ e bafilomicina 400 nmol L⁻¹) enquanto $23,5 \pm 2,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína representa a atividade V(H⁺)-ATPase.

Na Figura 36 está mostrada a modulação pelo ATP (como MgATP) da atividade V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê. Em condições saturantes de Mg²⁺ (2 mmol L⁻¹) o aumento da concentração de ATP (no intervalo de 10⁻⁵ a 10⁻³ mol L⁻¹) acarretou a estimulação da atividade através de uma única curva de saturação com $V_M = 27,2 \pm 1,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e $K_{0,5} = 0,27 \pm 0,04$ mmol L⁻¹ através de cinética “Michaeliana” (Tabela 8). Nessas condições, o aumento da atividade está relacionado com a variação da concentração do MgATP e não do ATP livre (inserção A da Figura 36). A atividade insensível à bafilomicina também foi estimulada nessa faixa de concentração atingindo valores correspondentes a 45% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato (inserção B da Figura 36).

A modulação da atividade V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo íon magnésio (Figura 37) foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹). O aumento da concentração de Mg²⁺ no intervalo de 10⁻⁵ a 3.10⁻³ mol L⁻¹ estimulou a atividade da enzima até valores máximos de $V_M = 28,0 \pm 2,4$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e $K_{0,5} = 0,28 \pm 0,05$ mmol L⁻¹ através de interações cooperativas (Tabela 8). Estes resultados confirmam que o complexo MgATP é o verdadeiro substrato da enzima (inserção A da Figura 37). A atividade insensível à bafilomicina (inserção B da Figura 37) também foi estimulada por íons magnésio, até valores de $22,3 \pm 2,2$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Concentrações crescentes de bafilomicina entre 10⁻⁹ e 4.10⁻⁷ mol L⁻¹, inibiram cerca de 45% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê (Figura 38). Em concentrações saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹) e Mg²⁺ (2 mmol L⁻¹) observou-se que a inibição ocorre através de uma curva monofásica, apresentando um valor de $K_I = 35,1 \pm 1,1$ nmol L⁻¹ (inserção da Figura 38).

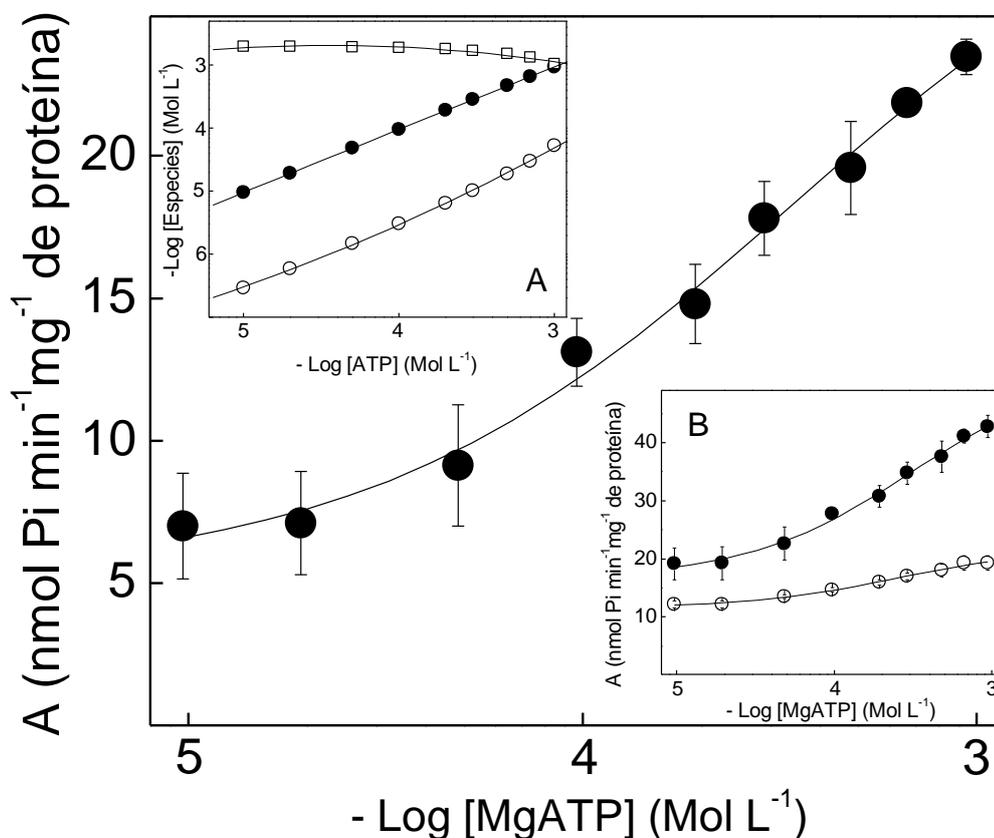


Figura 36. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios ± SD de três homogeneizados. **Inserção:** **A-** concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase insensível à ortovanadato (●); atividade ATPase insensível à bafilomicina (○).

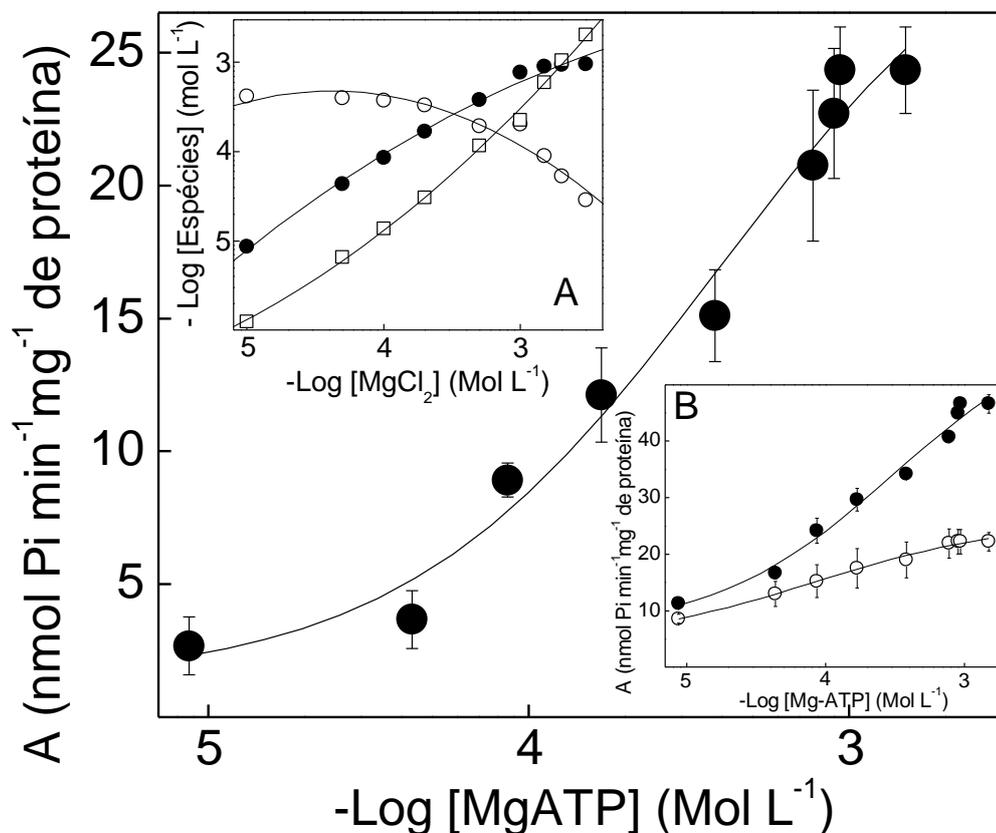


Figura 37. Efeito da concentração de Mg^{2+} (como MgATP) na atividade $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogêneos de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios ±SD de três homogêneos. **Inserção:** **A-** concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase insensível à ortovanadato (●); atividade ATPase insensível à bafilomicina (○).

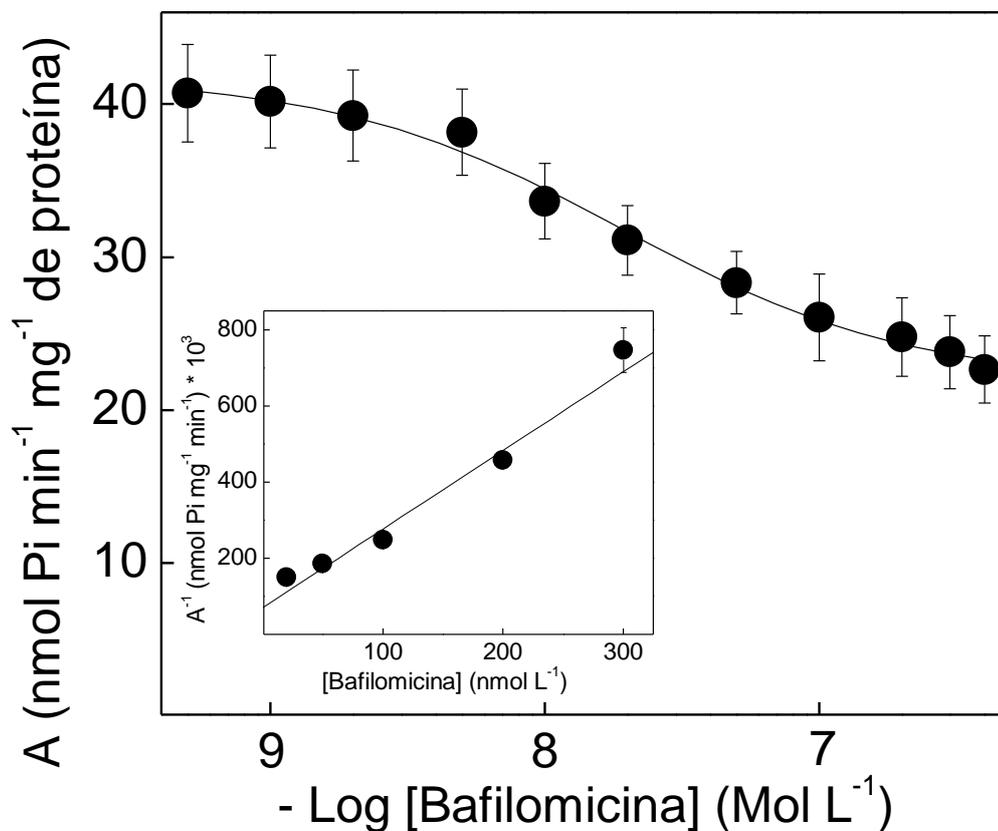


Figura 38. Efeito da concentração de bafilomicina na atividade insensível a ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 11,2 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_I.

Os valores iniciais da atividade ATPase insensível ao ortovanadato de $43,8 \pm 2,9$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína diminuíram até $22,6 \pm 2,3$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para concentrações de bafilomicina da ordem de 4.10^{-7} mol L⁻¹.

A Tabela 8 resume os valores calculados para os parâmetros cinéticos determinados para a V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê pelo ATP.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum*, coletado no Rio Tietê, pelo ATP, Mg²⁺ e inibição pela bafilomicina.

Modulador/Inibidor	V _M (U mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	n _H	K _I (nmol L ⁻¹)
ATP	27,2 ± 1,1	0,27 ± 0,04	1,1	-
Mg ²⁺	28,0 ± 2,4	0,28 ± 0,05	1,2	-
Bafilomicina	-	-	-	35,1 ± 1,1

4.2.2. V(H⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado no Rio Grande

A fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande apresentou uma atividade ATPase insensível a ortovanadato de $40,0 \pm 3,7$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sendo que $24,4 \pm 1,8$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína corresponde a atividade insensível à bafilomicina (determinada na presença de ortovanadato 100 μmol L⁻¹ e bafilomicina 400 nmol L⁻¹) enquanto $15,6 \pm 2,2$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína corresponde a atividade V(H⁺)-ATPase.

A modulação da atividade V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* pelo ATP (como MgATP) (Figura 39) foi determinada em condições saturantes de Mg²⁺ (2 mmol L⁻¹). O aumento da concentração de ATP no intervalo de 10⁻⁵ a 10⁻³ mol L⁻¹ estimulou a atividade da enzima até valores máximos de V_M = $16,7 \pm 1,7$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = $0,16 \pm 0,03$ mmol L⁻¹ através de cinética “Michaeliana” (Tabela 9). Estes resultados confirmam que o complexo MgATP é o verdadeiro substrato da enzima (inserção A da Figura 39). A atividade insensível à bafilomicina também foi estimulada pelo ATP, até valores máximos de $22,8 \pm 1,4$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (inserção B da Figura 39).

Na Figura 40 está mostrada a modulação pelo Mg^{2+} (como $MgATP$) da atividade $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}), o aumento da concentração de $MgCl_2$ ($5 \cdot 10^{-6}$ a $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) acarretou a estimulação da atividade através de uma curva única de saturação com $V_M = 17,4 \pm 1,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,14 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$, através de cinética “Michaeliana” (Tabela 9). Nessas condições o aumento da atividade está relacionado com a variação da concentração do $MgATP$ e não do ATP livre (inserção A da Figura 40). A atividade insensível à bafilomicina também foi estimulada nesta faixa de concentração atingindo valores correspondentes a 55% da atividade ATPase insensível ao ortovanadato (inserção B da Figura 40).

Concentrações crescentes de bafilomicina ($5 \cdot 10^{-10}$ a $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) inibiram a atividade ATPase insensível ao ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande em cerca de 50% (Figura 41). A atividade ATPase insensível ao ortovanadato, em concentrações saturantes de ATP (1 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (2 mmol L^{-1}), apresentou valores iniciais de $37,6 \pm 2,4 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, que diminuíram até valores de $19,5 \pm 2,2 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína com o aumento da concentração de bafilomicina. A inibição pela bafilomicina ocorreu através de uma curva monofásica com $K_I = 21,2 \pm 1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ (inserção da Figura 41).

A Tabela 9 resume os valores dos parâmetros cinéticos determinados para a $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande pelo ATP, íons magnésio e inibidor bafilomicina.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum*, coletado no Rio Grande, pelo ATP, Mg^{2+} e inibição pela bafilomicina.

Modulador/Inibidor	V_M (U mg^{-1})	$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})	n_H	K_I (nmol L^{-1})
ATP	$16,7 \pm 1,7$	$0,16 \pm 0,03$	1,1	-
Mg^{2+}	$17,4 \pm 1,3$	$0,14 \pm 0,02$	1,1	-
Bafilomicina	-	-	-	$21,2 \pm 1,3$

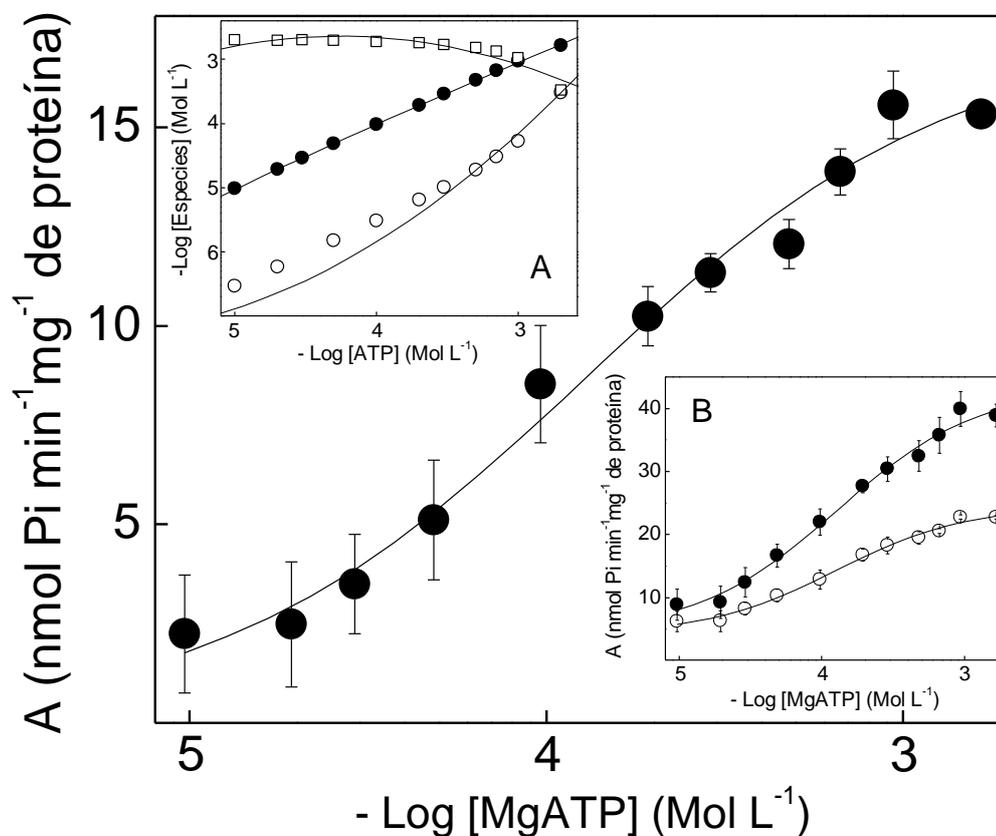


Figura 39. Efeito da concentração de ATP (como MgATP) na atividade V(H⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, 10 μg de alameticina, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** concentrações calculadas de Mg²⁺ livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase insensível à ortovanadato (●); atividade ATPase insensível à bafilomicina (○).

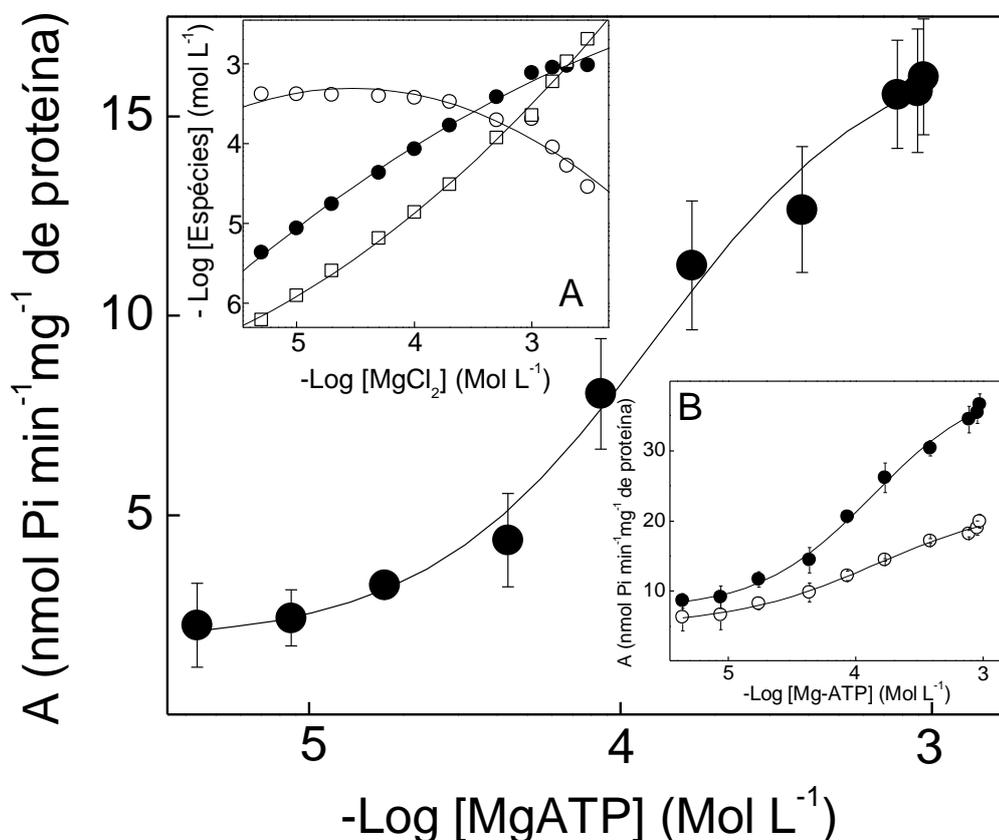


Figura 40. Efeito da concentração do Mg^{2+} (como MgATP) na atividade $V(H^+)$ -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, 10 μg de alameticina, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção: A-** concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (○) e MgATP (●). **B-** atividade ATPase insensível à ortovanadato (●); atividade ATPase insensível à bafilomicina (○).

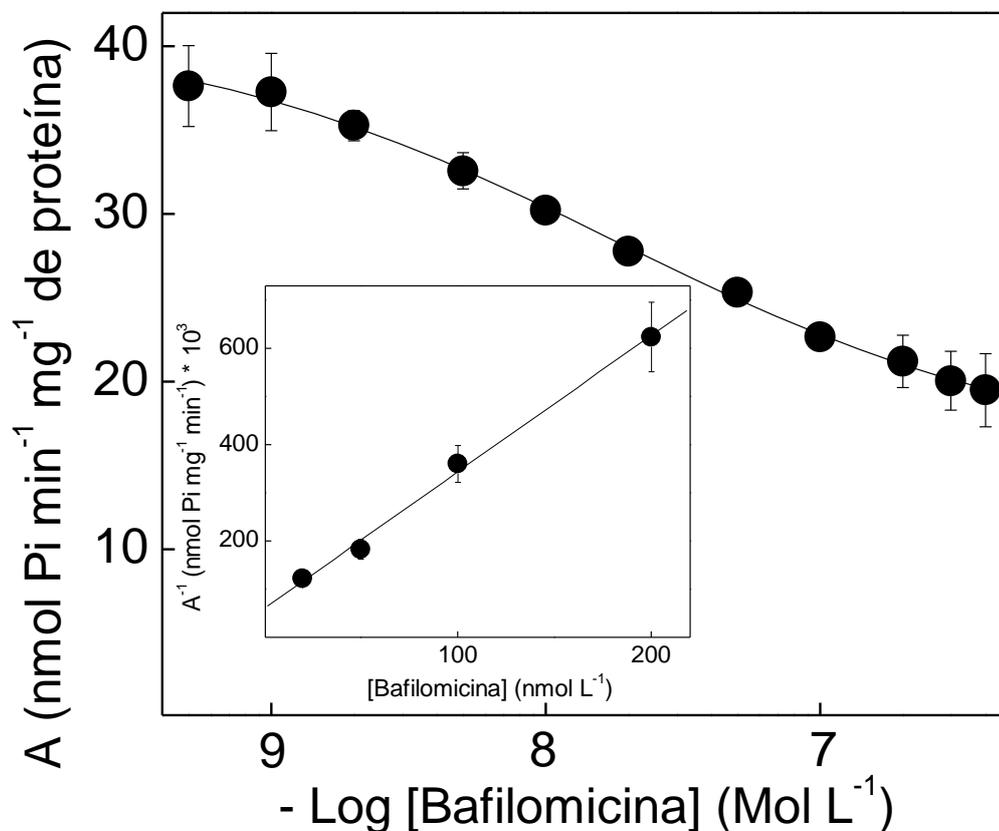


Figura 41. Efeito da concentração de bafilomicina na atividade insensível a ortovanadato da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Grande.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo ATP 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 10 mmol L⁻¹, ortovanadato 100 μmol L⁻¹, 10 μg de alameticina, NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,14 mmol L⁻¹, 49 U PQ e 94 U LDH em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 14,6 μg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios±SD de três homogeneizados. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_i.

4.3. Caracterização bioquímica da (Na⁺, K⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum*

A eletroforese em gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) 5-20% da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* capturado nos rios Tietê e Grande e aclimatado a 21 ‰ está mostrada na Figura 42. Apesar do padrão eletroforético ser relativamente complexo é possível observar algumas diferenças entre as frações microsomais preparadas que, aparentemente, sugerem diferenças na expressão proteica no tecido branquial de *M. amazonicum* recém capturado e aclimatado a 21 ‰. Interessantemente, a banda correspondente à hemocianina, entre 70 e 100 KDa, é muito diferente nos três casos, apesar da mesma concentração de proteína ter sido aplicada no gel.

A Figura 43 mostra a análise por western blotting da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*. Os resultados revelam a presença de uma única banda imunorreativa para a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase do tecido branquial, apresenta um valor de massa molar de aproximadamente 110 kDa. Embora essa técnica de SDS-PAGE apresente um erro de cerca de 10% com relação aos valores da M_r (Weber & Osborn, 1969; Kaufmann et al., 1984), observa-se que o deslocamento da banda correspondente aos animais aclimatados aparece em uma região do gel um pouco abaixo das correspondentes aos animais recém capturados. Embora os resultados sugiram a presença de apenas uma isoforma para a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase no tecido branquial de *M. amazonicum*, aparentemente a isoforma correspondente aos animais aclimatados pode ser diferente daquela dos animais recém capturados. Entretanto a confirmação dessa possibilidade permanece a ser estudada.

Outro resultado interessante revelado no western blotting foram as diferentes intensidades reveladas na resposta ao anticorpo monoclonal para a subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase. A banda imunorreativa correspondente ao tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê apresentou uma menor intensidade comparada com a do Rio Grande. A intensidade da banda imunorreativa correspondente aos animais do Rio Tietê aclimatados a 21 ‰ foi menos intensa ainda. Considerando que a mesma quantidade de proteína foi aplicada no gel, essas diferenças observadas nas intensidades das bandas imunorreativas podem indicar diferenças na expressão da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase no tecido branquial de *M. amazonicum*.

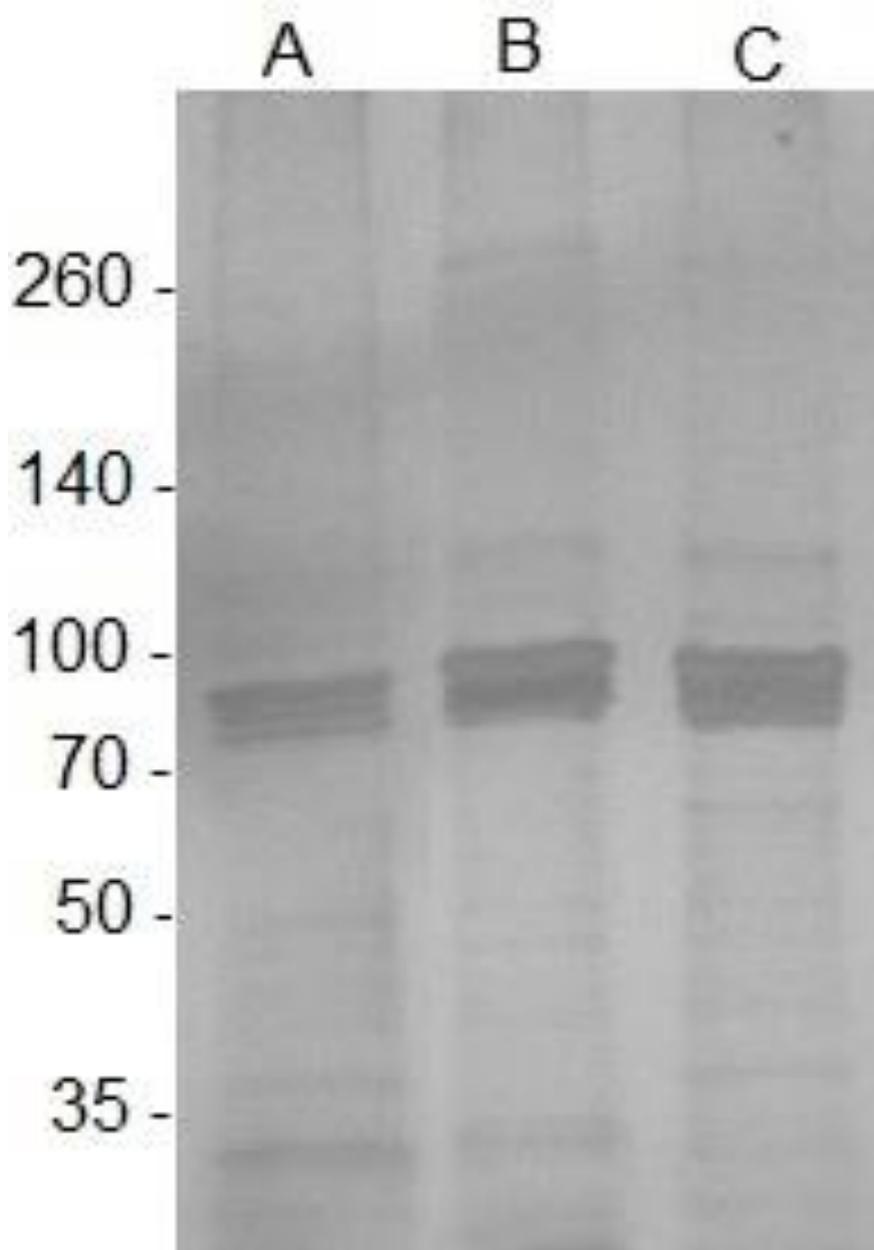


Figura 42. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 5-20%) da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% utilizando 4,0 μg de proteína e submetida a revelação com nitrato de prata. **A-** *M. amazonicum* recém capturado do Rio Tietê. **B-** *M. amazonicum* do Rio Tietê aclimatado a 21 ‰ durante 10 dias. **C-** *M. amazonicum* recém-capturado do Rio Grande.

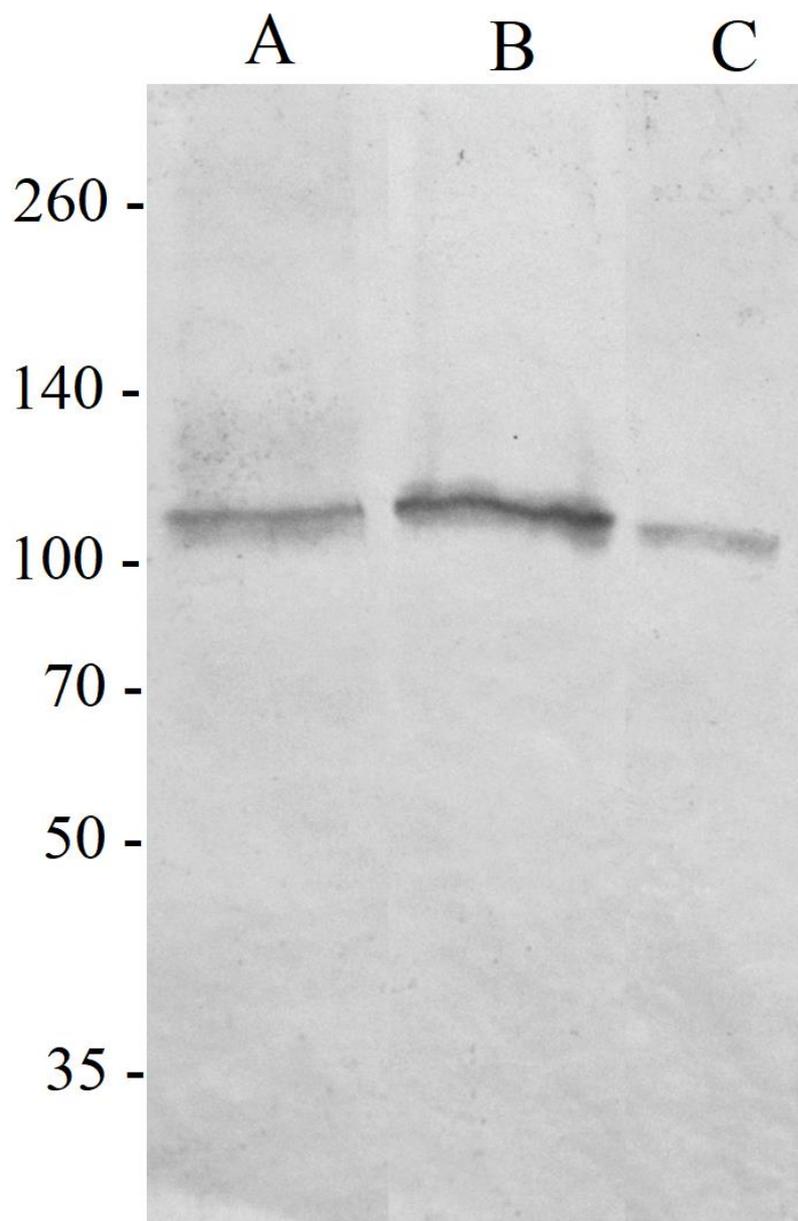


Figura 43. Western blotting na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* para a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% utilizando 50 μg de proteína. Após a corrida o gel foi submetido à eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal alfa-5 e a seguir com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado com fosfatase alcalina, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A-** *M. amazonicum* recém-capturado do Rio Tietê. **B-** *M. amazonicum* recém-capturado do Rio Grande. **C-** *M. amazonicum* do Rio Tietê aclimatado em salinidade de 21 ‰ durante 10 dias.

A imunolocalização de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na brânquia de *M. amazonicum* do Rio Tietê está mostrada na Figura 44. O septo intralamelar das lamelas branquiais do *M. amazonicum* apresentaram imunomarcação, enquanto nenhuma marcação foi detectada nas células pilares (Figura 44A). A aclimação dos animais durante 10 dias em uma salinidade de 21 ‰ não causou diferenças notáveis tanto na localização quanto na intensidade do sinal de imunofluorescência para a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Figura 44B). Esses resultados mostram que a distribuição da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ocorre exclusivamente no septo intralamelar da brânquia e que a aclimação em alta salinidade não altera a distribuição desta enzima.

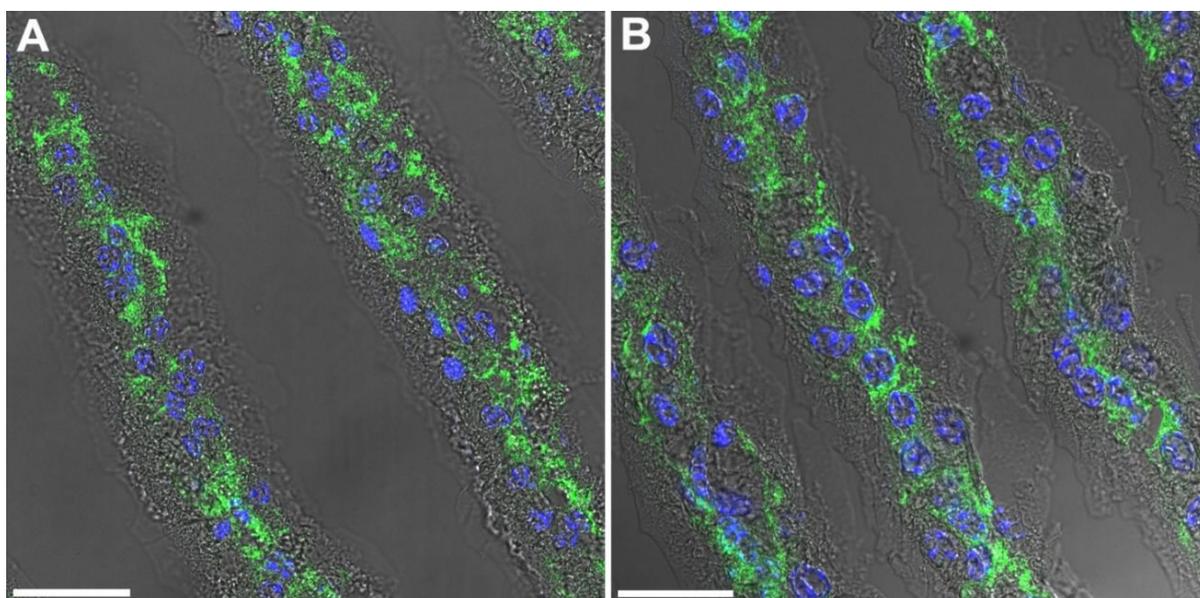


Figura 44. Imunolocalização da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na brânquia de *M. amazonicum* do Rio Tietê.

A imunolocalização foi realizada usando crio seções da brânquia número quatro, empregando anticorpos primários contra a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. O sinal fluorescente foi revelado utilizando o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo com fluoróforo Alexa-Fluor488 (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). **A-** animais recém-capturados. **B-** Animais aclimatados a 21 ‰S. Barras = 50 μm .

A Figura 45 mostra a distribuição da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* ao longo do gradiente de sacarose (10-50% m/m). Duas frações de membranas apresentando atividade ATPase estão distribuídas ao longo do gradiente de sacarose. A fração mais leve, com atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de $1,2 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, aparece na faixa compreendida entre 25% e 32% do gradiente. A fração mais pesada, que apresenta atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de $2 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ aparece na faixa compreendida entre 32% e 45% do gradiente. A atividade ATPase insensível a ouabaína aparece distribuída ao longo de todo o gradiente e corresponde a aproximadamente 20% da atividade ATPase total, sugerindo que a fração microsomal contém outras enzimas que hidrolisam o ATP.

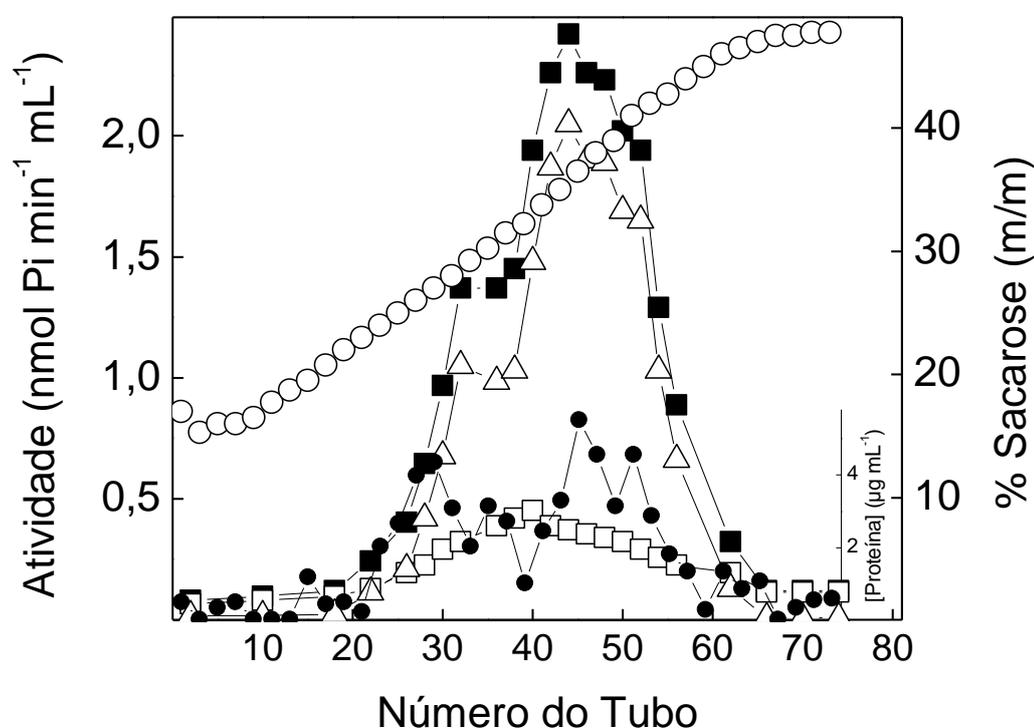


Figura 45. Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose do fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* coletado no Rio Tietê.

Uma alíquota contendo 2,5 mg de proteína foi adicionada na superfície do gradiente de sacarose (10-50%) preparado em tampão imidazol 20 mmol L^{-1} , pH 6,8 e centrifugada a $180.000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 3 horas, usando um rotor vertical PV50T2 Hitachi. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do gradiente e analisadas para atividade ATPase total (■); atividade ATPase insensível à ouabaína (□); atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Δ); concentração de proteína (●); e concentração de sacarose (○).

4.4. Efeito do FXYD2 na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum*.

O estudo do efeito do FXYD2 exógeno na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* foi realizado utilizando-se [γ -³²P]ATP como substrato e analisando a liberação de [³²P]-Pi. A atividade da enzima foi estimada em tampão Hepes 20 mmol L⁻¹, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, NaCl 50 mmol L⁻¹ e KCl 10 mmol L⁻¹ e ATP 1 mmol L⁻¹ [γ -³²P]-ATP (atividade específica 400-800 cpm/nmol) conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados na presença e ausência de ouabaína 3 mmol L⁻¹ e a diferença entre as duas medidas foi considerada como sendo a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase.

Observa-se na Tabela 10 que para os animais recém capturados nos Rios Tietê e Grande a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo FXYD2 foi praticamente a mesma (13% e 17%, respectivamente). Entretanto, para os animais do Rio Tietê aclimatados em 21 ‰ durante 10 dias a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo FXYD2 foi de aproximadamente 50%, uma estimulação três vezes maior do que a registrada nos animais recém capturados.

A presença de íons amônio em condições saturantes de potássio foi responsável por um aumento da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase de aproximadamente 8% nos animais recém capturados, enquanto que os animais aclimatados o aumento da atividade ATPase foi de 18%.

Na presença de íons amônio, a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo FXYD2 nos animais coletados no Rio Tietê foi cerca de 10% maior que a dos animais coletados no Rio Grande. Já para os animais aclimatados a 21 ‰, a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo peptídeo FXYD2 na presença de íons amônio foi aproximadamente 250% maior do que nos animais recém capturados.

Tabela 10. Efeito do polipeptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*.

	Rio Tietê				Rio Grande	
	Recém capturado		Aclimatado 21 ‰S		Recém capturado	
	U mg ⁻¹	Relativa (%)	U mg ⁻¹	Relativa (%)	U mg ⁻¹	Relativa (%)
Controle	130,1 ± 11,5	100,0	52,4 ± 4,5	100,0	134,2 ± 8,1	100,0
+ NH ₄ ⁺	137,8 ± 13,4	106,6	61,9 ± 1,8	118,2	146,6 ± 6,7	109,3
+ FXYD2	147,8 ± 15,1	113,7	77,0 ± 8,4	146,8	157,9 ± 14,9	117,7
+ FXYD2 e NH ₄ ⁺	158,8 ± 8,7	122,1	82,2 ± 6,2	156,8	162,1 ± 13,2	120,8

4.5. Efeito de quinases na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum*.

O efeito da fosforilação pelas proteínas quinases A e C endógenas presentes na preparação microsomal de *M. amazonicum* na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi analisado através da liberação de [³²P]-Pi usando como substrato o [γ -³²P]-ATP. Conforme descrito anteriormente, a fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pela proteína quinase A foi efetuada em tampão Hepes 20 mmol L⁻¹, pH 7,4, contendo EGTA 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, dibutilil cAMP 3 mmol L⁻¹ e queleritrina-Cl 3,5 μ mol L⁻¹, na ausência e na presença de seu inibidor específico, o H-89 200 nmol L⁻¹. Para a proteína quinase C, a fosforilação foi efetuada em tampão Hepes 20 mmol L⁻¹, pH 7,4, contendo MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, DTT 1 mmol L⁻¹, CaCl₂ 1 mmol L⁻¹, fosfatidil serina 80 μ g/ μ L, PMA 100 nmol L⁻¹ e H89 200 nmol L⁻¹, na ausência e na presença do seu inibidor específico, queleritrina-Cl 3,5 μ mol L⁻¹.

O efeito da fosforilação pelas proteínas quinases A e C endógenas na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* está mostrado na Tabela 11.

A fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pela proteína quinase A resultou em um aumento na atividade da enzima da ordem de 7% para os animais recém capturados no Rio Tietê. Entretanto, a fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial dos animais aclimatados em 21 ‰ durante 10 dias causou uma inibição de 85% da atividade ATPase. Em ambos os casos na presença do inibidor específico H89, a atividade ATPase apresentou valores próximos ao do controle, indicando que a alteração da atividade ATPase foi causada pela fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pela proteína quinase A.

Tabela 11. Efeito de proteínas quinases endógenas na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê.

	Recém capturado		Aclimatado 21 ‰	
	U mg ⁻¹	Relativa (%)	U mg ⁻¹	Relativa (%)
Controle	129,7 ± 13,3	100,0	55,7 ± 9,2	100,0
+ Quinase A	138,8 ± 17,4	107,0	8,5 ± 2,0	15,2
+ Quinase A + H89	125,6 ± 5,0	96,8	57,3 ± 2,8	102,9
+ Quinase C	60,1 ± 2,6	46,3	34,4 ± 7,0	61,7
+ Quinase C + Queleritrina	129,3 ± 14,0	99,7	50,0 ± 8,2	89,9

No caso da proteína quinase C foi observada uma inibição da ordem de 54% para os animais recém capturados. Para os animais aclimatados a 21 ‰S a inibição observada após a fosforilação foi menor que nos animais recém-capturados, sendo responsável por diminuir a atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase em torno de 40%. A presença de queleritrina, um inibidor específico da proteína quinase C, causou o retorno da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase para os valores observados para o controle (Tabela 11), confirmando que a variação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi causada pela proteína quinase C.

Além da análise da fosforilação pelas quinases na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum*, também foi realizada a fosforilação utilizando [γ -³²P]-ATP para a posterior submissão da amostra fosforilada a eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

A autorradiografia do gel mostrando a fosforilação pelas quinases endógenas do tecido branquial de *M. amazonicum* aclimatado em 21 ‰S, durante 10 dias está mostrada na Figura 46. No gel é possível identificar bandas que apresentam marcações radiográficas na faixa de massa molecular de aproximadamente 7 kDa, esta massa molecular é característica de peptídeos da família FXYD, indicando a presença destes na preparação microsomal. Nenhum sinal é observado na região de 100 kDa, indicando que nestas condições não ocorreu a fosforilação da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase.

Na canaleta 1, correspondente ao controle sem fosforilação não é possível observar nenhum sinal. Nas canaletas 2 e 3 houve a estimulação da fosforilação pela proteína quinase A com diferentes concentrações de dibutilil AMPc, o que causou o aparecimento de sinal na parte final do gel indicando que ocorreu a fosforilação pela quinase, confirmado pela perda deste sinal na presença de H89, inibidor farmacológico da proteína quinase A (canaletas 4 e 5).

A amostra da canaleta 6 foi submetida a estimulação da fosforilação pela proteína quinase C com fosfatidilserina 80 μ g/mL e PMA 100 nmol L⁻¹, o que provocou o aparecimento de uma banda na mesma região registrada para a proteína quinase A, que é revertida na presença de Queleritrina 3,5 μ mol L⁻¹, inibidor farmacológico da proteína quinase C (Canaleta 7). Porém a banda referente a proteína quinase C apresenta uma maior intensidade, indicando que a proteína quinase C é responsável por uma fosforilação mais intensa que a proteína quinase A.

Este mesmo estudo, utilizando as mesmas condições de fosforilação, foi realizado com a fração microsomal de *M. amazonicum* recém capturado no Rio Tietê (não mostrado), porém a intensidade do sinal para estes animais foi cerca de 100 vezes maior, o que impossibilitou a revelação da radiografia. Isto pode ter sido ocasionado tanto por uma maior quantidade de

proteínas da família FXYP presentes na fração microsomal, como uma maior intensidade na fosforilação pelas proteínas quinases presentes na fração microsomal dos animais desta condição.

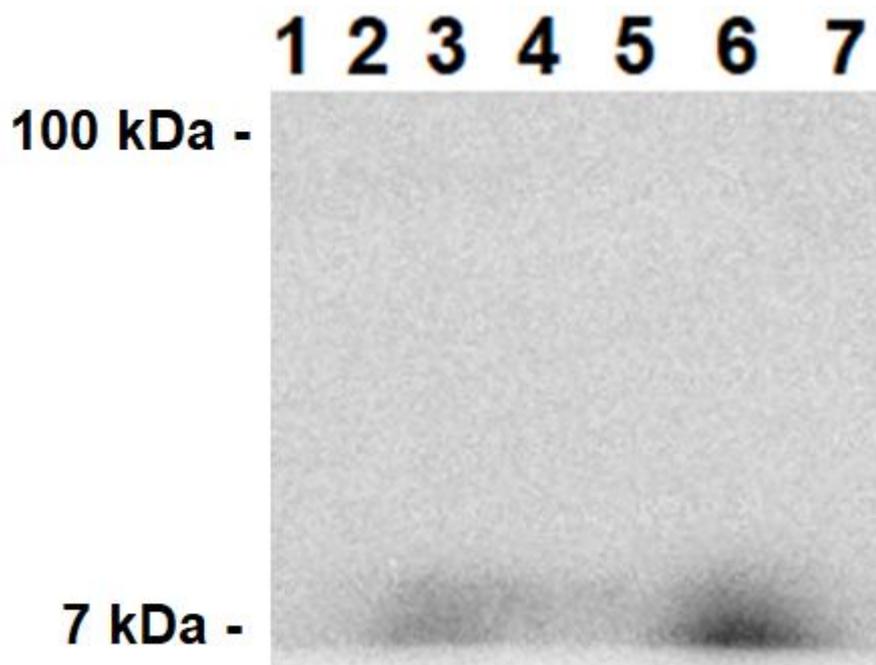


Figura 46 - Fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelas quinases A e C endógenas presentes na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

Autorradiografia de gel de acrilamida 15% (SDS-PAGE) mostrando a fosforilação pelas quinases endógenas. Em todas as canaletas foram aplicadas 12µg de proteínas. **1-** Controle sem fosforilação. **2-** Estimulação da fosforilação pela proteína quinase A com dibutilil AMPc 0,5 mmol L⁻¹. **3-** Estimulação da fosforilação pela proteína quinase A com dibutilil AMPc 1 mmol L⁻¹. **4-** Estimulação da PKA igual a 2 na presença de H89 400 nmol L⁻¹, inibidor farmacológico desta quinase. **5-** Estimulação da PKA igual a 3 na presença de H89 400 nmol L⁻¹, inibidor farmacológico desta quinase. **6-** Estimulação da fosforilação pela proteína quinase C com fosfatidilserina 80 µg/mL e PMA 100 nmol L⁻¹. **7-** Estimulação da PKC igual a 5 na presença de Quelitrina 3,5 µmol L⁻¹, inibidor farmacológico desta quinase.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização cinética da (Na⁺, K⁺)-ATPase

5.1.1. *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado

A capacidade de hiper-regular o conteúdo de sua hemolinfa é fundamental para a invasão do ambiente dulcícola pelos crustáceos. Isto é possível graças a algumas características que foram selecionadas nestes animais, como a diminuição da permeabilidade de íons e água dos epitélios, diminuição de perdas de sal na urina e captação ativa de íons do meio externo, sendo este último processo impulsionado energeticamente pela (Na⁺, K⁺)-ATPase presente no tecido branquial (Péqueux, 1995.; Lucu & Towle, 2003; McNamara & Faria, 2012). O *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie que invadiu recentemente a água doce, pelo seu desenvolvimento larval é considerada uma espécie diádroma, porém algumas populações não possuem acesso à água salobra e completam seu ciclo de vida na água doce (Pileggi & Mantelatto, 2010; Vergamini et al., 2011; Pantaleão et al., 2014). Para aumentar o entendimento da adaptação desta espécie ao ambiente dulcícola, neste trabalho a (Na⁺, K⁺)-ATPase foi caracterizada cineticamente em duas populações habitantes da Bacia do Rio da Prata, que não possuem acesso ao mar.

A (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de crustáceos apresenta uma grande variância na atividade ATPase nas suas diferentes espécies (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005a; Farias et al., 2017) que pode ser decorrente da expressão de diferentes isoenzimas, diferentes mecanismos regulatórios e níveis de expressão diferentes no tecido branquial (Blanco & Mercer, 1998; Segall et al., 2001; Lopez et al., 2002; Silva et al., 2012).

A Tabela 12 apresenta atividades específicas e as afinidades pelo ATP da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de diferentes crustáceos decápodes, habitantes de diferentes ambientes e/ou aclimatados em diferentes salinidades experimentais. A atividade específica da enzima para animais de água doce geralmente apresenta valores próximos a 120 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sendo as maiores exceções a (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *Potamon potamios* (Harris & Bayliss, 1988), *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2000) e *Macrobrachium acanthurus* (Faleiros et al., 2017; Furriel et al., 2018). Em caranguejos marinhos e estuarinos os valores de atividade da enzima são maiores e sofrem influência da aclimação em diferentes salinidades, variando de 60 a 1000 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Entre espécies da mesma família também ocorre uma grande variação, como por exemplo nas famílias Varunidae, Palaemonidae e Portunidae.

As populações de *M. amazonicum* do Rio Grande e do Rio Tietê apresentaram uma atividade máxima de hidrólise de ATP de aproximadamente 130 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, mesmo valor apresentado pelos animais provenientes de cultivo (Leone et al., 2012), entretanto este valor é apenas metade do valor apresentado por uma outra população de *M. amazonicum* que habita a represa da Usina São Geraldo em Sertãozinho (Santos et al., 2007). Se comparado com outros camarões do gênero, o *Macrobrachium rosenbergii* apresenta uma atividade parecida (\approx 115 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, Stern et al., 1984; França et al., 2013), entretanto a atividade apresentada pelos animais aqui estudados é quatro vezes menor que a encontrada para a enzima de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e cinco vezes maior do que a encontrada para *M. acanthurus* (Faleiros et al., 2017; Freire et al., 2018).

Outros crustáceos de água doce, como o caranguejo *Dilocarcinus pagei* (Furriel et al., 2010) e o lagostim *Astacus astacus* (Harris & Bayliss, 1988) apresentam atividade ATPase similar ao *M. amazonicum* da Bacia do Rio da Prata. Crustáceos de outros nichos ecológicos também apresentam (Na⁺, K⁺)-ATPase com atividade específica próxima aos valores encontrados neste trabalho, como os caranguejos de ambiente marinho *Hemigrapsus sanguineus* (Tsai & Lin, 2007) e *Callinectes ornatus* (Garçon et al., 2007), o caranguejo semi-terrestre *Cardisoma guanhumi* (Farias et al., 2017), o caranguejo de estuário *Minuca minax* (Wanson et al., 1984), o ermitão *Clibanarius symmetricus* (Gonçalves et al., 2006) e o camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* (Leone et al., 2015a).

A estimulação pelo ATP da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial das duas populações de *M. amazonicum* estudadas ocorreu através de uma curva de saturação única, mesmo comportamento observado para *M. amazonicum* cultivado (Leone et al., 2012), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a), o lagostim *Procambarus clarkii* (Horiuchi, 1977) e alguns caranguejos eurialinos da infraordem Brachyura (Holliday, 1985; Corotto & Holliday, 1996; Garçon et al., 2007; 2009; Farias et al., 2017). Entretanto a população de *M. amazonicum* que habita uma represa em Sertãozinho apresenta duas famílias de sítios para a ligação de ATP (Santos et al., 2007), bem como a enzima de *D. pagei* (Furriel et al., 2010), *Goniopsis cruentata* (Moraes, 2019), *Callinectes danae* (Masui et al., 2002), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012; Faleiros et al., 2018), e *Ucides cordatus* (Lucena et al., 2019b). Curiosamente estas últimas três espécies quando aclimatadas em baixa salinidade não apresentam o sítio de alta afinidade apresentando uma única curva estimulação (Masui et al., 2009; Antunes et al., 2017; Faleiros et al., 2018; Lucena et al., 2019b).

Tabela 12. Atividade específica e afinidade pelo ATP da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial em crustáceos decápodes selecionados de habitats de diferentes salinidades e/ou aclimatados em várias salinidades experimentais.

Infraordem/ Subordem	Família	Táxon/ Habitat	Espécie	V (U mg ⁻¹)	K _M ou K _{0,5} (μmol L ⁻¹)	Condição ou aclimação em salinidade (‰S)	Referência
Astacidea	Astacidae	Lagostim (AD)	<i>Astacus astacus</i>	137,0	-	Água doce	Harris & Bayliss (1988)
			<i>Austropotamobius pallipes</i>	165,0	-	Água doce	
	Cambaridae	Lagostim (AD)/(AB)	<i>Procambarus clarkii</i>	~216,0	710	< 0,5	Horiuchi (1977)
Brachyura	Cancridae	Caranguejo (AS)	<i>Cancer pagurus</i>	1000,0	120	Água salgada	Gache et al. (1976)
			<i>Carcinus maenas</i>	90,0	-	Água salgada	Winkler (1986)
				100,0	-	35	Siebers et al. (1983)
				286,6	-	17	Flick et al. (1994)
				311,7	-	10	Siebers et al. (1983)
	Gecarcinidae	Caranguejo (M)/(ST)	<i>Cardisoma</i>	148,5	60	16	Farias et al. (2017)
			<i>guanhumi</i>	235,6	120	22	Farias (2017)
	Ocypodidae	Caranguejo (E)	<i>Leptuca pugilator</i>	~550,0	480	Água salgada	D'Orazio & Holliday (1985)
				~900,0	-	3,5	
				<i>Minuca minax</i>	135,2	1.600	
		Caranguejo (M)	<i>Ucides cordatus</i>	466,7	560	Água salgada	Holliday (1985)
				24	29	2	Lucena et al. (2019b)
				305	79	8	
32* e 326**	0,068* e 20,1**	18					
96* e 557**	0,21* e 18,6**	26					
6* e 39*	0,59* e 29**	35					
Varunidae	Caranguejo (E)	<i>Neohelice granulata</i>	500,0	-	30	Genovese et al. (2004)	
			683,0	-	10		
			82,0	650	2		Castilho et al. (2001)

Continua

Infraordem/ Subordem	Família	Táxon/ Habitat	Espécie	V (U mg ⁻¹)	K _M ou K _{0,5} (μmol L ⁻¹)	Habitat ou aclimatação (%S)	Referência
Brachyura	Varunidae	Caranguejo (AS)	<i>Helice formosensis</i>	60,3	-	35	Tsai & Lin (2007)
				134,0	-	5	
				80,2	-	3	
			<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	113,5	-	35	
				93,2	-	5	
			<i>Eriocheir sinensis</i>	211,0	-	35	
				119,5	-	5	
Grapsidae	Caranguejo (ST)/(M)	<i>Goniopsis cruentata</i>	246,0	600	Água salgada	Corotto & Holliday (1996)	
			153,4* e 186,0**	13* e 85**	21		
			22* e 55**	2,4* e 50**	10		
			17* e 36**	4* e 160**	20		
			79* e 164**	15* e 520**	30		
			16* e 29**	3,3* e 310**	40		
			Portunidae	Caranguejo (AS)	<i>Callinectes danae</i>		35* e 272**
298,8	174	15					
<i>Callinectes ornatus</i>	116,3	55			Água salgada	Garçon et al. (2007) Garçon et al. (2009)	
	76,2	46			33		
	182,6	50			21		
<i>Callinectes sapidus</i>	233,3	190			Água salgada	Neufeld et al. (1980)	
	383,3	-			7		
Potamidae	Caranguejo (AD)	<i>Potamon fluviatile</i>	174,0	-	Água doce	Harris & Bayliss (1988)	
			7.300,0	1,400	Água doce		
Trichodactylidae	Caranguejo (AD)	<i>Dilocarcinus pagei</i>	6,4* e 127**	0,34* e 84**	Água doce	Furriel et al. (2010)	

Continuação

Infraordem/ Subordem	Família	Táxon/ Habitat	Espécie	V (U mg ⁻¹)	K _M ou K _{0,5} (μmol L ⁻¹)	Habitat ou aclimação (%S)	Referência
Anomura	Diogenidae	Ermiteiro (E)	<i>Clibanarius symmetricus</i>	19* 124**	0,063* e 44**	Água salgada	Gonçalves et al. (2006)
				46* e 108**	7* e 110**	45	Lucena et al. (2012)
				130,8	55	15	Antunes et al. (2017)
				77	72	5	Faleiros et al. (2018)
				55	160	15	
				18* e 31**	0,38* e 109**	25	
				5* e 49**	0,73* e 58**	35	
		11* e 17**	3,3* e 190*	45			
Caridea	Palaemonidae	Camarão (AD)	<i>Macrobrachium amazonicum</i>	34* e 233**	4,2* e 144**	Água doce	Santos et al. (2007)
				133,3	210	Água doce	Leone et al. (2012)
				130,3	65	Água doce	Fabri et al. (2019)
				137,3	83	Água doce	Este trabalho
				54,9	50	21	
				260	-	Água doce	Faleiros et al. (2010)
				108	-	25	
			<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	113	240	Água doce	Stern et al. (1984)
				30,2	200	Água doce	Wilder et al. (2000)
				115,0	100	Água doce	França et al. (2013)
			<i>Macrobrachium olfersii</i>	194	-	Água doce	Lima et al. (1997)
				122	-	21	
				131	-	28	
				686,1	165	Água doce	Furriel et al. (2000)
			<i>Macrobrachium acanthurus</i>	17	-	Água doce	Freire et al. (2018)
13	-	20					
24	-	Água doce		Faleiros et al. (2017)			
25	-	25					

Continuação

Infraordem/ Subordem	Família	Táxon/ Habitat	Espécie	V (U mg⁻¹)	K_M ou K_{0,5} (μmol L⁻¹)	Habitat ou aclimatação (‰S)	Referência
Caridea	Palaemonidae	Camarão (AS)	<i>Palaemon</i>	11	-	Água salgada	Faleiros et al. (2017)
			<i>northropi</i>	156	-	8	
				≈40	-	50	
Dendrobranchiata	Penaeidae	Camarão (AS)	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	109,5	30	Água salgada	Leone et al. (2015a)

Conclusão

* Sítio de ligação de alta afinidade.

** Sítio de ligação de baixa afinidade.

(AD) - água doce.

(AS) - água salgada.

(E) - Estuarino.

(M)- mangue.

(AB) – água salobra.

(ST) – semi-terrestre.

A afinidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de crustáceos decápodes pelo ATP geralmente apresenta valores de K_m ou $K_{0,5}$ entre 50 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Algumas famílias apresentam menor afinidade pelo ATP. Esse é o caso das famílias Varunidae, Cambaridae e Potamidae, enquanto a família Penaeidae apresenta uma afinidade maior (Horiuchi, 1977; Tentes & Stratakis, 1991; Corotto & Holliday, 1996; Castilho et al., 2001; Leone et al., 2015a). Curiosamente, na família Ocypodidae os caranguejos estuarinos apresentam uma baixa afinidade pelo ATP, entretanto o *U. cordatus*, que habita mangues, apresenta uma alta afinidade pelo ATP (Wanson et al., 1984; D’Orazio & Holliday, 1985; Holliday, 1985; Lucena et al., 2019b).

Na Tabela 13 estão relacionados os parâmetros cinéticos da (Na⁺, K⁺)-ATPase para diversas populações de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium*. As populações estudadas aqui apresentaram uma alta afinidade aparente pelo ATP (Rio Tietê $K_{0,5} = 0,065 \pm 0,0016 \text{ mmol L}^{-1}$ e Rio Grande $K_{0,5} = 0,083 \pm 0,0010 \text{ mmol L}^{-1}$, como MgATP) se comparado com outros camarões do mesmo gênero (Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007; Leone et al., 2012; França et al., 2013), com apenas a enzima de *M. rosenbergii* apresentando uma afinidade maior e mais próxima do que aqui relatado ($K_{0,5} = 0,10 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, França et al., 2013). Valores próximos da afinidade pelo ATP encontrados para as populações da Bacia do Rio da Prata também foram encontrados para a (Na⁺, K⁺)-ATPase de outros crustáceos, como *C. guanhumi* (Farias et al., 2017), *U. cordatus* (Lucena et al., 2019b), *G. cruentata* (Moraes, 2019), *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007; 2009) e para os sítios de baixa afinidade de *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Faleiros et al., 2018) e de *D. pagei* (Furriel et al., 2010).

A estimulação da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase também foi estudada em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂, nas duas populações a estimulação ocorreu através de uma única curva de saturação, apresentando uma afinidade aparente pelo MgATP próxima entre si (Tabela 13). A afinidade apresentada em condições estequiométricas é muito próxima daquela encontrada com a enzima saturada de íons magnésio, comportamento também encontrado para *C. guanhumi* (Farias et al., 2017), entretanto para *G. cruentata* (Moraes, 2019) a estimulação em condições estequiométricas resultou no desaparecimento do sítio de alta afinidade pelo ATP.

A interação entre a (Na⁺, K⁺)-ATPase e o Mg²⁺ é complexa, já que este íon tem a função de ligante e de substrato, na forma de MgATP e, além disso, quando em altas concentrações atua como um inibidor da atividade da enzima (Glynn, 1985; Jorgensen et al., 2003; Karlsh, 2003; Apell et al., 2017). Essa inibição ocorre devido a ligação do magnésio

em excesso à forma E₂K da enzima e a diminuição de afinidade pelo ATP que ocorre durante a liberação dos íons potássio (Fontes et al., 1992). A afinidade pelos íons magnésio da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial dos crustáceos não parece estar relacionada com a salinidade do habitat (Lucu & Towle, 2003).

A afinidade pelo Mg²⁺ da enzima de *M. amazonicum* do Rio Tietê (K_{0,5} = 0,33 ± 0,042 mmol L⁻¹) é duas vezes menor que dos animais que habitam o Rio Grande (K_{0,5} = 0,16 ± 0,01 mmol L⁻¹), já as outras populações do gênero estudadas anteriormente apresentam uma afinidade ainda menor, com K_{0,5} entre 0,7 e 1 mmol L⁻¹ (Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007; Leone et al., 2012; França et al., 2013). Com exceção da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. olfersii* (n_H = 0,8, Furriel et al., 2000), todos os animais apresentaram um estímulo cooperativo da atividade da enzima, isto indica a presença de mais de um sítio para a ligação do Mg²⁺. Valores próximos aos encontrados para as populações de *M. amazonicum* aqui estudados foram relatados para *D. pagei* (Furriel et al., 2010), *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006), *C. danae* (Masui et al., 2002) e *C. ornatus* (Garçon et al., 2007).

A atuação do ATP livre em excesso como um modulador alostérico da (Na⁺, K⁺)-ATPase descrito por Farias et al. (2017) para o *C. guanhumi*, também foi verificada para as populações de *M. amazonicum* deste estudo. Na população que habita o Rio Tietê a afinidade aparente da enzima pelo MgATP na presença de excesso de ATP é cerca de 5 vezes menor, enquanto na população do Rio Grande a afinidade aparente da enzima pelo MgATP é duas vezes menor sob saturação de ATP (Tabela 13).

A (Na⁺, K⁺)-ATPase apresenta parâmetros cinéticos diferentes em relação aos íons potássio e sódio para diferentes isoformas, bem como a expressão das diferentes isoformas ocorre de forma específica em relação a diferentes tecidos e organismos, isto permite que as propriedades cinéticas da enzima se alterem em relação a sua localização. Modificações pós-traducionais e características da membrana também interferem na cinética da enzima (Therien et al., 1996; Sáez et al., 2009). A afinidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de crustáceos pelo íon sódio (entre 4 e 25 mmol L⁻¹) está relacionado com a salinidade do meio que habitam, com animais totalmente adaptados ao ambiente dulcícola apresentando alta afinidade por estes íons (entre 0,06-0,9 mmol L⁻¹) (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005a). A afinidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo K⁺ é maior que aquela encontrada para os íons sódio, variando entre 0,5 e 2,5 mmol L⁻¹ nos crustáceos e, aparentemente, não está relacionada com o habitat (Lucu & Towle, 2003; Leone et al., 2005a).

As populações aqui estudadas apresentaram a mesma afinidade para os íons sódio, valores que são próximos aos relatados para outros crustáceos de água doce como *M. amazonicum* (Santos et al., 2007), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *D. pagei* (Furriel et al., 2010), contrastando com *M. amazonicum* cultivado (Leone et al., 2012), *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *Potamon fluviatile*, *A. astacus* e *Austropotamobius pallipes* (Harris & Bayliss, 1988), em que a enzima apresenta uma maior afinidade pelo Na^+ , característica de animais bem adaptados a água doce. Crustáceos marinhos como *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a) apresentam afinidade aparente similar a encontrada para *M. amazonicum*. A cooperatividade observada na modulação da enzima desses animais pelo sódio é similar a encontrada para outras populações de *M. amazonicum* bem como outras espécies de camarões (Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007; Leone et al., 2012; França et al., 2013; Leone et al., 2015a).

A estimulação da enzima pelo íon potássio nos animais do Rio Tietê e Rio Grande resultou em afinidades de $K_{0,5}$ de $0,65 \pm 0,079$ e $0,75 \pm 0,14$ mmol L^{-1} , respectivamente. Estes valores são próximos aos reportados para *M. amazonicum* de Sertãozinho (Santos et al., 2007) e *D. pagei* (Furriel et al., 2010). Entretanto outros camarões de água doce estudados anteriormente apresentam valores 3 a 4 vezes maiores dos aqui apresentados (Furriel et al., 2000; Leone et al., 2012; França et al., 2013), sugerindo diferenças regulatórias ou de isoenzimas entre as populações estudadas. Já os crustáceos de água salgada, com exceção do *C. guanhumi*, apresentam valores cerca de duas vezes maiores (Masui et al., 2002, Gonçalves et al., 2006, Garçon et al., 2007; Leone et al., 2015a; Farias et al., 2017).

Íons amônio hidratados apresentam um raio similar ao dos íons potássio (Knepper et al., 1989), isto permite que estes íons sejam transportados pela $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de diversos organismos, incluindo vertebrados (Robinson, 1970), moluscos (Pagliarani et al., 2008) e crustáceos (Holliday, 1985; Weihrauch et al., 2004b; Masui et al., 2002, Furriel et al., 2004; Leone et al., 2014). Este fato é de grande importância já que a grande maioria de crustáceos elimina amônia na forma de NH_4^+ pelas brânquias (Lucu et al., 1989; Weihrauch et al., 1998; 1999). O processo de eliminação de amônia através do tecido branquial de crustáceos não está completamente esclarecido, sendo que o modelo mais aceito envolve a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ transportando o íon NH_4^+ em detrimento do K^+ , além do envolvimento de outros transportadores (Weihrauch et al., 2004b).

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros cinéticos para a estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo ATP, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ e NH₄⁺ e inibição pela ouabaína em diferentes populações de camarões do gênero *Macrobrachium*.

Modulador	<i>Macrobrachium amazonicum</i> selvagem								
	Rio Tietê ^a			Rio Grande ^a			Represa da Usina S. Geraldo ^b		
	V _M (U mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H	V _M (U mg ⁻¹)	K _m /K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H	V _M (U mg ⁻¹)	K _m /K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H
ATP	130,3 ± 4,8	0,065 ± 0,0016	1,7	137,3 ± 8,1	0,083 ± 0,010	1	33,9 ± 1,9 ^c 232,9 ± 15,3 ^d	0,004 ± 0,0002 0,144 ± 0,01	2,8 1,7
MgATP ^e	114,6 ± 6,3	0,062 ± 0,0032	1,2	128,9 ± 1,9	0,052 ± 0,0086	1,2	-	-	-
Mg ²⁺	130,6 ± 6,8	0,33 ± 0,042	2,5	135,6 ± 2,5	0,16 ± 0,011	2,2	261,9 ± 18,3	0,79 ± 0,06	1,7
Na ⁺	127,5 ± 5,3	5,30 ± 0,42	2,2	134,2 ± 4,3	5,5 ± 0,48	1,5	275,1 ± 15,1	5,50 ± 0,3	1,4
K ⁺	126,7 ± 7,7	0,65 ± 0,079	1,7	132,3 ± 5,6	0,75 ± 0,14	1,4	271,8 ± 10,9	0,88 ± 0,04	1,0
NH ₄ ⁺	134,5 ± 8,6	1,28 ± 0,44	1,5	149,2 ± 7,1	2,5 ± 0,27	1,3	385,9 ± 15,8	5,00 ± 0,2	1,0
Ouabaína	-	0,180 ± 0,058	-	-	0,138 ± 0,005	-	-	0,148 ± 0,009	-

Continua

Modulador	<i>M. amazonicum</i> cultivado ^f			<i>Macrobrachium rosenbergii</i> ^g			<i>Macrobrachium olfersii</i> ^h		
	V _M (U mg ⁻¹)	K _m /K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H	V _M (U mg ⁻¹)	K _m /K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H	V _M (U mg ⁻¹)	K _m /K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H
ATP	133,3 ± 6,4	0,21 ± 0,01	1,0	115,0 ± 2,3	0,10 ± 0,01	1,5	686,1 ± 24,7	0,165 ± 0,005	1,0
Mg ²⁺	139,4 ± 6,7	1,03 ± 0,05	1,7	115,0 ± 4,6	0,96 ± 0,03	2,1	632,5 ± 28,5	0,76 ± 0,03	0,8
Na ⁺	126,4 ± 6,3	3,00 ± 0,15	2,2	110,0 ± 3,3	1,30 ± 0,03	2,1	653,8 ± 26,1	6,0 ± 0,2	1,6
K ⁺	137,1 ± 7,0	2,02 ± 0,10	1,0	120,0 ± 2,4	2,74 ± 0,08	1,1	556,1 ± 27,8	2,4 ± 0,1	0,8
NH ₄ ⁺	194,2 ± 8,5	4,76 ± 0,23	1,9	141,0 ± 5,6	1,90 ± 0,04	1,8	744,8 ± 22,3 ⁱ	8,4 ± 0,2 ⁱ	1,1 ⁱ
Ouabaína	-	0,13 ± 0,007	-	-	0,012 ± 0,001	-	-	0,062 ± 0,003	-

Conclusão.

^a Este trabalho.

^b Dados de Santos et al. (2007).

^c Sítio de ATP de alta afinidade.

^d Sítio de ATP de baixa afinidade.

^e Estimado em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂.

^f Dados de Leone et al. (2012).

^g Dados de França et al. (2013).

^h Dados de Furriel et al. (2000).

ⁱ Dados de Furriel et al. (2004).

A estimulação da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* pelo amônio resultou em velocidades máximas parecidas com a estimulação pelo K⁺, conforme visto para *C. guanhumi* (Farias et al., 2017), diferente dos valores 30 a 40% maiores na estimulação da velocidade pelo amônio visto em outros crustáceos (Masui et al., 2002, Furriel et al., 2004; Santos et al., 2007; Leone et al., 2012). Contrariando o que acontece em muitas espécies de crustáceos, estas populações de *M. amazonicum* (Tabela 10 e 13) não apresentam estimulação sinérgica da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase na presença de K⁺ e NH₄⁺ (Furriel et al., 2004; Gonçalves et al., 2006, Garçon et al., 2007; Santos et al., 2007; França et al., 2013; Leone et al., 2014).

A (Na⁺, K⁺)-ATPase dos animais coletados no Rio Tietê apresentou uma afinidade aparente para o NH₄⁺ quase duas vezes maior que a da população que habita o Rio Grande, sendo que a afinidade por estes íons são duas e três vezes maiores do que para o potássio, respectivamente. Outras populações de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Leone et al., 2012), e outros crustáceos, exemplo de *M. olfersii* (Furriel et al., 2004), *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007) e *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006) apresentam afinidade menores para os íons amônio. A enzima de *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a) e *D. pagei* (Furriel et al., 2010) apresentaram uma afinidade similar com a da enzima dos animais do Rio Grande.

A presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹ foi responsável pela inibição de 71 e 78% da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase nas populações do Rio Tietê e Rio Grande, respectivamente (Tabela 14), valores próximos àqueles encontrados para outros camarões palemonídeos (Furriel et al., 2000; Santos et al., 2007; França et al., 2013; Lucena, 2014). A inibição pela ouabaína ocorreu através de uma curva monofásica, apresentando valores semelhantes de constante de dissociação inibidor-enzima de outras populações de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Leone et al., 2012). Valores próximos aos relatados neste trabalho foram encontrados para *D. pagei* (Furriel et al., 2010), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007), *Callinectes sapidus* (Neufeld et al., 1980) e *C. danae* (Masui et al., 2002). Entretanto os camarões *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *M. rosenbergii* (França et al., 2013) apresentam valores de K_I três a 10 vezes menores que o de *M. amazonicum*, respectivamente. Para a (Na⁺, K⁺)-ATPase de outros crustáceos, como *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006), e *Orconectes limosus* (Kosiol et al., 1988) também foram observados valores de K_I menores que para o *M. amazonicum*.

Na Tabela 14 estão mostradas as prováveis ATPases responsáveis pela hidrólise de ATP em diferentes populações de camarões do gênero *Macrobrachium*. A maior diferença

entre as populações do Rio Tietê e do Rio Grande é a ausência de atividade de F-ATPases na população do Rio Grande e, a atividade insensível à ouabaína é constituída por Na^+ e/ou K^+ -ATPase e $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ e, em menores proporções, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ e fosfatases neutras.

A $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ é associada ao transporte ativo de NaCl no meio diluído, sendo considerada importante para a adaptação dos crustáceos à água doce, ocorrendo uma diminuição da sua expressão e atividade em animais expostos a alta salinidade (Zare & Greenaway, 1998; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2001; Faleiros et al., 2010; Firmino et al., 2011; Lee et al., 2011; Freire & McNamara, 2012; Lucena, 2014;). A $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ representa 14 e 9% da atividade total no tecido branquial dos animais do Rio Tietê e do Rio Grande, respectivamente, valores próximos aos encontrados para outras populações de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Lucena, 2014). Em *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), a $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ representa 23% de atividade ATPase total, entretanto esta atividade é de aproximadamente $100 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, 4 vezes maior do que a relatada para o *M. amazonicum* selvagem (Faleiros et al., 2010; este trabalho). Curiosamente não foi encontrada atividade $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ em *M. rosenbergii* (França et al., 2013). Outros crustáceos que não habitam a água doce apresentam atividade $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, tais como *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a) e *C. guanhumi* (Farias et al., 2017).

Atividade de F-ATPase é comum em frações microsomais do tecido branquial de crustáceos já que as células deste tecido são ricas em mitocôndrias (Copele & Fritzjarrel, 1968; Towle & Kays, 1986). A população do Rio Grande não apresentou atividade F-ATPase apreciável, enquanto os animais do Rio Tietê apresentaram 8% de atividade F-ATPase. Atividade F-ATPase também foi encontrada em *M. amazonicum* da represa de Sertãozinho (Santos et al., 2007), *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007), e *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a) embora não tenha sido observada em *M. amazonicum* cultivado (Lucena, 2014).

Embora a presença de Na^+ - e K^+ -ATPase no tecido branquial de crustáceos é controversa, sendo que sua localização não é conhecida e estudos cinéticos são raros, ambas foram identificadas em diferentes crustáceos, incluindo o *M. amazonicum* (Wanson et al., 1984; Gilles & Péquex, 1985; Harris & Bayliss, 1988; Proverbio et al., 1990; Santos et al., 2007; França et al., 2013; Lucena, 2014). O *M. amazonicum* do Rio Tietê apresentou 10% de atividade de Na^+ e/ou K^+ -ATPase enquanto os animais do Rio Grande apresentaram 6%, valores esperados devido a estimulação da atividade insensível à ouabaína pelo Na^+ e K^+ (inserção das figuras 18, 19, 32 e 33).

Tabela 14. Atividade relativa das prováveis ATPases presentes na fração microsomal do tecido branquial em diversas populações de camarões do gênero *Macrobrachium*.

	<i>Macrobrachium amazonicum</i>				<i>Macrobrachium</i>	<i>Macrobrachium</i>
	Rio Tietê ^a (%)	Rio Grande ^a (%)	Cultivado ^b (%)	Represa ^c (%)	<i>rosenbergii</i> ^d (%)	<i>olfersii</i> ^e (%)
(Na⁺, K⁺)-ATPase	71	78	72	79	74	70
Ca²⁺-ATPase	4	4	-	5	-	-
Fosfatases	3	3	-	7	15	-
V-(H⁺)ATPase	14	9	16	5	-	19
F-ATPase	8	-	10	10	19	23
Na⁺-e/ou K⁺-ATPase	10	6	-	8	19	-

^a Este trabalho.

^b Dados de Lucena (2014).

^c Dados de Santos et al. (2007).

^d Dados de França et al. (2013).

^e Dados de Furriel et al. (2000).

A atividade Na^+ e/ou K^+ -ATPase também foi verificada em população de *M. amazonicum* da represa São Geraldo (Santos et al., 2007), *M. amazonicum* juvenis (Lucena, 2014), *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a), *C. ornatus* (Garçon et al., 2007) e *C. guanhumi* (Farias et al., 2017). *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) e *M. amazonicum* adultos provenientes de aquicultura (Lucena, 2014) não respondem à inibição pelo ácido etacrínico.

A Ca^{2+} -ATPase é uma P-ATPase assim como a (Na^+ , K^+)-ATPase, sendo responsável pelo transporte de cálcio através da membrana plasmática e retículo sarcoplasmático e representa um papel fundamental na homeostase de cálcio (Palmgren & Nissen, 2011). A atividade Ca^{2+} -ATPase é baixa, representando $\approx 5\%$, em populações de *M. amazonicum* selvagem (Santos et al., 2007; este trabalho), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a), porém está ausente em *M. amazonicum* cultivado (Lucena, 2014), *M. rosenbergii* (França et al., 2013) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2000). Foram identificadas atividades baixas de fosfatases nas populações de *M. amazonicum* selvagem (Santos et al., 2007; este trabalho) e *M. rosenbergii* (França et al., 2013), sendo ausente nas demais populações de camarões do gênero (Furriel et al., 2000; Lucena, 2014).

5.1.2. *Macrobrachium amazonicum* aclimatado a 21 ‰ durante 10 dias

O *Macrobrachium amazonicum* é um camarão que pertence à família Palemonidae que apresenta uma ampla distribuição em toda a América do Sul, ocupando desde regiões estuarinas até águas interiores distantes 3.000 km do mar (Odinetz-Collart & Rabelo, 1996; Montoya, 2003; Magalhães et al., 2005; Bentes et al., 2011). Quando aclimatado em altas salinidades o *M. amazonicum* adulto apresenta uma grande taxa de sobrevivência em salinidades de até 25 ‰, entretanto em salinidade maiores, esta mortalidade aumenta exponencialmente (Augusto et al., 2007). Já o *M. olfersii* não apresenta mortalidade em salinidades menores que 28 ‰ e o camarão hololimnético *Macrobrachium potiana* apresenta mortalidade a partir de 21 ‰ (Moreira et al., 1983).

Em água doce o *M. amazonicum* tem a capacidade de hiper-regular o conteúdo de sua hemolinfa, sendo que esta capacidade é mantida durante a aclimação em água salobra até aproximadamente 20 ‰, como em outros camarões do gênero *Macrobrachium* (Moreira et al., 1983; Read, 1984; Wilder et al., 1998; Augusto et al., 2007). O ponto isosmótico da hemolinfa do *M. amazonicum* ocorre em uma salinidade de aproximadamente 23 ‰ (Tabela

1; Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010). Durante a aclimação, o *M. amazonicum* apresenta estratégias diferentes na regulação dos principais componentes iônicos de sua hemolinfa, Na^+ e Cl^- . O cloreto é hiper-regulado até aproximadamente 16 ‰ e acima dessa salinidade é levemente hipo-regulado, enquanto o sódio é hiper-regulado até 14 ‰ e acima desse valor, é conformado com o meio externo (Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010). Para se entender melhor o envolvimento da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no processo osmorregulatório do *M. amazonicum*, animais capturados no Rio Tietê foram aclimatados durante 10 dias a 21 ‰, salinidade essa onde a hemolinfa é levemente hiper-regulada, estando próxima ao seu ponto isosmótico (Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010).

A Tabela 15 traz a comparação entre os parâmetros cinéticos da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *Macrobrachium amazonicum* do Rio Tietê recém capturado e após 10 dias de aclimação em salinidade de 21 ‰. A atividade máxima de hidrólise de ATP da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sofreu uma diminuição de 60% durante a aclimação, condizente com a importância da enzima na captura de íons sódio durante a hiperregulação destes animais, já que após a aclimação o desafio osmótico enfrentado pelos animais é reduzido (Lucu & Towle, 2003; Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010; McNamara & Faria, 2012). Uma outra população de *M. amazonicum*, que habita a represa Santa Elisa próxima à Ribeirão Preto, também apresentou uma diminuição de aproximadamente 60% da atividade ATPase após a aclimação em 25 ‰ (Faleiros et al., 2010) e a aclimação a 21 ‰ apresentou o mesmo efeito na atividade K^+ -fosfatase da enzima desta população (Belli et al., 2009). Entretanto esta diminuição de atividade foi acompanhada por um aumento da expressão da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Faleiros et al., 2010).

Mesmo que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresente uma diminuição da atividade no tecido branquial de *M. amazonicum* após um longo período de aclimação (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010; Este trabalho), a enzima de *M. amazonicum* apresentou um pico de atividade após 24 horas de exposição a alta salinidade (25 ‰). Este aumento foi causado por um aumento da expressão da subunidade α da enzima que ocorre logo nas primeiras horas de exposição a água salobra, demonstrando que a adaptação do camarão a altas salinidades é dependente da produção de novas moléculas da enzima (Faleiros et al., 2010).

A aclimação de camarões *M. olfersii* em altas salinidades (21 e 28 ‰) foi responsável pela diminuição da atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em cerca de 40 e 34%, respectivamente (Lima et al., 1997) embora a atividade K^+ -fosfatase teve uma diminuição de 50% após a aclimação a 21 ‰ (Furriel et al., 2001; Mendonça et al., 2007). Já os camarões *M. rosenbergii* (Wilder et al., 2000) e *M. acanthurus* (Faleiros et al., 2017;

Freire et al., 2018) não apresentaram grandes variações na atividade da enzima após a aclimação em altas salinidades por um longo período (entre 7 e 10 dias). Para *M. acanthurus* aclimatado a 20 ‰ ocorre uma rápida (3 horas) diminuição da atividade que após é recuperada (Freire et al., 2018), enquanto a aclimação a 25‰ causa um aumento de atividade após 5 dias de aclimação (Faleiros et al., 2017). Já o camarão palemonídeo marinho *Palaemon northropi* apresentou um aumento de 15 vezes da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase após a aclimação em meio diluído (8‰) (Faleiros et al., 2017).

Não só em camarões palemonídeos a (Na⁺, K⁺)-ATPase é importante na adaptação durante a aclimação em diferentes salinidades, sendo que crustáceos marinhos expostos a baixa salinidade apresentam um aumento de atividade ATPase da enzima (Tabela 12; Neufeld et al., 1980; Holliday, 1985; D'Orazio & Holliday, 1985; Harris & Bayliss, 1988; Corotto & Holliday, 1996; Henry et al., 2002; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004; Garçon et al., 2007; 2009; Lucu et al., 2008). Entretanto em *C. danae* aclimatado em 15 ‰ não foi verificada alteração da atividade da enzima (Masui et al., 2002; 2009). Dentro da família Varunidae de caranguejos de água salgada, o *Eriocheir sinensis* e o *H. sanguineus* apresentam uma diminuição de atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase ao serem aclimatados em baixas salinidades, enquanto a espécie *Helice formosensis* apresenta um aumento da atividade (Tsai & Lin, 2007). Crustáceos que habitam o estuário e o mangue apresentam diferentes relações entre a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase e salinidade de aclimação (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012; Antunes et al., 2017; Farias, 2017; Faleiros et al., 2018; Lucena et al., 2019b; Moraes, 2019).

A caracterização da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê aclimatado a 21 ‰ durante 10 dias é o primeiro trabalho que tem como objetivo caracterizar cineticamente a atividade ATPase desta enzima, após a aclimação de crustáceos do ambiente dulcícola em alta salinidade. Nesse sentido, anteriormente foi realizada apenas a caracterização da atividade K⁺-fosfatase em *M. amazonicum* (Belli et al., 2009) e *M. olfersii* (Mendonça et al., 2007) aclimatados a 21 ‰.

Tendo isto em vista, a comparação dos parâmetros cinéticos será realizada com animais marinhos e de estuários aclimatados em baixa salinidade, mesmo que nenhum tenha sido submetido aos mesmos desafios osmóticos do que o *M. amazonicum*, onde os animais recém-capturados hiperregulam fortemente a osmolalidade da hemolinfa, enquanto os animais aclimatados a 21 ‰ hiperregulam fracamente a hemolinfa (Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010). O caranguejo de água salgada *Callinectes ornatus* hipoosmorregula a hemolinfa quando em água marinha e após aclimação a 21 ‰ apresenta quase a mesma osmolalidade

do meio externo (Garçon et al., 2009). *Clibanarius symmetricus* osmoconforma quando em água marinha e após aclimação em 15 ‰S hiperregula o conteúdo de sua hemolinfa (Antunes et al., 2017; Faleiros et al., 2018), comportamento parecido com o do caranguejo *Callinectes danae* (Faleiros et al., 2018; McNamara & Antunes, dados não publicados).

Tabela 15. Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém capturado e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

<i>Macrobrachium amazonicum</i> coletado no Rio Tietê						
Modulador	Recém-capturado			Aclimatado (21 ‰S)		
	V _M (U mg ⁻¹)	K _{0,5} ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H	V _M (U mg ⁻¹)	K _{0,5} , K _M ou K _I (mmol L ⁻¹)	n _H
ATP	130,3 ± 4,8	0,065 ± 0,0016	1,7	54,9 ± 1,8	0,050 ± 0,003	1,1
MgATP*	114,6 ± 6,3	0,062 ± 0,0032	1,2	49,8 ± 2,7	0,038 ± 0,005	1,3
Mg ²⁺	130,6 ± 6,8	0,33 ± 0,042	2,5	51,5 ± 1,3	0,032 ± 0,005	2,4
Na ⁺	127,5 ± 5,3	5,30 ± 0,42	2,2	51,5 ± 2,0	3,12 ± 0,18	1,4
K ⁺	126,7 ± 7,7	0,65 ± 0,079	1,7	52,8 ± 3,1	1,86 ± 0,14	1,1
NH ₄ ⁺	134,5 ± 8,6	1,28 ± 0,44	1,5	60,8 ± 2,1	1,96 ± 0,11	1,9
Ouabaína	-	0,18 ± 0,058	-	-	0,15 ± 0,004	-

*Estimado em condições estequiométricas de ATP e MgCl₂

A (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê não apresentou alteração significativa na afinidade aparente pelo ATP após a aclimação a 21 ‰S durante 10 dias (0,065 ± 0,0016 mmol L⁻¹ antes e 0,050 ± 0,003 mmol L⁻¹ após a aclimação). Tal como para o *M. amazonicum*, o *C. ornatus* também não apresentou variações na afinidade pelo ATP após a aclimação (Garçon et al., 2007; 2009), como ocorre comumente durante a aclimação dos crustáceos. Essa variação ocorreu para *G. cruentata* (Moraes, 2019) e *C. guanhumí* (Farias, 2017), em que a diminuição da salinidade levou a um aumento da afinidade da enzima pelo nucleotídeo. Já para *U. cordatus* (Lucena et al., 2019b) e *C. danae* (Masui et al., 2002; 2009) a afinidade diminuiu e ocorreu o desaparecimento do sítio de alta afinidade pelo ATP quando os animais foram aclimatados em 8 e 15‰S, respectivamente. Já o ermitão *C. symmetricus* apresenta um valor de K_M para o ATP entre 50 e 200 μmol L⁻¹ com a aclimação em diferentes salinidades (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012; Antunes et al., 2017; Faleiros et al., 2018).

A estimulação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo MgATP em condições estequiométricas foi um pouco menor após a aclimação do *M. amazonicum* em 21 ‰. Entretanto a afinidade aparente pelo magnésio, na presença de ATP saturante, apresentou uma grande mudança após a aclimação tendo sido observado um aumento de 10 vezes na afinidade (Tabela 15). Com isto, a afinidade da enzima pelo MgATP nas três condições estudadas (excesso de ATP, excesso de Mg²⁺ e condições estequiométricas) foram similares ($0,050 \pm 0,003$, $0,032 \pm 0,005$ e $0,038 \pm 0,005$ mmol L⁻¹, respectivamente). A inibição alostérica da enzima por excesso de ATP, verificada para os animais recém-capturados (Fabri et al., 2019) não foi observada nos animais aclimatados indicando que esta característica da (Na⁺, K⁺)-ATPase talvez seja importante para a adaptação de *M. amazonicum* à água doce e se torna dispensável com a diminuição do desafio osmótico enfrentado (Augusto et al., 2007; Faleiros et al., 2010). Outros crustáceos também apresentam variação na afinidade pelos íons magnésio durante a aclimação a 21 ‰. O caranguejo *C. ornatus* apresenta uma maior afinidade pelo Mg²⁺ (Garçon et al., 2007; 2009) entretanto para *C. danae* (Masui et al., 2002; 2009) e *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Antunes et al., 2017) aclimatados em 15 ‰ a afinidade pelo Mg²⁺ é menor que em animais recém capturados em ambiente marinho.

A aclimação de *M. amazonicum* em alta salinidade tal que os íons Na⁺ e o conteúdo osmótico total da hemolinfa estão próximos ao valor encontrado no meio externo (Augusto et al., 2007) causou um aumento de quase duas vezes na afinidade aparente da (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo íon sódio ($K_{0,5}$ de $5,30 \pm 0,42$ mmol L⁻¹ em animais recém capturados e $K_{0,5}$ de $3,12 \pm 0,18$ mmol L⁻¹ em animais aclimatados). Este valor é próximo ao encontrado para *M. amazonicum* cultivado (Leone et al., 2012). O estresse salino (15 e 45 ‰) também acarretou o aumento da afinidade da enzima de *C. symmetricus* pelo sódio (Gonçalves et al., 2006; Lucena et al., 2012; Antunes et al., 2017), bem como de *C. ornatus* aclimatado em 21 ‰ (Garçon et al., 2007; 2009). Já para *C. danae* aclimatado em 15 ‰ a afinidade pelo sódio é menor que a estimada em animais habitantes no ambiente marinho (Masui et al., 2002; 2009).

A afinidade aparente da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê pelo potássio diminui quase três vezes após a aclimação em alta salinidade ($K_{0,5}$ de $0,65 \pm 0,079$ mmol L⁻¹ antes da aclimação e um K_M de $1,86 \pm 0,14$ mmol L⁻¹ após 10 dias em 21 ‰), com mudança de comportamento cooperativo para cinética “Michaeliana”. A afinidade da enzima dos camarões aclimatados é próxima da que foi relatada para *M. amazonicum* cultivado (Leone et al., 2012). *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006; Antunes et al., 2017) e *C. ornatus* (Garçon et al., 2007; 2009) aclimatados em baixas salinidades apresentam uma maior afinidade pelo K⁺ comparada a animais recém capturados. Entretanto *C. danae* não

apresentou alteração na afinidade pelo potássio após aclimação em 15 ‰S (Masui et al., 2002; 2009).

A enzima do *M. amazonicum* recém-capturado apresentou um valor de $K_{0,5}$ de $1,28 \pm 0,44 \text{ mmol L}^{-1}$ e, após 10 dias de aclimação este valor aumentou para $1,96 \pm 0,11 \text{ mmol L}^{-1}$, mesma afinidade apresentada pela enzima de *M. rosenbergii* (França et al., 2013). Com a diminuição da afinidade da enzima pelo K^+ provocada pela aclimação, a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresentou a mesma afinidade aparente pelos íons amônio e potássio quando exposto em alta salinidade (Tabela 15). Como a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial é importante para a excreção de amônia (Lucu et al., 1989; Weihrauch et al., 1998; 1999), a não diferenciação entre o K^+ e NH_4^+ pela enzima provavelmente se torna importante para esta excreção quando os animais são submetidos a um ambiente de alta salinidade. Outra possível importância de um mesmo valor para essas afinidades poderia estar relacionada com o fato de que a estimulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do *M. amazonicum* do Rio Tietê pelo amônio não atingiu valores maiores do que a estimulação pelo potássio (Tabela 15), como visto para outros crustáceos (Masui et al., 2002, Furriel et al., 2004; Santos et al., 2007; Leone et al., 2012). Diferentes padrões em relação a afinidade pelo amônio são encontrados quando outros crustáceos são submetidos à aclimação (Masui et al., 2002; 2009; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007; 2009; Lucena et al., 2012; Antunes et al., 2017).

A inibição da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pela ouabaína, de aproximadamente 60% da atividade ATPase total, indica uma menor prevalência desta enzima na atividade ATPase total do que os 70% encontrado nos animais recém capturados. Nos animais aclimatados a inibição pela ouabaína também ocorreu através de uma curva monofásica, porém apresentando valor da constante de dissociação inibidor-enzima 20% menor que a dos animais recém capturados no Rio Tietê (Tabela 15), e se aproximando aos valores apresentados em outras populações de *M. amazonicum* mantidos em água doce (Tabela 13, Santos et al., 2007; Leone et al., 2012).

A alteração da afinidade aparente da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ pelo Mg^{2+} (como MgATP) e pelos íons sódio e potássio observada em *M. amazonicum* do Rio Tietê após a aclimação em 21 ‰S durante 10 dias indica alterações da regulação, mudanças pós-traducionais ou na composição da membrana em que a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ está contida após a exposição à água salobra (Sweadner, 1989; Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Lopez et al., 2002). Outra alternativa é a expressão de uma diferente isoenzima, já que alterações de afinidade pelos íons Na^+ e K^+ são característicos de diferentes isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Levenson, 1994; Therien et al., 1996; Blanco & Mercer, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Crambert et al., 2000; Segall et al. 2001; Lopez et al., 2002). Essa possibilidade é reforçada

pelo pequeno deslocamento de massa molecular desta subunidade observado na análise por Western Blotting (Figura 43), bem como resultados para outra população de *M. amazonicum* aclimatado em 25 ‰S, onde ocorre um rápido aumento da expressão da subunidade α seguido de um aumento da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase, indicando síntese de novas moléculas da enzima (Faleiros et al., 2010).

A Tabela 16 apresenta a atividade relativa das ATPases presentes na fração microsomal de *M. amazonicum* do Rio Tietê recém capturado e após a aclimação a 21 ‰S durante 10 dias. Após aclimação, a atividade V(H⁺)-ATPase (Tabela 5, 0,5 ± 0,2 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) se tornou desprezível, enquanto a atividade de fosfatases, F-ATPases e Na⁺- e/ou K⁺-ATPases sofreram pequenas alterações. Outra grande mudança verificada foi uma maior presença de Ca²⁺-ATPase (14%) contrastando com o relatado para vários crustáceos, que apresentam uma baixa atividade (Gonçalves et al., 2006; Santos et al., 2007; Masui et al., 2009; Leone et al., 2015a; Farias et al., 2017) ou mesmo que não apresentam atividade desta enzima (Furriel et al., 2000; Garçon et al., 2007; 2009; França et al., 2013; Lucena, 2014).

Tabela 16. Atividade relativa das prováveis ATPases presentes na fração microsomal do tecido branquial do *Macrobrachium amazonicum* recém capturado e aclimatado durante 10 dias a 21 ‰S.

	<i>M. amazonicum</i> Rio Tietê	
	Recém capturado	Aclimatado em 21 ‰S
(Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	71	59
Ca ²⁺ -ATPase	4	14
Fosfatases	3	1
V(H ⁺)-ATPase	14	-
F-ATPase	8	12
Na ⁺ - e/ou K ⁺ -ATPase	10	12

A ausência de atividade da V(H⁺)-ATPase no tecido branquial de *M. amazonicum* após a aclimação, também foi verificada durante a aclimação de uma outra população de *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010). A ausência de atividade da enzima foi acompanhada de uma expressão 4 vezes menor do RNA mensageiro da subunidade B da V(H⁺)-ATPase (Faleiros et al., 2010). Estágios larvais do *M. amazonicum* que dependem da água salobra para se desenvolver também não apresentaram atividade da V(H⁺)-ATPase (Lucena et al., 2015). Já o caranguejo de água doce *D. pagei* quando aclimatado em água salobra apresenta uma

diminuição da atividade da $V(H^+)$ -ATPase progressiva até 15 ‰, chegando a ser três vezes menor que os animais recém capturados, mantendo-se constante até salinidades de 21 ‰ (Firmino et al., 2011). Pós-larvas do camarão estuarino *Litopenaeus vannamei* também apresentaram diminuição da atividade da enzima em resposta ao aumento de salinidade (Pan et al., 2007). Os caranguejos *C. ornatus* e *Helice formosensis* aclimatados a 21 e 5‰S, respectivamente, apresentaram uma maior atividade da $V(H^+)$ -ATPase em resposta à baixa salinidade (Garçon et al., 2007; 2009; Tsai & Lin, 2007). Isto é condizente com a importância da $V(H^+)$ -ATPase na adaptação dos crustáceos ao ambiente dulcícola, sendo importante na captação de Na^+ e Cl^- do meio diluído (Zare & Greenaway, 1998; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2001; Lee et al., 2011; Freire & McNamara, 2012).

5.2. Caracterização cinética da $V(H^+)$ -ATPase de *Macrobrachium amazonicum*

A $V(H^+)$ -ATPase presente no tecido branquial de crustáceos apresenta grande importância no processo de excreção de amônia (Weihrauch et al., 2002, 2004b; Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008), no equilíbrio ácido-base (Tresguerres et al., 2008) e na adaptação ao ambiente dulcícola (Morris, 2001; Weihrauch et al., 2004b; Tsai & Lin, 2007; Faleiros et al., 2010; Firmino et al., 2011; Lee et al., 2011; McNamara & Faria, 2012).

A localização dos transportadores nas células do tecido branquial é de enorme importância para o entendimento de sua função (McNamara & Faria, 2012). Caranguejos que possuem a capacidade de suportar aclimatação em água doce apresentam distribuição da $V(H^+)$ -ATPase na membrana apical das brânquias posteriores (Tsai & Lin, 2007), enquanto aqueles que apresentam uma distribuição citoplasmática da enzima não toleram a água doce (Weihrauch et al., 2001; 2002, 2004b; Tsai & Lin, 2007).

Em *M. amazonicum*, a superfície apical do epitélio lamelar branquial é altamente ampliada por um extenso sistema de evaginações, estando associada com as mitocôndrias da região citoplasmática subapical (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010), o que permite o aumento da área da membrana apical disponível para a inserção de proteínas transportadoras tais como $V(H^+)$ -ATPase e o trocador HCO_3^-/Cl^- (Faleiros et al., 2010). A presença da $V(H^+)$ -ATPase na membrana apical do epitélio lamelar branquial representa uma força motriz independente da (Na^+, K^+) -ATPase para a absorção de íons Na^+ e Cl^- do meio externo, quando ocorre a hiper-regulação destes íons na hemolinfa (Onken, 1996; Towle et al., 1997; McNamara & Lima, 1997; Zare & Greenaway, 1998; McNamara & Torres, 1999; Weihrauch et al., 2004b; Faleiros et al., 2010; Lee et al., 2011; McNamara & Faria, 2012).

A atividade $V(H^+)$ -ATPase branquial foi identificada nas duas populações de *M. amazonicum* recém capturados aqui estudadas, entretanto a aclimação a 21 ‰ causou o desaparecimento da atividade $V(H^+)$ -ATPase nos animais do Rio Tietê. Esse mesmo efeito já tinha sido verificado para uma outra população de *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010). Outros crustáceos de água doce também apresentaram atividade $V(H^+)$ -ATPase, tais como *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015), *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), *Eriocheir sinensis* (Onken & Putzenlechner, 1995; Morris, 2001) e *D. pagei* (Weihrauch et al., 2004b; Firmino et al., 2011), embora esteja ausente em *M. rosenbergii* (França et al., 2013). Alguns crustáceos que não habitam a água doce também apresentam atividade $V(H^+)$ -ATPase, tais como *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a) e *C. guanhumi* (Farias et al., 2017). Por outro lado, *C. ornatus* (Garçon et al., 2007), *C. danae* (Masui et al., 2002), *C. symmetricus* (Gonçalves et al., 2006) e *G. cruentata* (Moraes, 2019) não apresentam uma atividade $V(H^+)$ -ATPase apreciável. O pH ótimo da $V(H^+)$ -ATPase em crustáceos ocorre próximo a 7,5 (Onken & Putzenlechner, 1995; Firmino et al., 2011; Lucena et al., 2015).

Na Tabela 17 estão relacionados os parâmetros cinéticos encontrados para a $V(H^+)$ -ATPase de diferentes populações de *M. amazonicum* e do caranguejo de água doce *D. pagei* recém capturado e aclimatado em alta salinidade. A atividade máxima da $V(H^+)$ -ATPase do tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Tietê é 60% maior do que da população do Rio Grande. A atividade da $V(H^+)$ -ATPase dos animais capturados no Rio Tietê é próxima daquelas encontradas em *M. amazonicum* recém capturado na Represa Santa Elisa (Faleiros et al., 2010), *E. sinensis* (Onken & Putzenlechner, 1995; Morris, 2001), *D. pagei* (Firmino et al., 2011) e do camarão marinho *X. kroyeri* (Leone et al., 2015a). Entretanto *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015) e *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) apresentaram uma atividade 50% e 4 vezes maior do que o registrado para os animais do Rio Tietê, respectivamente. Já o *C. guanhumi* (Farias et al., 2017), o *D. pagei* aclimatado em 21 ‰ (Firmino et al., 2011) e o caranguejo *Uca formosensis* (Tsai & Lin, 2007) apresentaram uma atividade $V(H^+)$ -ATPase menor que a de *M. amazonicum* do Rio Tietê.

A atividade da $V(H^+)$ -ATPase branquial de *M. olfersii* (Furriel et al., 2000) é quatro vezes maior que o valor encontrado para *M. amazonicum* selvagem (Faleiros et al., 2010; este trabalho) e duas vezes maior que o valor relatado para *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015). Os resultados mostram uma menor dependência da atividade $V(H^+)$ -ATPase em *M. amazonicum* que em *M. olfersii*. O que sugere uma maior dependência de O_2 no processo de desaminação dos aminoácidos livres, que são fonte de NH_3/NH_4^+ , em *M. amazonicum* que em *M. olfersii*, condizendo com o consumo 2,5 vezes maior de O_2 em *M. amazonicum*

(McNamara & Moreira, 1987; Zanders & Rodrigues, 1992). Essa diferença também sugere uma maior importância do antiporte $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ da membrana apical das franjas das células apicais na absorção de Na^+ em camarões *M. amazonicum* que em *M. olfersii* (McNamara & Lima, 1997).

A afinidade aparente da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ pelo ATP (como MgATP) nas duas populações aqui estudadas apresentam valores próximos entre si ($0,27 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ para a população do Rio Tietê e $0,16 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ para os animais capturados no Rio Grande). Uma afinidade similar foi encontrada para a enzima de *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015) embora populações de *M. amazonicum* selvagem (Faleiros et al., 2010) e *D. pagei* aclimatado em 21 ‰ (Firmino et al., 2011) apresentaram uma afinidade 4 vezes maior do que os camarões do Rio Tietê, já o *D. pagei* recém capturado apresenta afinidade ainda menor pelo ATP (Firmino et al., 2011). Afinidades parecidas com as do *M. amazonicum* da Bacia do Rio da Prata também foram encontradas para a $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ presente em rim de ratos (Sun-Wada et al., 2005) e fungos (Nakano et al., 2008).

A afinidade pelo Mg^{2+} também é parecida nas duas populações de *M. amazonicum* da Bacia do Rio da Prata (Tabela 17), apresentando valores próximos aos de *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015). Outra população selvagem de *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010) e *D. pagei* aclimatado em 21 ‰ (Firmino et al., 2011) apresentam uma afinidade um pouco menor do que a aqui registrada, enquanto o *D. pagei* recém capturado apresenta afinidade 4 vezes menor que o *M. amazonicum* (Firmino et al., 2011).

A estimulação pelo MgATP da atividade da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ apresentou a mesma afinidade nas duas condições estudadas, excesso de ATP e excesso de Mg^{2+} , indicando que a estimulação da enzima pelo MgATP é equivalente nas duas condições. Para *M. amazonicum* cultivado também ocorreram valores de afinidade muito próximos nas duas condições (Lucena et al., 2015). Nessas condições os sítios para ATP, que não hidrolisam o nucleotídeo e são reportados como regulatórios (MacLeod et al., 1998; Vasilyeva et al., 2000; Forgac, 2007; Toei et al., 2010), aparentemente não tem efeito sobre os parâmetros cinéticos da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *M. amazonicum*, contrastando com uma outra população selvagem de *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010) e o *D. pagei* (Firmino et al., 2011) que apresentam uma afinidade maior pelo Mg^{2+} do que pelo ATP.

Tabela 17. Comparação dos parâmetros cinéticos para a estimulação da V(H⁺)-ATPase pelo ATP e Mg²⁺ e inibição pela bafilomicina em diferentes populações de crustáceos decápodes de água doce.

	<i>Macrobrachium amazonicum</i> selvagem								
	Rio Tietê ^a			Rio Grande ^a			Represa Santa Elisa ^b		
	V _M ^c	K _M ^d ou K _I ^e	n _H	V _M ^c	K _M ^d ou K _I ^e	n _H	V _M ^c	K _{0,5} ^d ou K _I ^e	n _H
ATP	27,2 ± 1,1	0,27 ± 0,04	1,1	16,7 ± 1,7	0,16 ± 0,03	1,1	22,7 ± 1,3	1,11 ± 0,06	2,8
MgCl₂	28,0 ± 2,4	0,28 ± 0,05	1,2	17,4 ± 1,3	0,14 ± 0,02	1,1	23,3 ± 1,2	0,44 ± 0,02	3,5
Bafilomicina	-	35,1 ± 1,1	-	-	21,2 ± 1,3	-	-	3,97 ± 0,32	-

	<i>M. amazonicum</i> cultivado ^f				<i>Dilocarcinus pagei</i> recém capturado ^g			<i>Dilocarcinus pagei</i> em 21 %S ^g		
	V _M ^c	K _{0,5} ^d	n _H	K _I ^e	V _M ^c	K _M ^d	K _I ^e	V _M ^c	K _M ^d	K _I ^e
ATP	41,6 ± 1,3	0,21 ± 0,02	1,3	-	26,5 ± 2,1	4,2 ± 0,3	-	8,4 ± 0,7	0,96 ± 0,08	-
MgCl₂	39,8 ± 1,1	0,26 ± 0,02	1,6	-	27,9 ± 2,5	0,92 ± 0,09	-	8,2 ± 0,8	0,34 ± 0,03	-
Bafilomicina	-	-	24,2 ± 1,2	-	-	-	57,1 ± 5,8	-	-	47,9 ± 4,6

^a Este trabalho.

^b Dados de Faleiros et al. (2010).

^c Valores em nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

^d Valores em mmol L⁻¹.

^e Valores em nmol L⁻¹.

^f Dados de Lucena et al. (2015).

^g Dados de Firmino et al. (2011)

Outra característica da $V(H^+)$ -ATPase que é divergente entre as populações de *M. amazonicum* aqui estudadas e da população que habita uma represa, são as interações sítio-sítio. Enquanto este estudo mostrou a ausência de interações sítio-sítio, o *M. amazonicum* que habita a Represa Santa Elisa (Faleiros et al., 2010) apresenta uma cinética cooperativa (Tabela 17), indicando que ocorre cooperatividade na ligação do nucleotídeo nos três sítios de hidrólise da $V(H^+)$ -ATPase.

A ligação da bafilomicina na $V(H^+)$ -ATPase ocorre na subunidade c, impedindo a rotação do anel c e bloqueando o transporte de prótons (Bowman et al., 2004; Wang et al., 2005; Huss & Wieczorek, 2009). A inibição pela bafilomicina ocorreu através de uma curva única apresentando uma constante de dissociação inibidor-enzima maior nos animais do Rio Tietê (K_I de $35,1 \pm 1,1$ nmol L⁻¹) comparada com a população do Rio Grande (K_I de $21,2 \pm 1,3$ nmol L⁻¹), valor que é próximo ao encontrado para o *M. amazonicum* cultivado (Lucena et al., 2015). A outra população selvagem de *M. amazonicum* apresenta uma afinidade aparente maior pelo inibidor (Faleiros et al., 2010), enquanto a enzima de *D. pagei* apresenta uma menor afinidade aparente pela bafilomicina (Firmino et al., 2011).

5.3. Caracterização bioquímica da (Na^+, K^+) -ATPase de *Macrobrachium amazonicum*

A eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) das frações microsomais do tecido branquial de *M. amazonicum* apresentou um padrão complexo indicando a presença de diversas proteínas com diferentes massas moleculares, fato esperado por se tratar de uma fração microsomal. Diferenças podem ser observadas no padrão de coloração por prata, principalmente no tecido branquial dos camarões aclimatados a 21 ‰ durante 10 dias, sugerindo diferentes padrões de expressão de proteínas após a aclimação. Diferenças na expressão de proteínas após a aclimação em alta salinidade também já foram verificadas para *M. olfersii* (Mendonça et al., 2007) e uma outra população de *M. amazonicum* (Belli et al., 2009).

A análise por Western blotting revelou uma única banda imunorreativa para a subunidade α da (Na^+, K^+) -ATPase no tecido branquial dos camarões, sugerindo a expressão de uma única isoforma, sendo este resultado coerente com a inibição pela ouabaína da atividade ATPase, que ocorreu através de uma curva única. Nos animais recém-capturados a banda imunorreativa apresenta um valor de massa molar de aproximadamente 110 kDa, valor similar ao encontrado para a subunidade α da (Na^+, K^+) -ATPase de outros crustáceos (Furriel

et al., 2000; Masui et al., 2002, 2005; Lucu & Towle, 2003; Belli et al., 2009; Garçon et al., 2007, 2009; Lucena et al., 2012; França et al., 2013; Leone et al., 2014; 2015b).

Já o tecido branquial dos animais aclimatados em alta salinidade apresenta um pequeno desvio na banda imunorreativa da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, que pode ser atribuído ao erro de cerca de 10% na determinação da massa molar por SDS-PAGE (Weber & Osborn, 1969; Kaufmann et al., 1984). Entretanto, isto também pode ser indicativo de expressão de uma diferente isoforma desta subunidade após a aclimação em alta salinidade. Esta hipótese é suportada pelas diferentes características cinéticas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos animais recém capturados e aclimatados (Tabela 15), bem como pelo rápido aumento da expressão do RNAm da subunidade α seguido de um aumento da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, relatado para outra população de *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010). Duas isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foram identificadas em *Artemia* spp. (Peterson et al., 1982; Cortas et al., 1989), *D. pagei* (Furriel et al., 2010) e *C. sapidus* (Lovett et al., 2006). O sequenciamento desta subunidade no caranguejo eurialino *Pachygrapsus marmoratus* identificou a existência de duas isoformas da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, que se diferem entre si devido a uma inserção de um segmento de 81 nucleotídeos (Jayasundara et al., 2007).

A relação entre a atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e a intensidade da banda imunorreativa da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ na análise por Western blotting em diferentes condições não está bem estabelecida. Para *C. sapidus* (Lovett et al., 2006) e *C. ornatus* (Garçon et al., 2009; Leone et al., 2015b) um aumento da intensidade da imunorreação da subunidade α foi acompanhado por um aumento da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Entretanto para *C. danae* (Massui et al., 2005b; 2009) e *C. symmetricus* (Lucena et al., 2012) o aumento da intensidade da banda ocorreu sem alteração na atividade ATPase da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

Nas duas diferentes populações de *M. amazonicum* aqui estudadas, os animais recém capturados apresentaram a mesma atividade (Tabela 13), porém a banda imunorreativa para a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ apresentada pelo tecido branquial dos camarões do Rio Grande é mais intensa. A aclimação dos camarões capturados no Rio Tietê provocou uma diminuição da atividade da enzima (Tabela 15), que se refletiu na intensidade da banda na análise de Western blotting, mas a imunolocalização da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ não sofreu alteração com a aclimação (Figura 44).

Nos crustáceos, as brânquias constituem um epitélio especializado, que apresenta permeabilidade seletiva, tendo como função realizar trocas iônicas e gasosas entre o ambiente

e o meio extracelular dos animais, e são consideradas a principal estrutura responsável pela homeostase dos fluídos extracelulares (Péqueux, 1995). Diferentemente dos caranguejos braquiúros, as brânquias dos camarões carídeos não apresentam diferenciação entre as brânquias posteriores, ionorreguladoras, e brânquias anteriores, respiratórias (Péqueux, 1995; Lucu & Towle, 2003; Cieluch et al., 2007). Entretanto, têm se observado diferenciação dentro de cada lamela branquial nestes camarões, onde dois tipos de epitélios coexistem: regiões epiteliais delgadas, que são envolvidas em trocas gasosas e zonas axiais especializadas no transporte de íons (Cieluch et al., 2005; Martinez et al., 2005; Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010; Boudour-Bouchecker et al., 2013).

Em *M. amazonicum* as brânquias são do tipo filobrânquais, tipo característico dos camarões carídeos e dos caranguejos braquiúros (Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995). No epitélio lamelar branquial de *M. amazonicum*, as células pilares apresentam franjas apicais alongadas e delgadas, sendo que a hemolinfa flui através de dois compartimentos simétricos existentes entre estas e as células do septo intralamelar (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010). As células do septo intralamelar de *M. amazonicum* apresentam extensas invaginações na membrana plasmática associadas a numerosas mitocôndrias, características de um epitélio que realiza transporte ativo de íons (Towle & Kays, 1986; Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995). Entre as células do septo e as células pilares ocorre comunicação através de numerosas junções interdigitadas que permitem a passagem de íons entre estas (Faleiros et al., 2010).

A imunolocalização da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ revelou a presença da enzima exclusivamente ao longo do septo intralamelar das brânquias de *M. amazonicum*, como já relatado anteriormente para *M. amazonicum* (Leone et al., 2014; Pinto et al., 2016) e *M. rosenbergii* (França et al., 2013). Em *M. olfersii*, as membranas deste apresentam uma maior atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do que outras regiões das brânquias (McNamara & Torres, 1999). Tanto a distribuição quanto a intensidade da imunorreatividade para a subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ não foram alteradas após a aclimação a 21 ‰S, indicando que a regulação a longo prazo necessária para a adaptação do *M. amazonicum* do Rio Tietê em alta salinidade não envolve alterações na distribuição e quantidade de moléculas da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ presente no septo intralamelar. Porém a diminuição da atividade ATPase da enzima e alterações na afinidade da enzima para Mg^{2+} , K^+ e Na^+ (Tabela 15) estão envolvidas neste processo. Aclimação de *M. amazonicum* em diferentes concentrações de amônia durante 72 horas também não causou alterações na distribuição da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ embora tenham sido observadas alterações na atividade da enzima (Pinto et al., 2016).

M. amazonicum apresenta invaginações ao longo da membrana plasmática nas células do septo intralamelar, o que confere uma maior superfície de membrana permitindo que ocorra a inserção das proteínas de membrana como a (Na⁺, K⁺)-ATPase, e a presença de mitocôndrias associadas permite que estes transportadores utilizem o ATP gerado por elas (Falerios et al., 2010). A (Na⁺, K⁺)-ATPase presente nas invaginações das células do septo geram um gradiente eletroquímico que dirige tanto a captação de Na⁺ em meios diluídos quanto a extrusão de Na⁺ em meios concentrados (McNamara & Torres, 1999) estando, portanto, envolvida tanto no processo de hiper- como no de hiporregulação de *M. amazonicum*.

A atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial do *M. amazonicum* do Rio Tietê se distribuiu em dois picos ao longo do gradiente de sacarose (10-50%). Fabri et al. (2019) sugerem que a enzima pode se originar de dois locais distintos, possivelmente do septo intralamelar e das células pilares (Freire & McNamara, 1995; McNamara & Lima, 1997), como já foi relatado para outros crustáceos (Furriel et al., 2010; Lucena et al., 2012). Entretanto a imunolocalização revelou que a (Na⁺, K⁺)-ATPase está restrita ao septo intralamelar, como já tinha sido observado anteriormente para o *M. amazonicum* cultivado (Leone et al., 2014). Uma outra explicação seria a de que os dois picos se originam devido à formação de fragmentos da membrana do septo intralamelar de tamanhos diferentes, que se distribuem em pontos diferentes do gradiente de sacarose (Fabri et al., 2019).

Dois picos de atividade ao longo do um gradiente de sacarose também foram verificados para *M. rosenbergii* (França et al., 2013), *D. pagei* (Furriel et al., 2010) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2015), contrastando com o pico único encontrado para *M. olfersii* (Furriel et al., 2000), outras populações de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Leone et al., 2014), *C. danae* (Masui et al., 2009) e *C. ornatus* (Garçon et al., 2009).

5.4. Efeito do FXYD2 na atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum*

Os peptídeos da família FXYD apresentam expressão tecido-específica e são associados a regulação da (Na⁺, K⁺)-ATPase, modulando suas propriedades cinéticas bem como sua estabilidade (Geering, 2008; Cirri et al., 2011; Mishra et al., 2011; Shindo et al., 2011; Yoneda et al., 2013; Pirkmajer & Chibalin, 2019). Em mamíferos são expressas sete proteínas FXYD, que apresentam de 43 a 51% de identidade entre si (Li & Langhans, 2015). Elas estão associadas à (Na⁺, K⁺)-ATPase e afetam a afinidade da enzima pelos íons Na⁺ e K⁺

ou os valores de V_M da enzima (Geering, 2005; 2006; 2008; Garty & Karlish, 2006; Clausen et al., 2017; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

A interação dos peptídeos da família FXYD com a subunidade α da (Na^+, K^+) -ATPase ocorre através da alça transmembrana 9 (TM9) (Garty & Karlish, 2006; Geering, 2008; Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009), sendo que os resíduos Glu953, Fen949, Leu957 e Fen960 da subunidade α , o motivo FXYD e dois resíduos de glicina altamente conservados dentro da família FXYD são de extrema importância para que essa interação ocorra (Morth et al., 2007; Shinoda et al., 2009). Alguns peptídeos da família são potencialmente associados a regulação de outras P-ATPases, como a Ca^{2+} -ATPase (Cortes et al., 2011) e a (H^+, K^+) -ATPase (Crambert et al., 2005; Delprat et al., 2007). Foram verificadas reações cruzadas na regulação das ATPases por estas proteínas, indicando que aparentemente o sítio de ligação para as proteínas FXYD é altamente conservado dentro da família das P-ATPases (Delprat et al., 2006; Cortes et al., 2011).

O FXYD2 foi a primeira proteína da família que foi associada a (Na^+, K^+) -ATPase, bem como é a mais comumente encontrada associada a esta ATPase (Therien & Blostein, 2000; Crambert et al., 2004; Füzesi et al., 2005, Lubarski et al., 2007; Cortes et al., 2011; Silva et al., 2012; Pirkmajer & Chibalin, 2019). O FXYD2 é um ativador da (Na^+, K^+) -ATPase e em mamíferos é capaz de aumentar a velocidade máxima da enzima e modular a afinidade por íons sódio, sem contudo afetar a afinidade pelo ATP (Forbush et al., 1978; Arystarkhova et al., 1999; Pu et al., 2001; Cortes et al., 2006; Geering, 2006; 2008).

A expressão de RNAm de diferentes proteínas da família FXYD no tecido branquial de peixes é alterada pelo desafio osmótico enfrentado por estes animais, o que mostra a importância destas proteínas no processo osmorregulatório (Tipsmark, 2008; Wang et al., 2008; Yang et al., 2013). A presença de um peptídeo da família FXYD em crustáceos foi identificado pela primeira vez por Silva et al. (2012) no tecido branquial do caranguejo *C. danae*. Similarmente ao que ocorre com o FXYD2 de mamíferos, a proteína de crustáceo também é passível de fosforilação pela proteína quinase A, indicando que a fosforilação pode ser importante na regulação no processo osmorregulatório (Silva et al., 2012).

A presença do peptídeo FXYD2 exógeno foi responsável por estimular a atividade da (Na^+, K^+) -ATPase branquial de *C. danae* em 40% (Silva et al., 2012). Para o *U. cordatus* a estimulação foi de aproximadamente 25% em condições de hiporregulação ou em condição isosmótica da hemolinfa com o ambiente externo, entretanto quando exposto a baixa salinidade (hiperregulação) esta estimulação foi de 80% (Lucena et al., 2019b).

A presença de FXYD2 exógeno provocou um aumento de aproximadamente 15% na atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturado, quando o animal está hiperregulando o conteúdo de sua hemolinfa, um valor muito inferior ao registrado para o *U. cordatus* nestas condições (Lucena et al., 2019b). Já para os animais aclimatados em 21 ‰ a estimulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi maior do que 40%, próxima ao registrado para *C. danae* (Silva et al., 2012).

A estimulação pelo peptídeo exógeno na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de crustáceos decápodes apresentar variação com o ambiente osmótico de aclimação (Lucena et al., 2019b; este trabalho) pode ser de uma grande importância no processo osmorregulatório destes animais, como verificado para peixes (Tipsmark, 2008; Wang et al., 2008; Yang et al., 2013). Sendo que a possível presença de peptídeos da família FXYD no tecido branquial de *M. amazonicum*, indicada pela Figura 46, pode ser um importante mecanismo de regulação da (Na⁺, K⁺)-ATPase na adaptação em diferentes ambientes osmóticos para este camarão.

A (Na⁺, K⁺)-ATPase é responsável por dirigir energeticamente o processo de excreção de amônia em diversos crustáceos (Lucu et al., 1989; Weihrauch et al., 1998, 1999; Masui et al., 2005; Garçon et al., 2007; Leone et al., 2017) e muitos crustáceos apresentam estimulação sinérgica pelos íons amônio e potássio (Holliday, 1985; Masui et al., 2005; Leone et al., 2014; 2015; 2017). A estimulação sinérgica pelos íons potássio e amônio da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* recém capturado no Rio Tietê e no Rio Grande foi de apenas 8%, que também foi registrado em *D. pagei* (Furriel et al., 2010) e *X. kroyeri* (Leone et al., 2015). Já para os animais aclimatados em alta salinidade (18,2‰) foi duas vezes maior que este valor, ainda sendo menor do que o registrado para outras populações de *M. amazonicum* (Santos et al., 2007; Leone et al., 2014) e outros crustáceos (Masui et al., 2002; 2005; Gonçalves et al., 2006; Garçon et al., 2007; 2009; 2013; Lucena et al., 2012; França et al., 2013), que geralmente apresentam estimulações sinérgicas superiores a 30%.

O FXYD2 exógeno não alterou a velocidade máxima da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *C. danae* na estimulação pelo NH₄⁺, na ausência de K⁺. Entretanto a afinidade da enzima pelo NH₄⁺ aumentou cerca de 10 vezes (Silva et al., 2012). Porém a fosforilação pela proteína quinase A endógena do FXYD2 de *C. danae* provoca uma estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase, que pode ser relevante para a participação da (Na⁺, K⁺)-ATPase na excreção de amônia através da brânquia deste animal (Silva et al., 2012).

A estimulação pelo FXYD2 exógeno, na presença de íons amônio, da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* sofreu um aumento de

aproximadamente 10% em relação à atividade na presença de apenas íons amônio (com K^+ saturante), tanto para os animais recém capturados quanto para os animais aclimatados em alta salinidade. Isso pode indicar que a presença de um peptídeo da família FXYP no tecido branquial de *M. amazonicum* (Figura 46) pode ser importante na excreção de amônia, como visto para *C. danae* (Silva et al., 2012).

5.5. Efeito de quinases na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase de *Macrobrachium amazonicum*

A proteína quinase ativada por cAMP (PKA) e a proteína quinase ativada por Ca^{2+} (PKC) são as proteínas envolvidas na fosforilação de transportadores mais bem estudadas, e ambas têm como alvos resíduos de serina e treonina e podem afetar tanto a atividade da bomba diretamente como a sua distribuição (Chibalin et al., 1999; Al-Khalili et al., 2004; Poulsen et al., 2010a; Pirkmajer & Chibalin, 2019). A regulação por fosforilação é importante para a (Na^+ , K^+)-ATPase e representa uma ligação da ação de diversos hormônios e a atividade da enzima (Bertorello & Katz, 1993; Therien & Blostein, 2000; Poulsen et al., 2010a; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

A subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase apresenta diversos sítios de fosforilação (Poulsen et al., 2010a; Pirkmajer & Chibalin, 2019). A proteína quinase C (PKC) é associada a fosforilação do resíduo Ser18 da subunidade α da (Na^+ , K^+)-ATPase (Vasilets et al., 1990; Middleton et al., 1993; Freschenko & Sweadner, 1995; Pirkmajer & Chibalin, 2019), enquanto a proteína quinase A (PKA) está envolvida com a fosforilação do resíduo Ser943 (Poulsen et al., 2010a). Entretanto esta fosforilação *in vitro* só ocorre na presença de Triton X-100 (Freschenko & Sweadner, 1994; Kurihara et al., 2000; Poulsen et al., 2010a).

A presença de peptídeos da família FXYP é uma outra importante ligação entre regulação hormonal e a (Na^+ , K^+)-ATPase, já que hormônios podem modular a interação entre essas moléculas, além de regular a expressão de peptídeos da família FXYP (Pirkmajer & Chibalin, 2019). Todos os peptídeos da família FXYP possuem um sítio de fosforilação, entretanto muitas vezes é difícil relacionar a fosforilação destes sítios com a regulação da (Na^+ , K^+)-ATPase (Mahmmoud et al., 2000; Sweadner & Rael, 2000; Yamaguchi et al., 2001; Crambert et al., 2004; Cortes et al., 2006; 2011; Silva et al., 2012; Tipsmark, 2008; Pirkmajer et al., 2017). A regulação por fosforilação da (Na^+ , K^+)-ATPase está comprovada apenas para FXYP1 e FXYP3/4 (Palmer et al., 1991; Mahmmoud et al., 2000, 2003; Crambert et al., 2002; Cornelius et al., 2005; Despa et al., 2005; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

A associação do FXYD1 com a (Na⁺, K⁺)-ATPase provoca a diminuição da afinidade pelo Na⁺ (Crambert et al., 2002), porém a fosforilação dos resíduos de serina (Ser63 e Ser68), realizada por PKA ou PKC, provoca um aumento da afinidade pelos íons sódio (Walaas et al., 1994; Despa et al., 2005; Bibert et al., 2008; Fuller et al., 2009; Han et al., 2010), o que liga diretamente a regulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase realizada pelo peptídeo FXYD1 com a ação de hormônios que ativam estas quinases (Walaas et al., 1994; Pirkmajer & Chibalin, 2019).

A fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* pelas proteínas quinase A e C endógenas, na ausência de Triton X-100, não resultou na fosforilação da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase, sendo que foi verificada apenas a fosforilação para uma proteína da família FXYD (Figura 46). A proteína da família FXYD presente no tecido branquial de *C. danae* também é sensível a fosforilação pela PKA, bem como o FXYD2 de mamífero (Cortes et al., 2011; Silva et al., 2012). A (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *U. cordatus* também é sensível a fosforilação pelas proteínas quinases, sendo que na presença de Triton X-100, a fosforilação pela PKA ocorre tanto na subunidade α quanto no peptídeo FXYD, porém apenas a subunidade α é fosforilada pela PKC (Lucena et al., 2019b). A fosforilação mais intensa da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* quando exposto a menores salinidades também foi verificada para *U. cordatus* (Lucena et al., 2019b).

A fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial do *M. amazonicum* recém capturado pela PKA endógena apresentou pouco efeito na atividade ATPase (estimulação de apenas 7%), porém para os animais aclimatados em alta salinidade a fosforilação pela PKA causou uma inibição de 85% da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase. A diferença do efeito da fosforilação pela proteína quinase A na atividade da enzima nas duas condições pode ser um importante mecanismo regulatório da (Na⁺, K⁺)-ATPase para a manutenção da osmolaridade da hemolinfa do *M. amazonicum* em altas salinidades. Para o caranguejo *U. cordatus* também foi verificada alteração no efeito de diferentes quinases com a aclimação em diferentes salinidades (Lucena et al., 2019b).

Já a fosforilação da enzima pela PKC foi responsável pela diminuição de 50 e 40% da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase para os animais recém capturados e aclimatados em alta salinidade, respectivamente. Diferente do visto para a PKA, a inibição da atividade ATPase da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial de *M. amazonicum* é mais próxima nas duas condições osmóticas estudadas, indicando que uma regulação hormonal através de uma cascata que ative a fosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase pela PKC pode ser importante para este camarão nos diferentes desafios osmóticos (Therien & Blostein, 2000).

6. CONCLUSÃO

A caracterização cinética da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* da Bacia do Rio da Prata (Paraná-Paraguai) mostrou grande semelhança para as duas populações aqui estudadas, porém divergindo consideravelmente de outras populações estudadas anteriormente, mostrando a proximidade adaptativa destas duas populações.

A aclimação do camarão *M. amazonicum* em salinidade de 21 ‰ durante 10 dias provocou uma diminuição na atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e alterou a afinidade da enzima por alguns de seus moduladores. Indicando que quando exposto a altas salinidades o *M. amazonicum* altera a regulação deste transportador, seja através da expressão de uma diferente isoenzima da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ou de outros mecanismos regulatórios.

As participações da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ na atividade ATPase total foram maiores nos animais recém capturados, mostrando mais uma vez a importância destas bombas no processo de invasão do ambiente dulcícola pelos crustáceos decápodes.

A caracterização da atividade ATPase da $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$ revelou uma velocidade máxima próxima para as duas populações, entretanto as afinidades pelos moduladores da enzima foram levemente distintas entre si.

Apenas uma isoforma da subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é expressa no tecido branquial de *M. amazonicum* da Bacia do Rio da Prata (Paraná-Paraguai), porém para os animais aclimatados pode ocorrer a expressão de uma isoforma diferente do que para os animais recém capturados.

A adaptação em longo prazo do camarão em alta salinidade não envolve a alteração na distribuição da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas brânquias do *M. amazonicum*. Mostrando que a adaptação destes animais a alta salinidade não depende da disponibilidade da enzima na membrana celular.

A $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial de *M. amazonicum* apresenta um sítio para ligação de peptídeos da família FXYP, e a atividade da enzima dos animais aclimatados apresenta uma maior estimulação na presença do peptídeo FXYP2 exógeno, o que indica uma grande importância desses peptídeos no processo osmorregulatório deste animal.

As proteínas quinases A e C endógenas realizam a fosforilação de uma proteína da família FXYP presente na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum*. Isto provoca a alteração da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de forma distinta em animais expostos a diferentes salinidades. Mostrando um importante mecanismo regulatório da atividade da enzima realizado por estas quinases.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M., Diaz, F., & Buckle, L. F. (1998). The effect of salinity on oxygen consumption and osmoregulation of *Macrobrachium tenellum*. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 31, 105-113.
- Alberts, R. W. (1967). Biochemical aspects of active transport. *Ann. Rev. Biochem.* 6, 727-756.
- Al-Khalili, L., Kotova, O., Tsuchida, H., Ehren, I., Feraille, E., Krook, A., & Chibalin, A. V. (2004). ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na, K-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 279, 25211-25218.
- Almeida, A. O., Coelho, P. A., Luz, J. R., Santos, J. T. A., & Ferrazi, N. R. (2008). Decapod crustaceans in fresh waters of southeastern Bahia Brazil. *Rev. Biol. Trop.* 56, 1225-1254.
- Almeida, V., Hahn, N. S., & Vazzoler, A. E. A. M. (1997). Feeding patterns in five predatory fishes of the high Parana River floodplain (PR Brazil). *Ecol. Freshwater Fish.* 6, 123-133.
- Alzamora, R., Thali, R. F., Gong, F., Smolak, C., Li, H., Baty, C. J., Bertrand, C. A., Auchli, Y., Brunisholz, R. A., Neumann, D., Hallows, K. R., & Pastor-Soler, N. M. (2010). PKA regulates vacuolar H⁺-ATPase localization and activity via direct phosphorylation of the A subunit in kidney cells. *J. Biol. Chem.* 285, 24676-24685.
- Amarelle, L., & Lecuona, E. (2018). The Antiviral Effects of Na,K-ATPase Inhibition: A Minireview. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2154.
- Anger K., & Hayd L. (2009). From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic Biol.* 7, 19-30.
- Anger, K. (2001). The biology of decapod crustacean larvae. *Crust. Issues Vol.* 14.
- Anger, K. (2003). Salinity as a key parameter in the larval biology of decapods crustaceans. *Invertebr. Repr. Dev.* 43, 29-45.
- Anger, K., & Hayd, L. (2010). Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquatic Biol.* 9, 251-261.
- Anger, K., Hayd, L., Knott, J., & Nettelmann, U. (2009). Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult.* 287, 341-348.
- Antunes, C. D., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Leone, F. A., & McNamara J. C. (2017). Low salinity-induced alterations in epithelial ultrastructure Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization and enzyme kinetic characteristics in the gills of the thistripe hermit crab *Clibanarius vittatus* (Anomura Diogenidae). *J. Exp. Zool.* 327, 380-397.
- Apell, H. J. (2017). Mechanistic Principles of Ion Transport in the Na,K-ATPase. *Russ. J. Electrochem.* 53, 237-247.
- Apell, H. J., Benz, G., & Sauerbrunn, D. (2011). Proton diet for the sodium pump. *Biochem.* 50, 409-418.
- Apell, H. J., Hitzler, T., & Schreiber G., (2017). Modulation of the Na,K-ATPase by magnesium ions. *Biochem.* 56, 1005-1016.
- Aperia, A. (2007). New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J. Intern. Med.* 261, 44-52.
- Aperia, A. (2012). 2011 Homer Smith Award: To Serve and Protect: Classic and Novel Roles for Na⁺K⁺-Adenosine Triphosphatase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 1283-1290.
- Aperia, A., Akkuratov, E. E., Fontana, J. M., & Brismar, H. (2016). Na⁺-K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am. J. Physiol.* 310, C491-C495.
- Arai, S., Saijo, S., Suzuki, K., Mizutani, K., Kakinuma, Y., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Iwata, S., Yamato, I., & Murata, T. (2013). Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V1-ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature* 493, 703-707.

- Arata, Y., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., Shao, E., Wilkens, S., & Forgac, M. (2002). Structure subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H⁺)-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 71-74.
- Araujo M. C., & Valenti, W. C. (2010). Efeito de baixas salinidades sobre larvas de (Crustacea Palaemonidae) submetidas à inanição *Macrobrachium amazonicum*. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, 22, 191-197.
- Araujo, M. C., & Valenti, W. C. (2007). Feeding habit of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* larvae. *Aquacult.* 265, 187-193.
- Armstrong, D. A., Strange, J., Crowe, J., Knight, A. W., & Simmons, M. (1981). High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds. *Biol. Bull.* 160, 349-365.
- Arystarkhova, E., Wetzel, R. K., Asinovski, N. K., & Sweadner, K. J. (1999). The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 33183–33185.
- Augusto, A., & Masui, D. C. (2014). Comparison of growth, metabolism, feed, fecal production, excretion and energy budget in males and females of the Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 47, 373-388.
- Augusto, A., & Valenti, W. C. (2016). Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae)? *J. Crust. Biol.* 36, 716–723.
- Augusto, A., Greene, L. J., Laure, H. J., & McNamara, J. C. (2007). The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous freshwater palaemonid shrimps *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Crustacea Decapoda). *J. Crust. Biol.* 27, 626–634.
- Augusto, A., Pinheiro, A. S., Greene, L. J., Laure, H. J., & McNamara J. C. (2009). Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biol.* 7, 113–122.
- Azarias, G., Kruusmagi, M., Connor, S., Akkuratov, E. E., Liu, X. L., Lyons, D., Brismar, H., Broberger, C., & Aperia, A. (2013). 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.
- Baldwin, G. F., & Kirschner L. B. (1976). Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 175 percent sea water. *J. Exp. Zool.* 49, 158–171.
- Barnes, D. B. (2000). *Zoologia dos invertebrados*. 4^a Ed. Editora Roca, São Paulo.
- Bate, S. (1868). On a new genus with four new species of freshwater shrimps. *Proc. Zool. Soc. London* 1868, 363-368.
- Bauer, R. T. (2004). Remarkable Shrimps: Adaptations and Natural History of the Carideans. University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, USA.
- Belli, N. M., Faleiros, R., O., Firmino, K. C., Masui, D. C., Leone, F. A., McNamara, J. C., & Furriel, R. P. (2009). Na, K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 152A, 431-439.
- Belogus, T., Haviv, H., & Karlish, S. J. D. (2009). Neutralization of the Charge on Asp(369) of Na⁺,K⁺-ATPase Triggers E-1 \leftrightarrow E-2 Conformational Changes. *J. Biol. Chem.* 248, 31038-31051.
- Benlekbir, S., Bueler, S. A., & Rubinstein, J. L. (2012). Structure of the vacuolar-type ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* at 11-Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1356-1362.
- Bentes, B. S., Martinelli, J. M., Souza, L. S., Cavalcante, D. V, Almeida, M. C., & Isaac, V. J. (2011). Spatial distribution of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*

- (Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Gujará Bay, Belém, Pará). *Braz. J. Biol.* 71, 925-935.
- Bertorello, A. M., & Katz, A. I. (1993). Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: Physiological relevance and cellular mechanisms. *Am. J. Physiol.* 265, F743-F755.
- Bianchini, A., Lauer, M. M., Nery, L. E., Colares, E. P., Monserrat, J. M., & Dos Santos Filho, E. A. (2008). Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 423-436.
- Bibert, S., Roy, S., Schaer, D., Horisberger, J. D., & Geering, K. (2008). Phosphorylation of phospholemman (FXD1) by protein kinases a and C modulates distinct Na, K-ATPase isozymes. *J. Biol. Chem.* 283, 476-486.
- Blanco G. (2005). Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* 25, 292-303.
- Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the (Na⁺K⁺)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 44, F633-F650.
- Blom, H., Bernhem, K., & Brismar, H. (2016). Sodium pump organization in dendritic spines. *Neurophotonics* 3, 041803.
- Bolotta, A., Visconti, P., Fedrizzi, G., Ghezzi, A., Marini, M., Manunta, P., Messaggio, E., Posar, A., Vignini, A., & Abruzzo, P. M. (2018). Na(+), K(+)-ATPase activity in children with autism spectrum disorder: Searching for the reason(s) of its decrease in blood cells. *Autism Res.* 11, 1388-1403.
- Boscolo, W. R., Hayashi, C., Meurer, F., Feiden, A., & Bombardelli, R. A. (2004). Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína das Farinhas de Resíduo da Filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e Farinha Integral do Camarão Canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a Tilápia do Nilo. *Rev. Bras. Zootec.* 33, 8-13.
- Bottger, P., Doganli, C., & Lykke-Hartmann, K. (2012). Migraine- and dystonia-related disease-mutations of Na⁺/K⁺-ATPases: relevance of behavioral studies in mice to disease symptoms and neurological manifestations in humans. *Neurosci. Biobehav. Review* 36, 855-871.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Charmantier-Daures, M., Anger, K., Charmantier, G., & Lorin-Nebel, C. (2016). Osmoregulation in larvae and juveniles of two recently separated *Macrobrachium* species: Expression patterns of ion transporter genes. *Comp. Biochem. Physiol.* 195A, 39-45
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Charmantier-Daures, M., Grousset, E., Anger, K., Charmantier, G., & Lorin-Nebel, C. (2014). Differential distribution of V-type H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell Tissue Res.* 357, 195-206.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Lorin-Nebel, C., Elguero, C., & Grousset, E. (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell Tissue Res.* 353, 87-98.
- Bowman, B. J., Graham, L. A., Stevens, T. H., & Bowman, B. J. (2004). The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 33131-33138.
- Boxenbaum, N., Daly, S. E., Javaid, Z. Z., Lane, L. K., & Blostein R. (1998). Changes in the steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the (Na⁺, K⁺)-ATPase α -subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 23086-23092.
- Bozza, D. C., Freire, C. A., & Prodocimo, V. (2019). Osmo-ionic regulation and carbonic anhydrase, Na⁺/K⁺-ATPase and V-H⁺-ATPase activities in gills of the ancient freshwater crustacean *Aegla schmitti* (Anomura) exposed to high salinities. *Comp. Biochem. Physiol.* 231A, 201-208.

- Bublitz, M., Poulsen, H., Morth, J. P., & Nissen P. (2010). In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 431-439.
- Buckup, P. A. (2011). *The Eastern Brazilian Shield*. In: J. S. Albert, & R. E. Reis, (Eds). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (pp. 203–210). The Regents of the University of California, Berkeley, CA, USA,
- Capendeguy, O., & Horisberger J. D. (2005). The role of the third extracellular loop of the Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit in a luminal gating mechanism. *J. Physiol.* 565, 207-218.
- Carvalho, T. P. & Albert, J. S. (2011). *The Amazon-Paraguay Divide*. In: Albert, J. S. & Reis, R. E. (eds). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. The Regents of the University of California, Berkeley, CA, USA, pp. 193–202.
- Castilho, P. C., Martins, I. A., & Bianchini, A. (2001). Gill Na⁺, K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256, 215-227.
- Castille, F. L., & Lawrence, A. L. (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of the freshwater shrimps *Macrobrachium ohione* Smith and *Macrobrachium rosenbergii* De Man. *Comp. Biochem. Physiol.* 70A, 47-52.
- Castillo, J. P., Rui, H., Basilio, D., Das, A., Roux, B., Latorre, R., Bezanilla, F., & Holmgren, M. (2015). Mechanism of potassium ion uptake by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature Comm.* 6, 7622.
- Cavalcante, D. V., Silva, B. B., & Martinelli-Lemos, J. M. (2012). Biodiversity of decapod crustaceans in the estuarine floodplain around the city of Belém (Pará) in Brazilian Amazonia. *Zool.* 29, 203–209.
- Charmantier, G., & Anger, K. (2011). Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 396, 89–98.
- Chibalin, A. V., Kovalenko, M. V., Ryder, J. W., Feraille, E., Wallberg-Henriksson, H., & Zierath, J. R. (2001). Insulin- and glucose-induced phosphorylation of the Na(+), K(+)-adenosine triphosphatase alpha-subunits in rat skeletal muscle. *Endocrinol.* 142, 3474–3482.
- Chibalin, A. V., Ogimoto, G., Pedemonte, C. H., Pressley, T. A., Katz, A. I., Feraille, E., Berggren, P.-O., & Bertorello, A. M. (1999). Dopamine-induced endocytosis of Na⁺, K⁺-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 1920–1927.
- Chibalin, A. V., Pedemonte, C. H., Katz, A. I., Feraille, E., Berggren, P. O., & Bertorello, A. M. (1998). Phosphorylation of the catalytic alpha-subunit constitutes a triggering signal for Na⁺, K⁺-ATPase endocytosis. *J. Biol. Chem.* 273, 8814–8819.
- Chong-Carrillo, O., Vega-Villasante, F., Arencibia- Jorje, R., Akintola, S. L., Michán-Aguirre, L., & Cupul-Magaña, F. G. (2015). Research on the river shrimps of the genus *Macrobrachium* (Bate, 1868) (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) with economic importance: strengths and weaknesses shown through scientometrics. *Lat. Am. J. Aquatic Res.* 43, 684-690.
- Chourasia, M., & Sastry, N. (2012). The Nucleotide, Inhibitor, and Cation Binding Sites of P-type II ATPases. *Chem. Biol. Drug Design* 79, 617–627.
- Cieluch, U., Anger, K., Charmantier-Daures, M., & Charmantier, G. (2007). Osmoregulation and immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase during the ontogeny of the mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea). *Mar. Ecol. Progr.* 329, 169–178.
- Cieluch, U., Charmantier, G., Grousset, E., Charmantier-Daures, M., & Anger, K. (2005). Osmoregulation, immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and ultrastructure of branchial

- epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 1017–1025
- Cipriano, D. J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K. C., Qi, J., & Forgac M. (2008). Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 599–604.
- Cirri, E., Katz, A., Mishra, N. K., Belogus, T., Lifshitz, Y., Garty, H., Karlisch, S. J. D., & Apell, H. J. (2011). Phospholemman (FXVD1) Raises the Affinity of the Human r1 β 1 Isoform of Na,K-ATPase for Na Ions. *Biochem.* 50, 3736–3748.
- Clarke, R. J. (2009). Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases. *Eur. Biophys. J.* 39, 3–17.
- Clarke, R. J., Catauro, M., Rasmussen, H. H., & Apell H. P. (2013). Quantitative calculation of the role of the Na⁺, K⁺-ATPase in thermogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827, 1205–1212.
- Clausen, M. V., Hilbers, F., & Poulsen H. (2017). The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol.* 8, 371
- Clausen, T. (2003). Na⁺- K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol. Review* 83, 1269–1324.
- Cochrane, D. R., Jacobsen, B. M., Connaghan, K. D., Howe, E. N., Bain, D. L., & Richer, J. K. (2012). Progesterin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 15–24.
- Cohen E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D. M., Ebel, C., Maire, M., & Karlisch, S. J. D. (2005). Purification of Na⁺,K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 280, 16610-16618.
- Coler, R. A., Watanabe, R. A., Xavier, B. F., & Paz, R. J. (1999). A preliminary report on the application of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Decapoda: Palaemonidae) as a biomarker. *Hydrobiol.* 412, 119–121.
- Colina, C., Palavicini, J. P., Srikumar, D., Holmgren, M., & Rosenthal, J. J. C. (2010). Regulation of Na⁺/K⁺ ATPase Transport Velocity by RNA. *PLoS Biol.* 8, 1-9.
- Collins, M. P. & Forgac, M. (2018). Regulation of V-ATPase Assembly in Nutrient Sensing and Function of V-ATPases in Breast Cancer Metastasis. *Front. Physiol.* 9:902.
- Compère, P., Wanson, S., Pequeux, A., Gilles, R., & Goffinet G. (1989). Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* 21, 299-318.
- Copele, D. E., & Fitzjarrell, A. T. (1968). The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Z. Zellforsch.* 92, 1-22.
- Cornelius, F., & Mahmoud, Y. A. (2003). Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins - FXVD. *News Physiol. Sci.* 18, 119-124.
- Cornelius, F., & Mahmoud, Y. A. (2009). Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase: Effects of pH and Ouabain induced changes in enzyme conformation. *Biochem.* 48, 10056-10065.
- Cornelius, F., Kanai, R., & Toyoshima, C. (2013). Moiety and Steroid Hydroxyls of Cardiotonic Steroids in Binding to Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 288, 6602-6616.
- Cornelius, F., Mahmoud, Y. A., Meischke, L., & Crambert, G. (2005). Functional significance of the shark Na, K-ATPase N-terminal domain. Is the structurally variable N-terminus involved in tissue-specific regulation by FXVD proteins? *Biochem.* 44, 13051–13062.
- Cornelius, F., Tsunekawa, N., & Toyoshima, C. (2018). Distinct pH dependencies of Na⁺/K⁺ selectivity at the two faces of Na,K-ATPase *J. Biol. Chem.* 293, 2195–2205

- Cornelius, F., Yasser, A., Mahmmoud, Y. A., & Toyoshima C. (2011). 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
- Corotto, F. S., & Holliday, C. W. (1996). Branchial (Na⁺, K⁺)-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* 113A, 361–368.
- Cortas, N., Arnaout, M., Salon, J., & Edelman, I. S. (1989). Isoforms of Na,K-ATPase in *Artemia salina*: II. tissue distribution and kinetic characterization. *J Membr. Biol.* 108, 187–195.
- Cortes, V. F., Ribeiro, I. M., Barrabin, H., Alves-Ferreira, M., & Fontes, C. F. L. (2011). Regulatory phosphorylation of FXD2 by PKC and cross interactions between FXD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na,K-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 75–82.
- Cortes, V. F., Veiga-Lopes, F. E., Barrabin, H., Alves-Ferreira, M., & Fontes, C. F. L. (2006). The gamma subunit of Na⁺,K⁺-ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1901–1913.
- Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C., & Forgac, M. (2015). Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* 40, 611–622.
- Couoh-Cardel, S., & Wilkens, S. (2015). Affinity purification and structural features of the yeast vacuolar ATPase Vo membrane sector. *J. Biol. Chem.* 290, 27959–27971.
- Crambert G., Li C. M., Swee, L. K., & Geering, K. (2004). FXD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with e regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 30888–30895.
- Crambert, G., Fuzesi, M., Garty, H., Karlsh, S., & Geering, K. (2002). Phospholemmann (FXD1) associates with Na, K-ATPase and regulates its transport properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99, 11476–11481.
- Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C. L., Modyanov, N. N., Horisberger, J. D., Lelievre, L., & Geering, K. (2000). Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. *J. Biol. Chem.* 275, 1976–1986.
- Crambert, G., Li, C., Claeys, D., & Geering, K. (2005). FXD3 (Mat-8), a new regulator of Na, K-ATPase. *Molec. Biol. Cell*, 16, 2363–2371.
- Cross, R. L. & Muller, V. (2004). Evolution of A, F and V-type ATP synthases and ATPases: reversal in function and changes in H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576, 1–4.
- D' Orazio, S. E., & Holliday, C. W. (1985). Gill Na,K-ATPase and osmorregulation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiol. Zool.* 58, 364–373.
- Da Silva N., Shum W. W., El-Annan J., Paunescu T. G., McKee M., Smith P. J., Brown, D., & Breton S. (2007). Relocalization of the V-ATPase B2 subunit to the apical membrane of epididymal clear cells of mice deficient in the B1 subunit. *Am. J. Physiol.* 293, C199–C210.
- Dalla, S., Swarts, H. G. P., Koenderink, J. B., & Dobler, S., (2013). Amino acid substitutions of Na,K-ATPase conferring decreased sensitivity to cardenolides in insects compared to mammals. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 1109–1115.
- Daly, S. E., Blostein, R., & Lane, L. K. (1997). Functional consequences of a post transfection mutation in the H2-H3 cytoplasmic loop of the alpha subunit of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 6341–6347.
- De Grave, S., & Fransen, C. H. J. M. (2011). Carideorum Catalogus: The recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zool. Medel. Leiden* 85, 195–588.
- Delprat, B., Bibert, S. & Geering, K. (2006). Les protéines FXD: nouveaux régulateurs de la Na,K-ATPase, *Med. Sci. (Paris)* 22 633–638.

- Delprat, B., Schaer, D., Roy, S., Wang, J., Puel, J. L., & Geering, K. (2007). FXVD6 is a novel regulator of Na, K-ATPase expressed in the inner ear. *J. Biol. Chem.* 282, 7450–7456.
- Dempski, R. E., Lustig, J., Friedrich, T., & Bamberg E. (2008). Structural arrangement and conformational dynamics of the γ subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem.* 47, 257-266.
- Deng, W. B., Tian, Z., Liang, X. H., Wang, B. C., Yang, F., & Yang, Z. M. (2013). Progesterone regulation of Na/K-ATPase beta1 subunit expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Theriogenol.* 79, 1196–1203
- Denne, L. B. (1968). Some aspects of osmotic and ionic regulation in the prawns *Macrobrachium australiense* (Holthuis) and *M. equidens* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 17-30.
- Despa, S., Bossuyt, J., Han, F., Ginsburg, K. S., Jia, L. G., Kutchai, H., Tucker, A. M., & Bers, D. M. (2005). Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circulation Res.* 97, 252–259.
- Diab, H., Ohira, M., Liu, M., & Kane, P. M. (2009). Subunit interactions and requirements for inhibition of the yeast V1-ATPase. *J. Biol. Chem.* 284, 13316– 13325.
- Drose, S., Bindsei, K. U., Bowman, E. J., Siebers, A., Zeeck, A., & Altendor, K. (1993). Inhibitory Effect of Modified Bafilomycins and Concanamycins on P- and V-Type Adenosinetriphosphatases. *Biochem.* 32, 3902-3906.
- Durr, K. L., Tavraz, N. N., Dempski, R. E., Bamberg, E., & Friedrich T. (2009). Functional significance of E₂ state stabilization by specific α/β -Subunit interactions of Na,K- and H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 284, 3842–3854.
- Eguchi, H., Takeda, K., Schwarz, W., Shirahata, A., & Kawamura, M. (2005). Involvement in K⁺ access of Leu³¹⁸ at the extracellular domain flanking M3 e M4 of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 611-614.
- Ehrenfeld J., & Klein U. (1997). The key role of the H⁺ V-ATPase in acid-base balance and Na⁺ transport processes in frog skin. *J. Exp. Biol.* 200, 247-256.
- Einholm, A. P., Toustrup-Jensen, M., Eersen, J. P., & Vilven, B. (2005). Mutation of Gly-94 in transmembrane segment M₁ of Na⁺, K⁺-ATPase interferes with Na⁺ e K⁺ binding in E₂P conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11254-11259.
- El-Beialy, W., Galal, N., Deyama, Y., Yoshimura, Y., Suzuki, K., Tei, K. & Totsuka, Y. (2010). Effects of estrogen on PMCA 2 and 4 in human fibroblast-like synovial cells and mouse macrophage-like cells. *Endocrinol. J.* 57, 93–97.
- Fabiato, A. (1988). Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* 157, 378-417.
- Fabri, L. M., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Moraes, C. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2019). Kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 227B, 64–74.
- Faleiros, R. O., Furriel, R. P. M., & McNamara, J. C., (2017). Transcriptional, translational and systemic alterations during the time course of osmoregulatory acclimation in two palaemonid shrimps from distinct osmotic niches. *Comp. Biochem. Physiol.* 212A, 97–106.
- Faleiros, R. O., Garçon, D. P., Lucena, M. N., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2018). Short- and long-term salinity challenge, osmoregulatory ability, and (Na⁺, K⁺)-ATPase kinetics and α -subunit mRNA expression in the gills of the thinstripe hermit crab *Clibanarius symmetricus* (Anomura, Diogenidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 225A, 16-25.
- Faleiros, R. O., Goldman M. H. S., Furriel R. P. M., & McNamara J. C. (2010). Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺- and V-ATPase activities and transporter mRNA expression

- during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Biol.* 213, 3894-3905.
- Farias, D. L. (2017). Caracterização cinética e moleculada da (Na⁺, K⁺)-ATPase do tecido branquial do caranguejo *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1985) (Tese de doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências de Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo). Recuperado de www.teses.usp.br.
- Farias, D. L., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2017). A kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)ATPase from the semi-terrestrial magrove crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825 (Decapoda, Brachyura). *J. Membr. Biol.* 250, 517-534.
- Fedosova, N. U., Cornelius, F., & Klodos I. (1998). E₂P phosphoforms of (Na⁺, K⁺)-ATPase. I: Comparison of phosphointermediates formed from ATP e Pi by their reactivity toward hydroxylamine e vanadate. *Biochem.* 37, 13634-13642.
- Feraille, E., Carranza, M. L., Gonin, S., Beguin, P., Pedemonte, C., Rousselot, M., Caverzasio, J., Geering, K., Martin, P. Y., & Favre, H. (1999). Insulin-induced stimulation of Na(+), K(+)-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol. Biol. Cell* 10, 2847-2859.
- Feraille, E., Mordasini, D., Gonin, S., Deschenes, G., Vinciguerra, M., Doucet, A., Vandewalle, A., Summa, V., Verry, F., & Martin, P. Y. (2003). Mechanism of control of (Na⁺, K⁺)-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 570-578.
- Fernandes, F., Loura, L. M. S., Fedorov, A., Dixon, N., Kee, T. P., Pietro, M., & Hemminga, M. A. (2006). Binding assays of inhibitors towards selected V-ATPase domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1777-1786.
- Feschenko, M. S., & Sweadner K. J. (1994). Conformation dependent phosphorylation of the Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269 30436-30444.
- Feschenko, M. S., & Sweadner, K. J. (1995). Structural basis for species-specific differences in the phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 14072-14077.
- Figtree, G. A., Liu, C. C., Bibert, S., Hamilton, E. J., Garcia, A., White, C. N., & Rasmussen, H. H. (2009). Reversible oxidative modification: A key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation. *Circulation Res.* 105, 185-193.
- Firmino K. C. S., Faleiros R. O., Masui D. C., McNamara J. C., & Furriel R. P. M. (2011). Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae) *Comp. Biochem. Physiol.* 160, 24-31.
- Flik G., Verboost P. M., Atsma W., Lucu C., & Wim A. (1994). Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *J. Exp. Biol.* 195, 109-122.
- Florkin, M., & Schoffeniels, E. (1969). *Molecular Approaches to Ecology*. New York: Academic Press.
- Fontes, C. F. L., Barrabin, H., Scofano, H. M., & Norby, J. G. (1992). The role of Mg²⁺ and K⁺ in the phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 215-225.
- Fontes, C. F. L., Lopes, F. E. V., Scofano, H. M., Barrabin, H., & Norby, J. G. (1999). Stimulation of ouabain binding to Na, K-ATPase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na, K-ATPase preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 215-223.
- Forbush, B. III, Kaplan, J. H., & Hoffman, J. F. (1978). Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochem.* 17, 3667-3676.

- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Mol. Cell. Biol.* 8, 917-929.
- França J. L., Pinto, M. R., Lucena, M. N., Garço, D. P., Valenti, W. C., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2013). Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Membr. Biol.* 246, 529-543.
- Frattoni, A., Orchard, P. J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J. P., Keeling, D. J., Andersson, A.-K., Wallbrandt, P., Zecca, L., Notarangelo, L. D., & Villa, A. (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature Genet.* 25, 343-346.
- Freire, C. A., & McNamara, J. C. (1995). Fine structure of the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *J. Crust. Biol.* 15, 103-116.
- Freire, C. A., Cavassin, F., Rodrigues, E. N., Torres, A. H., & McNamara J. C. (2003). Adaptive patterns of osmotic e ionic regulation, e the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp. Biochem. Physiol.* 136A, 771-778.
- Freire, C. A., Maraschi, A. C., Lara, A. F., Amado, E. M., & Prodocimo, V. (2018). Late rise in hemolymph osmolality in *Macrobrachium acanthurus* (diadromous freshwater shrimp) exposed to brackish water: early reduction in branchial Na(+)/K(+) pump activity but stable muscle HSP70 expression. *Comp. Biochem. Physiol.* 216B, 69-74.
- Freire, C. A., Onken, H., & McNamara, J. C. (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 272-304.
- Freire, C. A., Rios, L. P., Giareta, E. P., & Castellano, G. C. (2017). Oxygen consumption remains stable while ammonia excretion is reduced upon short time exposure to high salinity in *Macrobrachium acanthurus* (Caridae: Palaemonidae), a recent freshwater colonizer. *Zoologia*, 34, e20173.
- Freire, J. L., Bentes, B., Fontes, V. B., & da Silva, E. M. (2017). Morphometric discrimination among three stocks of *Macrobrachium amazonicum* in the Brazilian Amazon. *Limnologica*, 64, 1-10.
- Freschenko, M. S., & Sweadner, K. J. (1994). Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 30436-30444.
- Freschenko, M. S., & Sweadner, K. J. (1995). Structural Basis for Species-specific Differences in the Phosphorylation of Na,K-ATPase by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 14072-14077.
- Fuller, W., Howie, J., McLatchie, L. M., Weber, R. J., Hastie, C. J., Burness, K., Pavlovic, D., & Shattock, M. J. (2009). FXDY1 phosphorylation in vitro and in adult rat cardiac myocytes: Threonine 69 is a novel substrate for protein kinase C. *Amer. J. Physiol.* 296, C1346-C1355.
- Furriel R. P. M., McNamara J. C., & Leone F. A. (2001). Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 130A, 665-676.
- Furriel, R. P. M., Firmino, C. S., Masui, D. C., Faleiros R. O., Torres A. H., & McNamara J. C. (2010). Structural e biochemical correlates of (Na⁺, K⁺)-ATPase driven ion uptake across the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J. Exp. Zool.* 313A, 508-523.
- Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., & Leone F. A. (2000). Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B, 303-315.

- Furriel, R. P., Masui, D. C., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2004). Modulation of gill Na^+ , K^+ -ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J. Exp. Zool.* 301, 63–74
- Futai, M., Nakanishi-Matsui, M., Okamoto, H., Sekiya, M., & Nakamoto, R. K. (2012). Rotational catalysis in proton pumping ATPases: From *E. coli* F-ATPase to mammalian V-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1711–1721.
- Füzesi, M., Gottschalk, K. E., Lindzen, M., Shainskaya, A., Küster, B., Garty, H., & Karlsh, S. D. J. (2005). Covalent cross-links between the γ subunit (FX YD_2) and α and β -Subunits of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 280, 18291–18301.
- Gache, C., Rossi, B., & Lazdunski, M. (1976). (Na^+ , K^+)-activated adenosine triphosphatase of axonal membranes, cooperativity and control. *Eur. J. Biochem.* 65, 293–306.
- Gadsby, D. C., Bezanilla, F., Rakowski, R. F., De Weer, P., & Holmgren, M. (2012). The dynamic relationships between the three events that release individual Na^+ ions from the Na^+/K^+ -ATPase. *Nature Comm.* 3, article number 699.
- Gallo, L. C., Davel, A. P. C., Xavier, F. E., & Rossoni, L. V. (2010). Time-dependent increases in ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase activity in aortas from diabetic rats: The role of prostanoids and protein kinase C. *Life Sci.* 87, 302–308.
- Garçon, D. P., Lucena, M. N., França, J. L., McNamara, J. C., Fontes, C. F. L., & Leone, F. A. (2011). Na^+/K^+ -ATPase Activity in the Posterior Gills of the Blue Crab, *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura): Modulation of ATP Hydrolysis by the Biogenic Amines Spermidine and Spermine. *J. Membr. Biol.* 244, 9–20.
- Garçon, D. P., Lucena, M. N., Gonçalves, R. R., Pinto, M. R., McNamara, J. C., & Leone F. A. (2012). K^+ -phosphatase activity of the gill (Na^+ , K^+)-ATPase from the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*: Kinect characterization of the substrate and cation-binding sites. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 16, 71–83.
- Garçon, D. P., Lucena, M. N., Pinto, M. R., Fontes, C. F. L., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2013). Synergistic stimulation by potassium and ammonium of K^+ -phosphatase activity in gill microsomes from the crab *Callinectes ornatus* acclimated to low salinity: Novel property of a primordial pump. *Arch. Biochem. Biophys.* 530, 53–63.
- Garçon, D. P., Masui, D. C., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Furriel, R. P. M., & Leone, F. A. (2007). K^+ and NH_4^+ modulate gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 145–155.
- Garçon, D. P., Masui, D. C., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Furriel, R. P. M., & Leone, F. A. (2009). Hemolymph ionic regulation e adjustments in gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 154A, 44–55.
- Garty, H., & Karlsh, S. J. D. (2006). Role of FX YD proteins in ion transport. *Ann. Review Physiol.* 68, 431–459.
- Geering, K. (2000). Topogenic motifs in P-type ATPases. *J. Membr. Biol.* 174, 181–190.
- Geering, K. (2005). Function of FX YD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 387–392.
- Geering, K. (2006). FX YD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.* 290, F241–F250.
- Geering, K. (2008). Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17, 526–532.
- Genovese, G., Luchetti, C. G., & Luquet, C. M. (2004). Na^+/K^+ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper- hypo-regulating crab *Neohelice granulatus* acclimated to dilute, normal and concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144, 111–118.

- Genovese, G., Ortiz, N., Urcola, M. R., & Luquet, C. M. (2005). Possible role of carbonic anhydrase, V-H(+)-ATPase, and Cl(-)/HCO₃⁻ exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142A, 362-369.
- Gilles, R., & Péqueux, A. (1985). *Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches*. In: R. Gilles, & M. Gilles-Baillien(Org.). *Transport processes, ionic- and osmoregulation: Current comparative approaches*. (pp136-158). Berlin, Alemanha: Springer-Verlag.
- Glynn, I. M. (1985). *The (Na⁺, K⁺)-transporting adenosine triphosphatase*. In: A. N. Martonosi (Org.). *The enzymes of biological membranes*. V. 3 (pp. 35-114). Plenum Press, New York.
- Glynn, I. M. (2002). A hundred years of sodium pumping. *Review Physiol.* 64, 1-18.
- Gocheva, V., Joyce, J., & Johanna, A. (2007). Cysteine Cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, 60-64.
- Gonçalves, R. R., Masui, D. C., McNamara, J. C., Mantelatto, F. L. M., Garçon, D. P., Furriel, R. P. M., & Leone, F. A. (2006). A kinetic study of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase, and its role in ammonia excretion in the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145A, 346-356.
- Goodman, S. H., & Cavey, M. J. (1990). Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 260, 495- 505.
- Goodsell, G. (2009). Molecule of the Month: Sodium-potassium pump. Educational Portal of Protein Data Bank. PDB-101. DOI: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2009_10.
- Gregersen, J. L., Mattle, D., Fedosova, N. U., Nissen, P., & Reinhard, L. (2016). Isolation, Crystallization and Crystal Structure Determination of Bovine Kidney Na(+),K(+)-ATPase. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 72, 282–287.
- Grubmeyer, C., & Penefsky, H. S. (1981). The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 256, 3718–3727.
- Gruenberg, J., & Van Der Goot, F. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 7, 495-504.
- Guest, W. C. (1979). Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 37, 141-152.
- Han, F., Bossuyt, J., Martin, J. L., Despa, S., & Bers, D. M. (2010). Role of phospholemman phosphorylation sites in mediating kinase-dependent regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase. *American Journal of Physiology. Cell Physiol.* 299, C1363–C1369.
- Hansen, O. (2003). No evidence for a role in signal-transduction of Na(+)/K(+)-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. *Eur. J. Biochem.* 270, 1916-1919.
- Harris, R. R., & Bayliss, D. (1988). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na⁺ regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 303-308.
- Harris, R. R., & Santos, M. C. F. (1993). Sodium uptake and transport (Na⁺, K⁺)-ATPase changes following Na⁺ depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 35–42.
- Hasler, U., Crambert, G., Horisberger, J. D., & Geering, K. (2001). Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase b subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* 276, 16356-16364.
- Hayd L., & Anger, K. (2013). Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Rev. Biol. Trop. (Int J Trop Biol)* 61, 39-57.

- Hayd, L. A., Anger, K., & Urzúa, A. (2017). Growth, elemental and proximate biochemical composition of larval Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*, reared under different salinity conditions. *Lat. Amer. J. Aquatic Res.* 45 (5), 983-991.
- Hayd, L., Lemos, L., & Valenti., WC. (2014). Effects of ambient nitrite on Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*, larva. *J. World Aquacult. Soc.* 45, 55-64.
- Hayek, S. R., Rane, H. S. & Parra, K. J. (2019). Reciprocal Regulation of V-ATPase and Glycolytic Pathway Elements in Health and Disease. *Front. Physiol.* 10:127.
- Hebert, H., Purhonen, P., Thomsen, K., Vorum, H., & Maunsbach, A. B. (2003). Renal Na,K-ATPase Structure from Cryo-electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 9-16.
- Heller, C. (1862). Beiträge zur näheren Kenntniss der Macrouren. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien*, 45, 389-425.
- Henry, R. P. (1988a). Subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gill of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 245, 1-8.
- Henry, R. P. (1988b). Multiple functions of gill carbonic anhydrase. *J. Exp. Zool.* 248, 19-24.
- Henry, R. P., & Wheatly, M. G. (1992). Interaction of respiration ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32, 407-416.
- Henry, R. P., Lucu, C., Onken, H., & Weihrauch, D. (2012). Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front. Physiol.* 3, article number 431.
- Henry, R. P., Garrelts, E. E., McCarty, M. M., & Towle, D. W. (2002). Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J. Exp. Zool.* 292:7, 595-603.
- Hilario, E., & Gogarten, J. P. (1998). The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits, *J. Mol. Evol.* 46, 703-715.
- Hilbers, F., Kopec, W., Isaksen, T. J., Holm, T. H., Lykke-Hartmann, K., Nissen, P., Khandelia, H., & Poulsen, H. (2016). Tuning of the Na,K-ATPase by the b subunit. *Sci. Rep.* 6:20442.
- Hirata, R., Graham, L. A., Takatsuki, A., Stevens, T. H., & Anraku, Y. (1997). VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 4795-4803.
- Holliday, C. W. (1985). Salinity-induced changes in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the mud fiddler crab *Uca pugnax*. *J. Exp. Zool.* 233, 199-208.
- Holm, R., Toustrup-Jensen, M. S., Einholm, A. P., Schack, V. R., Andersen, J. P., & Vilsen, B. (2016). Neurological disease mutations of $\alpha 3$ Na⁺, K⁺-ATPase: Structural and functional perspectives and rescue of compromised function. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1807-1828.
- Holthuis, L. B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae. Occasional Paper 12. Allan Hancock Foundations Publications. 396 p.
- Horisberger, J. D. (2004). Recent insights into the structure e mechanism of the sodium pump. *Physiol.* 19, 377-388
- Horiuchi, S. (1977). Characterization of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in the freshwater crayfish, *Procambarus clarki* (Girard). *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 135-138.
- Howarth, C., Gleeson, P., & Attwell, D. (2012). Updated energy bud gets for neural computation in the neo cortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1222-1232.
- Huang, Y. -H., Zhang, M., Li, Y. -M., Wu, D. -L., Liu, Z. -Q., Jiang, Q. -C., & Zhao, Y. -L. (2019). Effects of salinity acclimation on the growth performance, osmoregulation and

- energy metabolism of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquatic Res.* 50, 685–693.
- Huss, M., & Weczorek M. (2009). Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J. Exp. Biol.* 212, 341-346.
- Imagawa, T., Yamamoto, T., Kaya, S., Sakaguchi, K., & Taniguchi, K. (2005). Thr-774 (Transmembrane Segment M5), Val-920 (M8), e Glu-954 (M9) are involved in Na⁺ transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na,K-ATPase Activity. *J. Biol. Chem.* 280, 18736-18744.
- Ituarte, R. B., Lignot, J. H., Charmantier, G., Spivak, E., & Lorin-Nebel, C. (2016). Immunolocalization and expression of Na⁺/K⁺-ATPase in embryos, early larval stages and adults of the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Cell Tissue Res.* 364, 527–541.
- Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., Yokoyama, K., & Iwata, S. (2004). Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 59–64.
- Jalihal D. R., Shenoy S., & Sankolli K. N. (1981). Adaptational significance of salinity tolerance in some freshwater prawns. *Proc. Symp. Ecol. Anim. Popul. Zool. Surv. India* 2, 175-187.
- Jalihal, D. R., Sankolli, K. N., & Shenoy S. (1993). Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 65, 365-376.
- Jayasundara, N., Towle, D. W., Weihrauch, D., & Spanings-Pierrot C. (2007). Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants e promoter structure. *J. Exp. Biol.* 210, 2070-2081.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J., & Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 33–42.
- Jimenez, T., Sanchez, G., Wertheimer, E., & Blanco, G. (2010) Activity of the Na,K-ATPase α 4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca²⁺, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. *Reproduction* 139, 835-845.
- Jimenez, T., Sanchez, G., McDermott, J. P., Nguyen, A. N., Kumar, T. R., & Blanco, G. (2011). Increased expression of the Na,K-ATPase alpha4 isoform enhances sperm motility in transgenic mice. *Biol. Reproduction* 84, 153–161.
- Jorgensen, P. L., Nielsen, J. M., Rasmussen, J. H., & Pedersen, P. A (1998). Structure-function relationships of E-1-E-2 transitions e cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 65-70.
- Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O., & Karlsh, S. J. D. (2003). Structure and mechanism of functional sites and their interactions. *Ann. Review Physiol.* 65, 817-849.
- Juel, C. (2014). Oxidative stress (glutathionylation) and Na, K-ATPase activity in rat skeletal muscle. *PLoS One* 9, e110514.
- Juel, C., Hostrup, M., & Bangsbo, J. (2015). The effect of exercise and beta2-adrenergic stimulation on glutathionylation and function of the Na, K-ATPase in human skeletal muscle. *Physiol. Reports* 3(8), e12515.
- Kanai, R., Ogawa, H., Vilsen, B., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2013). Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1 state. *Nature*, 502, 201-207.
- Kane, P. M. (2006). The where, when and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Review* 70, 177–191.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Ann. Review Biochem.* 71, 511-35.

- Karitskaya, I., Aksenov, N., Vassilieva, I., Zenin, V., & Marakhova, I. (2010). Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. *Eur. J. Physiol.* 460, 777–789.
- Karlish, S. J. (2003). Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 39–49.
- Kaufmann, E., Geisler, N., & Weber, K. (1984). SDS PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. *FEBS Lett.* 170, 81–84.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., & Forgac, M. (2001). Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa α -subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* 276, 17941–17948.
- Khalaf, F. K., Dube, P., Mohamed, A., Tian, J., Malhotra, D., Haller, S. T., & Kennedy, D. J. (2018). Cardiotoxic Steroids and the Sodium Trade Balance: New Insights into Trade-Off Mechanisms Mediated by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2576.
- Khalid, M., Suliman, R., Ahmed, R., Salin, H., & Clarke, R. J. (2014). The high and low affinity binding sites of digitalis glycosides to Na,K-ATPase. *Arab. J. Sci. Eng.* 39, 75-85.
- Kirschner, L. B. (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207, 1439-1452.
- Knepper, M. A., Packer, R., & Good, D. W. (1989). Ammonium transport in the kidney. *Physiol. Review* 69, 179-249.
- Kosiol, B., Bigalke, T., & Graszynski, K. (1988). Purification e characterization of gill Na⁺,K⁺-ATPase in the freshwater crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B, 171-177.
- Kurihara, K., Nakanishi, N., & Ueha, T. (2000). Regulation of Na⁺K⁺-ATPase by cAMP-dependent protein kinase anchored on membrane via its anchoring protein. *Am. J. Physiol.* 279, C1516–C1527.
- Kutty, M. N. (2005). Towards sustainable freshwater prawn aquaculture – lessons from shrimp farming, with special reference to India. *Aquacult. Res.* 36, 255-263.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lai, F. F., Madan, N., Ye, Q. Q., Duan, Q. M., Li, Z. C., Wang, S. M., Si, S., & Xie, Z. J. (2013). Identification of a mutant $\alpha 1$ Na/K-ATPase that pumps but is defective in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 288, 13295-13304.
- Lang, F., & Waldegger, S. (1997). Regulating cell volume. *Am. Sci.* 85, 456-463.
- Laughery, M. D., Todd, M. L., & Kaplan J. H. (2003). Mutational analysis of alpha-beta subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 34794-34803.
- Laursen, M., Gregersen, J. L., Yatime, L., Nissen, P., & Fedosova, N. U. (2015). Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺, K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 1755–1760.
- Laursen, M., Yatime, L., Nissen, P., & Fedosova N. U. (2013). Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase–ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 110, 10958–10963.
- Lecuona, E., Sun, H., Chen, J., Trejo, H. E., Baker, M. A., & Sznajder, J. I. (2013). Protein Kinase A-Ia Regulates Na,K-ATPase Endocytosis in Alveolar Epithelial Cells Exposed to HighCO₂ Concentrations. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 48, 626–634.
- Lee, C. E., & Bell, M. A. (1999). Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends Ecol. Evol.* 4, 284-288
- Lee, C. E., Kiergaard, M., Gelembiuk, G. W., Eads, B. D., & Posavi, M. (2011). Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65, 2229-2244.

- Leone, F. A., Baranauskas, J. A., Furriel, R. P. M., & Borin, I. A. (2005b). SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 33, 399-403.
- Leone, F. A., Bezerra, T. M. S., Garçon, D. P., Lucena, M. N., Pinto, M. R., Fontes C. F. L., & McNamara, J. C. (2014). Modulation by K^+ plus NH_4^+ of microsomal (Na^+ , K^+)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the diadromous river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *PLOS ONE*, 9, issue 2, e89626
- Leone, F. A., Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., Mantelatto, F. L. M., Masui, D. C., Alves, L. R., Gonçalves, R. R., & Garçon, D. P. (2005a). (Na^+ , K^+)-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular marker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 11, 1-15.
- Leone, F. A., Garçon, D. P., Lucena, M. N., Faleiros, R. O., Azevedo, S. V., Pinto, M. R., & McNamara, J. C. (2015b). Gill-specific (Na^+ , K^+)-ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-salinity acclimation of the ornate blue crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 186B, 59-67
- Leone, F. A., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Pinto, M. R., & McNamara, J. C. (2017). *Gill ion transport ATPases and ammonia excretion in aquatic crustaceans*. In: D. Weihrauch, & M. J. O'Donnell (Eds.). *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates - Mechanisms and Strategies in various Invertebrate Groups with Considerations of Challenges caused by Ocean Acidification* (pp. 61-107). Springer International Publishing AG Cham Switzerland.
- Leone, F. A., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Pinto, M. R., & McNamara, J. C. (2013). Gill (Na^+ , K^+)-ATPase in the diadromous palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Kinetic characterization of K^+ -phosphatase activity in juveniles and adults. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 17, 13-28.
- Leone, F. A., Lucena, M. N., Rezende, L. A., Garçon, D. P., Pinto, M. R., Mantelatto, F. L. M., & McNamara, J. C. (2015a). Kinetic characterization and immunolocalization of (Na^+ , K^+)-ATPase activity from gills of the marine seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). *J. Membr. Biol.* 248, 257-272.
- Leone, F. A., Masui, D. C., Bezerra, T. M. S., Garçon, D. P., Valenti, W. C., Augusto, A. S., & McNamara, J. C. (2012). Kinetic analysis of gill (Na^+ , K^+)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the Amazon river shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): Interactions at ATP- and cation-binding sites. *J. Membr. Biol.* 245, 201-215.
- Levenson, R. (1994). Isoforms of the Na,K-ATPase – Family members in search of function. *Review Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123, 1-45.
- Li, Z., & Langhans, S. A. (2015). Transcriptional regulators of Na, K-ATPase subunits. *Front. Cell Develop. Biol.*, 3, 66.
- Lima, A. G., McNamara, J. C., & Terra, W. R. (1997). Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na^+/K^+ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 215, 81-91.
- Lingrel, J. B. (2010). The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Ann. Review Physiol.* 72, 395-412.
- Lingrel, J., Moseley, A., Dostanic, I., Cougnon, M., He, S. W., James, P., O'Connor, K., Woo, A. & Neumann, J. (2003). Functional roles of the α isoforms of the (Na^+ , K^+)-ATPase. *Ann. NY Acad. Sci.* 986, 354-359.
- Liu, C. C., Garcia, A., Mahmmoud, Y. A., Hamilton, E. J., Galougahi, K. K., Fry, N. A., Figtree, G. A., Cornelius, F., Clarke, R. J., & Rasmussen, H. H. (2012). Susceptibility of beta1 Na^+ - K^+ pump subunit to glutathionylation and oxidative inhibition depends on conformational state of pump. *J. Biol. Chem.* 287, 12353–12364.

- Liu, J., & Xie, Z. J. (2010). The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 1237–1245.
- Liu, M. Y., Cai, Y. X., & Tzeng, C. S. (2007). Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zool. Stu.* 46, 272–289.
- Lopez, L. B., Quintas, L. E. M., & Noel, F. (2002). Influence of development on Na⁺/K⁺-ATPase expression: isoform- e tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol.* 131A, 323–333.
- Lovett, D. L., Colella, T., Cannon, A. C., Lee, H., Evangelisto, A., Muller, E. M., & Towle, D. W. (2006). Effect of Salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* 210, 132–139.
- Lubarski, I., Karlsh, S. J. D., & Garty H. (2007). Structural e functional interactions between FXVD5 and the Na⁺-K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol.* 293, F1818–F1826.
- Lucas, T. F. G., Amaral, L. S., Porto, C. S., & Quintas, L. E. M. (2012). Na⁺/K⁺-ATPase a1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells. *Reproduction* 144, 737–745.
- Lucena, M. N., Fabri, L. M., Fontes, C. F. L., Faleiros, R. O., Moraes, C. M., Garçon, D. P., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2019b). Osmotic and ionic regulation and the effect of salinity on modulation by ATP, FXVD2 peptide and protein kinases of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). Submetido.
- Lucena, M. N. (2014). *Macrobrachium amazonicum*, um invasor recente da água doce: papel da (Na,K)-ATPase na ontogenia e osmorregulação. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo). Recuperado de www.teses.usp.br.
- Lucena, M. N., Garçon, D. P., Fontes, C. F. L., Fabri, L. M., Moraes, C. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2019a). Dopamine binding directly up-regulates (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 233A, 39–47.
- Lucena, M. N., Garçon, D. P., Mantelatto, F. F. M., Pinto, M. R., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2012). Hemolymph ion regulation and kinetic characteristics of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda, Anomura) acclimated to high salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 161, 380–391.
- Lucena, M. N., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2017a). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous biogenic amines on enzyme activity in juveniles and adults. *Hydrobiol.* 789, 59–76.
- Lucena, M. N., Pinto, M. R., Garçon, D. P., Fontes, C. F. L., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2017b). Polyamines regulate phosphorylation-dephosphorylation kinetics in a crustacean gill (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Mol. Cell Biochem.* 429, 187–198.
- Lucena, M. N., Pinto, M. R., Garçon, D. P., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2015). A kinetic characterization of the gill V(H⁺)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a diadromous palaemonid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 181B, 15–25.
- Lucu, C., & Towle, D. W. (2003). (Na⁺, K⁺)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A, 195–214.
- Lucu, C., Devescovi, M., & Siebers, D. (1989). Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? *J. Exp. Zool.* 249, 1–5.

- Lucu, C., Devescovi, M., Skaramuca, B., & Kozul, V. (2000). Gill NaK-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 163-178.
- Lucu, C., Pavičić, J., Ivanković, D., Pavičić-Hamer, D., & Najdek, M. (2008). Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A, 362-372.
- Luquet, C. M., Weihrauch D., Senek M., & Towle D. W. (2005). Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Neohelice granulatus*. *J. Exp. Biol.* 208, 3627–3636.
- Macías, M. T., Palmero, I., & Sastre, L. (1991). Cloning of a cDNA encoding an *Artemia franciscana* α -subunit. *Gene* 105, 197-204.
- Maciel C. R., & Valenti, W. C. (2009). Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius*, 17, 61-79.
- MacLeod, K. J., Vasilyeva, E., Baleja, J. D., & Forgac, M. (1998). Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 150–156.
- Maegawa, Y., Morita, H., Iyaguchi, D., Yao, M., Watanabe, N. & Tanaka, I. (2006). Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel domain related to the peripheral stalk. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 483–488.
- Magalhães, C. (1985). The larval development of palaemonids from amazon region reared in the laboratory. 1. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). *Amazoniana-Limnologia et oecologia regionalis systemae fluminis amazonas* 9, 247-274.
- Magalhães, C. (1999). *Diversity and abundance of decapods crustaceans in the rio Tahuamanu and rio Manuripi basins*. In: B. Chernoff & P. W. Willink (Org.) *A Biological Assessment of the Aquatic Ecosystems of the Upper Río Orthon Basin, Pando, Bolivia: RAP Bulletin of Biological Assessment* 15. (pp. 35–38) Conservation International, Washington, DC.
- Magalhães, C. (2000). *Diversity and abundance of decapod crustaceans in the Rio Negro basin, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil*. In: B. Chernoff, L. E. Alonso, J. R. Montambault & R. Lourival (Org.) *A Biological Assessment of the Aquatic Ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. RAP Bulletin of Biological Assessment* 18 (pp. 56–62). Conservation International, Washington, DC.
- Magalhães, C., Bueno, S. L. S., Bond-Buckup, G., Valenti, W. C., Silva, H. L. M., Kiyohara, F., Mossolin, E. C., & Rocha, S. S. (2005). Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. *Biodiversity Conservation* 14, 1929-1945.
- Maher, M. J., Akimoto, S., Iwata, M., Nagata, K., Hori, Y., Yoshida, M., Yokoyama, S., Iwata, S., & Yokoyama, K. (2009). Crystal structure of A3B3 complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J* 28, 3771–3779.
- Mahmmoud, Y. A., Cramb, G., Maunsbach, A. B., Cutler, C. P., Meischke, L., & Cornelius, F. (2003). Regulation of Na,K-ATPase by PLMS, the phospholemman-like protein from shark: Molecular cloning, sequence, expression, cellular distribution, and functional effects of PLMS. *J. Biol. Chem.* 278, 37427–37438.
- Mahmmoud, Y. A., Vorum, H., & Cornelius, F. (2000). Identification of a phospholemman like protein from shark rectal glands. Evidence for indirect regulation of Na, K-ATPase by protein kinase c via a novel member of the FXYDY family. *J. Biol. Chem.* 275, 35969–35977.

- Maia, J. C. C., Gomes, S. L., Juliani, M. H., & Morel, C. M. (1983). *Laboratory manual proceedings*. In: C. M. Morel (Org.), *Genes and Antigens of Parasites* (pp. 144–157). FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
- Malkus, P., Graham, L. A., Stevens, T. H., & Schekman, R. (2004). Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase. *Mol. Biol. Cell* 15, 5075–5091.
- Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., & Jones, E. W. (1994). STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H-ATPase subunit Vph1p. *J. Biol. Chem.* 269, 14064–14074.
- Mantel L. H., & Farmer L. L. (1983). *Osmotic and ionic regulation*. In: L. H., Mantel (Org.) *The Biology of the Crustacea*, vol 5 (pp 53–161). Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York.
- Maraschi, A. C., Freire, C. A., & Prodocimo, V. (2015). Immunocytochemical localization of V H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Zool.* 323, 414–421.
- Marks, M. J., & Seeds, N. W. (1978). A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci.* 23, 2735–2744.
- Marques, H. L. A., & Moraes-Valenti, P. M. C. (2012). Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) and the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862)) in Brazil. *Aquacult. Res.* 43, 984–992.
- Marshansky V., & Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 415–426.
- Marshansky, V., Rubinstein, J. L., & Grüber, G. (2014). Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 857–879.
- Martin, D. W. (2005). Structure-Function. Relationships in the Na⁺,K⁺-Pump. *Seminars Nephrol.* 198, 282–291.
- Martinez, A. S., Charmantier, G., Compère, P., & Charmantier-Daures, M. (2005). Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue Cell* 37, 153–165.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., Mantelatto, F. L. M., & Leone, F. A. (2002). Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 132C, 471–482.
- Masui, D. C., Furriel, R. P., M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2005b). K⁺-Phosphatase Activity of Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase From the Blue Crab, *Callinectes danae*: Low-Salinity Acclimation and Expression of the *a*-Subunit. *J. Exp. Zool.* 303A, 294–307.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2003). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K⁺-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 631–640.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Silva E. C., Mantelatto, F. L. M., McNamara J. C., Barrabin H., Scofano, H., Fontes, C. F. L., & Leone, F. A. (2005a). Gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2521–2535.
- Masui, D. C., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Furriel, R. P. M., & Leone, F. A. (2009). (Na⁺, K⁺)-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.

- Masui, D. C., Silva, E. C. C., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Barrabin H., Scofano, H., Fontes, C. F. L., Furriel, R. P. M., & Leone F. A. (2008). The crustacean gill (Na⁺, K⁺)-ATPase: Allosteric modulation of high- and low-affinity ATP-binding sites by sodium and potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 479, 139–144.
- Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Review Mol. Cell Biol.* 5, 121–132.
- Mazzarelli, C. C. M., Santos, M. R., Amorim, R. V., & Augusto, A. (2015). Effect of salinity on the metabolism and osmoregulation of selected ontogenetic stages of an amazon population of *Macrobrachium amazonicum* shrimp (Decapoda, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.* 75, 372-379
- McNamara, J. C., & Lima, A. G. (1997). The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes Induced by acclimation to saline media. *Biol. Bull.* 192, 321-331.
- McNamara, J. C., & Faria, S. C. (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J. Comp. Physiol.* 182: 997-1014.
- McNamara, J. C., & Moreira, G. S., (1987). O₂ consumption and acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): whole animal and tissue respiration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113, 221–230.
- McNamara, J. C., & Torres, A. H. (1999). Ultracytochemical location of Na⁺/K⁺-ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Zool.* 284, 617-628.
- McNamara, J. C., Moreira, G. S., & Moreira, P. S. (1983). The effect of salinity on respiratory metabolism, survival and moulting in the first zoea of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Palaemonidae). *Hydrobiol.* 101, 239-242
- McNamara, J. C., Rosa, J. C., Greene, L. J., & Augusto, A. (2004). Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 37, 193-208.
- Meier, S., Tavraz, N. N., Durr, K. L., & Friedrich, T. (2010). Hyperpolarization-activated inward leakage currents caused by deletion or mutation of carboxy-terminal tyrosines of the Na⁺/K⁺-ATPase α subunit. *J. Gen. Physiol.* 135, 115–134.
- Meireles, A. L., Valenti, W. C., & Mantelatto, F. L. (2013). Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae): influence of life cycle on egg production. *Lat. Am. J. Aquatic Res.* 41, 718-731.
- Melo, G. A. S. (2003). *Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae*. In: G. A. S. Melo (Org.) *Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil*. (pp. 289-415) São Paulo, Brasil. Loyola.
- Mendonça, N. N., Masui, D. C., McNamara, J. C., Leone, F. A., & Furriel, R. P. M. (2007). Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na⁺,K⁺)-ATPase a subunit expression and K⁺-phosphatase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 146A, 534–543.
- Middleton, D. A., Hughes, E., & Esmann, M. (2011). The Conformation of ATP within the Na,K-ATPase Nucleotide Site: A Statistically Constrained Analysis of REDOR Solid-State NMRData. *Angew. Chem. Int.* 50, 7041 –7044.
- Middleton, J. P., Khan, W. A., Collinsworth, G., Hannun, Y. A., & Medford, R. M. (1993). Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 268, 15958–15964.

- Mijatovic, T., van Quaquebeke, E., Delest, B., Debeir, O., Darro, F., & Kiss, R. (2007). Cardiotonic steroids on the road to anticancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1776, 32-57.
- Miles, A. J., Fedosova, N. U., Hoffmann, S. V., Wallace, B. A., & Esmann, M. (2013). Stabilisation of Na,K-ATPase structure by the cardiotonic steroid ouabain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 435, 300-305.
- Mishra, N. K., Peleg, Y., Cirri, E., Belogus, T., Lifshitz, Y., Voelker, D. R., Apell, H.-J., Garty, H., & Karlisch, S. J. D. (2011). FXYD proteins stabilize Na,K-ATPase amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 286, 9699-9712.
- Mladinov, D., Liu, Y., Mattson, D. L., & Liang, M. (2013). Micro RNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase. *Nucleic Acid Res.* 41, 1273-1283.
- Mobasher, A., Avila, J., Cozar-Castellano, I., Brownleader, M. D., Trevan, M., Francis, M. J. O., Lamb, J. F., & Martin-Vasallo, P. (2000). (Na⁺, K⁺)-ATPase isozyme diversity, Comparative biochemistry e physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51-91.
- Montes, M. R., Monti, J. L. E., & Rossi, R. C. (2012). E2→E1 transition and Rb⁺ release induced by Na⁺ in the Na⁺/K⁺-ATPase. Vanadate as a tool to investigate the interaction between Rb⁺ and E2. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2087-2093.
- Monti J. L. E., Montes M. R., & Rossi, R. C. (2013). Alternative cycling modes of the Na⁺/K⁺-ATPase in the presence of either Na⁺ or Rb⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1374-1383.
- Montoya, J. V. (2003). Freshwater shrimps of the genus *Macrobrachium* associated with roots of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). *Caribbean J. Sci.* 39, 155-159.
- Moraes, C. M. (2019). *Goniopsis cruentata*: Caracterização cinética e bioquímica da (Na⁺, K⁺)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de mRNA (Dissertação de Mestrado não publicada). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Moraes-Riodades, P. M. C., & Valenti, W. C. (2004). Morphotypes in male Amazon River Prawns, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult.* 236, 297-307.
- Moraes-Riodades, P. M. C., & Valenti, W. C. (2001). Freshwater prawn farming in Brazilian Amazonia shows potential for economic social development. *Global Aquacult. Advoc.* 4, 73-74.
- Moraes-Valenti, P. M. C., & Valenti, W. C. (2010). *Culture of the Amazon River Prawn Macrobrachium amazonicum*. In: M. B. New, W. C. Valenti, J. H. D. Tidwel, L. R. Abramo, & M. N. Kutty (Org.) *Freshwater prawns: biology and farming* (pp. 485-501). Oxford, Wiley- Blackwell.
- Moraes-Valenti, P. M. C., & Valenti, W. C. (2007). Effect of intensification on grow-out of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *J. World Aquacult. Soc.* 38:516-26.
- Moreira, G. S., McNamara, J. C., & Moreira, P. S. (1986). The effect of salinity on the upper thermal limits of survival and metamorphosis during larval development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 50, 231-238.
- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Moreira, P. S. & Shumway, S. E. (1981). Osmoregulation em *Macrobrachium acanthurus* e *Macrobrachium carcinus* (Decapoda: Palaemonidae). *Ciência e Cultura* 33, 626.

- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Shumway, S. E., & Moreira, P. S. (1983). Osmoregulation and respiratory metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 74A, 57-62.
- Morris, S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapods crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979-989.
- Morris, S., & van Aardt, W. J. (1998). Salt and water relations, and nitrogen excretion, in the amphibious African freshwater crab *Potamonautes warreni* in water and in air. *J. Exp. Biol.* 201, 883-893.
- Morth, J. P., & Hein K. L. (2013). Listeria Monocytogenes Lmo0818-Exploring a Putative Ca^{2+} -ATPase, to Understand Calcium Ion Specificity. *Biophys. J.* 104, 300A-300A.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na^+ , K^+ -ATPase and H^+ -ATPase ion pumps. *Nature Mol. Cell Biol.* 60, 60-70.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sorensen, T. L. M., Petersen, J., Anderssen, J. P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450, 1043-1050.
- Morth, J. P., Poulsen, J., Toustrup-Jensen, M. S., Schack, V. R., Egebjerg, J., Andersen, J. P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2009). The structure of the Na^+ , K^+ -ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Phil. Trans. Royal Soc. Biol. Sci.* 364, 217-227.
- Moshtaghi, A., Rahi, L., Mather, P. B., & Hurwood, D. A. (2018). An investigation of gene expression patterns that contribute to osmoregulation in *Macrobrachium australiense*: Assessment of adaptive responses to different osmotic niches. *Gene Reports*, 13, 76-83.
- Moshtaghi, A., Rahi, M. L., Mather, P. B., & Hurwood, D. A., (2017). Understanding the genomic basis of adaptive response to variable osmotic niches in freshwater prawns: a comparative intraspecific RNA-Seq analysis of *Macrobrachium australiense*. *J. Hered.* 108, 544-552.
- Müller, O., Bayer, M. J., Peters, C., Andersen, J. S., Mann, M., & Mayer, A. (2002). The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V_0 trans-complex formation. *EMBO J.* 21, 259-269.
- Murata, Y., Sun-Wada, G. H., Yoshimizu, T., Yamamoto, A., Wada, Y., & Futai, M. (2002). Differential localization of the vacuolar H^+ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 36296-36303.
- Murphy, N. P., & Austin, C. M. (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zool. Scri.* 34, 187-197.
- Myers, S. L., Cornelius, F., Apell, H. J., & Clarke, R. J. (2011). Kinetics of K^+ occlusion by the phosphoenzyme of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Biophys. J.* 100, 70-79.
- Nagamatsu, Y., Takeda, K., Kuranaga, T., Numoto, N., & Miki, K. (2013). Origin of asymmetry at the intersubunit interfaces of V_1 -ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* 425, 2699-2708
- Nakano, M., Imamura, H., Toei, M., Tamakoshi, M., Yoshida, M., & Yokoyama, K. (2008). ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 283, 20789-20796.
- Nesher, M., Spolansky, U., Rosen, H., & Lichtstein, D. (2007). The endogenous digitalis-like compounds - A new family of steroid hormones. *Life Sci.* 80, 2093-2107.
- Neufeld, G. J., Holliday, C. W., & Pritchard, J. B. (1980). Salinity adaptation of gill (Na^+ , K^+)-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215-224.

- New, M. B. (2005). Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquacult. Res.* 36, 210-230.
- Nishi T., & Forgac, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nature Review Mol. Cell Biol.* 3, 94–103.
- Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., & Forgac M. (2003). Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms. *J. Biol. Chem.* 278, 46396–46402.
- Numoto, N., Hasegawa, Y., Takeda, K., & Miki, K. (2009). Inter-subunit interaction and quaternary rearrangement defined by the central stalk of prokaryotic V1-ATPase. *EMBO Rep.* 10, 1228–1234.
- Nyblom, M., Poulsen, H., Gourdon, P., Reinhard, I., & Andersson, M. (2013). Crystal structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state. *Science* 342, 123-127.
- Obradovic, M., Stanimirovic, J., Panic, A., Bogdanovic, N., Sudar-Milovanovic, E., Cenic-Milosevic, D., & Isenovic, E. R. (2017). Regulation of Na⁺/K⁺-ATPase by Estradiol and IGF-1 in Cardio-Metabolic Diseases. *Curr.Pharm. Design*, 23, 1551-1561.
- Odinetz-Collart, O., & Rabelo, H. (1996). Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *J. Crust. Biol.* 16, 684-688.
- Ogawa, H., Cornelius, F., Hirata, A., & Toyoshima, C. (2015). Sequential substitution of K(+) bound to Na(+),K(+)-ATPase visualized by X-ray crystallography. *Nature Commun.* 6, 8004.
- Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium e ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 166, 13742–13747.
- Ohira, M., Sardon, A. M., Charsky, C. M., Liu, J., Tarsio, M., & Kane, P. M. (2006). The E and G subunits of the yeast V-ATPase interact tightly and are both present at more than one copy per V1 complex. *J. Biol. Chem.* 281, 22752–22760.
- Onken, H., & Riestenpatt, S. (1998). NaCl absorption across split gill lamellae of hyper regulating crabs, transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 883–893.
- Onken, H., & McNamara, J. C. (2002). Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J. Exp. Biol.* 205, 167-175.
- Onken, H., & Putzenlechner, M. (1995). A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* 198, 767-774.
- Onken, H., Schobel, A., Kraft, J., & Putzenlechner, M. (2000). Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*: stimulation by eyestalk extract. *J. Exp. Biol.* 203, 1373-1381
- Onken, K. (1996). Active and electrogenic absorption of Na⁺ and Cl⁻ across posterior gills of *Eriocheir sinensis*: influence of short-term osmotic variations. *J. Exp. Biol.* 199, 901-910.
- Oot, R. A., & Wilkens, S. (2012). Subunit interactions at the V₁-V_o interface in yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 287, 13396-13406.
- Ordiano, A., Alvarez, F., & Alcaraz, G. (2005). Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtleense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 78, 1013–1022.
- Orlov, S. N., La, J., Smolyaninova, L. V., & Dulin, N. O. (2019). Na⁺,K⁺-ATPase as a Target for Treatment of Tissue Fibrosis. *Curr. Med. Chem.* 26, 564-575.
- Osteresch, C., Bender, T., Grond, S., Zezschwitz, P., Kunze, B., Jansen, R., Huss, M., & Wieczorek, H. (2012). The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid. *J. Biol. Chem.* 287, 31866–31876.

- Oubaassine, R., Weckring, M., Kessler, L., Breidert, M., Roegel, J.C., & Eftekhari, P (2012). Insulin interacts directly with Na⁺/K⁺ATPase and protects from digoxin toxicity. *Toxicol.* 299, 1–9.
- Owegi, M. A., Pappas, D. L., Finch, M. W., Jr., Bilbo, S. A., Resendiz, C. A., Jacquemin, L. J., & Parra, K. J. (2006). Identification of a domain in the V₀ subunit d that is critical for coupling of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 281, 30001–30014.
- Pagliarani, A., Bandiera, P., Ventrella, V., Trombetti, F., Manuzzi, M. P., Pirini, M., & Borgatti, A. R. (2008). Response of Na⁺-dependent ATPase activities to the contaminant ammonia nitrogen in *Tapes philippinarum*: possible ATPase involvement in ammonium transport. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 49–56.
- Palacios, E., & Racotta, I. S. (2007). Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquacult.* 268, 123-135.
- Palmer, C. J., Scott, B. T., & Jones, L. R. (1991). Purification and complete sequence determination of the major plasma membrane substrate for cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in myocardium. *J. Biol. Chem.* 266, 11126–11130.
- Palmgren, M. G., Nissen, P. (2011). P-Type ATPases. *Annu. Review Biophys.* 40, 243–266.
- Pan, L. Q., Zhang, L. J., & Liu, H. Y. (2007). Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquacult.* 273, 711–720.
- Pan, L., Li, L., & Zhang, L. (2010). Variations of ion-transport enzyme activities during early development of the shrimps *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus*. *J. Ocean Univ. China*, 9, 76-80.
- Pantaleão, J. A. F., Hirose, G. L., & Costa, R. C. (2012). Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. *Invertebr. Reprod. Develop.* 56 (3), 180-190.
- Pantaleão, J. A. F., Hirose, G. L., & Costa, R. C. (2014). Occurrence of male morphotypes of *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. *Braz. J. Biol.* 74, S223-S232.
- Pantaleão, J. A. F., Carvalho-Batista, A., Teodoro, S. S. A., & Costa, R. C. (2018). The influence of environmental variables in the reproductive performance of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae) females in a continental population. *Anais Acad. Bras. Ciências* 90, 1445-1458.
- Parekh, A., Campbell, A. J. M., Djouhri, L., Fang, X., McMullan, S., Berry, C., Acosta, C., & Lawson, S. N. (2010). Immunostaining for the $\alpha 3$ isoform of the Na⁺/K⁺-ATPase is selective for functionally identified muscle spindle afferents in vivo. *J. Physiol.* 588, 4131–4143.
- Parra, K. J., Keenan, K. L., & Kane, P. M. (2000). The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 21761–21767.
- Paulsen, P. A., Jurkowski, W., Apostolov, R., Lindahl, E., Nissen, & P. Poulsen, H. (2013). The C-terminal cavity of the Na,K-ATPase analyzed by docking and electrophysiology. *Mol. Membr. Biol.* 30, 195–205.
- Paunescu, T. G., Ljubojevic, M., Russo, L. M., Winter, C., McLaughlin, M. M., Wagner, C. A., Breton, S. & Brown, D. (2010). cAMP stimulates apical V-ATPase accumulation, microvillar elongation, and proton extrusion in kidney collecting duct A-intercalated cells. *Am. J. Physiol.* 298, F643–F654.

- Pedersen, P. L. (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 349–355.
- Pedersen, P. L., & Amzel, L. M. (1993). ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, e regulation of one Nature's most unique machines. *J. Biol. Chem.* 268, 9937-9940.
- Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1-60.
- Pereira, G. A. (1997). A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). *Acta Biol. Venezuelica*, 17, 1-69.
- Pestov, N. B., Ahmad, N., Korneenko, T. V., Zhao, H., Radkov, R., Schaer, D., Roy, S., Bibert, S., Geering, K., & Modyanov, N. N. (2007). Evolution of Na,K-ATPase beta m-subunit into a coregulator of transcription in placental mammals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 11215–11220.
- Pestov, N. B., Zhao, H., Basrur, V., & Modyanov, N. N. (2011). Isolation and characterization of BetaM protein encoded by ATP1B4—a unique member of the Na, K-ATPase beta-subunit gene family. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 412, 543–548.
- Peterson G., Ewing R., & Conte F. (1978). Membrane differentiation and de novo synthesis of the Na+K+-activated adenosine triphosphatase during development of *Artemia salina* nauplii. *Dev. Biol.* 67, 90-98.
- Peterson, G. L., Churchill, L., Fisher, J. A., & Honkin, L. E. (1982). Structural and biosynthetic-studies on the 2 molecular-forms of the (Na⁺, K⁺)-activated adenosine-triphosphatase large subunit in *Artemia salina* nauplii. *J. Exp. Zool.* 221, 295-308.
- Petrushanko, I. Y., Yakushev, S., Mitkevich, V. A., Kamanina, Y. V., Ziganshin, R. H., Meng, X., Anashkina, A. A., Makhro, A., Lopina, O. D., Gassmann, M., Makarov, A. A., & Bogdanova, A. (2012). S-glutathionylation of the Na, K-ATPase catalytic alpha subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.* 287, 32195–32205.
- Phakdeekitcharoen, B., Kittikanokrat, W., Kijkunasathian, C., & Chatsudthipong, V. (2011). Aldosterone increases Na⁺- K⁺-ATPase activity in skeletal muscle of patients with Conn's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 74, 152–159.
- Phakdeekitcharoen, B., Phudhichareonrat, S., Pookarnjanamorakot, C., Kijkunasathian, C., Tubtong, N., Kittikanokrat, W., & Radinahamed, P. (2007). Thyroid hormone increases mRNA and protein expression of Na⁺- K⁺-ATPase alpha2 and beta1 subunits in human skeletal muscles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 353–358.
- Pierre, S. V., Sottejeau, Y., Gourbeau, J., Sanchez, G., Shidyak, K. A., & Blanco, V. G. (2008). Isoform-specificity of Na,K-ATPase-mediated ouabain signaling. *Am. J. Physiol.* 294, F859-F866.
- Pietrement, C., Sun-Wada, G. H., Silva, N. D., McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M., & Breton, S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 74, 185–194.
- Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. M. (2010). Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invert. Sys.* 24, 194–208.
- Pileggi, L. G., Magalhães, C., Bond-Buckup, G., & Mantelatto, F. L. M. (2013). New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. *Rev. Mex. Biodiv.* 84, 563-574.
- Pinto, E. M. (1977). *O camarão canela, Macrobrachium amazonicum (Heller), em açudes públicos do Nordeste do Brasil administrados pelo Departamento Nacional de Obras contra as Secas.* (Monografia de Graduação, Universidade Federal do Ceará) 43 p.
- Pinto, M. R., Lucena, M. N., Faleiros, R. O., Almeida, E. A., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2016). Effect of ammonium stress *in vivo* on gill ion transport ATPases and oxidative

- enzyme activities in the Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicol.* 170, 13-23.
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2019). Hormonal regulation of Na⁺-K⁺-ATPase from the evolutionary perspective. *Curr. Topics Membr.* 83, 315-351.
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2016). Na,K-ATPase regulation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinol. Metabol.* 311, E1–E31.
- Pirkmajer, S., Kirchner, H., Lundell, L. S., Zelenin, P. V., Zierath, J. R., Makarova, K. S., Yi, W., & Chibalin, A. V. (2017). Early vertebrate origin and diversification of small transmembrane regulators of cellular ion transport. *J. Physiol.* 595, 4611–4630.
- Pivovarov, A. S., Calahorro, F. & Walker, R. J. (2019). Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert. Neurosci.* 19: 1.
- Post, R. L. (1999). Active transport and pumps. *Curr. Top. Memb.* 48, 397-417.
- Post, R. L., Hegyvary C., & Kume, S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 6530–6540.
- Poulsen H., Morth P., Egebjerg J., & Nissen, P. (2010a). Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 584, 2589–2595.
- Poulsen, H., Khandelia, H., Morth, P., Bublitz, M., Mouritsen, O. G., Egebjerg, J., & Nissen, P. (2010b). Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* 467, 99-102.
- Poulsen, H., Nissen, P., Mouritsen, O. G., & Khandelia, H. (2012). Protein Kinase A (PKA) Phosphorylation of Na⁺/K⁺-ATPase Opens Intracellular C-terminal Water Pathway Leading to Third Na⁺-binding site in Molecular Dynamics Simulations. *J. Biol. Chem.* 287, 15959–15965.
- Pressley, T. A. (1992). Ionic regulation of Na⁺-ATPase, K⁺-ATPase expression. *Seminars Nephrol.* 12, 67–71.
- Pressley, T. A., Duran, M. J., & Pierre, S. V. (2005). Regions conferring isoform-specific function in the catalytic subunit of the Na,K-pump. *Front. Biosci.* 10, 2018-2026.
- Prosser, C. L. (1973). *Water: Osmotic, Hormonal Regulation*. In: W. B. Saunders, *Comparative Animal Physiology* (p. 1-78) Philadelphia, USA.
- Proverbio, T., Anders, I. P., Maltin, R., Rodrigues, J. M., & Proverbio, F. (1990). Mg²⁺-dependent ATPase activities in shrimp (*Macrobrachium amazonicum*) gill homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B, 383-390.
- Pu, H. X., Cluzeaud, F., Goldshleger, R., Karlsh, S. J. D., Farman, N., & Blostein, R. (2001). Functional role and immunocytochemical localization of the gamma a and gamma b forms of the Na,K-ATPase gamma subunit, *J. Biol. Chem.* 276, 20370–20378.
- Purhonen, P., Thomsen, K., Maunsbach, A. B., & Hebert H. (2006). Association of renal Na,K-ATPase alpha-subunit with the beta- and gamma-subunits based on cryoelectron microscopy. *J. Membr. Biol.* 214, 139-146.
- Radzyukevich, T. L., Neumann, J. C., Rindler, T. N., Oshiro, N., Goldhamer, D. J., Lingrel, J. B., & Heiny, J. A. (2013). Tissue-specific role of the Na,K-ATPase α2 isozyme in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 288, 1226–1237.
- Rahi, M. L., Amin, S., Mather, P. B., & Hurwood, D. A., (2017). Candidate genes that have facilitated freshwater adaptation by palaemonid prawns in the genus *Macrobrachium*: identification and expression validation in a model species (*M. koomboolomba*). *Peer J.* 5, e2977.
- Randall, D., Burggren, W., & French, K. (2000). *Animal Physiology: Mechanisms and adaptations*. 4th Ed. (pp 727) WH Freeman, New York.
- Rastogi, V. K., & Girvin, M. E. (1999). Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402, 263-268.

- Ratheal, I. A. M., Virgin, G. K., Yu, H., Roux, B., Gatto, C., & Artiga, P. (2010). Selectivity of externally facing ion-binding sites in the Na/K pump to alkali metals and organic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18718-18723.
- Read, G. H. L. (1984). Intraspecific variation in the osmoregulatory capacity of larval, pot larval, juvenile and adult *Macrobrachium petersii* (Hilgendorf). *Comp. Biochem. Physiol.* 78A, 501-506.
- Read, S. M., & Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue-G dye-binding assay for protein. *Analyt. Biochem.* 116, 53-64.
- Rice, W. J., Young, H. S., Martin, D. W., Sachs, J. R., & Stokes, D. L. (2001). Structure of (Na⁺, K⁺)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E₁ e E₂ states. *Biophys. J.* 80, 2187-2197.
- Robinson, J. D. (1970). Interactions between monovalent cations and the (Na⁺, K⁺)-dependent adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 17-27.
- Roenn, C. P., Li, M., Schack, V. R., Forster, I. C., Holm, R., Toustrup-Jensen, M. S., Andersen, J. P., Petrou, S., & Vilsen, B. (2019). Functional consequences of the CAPOS mutation E818K of Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* In press. doi: 10.1074/jbc.RA118.004591.
- Rolfe, D. F., & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Reviews* 77, 731-758.
- Sáez, A. G., Lozano, E., & Zaldívar-Riverón, A. (2009). Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica*, 136, 479-490.
- Salyer, S. A., Parks, J., Barati, M. T., Lederer, E. D., Clark, B. J., Klein, J. D., & Khundmiri, S. J. (2013). Aldosterone regulates Na⁺, K⁺ ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1833, 2143-2152.
- Sampaio, C. M. S., Silva, R. R., Santos, J. A., & Sales, S. P. (2007). Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz. J. Biol.* 67, 551-559.
- Sandifer, P. A., Hopkins, J. S., & Smith, T. I. (1975). Observations on salinity tolerance and osmoregulation in laboratory-reared *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae (Caridea: Crustacea). *Aquacult.* 6, 103-114.
- Sandtner, W., Egwolf, B., Khalili-Araghi, F., Sánchez-Rodríguez, J. E., Roux, B., Bezanilla, F., & Holmgren, M. (2011). Ouabain binding site in a functioning Na/K ATPase. *J. Biol. Chem.* 286, 38177-38183.
- Santos, A., Hayd, L., & Anger, K. (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa*, 3700, 534-546.
- Santos, F. M. S., Ribeiro, K., Júnior, A. C. V. F., Júnior, L. B. C., Valenti W. C., & Bezerra, R. S. (2014). Digestive proteases from wild and farmed male morphotypes of the Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). *J. Crust. Biol.* 34, 189-198.
- Santos, J. A., Sampaio, C. M. S., & Soares Filho, A. A. (2006). Male population structure of the Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum*) in a natural environment. *Nauplius*, 14, 55-63.
- Santos, L. C. F., Belli, N. M., Augusto, A., Masui, D. C., Leone, F. A., McNamara, J. C., & Furriel, R. P. M. (2007). Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A, 178-188.

- Schack, V. R., Morth, J. P., Toustrup-Jensen, M. S., Anthonisen, A. N., Nissen, P., Eersen, J. P., & Vilsen, B. (2008). Identification e function of a cytoplasmic K⁺ site of the Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 283, 27982-27990.
- Schaefer, T. L., Lingrel, J. B., Moseley, A. E., Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2011). Targeted mutations in the Na,K-ATPase alpha 2 isoform confer ouabain resistance and result in abnormal behavior in mice. *Synapse* 65, 520–531.
- Schafer, I. B., Bailer, S. M., Duser, M. G., Borsch, M., Bernal, R. A., Stock, D., & Grüber, G. (2006). Crystal structure of the archaeal A1Ao ATP synthase subunit B from *Methanosarcina mazei* Go1: implications of nucleotide-binding differences in the major A1Ao subunits A and B. *J. Mol. Biol.* 358, 725–740.
- Scheiner-Bobis, G. (2002). The sodium pump: Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269, 2424-2433.
- Schmidt-Nielsen, K. (1996). *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. 5ª Edição. São Paulo, Brasil. Editora Santos.
- Schneeberger, A., & Apell, H.-J. (2001). Ion Selectivity of the Cytoplasmic Binding Sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of Various Cations. *J. Membr. Biol.* 179, 263-273.
- Schubart, C. D., & Diesel, R. (1998). Osmoregulatory capacities and penetration into terrestrial habitats: a comparative study of Jamaican crabs of the genus *Armases* Abele, 199 (Brachyura: Grapsidae: Sesarminae). *Bull. Mar. Sci.* 6, 743-752.
- Schubart, C. D., Diesel, R., & Hedges, S. B. (1998). Rapid evolution to terrestrial life in jamaican crabs. *Nature*, 393, 363-365.
- Scott, C., Bissig, C., & Gruenberg, J. (2011). Duelling functions of the V-ATPase. *EMBO J.* 30, 4113–4115.
- Segall, L., Daly, S. E., & Blostein, R. (2001). Mechanistic basis for kinetic differences between the rat $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ isoforms of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 276, 31535–31541.
- Segall, L., Daly, S. E., Boxenbaum, N., Lane, L. K., & Blostein, R. (2000). Distinct catalytic properties of the $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ isoforms of the rat (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Biophys. J.* 78, 78A-78A.
- Sennoune, S. R., Bakunts, K., & Martinez, G. M. (2004). Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Amer. J. Physiol.* 286, 1433-1452
- Seok, J. H., Kim, J. B., Hong, J. H., Sung, J. Y., Hur, G. M., Lim, K., & Lee, J. H. (1998). Regulation of Na,K-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 667-672.
- Shamraj, O. I., & Lingrel, J. B. (1994). A putative fourth Na⁺, K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12952–12956.
- Shao, E., & Forgac, M. (2004). Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation, *J. Biol. Chem.* 279, 48663–48670.
- Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., & Forgac, M. (2003). Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278, 12985–12991.
- Shao, Y., Ojamaa, K., Klein, I., & Ismail-Beigi, F. (2000). Thyroid hormone stimulates Na,K-ATPase gene expression in the hemodynamically unloaded heterotopically transplanted rat heart. *Thyroid* 10, 753–759.
- Sharma, S., Oot, R. A., & Wilkens, S. (2018). MgATP hydrolysis destabilizes the interaction between subunit H and yeast V1-ATPase, highlighting H's role in V-ATPase regulation by reversible disassembly. *J. Biol. Chem.* 293, 10718–10730.
- Shindo, Y., Morishita, K., Kotake, E., Miura, H., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Hino, A., Kanda, T., & Kusakabe, Y. (2011). FXYD6, a Na,K-ATPase Regulator, Is Expressed in Type II Taste Cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 75, 1061-1066.

- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459, 446-450.
- Shirakihara, Y., Leslie, A. G. W., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., & Yoshida, M. (1997). The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer. *Structure* 5, 825–836.
- Short, J. W. (2004). A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiol.* 525, 1–100.
- Siebers D., Winkler A., Levek K., & Madian A. (1983). Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas* adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 36, 303-312.
- Silva, E. C. C., Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., Barrabin, H., & Fontes, C. F. L. (2008). Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 149, 622- 629.
- Silva, E. C. C., Masui, D. C., Furriel, R. P., McNamara, J. C., Barrabin, H., Scofano, H. M., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Leone, F. A., & Fontes, C. F. L. (2012). Identification of a crab gill FXVD2 protein and regulation of crab microsomal Na,K-ATPase activity by mammalian FXVD2 peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2588–2597.
- Silva, G. M. F., Ferreira, M. A. P., Von Ledebur, E. I. C. F., & Rocha, R. M. (2009). Gonadal structure analysis of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) from a wild population: a new insight on the morphotype characterization. *Aquacult. Res.* 40, 798-803.
- Singh, T. (1980). The isosmotic concept in relation to aquaculture of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquacult.* 20, 251-256.
- Singaroy, A., Chipot, C., Ekimoto, T., Suzuki, K., Ikeguchi, M., Yamato, I., & Murata, T. (2019). Rotational Mechanism Model of the Bacterial V1 Motor Based on Structural and Computational Analyses. *Front. Physiol.* 10:46.
- Skaggs, H. S., & Henry, R. P. (2002). Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas* by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 605–612.
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401.
- Slingerland, M., Cerella, C., Guchelaar, H. J., Diederich, M., & Gelderblom, H. (2013). Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. *Invest. New Drugs*, 31, 1087–1094.
- Smardon, A. M., Diab, H. I., Tarsio, M., Diakov, T. T., Nasab, N. D., West, R. W., & Kane, P. M. (2014). The RAVE complex is an isoform-specific V-ATPase assembly factor in yeast. *Mol. Biol. Cell* 25, 356–367.
- Smardon, A. M., Nasab, N. D., Tarsio, M., Diakov, T. T., & Kane, P. M. (2015). Molecular interactions and cellular itinerary of the yeast RAVE (regulator of the HC-ATPase of vacuolar and endosomal membranes) complex. *J. Biol. Chem.* 290, 27511–27523.
- Smardon, A. M., Tarsio, M., & Kane, P. M. (2002). The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277, 13831–13839.
- Smith, A. N., Borthwick, K. J., & Karet, F. E. (2002). Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar V-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene*, 297, 169–177.
- Smith, A. N., Skaug, J., Choate, K. A., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Hulton, S. A., Sanjad, S. A., Al-Sabban, E. A., Lifton, R. P., Scherer, S. W., & Karet, F. E. (2000). Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit,

- cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nature Genetics*, 26, 71-75.
- Sokolov, V. S., Ayuan, A. G., & Apell, H.-J. (2001). Assignment of charge movements to electrogenic reaction steps of Na,K-ATPase by analysis of salt effects on the kinetics of charge movements *Eur. Biophys. J.* 30, 515-527.
- Sorensen, T. M. L., Moller J. V., & Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer e calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672-1675.
- Sothejeau, Y., Belliard, A., Duran, M. J., Pressley, T. A., & Pierre, S. V. (2010). Critical Role of the Isoform-Specific Region in R1-Na,K-ATPase Trafficking and Protein Kinase C-Dependent Regulation. *Biochem.* 49, 3602–3610.
- Stern S., Borut A., & Cohen, D. (1984). The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comp. Biochem. Physiol.* 79A, 271-274.
- Sun-Wada, G. H., Tabata, H., & Kawamura, N. (2005). Selective assembly of V-ATPase subunit isoforms in mouse kidney. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 415–418
- Suzuki, K., Mizutani, K., Maruyama, S., Shimono, K., Imai, F. L., Muneyuki, E., Kakinuma, Y., Ishizuka-Katsura, Y., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamato I., & Murata, T. (2016). Crystal structures of the ATP-binding and ADP-release dwells of the V1 rotary motor. *Nature Commun.* 7:13235.
- Swadner, K. J. (1989). Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 185-220.
- Swadner, K. J., & Rael, E. (2000). The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 68, 41–56.
- Sweeney, G., & Klip, A. (1998). Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: Why e how? *Mol. Cell. Biochem.* 182, 121-133.
- Tabke, K., Albertmelcher, A., Vitavska, O., Huss, M., Schmitz, H. P., & Wieczorek, H. (2014). Reversible disassembly of the yeast V-ATPase revisited under in vivo conditions. *Biochem. J.* 462, 185–197.
- Takeyasu, K., Tamkun, M. M., Renaud, K. J., & Fambrough, D. M. (1988). Ouabain-sensitive Na⁺/K⁺-ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection with DNA encoding the alpha-subunit of an avian sodium pump. *J. Biol. Chem.* 263, 4347-4354.
- Taylor, H. H., & Taylor, E. W. (1992). *Microscopic anatomy of invertebrates*. In: F. W. Harrison, & A. G. Humas (Org.) *Decapod Crustacea*. Vol. 10, (pp. 203-293). Wiley-Liss, New York.
- Tentes, I., & Stratakis, E. (1991). Partial purification and properties of (Na⁺, K⁺)-ATPase from *Potamon potamios*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 619-624.
- Thabet, R., Ayadi, H., Koken, M., & Leignel, V. (2017). Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiol.* 799, 1–20.
- Therien, A. G., & Blostein, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279, C541-C566.
- Therien, A. G., Nestor, N. B., Ball, W. J., & Blostein, R. (1996). Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271(12), 7104-7112.
- Tidow, H., Aperia, A., & Nissen, P. (2010). How are ion pumps and agrin signaling integrated? *Trends Biochem. Sci.* 35, 653-659.
- Tipmark, C. K. (2008). Identification of FXYD protein genes in a teleost: tissue-specific expression e response to salinity change. *Am. J. Physiol.* 294, R1367-R1378.
- Toei M., Saum R., & Forgac M. (2010). Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochem.* 49, 4715–4723.

- Toei, M., Toei, S., & Forgacs, M. (2011). Definition of membrane topology and identification of residues important for transport in subunit a of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 286, 35176–35186.
- Tokhtaeva, E., Clifford, R. J., Kaplan, J. H., Sachs, G., & Vagin, O. (2012). Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase α - β heterodimers. *J. Biol. Chem.* 287, 26115–26125.
- Tokhtaeva, E., Munson, K., Sachs, G., & Vagin, O. (2010). N-glycan-dependent quality control of the Na,K-ATPase b(2) subunit. *Biochem.* 49, 3116–3128.
- Torloni, C. E. C., Santos, J. J., Carvalho, J. R., & Corrêa, A. R. A. (1993). A pescada-do-piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo - CESP. *Série Pesquisa e Desenvolvimento (CESP, São Paulo)* 84: 1-23.
- Torres, A. H. Jr. (2006). Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (Crustacea, Decapoda). (Tese de doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo). Recuperado de www.teses.usp.br.
- Toustrup-Jensen, M. S., & Vilsen, B. (2005). Interaction between the Catalytic Site e the A-M3 Linker Stabilizes E_2/E_2P Conformational States of Na^+, K^+ -ATPase. *J. Biol. Chemist.* 280, 10210-20218.
- Toustrup-Jensen, M. S., Holm, R., Einholm, A. P., Schack, V. R., Morth, J. P., Nissen P., Andersen, J. P., & Vilsen, B. (2009). The C terminus of Na^+, K^+ -ATPase controls Na^+ affinity on both sides of the membrane through Arg⁹³⁵. *J. Biol. Chem.* 284, 18715-18725.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- Towle, D. W., & Kays, W. T. (1986). Basolateral localization of Na^+, K^+ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* e *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* 239, 311-318.
- Towle, D. W., & Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am. Zool.* 41, 770-780
- Towle, D. W., Henry, R. P., & Terwilliger, N. D. (2011). Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* 6D, 115-125.
- Towle, D. W., Paulsen, R. S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J. H., & Spanings-Pierrot, C. (2001). Na^+, K^+ -ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing e salinity related expression of α -subunit mRNA e protein. *J. Exp. Biol.* 204, 4005-4012.
- Towle, D. W., Rushton, M. E., Heidysch, D., Mag nani, J. J., Rose, M. J., Amstutz, A., Jordan, M. K., Shearer, D. W., & Wu, W. S. (1997). Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maen-* as: Molecular cloning, expression, and tissue distribution. *J. Exp. Biol.* 200, 1003-1014.
- Toyomura, T., Murata, Y., & Yamamoto, A. (2003). From lysosomes to the plasma membrane - Localization of vacuolar type H^+ -ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.* 248, 22023-22030.
- Toyoshima, C., & Cornelius, F. (2013). New crystal structures of PII-type ATPases: excitement continues. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 507–514.
- Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* 430, 529-535.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 647–655.

- Toyoshima, C., Ryuta, K., & Flemming, C. (2011). First crystal structures of Na⁺, K⁺-ATPase: New light on the oldest ion pump. *Struct.* 19, 1732-1738.
- Tresguerres, M., Parks, S. K., Sabatini, S. E., Goss, G. G., & Luquet, C. M. (2008). Regulation of ion transport by pH and [HCO₃⁻] in isolated gills of the crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. *Am. J. Physiol.* 294, R1033–R1043.
- Tsai, J. R., & Lin, H. C. (2007). V-type H⁺-ATPase e Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.* 210, 620–627.
- Uchihashi, T., Iino, R., Ando, T., & Noji, H. (2011). High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F-ATPase. *Science* 333, 755–758.
- Ueno, H., Suzuki, K., & Murata, T. (2018). Structure and Dynamics of Rotary V1Motor. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1789–1802.
- Urzúa A., & Anger, K. (2011). Larval biomass and chemical composition at hatching in two geographically isolated clades of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*: intra- or interspecific variation? *Invert. Reprod. Develop.* 55, 236–246.
- Valencia, D. M., & Campos, M. R. (2007). Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1968 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. *Zootaxa*, 1456, 1-44.
- Vasilets, L. A., Schmalzing, G., Madefessel, K., Haase, W., & Schwarz W. (1990). Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na⁺/K⁺-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Membr. Biol.* 118, 131–142.
- Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K. J., Baleja, J. D., & Forgac, M. (2000). Cysteine scanning mutagenesis of the noncatalytic nucleotide binding site of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275, 255–260.
- Vedovato, N., & Gadsby, D. C. (2010). The two C-terminal tyrosines stabilize occluded Na/K pump conformations containing Na or K ions. *J. Gen. Physiol.* 136, 63–82.
- Veja-Perez, L. A. (1984). Desenvolvimento larval de *Macrobrachium heterochirus* (Wiegmann, 1839), *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), em laboratório. (Tese de Doutorado. São Paulo, Universidade de São Paulo).
- Vera-Silva, A. L., Carvalho, F. L., & Mantelatto, F. L. (2016). Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of Non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. *J. Crust. Biol.* 36, 373-383.
- Vergamini, F. G., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2011). Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contrib. Zool.* 80, 67-83.
- Vergamini, F. G. (2009). Análise comparativa entre populações costeiras e continentais do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) por meio de dados morfológicos e moleculares. (Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).
- Vetorelli, M. P. (2008). Salinidade e composição iônica da água na larvicultura do camarão-da-amazonia, *Macrobrachium amazonicum*. (Tese de Doutorado. Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista). Recuperado de repositorio.unesp.br.
- Wagner, C. A., Finberg, K. E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D., & Geibel, J. P. (2004). Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol. Review* 84, 1263-1314.
- Walaas, S. I., Czernik, A. J., Olstad, O. K., Sletten, K., & Walaas, O. (1994). Protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylate phospholemman, an insulin and adrenaline-regulated membrane phosphoprotein, at specific sites in the carboxy terminal domain. *Biochem. J.* 304, 635–640.
- Wang, D., & Hiesinger, P. B. (2013). The vesicular ATPase: A missing link between acidification and exocytosis. *J. Cell Biol.* 203, 171–173.

- Wang, R., Zhuang, P., Feng, G., Zhang, L., Huang, X., & Jia, X. (2012). Osmotic and ionic regulation and Na^+/K^+ -ATPase, carbonic anhydrase activities in Mature Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 (Decapoda, Brachyura) exposed to different salinities. *Crustaceana* 85, 1431-1447.
- Wang, Y., Inoue, T., & Forgac, M. (2005). Subunit a of the yeast V-ATPase participates in binding of Bafilomycin. *J. Biol. Chem.* 280, 40481–40488.
- Wang, P., Lin, C., Hwang, H., & Lee, T. (2008). Branchial FXYD protein expression in response to salinity change e its interaction with Na^+/K^+ -ATPase of the euryhaline teleost *Tetraodon nigroviridis*. *J. Exp. Biol.* 211, 3750-3758.
- Wang, Y., Cipriano, D. J., & Forgac, M. (2007). Arrangement of subunits in the proteolipid ring of the V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 282, 34058–34065.
- Wanson, S. A., Péqueux A., & Roer, R. D. (1984). Na^+ regulation and $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (La Conte). *Comp. Biochem. Physiol.* 79A, 673-678.
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulf ate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinnesaffran, E., & Kinne, R. K. H. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Review Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148, 1–80.
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Luck-Kopp, S., & Siebers, D. (1999). Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. *J. Comp. Physiol.* 169B, 25-37.
- Weihrauch, D., Becker, W., Postel, U., Riestenpatt, S., & Siebers, D. (1998). Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol.* 168B, 364-376.
- Weihrauch, D., McNamara, J. C., Towle, D. W., & Onken, H. (2004a). Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J. Exp. Biol.* 207, 4623-4631.
- Weihrauch, D., Morris, S., & Towle, D. W. (2004b). Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491-4504.
- Weihrauch, D., Wilkie, M. P., & Walsh, P. J. (2009). Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *J. Exp. Biol.* 212, 1716-1730
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., & Towle, D. W. (2001). Molecular characterization of V-type H^+ -ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* 204, 25-37.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., & Towle, D. W. (2002). Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na^+/K^+ -ATPase, V-type H^+ -ATPase and functional microtubules. *J. Exp. Biol.* 205, 2765–2775.
- Wengert, M., Ribeiro, M. C., Abreu, T. P., Coutinho-Silva, R., Leão-Ferreira, L. R., Pinheiro, A. A. S., & Caruso-Neves, C. (2013). Protein kinase C-mediated ATP stimulation of Na^+ -ATPase activity in LLC-PK1 cells involves a P2Y2 and/or P2Y4 receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 535, 136–142.
- Wilder, M. N., Huong, D. T. T., Atmomarsono, M., Tran, T. T. H., Phu, T. Q., & Yang, W. J. (2000). Characterization of Na^+/K^+ -ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 377-388.
- Wilder, M. N., Ikuta, K., Atmomarsono, M., Hatta, T., & Komuro, K., (1998). Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. *Comp. Biochem. Physiol.* 119 A, 941–950.

- Wilkens, S. & Forgac, M. (2001). Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 276, 44064–44068
- Winkler, A. (1986). Effects of inorganic sea-water constituents on branchial (Na,K)-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 92, 537-544.
- Womor, D., Muthu, V., Meier, R., Balke, M., Cai, Y., & Peter, K. L. (2009). Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 340–350.
- Yamaguchi, F., Yamaguchi, K., Tai, Y., Sugimoto, K., & Tokuda, M. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel phospholemman-like protein from rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86, 189–192.
- Yang, W. K., Kang, C. K., Chang, C. H., Hsu, A. D., Lee, T. H., & Hwang, P. P. (2013). Expression profiles of branchial FXYD proteins in the brackish medaka *Oryzias dancena*: A potential saltwater fish model for studies of osmoregulation. *PLoS One*, 8, e55470.
- Yang, W. K., Kang, C. K., Chen, T. Y., Chang, W. B., & Lee, T. H. (2011). Salinity-dependent expression of the branchial $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and Na^+/K^+ -ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. *J. Comp. Physiol.* 181B, 953–964.
- Yatime, L., Laursen, M., Morth, J. P., Esmann, M., Nissen, P., & Fedesova, N. U. (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na^+ , K^+ -ATPase. *J. Struct. Biol.* 174, 296-306.
- Yoneda, J. S., Rigos, C. F., & Ciancaglini, P. (2013). Addition of subunit c, K^+ ions, and lipid restores the thermal stability of solubilized Na,K-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 530, 93–100.
- Yu, H., Ratheal, I. M., Artiga, P., & Rouxi, B. (2011). Protonation of key acidic residues is critical for the K-selectivity of the Na/K pump. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18, 1159-1164.
- Zanders, I. P., & Rodriguez, J. M. (1992). Effects of temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on oxygen-consumption in larvae and adults of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 505-509.
- Zare S., & Greenaway, P. (1998). The Effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na^+/K^+ -ATPase, and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 739-745.
- Zhang, D., Liu, J., Qi, T., Ge, B., Liu, Q., Jiang, S., Zhang, H., Wang, Z., Ding, G., & Tang, B. (2018). Comparative transcriptome analysis of *Eriocheir japonica sinensis* response to environmental salinity. *PLoS ONE*, 13(9), e0203280.
- Zheng, J., Koh, X., Hua, F., Li, G., Larrick, J. W., & Bian, J. S. (2011). Cardio protection induced by Na^+/K^+ -ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiov. Res.* 89, 51–59.
- Ziff, O. J., & Kotecha, D. (2016). Digoxin: the good and the bad. *Trends Cardiovasc. Med.* 26, 585–595.

CURRICULUM VITAE

1. Formação

Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em Administração.

Etec Prof^a Marinês Teodoro de Freitas Almeida, Etec Novo Horizonte-SP, Brasil.

Período: 08-2011 a 12-2012.

Graduação em Química Com Habilitação em Química Forense.

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Sao Paulo, Brasil.

Período: 02-2013 a 01-2017.

2. Artigos Publicados em Revistas de Circulação Internacional

Fabri, L. M., Lucena, M. N., Garçon, D. P., Moraes, C. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2019). Kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 227B, 64–74.

Lucena, M. N., Garçon, D. P., Fontes, C. F. L., Fabri, L. M., Moraes, C. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2019a). Dopamine binding directly up-regulates (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 233A, 39–47.

3. Trabalhos científicos apresentado em congressos

Fabri, L. M., Lucena, M. N., Leone, F. A. Caracterização da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase de frações microsomais do tecido branquial do caranguejo *Ucides cordatus*. In: 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 2015, Ribeirão Preto-SP.

Fabri, L. M., Lucena, M. N., Leone, F. A. Modulação da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase de frações microsomais do tecido branquial do caranguejo *Ucides cordatus* pelos íons potássio e amônio. In: 24º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo, 2016, Ribeirão Preto-SP.

Fabri, L. M., Moraes, C. M., Lucena, M. N., McNamara, J. C., Leone, F. A. Synergistic stimulation of K^+ -phosphatase activity of (Na^+, K^+) -ATPase from *Ucides cordatus* gills by potassium and ammonium ions. In: 46a. Reunião Anual da SBBq, 2017, Águas de Lindoia-SP.

Fabri, L. M., Moraes, C. M., Lucena, M. N., Garçon, D. P., McNamara, J. C., Leone, F. A. A kinetic characterization of (Na^+, K^+) -ATPase activity in gill microsomal fractions from *Macrobrachium amazonicum* caught at the Tietê river, São Paulo. In: 47^a. Reunião Anual da SBBq, 2018, Joinville - SC.

Fabri, L. M., Moraes, C. M., Lucena, M. N., McNamara, J. C., Leone, F. A. Caracterização cinética da atividade da (Na^+, K^+) -ATPase do tecido branquial do camarão *Macrobrachium amazonicum* coletado no rio Tietê. In: 3^o Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2019, Ribeirão Preto - SP.

Fabri, L. M., Moraes, C. M., Lucena, M. N., McNamara, J. C., Leone, F. A. (Na^+, K^+) -ATPase activity in gill microsomal fractions from the shrimp *Macrobrachium amazonicum* acclimated to high salinity In: 48^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2019, Águas de Lindoia, SP.