



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

*Goniopsis cruentata*: caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de RNAm

Cintya Mendes Moraes

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

CINTYA MENDES MORAES

*Goniopsis cruentata*: caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de RNAm

Versão corrigida

A versão original encontra-se na Biblioteca Central da Universidade de São Paulo/  
campus Ribeirão Preto.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

Ribeirão Preto – SP

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Moraes, Cintya Mendes

*Goniopsis cruentata*: caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de RNAm. 125p. il. ; 30cm

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

Orientador: Francisco de Assis Leone

1. (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.
2. *Goniopsis cruentata*.
3. Aclimação
4. FXYD2.
5. Osmorregulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Cintya Mendes Moraes**

***Goniopsis cruentata*: caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de RNAm.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra 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 \_\_\_\_\_

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim pensar o que ninguém nunca pensou sobre o que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## DEDICO

A minha mãe, que apesar de não ter acompanhado minha jornada até o fim, me deu o alicerce que precisava para perseverar na minha caminhada. A minha avó que sempre me deu colo e conselhos nos momentos mais difíceis. Ao meu pai que sempre me aconselhou. A minha tia Andréia que sempre me apoiou e me deu suporte na ausência da minha mãe. A minha irmãzinha Sarah que, apesar dos poucos meses de vida, iluminou meu caminho e me deu forças para continuar lutando.

*Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.*  
- O pequeno príncipe (Antoine de Saint-Exupéry)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Francisco de Assis Leone, por toda a paciência comigo durante todos esses anos, e por sempre estar presente nos momentos difíceis, dando todo o suporte que sempre precisei. Agradeço também por todos os ensinamentos de vida e acadêmico. Obrigada pelos puxões de orelha, por sempre ser compreensivo, por entender minhas dificuldades e sempre tentar me ajudar da melhor maneira possível. O senhor é um exemplo de superação e empenho pela vida acadêmica.

Ao Professor Doutor Malson Neilson de Lucena, por todo o suporte acadêmico e pessoal desde que iniciei minhas atividades no laboratório. Pela paciência, ensinamentos e, principalmente amizade. Pela companhia diária no laboratório, alegrando do seu jeito único de ser todos os meus dias de trabalho, e também por fazer os congressos serem sempre mais interessantes, no Brasil ou no exterior. Agradeço também por toda a colaboração na correção, leitura e feedback dos relatórios escritos, artigos publicados, assim como em apresentações de trabalho. Admiração por toda sua dedicação pela vida acadêmica e pelo excelente profissional que é.

Ao Professor Doutor Carlos Frederico Leite Fontes por todo o companheirismo e colaboração nos experimentos realizado no Rio de Janeiro. Obrigada pelos ensinamentos, por compartilhar comigo um pouquinho do seu modo brilhante de pensar, pelas ideias inovadoras e por todas as ricas discussões.

Ao Professor Fernando Luís Medina Mantellato, por disponibilizar tempo e recursos para a coleta dos animais utilizados neste estudo, e também pelas ricas discussões e vivências que proporcionou em sua disciplina.

Ao Professor Doutor Rogério Oliveira Faleiros por disponibilizar seu tempo e recursos para realizar a coleta dos animais utilizados neste estudo. Agradeço também pela colaboração nos experimentos envolvendo toda a parte de biologia molecular e aclimação dos animais. Agradeço pelo compartilhamento de conhecimentos, pelas discussões proveitosas e por todo o suporte acadêmico.

A Professora Doutra Daniela Gonçalves Favacho pela amizade e companheirismo. Pelas oportunidades que me ofereceu em sua disciplina como Educadora Bolsista e ricas discussões sobre a Educação em Química no Brasil.

Ao Professor Doutor Marcelo Rodrigues Pinto pela colaboração científica e experimental.

Ao Professor Doutor Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira por todo o suporte acadêmico e também, por todo o suporte psicológico em nossas conversas durante as aulas de inglês.

Ao Professor Doutor John Campbell McNamara por toda colaboração e discussão em projetos, artigos e revisões.

A professora Doutora Daniela Pereira Garçon por toda colaboração e discussões em projetos, artigos e revisões.

Aos amigos de laboratório Leonardo, Natália, Igor, Dham, Elise e Bruno. Obrigada pelo companheirismo e cumplicidade. A amizade de cada um de vocês durante todos esses anos foi essencial para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Obrigada pelas risadas, pelos jantares, almoços no Valter, churrascos, amigos-secreto e festinhas de aniversário no laboratório (inclusive por comemorarem meu aniversário em várias delas). Obrigada por tudo.

Aos meus amigos de vida e graduação Daniella, Douglas, Angélica e Maria Victória. Obrigada por me darem todo o suporte desde sempre. Obrigada por sempre acreditarem em mim, e sempre no meu melhor. Obrigada por todos os momentos especiais que passamos juntos, por todas as risadas, broncas, puxadas de orelha, paciência e companheirismo. Momentos estes que sempre me motivaram a seguir em frente.

As minhas queridas amigas Kauana, Maísa, Dominiquea, Carolina, Eloisa, Roberta, Lais, Leticia, Isabella, Joanna, Rae, Roberta e Julia por sempre estarem ao meu lado nos momentos de felicidade e tristeza. Por sempre me apoiarem quando tudo parecia muito difícil e impossível de ser conquistado. Por sempre elevarem minha auto-estima e confiança. Vocês foram meu alicerce durante todos esses anos.

Aos meus queridos alunos de inglês, em especial a Professora Doutora Rogéria Gonçalves e Professor Doutor José Mauricio Caiut e sua esposa Doutora Silvana Ruella de Oliveira, por todos os conselhos e conversas durante as aulas. Agradeço imensamente a cada um deles pela confiança e companheirismo, visto que sem eles a minha permanência não seria possível em Ribeirão Preto.

Ao apoio científico e financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).



## RESUMO

**MORAES, C.M. *Goniopsis cruentata*: caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de RNAm. 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Departamento de Química - Universidade de São Paulo. 2019.**

Este estudo apresenta as propriedades cinéticas e moleculares da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial do *G. cruentata*, trazendo informações que contribuem para uma melhor compreensão das adaptações fisiológicas e bioquímicas associadas à ocupação de diferentes ambientes pelos crustáceos. A análise por Western Blotting na presença de anticorpo monoclonal para a subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase confirmou a presença da enzima na fração microsomal. A marcação imunohistoquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase nas brânquias posteriores revela que a enzima está distribuída predominantemente na região apical das células pilares. A centrifugação em gradiente de sacarose indicou a presença de um único pico de atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, embora dois picos de proteína tenham sido observados para a atividade insensível a ouabaína. A modulação da atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de *G. cruentata* recém-capturado (21‰S) pelo ATP ocorreu através de duas famílias de sítios, uma de alta afinidade com  $V_M = 153,4 \pm 7,7$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 0,013 \pm 0,0006$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 1,3$ , e outra de baixa afinidade com  $V_M = 186,0 \pm 9,3$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 0,085 \pm 0,004$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 3,0$ . Uma atividade basal de aproximadamente 140 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína foi observada em baixas concentrações de ATP (10<sup>-9</sup> mmol L<sup>-1</sup>). Em condições estequiométricas de Mg<sup>2+</sup> e ATP apenas a família de baixa afinidade ATP foi observada, apresentando  $V_M = 443,0 \pm 22,1$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 0,06 \pm 0,003$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 4,0$ . Os resultados sugerem que excesso de Mg<sup>2+</sup> atua como um modulador alostérico e estimula o aparecimento da família de alta afinidade pelo ATP. A atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase dos animais aclimatados também foi estimulada através de duas famílias de sítios ATP em todas as salinidades estudadas. Os íons magnésio estimularam a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase através de uma única curva de saturação, com  $V_M = 425,9 \pm 25,5$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 0,16 \pm 0,01$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 2,6$ . De forma similar, a atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimulada pelo Na<sup>+</sup> ( $V_M = 425,0 \pm 23,4$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 5,1 \pm 0,3$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 1,5$ ), K<sup>+</sup> ( $V_M = 485,3 \pm 24,3$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 0,9 \pm 0,05$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 1,5$ ) e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $V_M = 497,4 \pm 24,9$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína,  $K_M = 9,7 \pm 0,5$  mmol L<sup>-1</sup> e  $n_H = 1,2$ ). A enzima é inibida pela ouabaína com  $K_i = 196,6 \pm 9,8$   $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. Além da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, foram identificadas na fração microsomal Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- e Ca<sup>2+</sup>-ATPases além de fosfatases neutra e alcalina. Embora a osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados não variou significativamente, os caranguejos hiperregulam em baixas salinidades e hiporregulam em salinidades mais altas. Uma expressão significativa da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi observada durante a aclimação a 10 ‰S enquanto para salinidades mais elevadas (20, 30 e 40 ‰S) não ocorreu uma diferença significativa na expressão. Na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimulada  $\approx 6\%$  e, de maneira inesperada, inibida  $\approx 25\%$  na presença de FXD2. Entretanto, na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e FXD2 ocorreu uma estimulação de  $\approx 10\%$ , sugerindo que o sítio de ligação do peptídeo FXD2 requer a presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para ser exposto. A adição de AMPc (estimulador da PKA) e PMA (estimulador da PKC) acarretou a fosforilação da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, sugerindo que a fração microsomal também apresenta PKA e PKC endógenas. A eletroforese em condições desnaturantes confirmou a fosforilação da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase pela PKA. Além disso ficou demonstrado que a fração microsomal apresenta o peptídeo FXD2, uma vez que foi observada uma banda fosforilada de aproximadamente 7 kD.

## ABSTRACT

**MORAES, C.M. *Goniopsis cruentata*: kinetic and biochemical characterization of the gill tissue (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase and its RNAm sequence analysis. 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Departamento de Química - Universidade de São Paulo. 2019.**

This systematic study of the kinetic and molecular properties of *G. cruentata* (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase of the gill tissue disclosed information that contributes to a better understanding of the physiological and biochemical adaptations associated to the occupation of different environments by crustaceans. Western Blotting analysis in the presence of a monoclonal antibody against the  $\alpha$  subunit of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase confirmed the presence of the enzyme in the microsomal fraction. Immunohistochemical analysis confirmed that gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase of *G. cruentata* is predominantly distributed in the apical region of pillar cells. Sucrose gradient centrifugation indicated the presence of a single protein peak showing (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity while two different protein fractions were observed for ouabain-insensitive activity. (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity is modulated by ATP by two ATP binding site families. One of high affinity with  $V_M = 153.4 \pm 7.7$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 0.013 \pm 0.0006$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 1.3$  and a low-affinity with  $V_M = 186.0 \pm 9.3$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 0.085 \pm 0.004$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 3.0$ . Interestingly, a basal activity of  $V_M = 140$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein was observed at low concentrations of ATP (10<sup>-9</sup> mmol L<sup>-1</sup>). However, under stoichiometric condition of ATP and Mg<sup>2+</sup> only a low-affinity family of sites was observed ( $V_M = 443.0 \pm 22.1$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 0.06 \pm 0.003$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 4.0$ ) suggesting that excess Mg<sup>2+</sup> is an allosteric modulator of the enzyme and is responsible for triggering the high-affinity ATP binding sites. The (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity of the acclimated animals was also stimulated by two ATP binding site families in all salinities studied. Magnesium ions also stimulated the (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity ( $V_M = 425.9 \pm 25.5$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 0.16 \pm 0.01$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 2.6$ ), as well as by Na<sup>+</sup> ( $V_M = 425.0 \pm 23.4$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 5.1 \pm 0.3$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 1.5$ ), K<sup>+</sup> ( $V_M = 485.3 \pm 24.3$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 0.9 \pm 0.05$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 1.5$ ) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $V_M = 497.4 \pm 24.9$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein,  $K_M = 9.7 \pm 0.5$  mmol L<sup>-1</sup> and  $n_H = 1.2$ ). Ouabain inhibited (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity with  $K_i = 196.6 \pm 9.8$   $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. ATPases other than (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase were identified in microsomal preparation such as Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPase, along with neutral and alkaline phosphatases. Hemolymph osmolality did not change after acclimation to different salinities, but crabs hyper-regulate at low salinities and hypo-regulate at higher salinities. At low salinities (10 ‰) a significant expression of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$  subunit was observed, but no significant difference in expression was observed in salinities higher than 10 ‰. In the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity was stimulated  $\approx 6\%$  and inhibited  $\approx 25\%$  by FXYD2. However, the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and FXYD2 stimulated the protein  $\approx 10\%$ , suggesting that for the binding site for FXYD2 peptide to be exposed and passive to binding requires the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. The addition of cAMP (PKA stimulator) and PMA (PKC stimulator) resulted in the phosphorylation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$  subunit suggesting that the microsomal fraction also has endogenous PKA and PKC. The electrophoresis under denaturing conditions has confirmed the phosphorylation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$  subunit by PKA. In addition, it has also been demonstrated that the microsomal fraction has the FXYD2 peptide since a phosphorylated band of approximately 7 kDa was observed.

## ABREVIATURAS

AMPc: 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico  
ADP: adenosina 5`difosfato  
ATP: adenosina 5`trifosfato  
ATPase: adenosina 5`trifosfatase  
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DTT: ditioneitol  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acético  
FEP: fosfoenolpiruvato  
FGQ: fosfoglicerato kinase  
GAF: 3-fosfogliceraldeído  
GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase  
H89: N-[2-p-bromocinnamylamino-etil]-5-isoquinolinesulphonamide  
Hepes: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanol sulfônico  
K<sub>M</sub>: constante de Michaelis-Menten  
K<sub>i</sub>: constante de inibição  
K<sub>0,5</sub>: constante de dissociação aparente  
LDH: lactato desidrogenase  
n<sub>H</sub>: número de Hill  
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)  
NBT: nitroblue tetrazolium  
Pi: fosfato inorgânico  
PA: ácido fosfático  
PC: fosfatidilcolina  
PE: fosfatidiletanolamina  
PG: fosfatidilglicerol  
Pi: fosfato inorgânico  
PI: fosfatidilinositol  
PKA: proteína kinase A  
PKC: proteína kinase C

PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate

PQ: piruvato kinase

qPCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

Che: querelitrina

PS: fosfatidilserina

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SDS: dodecil sulfato de sódio

TEA: trietanolamina

Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sequência dos primers degenerados empregados para amplificar a subunidade $\alpha$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ (NAK_10F e NAK_16R), e sequência dos primers baseados na sequência de cDNA de <i>Callinectes sapidus</i> para amplificar parcialmente o gene PRL10 (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R), codificador da proteína ribossomal L10 utilizado como controle interno (constitutivo) de reação -----	<b>51</b>
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros cinéticos calculados para se analisar o efeito na atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ das brânquias posteriores de <i>Goniopsis cruentata</i> por ATP, $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ e $\text{NH}_4^+$ e inibição pela ouabaína -----	<b>71</b>
<b>Tabela 3</b>	Desfosforilacao da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ das brânquias posteriores do caranguejo semi-terrestre <i>Goniopsis cruentata</i> em concentração estequiométrica de $\text{Mg}^{2+}$ e ATP livres -----	<b>72</b>
<b>Tabela 4</b>	Efeito de vários inibidores na atividade ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo de mangue <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>73</b>
<b>Tabela 5</b>	Valores determinados para a osmolalidade da hemolinfa de <i>Goniopsis cruentata</i> aclimatado em diferentes salinidades-----	<b>74</b>
<b>Tabela 6</b>	Efeito da salinidade na atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ das brânquias posteriores do caranguejo semi-terrestre <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>76</b>
<b>Tabela 7</b>	Efeito do peptídeo FXYD2 na atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> recém-capturado -----	<b>79</b>
<b>Tabela 7</b>	Atividade específica e afinidade pelo ATP da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial em crustáceos decápodes selecionados de habitats de diferentes salinidades e/ou aclimatados em várias salinidades experimentais -----	<b>102</b>

## LISTA DE PAINÉIS

<b>Painel 1</b>	<i>Goniopsis cruentata</i> adulto recém capturado-----	<b>22</b>
<b>Painel 2</b>	Representação esquemática da morfologia e estruturas finas das brânquias de caranguejos hiperreguladores-----	<b>25</b>
<b>Painel 3</b>	Modelo hipotético para o transporte de Na <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup> através do epitélio branquial de crustáceos permeáveis, intertidais e estuarinos, como os braquiúros hiperreguladores-----	<b>26</b>
<b>Painel 4</b>	Imagem topográfica da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase na membrana-----	<b>28</b>
<b>Painel 5</b>	Imagem topográfica da subunidade $\alpha$ -----	<b>29</b>
<b>Painel 6</b>	Imagem topográfica da subunidade $\beta$ -----	<b>31</b>
<b>Painel 7</b>	Estrutura do complexo $\alpha\beta\gamma$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da do rim de porco ligada à Na <sup>+</sup> , ADP e AlF <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -----	<b>32</b>
<b>Painel 8</b>	Esquema integrado do ciclo catalítico da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase-----	<b>35</b>
<b>Painel 9</b>	Estrutura da ouabaína-----	<b>36</b>
<b>Painel 10</b>	Interação da ouabaína com a subunidade $\alpha$ -----	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Localização subcelular da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da brânquia posterior do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>59</b>
<b>Figura 2</b>	Centrifugação da fração microsomal da brânquia posterior do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> em gradiente de sacarose-----	<b>60</b>
<b>Figura 3</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blotting da brânquia posterior do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>62</b>
<b>Figura 4</b>	Efeito da concentração de ATP na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>64</b>
<b>Figura 5</b>	Efeito da concentração estequiométrica de ATP e Mg <sup>2+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>65</b>
<b>Figura 6</b>	Efeito da concentração de Mg <sup>2+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>67</b>
<b>Figura 7</b>	Efeito da concentração de Na <sup>+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>68</b>
<b>Figura 8</b>	Efeito da concentração de K <sup>+</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>69</b>
<b>Figura 9</b>	Inibição da atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase branquial de <i>Goniopsis cruentata</i> pela ouabaína-----	<b>70</b>
<b>Figura 10</b>	Capacidade osmorregulatória de <i>Goniopsis cruentata</i> aclimatado durante 5 dias de aclimação a diferentes salinidades-----	<b>75</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito da salinidade na modulação da atividade da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase branquial de <i>Goniopsis cruentata</i> pelo ATP-----	<b>77</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito da salinidade sobre a expressão de RNAm da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase extraída das brânquias de <i>Goniopsis cruentata</i> ---	<b>78</b>
<b>Figura 13</b>	Identificação do peptídio FXYD2 na fração microsomal do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>80</b>

<b>Figura 14</b>	Fosforilação da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase de <i>Goniopsis cruentata</i> por PKA e PKC endógenas-----	<b>81</b>
<b>Figura 15</b>	Efeito da fosforilação da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase por PKA endógena-----	<b>82</b>
<b>Figura 16</b>	Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação parcial da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase com o par te primers degenerados NaK10F e NaK16R ( $\approx$ 700 pb), a partir do cDNA das brânquias posteriores de <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>83</b>
<b>Figura 17</b>	Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação parcial da proteína ribossomal L10 (PRL10), com o par de primers PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R ( $\approx$ 300 pb), a partir do cDNA das brânquias posteriores de <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>84</b>
<b>Figura 18</b>	Curva de eficiência obtida para o par de primers (NaK_Gcrug_F/R) utilizados analise de expressão de RNAm por qPCR para (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase-----	<b>85</b>
<b>Figura 19</b>	Curva de eficiência obtida para o par de primers (PRL10_Gcrug_F/R) utilizados para amplificar a proteína ribossomal L10, normalizador para a análise de expressão de RNAm por qPCR para (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase-----	<b>85</b>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1. O caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	21
1.2. Osmorregulação em crustáceos-----	23
1.3. (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase-----	27
1.4. Ciclo catalítico da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase-----	33
1.5. Inibidores da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase-----	36
1.6. (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase em crustáceos -----	37
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
2.1. Objetivos gerais -----	42
2.2. Objetivos específicos -----	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
3.1. Materiais-----	44
3.2. Coleta dos animais-----	46
3.3. Extração das brânquias e preparação das frações microsomais -----	46
3.4. Dosagem de proteína-----	47
3.5. Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose -----	47
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page) -----	47
3.7. Western Blotting-----	47
3.8. Aclimação dos caranguejos e capacidade osmorregulatória -----	48
3.9. Obtenção das brânquias para extração de RNA total -----	48
3.10. Extração de RNA total-----	49
3.11. Transcrição reversa (RT) dos RNAm – síntese de cDNA-----	49
3.12. Clonagem dos fragmentos parciais de cDNA e sequenciamento -----	50
3.13. Análise de expressão por PCR quantitativo (qPCR) -----	51
3.14. Determinação da atividade (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal-----	52
3.15. Cálculo das espécies livres no meio de reação -----	53
3.16. Tratamento dos dados cinéticos -----	53
3.17. Síntese do [γ- <sup>32</sup> P]-ATP -----	53
3.18. Determinação da atividade (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase através da liberação de [γ- <sup>32</sup> P]Pi-----	53
3.19. Estudo do efeito do peptídeo FXVD2 exógeno na atividade (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase	54

3.20.	Fosforilação por proteína kinase A (PKA)-----	54
3.21.	Fosforilação por proteína kinase C (PKC) -----	54
3.22.	Fosforilação/Desfosforilação da fração microsomal por [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP -----	55
3.23.	Imunolocalização da (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )-ATPase branquial do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> -----	55
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1.	Imunolocalização da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase das brânquias posteriores-----	58
4.2.	Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose-----	58
4.3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting-----	58
4.4.	Caracterização cinética da atividade (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal do caranguejo <i>Goniopsis cruentata</i> recém capturado-----	60
4.4.1.	Efeito da concentração do ATP na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase-----	61
4.4.2.	Efeito da concentração de ATP e Mg <sup>2+</sup> em condições estequiométricas na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase -----	63
4.4.3.	Efeito da concentração de Mg <sup>2+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase -----	63
4.4.4.	Efeito da concentração de Na <sup>+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase -----	66
4.4.5.	Efeito da concentração de K <sup>+</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase -----	66
4.4.6.	Efeito da concentração de ouabaína na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase -----	70
4.5.	Análise da fosforilação/desfosforilação da fosfoenzima -----	71
4.6.	Efeito de diferentes inibidores na atividade ATPase da fração microsomal de brânquias de <i>Goniopsis cruentata</i> -----	71
4.7.	Efeito da salinidade na capacidade osmorregulatória de <i>Goniopsis cruentata</i>	71
4.8.	Efeito da aclimação em diferentes salinidades na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo semi-terrestre <i>Goniopsis cruentata</i> -----	74
4.9.	Análise quantitativa da expressão de RNAm da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase por qPCR em <i>Goniopsis cruentata</i> -----	76
4.10.	Efeito do peptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase branquial de <i>Goniopsis cruentata</i> -----	79
4.11.	Identificação do peptídeo FXYD2 na fração microsomal do caranguejo <i>G. cruentata</i> -----	79
4.12.	Fosforilação da subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase por PKA e PKC	80

endógenas-----	
<b>4.13.</b> Eletroforese da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase branquial de <i>G. cruentata</i> fosforilada por PKA endógena-----	<b>81</b>
<b>4.14.</b> Clonagem, sequenciamento dos cDNAs parciais, e confecção de primers específicos para a subunidade $\alpha$ da (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase e PRL10 do tecido branquial de <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>82</b>
<b>4.15.</b> Padronização e avaliação dos parâmetros reacionais dos ensaios moleculares de qPCR para os genes (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase e PRL10 na espécie <i>Goniopsis cruentata</i> -----	<b>85</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>106</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>108</b>
<b>8. CURRÍCULO VITAE</b>	<b>122</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. O caranguejo *Goniopsis cruentata*

A ordem Decapoda constitui o maior grupo dentre os crustáceos com mais de 15.000 espécies descritas e distribuídas em quase 2.800 gêneros (DE GRAVE et al., 2009). A maioria desses gêneros (80 %) é formada por animais marinhos, uma parcela menor (18%) é de água doce e estuarino, e uma pequena minoria (2%) é representada por formas terrestres e semi-terrestres (DE GRAVE et al., 2009). A infra-ordem Brachyura (Brachy = curto; uros = cauda), que engloba siris e caranguejos, apresenta cerca de 7.250 espécies descritas (DAVIE et al. 2015). Trata-se de um grupo de grande interesse biológico, econômico e social, além de se destacar como fundamental na dinâmica das relações estabelecidas nos mais diversos ecossistemas do litoral brasileiro (BOWMAN & ABELE, 1982). Entre os Brachyura, destaca-se a família Grapsidae com 44 espécies agrupadas em 8 gêneros (DAVIE et al., 2015) onde está incluído o gênero *Goniopsis* que apresenta três espécies: *Goniopsis cruentata* (LATREILLE, 1803), *Goniopsis pelii* (HERKLOTS, 1851) e *Goniopsis pulchra* (LOCKINGTON, 1876) (MELO, 1996).

A espécie *Goniopsis cruentata* (Painel 1) ou ``maria mulata/aratu`` é um caranguejo que se distribui no Atlântico Ocidental desde a Florida (EUA) até próximo ao estado de Santa Catarina (Brasil). Necessitam de água para sobreviver sendo incapazes de se manterem vivos por mais de 48 horas fora da água (ZANDERS, 1978). Este caranguejo semi-terrestre é comumente encontrado em manguezais habitando fendas, troncos caídos e raízes de árvores, assim como andando sobre a matéria orgânica (ZANDERS, 1978). Essa espécie é encontrada em salinidades que variam entre 6 e 33‰ (MARTINEZ, 1989) e sua coloração varia entre avermelhada, arroxeadada ou marrom-escura, algumas vezes com pequenas manchas de diferentes tonalidades (SANTOS et al., 2007). Estes animais são extremamente ágeis e apresentam um cefalotórax com comprimento médio estimado entre 3,03 cm para as fêmeas e 3,16 cm para os machos (SANTOS et al., 2007).

Estudos sobre a morfologia das brânquias de *G. cruentata* demonstraram a presença de nove pares de brânquias do tipo filobranquiadas. As brânquias de número 1, 2, 3 e 9 são muito pequenas, quase vestigiais, e diferem notavelmente na morfologia quando comparadas com os demais pares de brânquias. As células epiteliais das brânquias anteriores apresentam um pequeno número de mitocôndrias e uma estrutura intracelular que não é alterada em resposta à aclimação a diferentes salinidades. Já as células epiteliais das brânquias posteriores, ricas em mitocôndrias, apresentam alterações morfológicas em resposta a

aclimatação a diferentes salinidades possivelmente estando relacionadas com a capacidade regulatória deste animal (MARTELO & ZANDERS, 1986).



**Painel 1.** *Goniopsis cruentata* adulto recém capturado. (MORAES, C.M., arquivo pessoal).

A estrutura do epitélio branquial de *G. cruentata* é similar à de outros crustáceos (MARTELO & ZANDERS, 1986). Dessa forma, apesar de existirem detalhes na microanatomia e na ultraestrutura que variam de uma espécie para outra, a morfologia básica das brânquias é similar nos crustáceos em geral (TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995). As brânquias são compostas por estruturas multilamelares onde cada lamela é envolvida por uma camada cuticular. O exterior das brânquias é banhado pela água do ambiente e o seu interior é preenchido com hemolinfa (MARTELO & ZANDERS, 1986; TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995; ONKEN & RIESTENPATT, 1998). A superfície apical das células epiteliais está em contato com o meio externo e apresenta um sistema bem desenvolvido de dobras formando microvilos com 0,6 a 1  $\mu\text{m}$  de espessura, os quais aumentam a superfície de contato com o meio ambiente. Banhada pela hemolinfa, a superfície basolateral dessas células apresenta um grande número de invaginações associadas a mitocôndrias (COPELAND, 1968; MARTELO & ZANDERS, 1986; PÉQUEUX, 1995). A este sistema de mitocôndrias associadas às invaginações é dado o

nome de “bombas mitocondriais”, que é característico de epitélios transportadores de íons (COPELAND, 1968; PÉQUEUX, 1995).

Segundo Zanders (1978), em animais aclimatados em água do mar (33‰S) as concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa são mantidas um pouco mais baixas em relação ao meio externo e a distribuição desses íons possivelmente ocorre de forma passiva entre esses dois meios, ou ainda por hiporregulação da hemolinfa. Quando esses animais são aclimatados em salinidades inferiores a 25‰, ocorre hiperregulação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa e os níveis desses íons tendem a diminuir à medida que o meio externo torna-se mais diluído. Em contraste com outros animais, em *G. cruentata* a concentração iônica da hemolinfa é mantida relativamente constante quando esses caranguejos capturados a 33 ‰S são aclimatados a 2‰S. Nesse caso, ocorre uma diminuição de 18 e 13% na concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  respectivamente. Esse fato classifica esse caranguejo como regulador forte. Desta forma, essa espécie deve ter um mecanismo de regulação osmótica e iônica extremamente eficiente e de rápida resposta, capaz de manter uma grande diferença de concentração entre a hemolinfa e o meio externo, o que a torna uma espécie bem adaptada para viver em ambiente de mangue (ZANDERS, 1978).

## **1.2. Osmorregulação nos crustáceos**

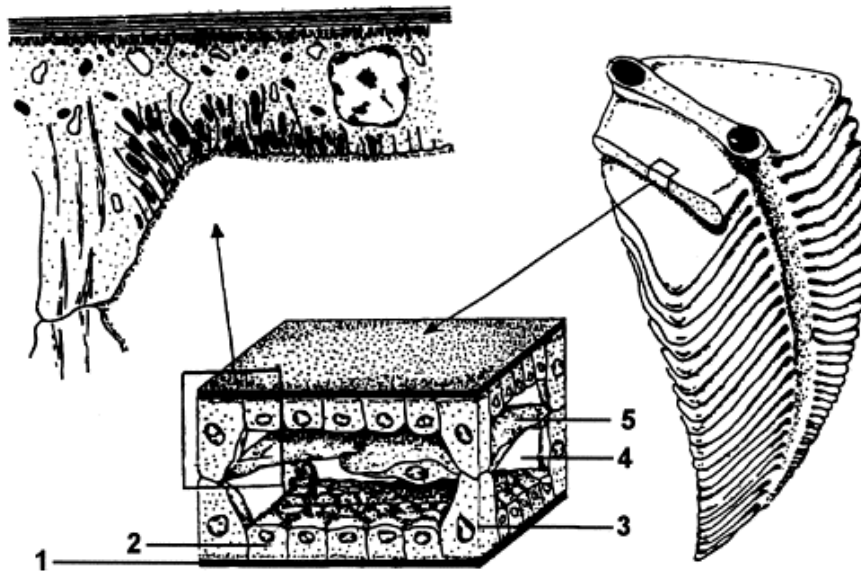
Crustacea constitui um dos maiores grupos entre os Arthropoda, com cerca de 68.000 espécies descritas (BRUSCA et al., 2016). Os primeiros crustáceos surgiram no mar há aproximadamente 600 milhões de anos e ainda hoje constituem um grupo essencialmente marinho (BARNES, 1990). Entretanto, ao longo da evolução alguns grupos de crustáceos invadiram ambientes de salinidades inferiores à da água do mar, tais como estuários, rios e lagos (SCHUBART et al., 1998). Ao invadir meios diluídos os crustáceos enfrentam influxo osmótico de água e perdas de sal por difusão através de superfícies permeáveis, alterando, portanto, o volume e a composição dos fluidos corporais destes animais e para reabsorver  $\text{Na}^+$ , estes animais se utilizam das brânquias posteriores (PÉQUEUX, 1995; OKEN e RIESTENPATT, 1998; LUCU ET AL., 2000; KIRSCHNER, 2004). Desta forma, a variação da salinidade é o fator abiótico mais importante em relação a sobrevivência do animal em diferentes ambientes, visto que o animal depende de adaptações fisiológicas, comportamental, morfológicas e bioquímicas, sendo a osmorregulação uma das mais importantes (ANGER, 1995).

Os crustáceos podem ser classificados como **estenoalinos** ou **eurialinos** devido à sua capacidade de sobrevivência em diferentes salinidades (RANDALL et al., 2000; PÉQUEUX, 1995). Os estenoalinos não conseguem sobreviver em ambientes onde ocorrem grandes variações da salinidade, diferente dos eurialinos que suportam grandes variações de salinidade. Com relação à variação da osmolalidade da hemolinfa comparada à do meio externo, os crustáceos são classificados como **osmoconformadores** ou **osmorreguladores** (PÉQUEUX, 1995; LUCU & TOWLE, 2003; FREIRE et al., 2008). Os osmoconformadores mantêm a osmolalidade da hemolinfa muito próxima à do ambiente enquanto os osmorreguladores controlam ativamente a concentração salina da hemolinfa, independentemente da concentração salina do ambiente. Os crustáceos podem ser classificados ainda como **hiperreguladores** e **hiporreguladores** (PÉQUEUX, 1995; KIRSCHNER, 2004), que diz respeito à sua capacidade de controlar a saída e/ou entrada de sais do seu organismo de acordo com a salinidade do ambiente. Os crustáceos marinhos geralmente são osmoconformadores e estenoalinos, enquanto as espécies que colonizaram com sucesso a água doce e estuários apresentam graus variados de eurialinidade, além de mecanismos eficientes de hiperosmorregulação (PÉQUEUX, 1995; ONKEN & MCNAMARA, 2002; LUCU & TOWLE, 2003).

Um exemplo da adaptação dos crustáceos em diferentes habitats é a tolerância a salinidade (SÁEZ et al., 2009). Quando a salinidade do ambiente varia, a expressão e/ou atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase é afetada (MARSHALL, 2002; EVANS et al., 2005; SÁEZ et al., 2009; MORAES, et al., 2020 – em fase de publicação). Os crustáceos possuem estratégias variadas para se adaptar à diferentes salinidades e, uma das estratégias é a variação das características das brânquias quando os animais são aclimatados em água com maior ou menor concentração salina (LAPUCKI & NORMANT, 2008). Algumas das alterações que acontecem são a diminuição da permeabilidade da membrana para a água e menor perda de íons pela consequente diminuição da superfície epitelial da brânquia quando em água doce (LAPUCKI & NORMANT, 2008). Os crustáceos também utilizam a estratégia de alterar a composição lipídica da membrana das células do epitélio branquial dependendo da salinidade (PAGLIARANI et al., 1991). Nesse sentido, um aspecto interessante nesses caranguejos é que a composição lipídica e proteica das brânquias anteriores é diferente daquela das brânquias posteriores (CHAPELLE & ZWINGELSTEIN, 1984).



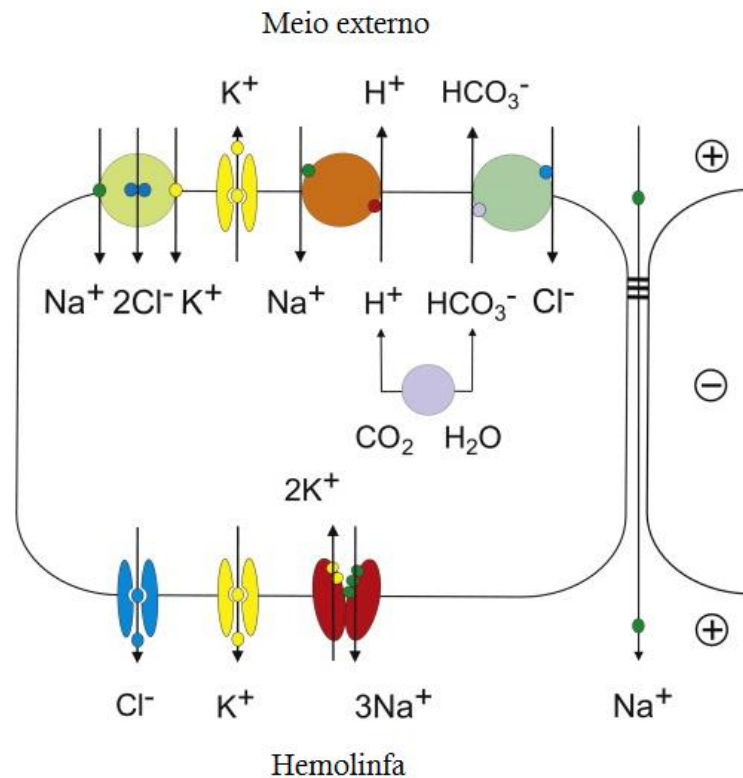
As brânquias são consideradas o principal órgão responsável pelo controle da osmolalidade da hemolinfa em crustáceos (Painel 2), embora também estejam envolvidas nas trocas gasosas (PÉQUEUX, 1995), na regulação do equilíbrio ácido-base (HENRY & WHEATLY, 1992) e na excreção de compostos nitrogenados na forma de amônia (PÉQUEUX, 1995; WEIHRAUCH et al., 2004). Mais especificamente, as brânquias posteriores são especializadas na osmorregulação destes organismos (TOWLE & WEIHRAUCH, 2001). Nos caranguejos da infra-ordem Brachyura, os tecidos relacionados com o transporte de íons estão localizados tanto na região basolateral como na apical das brânquias posteriores e apresentam uma elevada distribuição de mitocôndrias (COMPÈRE et al., 1989).



**Painel 2. Representação esquemática da morfologia e estruturas finas das brânquias de caranguejos hiperreguladores.**

1. Cutículas; 2. Células principais; 3. Células pilares; 4. Espaço onde corre a hemolinfa; 5. Septo intralamelar. Esta representação morfológica foi baseada nos estudos de microscopia de várias espécies do caranguejo *Uca* (ONKEN & RIESTENPATT, 1998).

A capacidade osmorregulatória dos crustáceos depende principalmente do fluxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  entre o meio externo e a hemolinfa (PÉQUEUX, 1995; TOWLE, 1997; HENRY et al., 2002; KIRSCHNER, 2004). Acredita-se que a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , presente na membrana basolateral do epitélio branquial dos crustáceos atua transportando ativamente  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  entre o meio intracelular e a hemolinfa, representando a principal força motriz para o estabelecimento de um gradiente eletroquímico através da membrana (Painel 3).



**Painel 3. Modelo hipotético para o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através do epitélio branquial de crustáceos permeáveis, interdiciais e estuarinos, como os braquiúros hiperreguladores.**

Apenas um lado da lamela da brânquia está representado, e a cutícula sobreposta não foi representada. (Modificado de McNAMARA & FARIA, 2012).

Esse gradiente energiza uma variedade de outros transportadores, tais como: trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  epitelial, trocador  $\text{Na}^+,\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  apical, canais de cloreto basolaterais, canais de  $\text{K}^+$  apicais e basolaterais,  $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$  apical, trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  apical, trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  apical (WILDER et al., 2000; KIRSCHNER, 2004; FREIRE et al., 2008; SÁEZ et al., 2009).

Os principais compostos nitrogenados excretados pelos crustáceos estão sob a forma de amônia ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ), independentemente de ocuparem ambiente marinho ou de água doce (WEIHRAUCH et al., 1998, 1999), sendo que a maior parte da excreção de amônia ocorre através das brânquias (WEIHRAUCH et al., 1999; TOWLE & WEIHRAUCH, 2001). Resta mencionar que, o estabelecimento dos crustáceos em meios diluídos é determinado pela habilidade de cada uma das fases de desenvolvimento em se adaptarem ao novo ambiente. Alguns animais migram entre diferentes ambientes durante seu ciclo de vida, sendo que as diferentes fases de desenvolvimento destes animais enfrentam um meio externo com diferentes salinidades. Assim, a forma como o animal osmorregula seus fluidos corporais devem se alterar durante a ontogênese, considerando que mudanças morfológicas

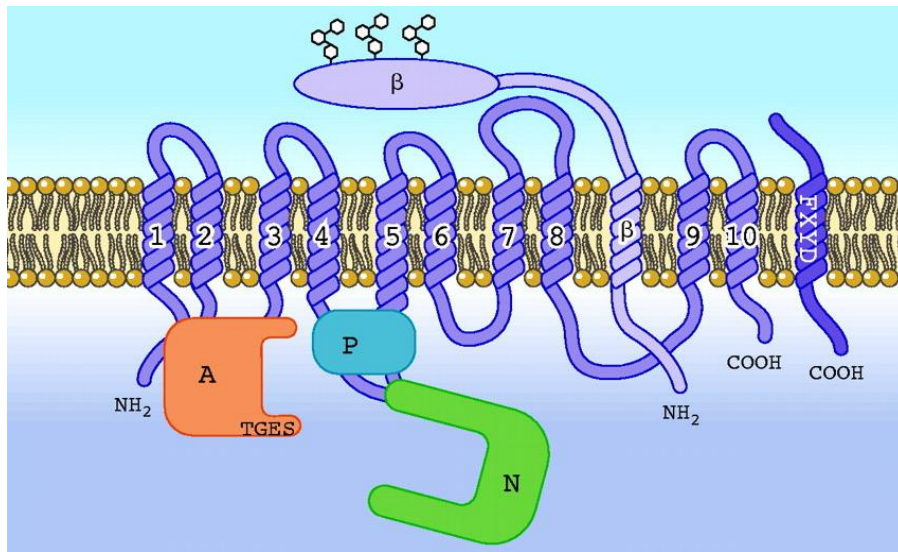
durante o desenvolvimento do animal levam a mudanças fisiológicas, aumentando sua tolerância à salinidade (CHARMANTIER, 1998).

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

A (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase (E.C. 7.2.2.13) é uma proteína transmembrana responsável pelo transporte ativo de 3 Na<sup>+</sup> para o meio extracelular e 2 K<sup>+</sup> para o meio intracelular contra um gradiente de concentração desfavorável (SHINODA et al., 2009) (Painel 4). O transporte ativo de íons através da membrana ocorre mediante a hidrólise de uma molécula de ATP (GEERING, 2001; KAPLAN et al., 2002; LEONE et al., 2015), e é responsável pelo gradiente eletroquímico gerado nas membranas das células da maioria dos eucariotos superiores. Entre 30 a 40% das moléculas de ATP da célula são utilizadas nesse processo (SKOU, 1988). Várias funções celulares são mantidas pelo gradiente eletroquímico gerado, tais como o estabelecimento do potencial de membrana, manutenção do balanço iônico, osmorregulação, regulação do pH, entre outros (CAPENDENGUY & HORISBERGER, 2005; MARTIN, 2005; PEDERSEN, 2007; POULSEN et al., 2010).

A família das ATPases contém mais de 300 membros que são classificados de acordo com o tipo de íon transportado, refletindo semelhanças e diferenças em relação a sua estrutura. Assim, os quatro grupos principais hoje conhecidos são as P-ATPases, F-ATPases, V-ATPases e M-ATPases (PEDERSEN & AMZEL, 1993). Uma subclasse das P-ATPases é a P<sub>2c</sub>-ATPase, que transporta cátions de metais alcalinos ou ainda, a P<sub>1</sub>-ATPase que transporta íons de metais de transição, como Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup> (KAPLAN et al., 2002). Durante a hidrólise do ATP, o fosfato  $\gamma$  terminal é ligado à proteína através um resíduo de aspartato (D<sup>376</sup>) presente no motivo DKTGT (Painéis 4 e 5), conservado em toda a família, formando o intermediário acil-fosfato, característica comum aos membros do tipo-P da família ATPase (KAPLAN et al., 2002; HORISBERGER et al., 2004).

A estrutura cristalina da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase tem sido estudada exhaustivamente, porém ainda muito se utiliza a estrutura de sua homóloga, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático, SERCA (TOYOSHIMA et al., 2000). A estrutura cristalina de SERCA foi obtida na presença de Ca<sup>2+</sup> em excesso, mostrando o local dos sítios de ligação deste íon na proteína. A estrutura cristalina também foi obtida na presença do seu inibidor, a tapsigargina, onde a proteína estava em uma conformação diferente daquela obtida na presença de Ca<sup>2+</sup>, o que contribuiu para o melhor entendimento de ligação de íons e inibidor em sua estrutura (HORISBERGER et al., 2004).



**Painel 4. Imagem topográfica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase na membrana.**

Estão representadas as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e o peptídeo FXYD (ou subunidade  $\gamma$ ). (Modificado de HORISBERGER et al., 2004). Na imagem também são mostrados os domínios N, P e A (TOYOSHIMA et al., 2000).

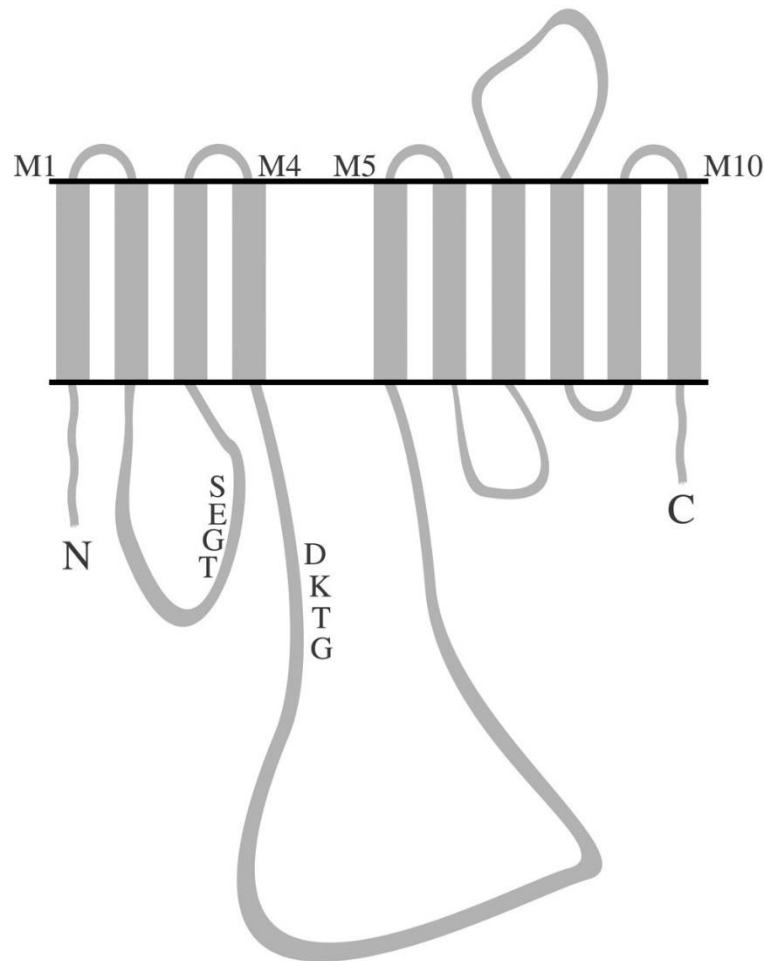
É importante ressaltar que todas as estruturas cristalinas da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase atualmente reportadas na literatura são referentes a proteína presente na membrana celular de mamíferos, representando aproximadamente 95% em relação as demais proteínas presentes na membrana celular.

Tanto a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase quanto a sua correspondente (H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase são membros da família das P<sub>2</sub>-ATPases e possuem a subunidade  $\alpha$  altamente conservada (GEERING, 2001). A subunidade  $\alpha$  é a subunidade catalítica com uma massa relativa de aproximadamente 110 kDa e, de acordo com a estrutura cristalizada da Ca<sup>2+</sup>-ATPase (TOYOSHIMA et al., 2000; KAPLAN et al., 2002) possui 10 segmentos transmembrana (TM – M1-M10) (Painel 5) onde se encontram os sítios de ligação para o ATP, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e inibidor específico, a ouabaína.

Atualmente são conhecidas quatro isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ), porém o efeito de possíveis diferenças na sequência de cada uma com relação à sua função e estrutura na enzima ainda é incipiente (KAPLAN et al., 2002). As isoformas  $\alpha_1$  (mais abundante) encontrada comumente em rins de mamíferos e no tecido cardíaco,  $\alpha_2$  no musculo esquelético,  $\alpha_3$  no tecido cerebral, enquanto a isoforma  $\alpha_4$  é encontrada majoritariamente nas células de espermatozoides (KAPLAN et al., 2002). O que deve ser

considerado para entender a função da proteína em determinada célula está estritamente relacionado com o que se conhece sobre tecido-especificidade e isoforma-especificidade.

De acordo com o Paine 2, observa-se que a subunidade  $\alpha$  atravessa a membrana formando alças tanto nos espaços extra, quanto nos espaços intracelulares, porém tanto o N- como o C-terminal da cadeia proteica estão localizados no interior da célula. Quando se compara a estrutura da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  com a da SERCA, observa-se diferença apenas na alça M7-M8 que é mais longa na  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ . O contato com a subunidade  $\beta$  através deste segmento pode ser considerado uma justificativa para tal fato (KAPLAN et al., 2002).



**Painel 5: Imagem topográfica da subunidade  $\alpha$ .**

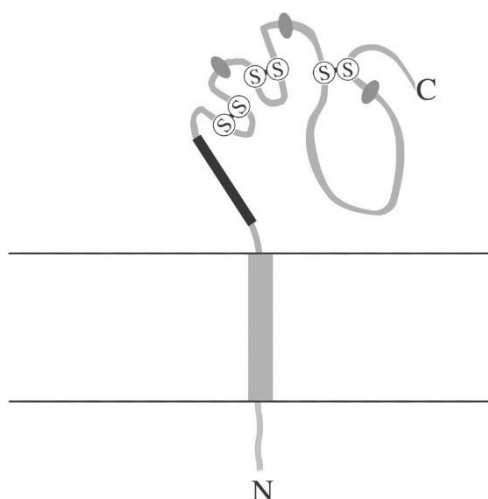
Podem ser observados os 10 segmentos transmembrana (M1-M10), as voltas curtas na região extracelular e as mais longas na região intracelular. (KAPLAN et al., 2002).

Outra alça importante, localizada no espaço intracelular, é a M4-M5 que contém aproximadamente 430 resíduos aminoácidos. Nessa alça encontram-se o domínio de fosforilação (P) e o do nucleotídeo (N) (KAPLAN et al., 2002; TOYOSHIMA et al., 2000). É nessa alça que ocorre a fosforilação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase pelo ATP que, conseqüentemente, leva à formação do intermediário acil-fosfato. A porção N-terminal intracelular (ver Painel 1) é composta por cerca de 90 resíduos de aminoácidos e é denominada domínio A (TOYOSHIMA et al., 2000). Existe uma interação entre os domínios A, P e a alça M2-M3, e essa interação é favorecida pela ligação dos íons ou quando ocorre a fosforilação da enzima.

A subunidade  $\beta$  possui massa molecular relativa de 55 kDa correspondendo a aproximadamente 370 resíduos de aminoácidos. Dos 370 aminoácidos, cerca de 30 ficam expostos no espaço extracelular, enquanto o restante permanece no espaço intramembrana (Painel 6). Essa topologia classifica a subunidade  $\beta$  como uma proteína do Tipo II, ou seja, aquela que atravessa apenas uma vez a membrana celular (KAPLAN et al., 2002). Similarmente à subunidade  $\alpha$ , ela também apresenta quatro isoformas conhecidas (KAPLAN, 2002).

A subunidade  $\beta$  é altamente glicosilada na porção extracelular apresentando 3 ligações dissulfetos (S-S) devido a presença de 6 cisteínas na sua estrutura e três sequências consenso de N-glicosilação, NXS ou NXT (KAPLAN et al., 2002; ARMESTO, 2014). Estudos recentes mostram que a subunidade  $\beta$  pode ser deglicosilada sem perda da atividade, porém, a redução das pontes dissulfeto por  $\beta$ -mercaptoetanol resulta na perda da atividade enzimática. A perda da atividade e clivagem redutora das ligações S-S podem ser evitadas na presença simultânea de K<sup>+</sup> e agentes redutores (KAPLAN et al., 2002).

É importante salientar que as subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , são essenciais para a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. Quando expressada na ausência da subunidade  $\beta$ , nenhuma atividade ATPase significativa é observada (GATTO et al., 2001). Até recentemente, a subunidade  $\beta$  era conhecida apenas pela sua importância na expressão correta da subunidade  $\alpha$  na membrana, porém novas evidências mostram que essa subunidade também participa de alguma forma no ciclo e no mecanismo de reação da enzima, assim como efeitos na afinidade dos íons são também observados quando modificações estruturais acontecem nesta subunidade (CHOW & FORTE, 1995; HASLER et al., 1998, KAPLAN et al., 2002). Mais ainda, interações com a subunidade  $\beta$  são extremamente importantes na adesão celular.

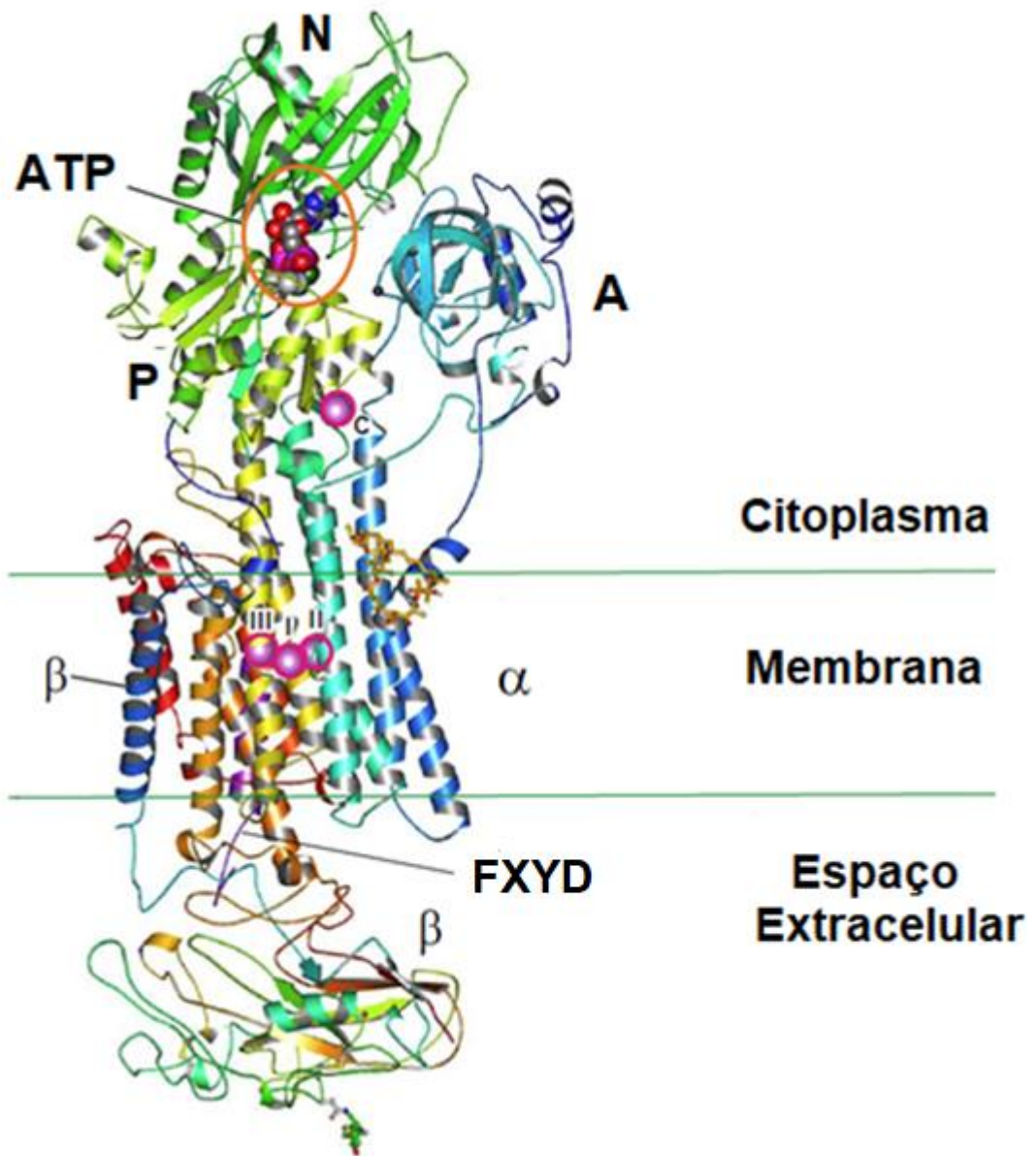


**Painel 6. Imagem topográfica da subunidade  $\beta$ .**

Pode ser observado o único segmento na membrana, sendo a cauda N-terminal localizada no meio intracelular e a C-terminal, assim como os resíduos de açúcar e ligações dissulfeto na porção extracelular. A linha mais grossa indica a porção da estrutura que interage com a subunidade  $\alpha$ . (KAPLAN et al., 2002).

O papel no mecanismo catalítico da enzima pode estar relacionado com a sua estabilidade, já que quando  $K^+$  é desocluído do seu sítio de ligação na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, a enzima perde sua função. Assim, pode-se dizer que a subunidade  $\beta$  estabiliza o  $K^+$  no seu sítio de ligação durante o ciclo catalítico sugerindo interações  $\alpha\beta$  (Painel 7) essenciais para a atividade da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase (GEERING, 2001; KAPLAN et al., 2002).

Além das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , a presença do peptídeo FXYD ou subunidade  $\gamma$  tem sido reportada não só em mamíferos, mas também crustáceos (SILVA et al., 2012). O peptídeo apresenta uma massa relativa de aproximadamente 7 kDa com aproximadamente 64-70 resíduos de aminoácidos. É importante ressaltar que esse peptídeo não é observado em todas as células de mamíferos e crustáceos, e já foi relatado que não é essencial para o funcionamento da enzima (THERIEN & DEBER, 2002). A principal função do peptídeo FXYD está relacionada a regulação da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase, o que influencia na afinidade da proteína pelo  $Na^+$  e  $K^+$  (ARYSTARKHOVA et al., 1999; THERIEN & DEBER, 2002, KANAI, et al., 2013), assim como o peptídeo também influencia na eficiência catalítica da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase, aumentando sua atividade.



**Painel 7. Estrutura do complexo  $\alpha\beta\gamma$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  do rim de porco ligada à  $\text{Na}^+$ , ADP e  $\text{AIF}_4^{2-}$ .**

As cores mudam gradualmente entre a extremidade amino terminal (azul) e carboxi terminal (vermelho) para a subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\gamma$  está apresentada em roxo. Os íons sódio estão representados por esferas roxas. A linha verde representa o limite hidrofóbico da bicamada lipídica. OLA = oligomicina (Adaptado de KANAI et al., 2013).



#### 1.4. Ciclo catalítico da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase

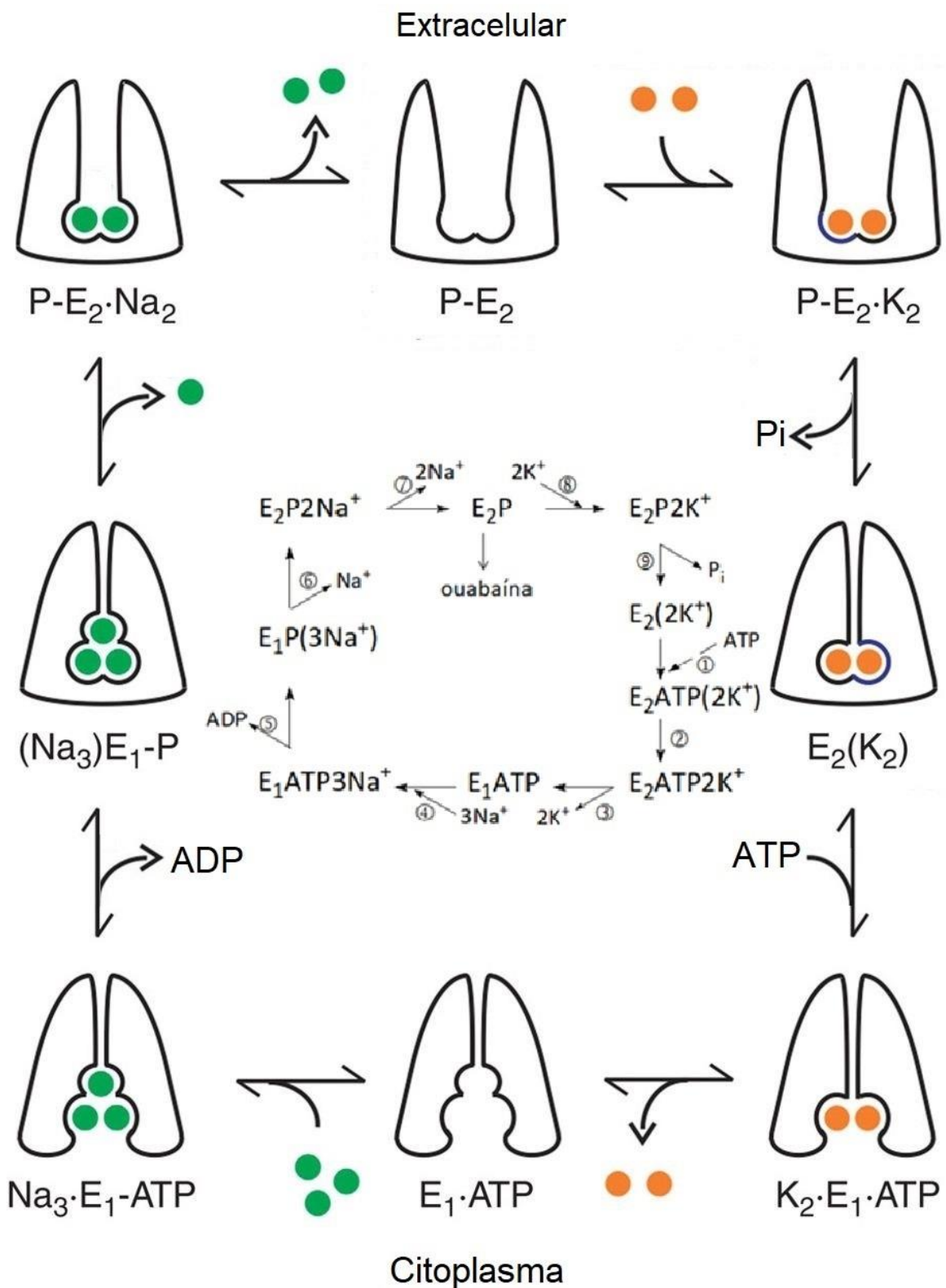
O mecanismo de reação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase é baseado nas propriedades bioquímicas dos intermediários fosforilados, reações bioquímicas parciais catalisadas pela enzima e as suas relações com o transporte parcial das reações. Por ser parte da família das P-ATPases, uma característica importante a ser ressaltada é que, pode ser encontrada em duas conformações principais, E<sub>1</sub> e/ou E<sub>2</sub>. (HORISBERGER et al., 2004). O que difere uma conformação da outra é a afinidade de cada uma por Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, sensibilidade por ADP, ATP e proteólise, e finalmente, fluorescência.

A forma E<sub>1</sub> tem alta afinidade por Na<sup>+</sup> citoplasmático, enquanto a forma E<sub>2</sub> tem alta afinidade por K<sup>+</sup> extracelular. O Painel 8 mostra de maneira simplificada o ciclo catalítico da enzima. De acordo com esse modelo, a etapa inicial do ciclo reacional consiste na ligação de uma molécula de ATP (etapa ①) à forma E<sub>2</sub>(2K), com uma baixa afinidade aparente. Nesta conformação, os dois K<sup>+</sup> estão ocluídos no interior da enzima (JORGENSEN et al., 1998, 2003; KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2004). A ligação do ATP ao seu sítio acelera a mudança conformacional de E<sub>2</sub>ATP(2K) para a forma E<sub>1</sub>ATP2K (etapa ②), onde os K<sup>+</sup> estão desocluídos, ocorrendo simultaneamente a reorientação dos sítios de ligação de cátions do lado extracelular para o citoplasma. A liberação dos K<sup>+</sup> (etapa ③) para o citoplasma e a sua substituição por dois íons Na<sup>+</sup> dá origem à forma E<sub>1</sub>ATP(2Na) (não mostrado). A ligação de um terceiro Na<sup>+</sup> citoplasmático a enzima dá origem à forma E<sub>1</sub>ATP(3Na) (etapa ④) provocando um rearranjo dos segmentos transmembrana da subunidade α (KAPLAN, 2002) que é propagado para os domínios citoplasmáticos induzindo o posicionamento adequado do resíduo de aspartato que será fosforilado pelo ATP já ligado à enzima (RICE et al. 2001; KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2004). A fosforilação da enzima, bem como a liberação de ADP (etapa ⑤), provoca uma transição para a forma E<sub>1</sub>P(3Na), na qual os íons Na<sup>+</sup> permanecem ocluídos. A enzima sofre então uma rápida isomerização passando para a forma E<sub>2</sub>P(2Na) liberando simultaneamente um Na<sup>+</sup> (etapa ⑥) para o meio extracelular (KAPLAN, 2002; HORISBERGER, 2004). As etapas de fosforilação e isomerização ocorrem de maneira acoplada à reorientação dos sítios de ligação de cátions do meio citoplasmático para o meio extracelular. A desocclusão dos dois Na<sup>+</sup> (etapa ⑦) restantes provoca a passagem para a forma E<sub>2</sub>P e a liberação dos íons para fora da célula. Finalmente, a ligação de dois íons K<sup>+</sup> (etapa ⑧) extracelulares à forma E<sub>2</sub>P catalisa a desfosforilação da enzima (etapa ⑨), que volta à forma E<sub>2</sub>(K), reiniciando assim o ciclo catalítico.

É importante salientar que embora as trocas catiônicas sejam isoenergéticas (ocorrem sem a hidrólise do ATP), o transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  com uma estequiometria fixa (3:2) requer a hidrólise do ATP. Sendo assim, 3  $\text{Na}^+$  são necessários para o início do ciclo e 2  $\text{K}^+$  se ligam para reiniciar o ciclo. Durante este processo, os sítios de ligação do nucleotídeo (domínio N) e fosforilação (domínio P) são abertos e fechados. A geração de um gradiente transmembrana é a consequência desta troca assimétrica de carga (KAPLAN et al., 2002; HORISBERGER, 2004). Já é conhecido que os íons se ligam em uma região transmembrana da proteína uma vez que após tratamentos de proteólise, onde foram removidos diversos fragmentos extracelulares da proteína, o  $\text{K}^+$  ainda era capaz de se ligar e ocluir na enzima (KAPLAN, 2002). Em adição ao processo de hidrólise da molécula de ATP, existe também o transporte ativo desses íons em diferentes regiões da proteína, mais especificamente nas alças M4 e M5.

As propriedades físico-químicas da membrana afetam a atividade da enzima de diferentes maneiras, como por exemplo, a espessura (JOHANSSON et al., 1981), composição de fosfolípidios (VEMURI & PHILIPSON, 1989) e a fluidez da membrana (KIMELBERG & PAPAHAJIOPOULOS, 1974). O microambiente lipídico apresenta influência sobre a enzima, interferindo nas propriedades cinéticas e termodinâmicas (MATSUDA & IWATA, 1986; ALMANSA et al., 2003; TOWLE & COPENHAVER, 1970; HARRIS, 1985; ELSE & WU, 1999). Uma alteração neste microambiente que favoreça a fluidez da membrana, irá consequentemente aumentar a atividade enzimática (BYSTRIANSKY & BALLANTYNE, 2006).

A regulação da ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase envolve um conjunto variável e complexo de fatores, que atuam a curto e longo prazo (PRESSLEY et al., 2005; MIJATOVIC et al., 2007). A regulação em curto prazo envolve efeitos diretos no comportamento cinético da enzima ou na translocação da enzima entre a membrana plasmática e os locais de estoque intracelulares (THERIEN & BLOSTEIN, 2000; FERAILLE et al., 2003). Esta regulação também pode ser desencadeada pela fosforilação/desfosforilação da enzima ou então pelo aumento da afinidade da enzima pelo  $\text{Na}^+$  (MIJATOVIC et al., 2007). Por outro lado, a regulação de longo prazo geralmente envolve mudanças na transcrição gênica, na tradução e na degradação da proteína (SEOK et al., 1998; THERIEN & BLOSTEIN, 2000). A ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )-ATPase também pode ser regulada por uma série de hormônios e fatores que atuam tanto a curto quanto a longo prazo (CORNELIUS & MAHMMOUD, 2003; HANSEN, 2003; FERAILLE et al., 2003; PRESSLEY et al., 2005; MIJATOVIC et al., 2007).



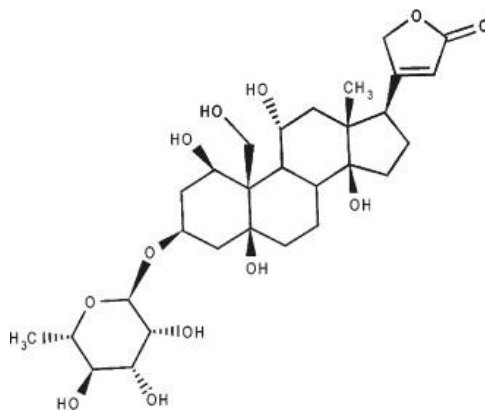
**Painel 8. Modelo de Alberts-Post para o ciclo catalítico da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .**

Modificado de Kaplan, 2002; Castillo et al., 2015.

### 1.5. Inibidores da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase

A (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase é inibida especificamente por esteroides cardiotônicos dos quais a ouabaína é o mais representativo (Painel 9), inibindo de modo específico tanto a atividade catalítica quanto o transporte iônico (DORIS, 1994; LINGREL et al., 1997; EMERY et al., 1998; KOENDERINK et al., 2000; KAPLAN, 2002; CRAMBERT et al., 2004; DOSTANIC-LARSON et al., 2006; NESHER et al., 2007). A ouabaína liga-se com alta afinidade à forma E<sub>2</sub>P e a interação enzima-ouabaína envolve resíduos das subunidades α e β (QIU et al., 2005; OGAWA et al., 2009). A identificação deste inibidor, concomitantemente à identificação da proteína, acoplado ao movimento de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> para fora e dentro da célula, respectivamente, é um conhecimento extremamente importante para o estudo da regulação eletrolítica e transporte ativo de íons na (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase.

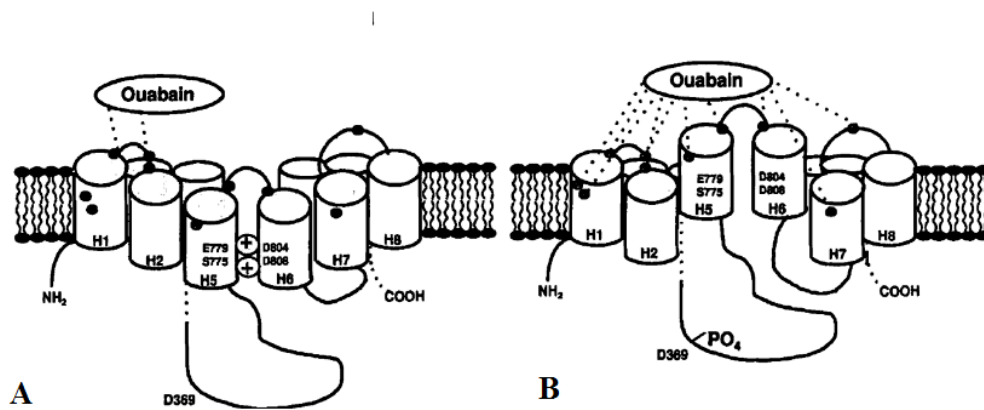
A ouabaína é um esteróide extraído de sementes maduras de plantas africanas *Strophantus gratus* e *Acokanthera ouabaio*, que interage com a porção extracelular da subunidade α e se liga com maior afinidade à forma E<sub>2</sub>P (Painel 10) bloqueando o transporte de íons e a hidrólise do ATP (ERDMAN & SHONER, 1973; YODA & YODA, 1972; ASAMI et al., 1995; LINGREL et al., 1997). Devido às suas características, este esteróide tem sido usado há mais de 200 anos no tratamento de doenças cardíacas (OGAWA et al., 2009), apesar da sua ligação com a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase não estar completamente elucidada.



**Painel 9. Estrutura da ouabaína.** (CORNELIUS & MAHMMOUD, 2009).

A (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase também pode ser inibida por vanadato, um inibidor típico das P-ATPases, formando um complexo com a conformação E<sub>2</sub> e, conseqüentemente impedindo a sequência do ciclo catalítico (NECHAY, 1984; MCGREGOR & WALKER, 1993;

DAFINIS & SABATTINI, 1994; BOXENBAUM et al., 1998; FEDOSOVA et al., 1998; RICE et al., 2001). Elevadas concentrações de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e metais pesados também inibem a atividade enzimática.



**Painel 10. Interação da ouabaína com a subunidade  $\alpha$ .**

Conformação com (A) baixa afinidade pela ouabaína. (B) conformação com alta afinidade pela ouabaína. (Modificado de LINGREL et al., 1997).

**1.6. (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de crustáceos**

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é a principal força promotora que dirige o movimento transepitelial de íons monovalentes através das brânquias e outros tecidos em muitos animais, incluindo os crustáceos (LUCU; TOWLE, 2003). A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de crustáceos, assim como de todas as outras células animais, é formada por uma subunidade  $\alpha$  catalítica e uma subunidade  $\beta$  glicosilada (PETERSON et al., 1978). Recentemente, foi confirmada a presença de um peptídeo FXYD2 (subunidade  $\gamma$ ) associada à (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial do siri *Callinectes danae*, que tem um papel importante na regulação da atividade enzimática (SILVA et al., 2012). A sequência de aminoácidos da subunidade  $\alpha$  de crustáceos apresenta entre 70-74% de identidade com as sequências da subunidade  $\alpha$  de vertebrados (MACÍAS et al., 1991; PRESSLEY et al., 1992; TOWLE et al., 2001; FALEIROS et al., 2010).

O estudo da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de crustáceos como marcador molecular da sua adaptação a biótopos de diferentes salinidades vem sendo desenvolvido em nossos laboratórios desde 1997, com a caracterização bioquímica da enzima do camarão de água doce *Machrobachium olfersii* (FURRIEL et al., 2000; 2001). Além da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi observada a presença de uma V(H<sup>+</sup>)ATPase, que corresponde a cerca de 18% da atividade

ATPase total e pode ter um papel crucial na captura de íons pelos crustáceos capazes de adaptar-se à água doce (LEONE et al., 2005a). A presença de uma  $V(H^+)ATPase$ , correspondendo a 18% da atividade ATPase total, também foi detectada no tecido branquial do camarão marinho *Xiphopenaeus kroyeri* (LEONE et al., 2015a) e em *Dilocarcinus pagei* aclimatado a 5‰ e 21‰ (FIRMINO et al., 2009). Uma  $V(H^+)ATPase$  presente na fração microsomal de *Macobachium amazonicum* revelou importantes diferenças nas características cinéticas da enzima de animais juvenis e adultos, sugerindo que a regulação pode ser estágio-específica (LUCENA et al., 2015).

Nos crustáceos braquiúros, a  $(Na^+,K^+)-ATPase$  é mais expressa nas brânquias posteriores quando comparada às anteriores e é encontrada predominantemente em células ricas em mitocôndrias que são bioquímica e morfologicamente especializadas para mediar a captação de  $NaCl$  do meio (COMPÈRE et al., 1989; GOODMAN; CAVEY, 1990; HARRIS; SANTOS, 1993; LUCU; TOWLE, 2003).

A atividade específica da  $(Na^+,K^+)-ATPase$  branquial de *M. olfersii* aclimatado durante 10 dias a 21‰ diminui cerca de 2 vezes, comparada com a de animais mantidos em água doce. Essa diminuição aparentemente não está associada a uma menor concentração da enzima, como relatado para vários outros crustáceos, mas pode derivar da expressão de uma isoenzima diferente (MENDONÇA et al., 2007). A caracterização cinética da  $(Na^+,K^+)-ATPase$  branquial do siri eurialino *Callinectes danae* recém capturado a 33‰ mostrou, de maneira inédita, a presença de dois sítios para o ATP numa enzima de crustáceo, similarmente à enzima dos mamíferos (MASUI et al., 2002). Posteriormente, a presença desses dois sítios também foi relatada para a enzima de *M. amazonicum* (SANTOS et al., 2007; LEONE et al., 2014), do ermitão *Clibanarius symmetricus* (GONÇALVES et al., 2006; LUCENA et al., 2012 como *Clibanarius vittatus*), do siri *Callinectes ornatus* (GARÇON et al., 2007; 2009) e camarão *Macrobrachium rosenbergii* (FRANÇA et al., 2013).

A interação da enzima de *C. danae* com  $K^+$  e  $NH_4^+$  é diferente daquela dos mamíferos, uma vez que ela exibe um sítio adicional para o amônio que estimula sinergicamente a atividade da  $(Na^+,K^+)-ATPase$  em concentrações saturantes de  $Na^+$  e  $K^+$  devido ao aparecimento de um segundo sítio para  $NH_4^+$  (MASUI et al., 2002). Essa estimulação por  $K^+$  e  $NH_4^+$  também foi observada para a enzima de *M. olfersii* (FURRIEL et al., 2004), *C. symmetricus* (GONÇALVES et al., 2006 como *Clibanarius vittatus*), *M. amazonicum* (SANTOS et al., 2007) e *C. ornatus* (GARÇON et al., 2007; 2009) levando à proposição de

uma mudança no atual modelo hipotético para a excreção ativa de amônia devido à uma estimulação da atividade “extra-pumping” da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  pelo  $\text{NH}_4^+$  e inibição por  $\text{Mg}^{2+}$  decorrente do aparecimento de um segundo sítio para  $\text{NH}_4^+$  (LEONE et al., 2005a). Foi demonstrado também que essa estimulação sinérgica pelo  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  é espécie e estágio específica (LEONE et al., 2014). A aclimação de *M. amazonicum* em diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  comprovou o modelo proposto (MASUI et al., 2005a; LEONE et al., 2005a), uma vez que a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  aumentou com o aumento da concentração do  $\text{NH}_4^+$  (PINTO et al., 2016).

Embora a contribuição dos sítios de alta e baixa afinidade para o ATP para a velocidade máxima da enzima de *C. danae* é a mesma tanto para  $\text{Na}^+$  como para  $\text{K}^+$ , no caso do  $\text{K}^+$  existe uma concentração limiar que dispara o aparecimento dos sítios de alta afinidade para o ATP (MASUI et al., 2008). Por outro lado, a aclimação desse siri em salinidade de 15‰ resultou no desaparecimento da família de sítios de alta afinidade para o ATP provocando um aumento de 10 vezes na afinidade da enzima pelo  $\text{K}^+$ , quando na presença de  $\text{NH}_4^+$  (MASUI et al., 2009).

A caracterização cinética da atividade  $\text{K}^+$ -fosfatase da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  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 como *Clibanarius vittatus*) mostrou que o p-nitrofenilfosfato, um substrato sintético, pode ser utilizado em estudos comparativos de osmorregulação apresentando uma excelente correlação com a atividade  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  da enzima. Interessantemente, apenas para *C. ornatus* aclimatado a 21‰ e 33‰, foi observada uma estimulação sinérgica da atividade  $\text{K}^+$ -fosfatase pelo  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$ , 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  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  das brânquias posterior de *C. danae* mostrou que essas moléculas inibem a atividade da bomba, competindo com o  $\text{Na}^+$  nos sítios de ligação desse metal, bem como inibido a desfosforilação da enzima (SILVA et al., 2008), e que o peptídeo FXYD2 controla a atividade enzimática, assim como sua afinidade por cátions (SILVA et al., 2008). A presença desse peptídeo FXYD2 também foi observada em preparações microsomais da

(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de brânquia posterior de *C. danae* apresentando inclusive um importante papel na regulação da enzima (SILVA et al., 2012).

Espermina e espermidina inibem a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de *C. ornatus* (GARÇON et al., 2011). Espermidina e putrescina também inibem consideravelmente a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de *M. amazonicum* afetando não somente as características cinéticas da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, 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). Estudos recentes mostraram que poliaminas exógenas inibem a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de *M. amazonicum* de maneira espécie e estágio específica, e 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase ligando-se diretamente à molécula da enzima (LUCENA et al., 2019b).

O estudo da ontogenia da osmorregulação em *M. amazonicum* revelou uma dramática atividade osmorregulatória da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase nas etapas iniciais embora a enzima não tenha uma atividade significativa nas fases finais da ontogenia (LEONE et al., 2012). Estudos realizados com brânquias posteriores de *C. ornatus* mostraram que elas respondem de maneira diferente ao stress osmótico. A diminuição da atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase sinaliza a necessidade de síntese de nova enzima, o que foi constatado pelo aumento da expressão de RNAm para a subunidade  $\alpha$  (LEONE et al., 2015b). Cerca de 1 h após a transferência dos animais para salinidade de 21‰ a atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase diminui. Entretanto a atividade inicial é recuperada após 24 h e aumenta 2,5 vezes depois de 10 dias de aclimação (LEONE et al., 2015b).



## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo a caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de caranguejo *Goniopsis cruentata* recém capturado. Ele faz parte da linha de pesquisa “(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de brânquias de crustáceos: um marcador molecular para avaliar a adaptação a biótopos de diferentes salinidades”. Com este estudo pretende-se contribuir para uma melhor compreensão das adaptações fisiológicas e bioquímicas associadas à ocupação de diferentes ambientes pelos crustáceos, além de poder também elucidar importantes aspectos sobre a evolução, relação filogenética e a conquista do ambiente dulcícola/terrestre.

## 2.2. Objetivos Específicos

A fim de alcançar os objetivos propostos foram realizadas as seguintes etapas:

- 1) Obtenção da fração microsomal rica em (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase a partir das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata* recém capturado;
- 2) Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em relação aos efetores ATP, potássio, magnésio, sódio, amônio e o inibidor ouabaína;
- 3) Análise do efeito de inibidores na atividade ATPase total da fração microsomal a fim de detectar a possível presença de outras ATPases na membrana;
- 4) Análise da fração microsomal por Eletroforese;
- 5) Identificação da presença da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores de *G. cruentata* por Western Blotting;
- 6) Análise da preparação microsomal em gradiente contínuo de sacarose;
- 7) Análise dos efeitos do peptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase;
- 8) Análise da expressão de RNA mensageiro da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de animais aclimatados em diferentes salinidades;
- 9) Efeito das proteínas kinases A e C na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase;
- 10) Análise do efeito da aclimação dos animais em diferentes salinidades nos parâmetros cinéticos da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase;
- 11) Análise do efeito da fosforilação/ desfosforilação da fração microsomal por  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ .

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3.1. Materiais

Todas as soluções utilizadas nesse trabalho foram preparadas utilizando água ultrapura apirogênica, obtida a partir do tratamento sucessivo em aparelhos MilliRO e MilliQ (Merck Millipore, USA). Adenosina trifosfato, sal de Tris, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico (Hepes), imidazol, tris (hidroximetil) aminometano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, ortovanadato de sódio, dibutilil cAMP (db-cAMP), forskolina, tapsigargina, aurovertina B, bafilomicina A<sub>1</sub>, alameticina, ácido etacrínico, teofilina, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD<sup>+</sup>, NADH, piruvato kinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato kinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gliceraldeído-3-fosfato (G3P), dietilpirocarbonato (DEPC), fosfatidil serina (PS), queleritrina, H89, forbol meristato acetato (PMA), Tween-20, 3-fosfogliceraldeído dietil acetal (GAP), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT), leupeptina, antipaína, benzamidina, pepstatina, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF), triptona, extrato de levedura e ampicilina foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). Trietanolamina (TEA), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), cloreto de cálcio, 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<sup>+</sup>) foram adquiridas da BioRad (Hercules, USA). O padrão de peso molecular Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (M<sub>r</sub> 10-260 kDa), foi adquirido da Thermo Scientific (Massachusetts, EUA). O reagente Trizol<sup>®</sup>, DNase I livre de RNase e os kits SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System, oligo (dT) primer, SYBR<sup>®</sup> Safe Gel stain, Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity, PureLink<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit, TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing and Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix foram adquiridos da Thermo Scientific (Carlsbad, USA). O anticorpo monoclonal α-5 contra a subunidade α da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,2 mol L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, pH 7,5 e após ter sido 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 a remoção total dos íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, foi adicionado tampão Hepes 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5 até completar o volume inicialmente utilizado. Para a enzima FGQ a suspensão foi tratada exatamente como descrito acima. Entretanto, a solução de GAFDH foi preparada em tampão Hepes 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5, contendo DTT mmol L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram usadas dentro de um período máximo de três dias.

A concentração final das proteases no coquetel de inibidores utilizado nas preparações da fração microsomal é a seguinte: leupeptina 5 µmol L<sup>-1</sup>, antipaína 5 µmol L<sup>-1</sup>, benzamidina 1 mmol L<sup>-1</sup>, pepstatina A 1 µmol L<sup>-1</sup> e PSMF 5 µmol L<sup>-1</sup>. A solução estoque dos inibidores foi preparada 100 vezes mais concentrada sendo diluída no 100 vezes momento do uso com o tampão de homogeneização. A 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.

A solução estoque de ATP foi preparada utilizando ATP (sal de Tris) e sua concentração final (100 mmol L<sup>-1</sup>) foi acertada através da determinação da absorbância da solução em 260 nm ( $\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 7,0} = 15.400 \text{ mol L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e pH ajustado para 7 com trietanolamina (d= 1,12 g mL<sup>-1</sup>).

A solução de G3F (20 mmol L<sup>-1</sup>), foi preparada imediatamente antes do uso, através da hidrólise de 15 mg de 3-fosfoglicer aldeído dietil acetal dissolvido em 1 mL de água ultrapura MilliQ, com 150 µL de HCl concentrado (d=1,18 g mL<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida em banho-maria a 90 °C durante 2 min e em seguida, cloreto de bário formado na reação foi removido pela adição de Dowex 50H<sup>+</sup>, seguindo as recomendações do fabricante (ver Product Information. Sigma 65376). Após a remoção da resina por centrifugação, a solução resultante foi neutralizada até pH 7,5 com 50 µL de trietanolamina pura (d= 1,12 g mL<sup>-1</sup>).

A solução estoque de ortovanadato de sódio (1 mmol L<sup>-1</sup>) foi preparada de acordo com Lucena et al. (2015). O pH da solução 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 ( $\epsilon_{260 \text{ nm, pH } 10,0} = 3,550 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A solução estoque foi diluída 1000 vezes para a determinação exata da concentração do vanadato. Finalmente, alíquotas de 1 mL foram congeladas em tubos Eppendorf e estocadas a -20° C até o momento do uso. A diluição da solução estoque não altera significativamente o pH.

A solução estoque de aurovertina B foi preparada em etanol. 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 do caranguejo *Goniopsis cruentata* com aproximadamente 3 cm de carapaça e cerca de 15 g ( $14,1 \pm 1,7$ ) foram coletados durante a maré baixa no mangue da Barra Seca em Ubatuba ( $23^{\circ}24'58.9''S$   $45^{\circ}03'02.9''W$ ), no litoral norte do Estado de São Paulo. As coletas foram realizadas sob licença do ICMBio/MMA (número de registro SISBIO 29594-12), através de busca ativa. Os caranguejos foram transportados para o laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da FFCLRP/USP, individualmente em recipientes plásticos (20×20 cm) fechados contendo uma lâmina (1 cm) de água do local da coleta.

Para os experimentos de cinética enzimática, os caranguejos foram mantidos nessas condições até o momento da preparação da fração microsomal. São considerados animais recém capturados os que chegam no laboratório e dentro de um período máximo de 12h a fração microsomal é preparada. No caso dos experimentos de aclimatação (ver item 2.8), após um período de acondicionamento de três dias, os espécimes foram divididos em quatro grupos e aclimatados a diferentes salinidades (10, 20, 30 e 40 ‰) durante 5 dias. Os caranguejos foram alimentados em dias alternados com camarão ou peixe.

### **3.3. Extração das brânquias e preparação da fração microsomal**

Para cada preparação foram utilizados 15 caranguejos. Os animais foram anestesiados em gelo picado durante 5 min, as brânquias foram removidas e transferidas imediatamente para o tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L<sup>-1</sup>, Tris.HCl 6 mmol L<sup>-1</sup> 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 (cerca de 1,5 g de brânquias, peso úmido) e em seguida homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 mL g<sup>-1</sup> brânquia) utilizando um homogeneizador Potter, ajustado para 600 rpm.

O homogeneizado obtido foi centrifugado a 20.000 ×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 e os sobrenadantes resultantes das duas centrifugações foram gentilmente

misturados e submetidos a uma nova centrifugação a  $100.000 \times g$  durante 90 min, a  $4^\circ C$  em uma ultracentrífuga Hitachi 55P-72. Finalmente, o *pellet* resultante (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão de homogeneização ( $15 \text{ mL g}^{-1}$  de brânquia) e alíquotas de aproximadamente  $0,5 \text{ mL}$  foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^\circ C$  por um período não superior a 4 meses. Quando necessário os tubos foram descongelados e mantidos em gelo picado durante um período de até 4 h.

### **3.4. Dosagem de proteína**

A concentração de proteínas da fração microsomal foi determinada conforme descrito por Read & Northcote (1981), empregando-se soralbumina bovina como padrão. A absorbância das amostras e do padrão foi estimada em  $595 \text{ nm}$  utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800.

### **3.5. Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose**

Uma alíquota ( $2,5 \text{ mg}$  de proteína) da fração microsomal rica em ATPase branquial foi colocada na superfície de um gradiente contínuo de sacarose  $10\%-50\%$ , (p/v) em tampão imidazol  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,8 e centrifugado a  $180.000 \times g$  durante 3 h, a  $4^\circ C$ , em um rotor vertical Hitachi PV50T2. Frações de  $0,5 \text{ mL}$  foram coletadas a partir do fundo do tubo e a atividade ATPase total, atividade ATPase insensível à ouabaína, concentração de proteína e índice de refração foram analisadas em cada fração coletada.

### **3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida ( $5\%-20\%$ , p/v) conforme descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, uma metade do gel foi submetida a uma eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose e a outra metade foi corada com nitrato de prata para revelação das proteínas. Para a determinação da  $M_r$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  foi utilizado o padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder.

### **3.7. Western Blotting**

A eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando uma corrente de  $300 \text{ mA}$  com voltagem livre durante 90 min, a  $4^\circ C$ , em um sistema de eletroforese Gibco BRL Mini-V 8-10 (Gaithersburg, USA) de acordo com Towbin et al.

(1979). Após a eletrotransferência, membrana de nitrocelulose foi bloqueada com uma solução de soralbumina bovina 10% (p/v) em tampão TBS-Tween (Tris.HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol L<sup>-1</sup> e Tween-20 0,05%), durante 90 min, sob agitação constante e a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada cinco vezes com tampão TBS-Tween e em seguida foi incubada durante 16 h, a 5 °C, com o anticorpo policlonal primário anti-(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de galinha (diluição 1:150 em uma solução de soralbumina bovina 5% em tampão TBS-Tween). Após cinco lavagens com o tampão TBS-Tween a membrana foi incubada durante 1 h, 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 do anticorpo foi revelada com uma solução de Tris.HCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,5, contendo NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup>, NBT 0,2 mmol L<sup>-1</sup> e BCIP 0,8 mmol L<sup>-1</sup>.

### **3.8. Aclimação dos caranguejos e capacidade osmorregulatória**

Grupos de 8-10 caranguejos foram aclimatados individualmente, durante 5 dias, em vasilhas plásticas (20×20 cm) contendo meios de salinidades diferentes (lâmina de água de 1 cm) e mantidos a 25 °C, sob fotoperíodo de 14 h. As águas salobras de 10, 20 e 30 ‰ (sendo 1 ‰ = 30 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), utilizadas nos experimentos, foram obtidas misturando-se água doce (<0.5 ‰, <15 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) com água do mar (33 ‰, ~1000 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) obtida na Praia da Barra Seca, Ubatuba/SP. A água salobra de 40 ‰ (1200 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), foi obtida pela diluição de sal marinho (Instant Ocean®) em água do mar. As salinidades foram verificadas utilizando um refratômetro de mão (American Optical, Modelo 10419). Vale ressaltar que os animais não ficaram submersos nas águas com diferentes salinidades, mas sim mantidos o mais próximo do ambiente onde foram coletados.

A capacidade osmorregulatória de *G. cruentata* foi avaliada a partir de amostras de hemolinfa (≈10 µL) retiradas dos caranguejos aclimatados durante 5 dias nas diferentes salinidades descritas. O ponto isosmótico (ponto onde a osmolalidade da hemolinfa se iguala à do meio externo) foi obtido matematicamente e representado graficamente pelo intercepto da curva ajustada (polinomial de segundo grau) aos dados experimentais [ $f(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2$ ] com a linha isosmótica [ $f(x) = a_0 + a_1x$ ], assumindo 1 ‰ = 30 mOsm.kg de H<sub>2</sub>O.

### **3.9. Obtenção de brânquias para extração de RNA total**

Os caranguejos foram anestesiados por imersão em gelo picado durante 5-10 min, as brânquias foram dissecadas sob lupa com microtesoura e pinça de relojoeiro em água DEPC,



livre de RNase (autoclavada) e colocadas imediatamente em tampão Trizol para extração de RNA total mantido em banho de gelo. Para cada condição foram utilizados 8 espécimes (N = 8).

### **3.10. Extração de RNA total**

A extração de RNA total foi realizada segundo protocolo do próprio fabricante utilizando 30 µL de água com dietil pirocarbonato (DEPC) para ressuspender o RNA total extraído. Esse procedimento tem sido eficiente para extração de RNA total branquial em diversas espécies de crustáceos (FALEIROS et al., 2010; PINTO et al., 2015; FALEIROS et al. 2017, 2018). O RNA total extraído foi quantificado em um fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies) e estocado em freezer a -80 °C.

### **3.11. Transcrição reversa (RT) dos RNAm – síntese de cDNA**

O kit RT-PCR SuperScript III foi utilizado para a reação de transcrição reversa, seguindo protocolo do próprio fabricante. O RNA total (300 ng) previamente tratado com DNase I foi submetido à reação de síntese de cDNA pela transcriptase reversa em presença de desoxinucleotídeos dissolvidos na solução tampão da enzima RT-III usando um termociclador Veriti™ (Thermo Scientific). A produção bem sucedida do cDNA foi constatada pela amplificação com os pares de primers descritos na Tabela 1. O par de “primer” degenerado utilizado inicialmente para amplificar parcialmente a subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi desenhado baseado em Weihrauch et al. (2004). Os primers utilizados para amplificar parcialmente o gene PRL10, codificador da proteína ribossomal L10, que foi utilizado como controle interno de reação para os experimentos de PCR quantitativo (qPCR), foram desenhados baseados na sequência conservada de *Callinectes sapidus* (Tabela 1), obtida no GenBank (AY822650, WYNN et al., 2004). Esses primers tinham sido utilizados com sucesso em diversas espécies e (WEIHRAUCH et al., 2004; FALEIROS et al., 2010; LEONE et al., 2015; FALEIROS et al. 2017, 2018).

Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose 1% corados com Sybr Safe (Thermo Scientific) em tampão TBE (Tris-Borato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). O tamanho dos fragmentos foi comparado com o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Plus. Para a visualização das amplificações em gel de agarose foi utilizado o trans-iluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transluminator (Thermo Scientific), e um foto documentador Digimage System (Major Science, Saratoga, CA, USA) para documentação desses géis.

Após a obtenção do cDNA para cada espécime de caranguejo em cada grupo experimental, um pool de cDNA foi realizado para dar continuidade às etapas seguintes para a obtenção dos fragmentos a serem sequenciados. O cDNA obtido foi utilizado posteriormente, individualmente nas análises de expressão por qPCR.

### **3.12. Clonagem dos fragmentos parciais de cDNA e sequenciamento**

Os fragmentos amplificados a partir das reações de PCR foram clonados no vetor “PCR 2.1 TOPO TA”, obtendo-se pelo menos três clones para cada gene de interesse (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase e PRL10). Para verificação e escolha dos transformantes que apresentaram os fragmentos amplificados, as colônias, oriundas da transformação térmica, foram cultivadas em meio Luria–Bertani (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L) com o antibiótico ampicilina (100 mg/ml) e submetidas a PCRs, com os primers inicialmente utilizados (Tabela 1) para confirmar a presença dos fragmentos de interesse.

As amostras de DNA dos clones selecionados como candidatos que contem sequências dos genes de interesse, foram submetidas ao sequenciamento (Genetic Analyzer, Modelo ABI PRISM® 3100) pelo método tradicional de incorporação de dideoxynucleotídeos (SANGER et al., 1977), utilizando os primers específicos do próprio vetor (M13F e M13R). As sequências parciais de cDNA obtidas foram utilizadas para a confecção dos primers específicos a serem utilizados nas análises de qPCR, com o auxílio do aplicativo on-line OligoPerfect™ Designer da LifeTechnologies (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>).

Os critérios utilizados para a escolha dos primers foram: amplificarem um fragmento entre 75 e 150 pb; apresentar uma temperatura de “melting” (T<sub>M</sub>) relativamente alta (entre 59-61 °C); conter pelo menos 50% de nucleotídeos C e G, sendo o último nucleotídeo da extremidade 3’ um G ou C. Os primers foram sintetizados pela empresa Exxtend, Brasil.

**Tabela 1. Sequência dos primers degenerados empregados para amplificar a subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (NAK\_10F e NAK\_16R), e sequência dos primers baseados na sequência de cDNA de *Callinectes sapidus* (WYNN et al., 2004) para amplificar parcialmente o gene PRL10 (PRL10\_Cs\_F e PRL10\_Cs\_R), codificador da proteína ribossomal L10 utilizado como controle interno (constitutivo) de reação.**

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
<b>(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase</b>		
NaK_10F	5' ATGACIGTIGCICAYATG	707
NaK_16R	5' GRTGRTCICCCIGTIACCAT	
NaK_Gcrug_F	5' TCGATGCCGATTCCGTCAAT	122
NaK_Gcrug_R	5' GATACCAGCAGAACGGCACT	
<b>PRL10</b>		
PRL10_Cs_F	5' AAGAACTGCGGCAAGGACCAGTTCC	304
PRL10_Cs_R	5' CGGTCAAACCTTGGTAAAGCCCCACTT	
PRL10_Gcrug_F	5' GCTGATAGGCTCCAGACAGG	129
PRL10_Gcrug_R	5' CTCGATGACGTGAGCCTTGT	

### 3.13. Análise de expressão por PCR quantitativo (qPCR)

A análises de expressão por qPCR foram realizadas utilizando um aparelho modelo Step One Plus (Thermo Scientific) no Laboratório de Genética do Desenvolvimento de Abelhas, Departamento de Genética da FMRP/USP. As reações de qPCR foram executadas utilizando o Kit “Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix” de acordo com as instruções do próprio fabricante. Para a quantificação relativa das amostras foi utilizado o método do CT comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para a validação da qPCR foi feita uma curva padrão necessária para identificar a eficiência e reprodutibilidade das amplificações tanto do gene alvo como do gene endógeno. Para cada amostra de cDNA a reação de qPCR foi realizada em triplicata e controles negativos (reações sem amostra) também foram realizados para detectar possíveis contaminações. As análises de expressão para os caranguejos aclimatados em diferentes salinidades foram efetuadas utilizando-se de 5 a 7 animais.

A análise dos resultados foi realizada por ANOVA de 1 fator. Para identificar a diferença entre as médias foi realizado o teste de médias múltiplas de Student-Newmann-

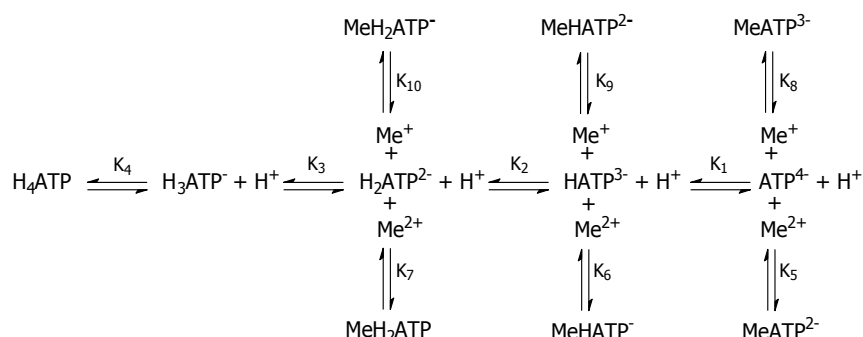
Keuls (SNK) utilizando o programa Sigma Stat 2.03, empregando-se um nível mínimo de significância de  $P= 0,05$ . Os dados obtidos estão expressos como Média  $\pm$  EPM. Para a apresentação dos dados, foi utilizado o programa SlideWrite.

### **3.14. Determinação da atividade ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )-ATPase da fração microsomal**

A atividade ATPase total foi determinada continuamente, a 25 °C, empregando-se o sistema de acoplamento piruvato kinase/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 ( $\epsilon_{340 \text{ nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas. Para o estudo do efeito dos íons potássio e amônio, a atividade ATPase foi quantificada empregando-se o sistema de acoplamento gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/fosfogliceratokinase, onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do  $\text{NAD}^+$  (LEONE et al., 2015a). A redução do  $\text{NAD}^+$  foi estimada em 340 nm ( $\epsilon_{340 \text{ nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas. Esse sistema foi usado uma vez que as enzimas de acoplamento não necessitam de potássio. A atividade ATPase também foi determinada na presença de ouabaína 3 mmol  $\text{L}^{-1}$  e a diferença entre a medida efetuada na ausência e na presença de ouabaína foi considerada como correspondente à atividade ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase da fração microsomal do caranguejo *G. cruentata*. Dada a possibilidade de ocorrer formação de vesículas seladas durante a preparação da enzima, a hidrólise do ATP também foi estimada após a incubação da amostra com alameticina (1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) durante 10 min, a 25 °C. 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 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase foi checada entre 10 e 50  $\mu\text{g}$  proteína total e a quantidade de proteína microsomal sempre foi usada dentro desse intervalo. Para cada concentração de ligante analisado (ATP,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  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. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes 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 padrão do ensaio e a atividade específica é dada em nmol de  $\text{P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

### 3.15. Cálculo de espécies livres no meio de reação

A concentração das espécies livres de  $Mg^{2+}$ , ATP e MgATP no meio de reação foram calculadas de acordo com Fabiato (1988) de acordo com o equilíbrio:



onde  $pK_1= 6,53$ ;  $pK_2= 4,06$ ;  $pK_3= 1,00$ ;  $pK_4= 1,00$ ;  $pK_5= 4,22$ ;  $pK_6= 2,24$  e  $pK_7= 1,58$ .

### 3.16. 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 programa SigrafW (LEONE et al., 2005b). As constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor,  $K_I$ , foram determinadas graficamente de acordo com Marks & Seeds (1978). Os parâmetros cinéticos apresentados nas tabelas são valores calculados e representam a média  $\pm$  SD de três preparações diferentes (N= 3).

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

O  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  foi sintetizado através 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, corrigindo-se com Tris (sólido) até pH 7.

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

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  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,5, contendo  $MgCl_2$  2  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $NaCl$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $KCl$  10  $\text{mM}$  em um volume final de 0,5 mL. A reação iniciada pela adição de ATP 1  $\text{mmol L}^{-1}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (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<sup>-1</sup>. Os tubos foram colocados em um banho de gelo e após a adição de 0,5 mL de água gelada e 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 radiatividade correspondente ao <sup>32</sup>Pi[P] liberado pelas amostras foi quantificada usando-se um espectrômetro de cintilação líquida Beckman Modelo LS 6500.

### **3.19. Estudo do efeito da FXYD2 exógena na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase**

A (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de *G. cruentata* foi pré-incubada na presença de 20µL de FXYD2 (em excesso em relação a subunidade α, proporção 30:1) extraído a partir da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase purificada de medula de rim de porco (CORTES et al., 2006) durante 20 min e a reação de hidrólise do [γ-<sup>32</sup>P]ATP foi estimada conforme descrito em 2.15.

### **3.20. Fosforilação por proteína kinase A (PKA)**

A fosforilação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi realizada incubando-se uma alíquota (20 µL) da fração microsomal de brânquia de *G. cruentata* em tampão Hepes 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, EGTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,05%, db-cAMP 3 mmol L<sup>-1</sup> e queleritrina 3,5 µmol L<sup>-1</sup>, em um volume final de 100 µL. Após 30 min de incubação, a 25 °C, nesse meio de reação de fosforilação, a atividade ATPase foi determinada da conforme descrito em 2.15 (CORTES et al., 2011). Controles contendo H-89 200 nmol L<sup>-1</sup> (inibidor específico da proteína kinase A), também foram realizados nas mesmas condições descritas acima.

### **3.21. Fosforilação por proteína kinase C (PKC)**

A fosforilação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi realizada incubando-se uma alíquota (20 µL) da fração microsomal de brânquia de *G. cruentata* em tampão Hepes 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,05%, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, fosfatidil serina 80 µg/µL, PMA 100 nmol L<sup>-1</sup> e H89 200 nmol L<sup>-1</sup> em um volume final de 100 µL. Após 30 min de incubação, a 25 °C, nesse meio de reação de fosforilação a atividade ATPase foi determinada conforme descrito em 2.15 (CORTES et al., 2011). Controles contendo queleritrina 3,5 µmol L<sup>-1</sup> (inibidor específico da proteína kinase C), também foram realizados nas mesmas condições descritas acima.

### 3.22 Fosforilação/ desfosforilação da fração microsomal por [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP

Alíquotas da fração microsomal branquial contendo ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase (40  $\mu\text{g}$  de proteína) foram incubadas a 27 ° C por 10 min no meio de ensaio nas seguintes condições: tampão HEPES 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  0,3  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$  50  $\text{mmol L}^{-1}$ . A reação de fosforilação foi iniciada pela adição de 0,02 mL de ATP /  $^{32}\text{P}$ -ATP 7,5  $\text{mmol L}^{-1}$  (atividade específica de 1 a 105 cpm / nmol) em um volume final de 0,5 mL (controle E-P). Após repousar por 3 min a 27 ° C, a desfosforilação foi iniciada pela adição de 0,05 mL de ADP 50  $\text{mmol L}^{-1}$  (desfosforilação induzida por ADP) ou 0,025 mL de  $\text{KCl}$  2  $\text{mol L}^{-1}$  (desfibrilação induzida por  $\text{K}^+$ ) a cada meio de fosforilação por 5 min.

Após a adição de 2 mL de  $\text{HClO}_4$  125  $\text{mmol L}^{-1}$  contendo  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  5  $\text{mmol L}^{-1}$ , a mistura resultante contendo a enzima fosforilada ( $\text{E}^{32}\text{P}$ ) foi filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  HAWP Filtros Millipore. Os filtros foram lavados três vezes com 2 mL de  $\text{HClO}_4$  125  $\text{mmol L}^{-1}$  e quatro vezes com  $\text{HClO}_4$  50  $\text{mmol de L}^{-1}$  (FONTES et al., 1992) para reduzir o sinal. A radioatividade foi contada usando um contador de cintilação líquida Beckman LS6500. Os controles foram realizados em triplicata usando a enzima desnaturada com  $\text{HClO}_4$  antes da adição de [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP. Cada experimento foi repetido três vezes usando uma preparação microsomal diferente ( $N = 3$ ). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DP.

### 3.23. Imunolocalização da ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )-ATPase branquial de *Goniopsis cruentata*

As brânquias #11 (artrobranquia) do lado direito foram dissecadas de caranguejos mantidos a 21‰S, incubadas em p-formaldeído 2% (preparado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4) durante 1 h, e em seguida, incorporada em um composto de temperatura de corte ideal (Sakura, Tissue-Tek, Torrance, EUA). Para evitar a hidratação ou encolhimento do tecido durante a fixação, as soluções salinas foram ajustadas para condições aproximadamente isosmóticas ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  137  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  2,7  $\text{mmol L}^{-1}$ , 290  $\text{mOsm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ), pH 7,4 durante 1 h. Cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espessura foram tomadas transversalmente ao eixo longo da lamela branquial a -25 ° C (Micromo Criostático Microm HM 505E, Walldorf, Alemanha) e recolhidas em lâminas revestidas com gelatina (Bloom 225). As lâminas foram pré-incubados durante 20 min com glicina 100  $\text{mmol L}^{-1}$  em PBS, apropriado para mascarar grupos aldeídos livres, e em seguida incubados durante mais 10 min em solução de bloqueio contendo soralbumina bovina 1% e de gelatina 0,1% em PBS.

A imunolocalização ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase foi realizada utilizando um anticorpo monoclonal IgG  $\alpha$ -5 de rato contra a subunidade  $\alpha$  da ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase de galinha (TAKEYASU et al., 1988). Gotas do anticorpo primário diluídas ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em PBS (1:1,75) foram colocadas sobre as seções e em seguida incubadas em câmara úmida durante 1 h em temperatura ambiente. Controles negativos foram incubados em solução de bloqueio sem o anticorpo primário. Depois de lavar 6 vezes 5 min cada em solução de bloqueio para remover anticorpos não ligados especificamente, as seções foram incubadas durante 45 min em gotículas de um anticorpo secundário IgG anti-jumento conjugado com Alexa-fluor 488 diluído 1:450 em PBS, e finalmente enxaguados 6 vezes 5 min cada em PBS. Para localizar os núcleos, as seções foram coradas durante 20 min com 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) diluídas a 1: 200 em PBS.

As seções foram montadas em meio de montagem de lâmina Fluoromount-G com lâminas Knittel Starfrost e lamínulas (Bielefeld, Alemanha) e foram observadas e fotografadas usando um microscópio de fluorescência Olympus BX-50 (Melville, EUA) equipado com uma câmara deslizante de 2 Mb SPOT RT3 25.4 (Sterling Heights, EUA). As seções foram observadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial e empregando comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 nm (DAPI) e 495/519 nm (Alexa-fluor 488).



## ***4. RESULTADOS***

#### **4.1. Imunolocalização da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores**

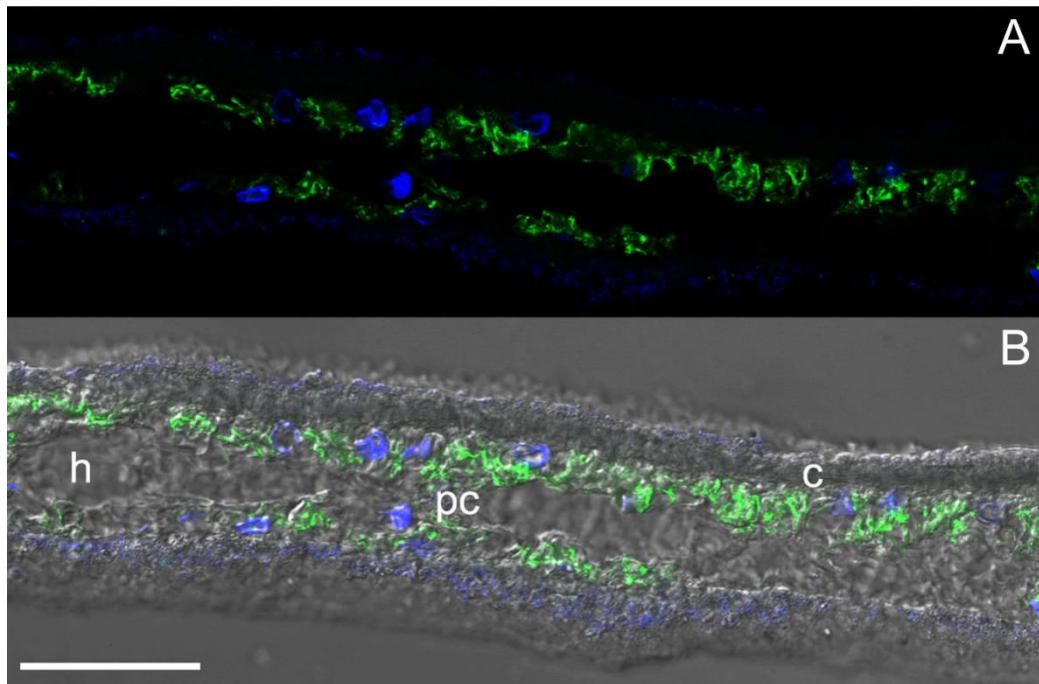
A marcação fluorescente revela que a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase pode ser observada através da lamela da brânquia posterior (Figura 1A). A organização das filobrânquias da lamela branquial do caranguejo *Goniopsis cruentata* consiste em um epitélio de camada simples coberto por uma cutícula na superfície apical (Figura 1B). A região apical, localizada próxima da cutícula, é projetada a partir das células pilares estreitando a região basal no centro da lamela, com espaços entre pares opostos de células pilares formando um sistema irregular onde a corre a hemolinfa (Figura 1B). Uma marcação imuno-histoquímica mais detalhada da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase revela que a enzima é predominantemente distribuída na região apical das células pilares (Figura 1B).

#### **4.2. Centrifugação em gradiente contínuo de sacarose**

A centrifugação da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *G. cruentata* em gradiente de sacarose 10-50% resultou em um único pico de atividade ATPase, correspondendo entre 25-35% de sacarose (Figura 2). Nota-se também a presença de dois picos, não separados totalmente, correspondendo à atividade ATPase insensível à ouabaína, o que sugere a presença de outras ATPases que não a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. Esse resultado também sugere a presença de duas frações de membrana distintas que apresentam atividade ATPase. A fração mais leve, correspondendo a 30-37% de sacarose apresenta cerca de duas vezes mais proteína quando comparada com a fração mais pesada que corresponde a 40% de sacarose.

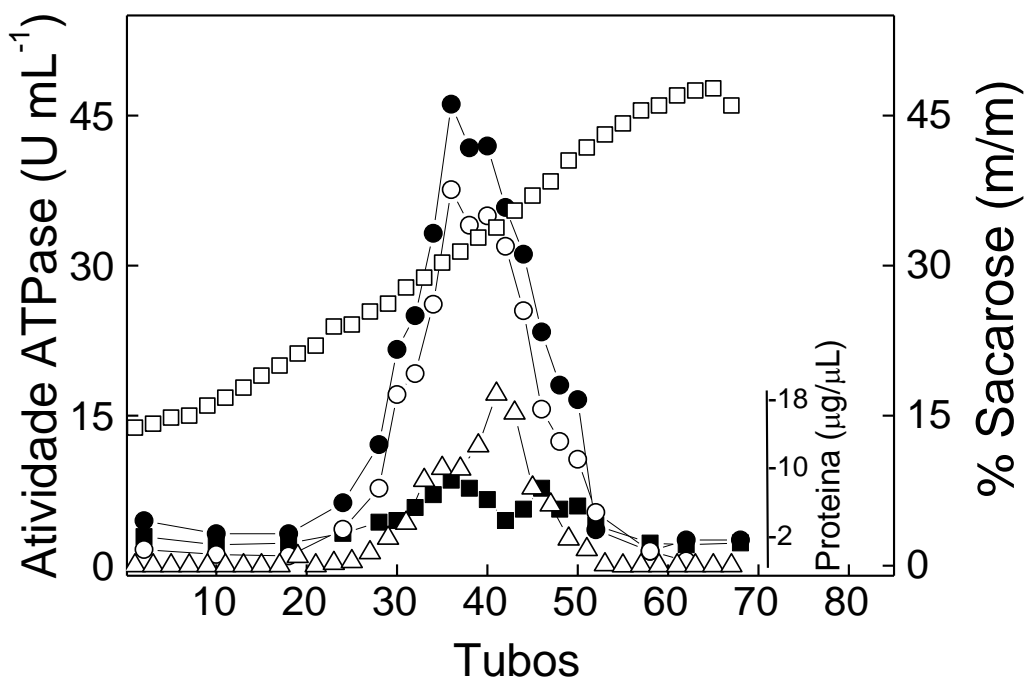
#### **4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting**

A análise da fração microsomal em gel de poliacrilamida (5-20%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) revelou várias bandas proteicas correspondentes ao tecido branquial do caranguejo *G. Cruentata* após a revelação com AgNO<sub>3</sub> (Figura 3A). A análise através de Western Blotting, utilizando um anticorpo monoclonal para cadeia  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, revelou uma única banda imuno-específica, com massa molecular em torno de 110 kDa (Figura 3B). De forma similar, a análise da fração microsomal também foi realizada em um gel de poliacrilamida 6-12%, o qual revelou somente uma única banda imunorreativa na presença do anticorpo monoclonal para cadeia  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Figura 3C). Quando comparada com outras bandas de proteínas, pode-se assumir que, a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase representa apenas uma pequena fração do total de proteínas presentes na membrana.



**Figura 1. Localização subcelular da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  da brânquia posterior do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A marcação imuno-histoquímica foi realizada empregando-se o anticorpo  $\alpha$ -5 específico contra a subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , O sinal fluorescente foi revelado usando um anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa-Fluor 488 (495/519 nm). Os núcleos (em azul) foram marcados com DAPI. **A-** Imunofluorescência mostrando a distribuição geral da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  no epitélio branquial em um corte ao longo do eixo longitudinal da sétima brânquia. **B-** Microscopia confocal/de contraste de fase da seção transversal de uma única lamela da brânquia revelando a arquitetura lamelar. A marcação da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (em verde) é intensa nas regiões apicais da célula. Os núcleos das células pilares e hemóticos marcados com DAPI (em azul). c- cutícula, PC - células pilares, h- lacuna onde corre a hemolinfa. i- espaço intralamelar, setas-lamelas das brânquias. Escala 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2. Centrifugação da fração microsomal da brânquia posterior do caranguejo *Goniopsis cruentata* em gradiente contínuo de sacarose.**

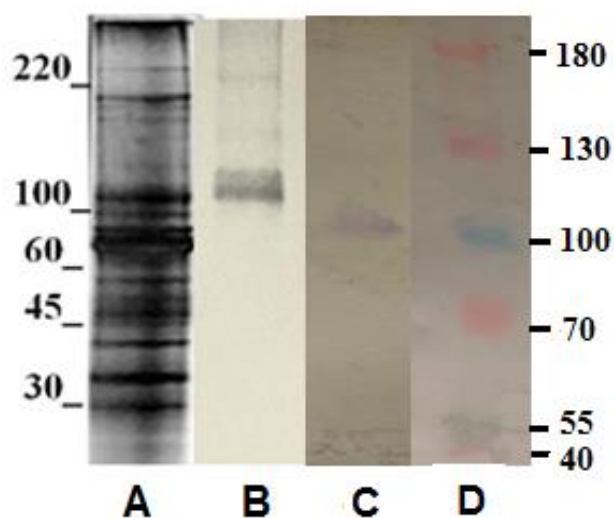
Uma alíquota contendo 2,5 mg de proteína foi aplicada na superfície do gradiente. Frações de 0,5 mL foram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas quanto a: (●) Atividade ATPase total, (■) atividade ATPase insensível à ouabaína, (○) atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, (Δ) concentração de proteína e (□) concentração de sacarose.

#### **4.4. Caracterização cinética da atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do caranguejo *Goniopsis cruentata* recém capturado**

Alameticina foi adicionada ao meio de reação devido a presença de vesículas seladas na fração microsomal. As atividades máximas com e sem alameticina foram  $512,9 \pm 25,6$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e  $419,4 \pm 20,9$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. Mostrando assim que  $\approx 20\%$  da atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase está ocluída em vesículas seladas na fração microsomal das brânquias

#### 4.4.1. Efeito da concentração de ATP na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase

O efeito do aumento da concentração de ATP na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *G. cruentata* está apresentado na Figura 4. Em concentrações saturantes de MgCl<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>), NaCl (50 mmol L<sup>-1</sup>) e KCl (10 mmol L<sup>-1</sup>) a estimulação da atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase no intervalo de concentração de ATP entre 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> resultou no aparecimento de duas curvas de saturação. A família de sítios de ATP de alta afinidade compreendida entre 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> apresentou V<sub>M</sub>= 153,4 ± 7,7 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e K<sub>0,5</sub>= 0,013 ± 0,0006 mol L<sup>-1</sup>. Já a família de sítios de ATP de baixa afinidade, compreendida entre 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> apresentou V<sub>M</sub>= 186,0 ± 9,3 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e K<sub>0,5</sub>= 0,085 ± 0,004 mol L<sup>-1</sup>. Interações sitio-sítio foram observadas para ambas as famílias (Tabela 2). Para concentrações inferiores a 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> de ATP, observa-se uma atividade ATPase basal insensível a ouabaína de aproximadamente 140,0 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. Nesse mesmo intervalo de concentração de ATP, a atividade ATPase insensível a ouabaína com aproximadamente 30 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína foi estimulada até valores da ordem de 60,0 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, sugerindo a presença de outras ATPases na fração microsomal (inserção da Figura 4A). Esses mesmos dados para a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase também foram analisados em relação à concentração do complexo Mg.ATP. Os resultados obtidos mostram uma curva bifásica (Figura 4B) similar à apresentada na Figura 4A (Tabela 2). A inserção da Figura 4B mostra inequivocamente que o aumento na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase está relacionado com o aumento da concentração do complexo Mg.ATP e não com a concentração de ATP livre (inserção da Figura 4B). Observa-se que, para uma dada concentração de ATP total, os valores calculados para a concentração de ATP livre são quase 100 vezes menores que os do complexo Mg.ATP (inserção da Figura 4B).



**Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

**A-** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (5-20%) coloração com prata usando 4 µg de proteína proveniente do tecido branquial da fração microsomal. **B-** Western Blotting (SDS-PAGE 5-20%) e **C-** Western Blotting (SDS-PAGE 6-12%), ambos contra a subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  do caranguejo *G. cruentata* recém capturado revelado com anticorpo anti-camundongo IgG conjugado com peroxidase (50 µg de proteína) identificando uma banda de  $\approx 110$  kDa. **D-** Padrão Spectra Multicolor Ladder Protein Ladder (10-180 kDa) usado para 6-12% SDS-PAGE.

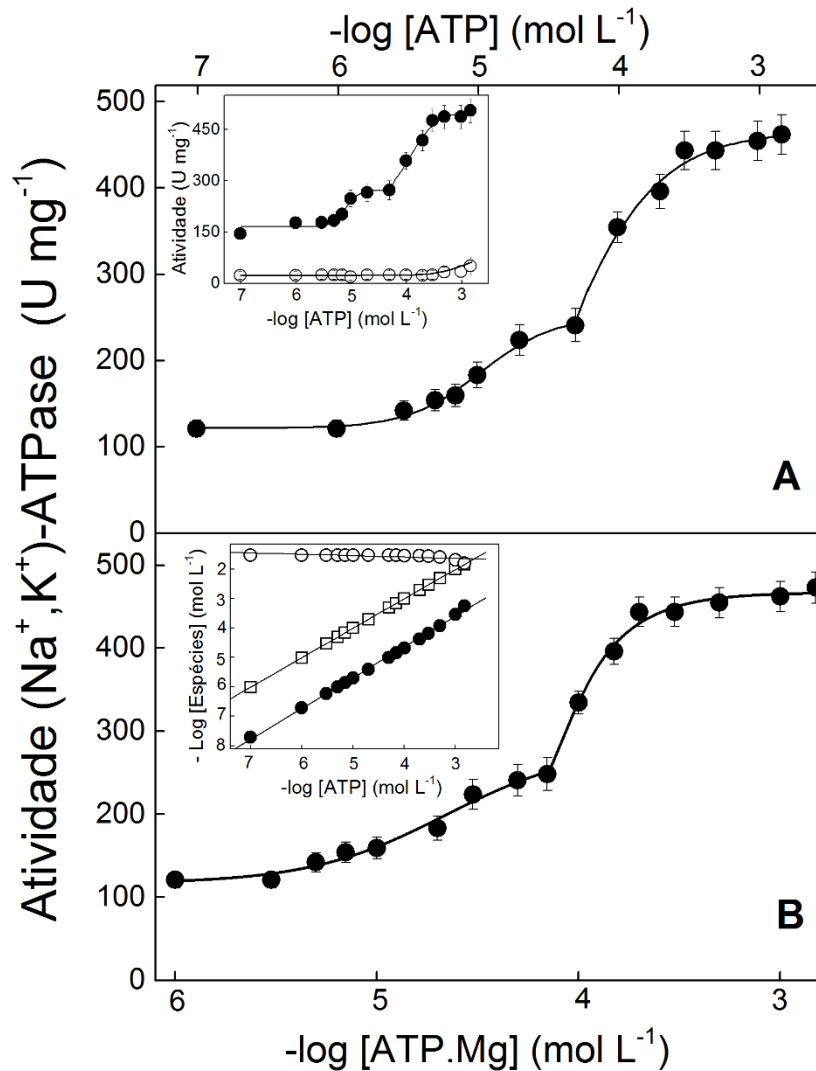
#### **4.4.2. Efeito da concentração estequiométrica de ATP e Mg<sup>2+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase**

Em condições saturantes de KCl (10 mmol L<sup>-1</sup>), NaCl (50 mmol L<sup>-1</sup>) e em condições estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup>, a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é estimulada através de uma única curva de saturação no intervalo de concentração entre 10<sup>-8</sup> e 7x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (Figura 5). Nestas condições, a atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase apresentou V<sub>M</sub>= 443,0 ± 22,1 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e K<sub>0,5</sub> = 0,060 ± 0,003 mol L<sup>-1</sup> resultante de interações sítio-sítio (Tabela 2). Nesse mesmo intervalo de concentração, a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até cerca de 60 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, correspondendo a cerca de 13% da atividade ATPase total presente na fração microsomal. É importante salientar que em condições estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup> a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi de apenas 20 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína para concentrações da ordem de 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> quando comparada com ≈140 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> observada em condições de excesso de Mg<sup>2+</sup>. Esses resultados sugerem que, em baixas concentrações de ATP, Mg<sup>2+</sup> (quando em grande excesso) atua como um efetor alostérico da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase causando o aparecimento do sítio de alta afinidade para o ATP.

#### **4.4.3. Efeito da concentração de Mg<sup>2+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase**

Nenhuma atividade foi observada na ausência de Mg<sup>2+</sup>, isso porque se trata de um íon essencial para a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L<sup>-1</sup>), KCl (10 mmol L<sup>-1</sup>) e NaCl (50 mmol L<sup>-1</sup>) o aumento da concentração de Mg<sup>2+</sup> entre 10<sup>-5</sup> e 2x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> estimulou a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase através de uma única curva de saturação com V<sub>M</sub>= 425,9 ± 25,3 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e K<sub>0,5</sub>= 0,016 ± 0,01 mol L<sup>-1</sup>, envolvendo interações sítio-sítio (Figura 6A e Tabela 2), sugerindo múltiplos sítios de ligação para este íon na enzima. Neste mesmo intervalo de concentração de Mg<sup>2+</sup>, a atividade ATPase insensível a ouabaína (V<sub>M</sub>= 44,0 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) foi estimulada até valores da ordem de 60 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, o que indica a presença de uma possível Mg<sup>2+</sup>-ATPase na fração microsomal (inserção da Fig. 6A).

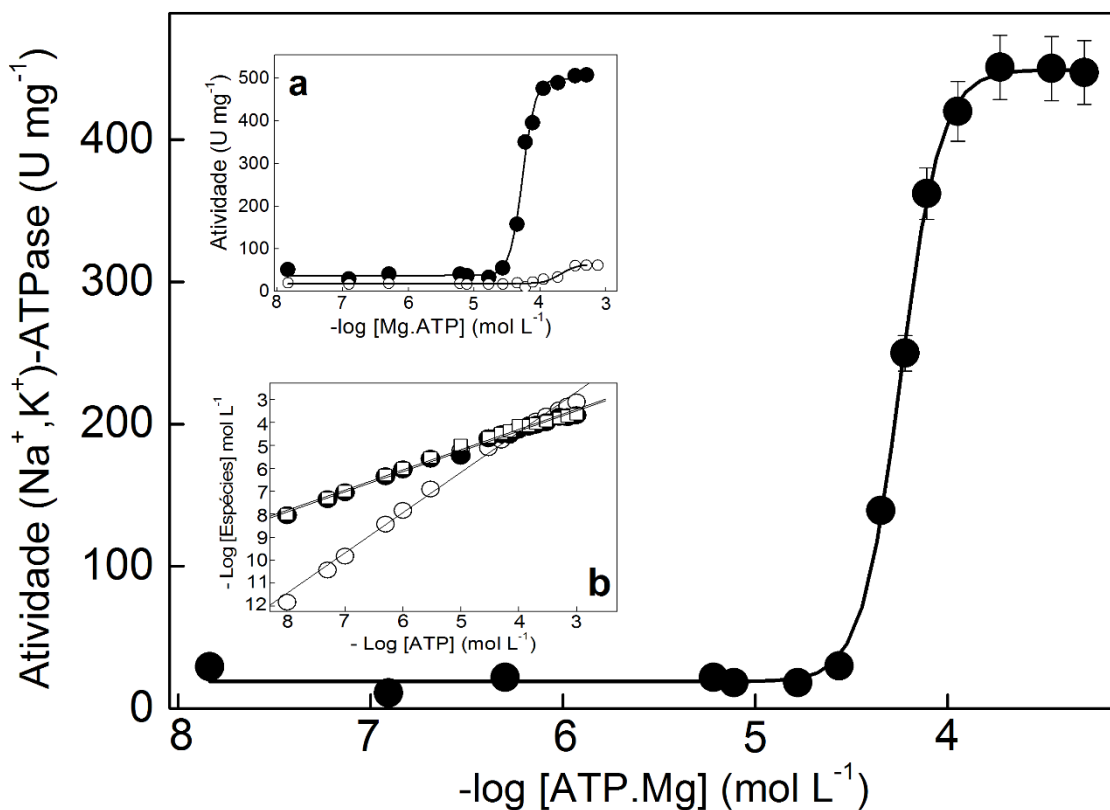
A análise da atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase com relação a concentração do complexo Mg.ATP também revelou uma curva monofásica similar a apresentada na Figura 6<sup>a</sup>, apenas com pequenas diferenças nos valores de V<sub>M</sub> e K<sub>0,5</sub> (Figura 6B e Tabela 2).



**Figura 4. Efeito da concentração de ATP na atividade da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão HEPES 50  $mmol L^{-1}$ , pH 7,5 contendo  $MgCl_2$  3  $mmol L^{-1}$ , NaCl 50  $mmol L^{-1}$ , KCl 10  $mmol L^{-1}$ , NADH 0,21  $mmol L^{-1}$ , FEP 3,18  $mmol L^{-1}$ , 10  $\mu g$  de alameticina, PQ 49 U e LDH 94 U. A reação foi iniciada pela adição de 44,0  $\mu g$  de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ( $\pm SD$ ; N=3). **A- ATP.** Inserção: (●) Atividade ATPase total; (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína. **B- Mg.ATP.** Inserção: (●) Concentração calculada de ATP livre; (□) Concentração calculada do complexo Mg.ATP; (○) Concentração calculada de  $Mg^{2+}$  livre.





**Figura 5. Efeito da concentração estequiométrica de ATP e Mg<sup>2+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5 contendo NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmol L<sup>-1</sup>, NADH 0,21 mmol L<sup>-1</sup>, FEP 3,18 mmol L<sup>-1</sup>, 10 µg de alameticina, PQ 49 U e LDH 94 U. A reação foi iniciada pela adição de 44,0 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (±SD; N=3). Inserção **a**: (●) Atividade ATPase total; (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína. Inserção **b**: (●) Concentração calculada de ATP livre; (□) Concentração calculada de Mg<sup>2+</sup> livre; (○) Concentração calculada do complexo Mg.ATP.

Os resultados sugerem mais uma vez que o aumento da atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase está relacionado com o aumento da concentração do complexo Mg.ATP e não da concentração de Mg<sup>2+</sup> livre. Isso corrobora com nossa sugestão de que o sítio de ligação do ATP de alta afinidade resulta de um efeito alostérico quando a enzima se encontra em baixa concentração de ATP e em excesso de Mg<sup>2+</sup> (Figura 4).

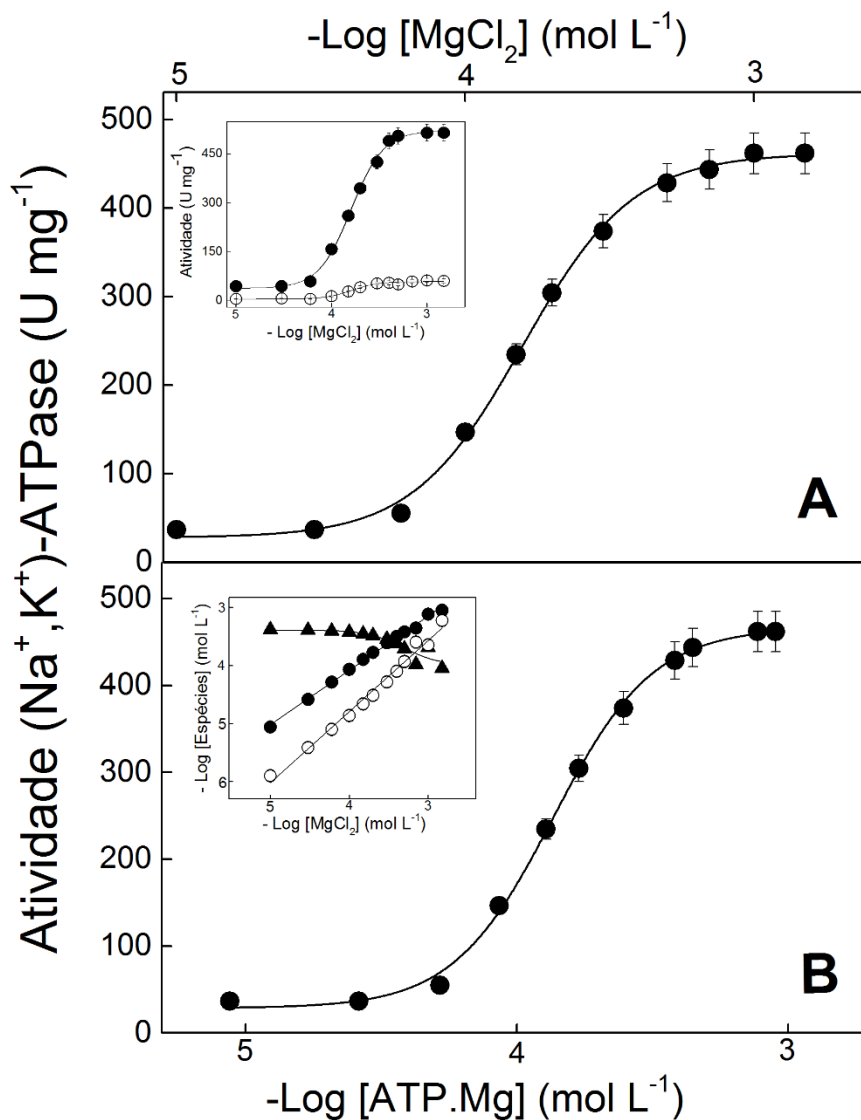
#### **4.4.4. Efeito da concentração de Na<sup>+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase**

Em condições saturantes de ATP (1 mmol L<sup>-1</sup>), KCl (10 mmol L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>), concentrações crescentes de Na<sup>+</sup> entre 10<sup>-5</sup> e 5x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> estimularam a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase através de uma única curva de saturação até valores máximos de V<sub>M</sub>= 425,0 ± 23,4 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína com K<sub>0,5</sub>= 5,1 ± 0,3 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 7). A atividade ATPase insensível à ouabaina, é da ordem de 30 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e não foi estimulada por Na<sup>+</sup> nesse mesmo intervalo de concentração.

#### **4.4.5. Efeito da concentração de K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase**

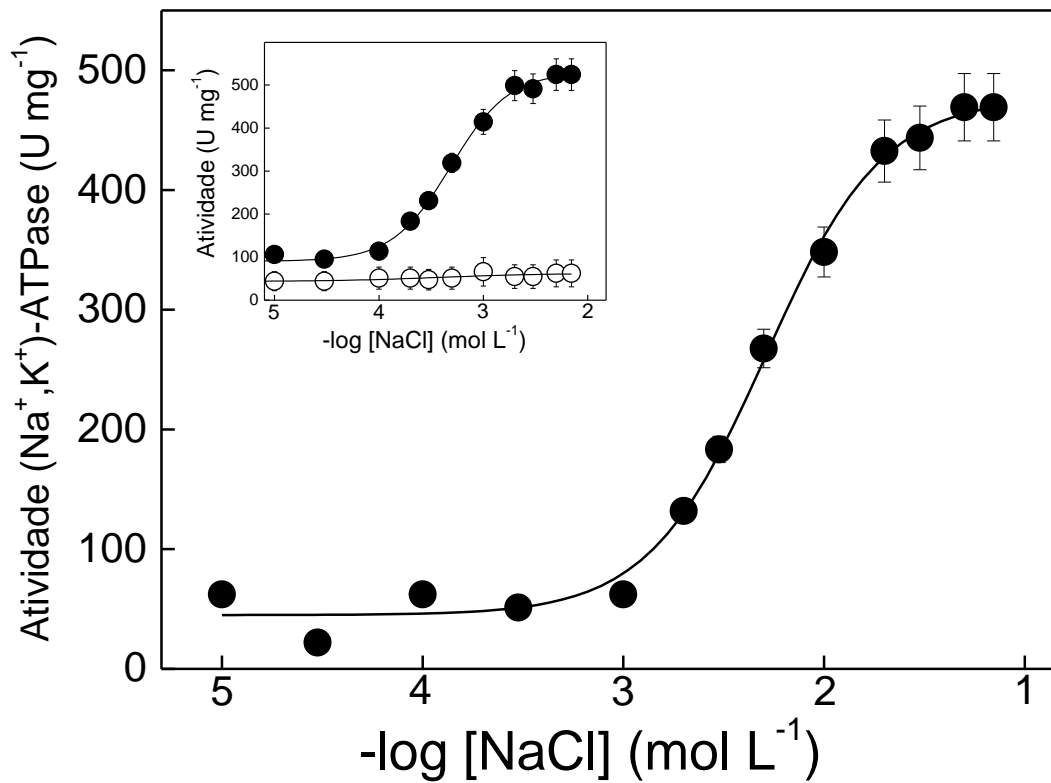
O efeito da variação da concentração de K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na hidrólise do ATP pela (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase presente na fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *G. cruentata* está apresentado na Figura 8. Em condições saturantes de ATP (1 mmol L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>) e NaCl (50 mmol L<sup>-1</sup>), concentrações crescentes de K<sup>+</sup> (10<sup>-6</sup> a 3x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>) e na ausência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estimularam a atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase através de uma única curva de saturação com uma atividade de V<sub>M</sub>= 485,3 ± 24,3 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína com K<sub>0,5</sub>= 0,9 ± 0,05 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 8A e Tabela 2). A atividade ATPase insensível à ouabaina (3 mmol L<sup>-1</sup>) foi cerca de 60 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e não foi estimulada nessa mesma faixa de concentração de K<sup>+</sup> (inserção da Figura 8A).

Concentrações crescentes de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> entre 10<sup>-5</sup> e 2x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> e em condições saturantes de ATP (1 mmol L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>) e NaCl (50 mmol L<sup>-1</sup>), na ausência de K<sup>+</sup>, foi observada estimulação da atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase através de uma única curva de saturação e com V<sub>M</sub>= 497,1 ± 24,9 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína e K<sub>0,5</sub>= 9,7 ± 0,5 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 8B e Tabela 2). A atividade insensível a ouabaina foi estimada em cerca de 30 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína (inserção da Figura 8B).



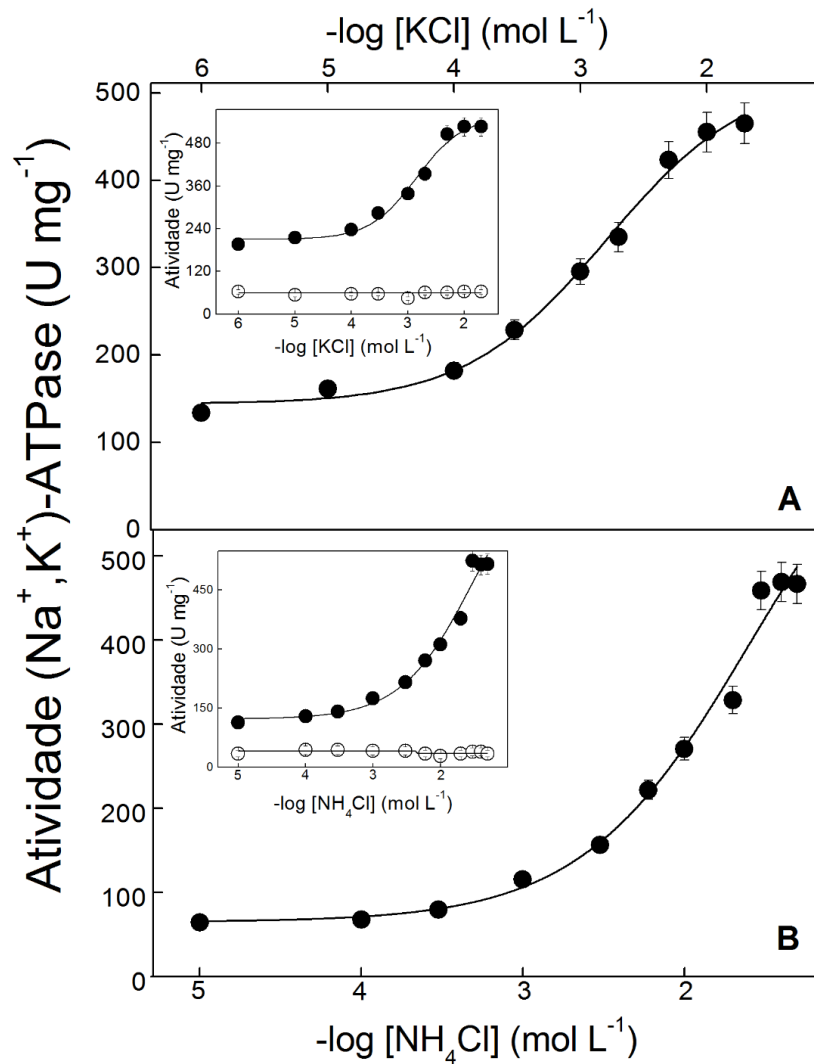
**Figura 6.** Efeito da concentração de Mg<sup>2+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.

A atividade foi determinada continuamente a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5 contendo ATP 1 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmol L<sup>-1</sup>, NADH 0,21 mmol L<sup>-1</sup>, FEP 3,18 mmol L<sup>-1</sup>, 10 µg de alameticina, PQ 49 U e LDH 94 U. A reação foi iniciada pela adição de 44,0 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (±SD; N=3). **A- Mg<sup>2+</sup>.** Inserção: (●) Atividade ATPase total e (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína. **B- Mg.ATP.** Inserção: (○) Concentração calculada de ATP livre; (●) Concentração calculada do complexo Mg.ATP; e (▲) Concentração calculada de Mg<sup>2+</sup> livre.



**Figura 7. Efeito da concentração de Na<sup>+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A atividade enzimática foi determinada continuamente a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5 contendo ATP 1 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmol L<sup>-1</sup>, NADH 0,21 mmol L<sup>-1</sup>, FEP 3,18 mmol L<sup>-1</sup>, 10 µg de alameticina, PQ 49 U e LDH 94 U A reação foi iniciada pela adição de 44,0 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (±SD; N=3). Inserção: (●) Atividade ATPase total e (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.

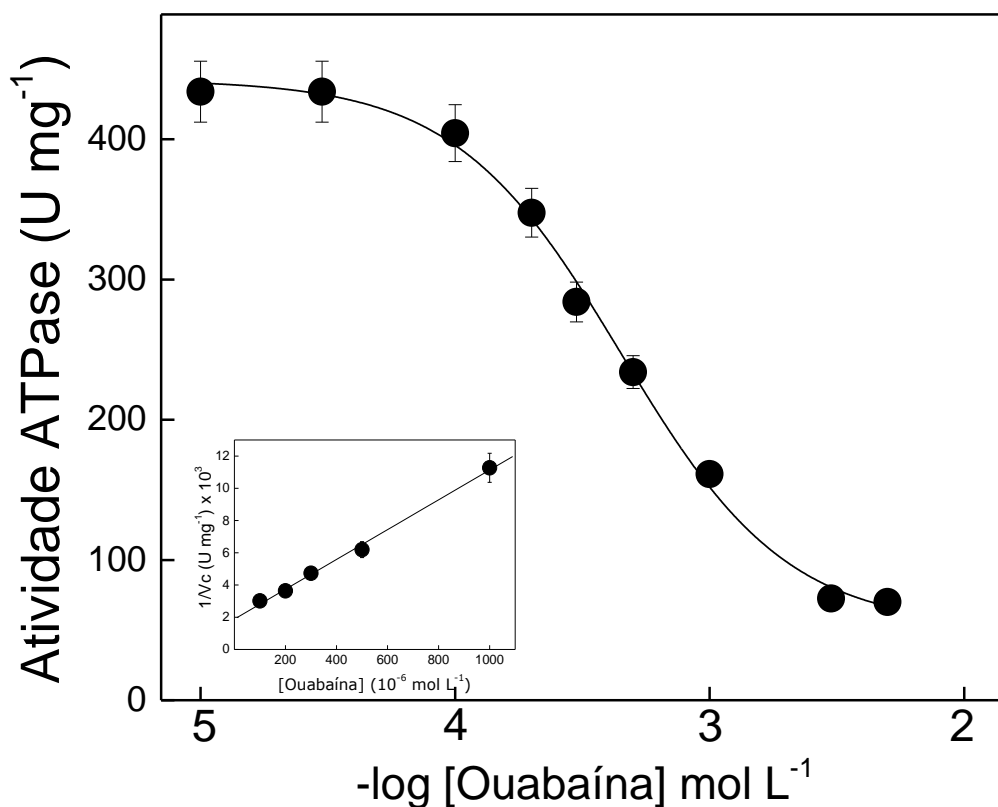


**Figura 8. Efeito da concentração de K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A atividade enzimática foi determinada continuamente a 25°C em tampão HEPES 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5 contendo ATP 1 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol L<sup>-1</sup>, NAD<sup>+</sup> 4.28 mmol L<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 1 mmol L<sup>-1</sup>, G3P 2 mmol L<sup>-1</sup>, GAPDH 24U, PGK 9U e 10 µg de alameticina. A reação foi iniciada pela adição de 44,0 µg de proteína e os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (±SD; N=3). **A- K<sup>+</sup>. B- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Inserções: (●) Atividade ATPase Total e (○) Atividade ATPase insensível à ouabaína.**

#### 4.4.6. Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal

Em condições saturantes de ATP ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2$  ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $\text{K}^+$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), concentrações crescentes de ouabaína entre  $10^{-5}$  e  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  inibiram a atividade ATPase da fração microsomal até valores da ordem de  $70 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Apenas uma curva monofásica foi observada sugerindo a existência de apenas um sítio de ligação para a ouabaína (Figura 9) e que a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  corresponde aproximadamente 95%. O valor de  $K_i$  foi  $196.6 \pm 9.8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (Tabela 2).



**Figura 9. Efeito da concentração de ouabaína na inibição da atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  branquial de *Goniopsis cruentata*.**

A atividade enzimática foi determinada continuamente a  $25^\circ\text{C}$ , conforme descrito em Materiais e Métodos e a reação foi iniciada pela adição de  $44,0 \text{ } \mu\text{g}$  de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ( $\pm\text{SD}$ ;  $\text{N}=3$ ). Inserção: Representação de Dixon para a estimação do valor de  $K_i$ , onde  $v_c$  corresponde a taxa de reação somente da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .

**Tabela 2. Parâmetros cinéticos calculados para se avaliar o efeito na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores de *Goniopsis cruentata* por ATP, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e inibição pela ouabaína.**

Modulador	V <sub>M</sub> (nmol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0.5</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )	n <sub>H</sub>	K <sub>I</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )
ATP	153,4 ± 7,7	0,013 ± 0,0006	1,3	-
	186,0 ± 9,3	0,085 ± 0,004	3,0	-
Mg.ATP*	143,6 ± 7,2	0,011 ± 0,0005	1,5	-
	198,6 ± 9,9	0,081 ± 0,004	3,1	-
Mg.ATP**	443,0 ± 22,1	0,06 ± 0,003	4,0	-
Mg <sup>2+</sup>	425,9 ± 25,5	0,16 ± 0,01	2,6	-
Mg.ATP***	427,7 ± 21,4	0,14 ± 0,007	2,7	-
Na <sup>+</sup>	425,0 ± 23,4	5,1 ± 0,3	1,5	-
K <sup>+</sup>	485,3 ± 24,3	0,9 ± 0,05	0,9	-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	497,9 ± 24,9	9,7 ± 0,5	1,2	-
Ouabaína	-	-	-	196,6 ± 9,8

\*ATP calculado como Mg.ATP. \*\*calculada em concentrações estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup>; \*\*\*Mg<sup>2+</sup> calculado como Mg.ATP.

#### 4.5. Análise da formação / decomposição de fosfoenzimas

Considerando que os locais de ligação de ATP de alta afinidade não foram expressos sob concentrações estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup> (Figura 5), a formação/decomposição da fosfoenzima foi analisada em função da concentração de Mg<sup>2+</sup>. A fosforilação com ATP de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e Mg<sup>2+</sup> de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> revelou um nível máximo de enzima fosforilada de 0,2832 ± 0,00219 nmol de proteína Pi mg<sup>-1</sup> (Tabela 3), que foi considerado como sendo o nível de controle para a formação do complexo EP. A desfosforilação induzida por K<sup>+</sup> (100 mmol L<sup>-1</sup>) foi estimada em 0,247 ± 0,009 nmol Pi mg<sup>-1</sup> (~ 87% do controle), sugerindo que apenas 13% da EP total foi desfosforilada. Em contraste, para a desfosforilação induzida por ADP (5 mmol L<sup>-1</sup>), apenas 0,078 ± 0,004 nmol L<sup>-1</sup> de EP foi estimada (Tabela 3), sugerindo que 72% da EP total foi desfosforilada.

**Tabela 3. Desfosforilação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata* em concentrações estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup> livre.**

Condição	Nível EP (nmol Pi mg <sup>-1</sup> proteína)	% E-P total	[Mg <sup>2+</sup> ]* livre (mmol L <sup>-1</sup> )
Controle <sup>†</sup>	0.283 ± 0.002	100	1.119 × 10 <sup>-4</sup>
ADP (5 mmol L <sup>-1</sup> )	0.078 ± 0.004	27.5	1.119 × 10 <sup>-4</sup>
K <sup>+</sup> (100 mmol L <sup>-1</sup> )	0.247 ± 0.009	87.3	1.119 × 10 <sup>-4</sup>

\*Calculado de acordo com Fabiato (1988). <sup>†</sup>Tampão HEPES 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.5, ATP 0.3 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup>.

#### 4.6. Efeito de diferentes inibidores na atividade ATPase da fração microsomal de brânquias de *Goniopsis cruentata*

Na Tabela 4 pode ser observado que atividade ATPase total de V<sub>M</sub> = 479,9 ± 10.9 nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína foi inibida até valores de V<sub>M</sub> = 450,4 ± 9.7 nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína na presença de ouabaína 3 mmol L<sup>-1</sup>, indicando que cerca de 95% da atividade ATPase da fração microsomal corresponde à (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Considerando-se a alta taxa de (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, os valores calculados para outras possíveis ATPases presentes na fração microsomal podem ser desprezados.

#### 4.7. Efeito da salinidade na capacidade osmorregulatória de *Goniopsis cruentata*

Na Figura 10 estão apresentados os valores estimados para a osmolalidade da hemolinfa do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata* em função da osmolalidade do meio. Nota-se que após 5 dias de exposição a ambientes aclimatados a 10, 20, 30 e 40 ‰ não foi observado variação significativa na osmolalidade da hemolinfa (P = 0,152). O ponto isosmótico deduzido a partir da equação polinomial de segundo grau (y = 0,117x<sup>2</sup> + 3,505x + 878,2) foi 29 ‰. Em concentrações mais diluídas (10‰) o valor estimado foi 855,0 ± 23,39 mOsm kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>, enquanto que, em concentrações mais elevadas (40‰), o valor estimado foi de 926,0 ± 26,46 mOsm kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> (X ± EPM, N = 8) (Tabela 4). O poder regulatório total calculado foi de 0,08. O poder hiperregulatório que expressa a captação de sal em salinidades baixas (10 e 20 ‰) e hiporegulatório que expressa a secreção de sal em salinidade elevada (30 e 40 ‰), ajustados ao ponto isosmótico, são 0,03; 0,06; 0,30 e 0,17, respectivamente.



**Tabela 4. Efeito de vários inibidores na atividade ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo de mangue *Goniopsis cruentata*.**

<b>Inibidor</b>	<b>Atividade total (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ASO (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade ATPase Residual (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade relativa (%)</b>	<b>Tipo de ATPase presente</b>
Controle	479,9 ± 10,9	-	-	100,0	ATPase
Ouabaina (OUA 3 mmol L <sup>-1</sup> )	29,5 ± 0,2	450,4 ± 9,7	-	93,8	(Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-
Ortovanadato (ORT 100 µmol L <sup>-1</sup> )	20,5 ± 0,3	459,4 ± 9,8	-	95,8	P-
OUA + ORT	21,1 ± 0,3	-	8,4 ± 0,1	1,7	F.N.
OUA + Teofilina (5 mmol L <sup>-1</sup> )	4,1 ± 0,1	-	25,4 ± 0,4	5,3	F.A.
OUA + Bafilomicina (0.4 µmol L <sup>-1</sup> )	30,2 ± 0,5	-	-	-	V(H <sup>+</sup> )-
OUA + Tapsigargina (0.5 µmol L <sup>-1</sup> )	22,7 ± 0,3	-	6,8 ± 0,1	1,4	Ca <sup>2+</sup> -
OUA + EGTA (1 mmol L <sup>-1</sup> )	27,9 ± 0,4	-	1,6 ± 0,1	< 1	Ca <sup>2+</sup> -
OUA + Ácido etacrínico (2 mmol L <sup>-1</sup> )	18,9 ± 0,2	-	10,6 ± 0,2	2,2	Na <sup>+</sup> - ou K <sup>+</sup> -
OUA + Aurovertina (10 µmol L <sup>-1</sup> )	30,7 ± 1,5	-	-	-	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -
OUA + Etanol (20 µL mL <sup>-1</sup> )	30,7 ± 0,5	-	-	-	-
OUA + DMSO (20 µL mL <sup>-1</sup> )	29,3 ± 0,4	-	-	-	-

ASO = Atividade ATPase sensível à ouabaína e/ou ortovanadato. F.N. = Fosfatases Neutras. F.A. = Fosfatase Alcalina.

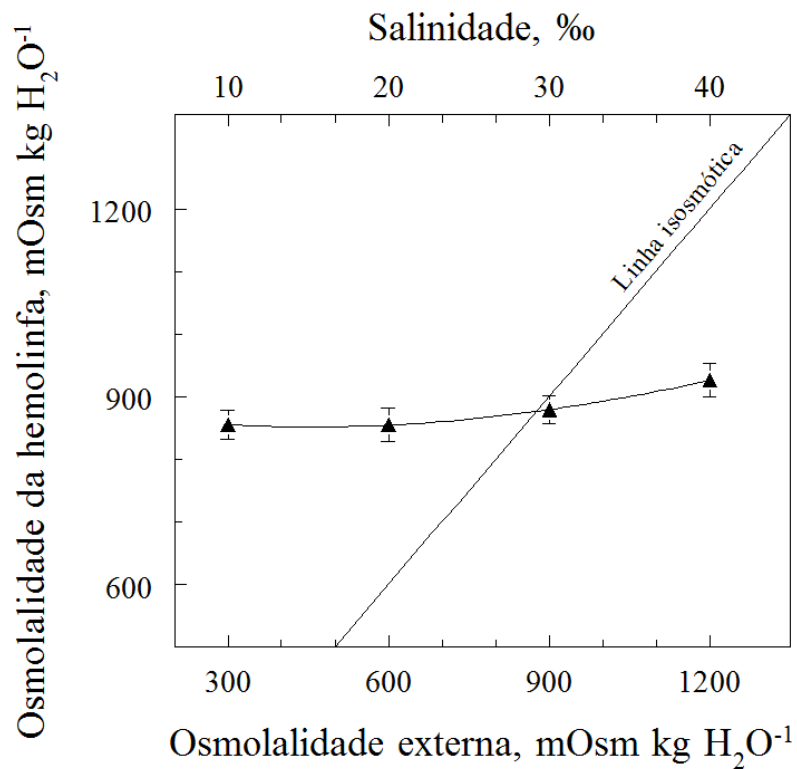
**Tabela 5. Valores determinados para a osmolalidade da hemolinfa de *Goniopsis cruentata* aclimatado em diferentes salinidades.**

Salinidade (‰S)	Amostragem (N)	Osmolalidade da hemolinfa (mOsm kg H <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )
10	8	855,0 ± 23,4
20	8	854,5 ± 29,9
30	8	879,0 ± 22,0
40	8	926,0 ± 26,5

**4.8. Efeito da aclimação em diferentes salinidades na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata***

O efeito da salinidade na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase está representado na Tabela 6. Similarmente ao que foi observado anteriormente na fração microsomal do caranguejo *G. cruentata* recém-capturado (ver Tabela 2), a estimulação da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ocorreu através de uma curva bifásica, indicando duas famílias distintas de sítios de ligação do ATP em todas as condições estudadas. A 10 ‰S e em condições saturantes de Mg<sup>2+</sup> (3 mmol L<sup>-1</sup>), Na<sup>+</sup> (50 mmol L<sup>-1</sup>), K<sup>+</sup> (50 mmol L<sup>-1</sup>) e concentrações crescentes de ATP (10<sup>-7</sup> a 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) revelaram uma família de sítios de alta afinidade pelo ATP com V<sub>M</sub>= 21,95 ± 1,1 nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, enquanto para a família de sítios de baixa afinidade pelo ATP foram observados valores máximos de V<sub>M</sub>= 54,54 ± 2,7 nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Valores similares foram obtidos a 20 e 40 ‰S (Figura 11B e Tabela 6), porém nota-se um deslocamento no sítio de alta afinidade pelo ATP (Figura 11 inserção A e B) bem como diferença nos valores de afinidade da enzima pelo ATP (K<sub>0,5</sub>= 0,0024 , 0,004 e 0,0033 mmol L<sup>-1</sup> para 10, 20 e 40 ‰S, respectivamente). Para animais aclimatados a 30 ‰S (Figura 11A), o valor da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase representa aproximadamente metade do valor que foi encontrado para o caranguejo recém capturado, embora os valores de K<sub>0,5</sub> para os sítios de alta afinidade são similares (K<sub>M</sub>= 0,015 mmol L<sup>-1</sup> e K<sub>0,5</sub>= 0,013 mmol L<sup>-1</sup> para 30 ‰S e recém-capturado, respectivamente) (ver Tabelas 2 e 6). Exceto para os sítios de alta afinidade pelo ATP revelados em salinidade de 30 ‰S, para todas as demais condições estudadas foram observadas interações sítio-sítio.



**Figura 10. Capacidade osmorregulatória de *Goniopsis cruentata* aclimatado durante 5 dias a diferentes salinidades.**

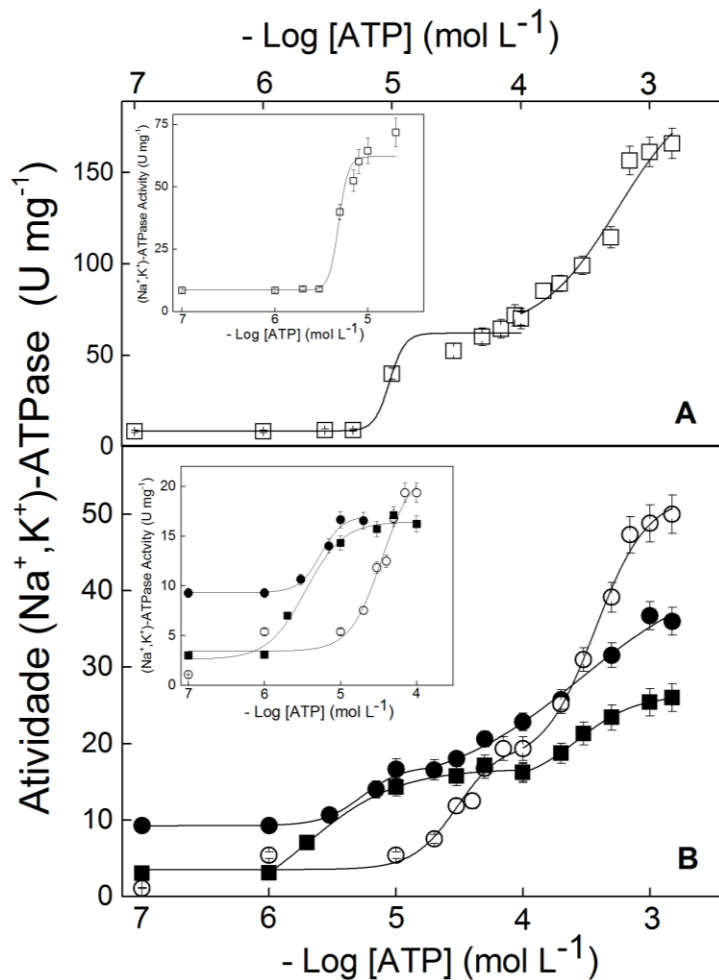
O poder regulatório para a osmolalidade da hemolinfa é 0,08 (sendo, o hiperregulatório 0,03 e o hiporregulatório 0,17). A linha isosmótica considera 1 ‰S= 30 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Não houve efeito da salinidade sobre a osmolalidade da hemolinfa (P= 0,152; ANOVA). Dados ajustados à polinômio de segundo grau ( $Y= 0,117X^2 - 3,505X + 878,2$ );  $R^2 = 1$  para a variação da osmolalidade ( $X \pm \text{EPM}$ , N=8).

**Tabela 6. Efeito da salinidade na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata*.**

Salinidade (‰S)	V <sub>M</sub> (nmol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5/M</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )	n <sub>H</sub>
10	21,95 ± 1,1	0,0024 ± 0,00012	1,5
	54,54 ± 2,7	0,050 ± 0,0002	2,7
20	16,91 ± 0,8	0,004 ± 0,0002	3,0
	35,72 ± 1,8	0,160 ± 0,008	1,6
30	78,97 ± 3,9	0,015 ± 0,0007	1,0
	164,22 ± 8,2	0,520 ± 0,03	6,9
40	16,45 ± 0,8	0,0033 ± 0,0002	1,7
	26,82 ± 1,3	0,310 ± 0,01	2,4

#### **4.9. Análise quantitativa da expressão de RNAm da subunidade $\alpha$ da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por qPCR em *Goniopsis cruentata***

Os resultados mostram que os valores de RNAm obtidos para a expressão da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *G. cruentata* aclimatado a 10 ‰S são aproximadamente 4 vezes maiores que os obtidos a 20, 30 e 40 ‰S (Figura 12). Além disso, não foi observada variação significativa na expressão da subunidade  $\alpha$  para animais aclimatados a 20, 30 e 40 ‰S.

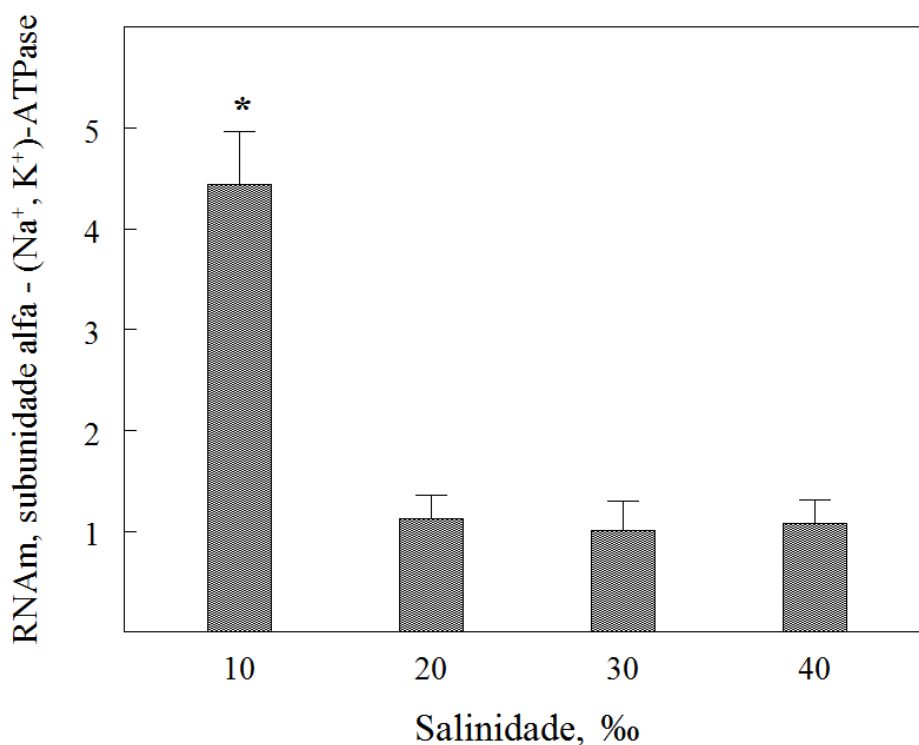


**Figura 11. Efeito da salinidade na modulação da atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  branquial de *Goniopsis cruentata* pelo ATP.**

A atividade enzimática foi determinada continuamente a  $25^\circ\text{C}$  em tampão HEPES  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,5 contendo  $\text{MgCl}_2$   $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NADH}$   $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{FEP}$   $3,18 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}$  de alameticina,  $\text{PQ}$   $49 \text{ U}$ ,  $\text{LDH}$   $110 \text{ U}$  e concentrações crescentes de ATP ( $10^{-7}$  a  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). A reação foi iniciada pela adição de  $44,0 \mu\text{g}$  de proteína conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três homogeneizados de brânquias ( $\pm\text{SD}$ ,  $N=3$ ). %.

**A-Estimulação da atividade a:** ( $\square$ ) 30‰S. **Inserção em A-** Sítio de alta afinidade: ( $\square$ ) 30‰.

**B-Estimulação da atividade a:** ( $\circ$ ) 10‰, ( $\bullet$ ) 20‰, ( $\blacksquare$ ) 40‰. **Inserção em B:** sítios de alta afinidade: ( $\circ$ ) 10‰, ( $\bullet$ ) 20‰ e ( $\blacksquare$ ) 40‰.



**Figura 12. Efeito da salinidade sobre a expressão de RNAm da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  extraída das brânquias de *Goniopsis cruentata*.**

A análise foi realizada por qPCR e a reação foi normalizada pelo gene PRL10 codificador da proteína ribossomal L10, cuja expressão é constitutiva. Os valores relativos foram calibrados em relação à salinidade de 30 ‰S (calibrador), sendo considerado arbitrariamente o valor 1. \* $P < 0,05$  comparado com o valor imediatamente anterior (ANOVA, SNK). ( $X \pm \text{EPM}$ ,  $5 \leq N \leq 7$ ).

A ANOVA indicou efeito da salinidade após 5 dias de exposição sobre a expressão de RNAm da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  ( $P < 0.001$ ) durante os desafios osmóticos (10, 20, 30 e 40 ‰S) impostos a *G. cruentata*. Sob desafio hiposmótico, houve elevação significativa de cerca de 4,5 vezes na expressão de RNAm para a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (SNK,  $P < 0.001$ ) nos caranguejos mantidos a 10 ‰S, e não houve diferença significativa naqueles mantidos em 20 ‰S (SNK,  $P = 0.960$ ), quando comparados com a condição controle (30 ‰S). Sob desafio hiper-osmótico, 40 ‰S, não houve diferença significativa na expressão de RNAm para a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (SNK,  $P = 0.879$ ) comparado com a condição controle (30 ‰S).

#### 4.10. Efeito do peptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *Goniopsis cruentata*.

Os resultados do efeito da adição do peptídeo FXYD2 na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Goniopsis cruentata* recém capturado (8 %S) estão apresentados na Tabela 7.

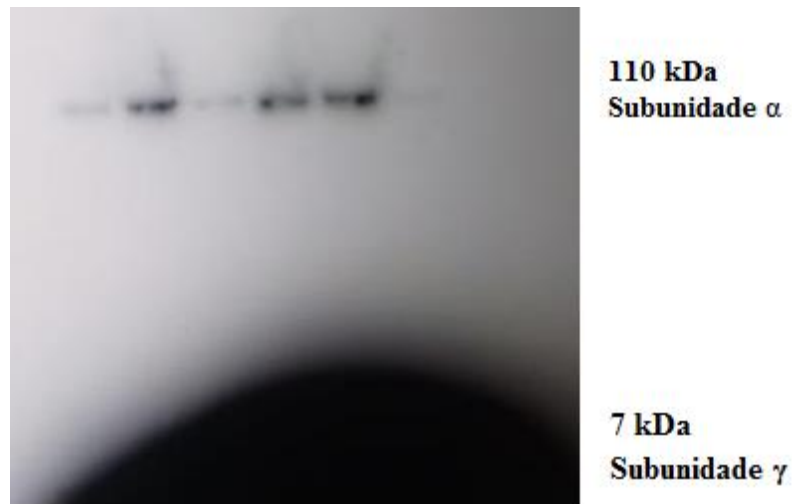
**Tabela 7. Efeito do polipeptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata* recém-capturado.**

Condição	(Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> )-ATPase	
	U mg <sup>-1</sup>	Relativa (%)
Controle	49,8	100,0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (50 mmol L <sup>-1</sup> )	59,4	120,0
FXYD2	18,2	36,5
FXYD2 + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	35,2	70,7

Interessantemente, na presença do peptídeo FXYD2 a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi inibida, ineditamente, cerca de 65%, contrariamente à estimulação esperada. Entretanto, na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (50 mmol L<sup>-1</sup>) o peptídeo FXYD2 estimulou em aproximadamente 20% a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase.

#### 4.11. Identificação do peptídeo FXYD2 na fração microsomal do caranguejo *Goniopsis cruentata*

A identificação do peptídeo FXYD2 na fração microsomal da brânquia de *G. cruentata* foi realizada utilizando-se um gel de poliacrilamida a 15% (p/v). Pode-se observar a existência de uma forte banda espalhada no gel correspondente a Mr entre 7 a 10 kDa (Figura 13). Esses dados sugerem que a fração microsomal de brânquia de *G. cruentata* possivelmente apresenta o peptídeo FXYD2.



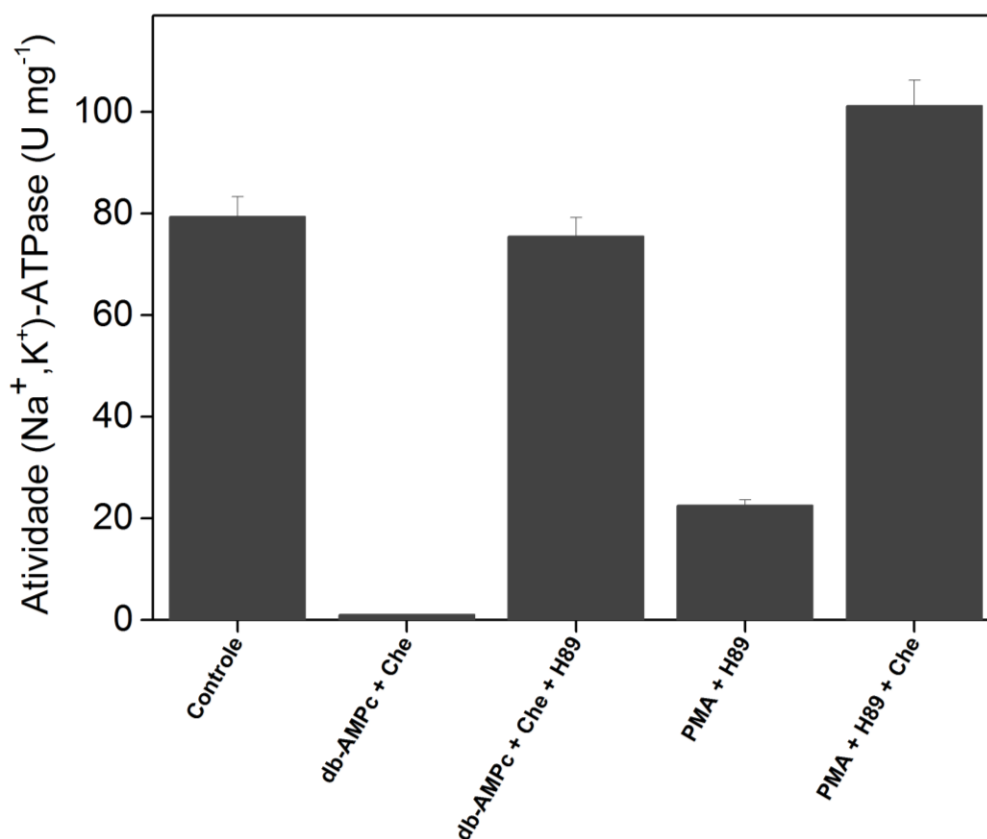
**Figura 13. Identificação do polipeptídeo FXYD2 na fração microsomal do caranguejo *Goniopsis cruentata*.**

A eletroforese em condições desnaturantes foi realizada utilizando-se um gel de poliacrilamida a 15% (m/v) e o peptídeo FXYD2 foi previamente fosforilado por  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  através da cascata de sinalização da PKA.

#### **4.12. Fosforilação da subunidade $\alpha$ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por PKA e PKC endógenas**

O efeito da fosforilação da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  branquial de *G. cruentata* por PKA e PKC está apresentado na Figura 14. A atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  estimada para o controle foi de  $78,8 \pm 2,4 \text{ nmol } [^{32}\text{P}] \text{ P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (coluna 1). A atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  estimada na presença dos ativadores de PKA e PKC foram  $0,09 \pm 0,00013$  e  $25,2 \pm 2,0 \text{ nmol } [^{32}\text{P}] \text{ P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente (colunas 2 e 4). Observe-se que nessas condições, houve uma inibição de aproximadamente 100% na presença de db-AMPC e cerca de 70% na presença de PMA. Entretanto, quando a atividade foi estimada na presença dos inibidores farmacológicos dessas duas kinases foram obtidos valores de  $75,7 \pm 2,3$  e  $108,4 \pm 5,8 \text{ nmol } [^{32}\text{P}] \text{ P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (colunas 3 e 5) que representam uma reversão da inibição da ordem de 96% para a PKA e uma reversão total da inibição por PKC. Esses resultados sugerem a presença de PKA e PKC endógenas na fração microsomal obtida de brânquias de *G. cruentata*.





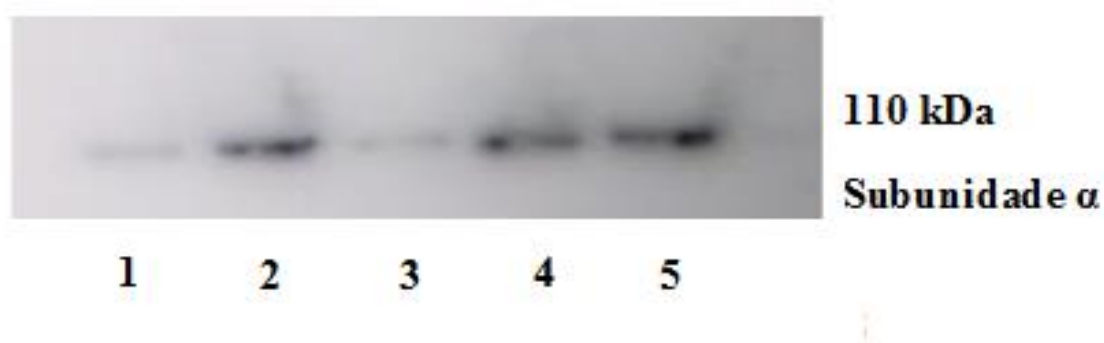
**Figura 14. Fosforilação da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de *G. cruentata* por PKA e PKC endógenas.**

Para o controle, a atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimada conforme descrito em Materiais e Métodos. A fosforilação por PKA foi realizada em Hepes 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EGTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,05%, db-AMPC 3 mmol L<sup>-1</sup> e queleritrina 3,5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, na ausência e presença de H-89 200 nmol L<sup>-1</sup> (inibidor farmacológico da PKA). A fosforilação por PKC foi realizada em Hepes 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, contendo MgCl<sub>2</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT 1 mmol L<sup>-1</sup>, Triton X-100 0,05%, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, fosfatidil serina 80  $\mu$ g/ $\mu$ L, PMA 100 nmol L<sup>-1</sup> e H89 200 nmol L<sup>-1</sup> na ausência e presença de queleritrina 3,5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (inibidor farmacológico da PKC).

#### **4.12. Eletroforese da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *Goniopsis cruentata* fosforilada por PKA endógena**

A Figura 15 mostra o resultado da eletroforese da fosforilação da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial de *G. cruentata* por PKA endógena. Na ausência do ativador da PKA (controle) praticamente não se observa nenhuma banda relativa à subunidade  $\alpha$  fosforilada (raia 1). Entretanto, nas raias 2 e 4 podem ser observadas bandas bem evidentes

em uma região correspondente a  $M_r \approx 110$  KDa, sugerindo a presença da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase fosforilada. Essa banda é resultada da fosforilação de um resíduo de serina da subunidade  $\alpha$  quando é adicionado ao meio de reação o db-AMPC, um ativador a PKA. Os dados da raia 3, onde não se observa nenhuma banda fosforilada, confirma tratar-se de fato da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase. O resultado esperado para a raia 5 deveria ser similar, uma vez que a reação foi realizada na presença de H89, um inibidor da PKA. Entretanto, ainda se observa uma banda, próxima a observada na raia 4, o que pode significar a concentração de inibidor de PKA não foi suficiente para inibir o processo de fosforilação. Ainda assim, esses resultados comprovam inequivocamente que existe uma PKA endógena na fração microsomal de brânquias de *G. cruentata*.



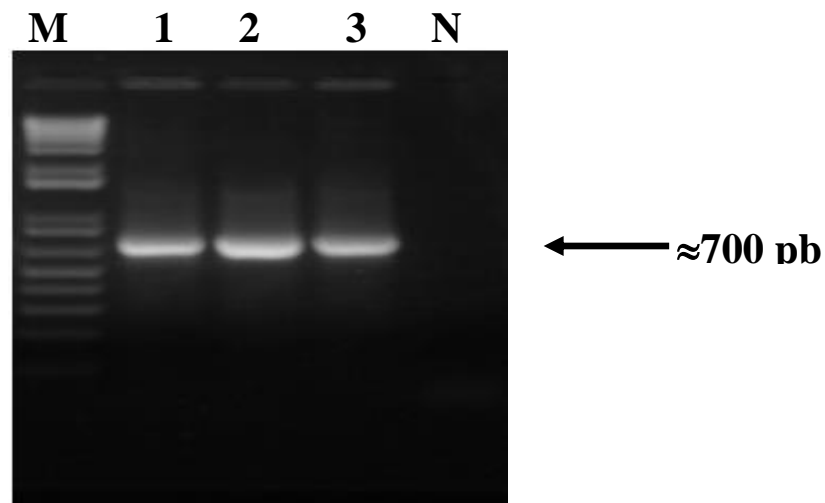
**Figura 15. Efeito da fosforilação da subunidade  $\alpha$  da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase por PKA endógena.**

A fosforilação da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase foi realizada incubando-se uma alíquota (20  $\mu$ L) da fração microsomal de brânquia de *G. cruentata* em tampão Hepes 20  $mmol L^{-1}$  pH 7,4, EGTA 1  $mmol L^{-1}$ ,  $MgCl_2$  10  $mmol L^{-1}$ , KCl 100  $mmol L^{-1}$ , DTT 1  $mmol L^{-1}$ , Triton X-100 0,05%, queletirina 3,5  $\mu mol L^{-1}$ , db-AMPC 0,5 e 3  $mmol L^{-1}$ , em um volume final de 100  $\mu$ L. Após 1h de incubação, a 25  $^{\circ}C$  a amostra foi aplicada em um gel de poliacrilamida 15%. Controles contendo H-89 200  $nmol L^{-1}$  (inibidor específico da PKA), também foram realizados nas mesmas condições descritas acima. 1. Controle; 2. db-AMPC 0,5  $mmol L^{-1}$ , 3. db-AMPC 0,5  $mmol L^{-1}$  + H89 200  $nmol L^{-1}$ ; 4. db-AMPC 3  $mmol L^{-1}$  e 5. db-AMPC 3  $mmol L^{-1}$  + H89 200  $nmol L^{-1}$ .

#### **4.19. Clonagem, sequenciamento dos cDNAs parciais, e confecção de primers específicos para a subunidade $\alpha$ da $(Na^+, K^+)$ -ATPase e PRL10 do tecido branquial de *Goniopsis cruentata***

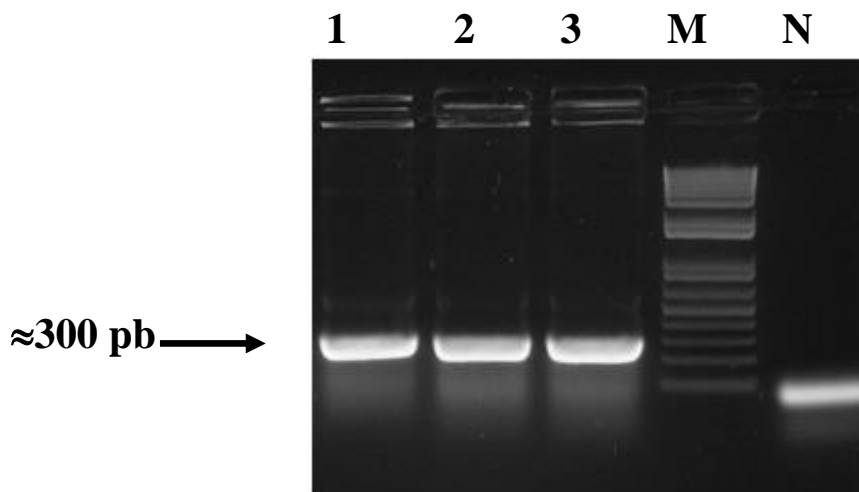
O par de “primers” degenerados NaK\_10F/NaK\_16R (ver Tabela 1), construídos baseados em sequências conservadas das subunidades  $\alpha$  da  $(Na^+, K^+)$ -ATPase de alguns

crustáceos (WEIHRAUCH et al., 2004; FALEIROS et al., 2010, FALEIROS et al., 2017), foi utilizado com sucesso na amplificação de um fragmento de tamanho esperado (700 pb, Figura 16) a partir do cDNA das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*, utilizado como molde. A combinação dos “primers” específicos para *Callinectes sapidus* PRL10\_Cs\_F e PRL10\_Cs\_R (ver Tabela 1), também foi utilizada com sucesso na amplificação de um fragmento esperado, uma banda de aproximadamente 300 pb (Figura 17), a partir do cDNA das brânquias posteriores de *G. cruentata*.



**Figura 16. Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação parcial da subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , com o par de primers degenerados NaK10F e NaK16R ( $\approx 700$  pb), a partir do cDNA das brânquias posteriores de *Goniopsis cruentata*.**

As raias 1, 2 e 3 correspondem ao cDNA das brânquias posteriores de *Goniopsis cruentata*. N, controle negativo (sem molde). M, marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).



**Figura 17. Visualização da eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação parcial da proteína ribossomal L10 (PRL10), com o par de primers PRL10\_Cs\_F e PRL10\_Cs\_R (≈300 pb), a partir do cDNA das brânquias posteriores de *Goniopsis cruentata*.**

As raias 1, 2 e 3 correspondem ao cDNA das brânquias posteriores de *Goniopsis cruentata*. N, controle negativo (sem molde). M, marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).

Os fragmentos parciais de cDNA da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase e PRL10 oriundos das brânquias posteriores, amplificados com sucesso anteriormente, foram purificados, quantificados, clonados em vetor *PCR 2.1-TOPO TA* (Thermo Scientific) e transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$ , resultando em algumas colônias isoladas em placas de *Petri* com meio LB contendo o antibiótico ampicilina e agentes seletivos. Três colônias para cada gene de interesse, crescidas em meio LB ágar com agentes seletivos, foram inoculadas em meio 3 - 5 mL de LB broth com ampicilina, e após verificar a eficiência da clonagem através de PCRs diagnóstico, com os respectivos primers apresentados na Tabela 1, um único clone para cada gene foi escolhido para a extração do DNA plasmidial (vetor + inserto de interesse) e posterior sequenciamento.

As sequências parciais de nucleotídeos codificantes para as sub-unidades  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (*pNaK\_Gcrug*, a ser liberado pelo Genbank) e para a proteína ribossomal L10 (*pPRL10\_Gcrug*, Genbank KX855934) são mostradas a seguir. As sequências marcadas em amarelo indicam os primers específicos (NaK\_Gcru\_F/R e PRL10\_Gcru\_F/R, Tabela 1) sintetizados para as análises de qPCR. O amplicons resultantes (sequências marcadas em

**amarelo** + em **negrito**) apresentam 122 e 129 pb, respectivamente. Das sequências de nucleotídeos abaixo foram excluídas as sequências de 37 e 51 nucleotídeos que representam, respectivamente, os primers degenerados NaK10F/16 e os primers específicos para *Callinectes sapidus*, PRL10\_Cs\_F/R, utilizados nas ampliações iniciais (Tabela 1).

> pNaK\_Gcrug (669 pb)

amplicon = 122pb

```
TGGTTTGACAACACCATCATTGAGGCTGACACCTCTGAGGACCAGTCAGGCTGCCAGTATG
ACAAGAGCTCTGAAGGGTGAAGACCCTCTCCAGGATTGCTGCTCTCTGCAACCGTGCAGA
GTTCAAGACTGGCCAGGAAGATGTTCCCATCCTTAAGCGAGAGGTAAATGGTGATGCTTCT
GAGGCTGCCCTGCTGAAGTGTGTGGAAGTGGCTGTTGGAGATGTTAGGGGCTGGCGTTCCC
GCAACAAGAAGGTTTGTGAGATTCTTTCAACTCAACCAACAAATACCAAGTATCTATCCA
CGAAACCCAGGACAAGAACGACCCCGCTACCTTCTTGTGATGAAGGGTGCCCTGAGAGA
ATCCTTGAGAGATGCTCAACCATCTTCATGAATGGTGAGGAAAAGCCCTTGGATGAAGAAA
TGAAGGAATCCTTCAACAATGCCTACCTGGAAGTCTTGGAGAGCGTGTGCTGGG
CTTCTGCGACTACATGCTTCCCTCAGACAAGTATTCCCCTAGGTTATCCCTTCGATGCCGAT
TCCGTCAATTTCCCCGTGCACGGCCTCAGGTTTCGTTCGGACTCATGTCCATGATTGATCCTC
CCCCTGCTGCTGTGCCTGATGCTGTGGCCAAGTGCCGTTCTGCTGGTATCAAAGGTCATC
```

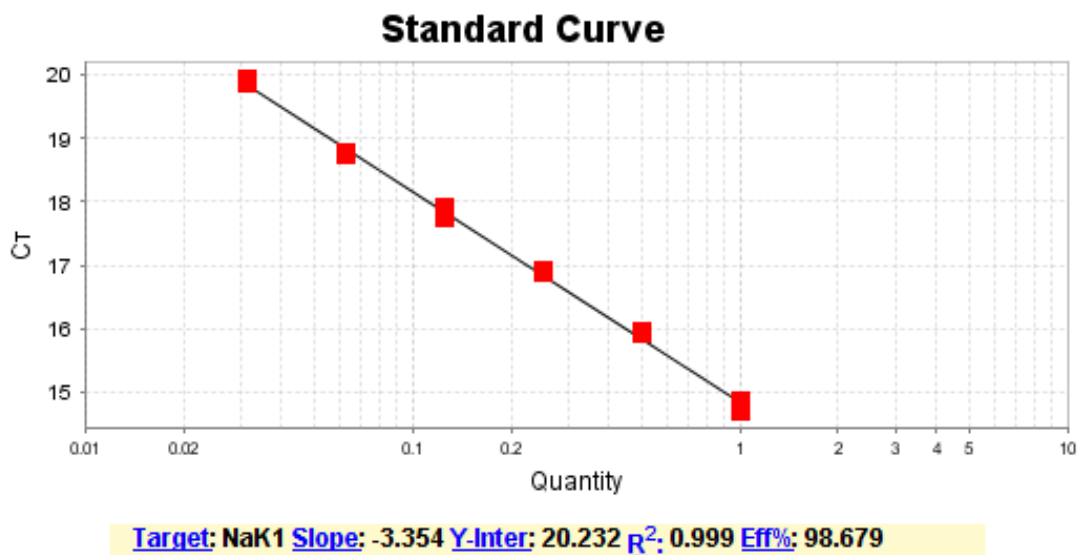
>pPRL10\_Gcrug (251 pb)

Amplicon = 129pb

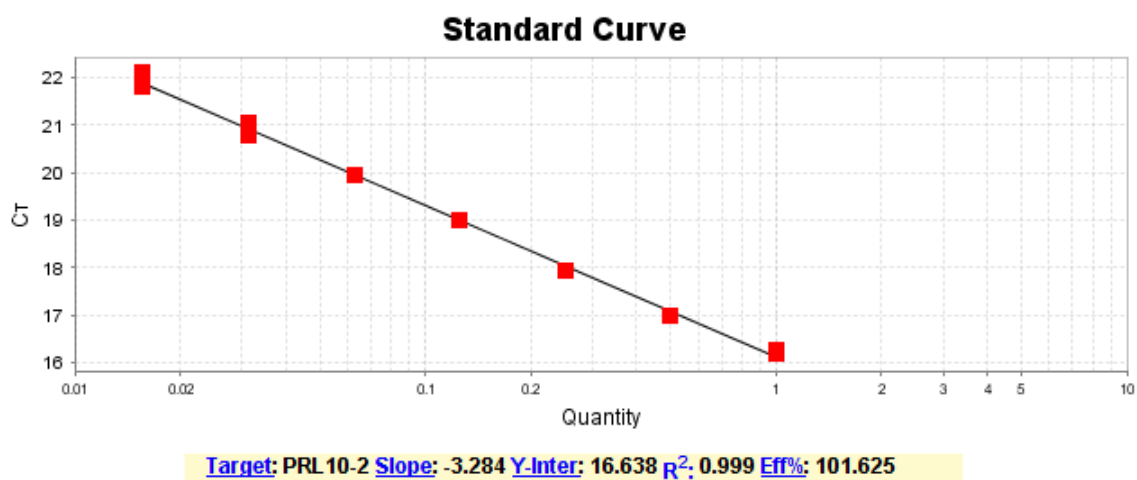
```
ACGTCCGCGTCCGGCTCCACCCCTTCCACGTGATCCGCATTAACAAGATGTTGTCCTGCGC
CGGGGCTGATAGGCTCCAGACAGGGATGCGAGGTGCCTTCGGTAAGCCGCAAGGCACAGTG
GCCAGGGTTCAGATCGGCCAGCCATCATGTCTGTTAGAACCCATGACAGGCACAAGGCTC
ACGTCATCGAGGCGCTCAGGAGGGCTAAGTTCAAGTACCCCGGCAGGCAGAAGATCTATGT
GTCTCGC
```

#### **4.20. Padronização e avaliação dos parâmetros reacionais dos ensaios moleculares de qPCR para os genes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase e PRL10 na espécie *Goniopsis cruentata***

As Figuras 18 (NaK) e 19 (PRL10) mostram as curvas padrões ou de eficiência obtidas para os pares de primers utilizados para a análise da expressão por qPCR da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, utilizando como normalizador endógeno, o gene codificador para proteína ribossomal L10 (PRL10). Evidencia-se os valores obtidos para o *ciclo threshold* (Ct) em relação às diferentes concentrações de amostras de cDNA logaritimizadas.



**Figura 18.** Curva de eficiência obtida para o par de primers (NaK\_Gcrug\_F/R) utilizados análise de expressão de RNAm por qPCR para (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Os valores da inclinação e R<sup>2</sup> foram, -3.35 e 0.999, respectivamente.



**Figura 19.** Curva de eficiência obtida para o par de primers (PRL10\_Gcrug\_F/R) utilizados para amplificar a proteína ribossomal L10, normalizador para a análise de expressão de RNAm por qPCR para (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Os valores da inclinação e R<sup>2</sup> foram, -3.28 e 0.999, respectivamente.

## **5. DISCUSSÃO**

Este estudo apresenta pela primeira vez dados de caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase presente nas brânquias posteriores do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata* recém capturado e aclimatado a 10, 20, 30 e 40 ‰S. Por estar presente na região costeira, mais especificamente no mangue, a osmorregulação desse animal vem a ser de extremo interesse, pois diferentemente de crustáceos provenientes de ambientes dulcícolas ou marinhos, o manguezal representa um ambiente em que a presença e ausência de água do mar coexistem. Neste estudo foram empregadas frações microsomais preparadas utilizando as brânquias posteriores do caranguejo, as quais se mostraram um sistema adequado para o estudo *in vitro* das propriedades cinéticas da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase.

### **Caracterização da brânquia**

As brânquias posteriores dos crustáceos estão envolvidas tanto na excreção quanto absorção de íons (LUQUET et al., 2002). A marcação fluorescente revelou que a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase pode ser observada através da lamela da brânquia posterior (Figura 1A) sendo que, a organização das filobrânquias da lamela branquial do caranguejo *G. cruentata* consiste em um epitélio de camada simples coberto por uma cutícula na superfície apical (Figura 1B). A arquitetura epitelial das lamelas da filobrânquia observada em sessões congeladas retiradas ao longo da brânquia conforma com o típico plano dos caranguejos (FREIRE et al., 2008). A região apical, localizada próxima da cutícula, é projetada a partir das células pilares estreitando a região basal no centro da lamela, com espaços entre pares opostos de células pilares formando um sistema irregular onde a corre a hemolinfa (Figura 1B). Uma marcação imuno-histoquímica mais detalhada da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase revela que a enzima é predominantemente distribuída na região apical das células pilares (Figura 1B), o que corrobora com o que foi observado para o caranguejo de mangue *Cardisoma guanhumi* (FARIAS et al., 2017). Entretanto, a distribuição não usual da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase nas células pilares, sugere que exista um reserva nas vesículas que podem se locomover para as células pilares em condições hipo-osmóticas.

### **Caracterização da fração microsomal**

A centrifugação em gradiente de sacarose revelou a presença de apenas um pico com atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Figura 2), diferindo de outros crustáceos como *C.*



*guanhumi* (FARIAS et al., 2017), *Dilocarcinus pagei* (FURRIEL et al., 2010) e *Clibanarius symmetricus* (LUCENA et al., 2012 como *Clibanarius vittatus*), todos apresentando dois picos de atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Dois picos de atividade insensível a ouabaína também foram observados, sugerindo a presença de outras ATPases na fração microsomal, provavelmente proveniente de regiões diferentes do epitélio da brânquia do animal (FURRIEL et al., 2010; LUCENA et al., 2012) ou frações de membrana com diferentes concentrações de lipídios. Tais características estão presentes em diversas outras espécies, porém difere das observações encontradas para o *Callinectes danae*, o qual apresenta apenas (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase na sua fração microsomal (MASUI et al., 2002). Posteriormente, a presença de outras ATPases foi extensivamente investigada na presença de diferentes inibidores.

A revelação com AgNO<sub>3</sub> da eletroforese SDS/PAGE revelou a presença de diferentes proteínas com diferentes pesos moleculares, o que de fato é esperado para a fração microsomal do tecido branquial. Entretanto, na eletrotransferência, durante o Western Blotting, foi observada uma única banda imuno específica no tecido branquial, sugerindo assim, tratar-se de uma única isoforma  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase com peso molecular de 110 kDa, o que pode ser correlacionado em outros trabalhos (FURRIEL et al., 2000; TOWLE e WEIHRAUCH, 2001; MASUI et al., 2002, 2005a; LUCU e TOWLE, 2003; BELLI et al., 2009; GARÇON et al., 2007, 2009). O processo de Western Blotting foi realizado duas vezes, uma vez através de uma eletroforese SDS/PAGE 5-20% e outra 6-12% (Figura 3 B e C), a fim de eliminar quaisquer dúvidas a respeito da presença de uma ou duas bandas imuno específicas.

### **Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase**

A atividade (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial do caranguejo *G. cruentata* recém capturado modulada pelo ATP apresentou duas curvas de saturação distintas, o que sugere a presença de duas famílias com afinidades diferentes pelo ATP. As duas famílias de afinidade pelo ATP já foram reportadas na enzima de mamíferos (GLYNN, 1985), já em crustáceos foi reportado pela primeira vez no caranguejo *Callinectes danae* (MASUI et al., 2002). A família de alta afinidade pelo ATP foi estimulada em  $V_M = 153,4 \pm 7,7$  nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína em concentrações crescentes de ATP, enquanto que, a família de baixa afinidade pelo ATP foi estimulada a valores máximos de  $V_M = 186,0 \pm 9,3$  nmol Pi

$\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, nas mesmas condições (Figura 4). De forma atípica, foi observada uma atividade basal em baixas concentrações de ATP ( $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) de aproximadamente  $140 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Quando comparada com a atividade de *Macrobrachium olfersii* (FURRIEL et al., 2000) recém capturado e habitante de água doce, a atividade é 2.9 vezes maior. Esse resultado é coerente com estudos de outros autores que relataram que, quanto menor a salinidade, maior a atividade específica da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (HARRIS e BAYLISS, 1988; COROTTO e HOLLIDAY, 1996; HENRY et al., 2002; LUCU e TOWLE, 2003)

Tem-se estabelecido que a atividade específica da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  não está relacionada com o habitat desses animais. Para caranguejos de água doce, camarões e lagostins a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  fica em torno de 127 a 686  $\text{nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Já para os crustáceos marinhos, a atividade fica em torno de 60 a 271  $\text{nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína enquanto que, finalmente, para crustáceos estuarinos, ou no caso semi-terrestres, como o *G. cruentata*, tem-se a faixa de 135 a 900  $\text{nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Desta forma, pode-se afirmar que as atividades encontradas neste estudo estão dentro do esperado para este animal.

Foram observados dois valores distintos de  $K_{0.5}$  durante a estimulação da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  pelo substrato ATP (Tabela 2), sendo  $K_{0.5} = 0,0013 \pm 0,0006 \text{ mol L}^{-1}$  e  $K_{0.5} = 0,085 \pm 0,004 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Em outras palavras, duas famílias distintas de sítios de ligação do ATP (GLYNN, 1985; WARD e CAVIERES, 1998) estão presentes na enzima, porém a localização de tais sítios ainda não está bem estabelecida. Ao contrário do que se tem afirmado em relação as atividades de diferentes crustáceos, a afinidade da enzima pelo ATP varia de acordo com o habitat desses animais. Observando os valores de  $n_H$  obtidos (Tabela 2), nota-se que tanto a família de baixa afinidade quanto a de alta afinidade pelo ATP apresentaram interações sitio-sítio ( $n_H = 1,3$  e  $3,0$ , respectivamente).

Vale ressaltar que, nas condições acima apresentadas há excesso de  $\text{Mg}^{2+}$  ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A concentração de  $\text{Mg}^{2+}$  livre permanece praticamente constante, enquanto que, após adições de diferentes concentrações de ATP, diferentes concentrações do complexo  $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$  é formado (Figura 4 Inserção b). Da mesma forma, observa-se que a concentração de ATP livre é aproximadamente 100 vezes menor do que a concentração do complexo  $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ . Assim, pode-se sugerir que a enzima não é estimulada pela presença de ATP livre no meio, mas sim pela concentração crescente do complexo  $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$  (GLYNN, 1985; FURRIEL et al., 2000; KARLISH, 2003; GARÇON et al., 2007). Quando calculado os

parâmetros cinéticos em relação a crescente concentração de Mg.ATP no meio, nota-se uma pequena variação em  $V_M$  e  $K_{0,5}$  (Tabela 2), indicando realmente a estimulação da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase pelo complexo.

A ausência de  $Mg^{2+}$  no meio impede a hidrólise do ATP, porém, na presença deste importante cofator a enzima é estimulada através de importantes mudanças conformacionais (GLYNN, 1985). Desta forma, pode-se afirmar que o  $Mg^{2+}$  é um cofator essencial para a atividade da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase (GLYNN, 1985; ROBINSON e PRATAP, 1991; BERBERIAN & BEAUGÉ, 1992; FURRIEL et al., 2001; MASUI et al., 2003; KARLISH, 2003; GATTO et al., 2007). Entretanto, elevadas concentrações de  $Mg^{2+}$  inibi a enzima (GLYNN, 1985) diminuindo a sua afinidade pelo ATP (BEAUGÉ, 1983; FONTES et al., 1992).

Em condições estequiométricas de  $Mg^{2+}$  e ATP (Figura 5), a  $(Na^+,K^+)$ -ATPase também foi estimulada através de uma única curva de saturação e através de interações sitio-sítio ( $n_H= 4,0$ ). Como já discutido anteriormente, excesso de  $Mg^{2+}$  pode inibir a atividade da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase, isto porque, acima de  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $Mg^{2+}$  ocorre uma mudança conformacional da enzima de  $E_1$  para  $E_2$  (Painel 8), o que diminui a sua afinidade por  $Mg^{2+}$ . Outro fato a ser observado é que, em condições crescentes de  $Mg^{2+}$  a enzima foi estimulada através de interações cooperativas ( $n_H= 2,6$ ), o que sugere múltiplos sítios de ligação para o  $Mg^{2+}$  e, possivelmente, está relacionado com a inibição da enzima (Tabela 2).

A elevada atividade basal observada na Figura 4 na presença de excesso de  $Mg^{2+}$  sugere que este íon atua como um modulador alostérico da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase estimulando o aparecimento da família de alta afinidade pelo ATP, o que não acontece em condições estequiométricas de ATP e  $Mg^{2+}$  onde apenas a família de baixa afinidade pelo ATP é estimulada. Em condições estequiométricas, baixas concentrações de ATP e  $Mg^{2+}$  ( $10^{-8}$  a  $7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) resultam em baixas concentrações do complexo Mg.ATP (Figura 5- inserção b), onde se observa uma baixa estimulação da  $(Na^+,K^+)$ -ATPase. Nota-se também que, a concentração do complexo Mg.ATP nunca será maior que a maior concentração de  $Mg^{2+}$  inicialmente adicionada ( $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) devido ao equilíbrio formado entre as espécies existentes. Por outro lado, elevadas concentrações estequiométricas de ATP e  $Mg^{2+}$  ( $7 \times 10^{-4}$  a  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), resultam em maiores concentrações do complexo, o que leva a estimulação da enzima, como anteriormente descrito para estimulações por ATP e  $Mg^{2+}$  (Figuras 4 e 5).

O sítio de ligação de alta afinidade pelo ATP da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase de *G. cruentata* induzida pelo excesso de Mg<sup>2+</sup> pode ser explicada devido as seguintes premissas: (1) Entre Mg.ATP 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> e 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, os locais de ligação de ATP de alta afinidade não são expressos, pois as concentrações de Mg<sup>2+</sup> livre variam entre 9,998×10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> e 8,829×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (ver Figura 5 e inserção b). Esses valores são muito baixos em comparação com o necessário para desencadear o surgimento desse sítio de ligação (2,031×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, veja a Figura 4B). Assim, a ausência dos sítios de alta afinidade pelo ATP em concentrações estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup> resulta da disponibilidade muito baixa de Mg<sup>2+</sup> livre que não pode sustentar a transição normal de E<sub>1</sub>P para E<sub>2</sub>P, causando uma redução drástica na hidrólise de ATP. O Mg<sup>2+</sup> livre é necessário para a fosforilação da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase por ATP ou Pi, e para a conversão da conformação de fosfoenzima com afinidade pelo ADP (E<sub>1</sub>P), assim como na conformação de fosfoenzima com afinidade pelo K<sup>+</sup> (E<sub>2</sub>P) (FUKUSHIMA e POST, 1978; HEGYVARY e JORGENSEN, 1981).

Os dados da Tabela 3 mostram que, Mg<sup>2+</sup> 0,3 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> e ATP 0,3 mmol L<sup>-1</sup>, a concentração de Mg<sup>2+</sup> livre (1,119×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, ver Figura 5 inserção b) está muito abaixo do valor 2,031×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> necessário para ativar os sítios de alta afinidade pelo ATP (Figura 4B). As medições usando fluoresceína e eosina para detectar transições de E<sub>1</sub>P para E<sub>2</sub>P realizadas na presença de concentrações crescentes de Mg<sup>2+</sup> livre mostram que o K<sub>0,5</sub> para Mg<sup>2+</sup> relacionado à transição E<sub>2</sub>P se situa na faixa de 0,15 a 0,7 mmol L<sup>-1</sup> (HEGYVARY e JORGENSEN, 1981; MONTES et al., 2015), valor semelhante ao estimado neste trabalho (ver Tabela 2). Esses dados revelam inequivocamente que os sítios de alta afinidade pelo ATP não foram expressos sob concentrações estequiométricas de ATP e Mg<sup>2+</sup> devido à falta de Mg<sup>2+</sup> livre, já que em vez de Mg<sup>2+</sup> 2,031×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> apenas Mg<sup>2+</sup> 1,119×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> está disponível para fosforilação.

Quando saturada por Mg<sup>2+</sup> (Figura 6), a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimulada através de uma única curva de saturação e interações sítio-sítio (n<sub>H</sub> = 2,6 mmol L<sup>-1</sup>). A estimulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase apresentou um valor de K<sub>0,5</sub> = 0,16 ± 0,01 mmol L<sup>-1</sup> e V<sub>M</sub> = 425,9 ± 25,5 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, reforçando a elevada afinidade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por Mg<sup>2+</sup>. Em concentrações saturantes de Mg<sup>2+</sup> (3 mmol L<sup>-1</sup>) a concentração Mg<sup>2+</sup> livre é maior que a concentração do complexo Mg.ATP (Figura 6 – inserção b), porém a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase continua sendo estimulada pelo complexo Mg.ATP.

Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> são essenciais para o funcionamento da enzima, entretanto, existem controvérsias acerca da afinidade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase de crustáceos pelo Na<sup>+</sup>, pois os

valores de  $K_{0,5}$  variam entre 0,06 e 41,6 mmol L<sup>-1</sup> (WANSON et al., 1984; WILKIE, 1987; HARRIS e BAYLLISS, 1988; ROBINSON & PRATAP, 1991; VILSEN, 1995; THERIEN et al., 1996; SPECHT et al., 1997; LUCU e TOWLE, 2003). A razão para esta grande variação, se deve ao fato da afinidade da enzima pelo Na<sup>+</sup> estar relacionada com a isoforma da subunidade  $\alpha$ , sendo o tecido onde a mesma é expressa também extremamente importante (SWEADNER, 1989; LEVENSON, 1994; THERIEN et al., 1996; BLANCO e MERCER, 1998; SWEENEY e KLIP, 1998; CRAMBERT et al., 2000; LOPEZ et al., 2002). Tinha-se como premissa que os valores de  $K_{0,5}$  seriam maiores em espécies de água doce, porém, estudos recentes têm mostrado que, independente da salinidade e/ou aclimatação, se tem uma variação constante nos valores de  $K_{0,5}$  (4,0 a 6,5 mmol L<sup>-1</sup>) (LEONE et al., 2015a; GARÇON et al., 2009).

A (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimulada pelo Na<sup>+</sup> ( $V_M = 425,0 \pm 23,4$  nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) através de uma única curva de saturação ( $n_H = 1,5$ ) e com  $K_{0,5} = 5,1 \pm 0,3$  mmol L<sup>-1</sup> (Figura 7), o que está de acordo com os valores anteriormente apresentados. Na ausência de Mg<sup>2+</sup>, observa-se uma atividade residual de aproximadamente 62,1 nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína, o que sugere a presença de uma ATPase estimulada por Na<sup>+</sup>. De maneira similar, a atividade residual insensível a ouabaína também sugere a presença de ATPases estimuladas por Na<sup>+</sup> (Figura 7, inserção). Uma possível explicação seria a presença da Na<sup>+</sup>-ATPase na fração microsomal, responsável pela regulação da concentração de Na<sup>+</sup> e volume celular (PROVERBIO et al., 1991).

O valor de  $K_{0,5}$  determinado pela estimulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial do caranguejo *G. cruentata* por K<sup>+</sup> ( $V_M = 485,3 \pm 24,3$  nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) foi aproximadamente igual a 0,9 mmol L<sup>-1</sup> através de interações sitio-sítio ( $n_H = 0,9$ ) (Figura 8), sendo similar aos relatados para a enzima obtida do tecido branquial de *M. amazonicum* recém capturado e aclimatado à 21‰ (BELLI et al., 2009, FABRI et al., 2019), *C. danae* recém capturado à salinidade de 33‰ (MASUI et al., 2005a) e *Callinectes ornatus* também recém capturado (GARÇON et al., 2007). Já os valores de  $K_{0,5}$  estimados para as espécies *D. pagei* (FIRMINO et al., 2009), *M. olfersii* mantido em água doce (FURRIEL et al., 2001) e *C. vitatus* recém capturado (GONÇALVES et al., 2006) são cerca de 1,6 vezes maiores do que os calculados para o *G. cruentata*, porém a salinidade em que o animal se encontra parece não ser fator de variação da afinidade da enzima por K<sup>+</sup>.

K<sup>+</sup> pode ser substituído por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na estimulação da atividade ATPase de crustáceos (HOLLIDAY, 1985; TOWLE e WEIHRAUCH, 2001; MASUI et al., 2002, 2003;

WEIHRAUCH et al., 2004; FURRIEL et al., 2004; MENDONÇA et al., 2007; WEINER & HAMM, 2007; BELLI et al., 2009). A atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase estimulada por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi  $V_M = 497,9 \pm 24,9$  nmol de Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína. Nota-se que, a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi maior na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, o que sugere a correlação da enzima com processos importantes na excreção de compostos nitrogenados. Entretanto, quando comparadas as afinidades por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, observa-se que a enzima possui maior afinidade por K<sup>+</sup> ( $K_{0,5} = 0,9$  mmol L<sup>-1</sup>) que por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ( $K_{0,5} = 9,7$  mmol L<sup>-1</sup>).

### **Efeito dos inibidores na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase**

A atividade ATPase total foi obtida na presença e ausência de ouabaína, sendo possível caracterizar a atividade atribuída somente à (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, de acordo com o que já foi relatado previamente na literatura (FURRIEL et al., 2001, 2004; MASUI et al., 2005a; GARÇON et al., 2007, 2009; BELLI et al., 2009). Vale a pena destacar que, além da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, outras enzimas capazes de hidrolisar uma molécula de ATP foram identificadas na fração microsomal, já que uma atividade ATPase insensível a ouabaína foi observada em todos os ensaios cinéticos com os íons moduladores da enzima.

A capacidade inibitória da ouabaína foi  $K_I = 196,6 \pm 9,8$  μmol L<sup>-1</sup>. Apenas uma curva de saturação foi observada, indicando que apenas uma isoforma da subunidade α da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase está presente na fração microsomal. Dessa forma, para se entender melhor o processo de osmorregulação em crustáceos é necessário compreender melhor as características inibitórias das possíveis enzimas presentes na fração microsomal. Na membrana plasmática, encontram-se, além da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, outros transportadores de íons, como por exemplo, canais de K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, V-ATPases, trocadores de Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que também participam da osmorregulação (KIRSCHNER, 2004; FREIRE et al., 2008). Entretanto, além da presença de canais e trocadores iônicos, existem na membrana, outras ATPases que também são estimuladas por Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, o que confere maior complexidade a fração microsomal.

A atividade residual relativa (aproximadamente 1,7%) na presença de ortovanadato (100 μmol L<sup>-1</sup>) e ouabaína (3 mmol L<sup>-1</sup>) sugere a presença de fosfatases neutras na membrana, assim como P-fosfatases, diferentes da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase e/ou Ca<sup>2+</sup>-ATPase. A presença de fosfatases na fração microsomal é comum a outras espécies de caranguejos e siris, tais como *C. guanhuami* e *C. danae*, respectivamente (GONÇALVES et al., 2006; SANTOS et al., 2007, LUCENA et al., 2012; LEONE et

al., 2014; MASUI et al., 2002), pois estas são essenciais na remoção de grupos fosfato de diversas macromoléculas (GREEN et al., 1971).

Similarmente, na presença de ouabaína ( $3 \text{ mmol}^{-1}$ ) e teofilina ( $5 \text{ mmol}^{-1}$ ), a atividade residual relativa (aproximadamente 5,3%) sugere a presença de fosfatases alcalinas na fração microsomal, sendo também reportada para outras espécies (GONÇALVES et al., 2006; SANTOS et al., 2007; LUCENA et al., 2012; LEONE et al., 2014). A teofilina inibe de forma não competitiva a desfosforilação de macromoléculas ao se ligar no complexo enzima substrato (CURTI et al., 1987), dessa forma não foi observada nenhuma atividade relativa.

Também foi observada uma atividade residual relativa referente à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase na presença de tapsigargina ( $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou EGTA ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ouabaína ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Vale ressaltar que, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é uma P-ATPase, e é responsável pelo transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática (PALMGREN & NISSEN, 2011). Por apresentar similaridades tanto estruturais quanto catalíticas com a  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , o uso da tapsigargina resulta na inibição específica da enzima no retículo endoplasmático, mantendo-a na conformação  $\text{E}_2$  (SAGARA & INESI, 1991).

Foi observado a possível presença de  $\text{Na}^+$ - e/ou  $\text{K}^+$ -ATPases na fração microsomal, na presença de ácido etacrínico ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ouabaína ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo que o primeiro é um diurético e inibidor específico da  $\text{Na}^+$ -ATPase, porém em altas concentrações também pode inibir a  $\text{K}^+$ -ATPase. Foi observado que, a diferença entre a estimulação pelo  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi mínima ( $V_M = 66,0 \text{ nmol de Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $V_M = 63,1 \text{ nmol de Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente). Entretanto, ainda assim pode-se afirmar que existe uma atividade  $\text{Na}^+$ -ATPase maior.

Não foi observada a presença de  $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPases}$  ou  $(\text{FoF}_1)\text{-ATPases}$  na membrana. A bomba de prótons, ou  $\text{V-ATPase}$ , está presente em diversas células (CIPRIANO et al., 2008) e é inibida em concentrações nanomolares de baflomicina (DROSE et al., 1993). A presença considerável de  $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPases}$  na fração microsomal de *M. amazonicum* (FALEIROS et al., 2010; LUCENA et al., 2015) e *D. pagei* (FIRMINO et al., 2011), crustáceos de água doce, contrasta com a modesta presença da mesma em crustáceos marinhos, tais como *C. danae* (MASUI et al., 2002) e *C. ornatus* (GARÇON et al., 2011), e total ausência no caranguejo semi-terrestre *G. cruentata*.

Desta forma, como trata-se de um caranguejo semi-terrestre, dependente da água do mar apenas para se reproduzir, a expressão desta enzima se faz desnecessária, pois a

captura de  $\text{Na}^+$  para a sobrevivência do animal é quase que irrelevante, devido a elevada salinidade do local.

Vale ressaltar que, todos os dados ressaltados anteriormente foram realizados em animais recém capturados, onde a salinidade medida era referente a água utilizada durante a coleta. Assim, para compreender melhor como estes animais se adaptam a uma variação constante de salinidade nos manguezais, os caranguejos recém capturados foram aclimatados em diferentes salinidades (10 a 40 ‰). Diversos transportadores já foram caracterizados a nível molecular e indicados como possíveis responsáveis pela osmorregulação em crustáceos eurialinos, tais como o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (TOWLE et al., 1997a), a  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$  (TOWLE et al., 2001), a  $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$  (WEIHRAUCH et al., 2001) e o cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (TOWLE et al., 1997b), entretanto, neste estudo, buscou-se compreender melhor qual era a contribuição a nível molecular e cinético da  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$  no processo osmorregulatório.

### **Capacidade osmorregulatória do caranguejo semi-terrestre *Goniopsis cruentata***

Muitos estudos mostram que, quando um crustáceo migra de um ambiente hipersalino (como o mar – 33 ‰, por exemplo) para um ambiente com salinidade mais baixa/variante ou inexistente (manguezal, rios e lagos), a atividade  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$  aumenta drasticamente (PEQUEUX, 1995). Um exemplo deste comportamento foi reportado para o caranguejo azul *Callinectes sapidus*, o qual apresentou uma atividade  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$  duas vezes maior nos animais transferidos de 35 ‰ para 5 ‰ (TOWLE et al., 1976;). Uma das razões para este comportamento é justificado pelo intenso transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através do epitélio. Entretanto, ainda permanece indefinido se o aumento na atividade  $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$  é resultado da síntese de RNAm, ou se está relacionado com processos pós-traducionais (TOWLE et al., 2001).

Assim como já reportado anteriormente em relação a caracterização cinética dos animais recém capturados, está reportado aqui pela primeira vez o processo de aclimação do caranguejo semi-terrestre *G. cruentata*. Diferentemente de outras espécies, como o camarão de água doce *M. amazonicum* e o siri *C. danae*, que habita ambientes de água salgada, o caranguejo *G. cruentata* por viver no mangue, enfrenta sazonalmente alterações na salinidade no ambiente em que vive. Algo interessante observado com a aclimação de *G. cruentata* é que, diferentemente do que já tinha sido observado por Zanders & Martelo (1984, 1986), o animal além de hiperregular em baixas salinidades



também hiporegula em salinidades mais elevadas, como já reportado para o caranguejo estuarino semi-terrestre *Chasmagnathus granulatus* (LUQUET et al., 2002; CHARMANTIER et al., 2002; LUQUET et al., 2005).

Apesar das variações de salinidade durante o processo de aclimação, não foi observada uma variação significativa na osmolalidade da hemolinfa (Figura 10), onde os valores ficam entre  $855,0 \pm 23,4$  e  $926,0 \pm 26,5$  mOsm kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> (Tabela 5). Essa resposta osmorregulatória forte, principalmente em meios mais diluídos, apenas demonstra a capacidade deste animal em transportar Na<sup>+</sup> através do epitélio, assim como também sugere um forte mecanismo de retenção e hiperregulação, que primordialmente ocorre nas brânquias posteriores (PEQUEUX, 1995; TAYLOR & TAYLOR, 1992; TOWLE & WEIHRAUCH, 2001). Em contraste, em condições mais severas de salinidade, ou seja, acima de 30 ‰, ocorre o processo inverso, onde a habilidade encontra-se na excreção de Na<sup>+</sup> do epitélio contra um gradiente osmótico, através de mecanismos hiporregulatórios ainda não totalmente compreendidos (LUQUET et al., 2005). Nestas condições, infere-se que as glândulas antenárias são os órgãos excretores mais importantes para manter a homeostase do animal (ZANDERS & MARTELO, 1984).

Sabe-se que, os mecanismos fisiológicos que os organismos eurialinos adquirem frente a mudanças de salinidade ainda é pouco explorada a nível molecular, principalmente no que diz respeito a regulação da expressão gênica (LUQUET et al., 2005). A Figura 12 traz o efeito da salinidade sobre a expressão de RNAm da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase extraída das brânquias de *G. cruentata*. Nota-se que, a expressão do RNAm da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi mais significativa nos animais aclimatados a 10 ‰, enquanto que para as demais salinidades não foi observado variação significativa na expressão. Esta resposta rápida de expressão do RNAm da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em meios mais diluídos sugere que diferentes mecanismos de regulação ocorram nestas condições, já que em concentrações salinas mais elevadas não se observa tal resposta (LUQUET et al., 2005).

Apesar da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase nos animais aclimatados ser menor do que a observada nos animais recém capturados (Tabela 2 e 5), e pelo contraste de maior expressão de RNAm em meios mais diluídos (10 ‰), pode-se sugerir que, neste momento o transporte de íons ocorre através da membrana, porém, não as custas da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, indicando um processo adaptativo nestas condições. Tal fato corrobora com a habilidade de caranguejos eurialinos compensar a perda de íons que

ocorre em meios diluídos por transporte ativo através do epitélio, porém contrasta com o que já foi reportado para diversos crustáceos que, em meio diluído, tem a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  aumentada, como é o caso dos caranguejos *C. danae* (GARÇON et al., 2007) e *Callinectes sapidus* (NEUFELD et al., 1980) (Tabela 8).

Em contraste com o observado em relação a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , esperava-se que, a expressão do RNAm fosse maior em baixas salinidades, como foi reportado por Faleiros e colaboradores (2010), onde os autores descrevem que, a expressão do RNAm diminui cerca de quatro vezes em *M. amazonicum* aclimatado a 25‰, quando comparado com o mesmo animal proveniente de ambiente dulcícola. Vale ressaltar que, a porcentagem de  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  expressa na célula de interesse depende da degradação das subunidades da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  (PIRKMAJER e CHIBALIN, 2019), e assim, o controle sobre a expressão da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  permite que a célula se adeque frente a diferentes demandas de transporte de íons.

### **Efeito da salinidade na atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$**

Mais especificamente em relação a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  dos animais recém capturados, duas famílias de afinidades distintas pelo ATP foram observadas (Tabela 2). Duas famílias, uma de alta ( $0,1$  a  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e outra de baixa afinidade pelo ATP ( $0,04$  a  $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram reportadas nas isoformas da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  encontradas em mamíferos (GLYNN, 1985; WARD & CAVIERES, 1998). Em todas as salinidades estudadas (Tabela 6), a estimulação da atividade  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  pelo ATP apresentou as mesmas duas famílias de afinidade (Figura 11), porém, os parâmetros cinético foram alterado drasticamente. Algo interessante a ser ressaltado é que, diferentemente dos animais recém capturados, não foi observado uma atividade basal significativa.

Quando submetido a uma salinidade de 10 ‰, a atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  tanto para a família de alta afinidade ( $V_M = 21,95 \pm 1,1 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína) quanto para a de baixa afinidade ( $V_M = 54,54 \pm 2,7 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína) foi cerca de 86 e 71% menor, respectivamente, em relação a observada em animais recém capturados (ver Tabela 2 e 6). Algo similar é observado em 20 e 40 ‰, e apenas quando em 30 ‰ nota-se um aumento na atividade da  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , sendo  $V_M = 78,97 \pm 3,9 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína e  $V_M = 164,22 \pm 8,2 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína para a família de alta e baixa afinidade pelo ATP respectivamente (Tabela 6). Vale

ressaltar que, quando em salinidade 30 ‰ encontra-se próximo a linha isosmótica (29 ‰) (Figura 10). Um comportamento similar foi observado no caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (LUCENA et al., 2019b). Foi também reportado por Faleiros e colaboradores (2018) que, o ermitão *Clibanarius symmetricus* aclimatado a 5‰ apresentou uma atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase menor (Tabela 8), além de apresentar apenas uma família de afinidade pelo ATP antes da aclimação, enquanto que os animais não aclimatados apresentavam ambas as famílias (GONÇALVES et al., 2006).

A afinidade pelo ATP foi alterada no processo de aclimação em ambas as famílias. Os valores de  $K_{0,5}$  obtidos para os animais recém capturados foram  $0,013 \pm 0,0006 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,085 \pm 0,004 \text{ mol L}^{-1}$ , para as famílias de alta e baixa afinidade respectivamente (Tabela 2). Em salinidades 10 e 20 ‰, nota-se um aumento na afinidade pelo ATP na primeira família ( $K_{0,5} = 0,0024 \pm 0,00012 \text{ mol L}^{-1}$  e  $K_{0,5} = 0,004 \pm 0,0002 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente), algo parecido também ocorre nos animais aclimatados a 40 ‰ ( $K_{0,5} = 0,0033 \pm 0,0002 \text{ mol L}^{-1}$ ) e, apenas nos caranguejos a 30 ‰ foi observado um valor similar ao dos animais recém capturados ( $K_M = 0,015 \pm 0,0007 \text{ mol L}^{-1}$ ) (Tabela 6). Vale ressaltar que, interações sitio-sítio foram observadas em todas as salinidades estudadas, exceto em salinidade 30 ‰, onde a estimulação da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase apresentou comportamento Michaeliano ( $n_H = 1,0$ ). Considerando a família de baixa afinidade, apenas os animais aclimatados a 10 ‰ apresentaram maior afinidade pelo ATP em relação aos animais recém capturados (Tabela 2 e 6), enquanto que as demais salinidades estudadas apresentaram valores de  $K_{0,5}$  significativamente maiores que  $0,085 \pm 0,004 \text{ mmol L}^{-1}$  (Tabela 6).

### **Identificação da possível presença do peptídeo FXYD2 na fração microsomal**

Entendendo melhor como estes animais osmorregulam em diferentes salinidades, ficou agora apenas um questionamento: o peptídeo FXYD2 está presente nas frações microsomais estudadas? Se presente, de que forma está relacionado com a regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase? Sabe-se que, a atividade catalítica da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em muitas espécies pode ser modificada por proteínas kinases A e C (PKA e PKC, respectivamente) assim como através de interações com a subunidade regulatória FXYD (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Todas as isoformas do peptídeo FXYD em células de mamíferos estão de alguma forma relacionadas com a regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (GEERING, 2008). Em crustáceos, pouca informação se tem sobre o peptídeo, mas também acredita-

se que esteja relacionado com a regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Adicionalmente, sabe-se que uma das formas intrínsecas de regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase é através da interação das outras subunidades com o peptídeo FXYD, além da concentração de íons e modificação covalente (FONTES et al., 2014; PIRKMAJER e CHIBALIN, 2019). O caranguejo azul, *C. danae* foi o primeiro crustáceo relatado a exibir a subunidade FXYD2, uma proteína de 6,5 kDa reconhecida por um anticorpo anti-FXYD2  $\gamma$ C33 que é fosforilado por PKA endógena (SILVA et al., 2012).

Para identificar a possível presença do peptídeo nas frações microsomais de *G. cruentata*, foi primeiro observado o efeito do peptídeo FXYD2 exógeno na atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Como já descrito anteriormente, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> estimula a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Tabela 2 e 7). A presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> causa modificações covalentes na estrutura da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, que por sua vez, estimula a atividade da proteína. Porém, na presença do peptídeo FXYD2 exógeno observa-se uma inibição de aproximadamente 65% da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, sugerindo que, a associação da subunidade  $\alpha/\beta$  e o peptídeo FXYD2, regula negativamente a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. De forma interessante, na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e FXYD2 observa-se uma estimulação de aproximadamente 20% da atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em relação a atividade na presença do peptídeo exógeno. Como já mencionado anteriormente, a modificação na estrutura da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> provavelmente expõe o sítio de ligação do peptídeo FXYD2, estimulando a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Desta forma, pode-se sugerir inicialmente que o peptídeo FXYD2 está presente na fração microsomal estudada, e possivelmente está relacionado com regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.

A conformação em que a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase se encontra (E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub>) influencia na quantidade de fosfato que é incorporado, já que dependendo da conformação, a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase pode estar mais suscetível a fosforilação por PKA e menos por PKC, ou vice versa (FESCHENKO & SWEADNER, 1994). A localização do sítio de fosforilação da PKA foi identificada na alça TM4, sendo o resíduo Ser<sup>943</sup> passivo de fosforilação (CHENG et al., 1997; POULSEN et al., 2010). O resíduo Ser<sup>943</sup> presente nesta alça pode estar exposto no citosol ou, de acordo com o transporte de íons, próximo a membrana plasmática, o que confere a mudança conformacional na estrutura da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (FESCHENKO & SWEADNER, 1994; CHENG et al., 1997). De forma similar, a localização do sítio de fosforilação da PKC foi identificada no resíduo Ser<sup>18</sup> próximo ao N-terminal da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, porém ainda há controvérsias sobre a existência de mais

de um sítio de fosforilação (FESCHENKO & SWEADNER, 1994). Sabe-se também que, nem todas as unidades da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase estão ativas na célula, o que gera um fator extra em relação a regulação da proteína na membrana (FESCHENKO & SWEADNER, 1994; PIRKMAJER & CHIBALIN, 2019).

Foi observado que a fosforilação por PKA e PKC endógena diminuiu a atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase (Figura 14), exibindo um efeito inibitório. As inibições tanto por PKA quanto por PKC foram quase que completamente revertidas na presença dos antagonistas H89 e PMA, respectivamente, sugerindo que PKA possivelmente fosforila o resíduo de Ser<sup>943</sup> (CHENG et al., 1997; POULSEN et al., 2010) e PKC, o resíduo de Ser<sup>18</sup> (FESCHENKO & SWEADNER, 1997; CHIBALIN et al., 1998, 1999), ambos localizados na subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, similar ao observado no caranguejo *U. cordatus* (LUCENA et al., 2019b). A autorradiografia em SDS-PAGE confirmou que, tanto a subunidade  $\alpha$  quanto a  $\gamma$  foram fosforiladas por PKA endógena (Figura 13 e 15), sendo que a fosforilação do peptídeo FXYD2 por PKA corrobora com o que foi observado anteriormente na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e FXYD2 exógeno, e por sua vez, sugere fortemente a presença do peptídeo nas frações microsomais de *G. cruentata*.

Para que a fosforilação do peptídeo FXYD2 por PKA endógena ocorra, o peptídeo deve estar associado ao complexo  $\alpha$ - $\beta$ / $\gamma$  (CORTES et al. 2011; PIRKMAJER & CHIBALIN, 2019). Entretanto, sabe-se que a regulação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por PKA é ainda controversa em mamíferos (FESCHENKO & SWEADNER, 1994), o que adiciona uma dificuldade extra no que se conhece em crustáceos. Vale ressaltar também que, os sítios de fosforilação da PKA em ambas as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  (ou FXYD2) não estão acessíveis quando se tem uma preparação com (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase purificada (CORTES et al., 2006, 2011), já que para ser exposto, é necessário Triton-X, e na sua ausência pouco efeito é observado (SILVA et al., 2012). Assim, trabalhar com frações microsomais de membrana contribui para um melhor entendimento sobre a fosforilação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase proveniente das brânquias posteriores de *G. cruentata*.

**Tabela 8. Atividade específica e afinidade pelo ATP da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase branquial em crustáceos decápodes selecionados de habitats de diferentes salinidades e/ou aclimatados em várias salinidades experimentais.**

Infraordem/ Subordem	Família	Habitat/ Táxon	Espécie	V (U mg <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> ou K <sub>0,5</sub> (µmol L <sup>-1</sup> )	Habitat 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	Água doce		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 guanhumi</i>		148,5	60	16	Farias et al. (2017)		
					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	Água salgada	Wanson et al. (1984)	
					<i>Minuca pugnax</i>	466,7	560	Água salgada	Holliday (1985)	
				Caranguejo (M)	<i>Ucides cordatus</i>		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							
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	Habitat/ Táxon	Espécie	V (U mg <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> ou K <sub>0,5</sub> (µmol L <sup>-1</sup> )	Habitat ou aclimatação (%oS)	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>Eriocher 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	Moraes (2019)	
			22* e 55**	2,4* e 50**	10	Este trabalho	
			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**	0,054* e 55**
298,8	174	15				Masui et al. (2009)	
<i>Callinectes ornatus</i>	116,3	55			Água salgada	Garçon et al. (2007)	
	76,2	46			33	Garçon et al. (2009)	
	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)	
			<i>Potamon potamios</i>	7.300,0	1,400	Água doce	Tentes & Stratakis (1991)
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	Habitat/ Táxon	Espécie	V (U mg <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> ou K <sub>0,5</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	Habitat ou aclimação (%S)	Referência
Anomura	Diogenidae	Ermitão (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 (2019)
				137,3	83	Água doce	Fabri (2019)
				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)			

Continuação



<b>Infraordem/ Subordem</b>	<b>Família</b>	<b>Habitat/ Táxon</b>	<b>Espécie</b>	<b>V (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>M</sub> ou K<sub>0,5</sub> (μmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Habitat ou aclimatação (%S)</b>	<b>Referência</b>
Caridea	Palaemonidae	Camarão (AS)	<i>Palaemon northropi</i>	11	-	Água salgada	Faleiros et al. (2017)
				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.

## **6. CONCLUSÃO**

Neste trabalho foi reportado pela primeira vez a caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase das brânquias posteriores do caranguejo *Goniopsis cruentata*. Primeiramente foi observado a presença da subunidade  $\alpha$  da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase através do Western Blotting nas frações microsomais. Dois picos de atividade insensível a ouabaína foram observados, indicando a possível presença de duas frações de membrana com diferentes densidades. Através da técnica de imunolocalização, foi constatado que a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase encontra-se primordialmente na região apical das brânquias posteriores.

Duas famílias de afinidades distintas pelo ATP foram observadas quando a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi estimulada por concentrações crescentes de ATP (ou Mg.ATP). Diferentemente do que foi observado em outras espécies de crustáceos já reportadas na literatura, uma atividade basal de aproximadamente 140 nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína apresentada nestas condições sugere que o Mg<sup>2+</sup> é um modulador alostérico da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Em condições estequiométricas de Mg<sup>2+</sup> e ATP apenas a família de baixa afinidade pelo ATP é observada devido à ausência de Mg<sup>2+</sup> livre suficiente para que a (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase vá da conformação E<sub>1</sub> para E<sub>2</sub>. A atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase também foi estimulada por Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A ouabaína inibiu a atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase em apenas uma curva de saturação, sugerindo a presença de apenas uma isoforma da subunidade  $\alpha$  na fração microsomal estudada. Além da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, outras proteínas capazes de hidrolisar o ATP foram identificadas na fração microsomal, tais como fosfatase neutras e alcalinas, Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>-ATPase e P-fosfatases.

Neste trabalho também foi reportado pela primeira vez a aclimação de *G. cruentata* em diferentes salinidades (10, 20, 30 e 40 ‰). Em relação a osmolalidade da hemolinfa, foi observado que não houve uma variação significativa, indicando que este animal hiperregula em condições mais amenas de salinidade e hiporregula em salinidades mais altas. A atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase foi menor em todas as salinidades estudadas, exceto nos animais aclimatados a 30 ‰. Em todas as salinidades foram observadas as duas famílias de afinidade pelo ATP. Não houve diferença significativa na expressão de RNAm em todas as salinidades, exceto nos animais aclimatados a 10 ‰, onde foi cerca de 4 vezes maior, sugerindo que, apesar da baixa atividade (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase, em condições hiper-osmóticas, o caranguejo transporta Na<sup>+</sup> através do epitélio através de outro mecanismo, e não as custas da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. Foi também identificada nas frações microsomais a possível presença do peptídeo FXYD2, assim como a presença das PKA e PKC endógenas.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ANGER, K. (1995) The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193,119-145.
- ANTUNES, C.D.; LUCENA, M.N.; GARCON, D.P., LEONE, F.A.; McNAMARA, J.C. (2017) Low salinity-induced alterations in epithelial ultrastructure, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunolocalization and enzyme kinetic characteristics in the gills of the thinstripe hermit crab, *Clibanarius vittatus* (Anomura, Diogenidae). *J. Exp. Zoo.* 327(6)A, 327,380-397.
- ALMANSA, E.; SANCHEZ, J.J.; COZZI, S.; RODRIGUEZ, C.; DIAZ, M. (2003) Temperature-activity relationship for the intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment? *J. Comp. Physiol.* 173B, 231-237.
- ARYSTARKHOVA, E.; WETZEL, R.K.; ASINOVSKI, N.K.; SWEADNER, K.J. (1999) The  $\gamma$  subunit modulates Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> affinity of the renal Na,K-ATPase. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 274, 33183 – 33185.
- ASAMI, M.; SCKIHARA, T.; HANAOKA, T.; GOYA, T.; MATSUI, H.; HAYASHI, Y. (1995) Quantification of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump in solubilized tissue by the ouabain binding method coupled with high-performance gel chromatography. *Biochem. Biophys.* 1240, 55-64.
- BARNES, D.B. (1990) In: *Zoologia dos invertebrados*. 4<sup>a</sup> ed. Editora Roca. 1177 páginas.
- BEAUGÉ, L.; BERBERIAN, G. (1983) The effects of several ligands on the potassium-vanadate interaction in the inhibition of the (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase e the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump. *Biochim. Biophys. Acta* 727, 336-350.
- BEAUGE, L.; CAMPOS, M.; PEZZA, M. (1997) Understanding the energy source for Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange after dephosphorylation steps of the Na<sup>+</sup>-ATPase activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Calcium and cellular metabolism: transport and regulation*, 105-116.
- BERBERIAN, G. & BEAUGE, L. (1992) Phosphatase activity and potassium transport in liposomes with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase incorporated. *Biochim. Biophys.* 1103, 85-93.
- BLANCO, G.; MERCER, R. W. (1998) Isozymes of the (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 44, F633-F650.
- 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase  $\alpha$ -subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 23086-23092.
- BOWMAN, T.E. & ABELE, L.G. (1982) Classification of the recent Crustacea. *The biology of Crustacea 1*: 1-25.
- BRUSCA, R.; MOORE, W.; SHUSTER, S.M. (2016) *Invertebrates*. 3<sup>rd</sup> Edition. Sinauer Associates, Inc. 1129 pp.
- BYSTRIANSKY, J.S.; BALLANTYNE, J.S. (2006) Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity correlates with basolateral membrane lipid composition in seawater- but not freshwater-acclimated Artic char (*Salvelinus alpinus*). *Am. J. Physiol.* 292, R1043-R1051.
- CASTILHO, P.D.; MARTINS, I.A., BIANCHINI, A. (2001) Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 2, 215-227.
- CIPRIANO, D.J.; WANG, W.; BOND, S; HINTON, A.; JEFFERIES, K.C.; QI, J.; FORGAC, M. (2008) Structure and regulation of the vacuolar ATPases. 1977, 599-604.
- CHANG, M.C.J.; ROOTS, B.I. (1989) The lipid-composition of mitochondrial outer and inner membranes from the brains of goldfish acclimated at -5 degrees-C and 30 degrees C. *J. Thermal Biol.* 14, 191-194.
- CHAPELLE, S.; ZWINGELSTEIN, G. (1984) Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities. Relationship between Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B, 363-372.
- CHARMANTIER, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invert. Reprod. Devel.* 33: 177–190.

- CHARMANTIER, G.; GIMENEZ, L.; CHARMANTIER-DAURES, M.; ANGER, K. (2002) Ontogeny of osmoregulation, physiological plasticity and larval export strategy in the grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Eco.Ser.* 229,185-194.
- CHENG, X.J., FISONE, G., AIZMAN, O., AIZMAN, R., LEVENSON R., GREENGARD, P., APERIA, A., (1997). PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. *Am. J. Physiol.* 273, C893-C901.
- CHIBALIN, A.V.; PEDEMONTE, C.H.; KATZ, A.I.; FERAILLE, E.; BERGGREN, P.; BERTORELLO, A.M. (1998) Phosphorylation of the Catalytic  $\alpha$ -Subunit Constitutes a Triggering Signal for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Endocytosis. *J. Biol. Chem.* 15, 8814-8819
- CHIBALIN, A.V.; PEDEMONTE, C.H.; KATZ, A.I.; FERAILLE, E.; BERGGREN, P.; BERTORELLO, A.M. (1999) Dopamine-induced Endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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.* 22, 1920-1927.
- CHOW, D.C. & FORTE, J.G. (1995) Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J. Exp. Biol.* 198: 1-17.
- COMPÈRE, P.; WANSON, S.; PÉQUEUX, A.; GILLES, R.; GOFFINET, G. (1989) Ultrastructural- changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus- maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* 21, 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.; MAHMMOUD, Y.A. (2003) Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins “fixit”. *News Physiol. Sci.* 18, 119-124.
- CORNELIUS, F. & MAHMMOUND, Y. A. (2009). Interacition between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase: Effects of pH and Ouabain induced changes in enzyme conformation. *Biochem.* 48, 10056-10065.
- COROTO, F.S.& HOLIDAY, C.W. (1996) Branchial Na, K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* 4, 361-368.
- CORTES, V.F.; VEIGA-LOPES, F.E.; BARRABIN, H.; ALVES-FERREIRA, M.; FONTES, C.F.L. (2006) The gamma subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1901-1913.
- CORTES, V.F., RIBEIRO I.M., BARRABIN H., ALVES-FERREIRA M., FONTES C.F., (2011). Regulatory phosphorylation of FXYD2 by PKC and cross interactions between FXYD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na,K-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 75-82.
- 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. M.; SWEE, L. K.; GEERING, K. (2004) FXYD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with e regulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 30888-30895.
- CURTI, C.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. (1987) Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix-induced alkaline-phosphatase *Cell. Mol. Biol.* 33, 625-35.
- DAFINIS, E. & SABATINI, S. (1994) Biochemistry and pathophysiology of vanadium. *Neprom.* 67, 133-143.
- DAVIE, P.J.F.; GUINOT, D.; Ng, P.K.L. (2015) Systematics and classification of Brachyura. In: CASTRO, P.; DAVIE, P.J.F.; GUINOT, D.; SCHRAM, F.; von VAUPEL KLEIN, C.

- (eds) Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea. Volume 9C-II: Decapoda: Brachyura (Part 2). Leiden: Brill, pp. 1049-1130.
- DeGRAVE, S.; DEAN PENTCHEFF, N.; AHYONG, S.T.; CHAN, T.Y.; CRANDALL, K.A.; DWORSCHAK, P.C.; FELDER, D.L.; FELDMANN, R.M.; FRANSEN, C.H.J.M.; GOULDING, L.Y.D.; LEMAITRE, R.; LOW, M.E.Y.; MARTIN, J.W.; Ng, P.K.L.; SCHWEITZER, C.E.; TAN, S.H.; TSHUDY, D.; WETZER, R. (2009) A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bull. Zool.* 21, 1-109.
- D'ORAZIO, S. E.; HOLLIDAY, C. W. (1985) Gill Na,K-ATPase e osmorregulation in the se fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiol. Zool.* 58, 364-373.
- DORIS, P. A. (1999) Regulation of NaK-ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Proc. Soc Exp. Biol. Med.* 2051, 202-212.
- DOSTANIC-LARSON, I.; LORENZ, J. N.; VAN HUYSSSE, J. W.; NEUMANN, J. C.; MOSELEY, A. E. ; LINGREL, J. B. (2006) Physiological role of the alpha(1)- e alpha(2)- isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol.* 290, R524-R528.
- 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. *Biochemistry* 32, 3902-3906.
- ELSE, P.L.; WU, B.J. (1999) What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms? *J. Comp. Physiol.* 169B, 296-302.
- ERDMANN, E. & SCHONER, W. (1973) Ouabain-receptor interactions in (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase preparations from different tissues and species Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochem. Biophys.* 307, 386-398.
- EVANS, D.H., (2009). *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. CRS Press, New York.
- EMERY, A.M.; BILINGSLEY, P.F.; READY, P.D., DJAMGOZ, M.B.A. (1998) Insect Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Insect Physiol.* 44, 197-209.
- 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. *Meth. Enzym.* 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 227(B), 64-74.
- FABRI, L.M. (2019) Estudo bioquímico comparativo da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase branquial de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1968) habitante de regiões continentais. Dissertação Mestrado. 190p.
- 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.* 212(A), 97–106.
- FALEIROS, R. O.; GOLDMAN, M. H. S.; FURRIEL, R. P. M.; MCNAMARA, J. C. (2010) Differential adjustment in Gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and V-ATPase activities and transporter RNAm expression during osmorregulatory acclimation in the cinnamom shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Biol.* 213, 3894-3905.
- FALEIROS, R.O., GARÇON, D.P, LUCENA, M.N., McNAMARA, J.C. and LEONE, F.A. (2018). Short- and long-term salinity challenge, osmoregulatory ability, and (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase kinetics and  $\alpha$ -subunit RNAm expression in the gills of the thinstripe hermit crab *Clibanarius symmetricus* (Anomura, Diogenidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 225A, 16-25.

- FARIAS, D.L., LUCENA, M.N., GARÇON, D.P., MANTELATTO, F.L., McNAMARA, J.C., LEONE, F.A., (2017). A kinetic characterization of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the semi-terrestrial mangrove crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825 (Decapoda, Brachyura). J. Membr. Biol. 250, 517-534.
- FARIAS, D.L. (2017) Caracterização cinética e molecular da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial do caranguejo *Cardisoma Guanumi* (Latreille, 1825). Tese Doutorado. 228p.
- FEDOSOVA, N. U.; CORNELIUS, F.; KLODOS, I. (1998) E<sub>2</sub>P phospho forms of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. I: Comparison of phosphor intermediates formed from ATP e Pi by their reactivity toward hydroxylamine e vanadate. Biochemistry 37, 13634-13642.
- FERAILLE, E.; MORDASINI, D.; GONIN, S.; DESCHENES, G.; VINCIGUERRA, M.; DOUCET, A.; VEEWALLE, A.; SUMMA, V.; VERREY, F.; MARTIN, P. Y. (2003) Mechanism of control of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. Ann. N.Y. Acad. Sci. 986, 570-578.
- FESCHENKO, M.S. & SWEADNER, K.J. (1994) Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. J. Biol. Chem. 48, 30436-30444.
- 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.
- FIRMINO, K.C.S.; FALEIROS R.O.; MASUI D.C.; McNAMARA J.C; FURRIEL R.P.M. (2009) 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. 160B, 24-31.
- FLIK, G.; VBERBOST, P. M., AT SMA, W.; LUCU, C. (1994) Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP e a Na<sup>+</sup> gradient. J. Exp. Biol. 195, 109-122.
- FONTES, C. F.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H. M.; NØRBY, J. G. (1992). The role of Mg<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in the phosphorylation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na<sup>+</sup>. Biochem. 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.
- FRANÇA, J.L.; PINTO, M.R.; LUCENA, M.N.; GARÇON, D.P.; VALENTI, W.C.; McNAMARA, J.C. (2013) Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J. Membr. Biol 246, 529-543.
- FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; McNAMARA, J. C. (2008) A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills e excretory organs. Comp. Biochem. Physiol. 151A, 272–304.
- FREIRE, C.A.; ANIELI, C.M.; 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity but stable muscle HSP70 expression Comp. Biochem. Physiol. 216B, 60-74.
- FURRIEL, R.P. M.; MASUI, D. C.; McNAMARA, J. C.; LEONE F. A. (2004) Modulation of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. J. Exp. Zool. 301, 63-74.
- FURRIEL, R. P. M.; FIRMINO, K. C. S.; MASUI, D. C.; FALEIROS, R. O.; TORRES, A. H.; McNAMARA, J. C. (2010). Structural e biochemical correlates of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-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., (2001). Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in hyperregulating Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 130A, 665-676.
- FURRIEL, R. P. M.; MCNAMARA, J. C.; LEONE, F.A. (2000) Characterization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B, 303-315.
- GARÇON, D.P.; LUCENA, M.N.; PINTO, M.R.; FONTES, C.F.L.; McNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. (2013) V Synergistic stimulation by potassium and ammonium of K<sup>+</sup>-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., LUCENA, M.N., GONÇALVES, R.R., PINTO, M.R., McNAMARA, J.C. and LEONE, F.A. (2012) K<sup>+</sup>-phosphatase activity of the gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the intertidal hermit crab, *Clibanarius vittatus*: kinetic characterization of the substrate and cation-binding sites. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 16, 71-83.
- GARÇON, D. P.; LUCENA, M. N.; FRANÇA, J. L.; McNAMARA, J. C.; FONTES, C. F. L.; Leone, F. A. (2011) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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.; 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.* 154A, 44-55.
- GARÇON, D. P.; MASUI, D. C.; MANTELATTO, F. L. M.; MCNAMARA, J. C.; FURRIEL, R. P. M.; LEONE, F. A. (2007) K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> modulate gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: Fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 145-155.
- GATTO, C.; MCLOUD, S. M.; KAPLAN, J. H. (2001) Heterologous expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in insect cells: intracellular distribution of pump subunits. *Am. J. Physiol.* 281, C982-C992.
- GATTO, C.; ARNETT, K.L.; MILANICK, M.A. (2007) Divalent Cation Interactions with Na,K-ATPase Cytoplasmic Cation Sites: Implications for the para-Nitrophenyl Phosphatase Reaction Mechanism. *J. Membrane. Biol.* 216, 49-59.
- GEERING, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomemb.* 33, 425-438.
- GEERING, K. (2006) FXYD 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> –ATPase activity e gill ultrastructure in the hyper– hypo-regulating crab *Neohelice granulatus* acclimated to dilute, normal e concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144, 111-118.
- GLYNN, I. M.(1985) The (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-transporting adenosine triphosphatase. In: A.N. Martonosi (Ed), *The enzymes of biological membranes*. Plenum Press, N. Y. Volume 3, 35-114 p.
- GONÇALVES, R. R.; MASUI, D. C.; MCNAMARA, J. C.; MANTELLATO, F. L. M.; GARÇON, D. P.; FURRIEL, R. P. M. ; LEONE, F. A. (2006) A kinetic study of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, e 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.

- GREEN, S.; ANSTISS, C. L.; FISHMAN, W. H. (1971) Automated differential isoenzyme analysis: Fractionation of serum alkaline phosphatases into liver, intestinal and other components. *Enzymologia* 41, 9-26.
- GRUBMEYER C. & PENEFSKY H.S., (1981). The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 256, 3718–3727.
- HANSEN, O. (2003) No evidence for a role in signal-transduction of Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. *Eur. J. Biochem.* 270, 1916-1919.
- HARRIS R.; BAYLISS D. (1988) Gill (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPases in decapod crustaceans, distribution and characteristics in relation to Na<sup>+</sup> regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 303-308.
- HARRIS, R.R.; SANTOS, M.C.F. (1993). Sodium uptake and transport (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)ATPase changes following Na<sup>+</sup> depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 35–42.
- HARRIS, W.E. (1985) Modulation of (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase activity by the lipidic bilayer examined with dansylated phosphatidylserine. *Biochem.* 24, 2873-2883.
- HASLER, U; WANG, X.; CRAMBERT, G.; BEGUIN, P; JASSIER, F.; HORISBERGER, J.; GEERING, K. (1998). Role of  $\beta$ -Subunit Domains in the Assembly, Stable Expression, Intracellular Routing, and Functional Properties of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 30826 – 30835.
- HENRY, R.P.; GARRELTS, E.E.; McCARTY, M.M.; TOWLE, D.W. (2002). Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J. Exp. Zool.* 292, 595-603.
- 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, 1-33.
- HENRY, R. P.; WHEATLY, M. G. (1992) Interaction of respiration ion regulation, e acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Amer. Zool.* 32, 407-416.
- 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.
- 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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in freshwater crayfish, *Procambarus clarki* (Girard). *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 135-138.
- ITUARTE, R. B.; MAÑANES, A. A. L.; SPIVAK, E. D.; ANGER, K. (2008) Activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in a freshwater shrimp, *Palaemonetes argentinus* (Caridea, Palaemonidae): ontogenetic and salinity-induced changes. *Aquat. Biol.* 3, 283-290.
- JOHANSSON, A.; SMITH, G.A.; METCALFE, J.C. (1981) The effect of bilayer thickness on the activity of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 641, 416– 421.
- JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH S. J. D. (2003) Structure and mechanism of functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65, 817-849.
- 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.
- KANAI, R.; OGAWA, H.; VILSEN, B.; CORNELIUS, F.; TOYOSHIMA, C. (2013) Crystal structure of a Na<sup>+</sup>-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase preceding the E1 state. *Nature* 502: 201-207.
- KAPLAN, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Review Biochem.* 71, 511-35.
- KARLISH, S. J. (2003) Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe<sup>2+</sup>-catalyzed oxidative cleavage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986, 39–49.
- KIMELBERG, H.K.; PAPAHADJOPOULOS, D. (1974) Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na<sub>2</sub>K)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249, 1071–1080.

- KIRSCHNER, L. B. (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207, 1439-1452.
- KOENDERINK, J. B.; HERMSEN, H. P. H.; SWARTS, H. G. P.; WILLEMS, P. H. G. M.; DE PONT, J. J. H. H. M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11209-11214.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- LAPUCKI, T.; NORMANT, M. (2008) Physiological responses to salinity changes of the isopode *Idotea chelipes* from the Baltic brackish waters. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A, 299-305.
- LEONE, F. A. ; FURRIEL, R. P. M. ; MCNAMARA, J. C. ; MANTELATTO, F. L. M. ; MASUI, D. C. ; REZENDE, L. A. ; GONÇALVES, R. R. ; GARÇON, D. P. (2005a) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-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.; MASUI, D. C.; BEZERRA, T. M. S.; GARÇON, D. P.; VALENTI, V. C.; AUGUSTO, A. S.; MCNAMARA, J. C. (2012) Kinect analysis of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-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.
- 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity and  $\alpha$ -subunit RNAm 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.; REZENDE, L.A.; GARÇON, D.P.; PINTO, M.R.; MANTELATTO, F.L.; McNAMARA, J.C. (2015a). Kinetic characterization and immunolocalization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity from gills of the marine seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). *J. Membr. Biol.* 248, 257–272.
- LEONE, F.A.; LUCENA, M.N., GARÇON, D.P.; BEZERRA, T.M.S.; PINTO, M.R.; McNAMARA, J.C. (2013) Gill Ion Transport ATPases and Ammonia Excretion in Aquatic Crustaceans *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 17, 13-28.
- 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<sup>+</sup> plus NH<sub>4</sub><sup>+</sup> of microsomal (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the diadromous river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae) *PLOS ONE* 9(2), e 89626.
- LEVENSON, R. (1994) Isoforms of the Na,K-ATPase – Family members in search of function. *Review Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123, 1-45.
- LIMA, A.G.; McNAMARA, J.C.; TERRA, W.R. (1997) Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *J.Mar. Biol. Eco.* 215(1), 81-91.
- LINGREL, J.; MOSELEY, A.; DOSTANIC, I.; COUGNON, M.; HE, S.W.; JAMES, P.; WOO, A.; O'CONNOR, K.; NEUMANN, J. (2003) Functional Roles of the  $\alpha$  Isoforms of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 354-359.
- LINGREL, J.; ARGUELLO, J.M.; HUYSSE, J.V.; KUNTZWEILER, T.A. (1997) Cation and Cardiac Glycoside Binding Sites of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834: 354-359
- LINGREL, J.; ARGÜELLO, J.M.; HUYSSE, J.V.; KUNTZWEILER, T.A. (2006). Cation and Cardiac Glycoside Binding Sites of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986, 194-206.
- LIVAK, K.J. & SCHEMITTGEN, T.D (2001) Analalysis of relative gene Expressiondata using real-time quantitative PCR and the 2 Method. *Methods.* 25, 402-408.

- LOPEZ, L. B.; QUINTAS, L. E. M.; NOEL, F. (2002) Influence of development on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression: isoform- e tissue-dependency. *Comp. Biochem. Physiol.* 131A, 323-333.
- LUCAS, T.F.G.; AMARAL, L.S.; PORTO, C.S.; QUINTAS, L.E.M. (2012). NaC/KC-ATPase a1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells *Reproduction* 144, 737–745.
- LUCENA, M.N.; PINTO, M.R.; GARÇON, D.P.; McNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. (2015) A kinetic characterization of the gill V(H<sup>+</sup>)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a Diadromous palaemonid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 181B, 15-25.
- LUCENA M.N.; FABRI, L.M.; MORAES, C.M.;GARÇON D.P.; FONTES C.F.L.; McNAMARA J.C.; LEONE F.A. (2019b) Osmotic and ionic regulation and the effect of salinity on modulation by ATP, FXD2 peptide and protein kinases of gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Submetido*.
- LUCENA, M.N.; McNAMARA, J.C.; LEONE F.A. (2017a) Gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous biogenic amines on enzyme activity in juveniles and adults. *Hydrobiologia* 789: 56-76.
- LUCENA M.N.; GARÇON D.P.; FONTES C.F.L.; McNAMARA J.C.; LEONE F.A. (2017b) Dopamine binding directly up-regulates (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell. Molec. Biochem.* 233, 39-47.
- LUCENA, M. N. (2011) Influência da salinidade e das poliaminas exógenas nas características cinéticas da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase branquial do ermitão *Clibanarius vittatus* Dissertação de Mestrado. 144p.
- 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda, Anomura) acclimated to high salinity . *Comp. Biochem. Physiol.* 161, 380–391.
- LUCU, C.; DEVESCOVI, M.; SKARAMUCA, B.; KOZUL, V. (2000) Gill NaK-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* e other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 163-178.
- LUCU, C.; TOWLE, D.W. (2003) (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem.* 4Physiol. 135A, 195-214.
- LUQUET, C. M.; GENOVESE, G.; ROSA, G. A.; PELLERANO, G. N. (2002) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathys granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted e concentrated seawater. *Mar. Biol.* 141, 753-760.
- LUQUET, C. M.; WEIHRAUCH, D.; SENEK, M.; TOWLE. D.W. (2005) Induction of branchial ion transporter RNAm 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.
- MacGREGOR, S.E. & WALKER, J.M. (1993) Inhibitors of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 1-9.
- MAIA, J.C.C.; GOMES, S.L.; JULIANI, M.H. (1983) In: Morel, C.M. (Ed.), Genes and Antigens of Parasites-A Laboratory manual proceedings. FIOCRUZ, Brasil, RJ, pp. 144–157.
- MARKS, M.J.; SEEDS, N.W. (1978) A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci.* 23, 2735-2744.

- MARTELO, M.J. & ZANDERS, I.P. (1986) Modifications of gill ultrastructure and ionic composition in the crab *Goniopsis cruentata* acclimated to various salinities. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A, 383-389.
- MARTELO, M.J. & ZANDERS, I.P. (1984) The influence of acclimation temperature on magnesium and sulphate regulation in two mangrove crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 3A, 487-492.
- MARTIN, D. W. (2005) Structure-Function. Relationships in the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -Pump. *Seminars Nephrol.* 198, 282-291.
- MARTINEZ, C.B. R. (1989). Regulação osmótica no caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) em presença de benzeno. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- MARSHALL, W. S. (2002)  $\text{Na}^{(+)}$ ,  $\text{Cl}^{(-)}$ ,  $\text{Ca}^{(2+)}$  e  $\text{Zn}^{(2+)}$  transport by fish gills: retrospective review e prospective synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264-83.
- 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 ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 132, 471-482.
- MASUI, D.C., FURRIEL, R.P.M.; MANTELATTO, F.L.M, MCNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. (2003) Gill ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of  $\text{K}^+$ -phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comp. Biochem. Physiol.* (B), 4, 631-640.
- MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P. M.; SILVA, E. C.; MANTELATTO, F. L. M.; MCNAMARA, J. C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H. M.; FONTES, C. F.; LEONE, F. A. (2005a) Gill microsomal ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-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) ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-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.M.; FONTES, C.F.L.; FURRIEL, R.P.M.; LEONE, F.A. (2008) The crustacean gill ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase: Allosteric modulation of high- and low-affinity ATP-binding sites by sodium and potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 479, 139–144.
- MATSUDA, T.; IWATA, H. (1986) Difference in phospholipid dependence between 2 isozymes of brain ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase. *Biochim Biophys. Acta* 860, 620-625.
- MELO, G.A.S (1996) Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade Ed, São Paulo 1-603.
- 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.
- 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 ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ )-ATPase  $\alpha$ -subunit expression e  $\text{K}^+$ -phosphatase activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 146A, 534-543.
- 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.
- NECHAY, B.R. (1984) Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 501-524.
- NESHER, M.; SHPOLANSKY, U.; ROSEN, H.; LICHTSTEIN, D. (2007) The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. *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.
- OGAWA, H.; SHINODA, T.; CORNELIUS, F.; TOYOSHIMA, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 13742–13747.
- ONKEN, H., RIESTENPATT, S., (1998). NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 883–893.
- OKEN, 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.
- PAGLIARANI, A.; VENTRELLA, V.; BALLESTRAZZI, R.; TROMBETTI, F.; PIRINI, M.; TRIGARI, G., (1991) Salinity-dependence of the properties of gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 100B, 229-236
- PALMGREN, M.G.; NISSEN, P. (2011) P-Type ATPases. Annu. Review Biophys. 40, 243–66.
- PEDERSEN, P. L.; AMZEL, L.M. (1993). ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one Nature's most unique machines. J. Biol. Chem. 268, 9937-9940.
- PEDERSEN, P.L. (2007) Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen J. Bioenerg. Biomembrane. 39: 349–355.
- PÉQUEUX, A. (1995) Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. 15, 1-60.
- PETERSON, G.; EWING, R.; CONTE, F. (1978) Membrane differentiation and de novo synthesis of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase during development of *Artemia salina* nauplii. Devl. Biol. 67: 90-98.
- PINTO M.R.; LUCENA M.N.; FALEIROS R.O.; AIMEIDA E.A.; McNAMARA J.C.; LEONE F.A. (2016) Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae) Aquatic Toxicol. 170, 13-23.
- PIRKMAJER, S. & CHIBALIN, A.V. (2019) Hormonal regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase from the evolutionary perspective. Curr. Top. Memb. 83, 315-351.
- POULSEN, H.; KHANDELIA, H.; MORTH, P.; BUBLITZ, M.; MOURITSEN, O. G.; EGEBJERG, J.; NISSEN, P. (2010) Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Nature 467, 99-102.
- PRESSLEY TA (1992) Ionic regulation of Na-ATPase, K<sup>+</sup>-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.
- PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. Comp. Biochem. Physiol. 99A, 279-283.
- PROVERBIO, T.; ANDERS, I. P.; MALTIN, R.; RODRIGUES, J. M.; PROVERBIO F. (1990) Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activities in shrimp (*Macrobrachium amazonicum*) gill homogenates. Comp. Biochem. Physiol. 97B, 383-390.
- QIU, L. Y.; KRIEGER, E.; SCHAFTENAAR, G.; SWARTS, H. G. P.; WILLEMS, P. H. G. M.; DE PONT, J. J. H. H. M. ; KOENDERINK, J. B. (2005) Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids. J. Biol. Chem. 280, 32349-32355.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. (2000) Animal Physiology – Mechanisms and adaptations. 4<sup>a</sup> edição. W. H. Freeman and Company, New York. 727 pp.

- 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase at 11-angstrom resolution: Comparison with Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> states. *Biophys. J.* 80, 2187-2197.
- ROBINSON, J. D.; PRATAP, P. R. (1991) Na,K-ATPase : modes of inhibition Mg<sup>2+</sup>. *Biochim. Biophys. Acta.* 1061, 267-78.
- SÁEZ, A. G.; LOZANO, E.; ZALDÍVAR-RIVERÓN, A. (2009) Evolutionary history of Na,K-ATPases e their osmoregulatory role. *Genetica* 136, 479-490.
- SAGARA, Y.; INESI, G. (1991) Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* 266, 13503-13506.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467
- 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and  $\alpha$ -subunit expression. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A, 178–188.
- 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). *Bul. Mar. Sci.* 6, 743-752.
- SEOK, J.H.; KIM, J.B.; HONG, J.H.; SUNG, J.Y.; HUR, G.M.; LIM, K.; LEE, J.H. (1998) Regulation of Na,K-ATPase activity in renal basolateral membrane of 1-clip-1-kidney hypertensive rat. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 667-672.
- SHINODA, T.; OGAWA, H.; CORNELIUS, F.; TOYOSHIMA, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4Å resolution. *Nature* 459, 446-450.
- 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 FXYD2 protein and regulation of crab microsomal Na, K-ATPase activity by mammalian FXYD2 peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2588–2597.
- SIEBERS, D.; WINKLER, A.; LEWECK, K.; MADIAN, A. (1983) Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Biol. Ans. Helg.* 36, 303-312.
- SKOW, J.C. (1988) Overview: The Na,K-pump. *Meth. Enzym.* 156, 1-25.
- SPECHT, S. C.; RODRIGUEZ, C.; QUIÑONES, L.; VELAZQUEZ, S. (1997) Effect of high ionic strength e inhibitors of HK-ATPase on the ouabain-sensitive K-p-Nitrophenyl phosphatase activity in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 217-224.
- STERN, N.; BECK, F.W.J.; CHANDLER, D.W.; MAYES, D.M. (1984) The Role of Corticosteroids in the Regulation of Myocardial Na, K-ATPase in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Clin. Sci.* 4, 421-426.
- SWEADNER, K. J. (1989) Isozymes of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 185-220.
- SWEENEY, G.; KLIP, A. (1998) Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by insulin: Why e how? *Mol. Cell. Biochem.* 182, 121-133.
- TAKEYASU, K.; TAMKUM, M.M.; RENAUD, K.J.; FAMBROUGH, D. M. (1988) Ouabain-sensitive (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection with DNA encoding the alpha-subunit of an avian sodium pump.

- TAYLOR, H.H.; TAYLOR, E.W. (1992) Microscopic anatomy of invertebrates. Decapod Crustacea, F.W. Harrison and A.G. Humas (Eds.), Wiley-Liss, New York, 10, 203-293.
- TENTES, I.; STRATAKIS, E. (1991) Partial purification e properties of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from *Potamon – potamios*. Comp. Biochem. Physiol. 100C, 619-624.
- THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. Am. J. Physiol. 279, C541-C566.
- THERIEN, A. G. & DEBER, C.M. (2002). Oligomerization of a Peptide Derived from the Transmembrane Region of the Sodium Pump  $\gamma$  Subunit: Effect of the Pathological Mutation G41R. J. Mol. Biol. 322, 583-590.
- 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, 7104-7112.
- TOWLE, D.W.; PALMER, G.E.; HARRIS III, J.L. (1976) Role of gill Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> -dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. Comp. Physiol. Biochem. 196, 224-235.
- TOWLE, D. W.; PAULSEN, R. S.; WEIHRAUCH, D.; KORDYLEWSKI, M.; SALVADOR, C.; LIGNOT, J.H.; SPANINGS-PIERROT, C. (2001) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing e salinity related expression of  $\alpha$ -subunit RNAm e protein. J. Exp. Biol. 204, 4005-4012.
- TOWLE, D. W.; WEIHRAUCH, D. (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. Am. Zoologist 41, 770-780.
- TOWLE, D.W. (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. Amer. Zool. 37, 575-584.
- TOWLE, D.W.; RUSHTON, M.E., HEIDYSCH, D.; MAGNANI, J.J; ROSE, M.J; AMSTUTZ, A.; JORDAN, M.K.; SHEARER, D.W.; WU, W. (1997) Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. J. Exp. Biol. 200, 1003-1014.
- TOWLE, D.W.; COPENHAVER, JR. J.H. (1970) Partial purification of a soluble Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dependent ATPase from rabbit kidney. Biochim Biophys Acta 203, 124-130.
- TOYOSHIMA, C.; NAKASAKO, M.; NOMURA, H.; OGAWA, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6Å resolution. Nature 405, 647–655.
- TSAI, J. R.; LIN, H. C. 2007. V-type H1-ATPase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. J. Exp. Biol. 210, 620–627.
- VEMURI, R.; PHILIPSON, K.D. (1989) Influence of sterols and phospholipids on sarcolemmal and sarcoplasmic reticular cation transporters. J. Biol. Chem. 264, 8680–8685.
- VILSEN, B. (1995) Mutant Glu781--Ala of the rat kidney Na<sup>+</sup>K<sup>(+)</sup>-ATPase displays low cation affinity e catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. Biochem. 34, 1455-63.
- WANSON, S.; PÉQUEUX, A.; ROER, R. (1984) Na<sup>+</sup> regulation e (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte) Comp. Biochem. Physiol. 79A, 673-678.
- 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.; MORRIS, S.; TOWLE, D. W. (2004) Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. J. Exp. Biol. 207, 4491-4504.



- WEIHRAUCH, D.; ZIEGLER, A.; SIEBERS, D.; TOWLE, D.W. (2001) Molecular characterization of V-type H<sup>+</sup>-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role. *J. Exp. Biol.* 204, 25-37.
- WEINER, D. & HAMM, L.L. (2007) Molecular mechanisms of renal ammonia transport. *Ann. Rev. Physiol.* 69, 317-340.
- 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* e the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 377-388.
- WINKLER, A. (1986) The role of the transbranchial potential difference in hyperosmotic regulation of the shore crab *Carcinus maenas*. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 40, 161-175 .
- WYNN, A.; SHAFER, T.H.; COBLENTZ, F.E. (2004) Sequência de gene PRL10 de *Callinectes sapidus* depositados no banco de dados Genbank sob accession number (AAV71145).[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list\\_uids=56112341&dopt=GenPept](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list_uids=56112341&dopt=GenPept).
- YODA, A. & YODA, S. (1972) Interaction between Ouabain and the Phosphorylated Intermediate of Na, K-ATPase. *Molec. Pharm.* 22, 700-705.
- ZANDERS, I.P. (1978). Ionic regulation in the mangrove crab *Goniopsis cruentata* *Comp. Biochem. Physiol.* 60A: 293-302.

## Curriculum Vitae

**Nome:** Cintya Mendes Moraes

**Data de nascimento:** 14/11/1992

**Endereço:** Rua Tibiriçá, 478 – ap. 82/Ribeirão Preto/São Paulo

**Telefone para contato:** (16) 981293160/ (16) 33153878

**Email:** cintyamoraes@usp.br

### INFORMAÇÕES GERAIS

Licenciada em Química pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Integrante do Programa de Educação Tutorial (PET) do Departamento de Química de abril/2010 a abril/2014, representante discente da Comissão Organizadora de Curso (COC) do curso de Licenciatura em Química (2012/2013) e representante discente pela COC e PET na Comissão de Recepção aos Calouros 2013. Graduação sanduíche realizada na University of Liverpool no período de abril/2014 - outubro/2015 pelo Ciência Sem Fronteiras (CSF). Projeto de mestrado sob orientação do Professor Doutor Francisco de Assis Leone: "Caracterização cinética e Bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae)"

### FORMAÇÃO PROFISSIONAL

#### **2017 - Atual**

Mestrado em Química.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

**Título:** Caracterização cinética e bioquímica da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do tecido branquial e análise da sequência de mRNA do caranguejo *Goniopsis cruentata*

**Orientador:** Professor Doutor Francisco de Assis Leone.

**Grande área:** Ciências Exatas e da Terra

#### **2014 - 2015**

Aperfeiçoamento em BSc Chemistry F100.

University of Liverpool, LIVERPOOL, Inglaterra.

**Título:** Identifying molecular junction formation from surface-enhanced Raman spectroscopy. Ano de finalização: 2015.

**Orientador:** Heike Arnolds.

**Bolsista do(a):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

#### **2010 - 2016**

Graduação em Licenciatura em Química.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

MORAES, C.M.; FABRI, L.M.; LUCENA, M.N.; GARCON, D.P.; McNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. (2019) Kinetic characterization of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the mangrove crab *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae). **Submetido**.

FABRI, L.M.; LUCENA, M.N.; GARCON, D.P.; MORAES, C.M.; McNAMARA, J.C.; LEONE, F.A. (2019) Kinetic characterization of the gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 227(B), 64-74.

LUCENA M.N.; FABRI, L.M.; MORAES, C.M.; GARÇON D.P.; FONTES C.F.L.; McNAMARA J.C.; LEONE F.A. (2019b) Osmotic and ionic regulation and the effect of salinity on modulation by ATP, FXYD2 peptide and protein kinases of gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). **Submetido**.

LUCENA M.N.; FABRI, L.M.; MORAES, C.M.; GARÇON D.P.; FONTES C.F.L.; McNAMARA J.C.; LEONE F.A. (2019) Dopamine binding directly up-regulates (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*. **Comp. Biochem. Physiol.** 233(A), 39-47.

## APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E PALESTRA

1. MORAES, C. M.; FABRI, L. M.; LUCENA, M. N.; FALEIROS, R. O.; FONTES, C. F. L.; LEONE, F. A.

**Efeito do peptídeo FXYD2 na atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Brachyura, Grapsidae), 2019.**

2. MORAES, C. M.; LUCENA, M. N.; FABRI, L. M.; GARCON, D. P.; MCNAMARA, J. C.; LEONE, F. A.

**Effect of Mg.ATP complex on gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity of the semi-terrestrial crab *Goniopsis cruentata* (Decapoda, grapsidae), 2018.**

3. MORAES, C. M.; LUCENA, M. N.; MCNAMARA, J. C.; LEONE, F. A.

**Modulation by ATP and ammonium plus potassium ions of gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the red mangrove crab *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), 2016.**

4. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; MACNAMARA, J. C.

**Nitrophenylphosphate as a tool to characterize gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in red mangrove crab *Goniopsis Cruentata*, 2015.**

5. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; MACNAMARA, J. C.

**Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in red mangrove crab *Goniopsis cruentata*, 2014.**

6. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; PINTO, M. R.

**Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo *Genoiopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), 2013.**

7. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; PINTO, M. R.  
**Kinetic Characterization of ((Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase Activity of Microsomal Gill Tissue Crab *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), 2013.**

8. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; PINTO, M. R.  
**Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), 2012**

10. MORAES, C. M.; LEONE, F. A.; LUCENA, M. N.; PINTO, M. R.  
**Caracterização cinética da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), 2012.**

### **PARTICIPACÃO EM PROJETOS**

**Abril (2018) – Outubro (2019) Educadora Bolsista – Programa Formação de Professores**

Neste projeto, a Educadora realizou diversas atividades em prol do estreitamento de laços entre Escola parceiras e a Universidade. Durante as disciplinas Química para o Ensino Médio I e II, foi possível desenvolver diferentes atividades com os alunos, tais como: (a) reuniões de supervisão para melhor compreender as condições do estágio que estavam desenvolvendo, assim como ajuda-los no preparo das aulas e (b) auxílio nas atividades extra-classe, oportunizando momentos de discussão. Já em relação ao planejamento de ambas as disciplinas, foi extremamente importante o envolvimento com a docente responsável, pois foi possível entender como se planeja uma disciplina de cunho educacional. Em detrimento a escola, foi possível realizar entrevistas com os professores e melhor entender como estes compreendem a importância do estagio supervisionado, assim como foi interessante as parcerias originadas neste trabalho. De uma forma geral, o projeto foi extremamente importante no que diz respeito a formação pedagógica do professor, e que será significativamente relevante para minha futura atuação na área.

**Março a dezembro – 2016 (Bolsista PEEG – Programa de Estimulo ao Ensino de Graduação)**

**Agosto a dezembro – 2017 (Voluntaria PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino)**

**Monitoria supervisionada da disciplina: *Fundamentos de Química Geral Experimental***

Neste projeto, a monitora PEEG/estagiária PAE acompanhou os alunos de graduação nas aulas experimentais e teóricas da disciplina. O objetivo principal do projeto era estimular a aprendizagem dos alunos através de atividades semanais diversas. Muitas das atividades propostas em 2016/2017 foram baseadas na experiencia vivenciada em uma disciplina experimental cursada pela monitora/estagiaria no Reino Unido (University of Liverpool). O uso de plataforma virtual STOA permitiu uma avaliação individual para cada aluno de acordo com as atividades postadas semanalmente. Atendimento extra-classe, reuniões quinzenais com as coordenadoras do projeto, participação na correção e discussão dos relatórios quinzenais dos alunos, participação na elaboração das provas praticas, atividades diferenciadas em sala de aula e questionários/discussão em laboratório foram algumas das estratégias utilizadas neste projeto. Durante todo o processo, foi possível obter relação direta com os alunos, o que veio a ser um meio facilitador da aprendizagem.

**Coordenadoras:** Glaucia Maria da Silva  
Daniela Gonçalves de Abreu  
Yassuko Iammamoto

**2017 (Aluna de mestrado voluntária)**

**Monitoria supervisionada da disciplina:** "Enzimologia" para o curso de Bacharelado em Química

O projeto tem como objetivo a participação do aluno da pós-graduação em monitorias ministradas previamente as provas em horário de aula, permitindo assim a maior participação dos alunos. A participação em monitorias contribuiu de forma positiva para a formação acadêmica e profissional da aluna, de forma a compreender melhor as estratégias de ensino/aprendizagem em sala de aula. A presença do coordenador do projeto foi extremamente importante para se levantar discussões referente aos tópicos a serem discutidos com os alunos, tanto em sala de aula quanto nas aulas de monitoria.

**Coordenador:** Professor Doutor Francisco de Assis Leone

### **PREMIACÕES**

**2017**

**Melhor trabalho:** Práticas inovadoras na primeira disciplina experimental de um curso de Licenciatura em Química (Mostra de trabalhos da Licenciatura)

**2016**

**Menção Honrosa:** Modulação da atividade da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase por ATP e pelos íons amônio e potássio no caranguejo de mangue vermelho *Goniopsis cruentata* (Decapoda, Grapsidae), SIICUSP 2016 (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP).

**2013**

**Melhor trabalho:** área das exatas (PET Química RP), Universidade de São Paulo (USP/FZEA) (EPETUSP – Encontro dos PET Química da USP).