UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



Mecanismos de regulação da Na⁺, K⁺-ATPase de brânquias de *C. danae.* – Efeitos de poliaminas, FXYD2, interações entre os sítios de cátions e hormônio juvenil na atividade enzimática

ELIAS CRISTIANO CANDIDO DA SILVA.

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Bioquímica Médica.

Mecanismos de regulação da Na⁺, K⁺-ATPase de brânquias de *C. danae.* – Efeitos de poliaminas, FXYD2, interações entre os sítios de cátions e hormônio juvenil na atividade enzimática

ELIAS CRISTIANO CANDIDO DA SILVA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Carlos Frederico L. Fontes.

Rio de Janeiro Abril, 2008

A presente Tese foi elaborada no Laboratório de Estrutura e Regulação de P-ATPases e no Laboratório de Membrana Transportadoras do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Carlos Frederico Leite Fontes, e contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Mecanismos de regulação da Na⁺, K⁺-ATPase de brânquias de *C. danae.* – Efeitos de poliaminas, FXYD2, interações entre os sítios de cátions e hormônio juvenil na atividade enzimática

Elias Cristiano Candido da Silva

Prof. Carlos Frederico L. Fontes (Orientador).

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Aprovada por:

Prof. Carolina A. de O. Freire – Departamento de Fisiologia, UFPR (Membro titular)

Prof. Antonio Ferreira Pereira – IMPPG/UFRJ(Membro titular)

Prof. Jose Roberto Meyer Fernandes- IBqM/UFRJ (Membro titular)

Prof. Marcelo Alves Ferreira (Suplente externo).

Prof. Paulo César de Carvalho Alves (Revisor).

Prof. Carlos Frederico L. Fontes (Orientador).

Rio de Janeiro Abril, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Elias Cristiano Candido da Mecanismos de regulação da Na⁺, K⁺-ATPase de brânquias de *C. danae.* – Efeitos de poliaminas, FXYD2, interações entre os sítios de cátions e hormônio juvenil na atividade enzimática Orientador: Carlos Frederico L. Fontes Tese (Doutorado) – UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pósgraduação em Química Biológica, 2008. Referências Bibliográficas: f. 119-138 1- Na,K- ATPase, 2. *Callinectes danae*, 3. Subunidade γ, 4. Hormônio Juvenil 5. Amônio. I Fontes,Carlos Frederico L. II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III Título "E aqui chego à última objeção que me impus. Não resguardei os apontamentos obtidos em largos dias e meses de observação (...) Mas que significa isso? Essas coisas verdadeiras podem não ser verossímeis. E se esmoreceram, deixalas no esquecimento: valiam pouco, pelo menos imagino que valiam pouco. Outras, porém, conservaram-se, cresceram, associaram-se, e é inevitável mencioná-las. Afirmarei que sejam absolutamente exatas?"

Memórias do Cárcere _ Graciliano Ramos

O questionamento é o único e interminável caminho. Ciências exatas ou "não" *Pesquisa Básica ou Aplicada* ? ... As novas descobertas estão à espera de superação... dia após dia apontar novas contradições! Este trabalho, portanto, como Tese de Doutorado, não configura apenas o fim de uma etapa com respostas a questionamentos anteriores; mas também, um direcionamento para novas indagações.

Agradecimentos

À Prof. Helena:

Agradeço à professora Helena que esteve presente em minha formação desde os tempos da iniciação científica do curso técnico em química. Incentivou-me para o vestibular de farmácia; orientou-me a partir das indagações da graduação ao mestrado e doutorado. Exigente, determinada, questionadora e amiga.

Ao Prof. Carlos Frederico:

Agradeço ao professor Fred pela amizade, paciência, pontualidade, disposição, otimismo e simplicidade que foi exigida ao longo do desenvolvimento desta Tese, e por tudo isto reforço a idéia clara que antes de mais nada, tenho além de um grande orientador, um grande amigo.

À Equipe da USP:

Agradeço pela enzima que nos foi cedida e as discussões que geraram grandes frutos.

Aos companheiros de laboratório (Vanessa I, Vanessa II, Leandro, Otacílio, Jorge, Juliana, Thiago, Milene, Rosângela, Mônica, Júlio, Marcelo, Antônio, Bernardo, Patrícia, Adriana, Cristiane, Miriam, Isabela, Ana Paula, Miriam, Mateus e Dudu):

Pelos seminários, journal, festinhas de aniversários e horas divertidas entre os experimentos, e pela ajuda que cada um , ao seu modo, deu para a realização deste trabalho.

Ao Pablo e a Denise:

A ele pela ajuda durante a madrugada na enorme tentativa de pescar algum siri na baia de Ubatuba, e a ela pela diversão e pelos camarões fritos durante esta mesma noite.

A minha mãe, meu pai e minha irmã: Ao constante apoio, animação, força... enfim por tudo e algo mais!

A Letícia,

Minha esposa, uma mulher especial, que ao longo destes anos tem acompanhado esta minha caminhada, dando-me força e animo. Incentivando-me em todos os momentos, com alegria, carinho e amor, mostrando-me a alegria de se viver fazendo o que se gosta. Enfim, a minha grande fonte de inspiração e esperança.

Ao Diogo

Meu filho, um pequeno pedacinho de gente, que tem me feito uma pessoa melhor, com a sua alegria e brincadeiras durante as horas maravilhosas que passamos juntos.

Ao Prof. Paulo César

Pela atenção, sugestões, acompanhamento e criticas que contribuíram para a elaboração desta Tese

A Deus... O princípio, o meio e o fim.

ABREVIAÇÕES

- AMPc Monofosfato cíclico de Adenosina.
- ANF fator atrial natriurético
- ATP-Trifosfato de Adenosina.
- BTP Bis-tris-propano
- cDNA cadeia de ácido dexoribonucléico complementar.
- CHIF Fator indutor de canal.
- Da Dalton
- EGFR Receptor do fator de crescimento epidermal
- K_{0.5 -} Constante de dissociação aparente
- Ki Constante de inibição
- Km Constante de Michaelis-Menten
- MAPK Proteina quinase ativada por mitógenos
- MEK proteína cinase da cascata de transdução de sinal da MAPK
- NADPH Nicotinamida adenina difosfato
- PKA Proteína quinase dependente de AMPc
- PKC Proteína quinase dependente de cálcio
- PKG Proteínas quinase dependente de GMPc
- PLA2 Fosfolipase A2
- Raf-proto-oncogen
- Ras-proto-oncogen
- RE Retículo endoplasmático.
- RNAm Cadeia de ácido ribonucléico mensageiro.
- $SERCA Ca^{2+}$ -ATPase de retículo sarco-endoplasmático.
- SKATc α actina de músculo esquelético.

<u>Resumo.</u>

Nossos resultados confirmam a presença de um sítio de alta afinidade para a hidrólise do ATP na Na,K-ATPase de Callinectes danae, descrevemos este sítio quando a enzima é fosforilada por ATP em alta concentração de NaCl (100 mM). Foi realizada uma imunoidentificação do FXYD2 da Na,K-ATPase proveniente da preparação das brânquias de Callinectes danae com o anticorpo para o FXYD2 de mamíferos que foi capaz de detectar sua presença nesta preparação. O FXYD2 presente nesta preparação foi fosforilado por PKA e também por cinases ativadas por poliaminas. A adição do FXYD2 exógeno (rim de porco) à Na,K-ATPase de C. danae resultou em uma estimulação de 40% na hidrólise do ATP. Nossos resultados demonstram que este efeito foi devido a um aumento na afinidade ($K_{0,5}$) e na velocidade máxima (V_{max}) da enzima em presença do íon K^+ ; enquanto que nos experimentos com o íon Na⁺ e com ATP ocorreu somente uma estimulação da V_{max}. O FXYD2 previamente fosforilado por PKA estimulou a atividade da enzima em 80-90%, o que não foi observado para o tratamento com o FXYD2 fosforilado por PKC. A atividade da Na,K-ATPase foi ensaiada após a pré-incubação com o hormônio juvenil de inseto em no meio para a ativação da PKC, e observou-se uma inibição da atividade Na,K-ATPásica, sendo que este efeito foi prontamente revertido pelo uso de queleritrina-Cl (um inibidor de PKC). A incubação da Na,K-ATPase com poliaminas e diferentes concentrações de Mg⁺² demonstrou que estas substâncias inibem o efeito estimulatório que o cátion NH⁺₄ exerce na enzima do crustáceo. Em contraste, a incubação da enzima com o FXYD2 exógeno foi capaz de modular positivamente a afinidade da enzima por NH_4^+

<u>Abstract.</u>

Our results confirm the presence of the high affinity site for ATP hydrolysis in the Na,K-ATPase of gills of the euryhaline crab *Callinectes danae*, and show that the catalytic site of crabs enzyme was regulated by sodium concentrations during the enzyme phosphorylation by ATP. The "western-blotting" of Na, K-ATPase from C. danae gills with the γ subunit (FXYD2) antibody detected the presence of this subunit in the functional complex of the enzyme, and it was observed that FXYD2 present in this preparation was phosphorylated by PKA and also by an endogenous kinase activated by polyamines. The addition of exogenous FXYD2 on the crabs Na, K-ATPase cause a stimulation of 40% in the ATP hydrolysis. Our results show that this effect was due to an increase in affinity $(K_{0.5})$ and (V_{max}) of the enzyme in the presence of K⁺ ion, while in experiments with Na⁺ and ATP occurred only a stimulation of the V_{max}. The exogenous FXYD2 phosphorylated by PKA is able to stimulate the activity of the enzyme by 80-90%, however no effect was observed when exogenous FXYD2 phosphorylated by PKC was tested. The effect of the juvenile insect hormone on the Na, K-ATPase activity was measured after the preincubation of the enzyme with juvenile hormone in the reaction medium to PKC activation. We observed an Na, K-ATPase inhibition, and this effect was promptly reversed by the use of chelerythrine-Cl. The incubation of Na, K-ATPase with polyamines and different Mg⁺² concentrations shown that these substances inhibit the stimulation of Na,K-ATPase of C. danae by NH_4^+ ions. Interestingly, the incubation of the enzyme with exogenous FXYD2 was able to increase the affinity of the enzyme by NH⁺₄. Such effects of the FXYD2 and it's presence on the *C.danae* enzyme might means a possible physiological role of this subunit in the control of Na,K-ATPase in euryhaline crustaceans.

Lista de ilustrações

<u>Introdução</u>

Figura	1 – Siri <i>Callinectes</i> danae	.04
Figura	2 – Estrutura geral das brânquias dos crustáceos	.06
Figura	3 – Transportadores das brânquias dos crustáceos	.08
Figura	4 – Modelo estrutural da Na,K-ATPase	.13
Figura	5 – Função da subunidade β na topogênese da subunidade α da Na,K-ATPase	.15
Figura	6 – Ciclo catalítico da Na,K-ATPase	.21
Figura	7 – Interação da Na,K-ATPase com a Ouabaína	.27
Figura	8 – Sinalização promovida pela Na,K-ATPase ligada à ouabaína	.30
Figura	9 – Esquema da regulação da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase por proteínas cinases	.33
Figura	10 – Na,K-ATPase cristalizada em 3,5 angstron	.36
Figura	11 – Distribuição tecido específica da subunidade γ	.38

<u>Resultados</u>

Figura 12 – Dependência do Na ⁺ na fosforilação por ATP da Na,K-ATPase das br	ânquias
de C. danae	63
Figura 13: Medida da Atividade ATPásica em função de ATP em diferentes concer	ntrações
de Na ⁺	64
Figura 14 – Fosforilação da Na,K-ATPase das brânquias de <i>C. danae</i>	66
Figura 15- Western blot da Na,K-ATPase da fração microssomal das brânq	uias de
Calliectes danae	68

Figura 16 - Fosforilação por PKA do FXYD2 presente na preparação da Na,K-ATPase de
Callinectes danae
Figura 17 – Fosforilação da Na,K-ATPase por Na ⁺ na Presença de poliaminas70
Figura 18 – Efeito da subunidade γ exógena na atividade da Na,K-ATPase das brânquias de
<i>C. danae</i>
Figura 19 - Efeitos do Tampão e fosfolipídeos na estimulação da Na,K-ATPase das
brânquias de <i>C. danae</i>
Figura 20 – Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de C. danae
estimulada por Sódio75
Figura 21 – Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de C. danae
estimulada por Potássio
Figura 22 – Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de C. danae
estimulada por ATP77
Figura 23 - Efeito da Subunidade y exógena fosforilada por PKA na Atividade da Na,K-
ATPase de <i>C. danae</i>
Figura 24 - Efeito da Subunidade γ exógena fosforilada por PKC na Atividade da Na,K-
ATPase de <i>C. danae</i>
Figura 25 - Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de C.
<i>danae</i>
Figura 26 - Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de C. danae
incubada no meio de ativação da proteína cinase A
Figura 27 - Figura 26: Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de C.
danae incubada no meio de ativação da proteína cinase C

Figura 28 – Efeito do inibidor para PKC na inibição provocada pelo Hormônio juvenil na							
Na,K-ATPase de <i>C. danae</i>							
Figura 29 – Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de C. danae							
estimulada por Amônio							
Figura 30 – Estimulação da Na,K-ATPase de C. danae por NH_4^+ e							
Mg ⁺² 90							
Figura 31 – Efeito da espermidina na estimulação da Na,K-ATPase das brânquias de C.							
<i>danae</i> por NH_{4}^{+}							

Discussão

Figura	33 -	Fórmula	estrutural	do	metil	farneso	ato	(A) e	hormôr	nio j	uvenil	de	inse	0
(B)													11	1
Figura	34–	Modelo	hipotético	para	a exe	creção d	le a	mônia	através	das	brânqı	iias	de (2.

danae	113

<u>Tabelas</u>

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos da Na,K-ATPase de C. danae	78
Tabela 2: Parâmetros cinéticos da Na,K-ATPase estimulada por íons NH ⁺ ₄	.89
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da estimulação dos íons NH ⁺ ₄ e Mg ⁺² na Na,K-ATPase	das
brânquias de C. danae	.91

<u>1 - Introdução</u>

1.2 - A Na,K–ATPase101.2.1 - A subunidade α 121.2.2 - A subunidade β 141.2.3 - Isoformas da Na,K-ATPase171.2.4 - O ciclo catalítico201.2.5 - Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas261.2.5.1 - Vanadato261.2.5.2 - Ouabaína261.2.5.3 - Endobaínas281.2.6 - A Na,K-ATPase como um receptor291.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases311.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase351.2.9 - A subunidade γ , um membro da família FXYD371.3 - A Na,K-ATPase nos crustáceos47	1.1 - Os crustáceos e os processos de osmoregulação	2
1.2.1 - A subunidade α	1.2 - A Na,K–ATPase	10
$1.2.2 - A$ subunidade β .14 $1.2.3 - Isoformas da Na, K-ATPase$ 17 $1.2.4 - O$ ciclo catalítico.20 $1.2.5 - Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas.261.2.5.1 - Vanadato261.2.5.2 - Ouabaína261.2.5.3 - Endobaínas281.2.6 - A Na, K-ATPase como um receptor.291.2.7 - Regulação da Na, K-ATPase por Cinases311.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na, K-ATPase351.2.9 - A subunidade \gamma, um membro da família FXYD371.3 - A Na, K-ATPase nos crustáceos47$	1.2.1 - A subunidade α	12
$1.2.3$ – Isoformas da Na,K-ATPase.17 $1.2.4$ - O ciclo catalítico.20 $1.2.5$ - Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas.26 $1.2.5.1$ – Vanadato.26 $1.2.5.2$ – Ouabaína.26 $1.2.5.3$ – Endobaínas.28 $1.2.6$ – A Na,K-ATPase como um receptor.29 $1.2.7$ - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases.31 $1.2.8$ - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase.35 $1.2.9$ – A subunidade γ , um membro da família FXYD.37 1.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos.47	1.2.2 - A subunidade β	14
1.2.4 - O ciclo catalítico	1.2.3 – Isoformas da Na,K-ATPase	17
1.2.5 - Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas	1.2.4 - O ciclo catalítico	20
1.2.5.1 – Vanadato	1.2.5 - Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas	
1.2.5.2 – Ouabaína.261.2.5.3 – Endobaínas.281.2.6 – A Na,K-ATPase como um receptor.291.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases.311.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase.351.2.9 – A subunidade γ, um membro da família FXYD.371.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos.47	1.2.5.1 – Vanadato	26
1.2.5.3 – Endobaínas281.2.6 – A Na,K-ATPase como um receptor291.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases311.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase351.2.9 – A subunidade γ, um membro da família FXYD371.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos47	1.2.5.2 – Ouabaína	26
 1.2.6 – A Na,K-ATPase como um receptor	1.2.5.3 – Endobaínas	
 1.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases	1.2.6 – A Na,K-ATPase como um receptor	29
 1.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase	1.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases	
 1.2.9 – A subunidade γ, um membro da família FXYD	1.2.8 - Estruturas Cristalizada da Na,K-ATPase	35
1.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos	1.2.9 – A subunidade γ, um membro da família FXYD	
	1.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos	47

2- Objetivos

2.1 - Objetivos	.5	2
-----------------	----	---

3- Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes	54
3.2 - Dissecção das brânquias	54
3.3 - Preparação da fração microsomal de brânquias	54
3.4 - Síntese do $[\gamma$ - ³² P] ATP	55
3.5 - Atividade Na,K-ATPásica	55
3.6 - Extração do FXYD2	56
3.7 - Método para isolar o FXYD2 fosforilado por cinases	56
3.8 - Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade Na,K-ATPásica	57
3.9 - Fosforilação por Proteína Cinase A	57
3.10 - Pré-incubação da Na,K-ATPase com o Hormônio Juvenil de Inseto	58

3.11	-	Medida	do	nível	de	EP	da	Na,K-ATPase	das	brânquias	de	С.
danae	2		•••••								•••••	.58
3.12 -	· Fo	osforilaçã	o e Is	solame	nto d	la fos	foen	zima (EP) por E	letrof	orese		59
3.13 -	W	estern- B	lot d	a Na,K	-AT	Pase	das ł	orânquias de C. a	lanae			.60
3.14 -	A	nálise dos	dad	os								60

<u>4- Resultados</u>

4.1 - Regulação do sítio de ATP da Na,K-ATPase das brânquias de C. danae por
Na ⁺
4.2 - Identificação da subunidade γ da Na,K-ATPase das brânquias C.
danae
4.3 - Estudos da adição da subunidade γ (FXYD2) exógena a Na,K-ATPase das
brânquias de <i>C. danae</i>
4.4 - Efeito do Hormônio Juvenil de Inseto na Na,K-ATPase das brânquias de C.
<i>danae</i>
4.5 - Regulação do sítio de NH_4^+ da Na,K-ATPase das brânquias de <i>C. danae</i> por
FXYD2, Mg ⁺² e espermidina

<u>5- Dicussão</u>

5.1 – O sítio de ATP da Na,K-ATPase		
5.2 – A fosforilação da Na,K-ATPase por ATP na presença de poliaminas e PKA, e		
a identificação do FXYD2 e seus efeitos na atividade da Na,K-ATPase de C.		
danae96		
5.3 – Adição do FXYD2 da Na,K-ATPase renal à Na,K-ATPase das brânquias de C.		
danae e seus efeitos na atividade da enzima de crustáceos		
$5.4 - A$ regulação do sítio de NH_4^+ por Mg^{+2} e espermidina105		
5.5 - A regulação da Na,K-ATPase das brânquias de C. danae por Hormônio		
Juvenil de Inseto		

5.6 - Conclusões finais	
6- Objetivos futuros	
Objetivos117	
7- Referências bibliográficas	
Referências	
8- Anexos.	
Gill microsomal (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase from the blue crab <i>Callinectes danae</i> : Interactions at the	
cationic sites 140	

cationic sites	140
Regulation by exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from	om the gills of
the euryhaline swimming crab Callinectes danae (Brachyuria, Portunidae)	

1 - Introdução

1.1 – Os crustáceos e os processos de osmoregulação.

Os crustáceos são amplamente distribuídos na natureza. A maioria dos biótopos conhecidos possuem representantes aquáticos, semi-terrestres e terrestres, que se adaptaram às variadas demandas físicas e químicas do ambiente em que vivem, tais como: a salinidade; a temperatura; a pressão hidrostática; o ciclo luz-escuridão e o pH.

Os ambientes que ficam sujeitos a variações de salinidade, tais como estuários e áreas costeiras sujeitas às ações das marés, representam uma barreira ao estabelecimento dos crustáceos, pois estas condições instáveis acarretariam um grande estresse iônico e osmótico. Entretanto ao longo da evolução diversos grupos de crustáceos tornaram-se capazes de viver nestes ambientes e também de ocupar áreas com a salinidade inferior à da água do mar (águas salobras, rios e lagos).

As flutuações de salinidade induzem o organismo aquático a exibir dois tipos de comportamento, que os levam à classificação como crustáceos estenoalinos e eurialinos. Os estenoalinos são representados pelos animais que vivem em água salgada ou em água doce, mas são incapazes de se adaptar a grandes alterações de salinidade. A pressão osmótica e as concentrações de Na⁺ e Cl⁻ na sua hemolinfa são idênticas à da água do meio, e representam um grande problema residual. Não possuindo os mecanismos necessários para a manutenção do fluido corporal em qualquer concentraçõe que não seja a do ambiente, estes animais permanecem em total equilíbrio com a sua vizinhança, sem a possibilidade de poder submeter-se a qualquer mudança. Como resultado, os animais combinam tais limitações e são confinados a um habitat estável e homogêneo. Exemplos significativos destes são os caranguejos aranha *Maja sp*, e o caranguejo *Cancer pagurus*, pois quando eles são abruptamente transferidos da água salgada para um meio mais diluído, estes animais ganham água e perdem íons inorgânicos, e em pouco tempo (algumas horas) eles morrem (Péqueux, 1995).

Os animais eurialinos podem manter um estado hiperosmótico de sua hemolinfa em relação ao meio externo diluído, sendo que este estado ocorre mediante gasto de energia, enquanto que, em um meio mais concentrado, a osmolalidade da hemolinfa segue estritamente a osmolalidade do ambiente externo (Moreira e cols, 1983; Péqueux, 1995; Rathmayer & Sieberes, 2001; Guerin & Stickle, 1997; Lovett e cols, 2001; Henry e cols, 2002 e Genovese e cols, 2000). Os eurialinos são classificados como reguladores fracos ou fortes (Kischner's, 2004). Os reguladores fracos exibem uma limitada capacidade em manter um estado hiperosmótico da sua hemolinfa na água diluída, logo eles não podem permanecer neste ambiente por um longo tempo. Os reguladores fortes têm a capacidade de controlar e regular a composição de sua hemolinfa, a um nível osmótico quase constante e acima da escala encontrada na água doce. Esta característica representa um ganho evolucionário, que permite aos crustáceos colonizarem ambiente de salinidades menores que a água do mar (estuários e águas salobras) e até mesmo ambientes de água doce (rios e lagos). Esta capacidade está condicionada ao desenvolvimento de mecanismos fisiológicos eficientes, que permitem ao animal manter o volume celular e a concentração iônica e osmótica do fluido intra e extracelular em níveis compatíveis com as funções vitais.

O caranguejo *Callinectes danae* Smith 1869 (Figura 1), é um eurialino forte e um osmorregulador fraco, de grande interesse comercial, distribuído desde a Flórida até o sul do Brasil (Melo, 1996; Chacur, 1998; Weber & Levy, 2000; Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001). Ele habita regiões de estuários, mangues, baías, águas costeiras e mar aberto, até aproximadamente a 75 metros de profundidade. Parecido com muitos siris do gênero, *C. danae* move-se em áreas onde ocorre uma grande variação de salinidade, e na fase adulta muitos são encontrados em águas de salinidade moderada (28-35 ppm), porém são influenciados por águas doces no verão (Willians, 1974).



Figura 1: Siri eurialino Callinectes danae. (Braga e cols 2005)

Por causa dos processos migratórios e das condições ambientais a que estão expostos, os caranguejos que estão em um ambiente onde o osmolalidade do meio é menor do que a da sua respectiva hemolinfa, sofrem uma perda passiva de íons e um fluxo (ganho) de água. Para reduzir este movimento passivo de íons e água, caranguejos toleram um moderado decréscimo na osmolalidade de sua hemolinfa (reduzindo o gradiente osmótico). Deste modo, a perda iônica nestes animais é compensada por uma série de transportadores localizados nas brânquias posteriores dos crustáceos eurialinos. Portanto, a osmorregulação é na verdade uma estratégia adotada pelos crustáceos para poderem manter uma concentração osmótica do fluido celular relativamente constante, independente da salinidade do meio externo. Dessa maneira é possível preservar os tecidos internos da exposição a mudanças drásticas e repentinas de salinidade que poderiam inviabilizar os seus processos celulares vitais (Péqueux, 1995; Mo & Greenway, 2001, Castilho e cols, 2001 e Lucu & Towle, 2003).

As brânquias dos crustáceos são órgãos multifuncionais (Figura 2). Em adição a sua função no controle das trocas gasosas (McMahon & Wilkens, 1983), elas são essenciais para homeostase iônica e osmótica (Potts & Parry, 1964; Mantel and Farmer, 1983). Nos crustáceos que migram da água salgada para a água doce, uma absorção transbranquial ativa constitui um elemento do processo hiperosmoregulatório (Mantel and Farmer, 1983; Péqueux e cols, 1989; Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998; Kirschner, 2004;). Embora pouco compreendido, o processo de secreção de NaCl em crustáceos estuarinos e hiporeguladores em meio marinho, parece ser gerado nas brânquias (Freire e cols, 2008). A homeostase de cálcio é outra importante função das brânquias dos crustáceos, e em particular nos crustáceos que se submetem ao ciclo de mudas (Neufeld and Cameron, 1993; Wheatly, 1999; Wheatly e cols, 2002 e Ahearn e cols, 2004). Recentemente a secreção ativa de amônio nas brânquias dos crustáceos foi



Figura 2: Representação esquemática da morfologia e estrutura fina das brânquias dos caranguejos 1- cutícula, 2- célula principal, 3- célula pilar, 4- espaço hemolinfático e 5- septo intralamelar. O desenho está baseado nos estudos microscópicos realizados em *Uca ssp* (Onken & Riestenpastt, 1998; Freire e cols, 2008). Painel inferior: Microscopia das brânquias de *Ucides cordatus* (Martinez e cols, 1999)

identificada e caracterizada (Weilrauch e cols,1998,2001, 2002 e 2004; Garçon e cols, 2007; Santos e cols, 2007).

Apesar de existirem diferentes detalhes na micro-anatomia e na ultra-estrutura das brânquias de caranguejos (Figura 2), que variam de uma espécie para outra, elas podem ser consideradas como um exemplo da organização básica das brânquias dos crustáceos de um modo geral (Péqueux, 1995; Towle, 1997). As brânquias dos caranguejos (Figura 2) são estruturas multilamelares, nas quais cada lamela consiste de um envelope cuticular banhado externamente pela água do meio-ambiente e revestido internamente por uma única camada contínua de células epiteliais que formam um compartimento estreito por onde flui a hemolinfa (Mantel & Farmer, 1983; Barra e cols, 1983). As superfícies apicais das células epiteliais estão voltadas para o meio externo e são amplificadas por microvilos. As membranas basolaterais são banhadas pela hemolinfa, altamente invaginadas e associadas a numerosas mitocôndrias. Estas invaginações de membrana associadas às mitocôndrias são denominadas de bombas mitocondriais de epitélios transportadores de íons (Péqueux, 1995).

Os maiores contribuintes para a osmolalidade da hemolinfa são os íons inorgânicos, essencialmente o Na⁺ e Cl⁻. Assim, a regulação do fluxo destes dois íons, representa um aspecto fundamental para a capacidade osmoregulatória destes animais (Péqueux, 1995; Towle 1997; Castilho e cols, 2001; Henry e cols, 2002; Kirschner, 2004). O processo de captura ativa de íons Na⁺ que é realizado pelas brânquias dos crustáceos hiper reguladores em meios diluídos está sendo amplamente estudado (Péqueux, 1995; Onken & Riestenpatt, 1998; Lucu & Towle, 2003; Weiharauch e cols, 2004; Henry e cols, 2002 e Freire e cols, 2008). O processo envolve a participação coordenada de vários sistemas transportadores (Figura 3), destaca-se um trocador do tipo Na⁺/H⁺, um Na⁺/NH⁺₄, um canal de Na⁺, um co-transportador do tipo Na⁺, K⁺/ 2Cl



Figura 3: Representação esquemática dos transportadores e enzimas envolvidos no transporte de íons nas brânquias dos siris eurialinos. É importante observar que a composição e localização das enzimas e transportadores podem variar entre as diferentes espécies de crustáceos. A figura representa a identificação de vários componentes descritos até o presente momento em diferentes crustáceos . 1 Na,K-ATPase; 2- canais de K⁺; 3- co-transportador Na⁺/K⁺/Cl⁻; 4- trocador Na⁺/K⁺; 5- trocador HCO_3^{-}/Cl^{-} ; 6- H⁺-ATPase; 7- anidrase carbônica; 9- proteína Rhesus, transportador de NH₄⁺.

(Péqueux 1995; Towle, 1997), e segundo alguns autores, haverá ainda a entrada de Na⁺ através de um canal apical acoplado a uma H⁺-ATPase do tipo V (Riestenpatt e cols,

1996; Weirauch e cols, 2002)_cabe ressaltar que a presença de um ou mais transportadores pode ser específico para uma determinada espécie de crustáceo. Estes transportadores estão organizados assimetricamente na membrana da célula do epitélio branquial, voltados para o meio externo ou para a hemolinfa (Péqueux, 1995, Zare & Greenway 1998; Onken & Riestenpatt, 1998; Ahearn e cols, 1999; Towle & Weiraulch, 2001, Grosell e cols, 2002; Lucu & Towle, 2003 e Kirschner, 2004). Já está bem estabelecido que a Na,K-ATPase presente no tecido das brânquias posteriores da maioria dos crustáceos, desempenha um papel central nesse mecanismo de captura iônica, transportando os íons sódio das células do epitélio branquial para a hemolinfa, diminuindo localmente a sua concentração. Neste sentido existe uma estreita relação entre a atividade específica da enzima e a amplitude do transporte ativo transepitelial de Na⁺ (Scheleich e cols, 2001; Mo e Greenaway, 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Lignot e cols, 2005; Tresguerres e cols, 2003, Ahearn e cols, 1999; Furriel e cols, 2000; Lucu & Towle, 2003; Péqueux, 1995).

1.2 A Na,K-ATPase.

A habilidade das células vivas em responder às mudanças no meio ambiente e manter uma relativa constância do seu meio interno representa uma propriedade fundamental para o desenvolvimento celular. Em resposta as perturbações externas, as células ativarão uma série de sistemas de transportes contidos em sua membrana como um esforço para manter a sua homeostase. A ligação da energia metabólica para a função celular e a sinalização entre as necessidades da célula depende de uma distribuição assimétrica de íons através de sua membrana celular. Todas as células contêm muito mais K^+ e muito menos Na^+ do que os seus arredores, e a diferença na concentração destes cátions, que resulta na formação de um potencial de membrana, é finamente regulada. A existência de um transportador de sódio na membrana plasmática de células animais foi postulada primeiramente por Dean em 1941, que introduziu o termo "bomba" para explicar a distribuição assimétrica dos cátions. Porém 20 anos mais tarde, estudos com axônio de lulas gigantes estabeleceram a existência de um transporte ativo de Na⁺ e K⁺ (Caldwell e cols, 1960). A presença de uma enzima que hidrolisava ATP e requisitava a presença de Na⁺ e K⁺ para a sua atividade foi conclusivamente demonstrada por Jens C. Skou em 1957, e esta enzima é conhecida hoje por Na,K-ATPase.

A Na,K-ATPase ou bomba de sódio é responsável pelo estabelecimento e manutenção do potencial de membrana nas células animais. Esta enzima é uma proteína integral de membrana que transporta ativamente íons Na⁺ e K⁺, usando a hidrólise do ATP. Para cada molécula de ATP hidrolisada, 3 íons Na⁺ são transportados para o meio extracelular e 2 íons K⁺ do meio extracelular para o interior da célula (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Lutsenko & Kaplan, 1995; Skou, 1998). Este processo consome

cerca de 5 a 40 % de todo o ATP produzido pela célula em estado de repouso (Kostia & Zivkovic, 1994; Gruwel e cols, 1995) contribuindo em 20-25% para a TMB (taxa metabólica basal) e leva à formação de um potencial elétrico e químico através da membrana, provendo a base para a comunicação neuronal e contribuindo para a regulação osmótica da célula. Este gradiente químico formado pelo gradiente de sódio é utilizado para o transporte secundário de aminoácidos, glicose, vitaminas e outros compostos (Emery e cols, 1998; Sweeney & Klip, 1998; Beaugé e cols, 1997; Lingrel, 1992).

1.2.1 A subunidade α

A bomba de Na⁺ é formada por um complexo que envolve três subunidades, que são designadas como α , $\beta \in \gamma$ (Figura 4) _ sendo que a subunidade γ (na figura é vista como sendo o componente FXYD), até o presente momento, é associada à Na,K-ATPase renal (Scheiner-Bobis, 2002)_. A subunidade α (Figura 4), também referida como subunidade catalítica da bomba, possui um peso molecular aparente que varia de 100 a 113 kDa. Ela está inserida na membrana de modo que a atravessa 10 vezes, formando domínios transmembranares que vão dos segmentos 1 ao 10, nos quais as porções N e C-terminais da bomba estão voltados para o lado citoplasmático.

A maneira exata como o C-terminal da subunidade α encontra-se inserido na membrana ainda está por ser identificada, uma vez que modelos topológicos diferentes foram apresentados: (Capasso e cols, 1992; Mohraz e cols, 1994; Karlish e cols, 1993; Golsdshelger e cols, 1995; Antolovic e cols, 1991). Porém, sabe-se que o domínio Nterminal da enzima é formado pelos segmentos transmembranares 1- 4, com estes segmentos voltados para o interior da célula, formando duas grandes alças citoplasmáticas. A publicação da estrutura em alta resolução (2.6 Angstron) da Serca (Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático_ Toyoshima e cols, 2000), cristalizada na presença de altos níveis de Ca^{2+} , presumivelmente na forma E_1Ca ; propõe o mecanismo de atuação de bombas de íons. Para tal, a estrutura da bomba foi dividida em três domínios:

- a. domínio N (ligação de nucleotídeo),
- b. domínio A (atuador) envolvido na transmissão das mudanças conformacionais, e
- c. domínio P (fosforilação).

Portanto, assumindo o modelo proposto por Toyoshima e cols podemos dividir e especificar os segmentos da porção N-terminal da subunidade α em (Figura 4):

- Domínio A (cor laranja), que compreende a parte citosólica entre os segmentos transmembranares 2 e 3. Neste domínio, a seqüência TEGS responsável pela defosforilação da enzima está inserida. (Toyoshima e cols, 2002, Karlish, 1997; Lingrel & Kuntzweiler, 1994);
- 2) Domínio P (azul) e N (verde) que representam uma subdivisão da grande alça citoplasmática localizada entre os domínios transmembranares 4 e 5, onde encontra-se a porção P contendo o aminoácido aspartato que é fosforilado durante o ciclo catalítico da enzima (Post & Kume, 1973; Inesi & Kirteley, 1992; Stokes e cols, 1994), e a porção N que é responsável pela ligação do nucleotídeo ATP.
- Os segmentos restantes que vão do 5 ao 10 constituem o C-terminal da enzima.



Figura 4: Topologia da Na,K-ATPase. Representação da subunidade α , a subunidade β , com sua porção C- terminal glicosilada (hexágonos brancos) e o FXYD (no texto referido como subunidade γ). O modelo desta figura propõe uma divisão funcional das alças citoplasmáticas. Em laranja temos domínio A, constituído pela parte N- terminal, precedido do primeiro segmento transmembranar entre as alças 2 e 3, contendo o domínio TGES envolvido na defosforilação da enzima. Em azul o domínio de fosforilação localizado entre os segmentos 4 e 5, onde encontramos a seqüência DKTGT, contendo o aspartato 376 (G) que é fosforilado durante o ciclo catalítico. Em verde o dominio de ligação do ATP (Horisberger, 2004).

1.2.2 A subunidade β

A subunidade β (Figura 5), é uma proteína de membrana do tipo II, altamente glicosilada com um peso molecular relativo em torno de 60 kDa (McDonough e cols, 1990). Diferentemente da subunidade α , ela atravessa a membrana plasmática uma única vez, apresentando uma pequena porção N-terminal citosólica, um segmento transmembranar e um longo C-terminal direcionado ao meio extracelular.

Apesar de todas as principais funções da Na,K-ATPase estarem localizadas na subunidade α , podendo então levar à conclusão de que somente esta subunidade é essencial para o funcionamento da bomba, a subunidade β apresenta um papel essencial na formação de um complexo enzimático funcional. As funções mais importantes da subunidade β na enzima incluem o seu papel funcional de uma chaperona na estrutura e na maturação funcional da Na,K-ATPase (Figura 5); de modo que ela é fundamental para a formação de uma perfeita configuração da enzima, necessária para a saída do retículo endoplasmático (Geering, 2001).

Durante a síntese da subunidade α da Na,K-ATPase, os primeiros segmentos hidrofóbicos do N-terminal são integrados do translocon para a bicamada lipídica. A maior volta central citoplasmática adota uma conformação que não expõe qualquer seqüência sinalizadora de degradação. Por outro lado, devido a informações específicas da seqüência, que impedem a interação com superfícies apolares, a eficiente integração do segmento C-terminal da subunidade α na membrana para a bicamada lipídica é muito baixa. Na ausência da co-expressão da subunidade β , o segmento C-terminal da subunidade α está em equilíbrio dinâmico entre a bicamada lipídica, o translocon e o citoplasma, com uma alta preferência para a fase aquosa (Figura 5).

Nesta configuração, a subunidade α está altamente sensível à degradação celular e tripsinólise. A co-expressão da subunidade α juntamente com a β é necessária para



ura 5: Topogênese da subunidade α da Na,K-ATPase. A figura demonstra as interações que devem ocorrer entre a subunidade β e o C- terminal da subunidade α , representado pelos retângulos com os números 5, 6, 7, 8, 9 e 10, da Na,K-ATPase para uma perfeita inserção da na membrana do retículo endoplasmático. Observa-se que na ausência da subunidade β o segmento do C- terminal da subunidade α não é inserido de modo adequado na membrana plasmática (parte A e B_esquerda_) possuindo uma baixa capacidade de abandonar o translocon e se inserir na membrana de modo correto (parte C). Porém em contato com a subunidade β (parte B_direita_), a subunidade α é inserida de modo estruturalmente correto na membrana plasmática (Geering, 2002).

permitir a exposição dos segmentos M7/M8 da volta extra citoplasmática para o lado luminal do retículo endoplasmárico (RE). O processo de união entre α e β reterá o par M7/M8 na membrana, permitindo interações intramoleculares e a integração do segmento C-terminal para a bicamada lipídica, conferindo então à subunidade α resistência à degradação e tripisinólise. Podemos observar que uma inserção inadequada do segmento C-terminal correlaciona-se com a susceptibilidade à degradação celular e, em última parte, ao sistema proteossomal (Kirley, 1989; Béguin e cols, 2000).

Em caminhos opostos aos da subunidade α , a topologia da subunidade β não é dependente desta parceria. Todavia, como sugerido pela sensibilidade à degradação no RE, a inserção estável na membrana e o correto posicionamento da subunidade β pode ou não contar com interações com a subunidade α .

Em adição à função de chaperona na maturação da enzima recém sintetizada, a subunidade β também tem um papel determinante nas propriedades de transporte da Na,K-ATPase. A primeira evidência da função desta subunidade na ligação de cátions foi mostrada na atividade da Na,K-ATPase purificada, considerando que a subunidade β influencia a afinidade aparente por K⁺ nas ATPases do tipo P oligoméricas (Kirley, 1989; Chow e cols, 1992; Lutsenko & Kaplan, 1993; Blanco & Mercer, 1998; Hasler e cols, 1998) e modula o requerimento de Na⁺ pela enzima com conseqüente aumento da sua afinidade aparente. Além disso, estudos demonstraram que a subunidade β também pode estar envolvida na migração neuronal e adesão célula-célula, correlacionando-se com a tumorogênese dos pulmões, figado e rins nos seres humanos (Akopianz e cols, 1991).

1.2.3 – Isoformas da Na,K-ATPase.

Um fenômeno essencial para uma célula é a presença de isoformas enzimáticas, proteínas homólogas que catalisam as mesmas reações bioquímicas, apresentando, porém, diferentes afinidades por substratos ou regulações diversas (Market & Moller, 1959). Até o presente momento existem quatro isoformas identificadas para a subunidade α (α 1, α 2, α 3 e α 4), e três para a subunidade β (β 1, β 2 e β 3) (Blanco & Mercer, 1998). As isoformas da cadeia α são produtos de diferentes genes resultando de "splicing" alternativos com a seqüência completa dos aminoácidos das isoformas, deduzido a partir do DNA de ratos, aves e homens; e apresentam um conteúdo de aminoácidos na ordem de 1014 para a α 3, 1024 para a α 1, 1021 para a α 2 e 1028 para a α 4 (Lingrel e cols, 1990).

As identidades das isoformas da cadeia α estão em torno de 92% quando comparamos α 1 e α 2, e 96% para a α 1 e α 3. Acerca da isoforma α 4 há divergências a respeito do valor da identidade em torno de 78% em relação à cadeia α 1. Isto se deve às grandes diferenças observadas no N-terminal, no sítio de ligação de ouabaína e a região citoplasmática entre os aminoácidos 403 e 503. Por outro lado, grandes similaridades são vistas na região citoplasmática mediana, onde estão localizados os sítios de ligação de ATP e fosforilação (Levenson, 1994; Mercer, 1993; Lingrel & Kuntzweiler, 1994).

Em relação à subunidade β , a seqüência do DNA revelou que esta proteína possui os seguintes números de aminoácidos: 304 para a β 1, 290 para a β 2 e 297 para a β 3. A homologia das diferentes isoformas chega à ordem de 95% quando comparamos β 1 e β 2 em mamíferos, porém este valor decresce até a faixa de 60% quando outras espécies são incluídas. Diferente da cadeia α , a homologia existente entre as isoformas da cadeia β apresenta-se menor. Comparando-se os polipeptídios da isoforma β 1, a similaridade existente com a β 2 é de 58% (34% de identidade e 24% de substituições favorecidas), e para a β 3 o nível chega aos 68% de homologia.

Comparando-se β 3 e β 2, temos 61% de similaridade com 49% de resíduos conservados (Malik e cols, 1989). Todas as isoformas da subunidade β são glicosiladas, sendo que a β 1 apresenta 3 sítios, com os sítios putativos para a glicosilação variando de isoformas e dependendo da espécie. Deste modo, a subunidade β 1 de galinha apresenta 4 sítios de glicosilação, a de rato 7, a humana 8 e a de camundongos 9 (Chow & Fortes, 1995). A presença de um ectodomínio de 6 resíduos de cisteínas formando três pontes dissulfeto, quando reduzidas causam uma inativação da Na,K-ATPase, além da presença de um motivo altamente conservado Tirosina-Tirosina-Fenilalanina-Prolina-Tirosina também podem ser considerada como uma assinatura de proteínas que pertencem à família β (Béggah e cols, 1997).

Portanto, com tantas isoformas presentes, podemos propor diferentes combinações de subunidades que proporcionam à bomba diferentes propriedades em relação às respostas que as mesmas podem apresentar ao sódio, potássio, ouabaína e ATP (Blanco e cols, 1995; Blanco e cols, 1995b). Logo, as combinações possíveis são as seguintes:

$$K_{0.5}$$
 para o Na⁺ $\alpha 2\beta 2 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 1\beta 1 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 3\beta 1$ $K_{0.5}$ para o K⁺ $\alpha 1\beta 1 > \alpha 2\beta 1 = \alpha 2\beta 2 > \alpha 3\beta 1 = \alpha 3\beta 2$

Com relação à afinidade pelo ATP as enzimas compostas por $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ apresentam K_m equivalentes, que são aproximadamente quatro vezes menores para $\alpha 1$; já para o K_i para ouabaína as isoformas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 3\beta 2$ possuem um nível alto de sensibilidade, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 2\beta 2$ um valor intermediário e $\alpha 1\beta 1$ um baixo nível de sensibilidade para o esteróide cardiotônico (Blanco e cols, 1995b; O'Brien e cols, 1994). Até o momento, as propriedades enzimáticas da Na,K-ATPase formada com a
presença da isoforma α 4 ainda não foram analisadas (Woo e cols, 2000), a possiblilidade da isoforma β estar combinada com a α 4 ainda é desconhecida, porém os RNAm para β 1 e β 2 foram detectados em gônadas (Malik e cols, 1989).

A presença de tantas isoformas, com pequenas diferenças na atividade e afinidade para cátions e ATP, são essenciais e específicas para um requerimento biológico diferenciado. A expressão da α 1 β 1é ubíqua, atuando então como a forma majoritária da bomba; as isoformas podem então controlar as funções de cada tecido. Como exemplo, podemos citar os neurônios, onde as isoformas α 1, α 2 e α 3 estão presentes, sendo que α 1 e α 2 são as responsáveis pelo gradiente iônico basal, pois a baixa afinidade para cátions da isoforma α 3 fará com que a mesma funcione de uma forma "menos eficiente". Porém, com a despolarização e repetidos disparos do potencial de ação, o gradiente de sódio e potássio é dissipado, e nestas condições as isoformas α 1e α 2 estarão em condições saturantes, enquanto que α 3 será ativada. Desta maneira a α 3 funciona como uma bomba sobressalente, restaurando o potencial de repouso. Além disso, a α 3 possui uma alta afinidade para o ATP, o que a habilita a utilizá-lo nas baixas concentrações de nucleotídeos próximo à membrana celular, após uma intensa atividade neuronal (Blaustein, 1993).

A diferença funcional para as isoenzimas também é sugerida para uma regulação estendida à expressão dos polipeptídeos α e β sob várias condições fisiológicas. Durante o desenvolvimento, a mudança na quantidade relativa de bombas de sódio ocorre em vários tecidos. Como exemplo, temos a regulação da expressão de isoformas do coração de ratos, pois, nestes tecidos, entre a segunda e a terceira semana de vida, a expressão de α 3 é interrompida e α 2 começa a ser expressa, tornando-se a isoforma predominante no miocárdio adulto (Lucchessi & Sweadner, 1991; Orlowski & Lingrel, 1988).

1.2.4. O Ciclo Catalítico

A Na,K-ATPase é classificada como uma ATPase do tipo P (Pedersen & Carafoli, 1987; Moller e cols, 1996; Lutsenko & Kaplan, 1995), e a grande marca que caracteriza este tipo de enzima é a presença de um aminoácido aspartato (no caso, Asp 369) que é fosforilado durante o seu ciclo catalítico (Post & Kume, 1973). As ATPases do tipo P apresentam-se distintamente em duas conformações definidas como $E_1 e E_2$ (Glynn, 1993), que são de fato estados conformacionais que a enzima apresenta durante o ciclo catalítico (Figura 6).

O início do ciclo de reações pode ser considerado a partir da ligação de uma molécula de ATP à forma $E_2(K_2)$ _ conformação da enzima com o íon potássio ocluído_ que possui alta afinidade por K⁺, apresentando K_{0.5} na ordem de 0.45 mM (passo 8 na figura 6). A ligação do ATP na enzima provoca uma mudança conformacional para a forma E_1 K₂.ATP, desocluindo então os íons K⁺ e liberando-os para o citosol (passos 9 e 10). Podemos observar que durante os passos do ciclo citado a ligação do ATP na parte "N" da enzima provoca um novo rearranjo distanciando-o de "A" e "P". A partir da ligação do ATP, a enzima passa a ter alta afinidade para o íon Na⁺ (K_{0.5} que varia de 0.19 – 0.26 mM), e então 3 íons Na⁺ ligam-se à enzima; sendo que a ligação do terceiro íon Na⁺ causa um novo rearranjo na estrutura, que é agora denominada de E_1 Na₃ATP. Em relação aos movimentos dos domínios observamos o deslocamento de "A" , desobstruindo "P". Ocorre concomitantemente, o deslocamento de "N" posicionando o fosfato γ terminal do ATP _ de acordo com a figura 6, na qual o terceiro fosfato está circulado em vermelho no sítio de fosforilação da enzima (P) (passos 1, 2 e 3).

A seguir, ocorre a fosforilação do resíduo de aspartato da enzima (passo 3). O Mg^{+2} é muito importante para esta reação, fazendo com que os três íons Na^+ sejam ocluídos pela enzima, que assume e a conformação $E_1P(Na_3)$ (Skou & Esmann, 1992;



Figura 6- Ciclo de Reações da Na,K-ATPase. A figura mostra as etapas principais do ciclo catalítico da enzima, evidenciando a entrada e saída dos íons, a participação dos movimentos das alças intracelulares (domínios A, P e N), bem como as duas conformações principais da enzima: E1 e E2. A seta em circulo no interior da figura indica o movimento do ciclo, em condições fisiológicas, dependente da razão ATP/ADP, porém em condições adequadas o ciclo poderá operar na direção reversa. (Horisberger, 2004).

Glynn, 1993). Esta forma sofre mudança conformacional, resultando em $E_2P(Na_3)$ com a conseqüente passagem para a forma $E_2P(Na_2)$ e liberação simultânea de um íon Na^+ para o meio extracelular (De Weer e cols, 1988; Apell e cols, 1998). Obs.: passo não discriminado no ciclo.

A próxima etapa é a desoclusão dos dois íons restantes, na qual a enzima passa para forma E_2P . Esta conformação apresenta uma baixa afinidade pelo Na⁺ (K_{0.5}= 14mM) mas, por outro lado, aumenta a sua afinidade pelo K⁺ (K_{0.5}= 0.1 mM). A ligação do K⁺ na enzima induz a defosforilação da conformação E_2P e a oclusão de dois íons K⁺, acarretando a conformação $E_2(K_2)$. Durante estes passos, podemos observar novamente os movimentos de "A" e "P"; de forma que o domínio A aproxima-se de "P" "bloqueando" o sítio de fosforilação (passos 4, 5, 6, 7 e 8). Logo, a enzima está pronta para outro ciclo de reação (Skou & Esmann, 1992; Glynn, 1993).

Estes dois efeitos do ATP, fosforilação e estimulação da desoclusão do K⁺, com alta e baixa afinidade respectivamente, são usualmente considerados como sendo manifestações de um domínio de ligação de nucleotídeo comum às duas conformações (Kaplan, 2002).

O controle do ciclo em baixa concentração de ATP demonstra que a ligação deste nucleotídeo (com baixa afinidade) na conformação $E_2(K_2)$ será lenta e o equilíbrio $E_1K_2 \leftrightarrow E_2(K_2)$ permanecerá fortemente voltado em direção à forma E_2 . A velocidade limitante será a transição de $E_2(K_2)$ para E_1K_2 (0.3 sec⁻¹). Com altas concentrações de ATP (> 1mM) a velocidade de turnover depende das razões de Na⁺ e K⁺. Com baixa razão de Na⁺/K⁺ com [Na⁺]i < 20mM e [K⁺]i > 130 mM, o passo limitante é a desoclusão de E_1K_2 . E com altas razões de Na⁺/K⁺ com [Na⁺]i > 20mM e [K⁺]i < 130mM, os passos limitantes serão $E_1P(Na_3) \leftrightarrow E_2P(Na_2) \leftrightarrow E_2P$; e a transição de E_1P para E_2P e a desoclusão de Na⁺ na superfície extracelular (Jorgensen, 2001).

Este ciclo de reações em modelo seqüencial é referido como esquema de Post -Albers, que não leva em consideração se a enzima apresenta-se como uma unidade funcional na forma de um diprotômero ($\alpha 2\beta 2$), deste modo apresentando dois sítios para a ligação do ATP, ou ainda, como uma estrutura tetraprotomérica (Taniguchi e cols, 2001).

Importantes aspectos das vias bioquímicas incluem a seqüência natural da ligação e transporte de cátions e o fato de que a forma E1P é mais suscetível ao ataque de 200µM de ADP do que 55M de água, sugerindo que o centro de fosforilação poderia estar mais fechado na forma E1P e mais aberto na forma E2P, que sofre clivagem por água. A idéia de que o sítio de ligação de nucleotídeos (e fosforilação) abre e fecha durante as reações do ciclo é um importante aspecto do modelo emergente da estrutura de alta resolução da Serca (Toyoshima e cols, 2000). As mudanças conformacionais que a enzima se submete durante o seu ciclo catalítico parece ser um conjunto alternado de abertura e fechamento de partes citoplasmáticas e intramembranar.

A Na,K-ATPase realiza duas funções separadas que, porém, devem estar acopladas: a hidrólise de ATP e o transporte de cátions monovalentes, sendo estas funções realizadas por partes distintas da enzima (Gatto e cols, 1998). A volta citoplasmática da alça central entre a região 4 e 5 da enzima("N" figura 6) contém todos os resíduos envolvidos na ligação do ATP, que foram identificados por marcação química ou mutações sítios dirigidas. Este polipeptídio de aproximadamente 430 aminoácidos foi expresso em *Escherichia coli* e purificado. E foi mostrado que o peptídeo purificado tinha a mesma especificidade da ligação nucleotídeo como a proteína nativa e intacta (Gatto e cols, 1998).

A ligação de cátions (e oclusão) ocorre em outra parte da enzima e foi demonstrada após extensivos experimentos de proteólises da Na,K-ATPase, que remove a maioria das partes citoplasmáticas extra da membrana (incluindo quase todo domínio de ligação de nucleotídeo). O resíduo pós- triptico foi capaz de ligar e ocluir íons K⁺ (Karlish e cols, 1990). Deste modo o domínio responsável pelo transporte de cátions é formado por segmentos transmembranares da enzima, e posteriores estudos indicaram modificações na enzima que resultavam na perda da função (oclusão) sem significante perda na ligação do ATP. E foi demonstrado que um resíduo de glutamato (E779) no segmento 5 removeu a habilidade da enzima em ocluir íons, enquanto a ligação de nucleotídeo permaneceu inalterada (Argüello & Kaplan, 1991 e Argüello & Kaplan, 1994). Modificação em um único resíduo no domínio de ligação de nucleotídeo provoca um pequeno efeito na ligação de cátions (Ellis-Davies & Kaplan, 1993 e Ellis-Davies & Kaplan 1994). E por fim um amplo estudo de mutações, tornou clara que os resíduos da Na,K-ATPase envolvidos na coordenação de cátions estão localizados nas porções 4, 5 e 6, que são ricas em aminoácidos com cadeias laterais doadoras de elétrons, incluindo aspartatos (Kuntzweiler e cols, 1996; Vilsen & Andersen, 1998).

A presença de muitos aminoácidos carregados negativamente nos segmentos transmembranares (4, 5 e 6, figura 4) e a ausência de cargas positivas para a compensação, leva a uma pronta idéia de que a neutralização da carga e o transporte do cátion é um aspecto importante do transporte transmembranar de íons Na⁺ e K⁺. A neutralização da carga serviria para estabilizar o cátion a caminho das porções da enzima que estão localizadas na membrana. Todavia, isto também implicaria que em circunstâncias nas quais a enzima não teria nenhum cátion ligado, os segmentos transmembranares (especialmente o 5 e o 6, que contem 3 resíduos carboxil) seriam menos estáveis por causa da ausência de cargas que neutralizariam os resíduos de

aspartato e de glutamato (Gatto e cols, 1998; Toyoshima e cols, 2000; Karlish e cols, 1990; Argüello & Kaplan, 1991).

Apesar da existência de uma quantidade apreciável de dados sobre a área de reconhecimento do ATP e de sua coordenação com os sítios de íons, os mecanismos moleculares que acoplam a hidrólise do ATP aos mecanismos de abertura de poro para os íons, e sua translocação, ainda não estão bem compreendidos. No caso da Na,K-ATPase, as observações feitas por Armstrong (Armstrong, 1998) nos ajudam a compreender como uma única estrutura pode coordenar o Na⁺ em um momento e o K⁺ em outro.

Na conformação E_1 da enzima o Na⁺ está ligado por interações íon/dipolo aos grupos carbonila dos segmentos M4, M5, M6 e M8, e aplicando-se o modelo para o Na⁺ no meio aquoso, por causa do grande tamanho do K⁺ (r= 1.33 angstron) se comparado ao Na⁺ (r = 0.85 angstron), percebemos que somente o Na⁺ se adequaria ao sítio de ligação do mesmo. A mudança conformacional relacionada à fosforilação da Na,K-ATPase causa uma mudança no sítio de ligação do Na⁺, permitindo a saída do Na⁺ para o lado extracelular (Armstrong, 1998).

Podemos observar que esta transição ocorre concomitantemente com a expansão do sítio de ligação de cátions (conformação E_2 da enzima), no qual o íon K^+ pode ser agora acomodado com a interação íon/dipolo em meio aquoso. O sítio, agora expandido, não acomoda o Na⁺, pois este não pode ser adequadamente coordenado com os grupos carbonila. Neste estado, uma troca das moléculas de água ao redor do Na⁺ para os grupos carbonila seria termodinamicamente desfavorável. Isto se deve ao fato de que seriam gastos aproximadamente 10 Kcal /mol para remover duas moléculas de água que ocupam um volume de 0.38 angstron (diferença do raio iônico entre o K⁺ e o Na⁺) do Na^+ . Sendo assim este resultado dá uma preferência de seletividade para o K⁺ sobre o Na^+ na ordem de 10⁶:1 (Armstrong, 1998).

1.2.5 Inibidores: vanadato, ouabaína e endobaínas.

1.2.5.1 – Vanadato

O vanadato é um potente inibidor da Na,K-ATPase, bem como de outras ATPases do tipo P, pois ele se assemelha estruturalmente ao fosfato ligado à enzima no estado de transição. Devido a esta similaridade estrutural o vanadato liga-se no sítio de fosforilação da enzima, bloqueando o seu ciclo catalítico, aparentemente porque ocorre a formação de uma ligação covalente acil-vanadato entre o vanadato e o aspartato que normalmente sofre fosforilação durante o ciclo catalítico, dando origem ao complexo estável E-V (enzima-vanadato) (Fedosova e cols, 1998).

1.2.5.2 – Ouabaína

A Na,K-ATPase é alvo de um vasto número de toxinas produzidas por plantas e animais, uma série de esteróides de ocorrência naturais, denominados de esteróides cardíacos ou glicosídeos cardíacos (Thomas e cols, 1990; Kaplan, 2002; Scheiner-Bobis, 2002), como por exemplo a ouabaína. A atividade de bombeamento de íons é especificamente inibida por estas substâncias, que são capazes de se ligar reversivelmente do lado extracelular da bomba, inibindo a hidrólise do ATP pela bomba, por "prender" a enzima no estado E2-P*-ouabaína (figura 7).

Pelo fato de que estas substâncias são capazes de inibir a enzima, elas são muito utilizadas para identificar a Na,K-ATPase em diversos sistemas, e estudar o mecanismo de transporte de íons envolvidos neste sistema. Em condições ótimas a ligação de ouabaína ocorre na razão de 1:1. A indução da conformação E_2 -P da enzima induz o



Figura 7: Representação dos segmentos da subunidade α da Na,K-ATPase que interagem com a ouabaína. A identificação de cada resíduo e alças envolvidas na ligação ou ancoragem da ouabaína estão referidas no texto. A esfera cinza no centro da figura representa a ouabaína em seu local de ligação na Na,K-ATPase (Sweadner and Donnet, 2001).

esteróide a ligar-se à enzima com maior afinidade, resultando na formação de um complexo fosfoenzima/esteróide estável, denominado de E_2 -P*ouabaína (Figura 7). A presença de íons a serem transportados, portanto, influencia as constantes de dissociação do complexo enzima-ouabaína. Em vista disso, a presença de K⁺ reduz a alta afinidade da enzima pelos esteróides no sítio de ligação extracelular, enquanto que a presença de Na⁺ favorece a ligação da ouabaína à enzima. Por outro lado, quando na presença de Mg⁺² e Pi, a baixa concentração de Na⁺ tem o efeito de baixar a afinidade da bomba pelo esteróide quando o K⁺ está presente (Scheiner- Bobis, 2002).

A ligação da ouabaína na enzima propriamente dita envolve uma série de aminoácidos. O primeiro grupo destes resíduos na alça extracelular está no segmento 1 e 2, incluindo glicina 111, prolina 118, aspartato 121, asparagina 122 e tirosina 308, e possivelmente fenilalanina 928 no segmento 10 (lembrando que o primeiro e o décimo segmentos estão próximos). O segundo grupo de aminoácidos é composto pelos que estão localizados nos fragmentos dos segmentos transmembranares 5, 6, e 7 incluindo uma arginina 880. E por fim, o terceiro grupo inclui aminoácidos do quarto segmento transmembranar e dois aminoácidos, cisteína 367 e 656 (Saravazyan e cols, 1997; Kirley e cols, 1986; Kirley & Peng, 1991; Canessa e cols, 1992).

1.2.5.3. Endobaínas

Muitos compostos com a estrutura idêntica ou parecida com ouabaína e moléculas correlatas, foram identificados em mamíferos e exibem a mesma atividade biológica que os esteróides cardiotônicos exógenos (Schoner & Scheiner- Bobis, 2007). Estes compostos são agora denominados de esteróides cardiotônicos endógenos, ou endobaínas. As substâncias identificadas até o momento incluem a ouabaína (plasma, adrenal e hipotálamo), um isômero da ouabaína (hipotálamo), digoxina (urina), e fortes evidências indicam que estas substâncias são sintetizadas pelo córtex da adrenal.

O alvo fisiológico das endobaínas parece ser a regulação da pressão sangüínea, uma vez que ouabaína circulante parece atuar como um modulador da pressão sangüínea; atingindo os componentes principais do sistema cardiovascular (coração, vasos e rins). Deste modo a hipertensão foi relacionada ao aumento dos níveis plasmáticos de endobaínas (Rossi e cols, 1995). O mecanismo pelo qual as endobaínas aumentam a pressão sangüínea está ligado ao equilíbrio entre o Na⁺ e o Ca⁺⁺ citosólico via trocador Na⁺/Ca⁺⁺. Deste modo, a inibição da bomba de sódio no músculo vascular liso das células de miócitos pelas endobaínas leva a um aumento na concentração de Na⁺ citoplasmático, causando um aumento na entrada da Ca⁺⁺ na célula para ser seqüestrado pelo retículo sarcoplasmático (RS). O aumento do Ca⁺⁺ no RS resulta no aumento da força de contração de fibras do músculo cardíaco e vascular, aumentando então a pressão diretamente. Este mecanismo é a base para a reversão parcial da insuficiência cardíaca, seguida ao tratamento com glicosídeos cardíacos, logo se ocorresse um excesso de produção endógena de esteroides cardiotônicos um aumento na pressão arterial poderá ser observado.

1.2.6 A Na,K-ATPase como um receptor

A inibição parcial da Na,K-ATPase (50-60%) por concentrações não tóxicas de ouabaína (10 μ M), causa um crescimento hipertrófico, além de uma regulação transcricional de muitos genes marcadores relacionados ao crescimento de miócitos (ex: NF κ B, α 3, sKATc e ANF) (Figura 8). Estes efeitos da ouabaína envolvem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal incluindo, a ativação da Src cinase e a fosforilação do receptor do fator de crescimento epidermal e outras proteínas, seguidas pela ativação



Figura 8: Representação esquemática da sinalização da ouabaína em miócitos cardíacos. A ligação de 10μM de ouabaína na Na,K-ATPase causa uma mudança conformacional na enzima, resultando na interação entre a Na,K-ATPase e o receptor do fator de cresciemento (EGF) causando a ativação de múltiplas vias de transdução de sinais, incluindo a PKC e a ativação da Src quinase com a fosforilação de tirosinas do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), que ativa a cascata de sinalização da via Ras/Raf/Mek/MAPK, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o aumento de síntese de proteínas (XIE, 2001).

da cascata Ras/Raf/MEK/MAPK. Esta ação na regulação de genes, similarmente aos efeitos clássicos na contração muscular, são dependentes do influxo e aumento da $[Ca^{++}]_i$, indicando que este segundo mensageiro participa dos efeitos da ouabaína na contratilidade e crescimento. Portanto, estes achados levam prontamente à proposta de que a ligação do inibidor à bomba, neste caso a ouabaína, converte-a em um transdutor de sinal, que pode operar por vias dependentes ou não do cálcio (Kometiani e cols, 1998; Akera & NG, 1991; Nagakawa e cols, 1992; Huang e cols, 1997).

1.2.7 - Regulação da Na,K-ATPase por Cinases

A regulação da Na,K-ATPase pode ser dividida, por conveniência , em período longo, principalmente envolvendo mudanças na velocidade de síntese e degradação, e em período curto, responsável pelas rápidas alterações na atividade da bomba, que geralmente ocorre em minutos. Portanto, podemos perceber que a enzima está sujeita a uma série de controles hormonais. Levando em consideração a regulação de período curto da Na,K-ATPase, vemos que a mesma é alvo de uma série de hormônios (catecolaminas, peptídeos hormonais), que atuam através da ativação de receptores de membrana acoplados à proteína G, que inicia múltiplas vias de transdução de sinal modulando a atividade de grupos de proteínas cinases, fosfolipases e fosfatases (figura 9). Contudo, estabelecer uma função precisa da ação destas proteínas na fosforilação da subunidade α da Na,K-ATPase, permanece incerta, uma vez que os dados atuais a respeito deste assunto ainda geram conflitos.

As proteínas cinases e fosfatases possuem uma função central na via de transdução de sinal em uma célula. Interações entre receptores da superfície celular/ ligantes extracelulares (hormônios, fatores de crescimento, citocinas e drogas) ativam as



Figura 9- Esquema da regulação da Na,K-ATPase por diversos fatores. Alguns hormônios e neurotransmissores estimulam PKA e PKC provocando uma fosforilação da subunidade α da Na,K-ATPase, que afeta as propriedades de transporte e ou redistribuição através da membrana ou estoques intracelulares. (Crambert & Gerring, 2003)

vias de sinalização intracelular que resultam no aumento ou decréscimo da atividade celular. Pouca informação está disponível sobre o envolvimento da Na,K-ATPase na cascata de reações celulares. Todavia os resultados direcionam para uma regulação da subunidade α da Na,K-ATPase como alvo de proteínas cinases (Bertorello e Katz, 1995). Muitas evidências de tais interações provêm de estudos *in vitro* (Bertorello e cols, 1991; Fisone e cols, 1995) e *in vivo* (Bertorello e cols, 1991). A subunidade α parece ser um substrato para a PKA e PKC (Figura 9) (Bertorello, 1991). Além disso existem 36 sítios que poderiam ser qualificados como possíveis motivos para a fosforilação da Na,K-ATPase pela PKC (Feschenko and Sweadner, 1995). As proteínas cinases PKA e PKC são classificadas como proteínas cinases serina/treonina considerando os seus resíduos alvos.

Através de uma complexa regulação hormonal, a Na,K-ATPase desempenha uma função crítica na reabsorção de Na⁺ na membrana basolateral das células do néfrons. A prevalência da isoforma $\alpha 1\beta 1$ nas células epiteliais dos rins (células tubulares renais), produziu um modelo popular para o estudo da influência da fosforilação na atividade e expressão da Na,K-ATPase. A fosforilação da subunidade α da Na,K-ATPase pode ser induzida experimentalmente por tratar as células epiteliais renais com drogas ou hormônios. Estudos anteriores mostraram que a fosforilação da Na,K-ATPase inibia a atividade da enzima (Bertorello e cols, 1991); e outros investigadores posteriormente confirmaram este efeito demonstrando que a fosforilação da enzima resultava na queda da atividade (Middleton e cols, 1993). Mais recentemente estudos feitos em células renais indicaram uma fosforilação induzida por dopamina na subunidade α (resíduo de serina-18) levou a internalização da Na,K-ATPase por mecanismos dependente de clatrina, deste modo contribuindo para reduzir a atividade da enzima (Chibalin e cols, 1999);e posteriormente um estudo com células renais transfectadas com a subunidade α mutada na serina- 18 mostrou que este aminoácido e importante para os efeitos da dopamina.

A fosforilação da bomba por PKA, que ocorrre na conformação E₁, promove efeitos variados e complexos. A inibição de atividade Na,K- ATPásica em função direta da fosforilação pela PKA não é verdadeira, pois recentes dados demonstraram que a fosforilação da serina 938 tem uma função permissiva, permitindo a fosforilação da bomba pela PKC na serina 23 (Cheng e cols, 1997). A PKA inibe a atividade da Na,K-ATPase em ductos coletores renais por ativar a via da PLA₂ (Kiroytcheva e cols, 1999). Em outros sistemas a PKA aparece por ativar o inibidor da proteína fosfatase, que então irá alterar a atividade da bomba (Aperia e cols, 1991). E em muitos casos a PKA não regula a atividade da bomba diretamente, porém altera a atividade de outros transportadores de Na⁺, levando a uma mudança na concentração citoplasmática de Na⁺, que em retorno altera a atividade da bomba (Hughes e cols, 1988)

Em relação às questões que envolvem o mecanismo de regulação da Na,K-ATPase pela PKC os dados também geram dúvidas, pois os resultados obtidos dependem da isoforma da cinase que esta envolvida no sistema, logo a fosforilação da Ser 23, e recentemente da serina 774 ou Treonina 938 (Mahmmoud e cols, 2002), pode causar um aumento na atividade (Pedemonte e cols, 1997), ou inibição da bomba (Gao e cols, 1999).

Além da PKA e da PKC outras proteínas cinases são capazes de fosforilar a Na,K-ATPase e deste modo temos que a AKAP (anchored kinase AMPc dependent protein), uma proteína cinase ancorada na membrana dependente de AMPc, é capaz de fosforilar a bomba presente na membrana basolateral de glândulas parótidas causando a sua inibição (Kurihara 2000); e o mesmo efeito pode ser observado com a proteína cinase dependente de Ca²⁺\CaM, ou seja ocorre uma fosforilação da Na,K-ATPase (coração) e uma conseqüente inibição (Netticadan, 1999).

Há por fim os resultados provenientes da PKG sobre a atividade da bomba, que é isoforma-específico. Assim sendo, ocorre uma modulação na isoforma α 3, mas não na α 1 em células de Purkinje (Nathanson e cols, 1995); já em células endoteliais observamos uma modulação em α 1, mas não em α 2 e α 3 (Pontiggia e cols, 1998).

1.2.8 – Estrutura Cristalizada da Na,K-ATPase.

Recentemente Morth e cols (2007) demonstraram a estrutura cristalizada da Na,K-ATPase em 3,5 Angstron (Figura 11), e diferente de outros estudos, eles foram aptos a estudar a enzima associada às subunidade β e γ . De forma bem elegante estes autores conseguiram cristais da Na,K-ATPase na forma $E_2[K_2]$, e para isto eles utilizaram íons Rb⁺, um congênere do K⁺, e através do substrato MgF⁻²₄, como análogo de Pi; e deste modo foi obtido uma enzima na forma [Rb2]E2.MgF⁻²₄.

As análises dos cristais revelaram que o domínio de ligação de cátions, que se assemelha a Serca, é formado pelos seguintes resíduos: glutamato 327 (M4), serina 775, glutamato 779, asparagina 779 (M5) e aspartato 808 (M6) e de modo indireto glicina 923 (M8), a leucina 97 (M1) pode contribuir na ligação dos íons, e muitos destes resíduos já tiveram a sua importância determinada por experimentos de mutagenesis. Adicionando-se aos estudos feitos em cristais Morth e cols, 2007 sugeriram que o C – terminal (arginina1003-1006, tirosina 1015 e 1016) da enzima é crucial para a ligação do terceiro íon Na⁺ pela Na,K-ATPase.

Diferentemente da Serca a Na,K-ATPase está associada a duas outras subunidade, a β e γ . Os resultados obtidos para a subunidade β mostram um contato direto com os segmentos 7 e 10 da subunidade α e um causando um "cobrimento" das



Figura 10: Na,K-ATPase cristalizada em 3,5 angstron. A subunidade α (amarelo e azul) da Na,K-ATPase foi cristalizada na presença da subunidade β (bege) e da subunidade γ (vermelho) (Morth e cols 2007).

Voltas extracelulares dos segmentos 5/6 e 7/8, que pode ser a interação responsável pelo papel desta subunidade na oclusão de K⁺. E considerando a subunidade γ os resultados indicam que esta subunidade esta associada com parte externa do segmento 9 (fenilalanina 949, glutamato 953, leucina 957 e fenilalanina 960), e não na fenda existente entre os segmentos 9 e 2, como dito por estudos de modelagem baseados na estrutura da Ca⁺²-ATPase (Garty & Karlish, 2004 e Li e cols, 2006).

1.2.9 - A Subunidade γ, um membro da família FXYD.

A subunidade γ (FXYD2) é um proteolipídeo, e está associado especificamente à Na⁺,K⁺-ATPase em alguns tipos celulares (Figura 11). A existência desta subunidade foi postulada há 30 anos (Rivas e cols, 1972) e subseqüentemente foi referida como subunidade γ (Reeves e cols, 1980), e a sua associação específica com a Na,K-ATPase foi demonstrada por Forbush e colaboradores (Forbush e cols, 1978).

Como dito anteriormente, a subunidade γ descrita e purificada na preparação de Na,K-ATPase renal (Forbush e cols 1978) está associada às subunidade α e β em quantidades equimolares (Coolins e cols, 1982; Hardwick e Freytag, 1981 e Reeves e cols, 1980). A clonagem molecular da subunidade γ de diferentes animais (rato, camundongo, vaca e ovelha) indicou um peso molecular de aproximadamente 6500 Da (Mercer e cols 1993). Fato importante observado é que a comparação entre as seqüências mostra uma equivalência de 75% como um todo, porém este valor pode chegar a 93% quando as seqüências de mamíferos são comparadas. Além disso, a análise estrutural deste proteolipídeo mostrou que a subunidade γ consiste de uma proteína com um único domínio transmembranar com o seu N-terminal direcionado para o lado externo e o C-terminal voltado para o interior da célula (Béguin e cols, 1997).



Figura 11- Distribuição tecido específica da subunidade γ . *Western-blot* utilizando anticorpo anti-subunidade α e γ (FXYD2). O Painel (A) mostra a expressão da subunidade α e γ (FXYD2) em diferentes tecidos. O painel (B) mostra a expressão da subunidade α e γ na medula renal de diferentes animais. A γ (FXYD2) é expresso apenas na medula renal (Therien e cols, 1997).

No que diz respeito à presença da subunidade γ junto ao complexo funcional da Na,K-ATPase (subunidade $\alpha \in \beta$) de acordo com o dado apresentado na figura 11, que demonstra a análise de *western blots* de uma variedade de tecidos, incluindo células glomerulares de ratos, medula, axolema, coração, eritrócitos, células epiteliais glomerulares (linhagem celular GEC), HeLa e culturas de células derivadas de rim de rato (NRK-52E), usando um anticorpo contra a subunidade γ mostrou que está subunidade encontra-se presente somente no rim (Therien e cols, 2001).

Outro fato peculiar a subunidade γ da Na,K-ATPase é que ao observamos este proteolipídeo em um gel de SDS-page notamos a presença de uma dupla (massa molecular que equivale a 8 e 9 kDa) (Mercer e cols, 1993; Therien e cols 1997). E esta dupla é observada na presença, não na ausência, de microssomos pancreáticos (Mercer e cols 1993; Béguin e cols, 1997). Recente análise de espectroscopia de massa da subunidade γ de rim de rato indicou a presença de duas bandas que são "splice variants". Deste modo temos a subunidade γ a (uma banda de peso molecular aproximado de 7184 Da (Kuster e cols 2000) e a γ b com o peso de aproximadamente 7337,9 Da. As análises de espectroscopia de massa de peptídeos obtidos por digestão pela tripsina revelou que os resíduos do N-terminal da γ a , a saber TELSANH são trocados por Ac-MDRWYL na γ b. Contudo, cabe ressaltar que experimentos nos quais o cDNA, para ambos os variantes, foram expressos em células HeLa e HEK e bandas adicionais γ a' e γ b' podem ser observadas em westenn blot de células transfectadas (Arystarkova e cols 1999).

O papel funcional que a subunidade γ exerceria na Na,K-ATPase é uma grande área a ser trabalhada. Uma série de experimentos testou o efeito do anticorpo para subunidade γ (C-terminal) na enzima renal. E em outra série de experimento, o

comportamento cinético das células transfectadas com a subunidade γ foi comparado com as células nulas (somente o vetor). Este último experimento foi realizado inicialmente com células embrionárias de rim humano (HEK) e mais recentemente ya e yb foram transfectados também em células HeLa. Primeiramente foi mostrado que o soro anti γ elaborado contra o C-terminal da subunidade γ inibiu a atividade da Na,K-ATPase renal, porem não a das enzimas de outros tecidos que não expressam γ . Posteriores análises mostraram que o anticorpo contra a γ diminuía afinidade aparente para ATP provavelmente por estabilizar a forma E2 da enzima, e muitas observações suportam esta idéia: (1) o anti γ inibiu a atividade ATPásica tal que a inibição aumenta com o pH ácido e sobre quais condições o segmento da reação E2(K)→E1 torna-se limitador; (2) deslocamento do equilíbrio da conformação E₁-E₂ em direção à E₂ pelo anticorpo γ aumentou a sensibilidade a inibição da enzima por potássio a concentrações de ATP inferior ao qual a condição $E_2(K) \rightarrow E1$. Além disso, um pequeno efeito do anticorpo γ na afinidade aparente por K⁺ (aumento) foi observado em condições subótimas de ATP (Therien e cols 2000). Consistente efeito oposto não foi observado com células transfectadas com a subunidade γ , possivelmente devido ao seu alto nível de hidrólise. De fato, em experimentos de influxo de Rb⁺ sensível a ouabaína, uma significante diferença na afinidade aparente para K⁺ extracelular em células transfectadas com o ya e yb, comparados com as células controle não pode ser detectada. Baseado na premissa de que o anticorpo y aumenta a forma E2, incluindo E_2P , foi predito que a enzima de rim tratada com o anticorpo y deveria ser mais sensível ao vanadato do que o controle. De fato, este aspecto e demonstrado por um modesto, porém significante decréscimo no IC₅₀ para o vanadato com o tratamento do anticorpo γ . E finalmente, o anticorpo γ diminui o V_{max} sem afetar a fosfoenzima.

Unindo-se os dados publicados anteriormente, os resultados provêm uma forte evidência de que um papel importante da γ subunidade é o deslocamento do equilíbrio conformacional da reação da Na,K-ATPase em direção a E1 e que o anticorpo γ rompe a interação relevante entre o complexo α/β e γ . A observação de que o γ diminui a sensibilidade ao vanadato, visto que o tratamento com anticorpo γ da enzima renal aumenta a sensibilidade ao vanadato, fortemente suporta a conclusão de que a mudança no K_{ATP} reflete primariamente um efeito no equilíbrio conformacional E₁/E₂ (H.X. Pu e cols 2001).

Outro achado concernente as funções da γ é um segundo efeito distinto da função catalítica da Na,K-ATPase. Deste modo, estudos anteriores revelaram um grande efeito do K⁺ como um inibidor dos sítios de ativação por Na⁺ citoplasmáticos das Na,K-ATPase renal e muitos outros tecidos. Originalmente, disseminou-se a noção de que esta propriedade foi devido à presença da subunidade γ , desde que o anticorpo γ não anulasse o efeito. Todavia recentes estudos de transfecção revelaram que ambas as variações de γ aumentam o antagonismo K⁺/Na⁺ (H.X. Pu e cols, 2001). Quando os experimentos com a Na,K-ATPase são realizados com altas concentrações de K⁺, este efeito é manifestado como uma afinidade aparente baixa para Na⁺. Uma análise detalhada do K_{Na} medido como uma função da variação da concentração de K⁺, indica que o efeito é devido ao decréscimo do K_K com pouco efeito sobre o K_{Na}. Este efeito da γ no antagonismo de K⁺/Na⁺ é visto igualmente com ambas as variações de γ , interessantemente, esta função da γ não será alterada por anticorpos, que reagem com a enzima desnaturada, normalmente contra o C-terminal de ambos as γ s (a e b), ou o peptídeo TELSANH da γ a e b (H.X. Pu e cols, 2001).

É evidente que os estudos do γa e γb alteram similarmente a cinética da Na,K-ATPase, com nenhuma evidência de uma significante diferença do dois nas funções catalíticas. E pode ser notado que o efeito funcional não depende de modificações tecidos específicas da subunidade γ além disso; tais modificações podem ser vistas em células HeLa (γ b') ou HEK (γ a'). A expressão de γ a em células NRK-52E foi descritas por modular (diminuir) a afinidade por Na⁺ e K⁺ (Arystarkova e cols, 1999).

O reconhecimento de que a subunidade γ induz dois efeitos, sendo que somente um é impedido pelo anticorpo γ (C-terminal), sugere que estas características devem ser atribuídas a diferentes regiões da interação entre a subunidade γ e a subunidade α , que possui sítios residuais funcionais. Presumivelmente, o efeito no equilíbrio E₁/E₂ e a aparente afinidade por ATP envolvem a seqüência C-terminal KHRQVNEDEL e o antagonismo K⁺/Na⁺ é mediado por outra seqüência na molécula. Em relação ao mecanismo, enquanto a estabilização da conformação E₁ pela subunidade γ explica o aumento aparente da afinidade por ATP, um efeito semelhante não pode explicar o aumento no antagonismo K⁺/Na⁺. Um aumento intrínseco da afinidade de ligação de K⁺ em um dos dois sítios citoplasmáticos pode levar a um aumento citoplasmático do antagonismo K⁺/Na⁺, sem simultaneamente afetar o equilíbrio E₁/E₂.

A relevância fisiológica da modulação da Na,K-ATPase por γ permanece especulativa. A subunidade γ é em geral distribuída em segmentos do rim, que absorvem a grande carga de Na⁺ filtrado. Por causa do seu maior efeito estar relacionado a um decréscimo na afinidade da Na,K-ATPase pelo Na⁺ isto pode resultar em um favorável processo de reabsorção de Na⁺ em segmentos renais com uma alta carga de Na⁺. (Béguin e cols, 2001)

A importância fisiológica da modulação da afinidade por Na⁺ da Na,K-ATPase pela subunidade γ é também suportada pelas observações feitas em culturas de células transfectadas com a subunidade γ , onde ocorre uma redução na afinidade por Na⁺ e um decréscimo do crescimento celular (Arystarkhova e cols, 2002). Em outra via, um aumento na afinidade da Na,K-ATPase pelo ATP provocada pelo γ sugere que este pode ser importante na preservação da atividade da enzima em segmentos renais, tais como a medula interna, onde ela está propensa a anoxia. (Pu and cols, 2001 e Therien e cols, 1997), logo, um aumento na utilização de ATP manterá um ótimo nível intracelular de K⁺ e um baixo nível de Na⁺ sobre condições de energia comprometida (Therien e cols, 1999 e 2000). Tal como um regulador do K_{ATP} deve alterar moderadamente a afinidade da Na,K-ATPase, pois um excessivo aumento levaria a um grande decréscimo da concentração de ATP resultando ao comprometimento da viabilidade celular.

E em segundo lugar a habilidade do γ em aumentar o antagonismo K⁺/Na⁺ na superfície citoplasmática (H.X. Pu e cols 2001) pode prover meios para uma perspicaz regulação da concentração do Na⁺ no estado de equilíbrio. Uma efetiva queda na afinidade pelo Na⁺ citoplasmático para ativação da bomba, pode ser acompanhada por um ajuste no qual a concentração de Na⁺ no estado de equilíbrio é maior do que nas células que não possuem o regulador. E por fím, outro achado importante do possível papel fisiológico da subunidade γ é observado na mutação em um resíduo conservado de glicina no domínio transmembranar, que foi relacionado à hipomagnesemia primaria humana. Estudos no efeito da mutação G \rightarrow R revelou que ocorre uma "quebra" na associação da subunidade γ com a Na,K-ATPase sem mudanças na expressão da enzima na superfície celular (Pu and cols, 2002, Crambert e cols, 2002). No entanto, posteriores investigações devem ser feitas para determinar como este efeito poderia estar associado a perda de Mg⁺², aumento na absorção de cálcio, e hipocalciuria nestes pacientes.

A regulação da expressão da subunidade γ também foi estudada durante o desenvolvimento em rins durante o desenvolvimento de anfíbios, a subunidade γ foi encontrada em vários tecidos, porém normalmente no rim pró nefrótico. A expressão da

subunidade γ coincide com a expressão da subunidade α e β da Na,K-ATPase, sugerindo um processo regulatório comum. Este padrão de expressão revela a importância da modulação da subunidade γ na Na,K-ATPase. Em culturas de células do ducto coletor medular de murinos ausentes do γ, a expressão de γ a e γ b e induzida por condições hipertônicas dependente da ativação da fosfatidil inositol cinase e da jun cinase. A regulação da γ está direcionada para a membrana basolateral de células IMCD3, consistente com a localização no ducto coletor da medúla interna de células in vivo (Pihakaski e cols 2005). A regulação osmótica da subunidade γ foi observada na medula renal interna em resposta a mudança de hidratação (Capasso e cols, 2001, 2003 e 2005). A regulação promovida pela jun cinase durante a hipertonicidade e mediada por Cl⁻ e não por Na⁺, em contraste à regulação da α subunidade da Na,K-ATPase. Em células IMCD3, a ativação da jun cinase regula o nível transcricional da subunidade γ, mas por outro lado a fosfatil inositol cinase modula a translação do γ. E finalmente, a expressão do γa, porém não o γb, é induzida em células renais do proximal.

Deste modo, temos muito que aprender sobre os efeitos funcionais da subunidade γ na Na.K-ATPase e sua regulação , pois ainda estamos longe de compreender a relevância fisiológica desta proteína e o seu papel funcional em estados patofisiológico, tais como a hipomagnesemia primaria humana.

Como dito anteriormente, γ a e γ b mostram diferenças em sua localização ao longo do túbulo renal (H.X. Pu e cols 2001). Usando um anticorpo γ (C terminal) e anticorpos para a subunidade α de ratos como também anticorpos para definir os tipos celulares, experimentos de fluorescência dupla feitas no laboratório de N. Farman mostrou uma altíssima expressão na porção medular da alça ascendente fina, que contém ambos γ a e γ b, com nenhuma resposta positiva para os outros segmentos tubulares na medula. No córtex, a proporção de γ b é marcadamente menor do que na medula, e γ b é detectado no túbulo distal convoluto, e túbulo conector (Arystarkova e cols, 2002) muitos túbulos expressam γ , porem a um nível muito baixo. Anticorpos específicos para γ a e γ b mostraram diferenças em sua localização cortical: γ a está localizado nas células da mácula densa e principalmente nas células corticais do ducto coletor. Em contraste γ b e não γ a está presente na alça ascendente fina cortical.

Em relação à associação da subunidade γ com a Na,K-ATPase as interações foram reveladas por experimentos de co-imunopreciptação. Quando membranas da medula interna de rins de rato foram solubilizadas por CHAPS ou C12E8 e anticorpos contra a subunidade α da Na,K-ATPase trouxeram consigo ambas as formas da γ . E em outro experimento reverso, anticorpos específicos para γ a e γ b co- preciptaram com a subunidades α da Na,K-ATPase. Muitos estudos tentam estabelecer as regiões da subunidade α que interagem com a subunidade γ . Experimentos de desnaturação térmica $(55^{\circ}C)$ causam uma radical reorganização da porção C-terminal da subunidade α e foi sugerido que a região entre os segmentos TM8-TM10 da subunidade α seriam expelidos da membrana com a subunidade γ , sugerindo uma associação entre elas (Donnet e cols 2001) e interessantemente, quando a γ esta ausente na Na,K-ATPase, a temperatura para a observação deste efeito torna-se menor (41°C) causando um significante decréscimo na atividade da enzima (Jones e cols, 2005). Por outro lado, análises cristalográficas da Na,K-ATPase renal a 9,5 A de resolução (Hebert e cols, 2001) tomando-se como base a estrutura da em alta resolução da Ca-ATPase (Toysohima e cols 2000) a subunidade γ está localizada em uma fenda produzida em TM9, TM6, TM4 e TM2. A função do TM9 nas interações estruturais e funcionais com a subunidade γ foi confirmada por análises mutacionais. Interessantemente a Leu 964 e a Fen967 da Na,K-ATPase de rato contribui para uma estável associação da enzima com a subunidade γ , porem não influencia na afinidade aparente da enzima por K⁺. Por outro lado, Fen956 e Glu960 não contribuem para uma eficiente associação da subunidade γ porém transmite o efeito do K na Na,K-ATPase. E ainda considerando-se os experimentos que usaram peptídeos transmembranares miméticos e sintéticos podemos apontar que a glicina 41 é importante para o efeito da subunidade γ na afinidade aparente por Na⁺ da Na,K-ATPase e na associação da subunidade γ com a enzima, assim bem como a importância deste aminoácido na formação de peptídeos de γ oligomerizados (Zouzoulas e cols 2003). E por fim, as análises feitas com anticorpos contra o C-terrminal da subunidade γ (Pu e cols, 2001 e Therein e cols, 2001) e as retiradas das partes C e N terminal da subunidade γ (Pu e cols 2002) aboliram o aparente efeito que este proteolipideo exerceria na afinidade da Na,K-ATPase por ATP.

Apesar da pouca compreensão dos efeitos funcionais das proteínas de FXYD no transporte e propriedades cinéticas da bomba sódio, muito resta a ser aprendido sobre a relevância fisiológica destes efeitos e a implicação potencial de uma perda de regulação da Na,K-ATPase pela subunidade γ em estados patofisiológicos. Mais estudos são necessários, portanto, para se avaliar o papel funcional desta proteína, desde a biossíntese até a relação entre estrutura e funcionalidade.

1.3 – A Na,K-ATPase nos crustáceos.

A Na,K-ATPase é uma enzima de vital importância para os mais diferentes crustáceos eurialinos durante o seu processo de aclimatação, logo, a função e como esta enzima é regulada durante esta adaptação fisiológica dos crustáceos tem sido amplamente estudada em animais aclimatados em diferentes salinidades, e a literatura tem mostrado que esta enzima possui uma atividade significativamente menor em animais adaptados em meios de salinidade elevada e maior em salinidades baixas (Harris & Bayliss, 1988; Piller e cols, 1995; Corroto & Holliday, 1996; Mo e cols, 1998; Zare & Greenaway, 1998; Lucu & Flik, 1999; Lucu & Devescovi, 1999; Flik & Haond, 2000; Castilho e cols, 2001; Mo & Greenway, 2001; Towle e cols, 2001 e Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003). A diminuição da atividade da Na,K-ATPase branquial em resposta à aclimatação a salinidade elevada é uma característica importante para o processo osmoregulatório durante longos prazos, pois é acompanhada pela diminuição na captura de íons sódio e a energia gasta para o seu transporte. (Péqueux, 1995; Lima e cols, 1997; Lucu e Towle, 2003); porém os mecanismos que regulam este processo ainda são poucos compreendidos. (Lovett e cols, 2001; Mo & Greenaway, 2001; Towle e cols, 2001; Towle & Weihrauch, 2001; Lucu & Towle, 2003). Argumenta-se que tal resposta está baseada na regulação da enzima préexistente, na redução da taxa de sua síntese através de mecanismos induzidos por neurohormônios, na expressão de isoformas com afinidades diferentes para o íon sódio (observado no crustáceo Chasmagnatus granulata), mudança da composição lipídica da membrana (Castilho e col, 2001; Chapelle & Zwingelstein, 1984; Péqueux, 1995; Lima e cols, 1997; Spanings-Pierrot e cols, 2000; Lovett e cols, 1995 e 2001; Silva e cols, 2008; Towle e cols, 2001), um aumento na produção de poliaminas (Lovett e cols,

1995; Silva e cols, 2008) e um aumento na produção de metil farnesoato (Lovett e cols, 2000)

A dependência da Na,K-ATPase ao pH, temperatura, inibidores e composição do meio tem sido examinada. A enzima mostra um valor pH ótimo para a sua atividade em torno de 7,0- 7,7 no homogenato de brânquias de *Callinectes sapidus* (Neufeld e cols, 1980), *Hemigraspsus nudus* (Corroto and Holliday, 1996) *Callinectes danae* (Masui e cols, 2002) e *Uca pugnax* (Holliday, 1985).

Em relação à razão de íons Na⁺ e K⁺ que deve existir no meio, fato demonstrado por Skou 1957 e 1960, os dados encontrados na literatura indicam que a razão ótima é 5:1-10:1 para *Uca minax* (Wanson e cols, 1984) *Callinectes sapidus* (Neufeuld e cools, 1980) e *Callinectes danae* (Masui e cols, 2002). Logo na presença de 20 mM de K⁺, a Na,K-ATPase das brânquias de *Eriocheir sinensis* alcançou a atividade máxima com 100 mM de Na⁺, com um K_{0,5} de 13,9 mM, e na presença de 10 mM de K⁺ enzima de *C*. *danae* alcançou uma atividade máxima com 100 mM de Na⁺ (Masui e cols 2002). Já a concentração de K⁺ requerida está na faixa de 5-10 mM para ativar a Na,K-ATPase da brânquias de crustáceos, com um valor de K_{0,5} 1,1-14,3 (Masui e cols, 2002; Wanson e cols, 1984; Furriel e cols, 2000; Sarver e cols, 1994; Wilder e cols, 2000). No crustáceo *Carcinus maenas*, a afinidade pelo Na⁺ parece aumentar com o decréscimo da salinidade, enquanto que a afinidade para o K⁺ permanece inalterada (Siebers e cols, 1983; Winkler e cols, 1986). Em muitos casos, a afinidade aparente para os íons K⁺ não é correlacionada como uma adaptação à salinidade, mas a afinidade por Na⁺ parece ser, justamente pela vinculação com o transporte e a captação destes íons pelas brânquias.

Os valores de K_m para ATP medidos a concentração constante de Mg⁺² para a Na,K-ATPase das brânquias do *Callinectes sapidus* (Neufeld e cols, 1980) foi 0,2 mmol, para *Uca pugnax* (Holliday, 1985; Corotto & Holliday, 1996) foi 0,6 mmol, e

uma recente publicação destes comportamento cinético da Na,K-ATPase de *Callinectes danae* feita por nosso grupo revelou a presença de dois sítios para a ligação do ATP, um com alta afinidade ($K_m = 54$ nmol) e baixa afinidade ($K_m = 55 \mu mol$) (Masui e cols, 2008). E somando-se a este fato os valores de $K_{0,5}$ para o Mg⁺² estão compreendidos entre os valores de 3,1- 5,3 (Neufeld e cols, 1980; D'Orazio and Holliday, 1985), porém em contraste a estes resultados valores de $K_{0,5}$ para o Mg⁺² muito baixos já foram reportados, como exemplo temos o Km de 0,48 mM para o *Callinectes danae*. (Masui e cols, 2002).

Analisando-se os inibidores ouabaína, um inibidor específico para a Na,K-ATPase, e o vanadato, um inibidor clássico para as ATPases do tipo P, os dados mostram que a enzima de crustáceo é menos sensível à ouabaína, cerca de 100 vezes, quando comparada a enzima de mamíferos (Charnock & Simonson, 1977; Horiuchi, 1977). Quanto ao vanadato, os valores são bem diferentes, há inibição da Na,K-ATPase de *Carcinus maenas* em 1 μ M (Holleland and Towle, 1990) e em 11,2 μ M em *Calinectes danae* (Masui e cols, 2002), na enzima de vertebrados a inibição ocorre em valores na escala nanomolar (Skou and Esmann, 1992).

A Na,K-ATPase purificada, obtida de *Artemia salina* mostrou uma subunidade α que foi separada eletroforeticamente em uma banda que variava entre 95- 101 kDa e uma outra beta subunidade 38- 40 kDa (Peterson e cols, 1978). A enzima nativa é um tetrâmero composto por duas subunidades α s e duas subunidades betas com um peso molecular em torno de 274- 280 kDa (Peterson and Hokin, 1981). A terceira subunidade da Na,K-ATPase, o componente γ ainda não foi descrito como uma subunidade associada com a enzima das brânquias de crustáceo.

O modelo estrutural da Na,K-ATPase de *Artemia* foi seqüenciada por Baxter-Lowe (1989) sugere dois grupos de quatro domínio hidrofóbicos (M1-M4 e M5-M8) separados por um largo domínio citoplasmático que contem o sítio de ligação de ATP e fosforilação; sendo que sete alças transmembranares mostraram uma alta homologia com a seqüência de outras subunidades α de outras espécies (Towle e cols, 2001), sendo que a similaridade da enzima de crustáceo em especial a do siri *Callinectes* está mais intimamente relacionada a isoforma da subunidade α 3 (Pressley, 1992). De um modo geral a subunidade α da Na,K-ATPase é altamente conservada entre as espécies. A seqüência de aminoácidos da subunidade α de Callinectes e 71- 74% idêntica a isoformas de aves, e 94% idênticas a seqüência de *Homarus* (Towle e cols, 2001).

Os dados referentes à subunidade beta mostram que até o presente momento somente uma isoforma foi encontrada. A subunidade β de *Artemia* é homóloga à de vertebrados em seu único domínio transmembranar e carboxi terminal (Bhattacharya e cols, 1990). Experimentos de desenvolvimento de camarões mostraram que ocorre um acúmulo do RNAm da subunidade β e da proteína transcrita nas glândulas de sal entre 24 e 36 horas, e também um aumento em 48h na mucosa do estômago (Sun e cols, 1992).

2- Objetivos

A manutenção da osmolalidade da hemolinfa dos crustáceos é devido à Na,K-ATPase e o mecanismo de adaptação sugere que a resposta dos crustáceos deve envolver uma rápida ativação do transporte de íons que deve ser primária a qualquer outra resposta fisiológica deste animal. Porém devido a uma série de transportadores, que juntamente com a Na,K-ATPase, estão envolvidos na captação de NaCl através das brânquias (Towle, 1990) fica um pouco difícil atribuir somente a esta enzima um aumento no transporte de íons durante a aclimatação.

Deste modo resolvemos estudar a (1) possível existência de um regulador endógeno da Na,K-ATPase das brânquias do siri eurialino *C. danae*; (2) o efeito que a adição do FXYD2 exógeno teria na atividade da Na,K-ATPase de *C. danae*; (3) investigar a fosforilação por ATP e as características cinéticas deste sítio na enzima de *C. danae*; (4) estudo dos efeitos da poliaminana Na,K-ATPase e na regulação por NH⁺₄; (5) o efeito do hormônio juvenil e (6) estudar o efeito do Mg⁺² no sítio do NH⁺₄ da enzima de *C. danae*. 3 - Materiais e Métodos

3.1 - Reagentes:

Os reagentes utilizados neste trabalho foram do mais alto grau de pureza possível. Ouabaína, Na-ATP, e Alameticina e o Hormônio juvenil de Inseto foram obtidos da Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo, EUA.

O [32 P]P_i foi proveniente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. As enzimas utilizadas na marcação do [γ - 32 P]ATP foram obtidas da Boehringer Mannhein, Alemenha. Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água deionizada (sistema Milli-Q).

3.2 - Dissecção das brânquias

Siris adultos da espécie *Callinectes danae* foram coletados na baia de Ubatuba, São Paulo – Brasil. Os caranguejos foram então transportados para o laboratório, e mantidos em tanques contendo água do mar aerada (33 %o de salinidade, 25 °C) por 2-7 dias e alimentados em dias alternados. Os caranguejos foram então pesados, tendo em média 82,6 \pm 17,3 gramas enquanto que o tamanho da carapaça foi de 6,0 \pm 5,65 cm. Para cada homogenato preparado 5-8 caranguejos foram anestesiados por resfriamento a – 20°C, então a carapaça foi retirada rapidamente e os animais foram sacrificados. Os pares 6, 7 e 8 de brânquias posteriores foram rapidamente excisados e colocados em tampão gelado contendo 20 mM de imidazol a pH 6,8, 250 mM de sacarose, 6 mM de EDTA e um coquetel de inibidores de proteases (benzamidina 1 mM, antipaína 5µM, leupeptina 5µM, pepstatina A 1µM, PMSF (phenil-methyl-sulphonyl fluoride) 5µM).

3.3 - Preparação da fração microssomal de brânquias

As brânquias foram rapidamente transferidas e homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 ml/ grama de tecido), usando-se um homogeneizador. Após a
centrifugação do extrato cru, a 20.000g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado, e o pellet foi ressuspendido em um volume igual do tampão de homogeneização. Após uma nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores, os dois sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 100000g por 2 horas, a 4°C. O pellet foi homogeneizado em um tampão contendo 20 mM de imidazol (pH 6,8) e 250 mM de sacarose. Imediatamente, alíquotas contendo 500 µl foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a – 20 °C. Nenhuma perda de atividade foi notada após 2 meses de armazenamento.

3.4- Síntese do [γ-³²P] ATP

O ATP radioativo foi sintetizado através de uma seqüência de reações enzimáticas, envolvendo algumas enzimas da via glicolítica, descrita por Maia e cols. (1983) e purificado através de cromatografia em microcoluna (0.5 cm x 1 cm) de resina DOWEX - AG-100, (trocadora de ânions). Na coluna, o fosfato radioativo não incorporado, além de cátions indesejáveis, são removidos por lavagens sucessivas com água e 20 mM de HCl. Logo após, é realizada uma eluição específica do ATP marcado com 0,25 M de HCl, e as amostras são neutralizadas, em banho de gelo, pela adição de aproximadamente 10% do volume total do eluído com Mes-Tris 50mM (pH 6,0), corrigindo-se o pH final com Tris-base até pH 7,0 para posterior uso. Os índices de Pi contaminante observados após o procedimento de marcação do ATP estiveram abaixo de um limite de 1-2 %.

3.5 - Atividade Na,K-ATPásica.

A atividade Na,K-ATPásica foi ensaiada através da determinação da velocidade de liberação do [³²P]Pi proveniente do [γ -³²P]ATP. A atividade máxima da enzima

(5µg) foi medida em um volume final de 500 µl de um meio contendo BTP-HCl (pH 7,5) 50 mM, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM. A reação foi realizada a 25 °C por 40 minutos, sendo iniciada pela adição do ATP (2 mM) com 1 x 10⁶ cpm/ml do [γ -³²P]ATP. A seguir a reação foi parada pela adição de 90 µl de PCA 1M, os tubos foram colocados em gelo, e nestes foram adicionados 1 ml de água gelada e 400µl de carvão ativado em HCl 0,1 M. Os tubos foram então centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos, e 500 µl do sobrenadante foram aliquotados em papel de filtro. O [³²P]Pi liberado foi quantificado por cintilação líquida. A atividade específica da Na,K-ATPase inibível pela ouabaína foi equivalente a 90% da atividade total.

3.6 - Extração do FXYD2

A preparação é obtida conforme descrito em Fontes e cols. (1999). A Na⁺,K⁺-ATPase (cerca de 900 μ g) da medula renal de porco é adicionada sob agitação vigorosa, a uma mistura (%, v/v) de 46% metanol, 46% clorofórmio e 8% de 750 mM NH₄HCO₃ (pH 7,4) que depois é centrifugado a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante (que contém o FXYD2) é retirado e seco em alguns minutos utilizando-se um banho de bloco a 37⁰ C, sob vapor de N₂.

3.7 - Método para isolar o FXYD2 fosforilado por cinases

Para utilizar FXYD2 fosforilado isolado, a enzima purificada de medula renal de porco (900μg) foi preincubada por 5 minutos com os ativadores e/ou inibidores de proteínas cinases A e C, e o tempo de fosforilação foi de 60 minutos a 27°C. Posteriormente, esta enzima fosforilada foi submetida ao tratamento com metanol e clorofórmio conforme descrito por Fontes e cols. (1999). Os meio de reação para fosforilação pelas proteínas cinases foram: <u>Fosforilação do FXYD2 por PKA e PKC</u>:

KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Hepes 20 mM PH 7,4, fosfatidilserina 80 μg/ml, PMA 100 nM, dibutiril AMPc 0,5 mM, Triton X-100 0,05%, ATP 100 μM. <u>Fosforilação do FXYD2 por PKA</u>: KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl2 10 mM, DTT 1 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, dibutiril-AMPc 0,5 mM, triton X-100 0,05%, Queletrina 3,6 μM, ATP 100μM. <u>Fosforilação do FXYD2 por PKC</u>: KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl2 10 mM, DTT 1 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, fosfatidilserina 80 μg/ml, PMA 100 nM, H-89 200 nM, ATP 100 μM.

3.8 – Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade Na,K-ATPásica.

A Na,K- ATPase foi incubada na presença de volumes variados, ou fixos, de subunidade γ durante 15 minutos e a seguir a reação de hidrólise, foi medida conforme o descrito anteriormente.

3.9 - Fosforilação por Proteína Cinase A

A fosforilação da Na,K-ATPase da preparação de brânquias de caranguejos foi ensaiada através da incorporação do [32 P]Pi proveniente do [γ - 32 P]ATP. Para isto a enzima foi incubada no meio de reação contendo Hepes-KOH (pH 7,4) 20 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM e Triton X-100 0.005%, e os ativadores para a PKA, Dibutiril AMPc (em concentrações variáveis) e o inibidor H-89 10 nM. Após 15 minutos de incubação a reação foi disparada pela adição do ATP (100 μ M) juntamente com o [γ - 32 P]ATP (2000-4000 cpm/pmol), e depois de 1 hora a 25°C a reação foi interrompida com a adição do tampão de amostra - Tris (pH 6,8) 125 mM, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol. A seguir as amostras foram aplicadas em um gel SDS de gradiente 4- 20% e a eletroforese foi então realizada a 30 mA. Ao

término da corrida o gel foi corado e exposto durante 36 horas em um cassete. E depois scaneado pelo Phosphoimager STORM (Molecular Dynamics).

3.10 – Pré-incubação da Na,K-ATPase com o Hormônio Juvenil de Inseto

A Na,K-ATPase das brânquias do siri foi pré-incubada com concentrações crescentes ou fixa de hormônio juvenil em meios distintos. Para o Meio reacional para PKC foi utilizado Hepes-KOH (pH 7,4) 20 mM, EGTA 1 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, fosfatidilserina 80 μg/ml, ATP 100 μM e o inibidor Cloreto de Queleretrina. Para o meio PKA foi utilizado o sistema composto por Hepes-KOH (pH 7,4) 20 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM e Triton X-100 0.005%, ATP 100 μM. Independente do meio reacional utilizado o tempo de pré-incubação foi de 15 minutos. A seguir a atividade enzimática foi ensaiada conforme o descrito anteriormente.

3.11 Medida do nível de EP da Na,K-ATPase das brânquias de Callinectes dane

A fosforilação foi realizada conforme o descrito em Fontes e cols 1999. A reação foi iniciada com a adição de 20 μ g da Na,K-ATPase a 0,2 mL do meio de reação contendo concentrações crescentes de ATP/ATP- γ -P³² (8 x 10⁵ com/ nmol), BTP 20 50 mM, MgCl ₂ 3mM, albumina 20 μ g. O efeito do Na⁺ na fosforilação da enzima foi testada em 50 e 100 mM. A reação foi realizada a 25 °C por 60 segundos, e foi parada com a adição de 0,2 mL da solução PPP (ácido perclórico 125 mM, pirofosfato 5 mM e ácido fosfórico 5 mM). O intermediário fosforilado estável a pH ácido formado foi filtrado em Millipore HAWP- 245 usando o sitema a vacuo de Hoefer. Os filtros foram lavados 2 vezes com a solução PPP e então por mais 4 vezes com a solução ácido perclórico 50 mM, pirofosfato 5 mM e ácido fosfórico 5 mM. Os filtros foram secos e a

3.12 - Fosforilação e Isolamento da fosfoenzima (EP) por Eletroforese

porém a ezima foi previamente desnaturada com a solução PPP.

A fosforilação da enzima (5µg) foi feita a 4°C em meio de reação contendo BTP-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, ATP 20 µM, concentrações variáveis de NaCl e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) – quando requeridas. A reação foi iniciada com a adição da $[\gamma-^{32}P]ATP$ (1 x 10⁸ cpm/µmol) e após 20 segundos a mesma foi interrompida com a adição de uma solução de TCA (7%, p/V). O pellet foi então centrifugado a 7000g x 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e a seguir o mesmo pellet foi lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo que este último procedimento foi repetido por mais de uma vez. A seguir o pellet foi dissolvido em 40 µl de tampão de amostra contendo Tris-HCl (pH 6,5) 150 mM, SDS 5%, DTT 5%, glicerol 10% v/v e azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada a pH 6.3, em um gel de gradiente contínuo (4 - 20%). Uma solução contendo acrilamida 20%, bis- acrilamida 0,4%, Tampão fosfato (pH 6.3) 0,1 M, SDS (0,1%), TEMED (0,06%) e persulfato de amônio (0,05%); que foi progressivamente misturada a uma solução de mesma composição exceto que foi utilizado acrilamida 4%, bis-acrilamida 0.08%, TEMED 0.12%, foram usadas para formar o gradiente contínuo. O tampão de corrida utilizado foi elaborado pela adição de SDS 0,1 M ao Tampão fosfato (pH 6.3) 0,1M. A migração da amostra foi realizada a 60 mA (ECHARTE e cols, 2001) Após o término da corrida, o gel foi corado, seco e exposto a uma placa intensificadora do programa STORM, aparelho Phosphoimager.

3. 13 - Western- Blot da Na,K-ATPase das brânquias de C. danae

O western blot foi realizado de acordo com o descrito em Fontes e cols, 1999; usando-se anticorpo contra a subunidade α 1 de rim de cachorro ou galinha (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) junto com o marcador de peso molecular ((β -galactosidase, 110 kDa; albumina bovina, 66 kDa; albumina de ovo, 45 kDa and superoxido dismutase, 16.3 kDa).

3. 14 - Análise dos dados

Os programas utilizados para o tratamento das curvas foram o Enzyne Kinetics Analysis (Sigma Plot 8.0) e Sigraf (para as figuras 15 e 16), a equação utilizada foi de Michaelis-Menten ligeiramente modificada. As curvas foram ajustadas usando a equação de Michaelis-Menten modificada (n=($V_{max1}[S]/K_{m1} + [S]$) + ($V_{max2}[S]/K_{m2} + [S]$), considerando 2 sítios de ligação para ATP.

4 - Resultados

4.1 - Regulação do sítio de ATP da Na, K-ATPase das brânquias de C. danae por Na⁺.

A Na,K-ATPase do siri *C. danae*, assim como a enzima de mamíferos, apresenta uma curva sgmoidal para a sua atividade ATPásica estimulada por ATP, porém esta curva não é observada para a enzima dos crustáceos até agora descritas na literatura (Corroto & Holyday, 1996; Neufeld e cols, 1980; Holliday, 1985; D'Orazio & Holliday, 1985; Peterson e cols, 1978). Para compreendermos e identificarmos esta caraceterística presente na Na,K-ATPase deste siri, avaliamos a formação do intermediário fosforilado (EP) desta enzima.

Como pode ser observado na figura 12 à medida que aumentamos a concentração de Na⁺ o aparecimento de uma enzima fosforilada pode ser observada, e utilizando a técnica de *western blot* identificamos esta banda como sendo a Na,K-ATPase. Avaliamos também a auto fosforilação da enzima na presença de diferentes concentrações ATP- γ P³², porém em dois meios de reações distintos um com 50 mM de NaCl e outro com 100 mM de NaCl. Na figura 14 podemos observar que na presença de 100 mM de NaCl, e na ausência de K⁺, os sítios de alta e baixa afinidade são observados, similar ao que ocorre com a hidrólise de ATP (ver figura 13), o sítio de alta afinidade corresponde a quase 19% do total de enzima fosforilada. Todavia, na presença de 50 mM de NaCl os sítios de alta afinidade correspondem a apenas 9,3%.



Figura 12: Dependência do Na⁺ na fosforilação por ATP da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*. A fração microsomal foi fosforilada no meio de reação padrão, com concentraçoes crescentes de Na⁺ na ausência de K⁺. Linhas 1 e 2 western-blotting para a subunidade α da Na,K-ATPase de *C. danae*. Linha 3 a 9 radiografia da enzima fosforilada. Linha 3: sem Na⁺, 4- 1 mM de Na⁺; 5- 3 mM de Na⁺; 6- 5 mM de Na⁺; 7- 7 mM de Na⁺; 8- 10 mM de Na⁺ e 9- 50 mM de Na⁺.



Figura 13: Medida da Atividade ATPásica em função de ATP em diferentes concentrações de Na⁺. A Na,K-ATPase foi incubada em diferentes concentrações de Na⁺ a saber : (\blacksquare)10 mM, (\square)20 mM, (\bigcirc)30 mM, (\bigcirc)50 mM e (\blacklozenge)100 mM e a seguir mediu-se a sua atividade em função da concentração de ATP. Painel B: atividade no sítio de alta afinidade. Painel C: atividade no sítio de baixa afinidade (Masui, D. C. Tese de Doutorado).



Figura 14: Fosforilação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae.* A preparação das brânquias de *C. danae* foi fosforilada com diferentes concentrações de ATP em meio reacional contendo BTP-HCl 0,5 M, MgCl₂ 3 mM, e duas concentrações distintas de Na⁺, 100 mM (painel maior) e 50 mM (painel menor inserido). Os procedimentos experimentais podem ser vistos em Materiais e Métodos.

A regulação da Na,K-ATPase em crustáceos eurialinos é de vital importância para estes animais, pois esta enzima é a responsável por manter um sistema de transporte de íons Na⁺ localizado na superfície apical das brânquias dos animais eurialinos. Apesar de uma extensa literatura envolvendo esta enzima em crustáceo, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos que regulam a sua atividade durante a aclimatação dos crustáceos; porém, algumas substâncias foram implicadas nesta função, tias como: poliaminas (Silva e cols, 2008, Lovett & Watts, 1995), metil farnesoato (Lovett e cols, 2001), AMPc (Lucu & Flik, 1995) entre outros. Deste modo assim como ocorre com a Na,K-ATPase renal de mamíferos resolvemos estudar se a enzima de crustáceo poderia ser regulada por um peptídeo da família FXYD (como a subunidade γ da Na,K-ATPase renal).

A figura 15 mostra a incubação da preparação microsomal da Na,K-ATPase das brânquias do siri eurialino *C. danae* com o anticorpo anti γ C33, que reconhece a porção C- terminal do FXYD2, apresentou uma marcação positiva para a presença de uma subunidade γ na preparação, e assim como o observado em mamíferos a sua identificação apresentou-se como duas bandas distintas (Mercer e cols, 1993), uma de peso molecular maior (γ a) e uma de peso molecular menor (γ b). E, acrescentado-se a este dado, assim como a subunidade α da Na,K-ATPase de *C. danae*, o proteolipídeo identificado por nós foi fosforilado pela proteína cinase A (PKA), pois como pode ser visto na figura 16, à medida que aumentamos a concentração de DbAMPc, um análogo de AMPc, um aumento do sinal, proveniente da fosforilação do proteolipídeo, foi observado.

A ação que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina teriam sobre a atividade da enzima foi caracterizada por nosso grupo (Silva e cols, 2008). A inibição

que estes policátions exerceriam na atividade da enzima estaria relacionada à sua carga, ao seu tamanho, e ao fato de que a ligação destas substâncias à Na,K-ATPase causaria um acúmulo do intermediário fosforilado na forma E1, retardando o ciclo catalítico da enzima. Contudo, curiosamente ao fosforilarmos a Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* com diferentes poliaminas e em 10 ou 100 mM de NaCl (figura 17) observamos que os poços nos quais temos as poliaminas espermidina e espermina ocorre o aparecimento de uma banda de baixo peso molecular que encontra-se intensamente fosforilada, e na mesma posição observada para a subunidade γ da enzima de medula renal de porco (Cortes e cols, 2006)



Figura 15: Western blot da Na,K-ATPase da fração microssomal das brânquias de *Callinectes danae* :A Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* foi aplicada em um gel de SDS 10 % e ao término da corrida a proteína foi transferida para uma membrana de PVDF e tratada com o anticorpo específico para a subunidade γ renal de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Poços 1: subunidade γ da Na,K-ATPase de rim de porco; 2: Na,K-ATPase renal (5 µg); 3: Na,K-ATPase de *C. danae* (30µg); 4: da Na,K-ATPase de *C. danae* (20µg) e 5: Na,K-ATPase de *C. danae* (5 µg). A seta indica a presença do FXYD2.



Figura 16: Fosforilação por PKA do proteolipídeo presente na preparação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*. A enzima da preparação das brânquias de *C. danae* foi incubada em um meio específico para a ativação da proteína cinase A, conforme o descrito em Materiais e Métodos, na presença de diferentes concentrações de dibutiril AMPc (ativador da PKA), e uma concentração fixa de 200 nM de H-89 (inibidor da PKA). Poços: 1- 5 mM de DbAMPc; 2 – 5 mM de DbAMPc + H-89; 3- 2 mM de DbAMP+ H-89; 4 – 2 mM de DbAMPc; 5 –1 mM de DbAMPc; 6 –1 mM de DbAMPc + H-89; 7- 0,5 mM de DbAMPc e 8: 0,5 mM de DbAMPc + H-89. A seta indica a presença do FXYD2 fosforilado por PKA.



Figura 17: Fosforilação da Na,K-ATPase por Na⁺ na presença de poliaminas: A preparação de membranas de brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi fosforilada por ATP na presença das poliaminas putrescina, espermina e espermidina em dois meios de reações diferentes, um com 10 mM de Na⁺ e outro com 100 mM de Na⁺. Da esquerda para a direita temos que: Poços 1, 3, 5 e 7 meio de fosforilação com 10 mM de Na⁺, sendo respectivamente os pontos controle, putrescina (10 mM), espermidina (2mM) e espermina (2 mM). Os poços 2, 4, 6 e 8 contêm o meio de reação com 100 mM de Na⁺, e representam respectivamente, o controle, putrescina (10 mM), espermidina (2 mM) e espermina (2 mM).A seta indica a presença do FXYD2 fosforilado.

4.3 - Estudos da adição da subunidade γ (FXYD2) exógena a Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*.

Para compreendermos o efeito que o FXYD2 causaria na Na,K-ATPase de *C. danae* resolvemos estudar a sua adição, proveniente da preparação da Na,K-ATPase renal, na atividade ATPásica da enzima deste crustáceo. Na figura 18 podemos observar que à medida que incubamos a enzima com volumes crescentes de subunidade γ ocorre um estímulo da atividade da enzima de crustáceo (controle: 100 nmol/min/mg), sendo que um efeito máximo foi alcançado com 10 µl do proteolipídeo γ para 10 µl de Na,K-ATPase de *C. danae*; e para comprovar que o efeito desta ativação era devido as interações entre a Na,K-ATPase e a subunidade γ , realizamos experimentos utilizando a mesma técnica para a extração do FXYD2 da Na,K-ATPase de rim de porco, porém utilizamos uma preparação da Na,K-ATPase do cortex renal, que não contem o FXYD2 associado à enzima; e a preparação de membrana de eritrócitos anucleados conhecida pelo nome de "ghost", além do tampão de diluição do FXYD2 exógeno e do Anticorpo C γ 33, e como pode ser visto na figura 19 nenhuma estimulação da NA,K-ATPase das brânquias de *C. danae* foi observada (comparar figura 18 com a 19).

Com o intuito de identificar a natureza da ativação da Na,K-ATPase de *C. danae* incubada com a subunidade γ exógena realizamos experimentos para medirmos os parâmetros característicos desta enzima, tais como: afinidade por Na⁺, K⁺ entre outros. Na figura 20 observamos que a pré-incubação da enzima com o FXYD2, numa proporção de 1:1 (vol/vol), e a posterior medida da atividade ATPásica estimulada por íons Na⁺, demonstrou que a enzima incubada com o proteolipídeo γ teve um aumento na sua velocidade máxima, sem sofrer qualquer alteração na sua afinidade para este íon (Tabela 1). Todavia, ao estudamos o efeito que a subunidade γ causaria na estimulação por K⁺ da Na,K-ATPase de *C. danae*, foi observado um aumento na velocidade máxima da enzima com uma posterior mudança nos valores de K_{0,5} para o K⁺ da enzima (Figura 21 e Tabela 1). E ao avaliarmos o efeito que a subunidade γ causaria na estimulação da enzima para ATP, nossos resultados apontam que a enzima apresenta uma discreta mudança no valor de K_m, e um aumento na velocidade na hidrólise do ATP (figura 22 e tabela 1).

Uma vez que identificamos a presença de um proteolipídeo na Na,K-ATPase de *C. danae*, e que o mesmo foi fosforilado por PKA resolvemos testar o efeito que a subunidade γ fosforilada por PKA ou PKC teria na atividade da enzima. Na figura 23 observamos que a subunidade γ fosforilada por PKA foi capaz de estimular a atividade da enzima em torno de 80%, um valor duas vezes maior quando a subunidade não está fosforilada, todavia, no que diz respeito a subunidade γ fosforilada pela PKC observamos um estímulo discreto na atividade da enzima (figura 24).



Figura 18: Efeito da subunidade γ exógena na atividade da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*. A enzima foi incubada com volumes crescentes de subunidade γ por 20 minutos e a seguir atividade Na,K-ATPásica foi ensaiada em um meio de reação contendo: BTP-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 100 mM, KCl 10 mM e MgCl₂ 3 mM. A atividade foi disparada com a adição de ATP 2 mM conforme o descrito em Materiais e Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos.



Figura 19: Efeitos do Tampão e fosfolipídeos na estimulação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*: A enzima foi incubada com as substâncias indicadas no gráfico, sendo que os volumes utilizados foram: 20 μ L para o tampão BTP-HCl 0,5 M pH 7,5, 20 μ L para a extração de ghosts e 40 μ L para a extração da Na,K-ATPase de cortex renal e 10 μ L do anticorpo anti γ C33. Os procedimentos do experimentais são idênticos ao realizado na figura 18. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos.



Figura 20: Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae* estimulada por Sódio. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com a subunidade γ na razão de 1:1 (vol. de enzima/ vol. de FXYD2) por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no seguinte meio de reação descrito na figura 18, porém com diferentes concentrações de NaCl. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno



Figura 21: Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae* estimulada por Potássio. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com o FXYD2 por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no seguinte meio de reação descrito na figura 18, porém com diferentes concentrações de KCl. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 5 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno



Figura 22: Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae* estimulada por ATP. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com o FXYD2 por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no seguinte meio de reação descrito na figura 18, porém diferente do experimento da figura 20, a reação foi iniciada com concentrações variáveis de ATP. O tempo de reação foi distinto para cada concentração de ATP utilizada, e ao fim do período estabelecido o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da Na,K-ATPase. Os dados experimentais foram quantificados utilizando o programa SigmaPlot para Windows 8.0. Os dados representam as médias dos experimentos, realizados em duplicatas. Estes dados foram obtidos a partir da análise da figuras 20, 21 e 22.

	Controle	Subunidade γ exógena	
Na ⁺ (mM)			
	V_{max} 117,23 ± 4,36	V_{max} 162,49 ± 5,58	
	$K_{0,5} \qquad 6,25 \pm 0,3087$	$K_{0,5}$ 5,91 ± 0,5709	
	$n_{\rm H}$ 1,904 ± 0,1642	$n_{\rm H}$ 1.498 ± 0,176	
K ⁺ (mM)			
	V_{max} 132,0 ± 8,5	V_{max} 184,34 ± 5,5	
	$K_{0,5}$ 1,98 ± 0,087	$K_{0,5}$ 0,9 ± 0,10	
	$n_{\rm H}$ 0,71 ± 0,09	$n_{\rm H}$ 1,05 ± 0,09	
ATP (µM)			
	V_{max} 125,16 ± 5,2	V_{max} 162,19 ± 7,4	
	K_m 55 ± 4,3	K_m 35 ± 5,8	

V_{max}= nmolPi./min/mg



Figura 23: Efeito da Subunidade γ exógena fosforilada por PKA na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae*. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com diferentes volumes da subunidade γ fosforilada por PKA por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no meio de reação descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 3 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno. Velocidade do ponto controle: 110 nmol Pi/min/mg.



Figura 24: Efeito da Subunidade γ exógena fosforilada por PKC na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae*. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com diferentes volumes da subunidade γ fosforilada por PKC por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no seguinte meio de reação descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 3 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno. Velocidade do ponto controle: 107 nmol Pi/min/mg

4.4 - Efeito do Hormônio Juvenil de Inseto na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*.

Lovett e cols (2002) demonstraram que a aclimatação do siri *Carcinus maenas* em meio com salinidade baixa causava um aumento de 5 a 10 vezes na produção do metil farnesoato, que foi detectado na hemolinfa destes animais, porém uma relação direta entre o acúmulo deste hormônio e a regulação da Na,K-ATPase dos crustáceos não foi evidenciada até o momento.

Na figura 25 podemos observar que a pré-incubação da Na,K-ATPase com concentrações crescentes de hormônio juvenil III não resultou em nenhum efeito, e o mesmo resultado foi obtido quando utilizamos um meio de estimulação para a PKA durante a pré-incubação (figura 26), todavia, quando o meio de PKC foi adicionado ao hormônio e a enzima observou-se a inibição da atividade Na,K-ATPásica em torno de 40%, sendo que este efeito foi observado com 100 nM de hormônio, porém em concentrações maiores de hormônio_ 500 nM_ nenhuma inibição foi observada (figura 27).

Para comprovarmos se o efeito do hormônio era devido a PKC, ou a um componente do meio de reação, realizamos o mesmo experimento da figura 28, porém com duas concentrações distintas de hormônio, na presença do inibidor para PKC, a queleretrina. Como podemos observar na figura 28 a incubação do inibidor da PKC no meio de pré-incubação reverteu o efeito inibitório do hormônio revelando que o efeito foi realmente devido à ativação da PKC endógena.



Figura 25: Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae.* A Na,K-ATPase foi incubada em concentrações distintas de hormônio juvenil por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no meio de reação descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam a média e o erro padrão de 3 experimentos.



Figura 26: Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* incubada no meio de ativação da proteína cinase A. A Na,K-ATPase foi incubada em concentrações distintas de hormônio juvenil em um meio para o estímulo da atividade da PKA por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no meio de reçaão descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 3 experimentos distintos.



Figura 27: Efeito do Hormônio juvenil na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* incubada com o meio de ativação da proteína cinase C. A Na,K-ATPase foi incubada em concentrações distintas de hormônio juvenil em um meio para o estímulo da atividade da PKC por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no meio de reação descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos.



Figura 28: Efeito do inibidor para PKC na inibição provocada pelo Hormônio juvenil na Na,K-ATPase de *C. danae.* **A Na,K-ATPase foi incubada em concentrações distintas de hormônio juvenil em um meio para o estímulo da atividade da PKC, na presença ou ausência de queleletrina (QLT) (800 nM), ou DMSO por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaiada no meio de reação descrito na figura 18. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos.**

4.5 - Regulação do sítio de NH⁺₄ da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* por FXYD2, Mg⁺² e espermidina.

Diferente de outras preparações de Na,K-ATPase até agora descrita na literatura, a enzima de crustáceo possui um sítio para o transporte do íon NH⁺₄, que aparece quando a enzima esta com os sítios de K⁺ totalmente saturados (Masui e cols, 2002); e como resultado temos um sinergismo entre estes cátions que resulta em um estímulo em torno de 50% da atividade da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*. Deste modo resolvemos estudar o efeito que a adição da subunidade γ exógena causaria na estimulação por íons NH⁺₄ na Na,K-ATPase deste crustáceo; e podemos notar que a presença deste proteolipídeo não causa um efeito somatório ao efeito do NH⁺₄, mas por outro lado, a enzima apresentou uma grande mudança na sua afinidade pelo NH⁺₄ quando incubada com o FXYD2 (Figura 29 e tabela 2).

A interação que existe entre a inibição que o íon Mg^{+2} e a poliamina espermidina exerceriam sobre a atividade da Na,K-ATPase estimulada por NH⁺₄ foi avaliada Na figura 30 podemos observar que em condições ótimas (ATP 2 mM, NaCl 100 mM e KCl 10 mM) o baixo nível de Mg^{+2} só atua ativando a enzima, e nestas condições o aumento da concentração de NH⁺₄ estimula a atividade da enzima. Pórem ao aumentarmos a concentração de Mg⁺² para 13 mM observamos um decréscimo na atividade máxima da Na,K-ATPase; sugerindo que a enzima de *C. danae*, assim como a de mamíferos, possui um sítio no qual os íons Mg^{+2} exercem um efeito inibitório (Fontes e cols, 1992). E de certo modo a ocupação deste sítio regula a estimulação da enzima por NH⁺₄, pois ocorre um deslocamento do NH⁺₄ de seu sítio. E podemos observar um aumento no K_{0,5} para a estimulação por NH⁺₄ (anexo da figura 30). Este antagonismo entre os íons Mg⁺² e NH⁺₄ na regulação da atividade da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* pode ser observado na tabela 3. A figura 31 descreve a incubação da enzima com a espermidina (uma poliamina), podemos notar uma inibição em torno de 30% do efeito do amônio na enzima na presença da poliamina, porém esta inibição possui um valor constante (anexo da figura 16), e não altera a afinidade da enzima pelo cátion em estudo (NH⁺₄), afetando apenas a velocidade máxima da relação de hidrólise. Portanto sugerindo que as poliaminas espemidina atue estabilizando uma conformação da enzima que não interage com os íons NH⁺4, é como se a poliamina seleciona-se uma conformação que simplesmente não interage com o NH⁺₄, por isso a afinidade observada é a mesma, mas para uma população de enzima menor.



Figura 29: Efeito da Subunidade γ exógena na Atividade da Na,K-ATPase de *C. danae* estimulada por Amônio. A preparação das brânquias de *C. danae* contendo a Na,K-ATPase foi incubada com o FXYD2 por 20 minutos. A seguir a atividade da enzima foi ensaida no seguinte meio de reção descrito na figura 18, porém a enzima foi novamente pré-incubada em diferentes concentrações de NH₄Cl. O tempo de reação foi de 40 minutos e ao fim deste período o conteúdo de ATP hidrolisado pela enzima foi medido conforme o descrito em Materiais de Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 3 experimentos distintos. Símbolos (•) controle (\circ) FXYD2 exógeno.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da Na,K-ATPase estimulada por íons NH⁺₄**.** Os dados experimentais foram quantificados utilizando o programa SigmaPlot para Windows 8.0. Os dados representam as médias dos experimentos, realizados em

		Controle	Subunidade γ exógena	
$\mathrm{NH}_{4}^{+}(\mathrm{mM})$				
	V_{max}	196,6 ± 3,63	V_{max}	175,7 ± 2,589
	K _{0,5}	9,62 ± 1,01	K _{0,5}	$1,\!09\pm0,\!78$
	n_{H}	$1,1 \pm 0,154$	n_{H}	$2,\!32\pm0,\!156$

duplicatas Estes dados foram obtidos a partir da análise da figura 29.

V_{max}= nmolPi./min/mg



[MgCl₂] (M)

1

2

U.mg⁻¹

Fig 30: Estimulação da Na,K-ATPase de *C. danae* por NH⁺₄ e Mg⁺². A Na,K-ATPase de *C. danae* foi incubada em um meio reacional contendo BTP-HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 100 mM, KCl 10 mM com três concentrações distintas de Mg⁺², (•) 0,5 mM (•) 3 mM e (•) 13 mM. A atividade foi disparada com a adição de ATP 2 mM . e a estimulação por íons NH⁺₄ na atividade Na,K-ATPasica foi ensaida conforme o descrito em Materiais e Métodos. As barras representam o erro padrão da média de 4 experimentos distintos. Painel pequeno superior representa a atividade máxima da enzima nas respectivas concentrações de Mg⁺². Painel pequeno inferior representa os valores de K_{0,5} e $n_{\rm H}$ da Na,K-ATPase de *C. danae* pra os íons NH⁺₄ nos meios com diferentes concentrações de Mg⁺².

-Log [NH₄CI] (M)

3

4
Tabela 3: Parâmetros cinéticos da estimulação dos íons NH_4^+ e Mg^{+2} na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*. Os dados experimentais foram quantificados utilizando o programa Sigraf. Os dados representam as médias de 5 experimentos. A tabela foi elaborada a partir da análise dos experimentos usados na figura 15.

$[NH_4] mM$	[Mg ⁺²]mM	V (nmol	$K_{0.5}(mM)$	<i>n</i> _H
		Pi/min/mg)		
0.1-100	0.5	525.7 ± 15.7	4.8 ± 0.1	1.3
0.1-100	3.0	451.8 ± 18.1	7.0 ± 0.3	0.8
0.1-100	13	386.8 ± 9.7	8.1 ± 0.2	0.9



Figura 31: Efeito da espermidina na estimulação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* por NH⁺₄. A Na,K-ATPase foi incubada por 20 minutos na (•) ausência ou (\circ) na presença de 2 mM de espermidina, e a seguir a atividade da enzima foi ensaiada em um meio de atividade padrão contendo: BTP-HCl 0,5 M, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM e concentrações crescentes de NH₄Cl sendo que a reação foi disparada com ATP (2 mM). O painel menor inserido na figura representa o percentual de inibição da espermidina em cada concentração de NH₄Cl a qual a enzima foi incubada. O dado aqui demonstrado representa a média de 3 experimentos distintos.

5 - Discussão

5.1 - O sítio de ATP da Na,K-ATPase.

A Na,K-ATPase descrita para os crustáceos apresenta em geral um único K_m ATP que varia de 0,6 a 2,5 mM (Lucu & Towle, 2003), todavia a enzima presente nas brânquias do siri *C. danae* apresenta dois sítios distintos, assim como a enzima de mamíferos, um de alta afinidade [(catalítico) 0,056 μ M] e um de baixa afinidade [(regulatório) 56 μ M] (figura 12). Masui e cols (2007) demonstraram um comportamento único para a enzima de *C. danae*, como pode ser observado na figura 13, onde a Na,K-ATPase apresenta um sítio de baixa afinidade somente quando a concentração de Na⁺ é alta (50 e 100 mM), mostrando que o nível de Na⁺ afeta de modo marcante a ligação e a utilização de ATP pelos sítios de baixa e alta afinidade da enzima.

Para confirmar este resultado, fosforilamos a enzima em duas concentrações de Na⁺ varrendo-se o ATP, e na presença de 100 mM podemos notar claramente que a enzima fosforilada exibe a presença de dois sítios para o ATP. O mesmo foi evidenciado em 50 mM de Na⁺; ainda que de uma forma sutil (Figura 14), pois os níveis de E-P em estado de equilíbrio desta condição são extremamente baixos.

A presença de dois sítios que ligam ATP na Na,K-ATPase é um tema ainda muito discutido. Patchornik e cols (2002), utilizando como ferramenta a proteólise da enzima com um sistema oxidativo catalisado por Fe⁺² propuseram que os dois domínios de ligação de ATP estão localizados na mesma subunidade α da enzima. Neste modelo o ATP liga-se na conformação E1 na presença de 3 íons Na⁺. O domínio citoplasmático que liga a molécula de adenosina (domínio N) inclina-se 80° em direção ao domínio de fosforilação (P) posicionando o fosfato gama da molécula de ATP próximo ao Aspartato (D369), capacitando a hidrólise do ATP e a formação da fosfoenzima. Na conformação E1Na3ATP ocorre uma interação entre os domínios N e P, e o domínio conhecido como atuador é deslocado para o lado e não se conecta ao domínio N e P.

Em contraste na conformação E2K2 o domínio A interage com as partes N e P da enzima, deste modo obstruindo a interação entre N e P. Assim, o ATP ligaria com baixa afinidade na conformação E2K2, com a molécula de adenosina ligada ao mesmo resíduo no domínio N e o fosfato gama distante do D369, e desta maneira incapaz de formar o intermediário fosforilado. Todavia devido a uma aparente falta de um segundo domínio para a ligação de ATP nos modelos estruturais da subunidade α (Hilge e cols, 2003; Patchornik e cols, 2002; Kubala 2006) implica-se que a enzima seria um oligômero. Porém em ambas as hipóteses o sítio de baixa afinidade por ATP possui uma função regulatória, devido a sua aparente incapacidade de formar fosfoenzima.

Até o momento um segundo K_m para a fosforilação na Na,K-ATPase só foi observado para a enzima de mamíferos na presença de pNPP (para nitro fenil fosfato), um inibidor exógeno não fisiológico da proteína que reage com a mesma na conformação E2; e atribui-se a formação da enzima como um tetrâmero gerando dois sítios de alta afinidade e dois de baixa afinidade- na ligação catalítica do ATP que ocorre na subunidade α - que interageriam de modo cooperativo (Tanoe e cols, 2006).

Diferente destes autores nossos resultados foram gerados usando-se o ATP, um substrato endógeno que induz a enzima ao estado E1. É possível que algum fator desconhecido presente na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* desmascare este segundo sítio de fosforilação. Até o presente momento este sítio só foi caracterizado na enzima de *C. danae*.

A presença dos dois sítios de ATP e a co-relação de que a sua presença dependea do nível de sódio; estabelece uma condição interessante para este crustáceo, pois torna a Na,K-ATPase uma enzima mais eficiente para a adaptação do siri *C. danae* do que em

outros crustáceos, pois naquele animal a enzima e capaz de exercer a sua função de modo eficaz utilizando-se de uma quantidade menor de ATP.

5.2 - A fosforilação da Na,K-ATPase por ATP na presença de poliaminas e PKA, e a identificação do FXYD2 e seus efeitos na atividade da Na,K-ATPase de *C. danae*.

Como podemos observar na figura 17 a fosforilação da Na,K-ATPase na presença de poliaminas revelou que uma banda de baixo peso molecular foi intensamente fosforilada. A presença deste achado em nosso estudo abre uma nova direção na ação que estas substâncias exerceriam na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*, pois elas não atuariam simplesmente inibindo a bomba por atuarem como um inibidor de cátions. As poliaminas são capazes de estimular proteínas cinases, tais como, MAPK e a tirosina cinase, logo os resultados acumulados por nós, dão indícios de que ocorre a ativação de alguma cinase endógena que fosforilaria esta pequena proteína. Curiosamente a estimulação ocorre com espermidina e espermina, e apresenta uma resposta diferenciada a presença da concentração de sódio, logo uma proteína cinase tal como a SAPK1 e/ou SAPK2 poderia estar envolvida neste processo (Kültz & Ávila, 2001). Uma posterior análise deve ser feita para clarificar as proteínas envolvidas, contudo o resultado obtido direciona as poliaminas a outra ação, que não a simples inibição da atividade da enzima.

A fosforilação da Na,K-ATPase pela PKA foi extensivamente demonstrada por vários autores (Therien & Blostein, 2000), mas os dados na literatura são conflitantes, uma vez que alguns grupos de pesquisadores mostraram que para que a enzima seja passível de fosforilação pela PKA; o meio de reação deverá conter obrigatoriamente Triton X-100, por isso uma concentração de 0,05% é usualmente utilizada para a exposição da serina 943 da Na,K-ATPase, resíduo alvo da PKA já que a mesma

encontra-se "escondida" nas proximidades da membrana plasmática (Feschenko & Sweadner, 1994). Todavia, Cortes e cols (2006) mostraram que a fosforilação da subunidade α e do FXYD2 da Na,K-ATPase de rim de porco pode ocorrer na ausência do detergente Triton X-100.

Apesar da enorme quantidade de dados que envolvem os efeitos dos hormônios e proteínas cinases na Na,K-ATPase de mamíferos, nenhum dado demonstrou a ação de proteínas cinases na Na,K-ATPase das brânquias de crustáceos. Deste modo, durante o Mestrado nós objetivamos estabelecer um protocolo para sabermos se a Na,K-ATPase de *C. danae* seria fosforilada pela PKA ou PKC, e os resultados obtidos mostraram que a enzima era fosforilada por uma PKA endógena, e também por uma PKC endógena; e sendo assim fomos o primeiro grupo a caracterizar a Na,K-ATPase das brânquias de crustáceos como um alvo de proteínas cinases (Silva, 2003).

Estabelecidas as condições necessárias para a fosforilação da Na,K-ATPase pelas cinases, resolvemos testar qual seria o efeito que a fosforilação por PKA causaria na enzima, uma vez que já havia sido demonstrado que durante o processo de aclimatação do crustáceo ocorria um aumento dos níveis de AMPc nas brânquias (Lohrmann & Kamemoto, 1987). Contudo, o experimento de fosforilação da enzima por PKA e a sua posterior medida da atividade enzimática não foi bem sucedido, uma vez que, a concentração de Triton X-100 utilizada no meio de pré-incubação, para a exposição da serina que é fosforilada pela PKA, provocou uma inativação da enzima. Desta forma, verificamos se a enzima poderia ser fosforilada na ausência deste detergente. Todavia, na ausência do detergente, não foi evidenciada a fosforilação da subunidade α da Na,K-ATPase, mas uma banda de baixo peso molecular apareceu por ser altamente responsiva ao tratamento por DbAMPc (Figura 16) Para identificarmos a natureza desta pequena banda, analisamos a preparação microssomal das brânquias de *C*.dana*e* utilizando o anticorpo anti- γ C33, que reconhece uma seqüência de 10 aminoácidos localizados no carboxi-terminal da subunidade γ , e o resultado deste experimento foi a presença de uma marcação no componente de baixo peso molecular presente na preparação (figura 15); e não obstante a banda reconhecida pelo anticorpo encontrava-se na mesma posição da banda de baixo peso molecular que havia sido fosforilada pela PKA, evidenciando que a Na,K-ATPase das brânquias do siri eurialino *C. danae* possui um FXYD, provavelmente um análogo ao FXYD2, e que o mesmo foi fosforilado por uma PKA endógena. Considerando a especificidade deste anticorpo em reagir somente com a subunidade γ a (FXYD2), podemos então concluir que a Na,K-ATPase de *C. danae* está associada à uma subunidade γ , sendo esta a primeira vez que a referida subunidade foi encontrada em invertebrados.

5.3 - Adição do FXYD2 da Na,K-ATPase renal à Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* e seus efeitos na atividade da enzima de crustáceos.

Realizar a extração do FXYD2 partindo-se da preparação da enzima de *C. danae* é um pouco difícil, uma vez que a Na,K-ATPase que está presente na preparação microssomal apresenta-se em pouca quantidade, apesar da enzima responder a 90% do total de toda atividade ATPásica encontrada na preparação; logo a extração deste FXYD2 por protocolo descrito por Fontes e cols 1999 torna-se inviável, uma vez que o sistema clorofórmio : metanol seria perturbado pela grande quantidade de líquido proveniente da preparação microssomal das brânquias de *C. danae* (devido a baixa concentração da enzima), o que não acontece com a preparação da Na,K-ATPase de rim de porco. Outro empecilho é o fato de que nós não sabemos de que modo este proteolipídeo seria regulado, pois como foi demonstrado por Capasso e cols (2001), a expressão da subunidade γ responde à diferença na concentração de osmólitos nas células renais, portanto considerando os processos de "invasão" dos crustáceos em diferentes ambientes salinos, poderíamos trabalhar em certo momento com uma fração da Na,K-ATPase enriquecida com esta subunidade ou em outro momento com uma quantidade relativamente baixa de FXYD2 um posterior estudo de aclimatação deve ser feito para esclarecer qual seria a condição ideal para a expressão do proteolipídeo junto a enzima.

Deste modo uma alternativa viável foi utilizar a subunidade γ extraída de rim de porco na preparação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* a fim de garantir que uma quantidade maior de FXYD2 seria empregada nos experimentos de interação.

A incubação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* com a subunidade γ de rim de porco (figura 18), demonstrou que a atividade da enzima foi estimulada em torno de 46% na presença deste proteolipídeo, quando a razão volume de enzima e volume de subunidade γ estava na proporção de 10 µL de FXYD2 : 10µg de enzima; sendo que este valor permaneceu constante à medida em que aumentávamos a proporção do proteolipídeo γ , e como pode ser visto na figura 19 a estimulação da ativifdade da Na,K-ATPase deve-se ao FXYD2 exógeno e não a outro fator, como exemplo: lipídeos ou tampão. Portanto, o resultado visto na figura 18 demonstra primeiramente que a Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* possui os possíveis sítios para a inserção deste proteolipídeo em sua estrutura.

Para compreendermos o efeito estimulatório que a subunidade γ provocou na Na,K-ATPase de *C.danae* resolvemos estudar os parâmetros cinéticos da enzima. A ação da subunidade γ na atividade da Na,K-ATPase estimulada por Na⁺, K⁺ e ATP (figuras 20, 21 e 22 e tabela 1). Nossos resultados demonstraram que o FXYD2 estimulou a V_{max} da enzima nos ensaios de afinidade pelos cátions Na⁺, K⁺ e pelo seu substrato ATP, todavia a afinidade da enzima foi alterada para o íon K⁺, K_{0,5} 1,98 ± 0,087 (controle) para o valor de K_{0,5} 0,9 ± 0,1(enzima tratada com γ); e uma discreta mudança no Km para ATP 55 μ M ± 4,3 (controle) para o valor de 35 μ M ± 5,8 (enzima tratada com γ), sem qualquer alteração para a afinidade por Na⁺. Este efeito da subunidade γ exógena, modulação da afinidade da enzima pelo íon K⁺, é um dado diferente dos resultados até agora publicados, visto que alguns autores mostraram que a subunidade γ afeta somente a afinidade da enzima por Na⁺ e ATP (Arystarkhova e cols, 1999; Pu e cols, 2002; Cortes e cols, 2006).

De certo modo considerando os processos de aclimatação dos crustáceos e a necessidade que estes animais possuem em manter a sua carga de Na⁺ na hemolinfa a um nível superior ao do meio diluído, seria interessante que a subunidade γ modulasse o K_{0,5} Na⁺ e não o do K⁺, porém analisando-se os conjuntos de transportadores presentes na célula das brânquias um aumento da K_{0,5} K⁺ poderia compensar os efeitos que o aumento dos íons NH⁺₄ teriam nos transportadores inespecíficos para a presença destes cátions.

A Na,K-ATPase é uma proteína integral de membrana que transporta ativamente 2 íons K⁺ para o citossol da célula e 3 íons Na⁺ para o meio extracelular mantendo o potencial de membrana celular. Todavia, em determinadas condições, esta enzima é capaz de transportar íons NH^+_4 e ocluir íons Rb^+ em mamíferos, propriedades estas que em muito contribuíram para o estudo das funções desta enzima (Towle & Holleland, 1987; Glynn & Richards, 1982). Nossos resultados sugerem que o íon NH^+_4 pode ser transportado pela Na,K-ATPase em substituição ao íon K⁺ uma vez que NH^+_4 pode substituir efetivamente o íon K⁺ na ativação da hidrólise de ATP na Na,K-ATPase de *C. danae*. Quando comparamos o resultado obtido com a hidrólise realizada na presença do íon K⁺, e ausência de íons NH^+_4 , observamos que as curvas de ativação pelos

respectivos íons são semelhantes (Silva, 2003). Em adição, nossos resultados mostram que quando a concentração do íon NH_4^+ atingiu o valor de 50 mM, houve uma inibição da atividade da enzima, diferente do observado por Towle & Holleland (1987) que mostraram a ativação da enzima de *Callinectes sapidus* em concentrações de NH_4^+ mais altas, a saber 80, 100 e 120 mM.

A presença de uma ativação por NH_4^+ na ordem de 52% (Figura 29) na ativação da Na,K-ATPase das brânquias do siri na presença de altas concentrações de K⁺, condição na qual todos os sítios clássicos para estes íons estão saturados, demonstra que a enzima possui um sítio, específico ou adicional, para a ligação do íon NH_4^+ . Este sítio atua de modo sinérgico com o de ligação do íon K⁺ (Masui e cols, 2002), e até o presente momento só foi identificado nesta enzima, uma vez que saturando-se a Na,K-ATPase de rim de porco com K⁺ e variando-se a concentração de $NH_{4,}^+$ nenhuma ativação extra foi vista (Silva, 2003).

A amônia em solução ocorre ambas as formas (NH₃ e NH⁺₄) num equilíbrio dependente de pH, e como é uma base fraca, pK = 9,8 a 20 °C e NaCl 200 mM; (Cameron and Heisler, 1983) e no pH fisiologico de 7,8 o equivalente a 98% da amônia existe como a forma iônica NH⁺₄, e somente 2% está presente na forma não iônica. Contudo a alta solubilidade em lipídeos do NH₃ o torna mais difusível pela bicamada lipídica. Apesar de Kormanik & Cameron (1981) terem descrito que a excreção de amônia em *Callinectes sapidus* ocorre através da difusão do NH₃, outros autores obtiveram evidências experimentais de que a excreção de amônia ocorre através de NH⁺₄ em *Callinectes sapidus* (Pressley e cols, 1981) e *Carcinus mae*nas (Lucu, 1989; Siebers e cols, 1995).

Íons NH_4^+ e K⁺ possuem o mesmo raio atômico (Knepper e cols, 1989) e devido ao seu comportamento parecido ao K⁺, o íon NH_4^+ afeta o potencial de membrana, por exemplo, em axônio gigante de *Loligo pealei* (Binstock & Lecar, 1969) e neurônios de mamíferos (Cooper & Plum, 1987). Em mamíferos, um aumento da amônia causa um grande dano ao sistema nervoso central, incluindo danos morfológicos na barreira hemato-encefálica (Laursen & Diemer, 1997).

Em crustáceos, por exemplo, na lagosta *Homarus americanus* (Young-Lai e cols, 1991), um nível elevado de amônia prejudica a função iono-regulatória em ambientes de baixa salinidade. Exposição do siri *Carcinus maenas* a 1mM de amônio total leva a um aumento da permeabilidade a íons e um fluxo de sal através das brânquias (Spaargaren, 1990). Um efetivo sistema de excreção e detoxificação de NH⁺₄ é, por razões óbvias, essencial para manter as funções celulares, e para manter os níveis de amônio celular nos fluidos corporais em um nível tolerável. Em muitas espécies, incluindo mamíferos (Cooper & plum, 1987), peixes (Wood e cols, 2002) e crustáceos (Cameron & Batterton, 1978; Weihrauch e cols, 1999) a concentração de NH⁺₄ é tipicamente baixa (50- 400 μ M).

Diferentemente dos processos que ocorrem em aves, mamíferos e répteis, os produtos do metabolismo do nitrogênio em crustáceos são excretados como NH₃ e NH⁺₄ propriamente ditos, independentemente do meio que estão habitando, que podem ser águas marinhas, águas doces, ou habitats terrestres (Kormanik & Cameron, 1981). A urina primária dos crustáceos é formada via ultra-filtração através da glândula antenal, que é tida por ter um papel central na regulação de água e cátions divalentes (Mg⁺², Ca⁺²; Mantel & Farmer, 1983; Freire e cols, 2008), porém não contribuem significantemente na excreção de produtos nitrogenados, como exemplo, temos que a excreção que ocorre em *Callinectes sapidus*, é menor que 2% da amônia excretada pela urina (Cameron & Batterton, 1978). Logo o sítio alvo para a excreção da amônia em crustáceos são as suas brânquias (Claybrook, 1983; Kormanik & Cameron,

1981; Regnault, 1987), e muitos transportadores e enzima estão possivelmente ligados e envolvidos no transporte de amônia (figura 33).

Os mecanismos envolvidos na excreção de NH_4^+ parecem ser espécies específicas, logo no siri *Callinectes sapidus* a excreção correlaciona-se com uma absorção de Na^+ (Pressley e cols, 1981), e o mesmo resultado foi visto no siri chinês *Eriochier sinensis* (Péqueux & Gilles, 1981), sendo que estes resultados foram obtidos utilizando-se vesículas de membranas das brânquias (Towle & Holleland, 1987), indicando que o NH_4^+ substituía o K⁺ na ativação da Na,K-ATPase sensível a ouabaína (Towle and Kays, 1986; Towle e cols, 2001). Em relação à incubação com a ouabaína, um inibidor específico da Na,K-ATPase, inibiu completamente a excreção de NH_4^+ . Um segundo mecanismo encontrado foi observado em *Carcinus maenas* (Weihrauch e cols, 1998; Weihrauch e cols, 2004) pois o tratamento com ouabaína inibe a excreção de NH_4^+ parcialmente, consistente com um segundo mecanismo responsável pela extrusão branquial de NH_4^+ nesta espécie, que envolve um H^+ - ATPase do tipo V. E por fim no siri *Callinectes danae* a excreção de NH_4^+ ocorre de modo sinérgico ao transporte de K⁺ (Masui e cols, 2002) resultando em um aumento de ± 50% na atividade catalítica da Na,K-ATPase.

Deste modo testamos o efeito que a subunidade γ causaria na estimulação da atividade Na,K-ATPásica por íons NH⁺₄ (figura 29). Nossos resultados demonstraram que o K_{0,5} da enzima para o NH⁺₄ (9,62 ± 1,01) sofreu um decréscimo de 10 vezes na presença da subunidade γ (1,09 ± 0,78), além modificar o $n_{\rm H}$ da enzima (controle = 1,1 ± 0,145; γ = 2,32 ± 0,156); mostrando que ocorre uma grande alteração na afinidade da enzima pelos íons NH⁺₄, além de induzir um aumento da cooperatividade (Figura 29 e tabela 2). A importância deste aumento deve-se ao fato que os crustáceos nem sempre estão localizados em um ambiente onde a água está bem oxigenada e não poluída (NH⁺₄

5 μM), e por outro lado eles podem entrar em contato com concentrações superiores a 2,5 mM de NH⁺₄ (anóxia, águas parada entre outros) (Weihraulch e cols, 2004). Este resultado demonstra a importância da Na,K-ATPase neste transporte auxiliar de íons NH⁺₄ realizado pela bomba, considerando-se os fatores citados anteriormente; a regulação deste transporte pela subunidade γ torna ainda mais importante o papel da Na,K-ATPase de *C. danae* na excreção deste íons.

A presença de um proteolipídeo na preparação da Na,K-ATPase de *C. danae* que foi fosforilado pela PKA levou-nos a testar o efeito que a adição do γ fosforilado por PKA ou PKC causaria na atividade enzimática da enzima. Como pode ser visto na figura 23 na presença do γ fosforilado por PKA, a atividade da enzima sofre um estímulo em torno de 80% (o dobro da estimulação do γ não fosforilado), mas por outro lado o γ fosforilado por PKC (figura 24) apresentou uma discreta ativação da enzima. A diferença aqui obtida, PKA e PKC, devem ser atribuídas ao fato de que os resíduos fosforilados no γ são diferentes, logo temos uma serina que é fosforilada pela PKA, fazendo com que exista uma interação mais lenta, porém com um resultado final o estímulo, sendo que o mesmo não acontece com o γ fosforilado pela PKC (treonina); mais ainda sim, um estudo mais detalhado sobre as regiões que ocorrem as interações entre esta subunidade deve ser feita para um melhor esclarecimento (Cortes, 2007).

Nossos resultados mostram que a subunidade γ afeta (aumenta) a afinidade da enzima para o K⁺ e para ATP, enquanto que vários autores observaram um decréscimo K _{0,5} K⁺ (Béguin e cols, 1997; Crambert e cols, 2002; 2005; Arystharkova e cols, 1999; Béguin e cols, 2001; Pu e cols, 2001; Cortes e cols, 2006), e esta função, extrapolando os nossos dados para o FXYD2 encontrado nesta preparação, seria de grande valia para os siris eurialinos, uma vez que durante o seu ciclo de vida estes animais tendem a habitar ambientes onde a osmolaridade do meio é muito inferior ao da sua hemolinfa (águas salobras, estuários e água doce). E diferente de outros crustáceos, os animais eurialinos não possuem a capacidade de absorção de sal da sua urina primária, sendo assim, eles sempre perdem sal para o meio ambiente; desta maneira um aumento na afinidade da enzima por K^+ garantiria que as células brânquias manteriam a concentração deste íon de modo adequado para a manutenção do seu potencial, já que em um meio diluído a oferta deste íon torna-se muito menor. Em adição isto permitiria que o conteúdo de ATP produzido pelas células agora nesta situação fosse mais direcionado a manutenção do equilíbrio iônico-osmótico.

5.4 - A regulação do sítio de NH⁺₄ por Mg⁺² e espermidina.

Apesar de possuir um sítio extra para a ligação de íons amônio a Na,K-ATPase de *C. danae* comporta-se de maneira igual as outras Na,K-ATPases no que diz respeito ao efeito do Mg^{+2} , pois apesar de ser essencial para a atividade da enzima (é o complexo ATP-Mg que se liga à enzima e não o ATP sozinho), uma concentração acima de 3 mM é sempre capaz de inibir a enzima deslocando o equilíbrio para a forma E₂ (figura 30). Parece que em altas concentrações o Mg⁺² ocupa um sítio inibitório na enzima, e em mamíferos este efeito foi atribuído a ligação a forma E₂K, diminuindo a afinidade da enzima por ATP, o passo limite do ciclo de reação (Fontes e cols, 1992; Pedemonte & Beugé, 1983).

O significado fisiológico da inibição da enzima em alto magnésio não está claro. Concentrações de magnésio livre na hemolinfa do siri eurialino *Cryptograpsus angulatus* estão em torno de 12 mM (Mañanes e cols, 2002). Assumindo uma concentração similar na hemolinfa de *C. danae*, a bomba seria exposta a concentrações acima dos níveis inibitórios. Logo, os resultados apresentados na figura 30 poderiam sugerir um mecanismo regulatório, o antagonismo entre NH_4^+ e Mg^{+2} da atividade da enzima via a sua superfície extracelular (tabela 3). Aumentando-se a concentração de NH_4^+ na hemolinfa pode-se minimizar o efeito da inibição por Mg^{+2} , por deslocar a enzima de volta à forma E₁, expondo o sítio adicional para a ligação do NH_4^+ , e substituindo o íon K⁺.

Lovett and Watts, 1995 mostraram que durante a aclimatação do siri *Callinectes sapidus* a um meio de salinidade alta ocorria um aumento da produção de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) na hemolinfa destes animais, sugerindo que estes compostos estariam envolvidos na regulação osmoregulatórias neste crustáceo. Deste modo estudamos a ação que a poliamina espermidina teria no sítio de NH⁺₄. A incubação da enzima com 2 mM de espermidina resultou numa inibição do estímulo que este íon causa, diminuindo a Vmax da reação, sem alterar a afinidade da enzima por NH⁺₄ (figura 31). A inibição provocada pela poliamina é devido ao fato de que em pH fisiológico estas substâncias comportam-se como policátions, logo ao entrarem em contato com os resíduos negativos das cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos no transporte de cátions, elas iriam se ligar a estes resíduos e desta forma iriam competir com a ligação cátion - NH⁺₄ – em seu sítio, e esta competição e futura inibição pode ser atribuída também ao impedimento estérico que as poliaminas em questão causariam na ligação do NH⁺₄.

5.5 - A regulação da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* por Hormônio Juvenil de Inseto.

Os mecanismos pelos quais os crustáceos percebem as mudanças na osmolalidade interna e externa, e como ocorre a transmissão do sinal para o seu sistema neuro-endócrino não são bem conhecidos. O controle da osmolalidade da hemolinfa dos crustáceos eurialinos deve ser finamente controlado, e um processo rápido e preciso deve existir para que estes animais sobrevivam nestes ambientes com uma drástica mudança de salinidade. Um amplo estudo direcionado para a Na,K-ATPasse ao longo dos anos tem mostrado a importância desta enzima na regulação iônica "rápida" nestes animais, e indicando possíveis reguladores da enzima ao longo deste processo.

Ao longo dos anos as pesquisas realizadas nesta área vêm evoluindo e indicando possíveis reguladores, como exemplo temos o extrato do órgão pericardial do *Carcinus maenas* que demonstrou um aumentou da captação de Na⁺ e da atividade da Na,K-ATPase (Sommer & Mantel 1988), e este efeito foi mimetizado por dois componentes do extrato, a dopamina e a octopamina (Lohrmann & Kamemoto 1987). A infusão de dopamina nos crustáceos vivos ou a perfusão através das brânquias isoladas demonstrou um rápido aumento no nível de AMPc na atividade da Na,K-ATPase de muitas espécies (Kamemoto & Oyama, 1985; Sommer & Mantel, 1988; Morris & Edwards, 1995; Mo e cols, 1998). A transferência dos crustáceos de um meio de alta salinidade para outro de baixa, foi descrito por exibir um aumento no nível de AMPc nas brânquias anteriores e posteriores do *Carcinus maenas* (Sommer and Mantel, 1991), sugerindo que o aumento de AMPc pode estar envolvido numa prévia resposta da aclimatação a salinidades reduzidas. Corroborando com estes dados, experimentos em *Eriocheir sinensis* Riestenpatt e cols, 1994 mostraram que um aumento de AMPc estimulou a captação de Na⁺ e CI'.

Além desses estudos Lovett & Watts, 1995 demonstram que durante o processo de aclimatação, transferência do animal da água doce para a água salgada, do siri *C. sapidus,* ocasiona um aumento da produção de poliaminas nos pares brânquiais posteriores, que são justamente os pares responsáveis pelo controle osmoregulatório do animal, e posteriormente Silva e cols, 2008 mostraram que o efeito das poliaminas na Na,K-ATPase das brânquias do siri *Callinectes danae* era devido a competição que

estas substâncias tinham pelo sítio de cátions (neste caso o efeito sobre o Na^+ e a estimulação por NH_4^+ foram bem evidenciados) além do fato de que as poliaminas parecem estabilizar a conformação E1 da enzima.

O metil farnesoato, um sesquiterpeno não epoxidado estruturalmente parecido ao hormônio juvenil de inseto (Borst & Tsukimura, 1991; Laufer e cols, 1987), é secretado pelo órgão mandibular é está presente na hemolinfa de uma variedade de crustáceos. Recentes estudos têm sugerido que o metil farnesoato está envolvido na regulação de processos similares aos descritos em insetos (reprodução, muda, desenvolvimento larva, morfogênese, síntese de proteínas (Nagaraju, 2007).

Como dito anteriormente o controle hormonal da osmoregulação em invertebrados não está estabelecido e poucas informações existem até o presente momento. Recentemente estudos com o caranguejo aranha, L. emarginata, indicaram que o estresse hiper osmótico eleva a síntese de metil farnesoato, em parte por estimular a atividade da metil transferase no órgão mandibular (Ogan e cols, 1997). Lovett e cols, 1997 observaram que o nível de metil farnesoato da hemolinfa responde a certo número de estressores, incluindo o aumento de temperatura, anoxia, manuseio e exposição à água diluída. E foi demonstrado que o nível de metil farnesoato estava aumentado no stress hipo-osmótico (Lovett e cols, 2001). Todavia a significância fisiológica deste efeito não está clara. A adição do hormônio ao homogenato de Artemia salina aumentou a atividade da Na,K-ATPase (Ahl and Brown, 1991), e tal efeito seria consistente com o papel do metil farnesoato na osmorregulação. Em adição estudos realizados com a exposição do C. maenas a água do mar isosmótica, com baixa concentração de cálcio e magnésio, ou combinações dos dois; ou água diluída com altas concentrações de cálcio ou magnésio pode aumentar a produção do hormônio (Lovett e cols, 2006), mostrando a existência de uma forte correlação inversa entre o nível de hormônio e a osmolalidade

da hemolinfa. Todavia estes estudos não investigaram se o metil farnesoato poderia regular a Na,K-ATPase.

Deste modo decidimos estudar qual seria a ação que este hormônio poderia ter na atividade da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* e, para isto, usamos como uma substância análoga a este hormônio de crustáceo o hormônio juvenil de inseto (JH III). A incubação da Na,K-ATPase com o JH III resultou em uma inibição, diferente do resultado obtido por Ahl and Brown, 1991, que demonstraram que a adição de metilfarnesoato a uma preparação de homogenato total de larvas de *Artemia* estimulava a atividade da Na,K-ATPase. Este efeito inibitório só pode ser observado quando a enzima foi tratada com uma pré-incubação em um meio de reação específico para a atividade da PKC (comparar figuras 25 e 26 com a figura 27)

Para definirmos se a inibição da Na,K-ATPase foi provocada pelo JH, e não pelo seu solvente ou outra substância presente no meio, uma vez que o JH III foi dissolvido em DMSO, nós realizamos um experimento com o inibidor da PKC, a queleretrina, e adicionamos em outro tubo de pré-incubação a mesma quantidade de DMSO comparada ao hormônio, e como podemos observar a presença da queleretrina reverteu o efeito inibidor que o JH III exercia sobre a enzima, deste modo a inibição pode ser atribuída à fosforilação da Na,K-ATPase; ou de algum outro fator presente nesta preparação que uma vez fosforilado irá regular a atividade da bomba (figura 28). Cabe ressaltar que nestes experimentos o ponto controle possuía todo o meio para PKC além do ATP, e podemos observar que ocorria um decréscimo de 10% da atividade da Na,K-ATPase, comparando-se a enzima não tratada; desta forma o efeito inibitório pode ser atibuído de fato ao JH III estimulando a PKC.

Nossos resultados apontam que a inibição sofrida pela Na,K-ATPase de *C*. *danae* ocorre via a ativação da PKC, apesar de outros estudos já terem identificado a participação desta cinase na ação deste hormônio (Wyatt and Davey, 1996; Yamomoto e cols, 1988), os dados aqui apresentados mostram pela primeira vez presença de um sitema receptor-hormônio localizado nas brânquias de um crustáceo eurialino que é capaz de regular atividade da bomba de sódio, quer de maneira direta ou não.

Por outro lado torna-se óbvio que este efeito haverá de alterar de um modo "rápido" alguma propriedade cinética da Na,K-ATPase de modo a torná-la inibida, e devemos atentar que possíveis receptores nucleares para o hormônio juvenil tem sido sugeridos na literatura (Henrich e cols, 2003) logo uma regulação a longo prazo pode eventualmente realizada por este hormônio.

Portanto, assumindo uma estreita relação entre o hormônio juvenil e o metil farnesoato (figura 32), e obviamente atribuindo estes efeitos observados ao metil farnesoato, os resultados apresentados podem sugerir uma regulação rápida da enzima; e uma mais lenta, nos quais os processos de síntese e degradação estariam envolvidos. Desta maneira seria preenchido um grande espaço na compreensão dos mecanismos fisiológicos que regulam a atividade da Na,K-ATPase nos crustáceos. Ainda assim a presença de uma pequena diferença estrutural do JH III pode ser responsável (ou mesmo, não descartar possíveis efeitos específicos que talvez não possam ser observados no tratamento com metil farnesoato).



Figura 32: Fórmula estrutural do metil farnesoato (A) e hormônio juvenil de inseto (B).

5.6 - Conclusões finais.

A Na,K-ATPase é uma enzima de grande importância para o controle osmoregulatório nos crustáceos, e diferente de outros animais a enzima encontrada nas brânquias de *C. danae* está envolvida no transporte e excreção do íon NH⁺₄. Portanto, como pode ser observado na figura 33, através dos nossos resultados, propomos que a Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*, possui um sítio inibitório para a ligação de íons Mg⁺², que aparece quando a enzima está na conformação E2, considerando-se que a concentração deste íon é alta em um ambiente salino, leva a clara idéia que nesta condição a atividade estaria reduzida. Todavia este efeito pode ser antagonizado pelo sítio de NH⁺₄ que reverteria o efeito do Mg⁺² na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*, pois a levaria para a conformação E1, que não expõem o sítio inibitório para a ligação do Kg⁺². Este efeito de antagonismo seria ainda mais favorecido pela presença do FXYD2, pois este componente foi capaz de aumentar em 10 vezes afinidade da enzima por NH⁺₄, logo os efeitos combinados levariam a enzima a conformação E1, acabando então com a inibição.

Um aspecto importante de notar é que o antagonismo que existe entre o NH_4^+ e o Mg^{+2} , só poderá ocorrer se o sítio de ligação para aquele cátion esteja disponível, e esta condição se dá quando a enzima encontra-se com os sítios de K⁺ totalmente saturado pelo próprio, pois caso contrário o que teremos é simplesmente uma substituição entre K⁺ e o NH_4^+ no transporte da enzima. Logo para que isto não ocorra o FXYD2 também modula positivamente o sítio de K⁺ da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae*, logo uma menor quantidade de íons K⁺ é requerida para a saturação dos seus próprios sítios, que resultaria num efeito pronunciadamente mais rápida no sítio de NH_4^+ da enzima de *C. danae*. Deste modo estabelecemos uma relação entre os dados das figuras 16, 23 e 30.

Importante dizer que a modulação que o FXYD2 causa na Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* não seria só importante para conter a inibição por Mg^{+2} , mas também por favorecer a energia extra que facilitaria o transporte do próprio NH^{+4} , que ao ser excretado é trocado pelo Na⁺ movimentando este íon do meio interno para o meio externo, contribuindo então para o aumento na captação deste cátion durante o processo de aclimatação do *C. danae*. E aplicando-se os resultados das poliaminas, considerando-se que estas substâncias são estimuladas quando o animal está em um meio de alta salinidade, fica óbvio que com este fato ocorrerá também uma aumento na produção de amônio, que será eliminado pela Na,K-ATPase. Sendo assim temos que nestes crustáceos a presença do FXYD2 seria de grande importância para a aclimatação do *C. danae*.

Outra característica marcante do nosso sistema é a ação de proteínas cinases, estimuladas através do hormônio juvenil, espermina e espermidina, e da adição do DbAMPc, que implica que o controle da Na,K-ATPase durante a aclimatação não apenas se restringe a uma modulação direta da atividade da bomba de Na⁺ pela subunidade α , mas sim uma complexa rede de sinais que podem favorecer ou desfavorecer as interações que existem entre esta subunidade e o FXYD2. Esta afirmativa é baseada no fato de que a fosforilação do FXYD2 pela PKA ocorre em uma condição "natural" da enzima; a adição do FXYD2 exógeno resultou em um estímulo



Figura 33: Modelo hipotético para a excreção de amônia através das brânquias de *C. danae.* O mecanismo responsável para a excreção de NH_{4}^{+} é a Na,K-ATPase localizada na membrana basolateral. Um adicional transporte, inibido por Mg⁺², que aparece quando a enzima está saturada por K⁺ (2) canal de K⁺ sensível a Cs⁻; (3) junções (4) Na⁺/ NH₄⁺; (5) estrutura similar a um canal de íons presente nas cutículas, que permite a difusão do NH₄⁺ para o meio externo; (6) formação de vesículas contendo NH₄⁺ para posterior eliminação; (7) transportador de NH₄⁺, uma proteína similar a Rhesus. (Masui e cols 2005).

em torno de 80% da atividade Na,K-ATPase de *C. danae* o que sugere que a presença desta subunidade é um forte candidato a modular as propriedades catalíticas exibidas pela subunidade α da Na,K-ATPase das brânguias do siri eurialino *C. danae*.

Considerando-se que a Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* possui uma resposta mais "efetiva", ou seja, um K_m ATP muito inferior ao descrito para as enzimas de outros crustáceos, sugerimos também que a mesma estaria mais apta aos processos de adaptação deste crustáceo. Considerando que a concentração de ATP necessária para uma perfeita atividade da enzima, encontra-se inferior ao descrito para outros animais, isto nos levar a crer que em situações de estresse nestes animais, que fizessem com que o nível intracelular de ATP caísse; um fator de risco para o controle osmorregulatório, levaria a uma carga de ATP mais baixa. Entretanto comparando-se a afinidade por ATP entre as diferentes Na,K-ATPase dos crustáceos, temos que este não seria um grande problema para o siri *C. danae*.

Portanto, sugerimos a presença um sistema hormonal com suas proteínas cinases, as poliaminas, o íon Mg ⁺² e FXYD2 como efetores para o controle das propriedades catalíticas da Na,K-ATPase durante a aclimatação dos crustáceos visando um controle dinâmico do processo de osmorregulação que ocorre nestes animais.

6- Futuros objetivos

- 1- Definir o efeito que o hormônio juvenil teria na atividade catalítica da Na,K-ATPase das brânquias de *C. danae* estimulada por Na⁺, K⁺, NH⁺₄, ATP e Mg⁺².
- 2- Relacionar o processo da aclimatação do *C. danae* com a expressão diferencial do FXYD encontrado nesta preparação, e estabelecer qual seria a importância dos cátions ou anions neste processo.
- 3- Estabelecer uma cultura de células provenientes das brânquias de *C. danae* para compreender melhor o efeito das poliaminas em diferentes meios salinos, relacionando-os às proteínas cinases que são ativadas durante o estresse osmótico aos quais estes animais podem se submeter.
- 4- Elaboração de um protocolo para uma purificação da Na,K-ATPase, afim de se obter uma fração enriquecida deste enzima para experimentos que visem a identificação de seu padrão clivagem, e posteriormente a presença do sítio de ligação do NH⁺₄.
- 5- Identificar o papel que outros reguladores endógenos (dopamina, octopamina) teriam na Na,K-ATPase das células brânquiais cultivadas.
- 6- Estabelecer a sequência de aminoácidos desta proteína, objetivando a identificação dos possíveis resíduos envolvidos na ligação dos cátions.
- 7- Relacionar o FXYD com as proteínas cinases estimuladas por poliaminas e a sua ação final diante da atividade da Na,K-ATPase em diferentes meios salinos.

7- Referências bibliográficas.

Ahearn, G. A.; Duerr, J. M., Zhuang, Z.; Brown, R. J.; Aslamkhan, A. & Killebrew, D. A. (1999). Ion transport processes of crustaceans epithelial cells. *Physiol Biochem. Zool.* **72**: 1-18.

Ahl J. S. & Brown J. J. (1991). The effect of juvenile hormone III, methyl farnesoate, and methoprene on Na/K-ATPase activity in larvae of the brine shrimp, *Artemia. Comp. Biochem. Physiol.* . **100A**:155-158

Akera, T. & Ng, Y. C. (1991) Digitalis Sesitivity of Na^+/K^+ -ATPase Myocytes and The Heart. *Life Sci.* **48**: 97-106.

Akopianz, N. S.; Broude, N. E.; Bekman, E. P.; Marzen, E. O. & Sverdlov, E. D. (1991) tissue- specific expression of Na,K- ATPase β subunit. Does β 2 expression correlates with tumorigenesis? *FEBS LETT*. **289**: 8-10.

Antolovic, R.; Brüller, H. J.; Bunk, S.; Linder, D. & Schoner, W. (1991) epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na⁺/K⁺- ATPase are located on the cytoplasma side of the membrane. *Eur. J. Biochem.* **199**: 195- 202.

Apell, H. J.; Schneeberger, A. & Sokolov, V. S. (1998) Partial Reactions of the Na-K ATPase: Kinetic Analysis and Transpot Properties. *Acta Physiol. Scand* **163**, **Suppl 643**: 235-245.

Aperia, A.; Frycskstedt, J.; Svensson, L.; Hemmings, H. C. J.; Nairn, A. C. Amd Greengard, P. (1991) Phosphorylated Mr 32,000 dopamine and cAMP-Regulated phosphoprotein inhibts Na⁺-K⁺-ATPase activity in renal tubules Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2798- 2801.

Argëllo, J & Kaplan, J. H. (1991). Evidence for essential carboxyls in the cationbinding domain of the Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. **266**; 14627-14635.

Argüello, J. & Kaplan, J. H. (1994) Glutamate 779, an intramembrane carboxyl, is essential for monovalent cation binding by the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**: 6892-6899.

Armstrong, C. (1998) The Vision Pore. Science. 280: 56-57.

Arystarkhova, E.; Wetzel, R. K.; Asinovski, N. K. & Sweadner, K. J. (1999) The γ subunit modulates Na⁺ and K⁺ affinity of the renal Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**: 33183-33185.

Arystarkhova, E; Wetzel, R.K. & Sweadner K.J. (2002). Distribution and oligomeric association of splice forms of Na(⁺)-K(⁺)-ATPase regulatory γ -subunit in rat kidney.*Am J Physiol Renal Physiol.* **282**:F393-F407.

Barra, J. A.; Péqueux, A. J. R. & Humbert, W. (1983) A morphological study on gills of a crab acclimated to frersh water. *Tissue Cell* **15**: 583-596.

Baxter-Lowe, L.A.; Guo, J.Z.; Bergstrom, E.E.; Hokin, L.E. (1989). Molecular cloning of the Na,K-ATPase α - subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett.* **257**: 181-187.

Beggah, A. T.; Jaunin, P. & Geering, K. (1997) Role of glycosilation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na,K- ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 10318-10329.

Béguin, P.; Crambert, G.; Guennoum, S.; Garty, H.; Horisberger, J. D. & Geering, K. (2001). CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the γ -subunit.*EMBO J.* **20**:3993-4002.

Béguin, P.; Hasler, U.; Sraub, O. & Geering, K. (2000). Endoplasmic reticulum quality control oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involvede in the degradation of unassembled Na,K-ATPase alpha subunit and in it stabilization by β subunit assembly. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 1657-1672.

Béguin, P.; Wang, X.; Firsov, D.; Puoti, A.; Caeys, D.; Horisberger, J. D. & Gerring, K. (1997) The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* **16**: 4250- 4260.

Bertorello, A. M & Katz, A. I (1993). Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol.* **265**: F743-55.

Bertorello, A. M.; Aperia, A.; Walaas, S. I.; Nairn, A. C. & Greengard, P. (1991) Phosphorylation of the catalytic subunit of Na^+, K^+ -ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**:11359-11362.

Beuagé, L. A; Gadsby, D. C. & Garrahan, P. J. (1997) Na/K ATPase and Related Transport ATPases. Structure, Mechanism and Regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **834**: Xv - Xiii

Bhattacharya, K.K.; Bergstrom, E.E.; Honkin, L.E. (1990) Molecular cloning of the β -subunit of the Na,K-ATPase in the brine shrimp, Artemia: The cDNA –derived aminoacids sequence shows low homology with the β -subunits of vertebrates except in the single transmembrane and the carboxy-terminal domains. *FEBS Lett.* **269**; 233-238.

Binstock, L. & Lecar, H. (1969). Ammonium ion currents in the squid giant axon. J. Gen. Physiol. 53,342-361.

Blanco, G. & Mercer, R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in Structure, Diversity in Function. *Am. J. Physiol.* **275**: F633- F650.

Blanco, G.; Sánchez, G. & Mercer, R. (1995b) Comparison of the enzymatic properties of the Na,K- ATPase $\alpha 3\beta 1$ And $\alpha 3\beta 2$ Isozymes. *Biochemistry* **34**: 9897-9903.

Blanco, G.; Koster, J.; Sánchez, G. & Mercer, R. (1995a) Kinetics properties of the $\alpha 2\beta 1$ And $\alpha 2\beta 2$ isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* **34**: 319-325.

Blaustein, M. P. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: Control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **33**: C1367-C1387.

Borst D.W. & Tsukimura B.(1991).Quantification of methyl farnesoate levels in hemolymph by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* **545**: 71-78.

Caldwell, P. C.; Hodgkin, A. L.; Keynes, R. D. & Shaw, T.K. (1960) The effects of injecting 'energy-rich' phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of Loligo. *J. Physiol.* **152**: 561- 590.

Cameron, J. N. & Batterton C. V. (1978) Antennal gland function in the freshwater crabs *Callinectes sapidus*: water, electrolytes acid-base and ammonia excretion. *J. Comp. Physiol.* **123 B**: 143-148.

Cameron, J. N. & Heisler, N. (1983) Studies of ammonia in the rainbow trout: Physicochemical parameters, acid-base behaviour and respiratory clearance. *J. Exp. Biol.* **105**: 107-125.

Canessa, C. M.; Horisberger, J; Louvard, D. & Rossier, B. C. (1992) Mutation of a cysteine in the first transmembrane segment of Na,k-ATPase α subunit confers ouabain resistence. *EMBO J.* **11**: 1681-1687.

Capasso, J. H.; Hoving, S.; Tal, D. M.; Goldshleger, R. & Karlish, S. J. D.(1992) Extensive digestion of Na/K ATPase by specific and non-specific protease with preservation of cation occlusion sites. *J. Biol. Chem.* **267**: 1150-1158.

Capasso, J. M.; Rivard, C. J. & Berl, T. (2001) Expression of the γ subunit of Na,K-ATPase is regulated by osmolality via C-terminal Jun Kinase and Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13414-13419.

Capasso, J. M.; Rivard, C. J. & Berl, T.(2005) Synthesis of the Na,K-ATPase γ -subunit is regulated at both the transcriptional and translational levels in IMCD3 cells. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**: F76-F81.

Capasso, J. M.; Rivard, C. J.; Enomoto, L. M. & Berl, T(2003) Chloride, not sodium, stimulates expression of tje γ subunit of Na/K-ATPase and activated JNK in response to hypertonicity in mouse IMCD3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6428- 6433.

Castilho, P. C.; Martins, I. A. & Bianchini, A. (2001) Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Biol* **21**: 414- 425.

Chacur, M. M. & Negreiros-fransozo, M.L. (2001) Spatial and seasonal distribuitions of *Callinectes dane* (Descapoda, Portunidae) in Ubatuba bay, Sao Paulo, Brazil. *J Crustacean Biol* **21**: 414-425.

Chacur, M. M. (1998) Distribuição ecológica do siri azul *Callinectes dane* Smith, 1863 (Crustácea, Decapoda, Portunidae) na enseada de Ubatuba (SP). Dissertação de Mestrado. ICB/UNESP- Botucatu. 104 pp.

Chapelle, S. & Zwingelstein, G. (1984). Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes environmental salinities: relationship between Na,K-ATPase activity and phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**: 363-373.

Charmock, J.S. & Simonson, L. P. (1977). Differential lipid control of (Na⁺,K⁺-ATPase)-ATPase in homeotherms and poikilotherms. *Comp. Biochem. Physiol.* **58B**; 381-387.

Cheng, X. J.; Hoog, J. O.; Naira, A. C.; Greengard, P. & Aperia, A. (1997) Regulation of rat Na^+-K^+ -atpase by PKC is modulated by state of phosphorylation of ser-943 by PKA. *Am. J. Physiol Cell. Physiol* **273**: C1981- C1986.

Chiballin, A. V.; Ogimoto, G.; Pedemonte, C. H.; Pressley, T.A.; Katz, A. I.; Feraile, E. Berggren, P.O. & Bertorello, A. M. (1999). Dopamine-induced endocytosis of Na^+, K^+ -ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and Is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem.* **274**:1920-7.

Chow, D. & Fortes, J. G. (1995) Functional significance of the β subunit for heterodimeric P- type ATPases. *J. Exp. Biol.* **198**: 1-17.

Chow, D.C.; Browning, C. M. & Forte, J. G. (1992) Gastric H^+ - K^+ -ATPase activity is inhibited by reduction of disulfide bonds in β -subunit. *Am. J. Physiol.* **263**: C39- C46.

Claybrook, D. L. (1983) The biology of crustacean, In *Internal Anatomy and Physiology Regulation*, vol. 5 (ed. L. H. Mantel) pp 163-213. London: Academic Press.

Colins, J. H.; Forbush, B. III; Lane, L. K.; ling, E.; Schwartz, A. & Zot. A. (1982) Purification and characterization of an (Na^+,K^+) -ATPase proteolipid labeled with a photoaffinity derivative of ouabain. *Bioch. Biophys. Acta.* **686**: 235-241.

Cooper, A. J. & Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* **67**,440 -519

Corotto, F. S. & Holiday, F. S. (1996) Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* **113A**: 361-368.

Cortes, V. F. (2007). FXYD2: Um estudo de suas interações e efeitos sobre as ATPases do tipo P. Tese de Doutorado. IBqM/UFRJ.135.

Cortes, V. F.; Veiga-Lopes, F. E.; Barrabin, H.; Alves-Ferreira, M. & Fontes, C. F. L. (2006) The γ subunit of Na⁺, K⁺-ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *The Intern. J. of Biochem. & Cell Biology* **38**: 1901-1913

Crambert, G. & Geering K (2003). FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase.*Sci STKE*. **21**: RE1.

Crambert, G.; Fuzesi, M.; Garty, H.; Karlish, S. & Geering, K. (2002). Phospholemman (FXYD1) associates with Na,K-ATPase & regulates its transport properties *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**:11476-11481.

Crambert, G.; Li, C.; Clayes, D. & Geering, K. (2005). FXYD3 (Mat-8), a new regulator of Na, K-ATPase *Mol. Cell. Biol.* 16: 2326-2371.

D'Orazio, S.E. & Holliday, C. W. (1985). Gill na,K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca Pugilator. Physiol. Zool.* **58**: 364-373.

De Weer, P.; Gadsby, D. C. & Rakowski, R. F. (1988) Voltage dependence of the Na-K Pump. *Ann. Rev. Physiol.* **50**: 225-241.

Dean, R. B. (1941). Theories of electrolytes equilibrium in muscle. *Biol. Symp.* **3**: 331-348.

Dmitrieva, R. I. & Doris, P. A. (2002). Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 28160-28166.

Donnet, C.; Arystharkova, E. & Sweadner, K. J. (2001) Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for α - α oligomeric interaction and γ subunit association with the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 7357-7365.

Doris, P. A. & Bagrov, A.Y. (1998) Endogenous sodium pump inhibitor and blood pressure regulation: an update on recent progress. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218**: 156-167.

Ellies-Davies, G. C. & Kaplan, J. H. (1994) Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator thar selectively bind calcium with high affinity and release it rapidily upon proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA.* **91**: 187-191.

Ellies-Davies, G. C. & Kaplan, J. H.(1993). Modification of lysine 501 in Na,K-ATPase reveals coupling between cation occupancy and changes in ATP binding domains. *J. Biol. Chem.* **268**: 11622-11627.

Emery, A. M.; Billingsley, P. F.; Ready, P. L. & Djangouz, M. B. A. (1998) . Insect Na/K ATPase. J. Insect Physiol. 44: 197 – 209.

Fedosova, N.U.; Cornelius, F. & Klodos, I. (1998) E₂P phosphoforms of Na,K-ATPase. I comparison of phosphointermediates formed from ATP and Pi by their toward hydroxilamine and vanadate. *Biochemistry* **37**: 13634-13642.

Feschenko,M.S. & Sweadner, K. J. (1994). Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C.

Feschenko, M.S. & Sweadner, K. J. (1995). Structural basis for species-specific differences in the phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C. *J Biol Chem.* **270**:14072-140777.

Fisone, G.; Snyder G. L; Fryckstedt, J.; Caplan, M. J.; Aperia, A. & Greengard P (1995).Na⁺,K⁺-ATPase in the choroid plexus. Regulation by serotonin/protein kinase C pathway (1995). *J Biol Chem.* **270**:2427-2430.

Flik, G. & Haond, C. (2000). Na⁺ and Ca²⁺ pumps in the giull, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*; Effect of dilute sea water. *J. Exp. Biol.* **203**: 213- 220.

Fontes, C. F. L.; Barrabin, H.; Scofano, H. S. & Norby, J. G. (1992)The role of Mg^{2+} and K^+ in the phosphorylation of Na^+, K^+ATP by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na+. *Biochem. Biophys. Acta* **1104**: 215-225.

Fontes, C. F. L.; Lopes, F. V. E.; Scofano, H. M.; Barrabin, H. & Norby, J. G. (1997) Effect of a Low Molecular Weight Factor from Na⁺,K⁺-ATPase Preparation on Ouabain Binding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **834**: 631- 633.

Fontes, C. F. L.; Veiga-Lopes, F. E.; 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. Byophys.* **366**: 215-223.

Forbush, B.; Kaplan, J. H. & Hoffman, J. F. (1978) Characterization of a New Photoaffinity Derivate of Ouabain: Labeling of the Large Polypeptide and of a Proteolipid Component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* **17**: 3667-3676.

Freire, C.A.; Onken, H. & McNamara, J. C. (2007) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol* A doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.008

Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C. & Leone, F. A. (2000). Characterization of Na,KATPase in gill microsome of the freshwater shrimp Macrobachium olfersii. *Comp. Biochem. Physiol.* **126B** 303-315.

Gao, J.; Wymore, R.; Wymore, R. T.; Wang, Y.; Mckinnon, D.; Dixon, J. E.; Mathias, R. T.; Cohen, I. S. & Baldo, G. J. (1999) Isoform-specific regulation of the sodium pump by α and β adrenergic agonist in the guinea-pig ventricle. *J. Physiol.* **516**: 377-383.

Garçon, D. P., Masui, D. C.; Mantelatto, F. L. M.; McNamara, J. C.; Furriel, R. P. M. & Leone, F. A. (2007). K^+ and NH^+_4 modulate the gill (Na^+/K^+) -ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornathus*: fine tuning of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* **147A**: 145-155.

Garty, H. & Karlish, S. J. (2006). Role of FXYD proteins in ion transport. *Annu. Rev. Physiol.* **68**:431-459.

Gatto, C.; Wang, A. X. & Kaplan, J. H. (1998) The M4M5 cytoplasmic loop of the Na,K-ATPase, overexpressed in escherichia coli, binds nucleoside triphosphates with the same selectivity as the intact native protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 10578-10585.

Genovese, G.; Luchetti, C. G. & Luquet, C. M. (2000). Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure and concentrated seawater. *Mar. Biol.* **144**: 111- 118.

Gerring, K. (2002) The Functional Role of β Subunit in Oligomeric P- Type ATPases. *J. Bionerg. Biomembr.* **33**: 425-438. Glynn, I. M. & Richards, D. E. (1982) Occlusion of Rubidium Ions by the Sodium-Potassium Pump: Its Implications for the Mechanism of Potassium Transport. *J Physiol.* **330**:17-43

Glynn, I. M. (1993) Annual Review Prize Lecture. "All Hands to the Sodium Pump". J. *Physiol.* **462**: 1- 30.

Goldshelger, R.; Tal, D. M. & Karlish, S. J. D. (1995) Topology of the α -Subunit of Na/K ATPase based on proteolysis. Liability of the Topological Organization. *Biochemistry* **34**: 8668-8679.

Grossel, M.; Nielsen, C. & Bianchini, A. (2002) Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol.* **133C**: 287-303.

Gruwel, M. L.; Alves, C. & Schrader, J. (1995) Na/K ATPase in endothelial cell energetics: ²³Na nuclear magnetic resonance and calorimetry study. *Am. J. Physiol.* **268**: H351-H358.

Guerin, J. L. & Stickle, W. B. (1997) A comparative study of two sympatric species within the genus Callinectes: osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **218**: 165-186.

Hardwicke, P. M. & Freytag, J. W. (1981) A proteolipid associated with Na,K-ATPase is not essential for atpase activity. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **102**: 250-257.

Harris, R. R. & Bayliss, D. (1998). Gill (Na^+/K^+) -ATPase in decapod crusaceans: distribuition and characteristic in relation in Na⁺ regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* **90A**: 303-308.

Hasler, U.; Wang, X. Y.; Crambert, G.; Beguin, P.; Jaisser, F.; Horisberger, J. D. & Geering, K. (1998) Role of the β -subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na/K ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 30826-30835.

Hebert, H.; Purhonen, P.; Vorum, H.; Thomsen, K. & Maunsbach, A.B. (2001) Threedimensional structure of renal Na,K-ATPase from cryo-electron microscopy of twodimensional crystal. *J. Mol. Biol.* **314**: 479-494.

Henrich V.C.; Burns, E.; Yelverton, D.P.; Christensen, E. &, Weinberger C. (2003). Juvenile hormone potentiates ecdysone receptor-dependent transcription in a mammalian cell culture system. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**:1239-1247.

Henry, R. P.; Garrelts, E. E.; McCarty, M. M. & Towle, D. W. (2002) Differential induction of branchial carbonic anhydrase and (Na^+,K^+) -ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J. Exp. Zool* **292**: 595-603.

Hilge, M.; Siegal, G.; Vuister, G. W.; Güntert, P.; Gloor, S.M. & Abrahams, J. P. (2003). ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of of Na,K-ATPase. *Nature Structural Biology*, **10**: 468-474.

Holleland, T. & Towle, D.W. (1990). Vanadate but not ouabain inhibits Na⁺,K⁺-ATPase and sodium transport in tight inside-out native membrane vesicles from crab gill (*Carcinus maenas*). *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**, 177-181.

Holliday, C. D. (1985) Salinity-Induced Changes in Gill Na,K-ATPase in the Mud Fiddler Crab, *Uca pugnax. J. Exp. Zool.* **233**: 199-208.

Holliday, C. W. (1985). Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase and osmoregulation in the isopod, *Idotea wosnesesenkii*. J. Exp. Biol. **136**: 259-272.

Horisberger J.D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*. **19**: 377-87.

Horiuchi, S. (1977). Characterization of gill Na,K-ATPase in the freshwater cryfish, Procambarus clarkii. *Comp. Biochem. Physiol.* **56B**: 135-138.

Huang, L. Kometiani, P. & Xie, Z. (1997) Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**: 429-437.

Hughes, B. A.; Milleer, S. A.; Joseph, D. P. & Edelman, J. L. (1988) cAMP stimulates the Na⁺-K⁺ pump in frog retinal pigment epithelium. *Am* . *J. Physiol.* **254**: C84- C98.

Jones, D. H.; Li, T. Y.; Arystharkova, E.; Barr, K. J.; Wetzel, R.K.; Peng, J.; Markham, K.; Sweadner, K. J.; Fong, G. H. & Kidder, G. M.(2005) Na,K-ATPase from mice laking the γ subunit (FXYD2) exhibits altered Na⁺-affinity and decrease thermal stability. *J. Biol. Chem.* **280**: 19003-19011.

Jorgensen, P. L. & Andersen, J. P. (1988) Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J. Membr. Biol* **103**: 95-120.

Jorgensen, P. L. (2001) aspects of gene structural and functional regulation of the isoenzymes of Na,K-ATPase. *Cell. Mol. Biol.* **47**: 231-238.

Kamemoto, F. L. & Oyama, S. N. (1985). Neuroendocrine influence on effector tissue of hydromineral balance in crustaceans. In: Lofts, B., Holmes, W. N. (Eds), *Currrents Trends in Comparative Endocrinology*. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 833-886.

Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. Annu. Rev. Biochem. XXX. 511-533.

Karlish, S. J. D. (1997) Organization of the membrane domain of the Na/K pump. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **834**: 30-44.

Karlish, S. J.; Goldeshleger, R. & Stein, W. D. (1990) a 19-kda c-terminal tryptic fragment of the α chain of Na/K-atpase is essential for occlusion and transport of cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4566-4570
Kirley, T. L. & Peng, M. (1991) Identification of cysteine residues in lamb kidney Na,K-ATPase essential for ouabain binding. *J. Biol. Chem.* **266**: 19953-19957.

Kirley, T. L. (1989) Determination of three disulfide bonds and one free sulfhydryl in the β subunit of (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **264**: 7185-7192.

Kirley, T. L.; Lane, L. K. & Wallick, E. T. (1986) Identification of an Essential Sulfhydryl Groups in the Ouabain Site. *J. Biol. Chem.* **261**: 4525-4528

Kiroytcheva, M.; Cheval, L.; Carranza, M. L.; Martin, P. Y.; Favre, H.; Doucet, A. & Féraille, E. (1999) Effects of cAMP on the activity and the phosphorylation of Na,K-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kydney Int.* **55**: 1819-1831.

Kirschner, L. B. (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* **207**: 1439-1452.

Kneper, M. A.; Packer, R. & Good, D.W. (1989) Ammonium transport in the kidney. *Physiol. Rev.* **69**: 179-249.

Kometiani, P.; Li, J.; Gnudi, L.; Kahn, B. B.; Askari, A. & Xie, Z. (1998) multiple signal transduction pathways link Na^+/K^+ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: the role of Ras and mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 15249-15256.

Kormanik, G. A. & Cameron, J. N. (1981) ammonia excretion in the sea water blue crabs (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not Na^+/NH^+4 exchange. *J. Comp. Physiol.* **141 B**: 457-462.

Kostia, M. M. & Zivkovic, R. V. (1994) Energy metabolism of reticulocytes: two different sources of energy for Na/K ATPase activity. *Cell. Biochem. Func.* **12**: 107-112.

Kubala, M. (2006). ATP binding to P-type ATPase as revealed by biochemical spectrocospy and crystallographic experiments. *Proteins* **64**: 1-12.

Kültzer, D. & Ávila, K. (2001).Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol* **129B**: 821-829.

Kuntsweiler, T.A; Argüello, J.M. & Lingrel, J.B. (1996). Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase alpha subunit are cation coordinating residues. *J. Biol.Chem.* **271**: 29682-29687.

Kuster, B.; Shainskaya, A.; Pu, H. X.; Goldsheger, R.; Blostein, R.; Mann, M. & Karlish, S. J. (2000) A new variant of the γ subunit of renal Na,K-ATPase. Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 18441-18446.

Laufer H.; Borst, D.; Baker, F.C.; Reuter, C.C.; Tsai L.W.; Schooley, D.A.; Carrasco, C. & Sinkus, M. (1987) Identification of a Juvenile Hormone-Like compound in a crustacean. *Science*. **235**:202-205.

Laursen, H. & Diemer, N. H. (1997) Morphometric studies of rat glial cell ultrastructure after urease- induced hyperammonaemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **5**: 345-362.

Levenson, R. (1994) Isoforms of The Na,K- ATPase: Family members in search of function. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* **123**: 1-45.

Li, C.; Grosdidier, A.; Crambert, G.; Horisberger, J.D.; Michielin, O & Geering, K. (2004) Structural and functional interactions site between Na, K-ATPase and FXYD proteins. *J. Biol. Chem.* **279**: 38895- 38902.

Lignot, J. H.; Susanto, G.N.; Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G. (2005) Immunolocalization of Na,K-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* **319**: 331-339.

Lima, A. G.; McNamara, J. C. and Terra, W.R. (1997) Regulation of hemolymphn osmolytes and gill Na⁺,K⁺-ATPase activities during acclimatation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobachium olfersii* (Wiegmann 1836)(*Decapoda Palaemonidae*) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **215**; 81-91.

Lingrel, J. B. & Kuntzweiler, T. (1994) The Na/K ATPase. J. Biol. Chem. 268: 19659-19662.

Lingrel, J. B. (1992) Na/K ATPase. Isoforms structure, Functions and Expression. J. Bionerg. Biomem. 24: 263-270.

Lingrel, J. B.; Orlowsky, M. M.; Shull, J. & Price, E. M. (1990) Molecular genetics of Na,K- ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **38**: 37-89.

Lohrmann, D. M. & Kamemoto, F. I. (1987). The effect of dibutyryl cAMP on sodium uptake by isolated perfused gills of *Callinectes sapidus*. *Gen Comp Endocrinol*. **65**: 300-305.

Lovett D.L.; Verzi M.P.; Clifford P.D. & Borst D.W.(2001). Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol* **128A**:299-306.

Lovett, D. L. & Watts, S. A. (1995) Changes in polyamines in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **110B**: 115-119.

Lovett, D. L.; Cliford, P. D. & Borst, D. W.(1997) Physiological stress elevates levels of methyl farnesoate in the green crab *Carcinus maenas*. *Biol. Bull.* **193**: 266-267.

Lovett. D,L.; Tanner, C.A; Glomski, K.; Ricart, T.M. & Borst, D.W. (2006) The effect of seawater composition and osmolality on hemolymph levels of methyl farnesoate in the green crab *Carcinus maenas.Comp Biochem Physiol.* **143A**: 67-77.

Lucchesi, P. A. & Sweadner, K. J. (1991) Postnatal changes in Na,K- ATPase isoforms expression in rat cardiac ventricle. Conservation of Biphasic Ouabain Affinity. *J. Biol. Chem.* **266**: 9327-9331.

Lucu, C. & Devescovi, M. (1999). Osmoregulation and branchial Na,K-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater. *J. Exp. Mar. Biol. Ecology* **234**: 291- 304.

Lucu, C. & Flik, G. (1999) Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca2⁺ Exchange Activities in Gills of Hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am. J. Physiol.* **276** :R490 -R499.

Lucu, C. & Towle, D. W. (2003) Na⁺,K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacean. *Comp. Biochem. Physiol* **135A**; 195- 214.

Lucu, C. (1989). Evidence for Cl⁻ exchangers in perfused *Carcinus* gills. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**: 415- 420.

Lutsenko, S. & Kaplan, J. H. (1993) An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase β -subunit in cation occlusion. *Biochemistry* **32**: 6737-6743.

Mahmmoud, Y. A. & Cornelius, F. (2002) Protein kinase c phosphorylation of purified Na,K-ATPase: C-terminal phosphorylation sites at the α - and γ -subunit close to the inner face of the plasma membrane. *Biophys J.* **82**: 1907-1919.

Maia, J. C. C., Gomes, S. L. & Juliani, M. H. (1983) Genes and antigens of parasites- A laboratory manual proceedings. Morel, C. M., Ed., *FIOCRUZ*, Brasil, pg. 144-157.

Malik, N.; Canfield, V. A. C.; Beckers, M. C.; Gros, P. & Levenson, R. (1989) Identification of the mammalian Na,K-ATPase β 3 subunit. *J. Biol. Chem.* **127:** 835-845.

Mañanes, A. A.; Meligeni, C. D. & Goldemberg, A. A. (2002) Response to environmental salinity of Na^+, K^+ -ATPase activity in individual gills of euryhaline crab *Cytigrapsus angulatus. J. Experim. Mar. Biol. And Ecol.* **274**: 75-75.

Mantel, L. H. & Farmer, I. L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In The biology of Crustacea., vol 5 (ed. L. H. Mantel), pp 54-126. London: Academic Press.

Market, C. L., & Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**: 753-763.

Martinez, C. B. R.; Álvares, E. P.; Harris, R. R. & Santos, M. C. F. (1999) A morphological study on posterior gills of the mangrove crabs *Ucides cordatus*. *Tissue Cell* **31**: 380-389.

Masui, D.C. (2006). Caracterização cinética da (Na⁺,K⁺)-ATPase da fração microsomal de tecido branquial do siri *Callinectes danae* aclimatado a salinida de 15 $^{\circ}/_{oo}$. Tese de Doutorado. Departametro de Química, FFCLRP, USP.

Masui, D.C.; Furriel, R.P.; Silva, E. C. C.; Mantelatto, F. L.; McNamara, J. C.; Barrabin, H.; Scofano, H. M.; Fontes, C. F. & Leone, F. A. (2005). Gill microsomal (Na^+,K^+) -ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**: 2521-35.

Masui, D.C.; Furriel, R.P. M.; McNamara, J.; Mantellato, F.; Leone, F. (2002). Modulation by ammonium ions of gills microsomal (Na^+, K^+) -ATPase in the swimming cra *Callinectes danae*: A possile mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* **132C**: 471-482.

McDonough, A.; Geering, K. & Farley, R. A. (1990) The Sodium pump needs its β subunit. *FASEB J.* 4: 1598-1605.

McMahon, B. R. & Wilkens, J. L. (1983) Ventilation, perfusion and oxygen uptake. In: Mantel, L. Bliss D. (Eds), Biology of Crustacea, vol 6. Academic Press, New York, pp.: 289-372.

Melo, G. A. S. (1996) Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Editora Plêiade, São Paulo, pp. 1- 603.

Mercer, R. W. Biemesderfer, D.; Bliss, D. P.; Collins, J. H. & Forbush, B.Iii. (1993) Molecular cloning and imunological characterization of the γ polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **121**: 579-586.

Mercer, R.W. (1993) Structure of The Na,K-ATPase. Int. Rev. Cyt. 137: 139-168.

Middleton, J. P.; Khan, W. A.; Collinsworth, G.; hannun, Y.A. & Medford, R. M. (1991). Heterogeneit of protein kinase C- mediated rapid regulation of Na,K-ATPase in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 15958-15964.

Mo, J.L. & Greenway, P. (2001) cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor. Comp. Biochem. Physiol.* **129A**: 843-849.

Mo, J.L.; Devos, P. & Trausch, G. (1998) Dopamine as a modulator of ionic transport and Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. J. *Crustcean Biol.* **18**: 442- 448.

Mohraz, M.; Arystarkhova, E. & Sweadner, K. J. (1994) Immunoelectron microscopy of epitopes on Na/K ATPase catalytic subunit. implications for the transmembrane organization of the c-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 2929-2936.

Moller, J. V.; Juul B. & Le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochem. Biophys. Acta*, **1286**: 1-51.

Moreira, G. S.; Macnamara, J. C.; Shumway, S. E. & Moreira, P. S. (1983). Osmoregulatio n and respiratory metabolism in brazilian *Macrobachium* (Decapoda Palaemonidae) *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**: 57-62.

Morris, S. & Edwards, T. (1995) Control of osmoregulation via regulation of Na,K-ATPase activity of amphibious purple shore crab *Leptograpsus variengants*. *Comp. Biochem. Physiol.* **112C**: 129-136.

Morth, J.P.; Pedersen, B.; Toustrup-Jensen, M.S.; Sorensen, T. L. M.; Petersen, J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B. & Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**: 1043-1048.

Nagaraju, C.W. (2007) Is methyl farnesoate a crustacean hormone. *Aquaculture* **37:** 25-42.

Nakagawa, Y.; Rivera, V. & Larner, A. C. (1992) A Role for the Na^+/K^+ -ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription. *J. Biol. Chem.* **267**: 8785-8788.

Nathanson, J.A.; Scavone, C.; Scanlon, C. & Mckee, M. (1995) The cellular sodium pump as a site for carbon monoxide and glutamate: a mechanism of long- term modulation of cellular activity. *Neuron* **14**: 781-794.

Netticadan, T., Temsa, R.; Osada, M. & Dhalla, N.S.(1999). Status of $Ca^{2+}/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion.$ *Am J Physiol.***277**:C384-91.

Neufeld, D. S. & Cameron, J. (1993). Transepithelial movement of calcium in crustaceans. J. Exp. Biol. 184: 1-16.

Neufeld, D.; 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.

O'Brien, W. J.; Lingrel, J. B. & Wallick, E. T. (1994) ouabain binding kinetics of the rat $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**: 32-39.

Ogan, J.; Shaub, A.; Lovett, D. L. & Borst, D. W.(1997). Relationship of methyl transferase activity and methyl farnesoate levels in the spider crab *Libinia emarginata*. *Biol. Bull.* **193**: 267-268.

Onken, H. & Riestenpatt, S. (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanism and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol* **119A**: 883-893.

Onken, H.; Tresguerres, M. & Luquet, C. M. (2003) Active NaCl absorption across gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. J. Exp. Biol. **206**: 1017-1023.

Orlowski, J. & Lingrel, J. B. (1988) tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit. *J. Biol. Chem.* **263**: 10436- 10442.

Patchornik G.; Munson, K.; Goldshleger, R.; Shainskaya, A.; Sachs, G. & Karlish S. J. (2002). The ATP-Mg²⁺ binding site and cytoplasmic domain interactions of Na⁺, K⁺- ATPase investigated with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *Biochemistry* **41**: 11740- 11749.

Pedemonte, C. H. & Beuage, L. (1983). Inhibition of (Na^+,K^+) -ATPase by magnesium ions and inorganic phosphate and release of these ligands in the cycles of ATP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Acta* **748**: 245-253.

Pedemonte, C. H.; Presley, T. A.; Cinelli, A. R. Lokh, E. V. & Wala, M. F. (1997) Stimulation of protein kinase c rapidly reduces intracellular Na^+ concentration via activation of the Na^+ pump in OK cells. *Mol. Pharmacol.* **52**: 88-97.

Pedersen, P. L. & Carafoli, E. (1987) Ion Motive ATPases. I. ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* **12:** 146-150.

Peng, M.; Huang, L.; Xie, Z.; Huang, W. & Askari, A. (1996) Partial inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by ouabain induced the Ca^{2+} -dependent expression of early-response genes in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 10372-10378.

Péqueux, A. & Gilles, R. (1981) Na⁺- fluxes across isolated perfused gills pf the Chinese crab *Eriocher sinensis. J. Exp. Biol.* **92**: 173-186.

Péqueux, A. & Lignon (1995). Osmotic regulation of crustaceans. J. Crust. Biol. 15: 1-60.

Péqueux, A.; Gilles, R. & Marshall, W.S. (1989). NaCl transport in gills and related structures. In: Greger, R. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 1. Springer, Berlin, pp. 1-73.

Peterson, G.L.; Ewing, R. D.; Hootman, S.R.; Conte, F. P. (1978). Large-scale partial purification and molecular and properties or the (Na^+,K^+) -activated adenosine triphosphatase from *Artemia salina* nauplii. *J. Biol. Chem.* **253**; 4762-4770.

Peterson, G.L.; Hokin, L.E.(1981). Molecular weight and stoichiometry of the sodiumand-potassium-activated adenosine triphosphatase subunits. *J. Biochem. Chem.* **256**: 3751-3761.

Pihakaski- Maunsbach, K.; Tokonabe, S.; Vorum, H., Rivard, C. J.; Capasso, J. M.; Berl, T. & Maunsbach, A. B. (2005). The γ subunit of Na,K-ATPase is incorporated into plasma membranes of mouse IMCD3 cells in response ti hypertonicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**: F650- F657.

Piller, S. C.; henry, R. P.; Doeller, J. E. & Kraus, D. W. (1995)A comparision of the gill physiology of two euryhaline crabs species, *Callinectes sapidus* and *Callinects simlis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp. Biol.* **198**; 349- 358.

Pontiggia, L.; Winterhalter, K. & Gloor, S. M. (1998) Inhibition of Na,K-ATPase activity by cgmp is isoform- specific in brain endothelial cells. *FEBS Lett.* **436**: 470.

Potts, W. T. W. & Parry, G. (1964). Osmotic and ionic regulation in animals. Pergamon Press, Oxford.

Pressley, T.A. (1992). Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within α -subunit of Na⁺, K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol.* **262**; C743-C751.

Pressley, T.A.; Graves, J.S. & Krall, A. R. (1981). Amiloride-sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. *Am. J. Physiol.* **241**: R370- R 378.

Pu, H. X.; Cluzeaud, F.; Golfsherger, R.; Karlish, S. J.; Farman, N. & Blostein, R. (2001)Functional role and immunocytochemical localization of the gamma a and gamma b forms of the Na,K-ATPase gamma subunit. *J Biol Chem.* **276**:20370-20378.

Pu, H.X.; Scanzano, R. & Blostein, R. (2002) Distintic regulatory effects of the Na,K-ATPase γ subunit. *J. Biol. Chem.* **277**: 20270- 20276.

Rathmayer, M. & Siebers, D. (2001). Ionic balance in the freshwater-adapted Chinese crab, *Eriocher sinensis. J. Comp. Physiol.* **171B**: 271-281.

Reeves, A. S.; Collins, J. H. & Schartz, A. (1980). Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid.*Biochem Biophys Res Commun.* **95**:1591-8.

Regnault, M. (1987) Nitrogen excretion in marine and fresh- water crustacea. *Biol. Rev.* **62**: 1-24.

Riestenpatt, S.; Onken, H. & Siebers, D. (1996) Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gills epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion flux studies. *J. Exp. Biol.* **188**: 159-174.

Rivas, E; Lew, V. & De Robertis, E.(1972) (3 H) Ouabain binding to a hydrophobic protein from electroplax membranes.*Biochim Biophys Acta*. **290**:419-23.

Rossi, G.; Manunnta, P.; Hamly, J. M.; Pavan, E.; Detni, R.; Semplicini, A. & Pessina, A.C. (1995) Endogenous ouabain in primary aldoteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels. *J. Hypertens.* **13**: 1181-1191.

Santos, L. C.; Belli, N. M.; Augusto, A.; Masui, D. C.; Leone, F. A.; McNamara, J. C. & furriel, R. P. M. (2000) Gill (Na^+/K^+) -ATPase in diadromous freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and α subunit expression. *Comp. Biochem. Physiol*

Saravazyan, N.Z.; Nvanov, A.; Modyanov, M. M. & Askari, A. (1997) ligandsensitivity interactins among transmembrane helices of Na,K-ATPase *J. Biol. Chem.* **272**: 7855-7858. Sarver, R.G., Flynn, M. A., Holliday, C. W. (1994). Renal Na, K-ATPase and osmoregulation in crayfish, *Procamarus clarkii. Comp. Biochem. Physiol.* **107A**: 349-356.

Scheiner-Bobis, G. (2002). The Sodium Pump. Its molecular properties and mechanism of ion transport. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2424-2433.

Scheleich, C.E.; Goldemberg, L.A. & Mananes, A.A.L. (2001) Salinity dependence Na, K-ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Crasmagnathus granulate*. *Gen. Physiol. Biophys.* **20**: 255-266.

Schoner, W. & Scheiner-Bobis, G (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am J Cardiovasc Drugs*.7:173-89.

Siebers, D., Winkler, A., Leweck, K.; Madian, A. (1983). Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constants and changing salinities. *Helgoänder Meeresunters* **36**: 303-312.

Siebers, D.; Riestenpatt, S.; Weihrauch, D. & Lucu, C. (1995). Exkretion von Stickstoff über die Kiemen der Strandkrabbe *Carcinus maenas. Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **88**, 134.

Silva E.C.C.; Masui, D. C.; Furriel, R. P.; Mantelatto F. L.; McNamara, J. C.; Barrabin, H; Leone F. A; Scofano, H. M & Fontes C. F. L. (2008). Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae).*Comp. Biocem. Physiol.*

Silva, E. C. C. (2003) Efeito de poliaminas e proteínas cinases na Na,K-ATPase das brânquias de *Callinectes danae*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica/ICB/UFRJ.

Skou, J. C. & Esmann, M. (1992). The Na⁺/K⁺ATPase. *J. Bionerg. and Biomembr.* 24: 249-261.

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on a adenosine triphosphatase, from nerve peripheral nerve. *Biochim. Biophys. Acta* **23**: 394-401.

Skou, J. C. (1998) The identification of Sodium- Potassium pump (Nobel Lecture) *AngeewandeChemie* **37**: 2320-2328.

Sommer, M. J. & Mantel, L. H. (1991). Effects of dopamine and acclimatation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of green crab *Carcinus maenas, Gen. Comp. Endocrinol.* **82**: 364-368.

Sommer, M. J. & Mantel, L. H. (1988) Effect of dopamine, cyclic AMP, and pericardial prgans to sdium uptake and Na,K-ATPase activity in gills of te green crab *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool*: **248**: 272-277.

Spaargaren, D. H. (1990) The effect of environmental ammonia concentrations on the ion-exchange of shore crabs, *Carcinus maenas Comp. Biochem. Physiol.* **97C**: 87-91.

Charmantier, G. (2000) Involvement of Crustaceans Hyperglycemic Hormone in the Control of Gill Transport in te Crab *Pachygrapsus mamoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol*. **119**: 340- 350.

Stokes, D. L.; Taylor, W.R. & Green, N. M. (1994) Structure, Transmembrane Topology and Helix Packing of P- Type Ion Pumps. *FEBS Lett.* **346**: 32-38.

Sun, D.Y.; Guo, J.Z.; Hartmann, H.A.; Uno, H.; Hokin, L. E. (1992). Differential expression of the alpha 2 and beta messenger RNAs of Na,K-ATPase in developing brine shrimp as measured by in situ hybidrization. *J. histochem. Cytichem.* **40**:555-562.

Sweadner, K. J. & Donnet, C. (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA. *Biochem. J.* **3565**: 685-704.

Sweeney, G. & Klip, A. (1998) Regulation of The Na/K ATP by Insulin: Why and How? *Mol. Cell. Biochem.* **182**: 121 – 133.

Taniguchi, K.; Kaya, S.; Abe, K. & Mardh, S. (2001) The oligomeric nature of Na/K transport ATPase. *J. Biochem.* **129:** 335- 342.

Tanoue, K.; Kaya, S.; Hayashi, Y.; Abe, K.; Imagawa, T.; Taniguchi, K. & Sakaguchi, K. (2006) New evidence for ATP binding induced catalytic subunit interactions in pig kidney Na/K-ATPase. *J Biochem* **140**: 599-607

Therien, A.G. & Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. **279**: C541-66

Therien, A.G.; Karlish, S. J. D. & Blostein, H. (1999) Expression and functional role of the γ subunit of the Na,K-ATPase In Mammalian Cells. *J. Biol. Chem* **274**: 12252-12256.

Therien, A.G.; Goldshleger, R. Karlish, S. J. D. & Blostein, R. (1997) Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 32628-32634.

Therien, A.G.; Pu, H. X.; Karlish, S. J. & Blostein, R. (2001) Molecular and functional studies of the γ subunit of the sodium pump. *J Bioenerg Biomembr.* **33**:407-14.

Thomas, R.; Gray, P. & Rews, J. (1990) Digitalis: Its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Adv. Drug Res.* **19:** 311- 562.

Towle, D. W. & Hølleland, T. (1987). Ammonium ion substitutes for K^+ in ATP-dependent Na⁺ transport by basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **252**,R479 - R489.

Towle, D. W. & Kays, W. T. (1986). Basolateral localization of Na^++K^+ -ATPase in gills epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* **239**,311-318

Towle, D. W. & Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *Am. Zool* **41**: 770-780.

Towle, D. W. (1993) Ion Transport systems in membrane vesicles isolated from crustaceans tissues. *J. Exp. Zool.* **265**: 387-396.

Towle, D. W. (1997) Molecular approaches to understanding salinity adaptation of estuarine animals. *Amer. Zool.* **37**: 575-584.

Towle, D. W.; Paulsen, R. S.; Weihrauch, D.; Kordylewski, M.; Salvador, C.; Lignot, J. H. & Spanings-Pierrot, C. (2001). Na⁺+K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* **204**: 4005 -4012.

Towle, D.W. (1990) Sodium transport system in gills. In: kinne, R. K. H. (Ed), Comparative aspects of sodium cotransport system. Karger Publishing, Basel, pp. 241-263.

Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. & Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the Calcium Pump of Sarcoplasmic Reticulum at 2.6 A Resolution. *Nature* **405**: 647-655.

Tresguerres, M.; Onken, H.; Perez, A. F.; Luquet, C. A. (2003) Electrophysiology of posterior, NaCl-absoring gills of *Chasmagnathus granulatus*: rapid response to osmotic Variations. *J. Exp. Biol.* **206**: 619- 626.

Vilsen, B. & Andersen, J. P. (1998) Mutation to the glutamate in the fourth membrane segments of Na^+,K^+ -ATPase and $Ca2^+$ -ATPase affects cation binding from both insides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. *Biochemistry* **273**: 12944-12948.

Wanson, S.A.;Péqueux, A.; Roer, R.D.; (1984). Na⁺ regulation and Na⁺,K⁺-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax*. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A**; 673-678.

Weber, LI & Levy, J. A. (2000) Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* **420**; 203-210.

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 ammoniun across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol.* **168B**; 364-376.

Weihrauch, D.; Ziegler, A.; Siebers, D. & Towle, D.W. (2001) Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (β - subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* **204**: 25-37.

Weihrauch, D.;Ziegler,A.; Siebers, D. & Towle, D. W. (2002). Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas:* Participation of Na⁺,K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J. Exp. Biol.* **205**: 2765-2775.

Weilrauch, D.; Morris, S. & Towle, D. W. (2004) Ammonia excretion in aquatic and terestrial crabs. *J. Exp. Biol.* **207**: 4491- 4504.

Weiraulch, D.; Ziegler, A.; Siebers, D. & Towle, D. W. (2002) Active excretion of ammonium across the gills of the shore crab *Carcinus maenas*:participation of Na+/K+-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J. Exp. Biol.* **205**: 2765-2775.

Wheathly, M. G. (1999) Physiology response of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) to environmental hyperoxia. I. Extracellular acid-base and electrolyte status and transbranchial exchange. *J. Exp. Biol.* **207**: 4623-4631.

Wheatly, M. G.; ZAnnotto, F. P. & Hubbard, M. G. (2002). Calcium homeostase in crustacean: subcellular Ca dynamics. *Comp. Biochem. Physiol.* **132B**: 163-178.

Wilder, M.N.; Do, T. T.; Atmomarsono, M.; tran, T.T.; Truong, Q. P.; Yang, W. J. (2000). Characterization of Na,K-ATPase in *Macrobachium rosenbergii* and the effect of changing salinity on enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **125A**; 377-388.

Williams, A. B. (1974) Swimming crabs of genus *Callinectes* (Decapoda-Portunidae) *Fish Bull* **72**: 685-768.

Winkler, A. (1986). Effet of inorganic sweater constituents on Branchial Na,K-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* **92**: 537-544.

Woo, A. L.; James, P. F. & Lingrel, J. B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na-K ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 20693- 20699.

Wood, C. M.; Matsuo, A. Y.; Gonzalez, R. J.; Wilson, R. W.; Patrick, M. L. & Val, A. L.(2002). Mechanism of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater eslamobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *J. Exp. Biol.* **205**: 3039-3054.

Wyattt, G. R. & Davey, K. G. (1996) Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Role of juvenile hormone in adult insect. *Adv. Insect Physiol.* **26**: 1-155.

Xie, Z. (2001) Ouabain interection with cardiac Na/KATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. *Cell. Mol. Biol.* **47**: 383-390.

Yamomoto, K.; Chadarevian, A. & Pellegrini, M. (1988). Juvenile hormone action mediated in male acessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science*. **239**: 916-919.

Young-Lai, W. W.; Charmantier-Daures, M. & Charmantier, G. (1991). Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. *Mar. Biol.* **110**,293 -300.

Zare, S. & Greenaway, P. (1998) The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**: 739-745.

Zouzoulas, A.; Therien, A. G.; Scanzo, R.; Deber, C. M. & Blostein, R. (2003). Modulation of Na,K-ATPase by the γ subunit: studies with transfected cells and transmembrane mimetic peptides. *J. Biol. Chem.* **278**: 40437-40441.

8 - Anexos

Available on line at www.sciencedirect.com



e



The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (2005) 2521-2535

www.elsevier.com/locate/biocel

Gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites

D.C. Masui^a, R.P.M. Furriel^a, E.C.C. Silva^c, F.L.M. Mantelatto^b, J.C. McNamara^b, H. Barrabin^c, H.M. Scofano^c, C.F.L. Fontes^c, F.A. Leone^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,

Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil

^b Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil

° Departamento de Bioquímica Médica, ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 14 March 2005; received in revised form 20 May 2005; accepted 6 June 2005

Abstract

Euryhaline crustaceans tolerate exposure to a wide range of dilute media, using compensatory, ion regulatory mechanisms. However, data on molecular interactions occurring at cationic sites on the crustacean gill (Na⁺,K⁺)-ATPase, a key enzyme in this hyperosmoregulatory process, are unavailable. We report that Na⁺ binding at the activating site leads to cooperative, heterotropic interactions that are insensitive to K⁺. The binding of K⁺ ions to their high affinity sites displaces Na⁺ ions from their sites. The increase in Na⁺ ion concentrations increases heterotropic interactions with the K⁺ ions, with no changes in K_{0.5} for K⁺ ion activation at the extracellular sites. Differently from mammalian (Na⁺,K⁺)-ATPases, that from *C. danae* exhibits additional NH₄⁺ ion binding sites that synergistically activate the enzyme at saturating concentrations of Na⁺ and K⁺ ions. NH₄⁺ binding is cooperative, and heterotropic NH₄⁺ ion interactions are insensitive to Na⁺ ions, but Na⁺ ions displace NH₄⁺ ions from their sites. Mg²⁺ ions modulate enzyme stimulation by NH₄⁺ ions, displacing NH₄⁺ ion from their sites. Mg²⁺ ion smodulate enzyme stimulation by NH₄⁺ ions, displacing NH₄⁺ ion from its sites. These interactions may modulate NH₄⁺ ion excretion and Na⁺ ion uptake by the gill epithelium in euryhaline crustaceans that confront hyposmotic media.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: (Na⁺,K⁺)-ATPase; ATPase activity; Gill microsomes; Callinectes danae; Blue crab

1. Introduction

* Corresponding author. Tel.: +55 16 602 3668; fax: +55 16 633 8151.

E-mail address: fdaleone@ffclrp.usp.br (F.A. Leone).

1357-2725/8 - see front matter © 2005 Published by Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biocel.2005.06.004

The (Na⁺,K⁺)-ATPase (E.C.3.6.1.37) belongs to the P₂ ATPase family that forms an acyl-phosphate intermediate during the reaction cycle (for review, see Geering, 2000; Jorgensen & Pedersen, 2001). The most

extensively studied (Na⁺,K⁺)-ATPase isoenzymes are those of the mammals. The overall reaction mechanism proposed for enzyme activity consists of at least two different conformations, each of which can exist in either a phosphorylated or a dephosphorylated form (Horisberger, 2004). Such conformations have been denominated E1, with a high affinity for intracellular Na⁺ ions, and E2, with a high affinity for extracellular K⁺ ions. Cycling between the E1 and E2 forms results in the transport of three Na⁺ ions and two K⁺ ions across the cell membrane, at the expense of hydrolysis of a single ATP molecule. ATP, and three Na⁺ ions, in that order, bind to the enzyme from the cytoplasm, and the enzyme is phosphorylated by ATP in a Na⁺-dependent manner. A conformational change thus occurs, and the Na⁺ binding sites become exposed to the extracellular luminal surface. The three Na⁺ ions, now bound with low affinity, are released, and two, extracellular K⁺ ions bind with high affinity to the phosphoenzyme. One of the Na⁺ ions may be released before the others. Dephosphorylation, followed by ATP binding, is accompanied by a major conformational change that allows K⁺ ion release to the cytoplasm (Andersen & Vilsen, 1995; Jorgensen, Nielsen, Rasmussen, & Pedersen, 1998; Lingrel & Kuntzweiler, 1994). In mammals, extracellular Na+ ions act both as an allosteric modulator and as a low-affinity, competitive inhibitor of K⁺ ion binding at the extracellular surface (Balshaw, Millette, Tapperman, & Wallick, 2000; Sachs, 1977). K⁺ ions competitively inhibit Na⁺ ion transport on the cytoplasmic side of the membrane (Apell & Marcus, 1986). While free ATP and ADP also bind to the enzyme, the Mg2+ ion is a co-factor required for enzyme phosphorylation and catalysis, either as a Mg2+-nucleotide complex (Fedosova & Easmann, 2004; Hilge, Siegal, Vuister, Güntert, Gloor, & Abrahams, 2003) or in the form of free Mg2+ ions at a distinct, divalent cation site (Jorgensen & Pedersen, 2001; Kuntzweiler, Wallick, Johnson, & Lingrel, 1995). In elevated concentrations, free Mg^{2+} ions strongly inhibit the enzyme ($K_{0.5}$ of about 10 mM), binding to the E2K form, and decreasing affinity for ATP at the releasing step (Fontes, Barrabin, Scofano, & Norby, 1992; Forbush, 1987; Pedemonte & Beaugé, 1983). NH4⁺ ions can substitute for K⁺ ions at the transport sites on the enzyme (Jorgensen & Pedersen, 2001; Robinson, 1970).

Most marine crustaceans are essentially isoosmotic with the surrounding seawater, and employ Na⁺ and Cl- ions as their primary hemolymph osmolytes (Lucu, 1990). Euryhaline marine species, however, penetrate into estuarine waters, utilizing gill ion-pumping mechanisms to compensate for diffusive ion loss, thus maintaining osmotic equilibrium. The hyperosmoregulating crab, Callinectes danae, is a large, euryhaline brachyuran of commercial interest distributed in shallow waters of the Western Atlantic from Florida to southern Brazil (Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001). The crab inhabits estuaries, mangroves and bays, and is commonly found on sand or silt substrates. Individual crabs move among water masses of variable salinity (Guerin & Stickle, 1997; Williams, 1974), although adult crabs are frequently found in waters of moderate salinity (28-35‰), influenced by continental freshwater runoff during the southern summer (Mantelatto & Fransozo, 1999, 2000).

The gill epithelial cells play a central role in the ionoregulatory processes of crustaceans (Péqueux, 1995). C. danae possesses eight, laterally disposed, gill pairs. Thin epithelial cells predominate in the anterior gills, while thick cells or ionocytes, whose membrane surface is highly amplified by apical folds and basolateral invaginations, involved in ion transport, predominate in the posterior gills (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Henry & Wheatly, 1992; Péqueux, 1995; Towle & Kays, 1986). In such hyperosmoregulating crabs, the posterior gills act as a selective interface that actively absorbs Na⁺ and Cl⁻ ions from dilute media (Lucu & Towle, 2003; Péqueux, 1995). Although it is wellestablished that the (Na⁺,K⁺)-ATPase is housed at the basolateral surface of the gill epithelial cells, and apparently powers hyper-regulation in dilute media, cation movement across the gill epithelium is still not well understood. Apical Na⁺/H⁺ and Na⁺,K⁺/2Cl⁻ exchangers have been implicated in the movement of Na⁺ ions from the external medium into the cytoplasm in animals from brackish waters; a V-ATPase and a sodium channel also appear to be involved in osmoregulatory ion uptake across the gill epithelia of freshwatertolerant crab species (Onken, Tresguerres, & Luquet, 2003; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch, Ziegler, Siebers, & Towle, 2001). Although the expression of Na⁺/H⁺ and Na⁺,K⁺/2Cl⁻ exchangers, V-ATPase and Na⁺-channels in crab gill tissue is now well established, their exact localization in the gill epithelium remains to be established (Weihrauch, Morris, & Towle, 2004), and may vary among species (Weihrauch et al., 2004).

extensively studied (Na⁺,K⁺)-ATPase isoenzymes are those of the mammals. The overall reaction mechanism proposed for enzyme activity consists of at least two different conformations, each of which can exist in either a phosphorylated or a dephosphorylated form (Horisberger, 2004). Such conformations have been denominated E1, with a high affinity for intracellular Na⁺ ions, and E2, with a high affinity for extracellular K⁺ ions. Cycling between the E1 and E2 forms results in the transport of three Na⁺ ions and two K⁺ ions across the cell membrane, at the expense of hydrolysis of a single ATP molecule. ATP, and three Na⁺ ions, in that order, bind to the enzyme from the cytoplasm, and the enzyme is phosphorylated by ATP in a Na⁺-dependent manner. A conformational change thus occurs, and the Na⁺ binding sites become exposed to the extracellular luminal surface. The three Na⁺ ions, now bound with low affinity, are released, and two, extracellular K⁺ ions bind with high affinity to the phosphoenzyme. One of the Na⁺ ions may be released before the others. Dephosphorylation, followed by ATP binding, is accompanied by a major conformational change that allows K⁺ ion release to the cytoplasm (Andersen & Vilsen, 1995; Jorgensen, Nielsen, Rasmussen, & Pedersen, 1998; Lingrel & Kuntzweiler, 1994). In mammals, extracellular Na+ ions act both as an allosteric modulator and as a low-affinity, competitive inhibitor of K⁺ ion binding at the extracellular surface (Balshaw, Millette, Tapperman, & Wallick, 2000; Sachs, 1977). K⁺ ions competitively inhibit Na⁺ ion transport on the cytoplasmic side of the membrane (Apell & Marcus, 1986). While free ATP and ADP also bind to the enzyme, the Mg2+ ion is a co-factor required for enzyme phosphorylation and catalysis, either as a Mg2+-nucleotide complex (Fedosova & Easmann, 2004; Hilge, Siegal, Vuister, Güntert, Gloor, & Abrahams, 2003) or in the form of free Mg2+ ions at a distinct, divalent cation site (Jorgensen & Pedersen, 2001; Kuntzweiler, Wallick, Johnson, & Lingrel, 1995). In elevated concentrations, free Mg^{2+} ions strongly inhibit the enzyme ($K_{0.5}$ of about 10 mM), binding to the E2K form, and decreasing affinity for ATP at the releasing step (Fontes, Barrabin, Scofano, & Norby, 1992; Forbush, 1987; Pedemonte & Beaugé, 1983). NH4⁺ ions can substitute for K⁺ ions at the transport sites on the enzyme (Jorgensen & Pedersen, 2001; Robinson, 1970).

Most marine crustaceans are essentially isoosmotic with the surrounding seawater, and employ Na⁺ and Cl- ions as their primary hemolymph osmolytes (Lucu, 1990). Euryhaline marine species, however, penetrate into estuarine waters, utilizing gill ion-pumping mechanisms to compensate for diffusive ion loss, thus maintaining osmotic equilibrium. The hyperosmoregulating crab, Callinectes danae, is a large, euryhaline brachyuran of commercial interest distributed in shallow waters of the Western Atlantic from Florida to southern Brazil (Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001). The crab inhabits estuaries, mangroves and bays, and is commonly found on sand or silt substrates. Individual crabs move among water masses of variable salinity (Guerin & Stickle, 1997; Williams, 1974), although adult crabs are frequently found in waters of moderate salinity (28-35‰), influenced by continental freshwater runoff during the southern summer (Mantelatto & Fransozo, 1999, 2000).

The gill epithelial cells play a central role in the ionoregulatory processes of crustaceans (Péqueux, 1995). C. danae possesses eight, laterally disposed, gill pairs. Thin epithelial cells predominate in the anterior gills, while thick cells or ionocytes, whose membrane surface is highly amplified by apical folds and basolateral invaginations, involved in ion transport, predominate in the posterior gills (Copeland & Fitzjarrell, 1968; Henry & Wheatly, 1992; Péqueux, 1995; Towle & Kays, 1986). In such hyperosmoregulating crabs, the posterior gills act as a selective interface that actively absorbs Na⁺ and Cl⁻ ions from dilute media (Lucu & Towle, 2003; Péqueux, 1995). Although it is well established that the (Na⁺,K⁺)-ATPase is housed at the basolateral surface of the gill epithelial cells, and apparently powers hyper-regulation in dilute media, cation movement across the gill epithelium is still not well understood. Apical Na⁺/H⁺ and Na⁺,K⁺/2Cl⁻ exchangers have been implicated in the movement of Na⁺ ions from the external medium into the cytoplasm in animals from brackish waters; a V-ATPase and a sodium channel also appear to be involved in osmoregulatory ion uptake across the gill epithelia of freshwatertolerant crab species (Onken, Tresguerres, & Luquet, 2003; Towle & Weihrauch, 2001; Weihrauch, Ziegler, Siebers, & Towle, 2001). Although the expression of Na⁺/H⁺ and Na⁺,K⁺/2Cl⁻ exchangers, V-ATPase and Na⁺-channels in crab gill tissue is now well established, their exact localization in the gill epithelium remains to be established (Weihrauch, Morris, & Towle, 2004), and may vary among species (Weihrauch et al., 2004).

10 Microcon filter and washed five times with the same buffer at 14,000 rpm at 4 °C for 15 min each to complete depletion of ammonium ions (tested with the Nessler reagent). Finally, the pellet was resuspended in the original volume. For PGK and GAPDH, the suspension was treated as above with 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.5, containing 1 mM DTT. The dibarium salt of ATP (100 mg/mL water) was converted to the free acid form using a BioRad AG50W-X8 ion exchanger (400 mg) and neutralized to pH 7.5 with 50 μ L triethanolamine (d=1.12 g/mL). Glyceraldehyde-3-phosphate was prepared by hydrolysis of 3-PGDA with 150 µL HCl (d=1.18 g/mL) in a boiling-water bath for 2 min, and neutralized with 50 µL triethanolamine. When necessary, enzyme solutions were concentrated on YM-10 Amicon Centriflo cones or Microcon filters.

2.2. Gill excision

Adult, intermolt specimens of C. danae were collected using double rig trawl nets from Ubatuba Bay (23°26'S, 45°02'W), São Paulo State (Brazil). The crabs were transported to the laboratory, maintained in tanks containing aerated seawater (33‰ salinity, 25 °C) for 2-7 days and fed on alternate days with shrimp tails. Crab fresh body weight was 73.9 ± 17.3 g while carapace width, measured between the penultimate and last lateral spines, was 82.0 ± 5.65 mm. For each homogenate prepared, 5-8 crabs were anesthetized by chilling in a freezer (-20 °C) and sacrificed by quickly removing the entire carapace. Gill pairs 6, 7, and 8 were rapidly excised and placed in 10 mL ice-cold, 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, containing 250 mM sucrose, 6 mM EDTA and the protease inhibitor cocktail (homogenization buffer).

2.3. Preparation of the gill microsomal fraction

Microsomal fractions were prepared as described elsewhere (Masui et al., 2003). Briefly, gills were rapidly diced and homogenized in homogenization buffer (20 mL/g wet tissue) using a Potter homogenizer. After centrifugation of the crude extract at $20,000 \times g$ for 35 min at 4 °C, the supernatant was placed on crushed ice, and the pellet was resuspended in an equal volume of homogenization buffer. After further centrifugation as above, the two supernatants were pooled and centrifuged at $100,000 \times g$ for 2 h at 4 °C. The resulting pellet was resuspended in 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, containing 250 mM sucrose (10 mL buffer/g wet tissue). Finally, 0.5 mL aliquots were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C. No appreciable loss of activity was seen after 2-month storage at -20 °C or after 6 h in a crushed ice bath. When required, the aliquots were thawed, placed on crushed ice and used immediately.

2.4. Measurement of ATPase activity in the gill microsomal fraction

ATPase activity was assayed at 25 °C using the PK/LDH linked system in which the hydrolysis of ATP was coupled to the oxidation of NADH according to Furriel, McNamara, & Leone (2000). The oxidation of NADH was monitored at 340 nm (\$240 nm, pH 7.5=6200 mol⁻¹ L cm⁻¹) in a Hitachi U-3000 spectrophotometer equipped with thermostatted cell holders. Standard conditions were: 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.14 mM NADH, 2.0 mM PEP, 82 µg PK (49 U) and 110 µg LDH (94 U) in a final volume of 1.0 mL. Alternatively, ATPase activity was estimated using a GAPDH/PGK linked system coupled to the reduction of NAD+ at 340 nm (Furriel et al., 2000). Standard conditions were: 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM NAD⁺, 0.5 mM sodium phosphate, 1 mM G3P, 150 µg GAPDH (12 U) and 20 µg PGK (9 U) in a final volume of 1 mL. ATPase activity was also assayed at 25 °C after 10 min pre-incubation of the preparation with alamethicin (1 mg/mg protein) to demonstrate the presence of leaky and/or disrupted vesicles (Furriel et al., 2000). Activity was also measured as above in the presence of 2 mM ouabain. The difference in measured activity in the absence or presence of ouabain was considered to represent the (Na+,K+)-ATPase activity.

Controls without added enzyme were included in each experiment to quantify the non-enzymatic hydrolysis of substrate. The initial velocities were constant for at least 15 min provided that less than 5% NADH (or NAD⁺) was oxidized (reduced). In some cases, activity was measured directly by adding 2 mM [γ^{32} P] ATP, and the ³²Pi released was estimated using activated charcoal according to Grubmeyer & Penefsky 2524

10 Microcon filter and washed five times with the same buffer at 14,000 rpm at 4 °C for 15 min each to complete depletion of ammonium ions (tested with the Nessler reagent). Finally, the pellet was resuspended in the original volume. For PGK and GAPDH, the suspension was treated as above with 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.5, containing 1 mM DTT. The dibarium salt of ATP (100 mg/mL water) was converted to the free acid form using a BioRad AG50W-X8 ion exchanger (400 mg) and neutralized to pH 7.5 with 50 μ L triethanolamine (d=1.12 g/mL). Glyceraldehyde-3-phosphate was prepared by hydrolysis of 3-PGDA with 150 µL HCl (d=1.18 g/mL) in a boiling-water bath for 2 min, and neutralized with 50 µL triethanolamine. When necessary, enzyme solutions were concentrated on YM-10 Amicon Centriflo cones or Microcon filters.

2.2. Gill excision

Adult, intermolt specimens of C. danae were collected using double rig trawl nets from Ubatuba Bay (23°26'S, 45°02'W), São Paulo State (Brazil). The crabs were transported to the laboratory, maintained in tanks containing aerated seawater (33‰ salinity, 25 °C) for 2-7 days and fed on alternate days with shrimp tails. Crab fresh body weight was 73.9 ± 17.3 g while carapace width, measured between the penultimate and last lateral spines, was 82.0 ± 5.65 mm. For each homogenate prepared, 5-8 crabs were anesthetized by chilling in a freezer (-20 °C) and sacrificed by quickly removing the entire carapace. Gill pairs 6, 7, and 8 were rapidly excised and placed in 10 mL ice-cold, 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, containing 250 mM sucrose, 6 mM EDTA and the protease inhibitor cocktail (homogenization buffer).

2.3. Preparation of the gill microsomal fraction

Microsomal fractions were prepared as described elsewhere (Masui et al., 2003). Briefly, gills were rapidly diced and homogenized in homogenization buffer (20 mL/g wet tissue) using a Potter homogenizer. After centrifugation of the crude extract at $20,000 \times g$ for 35 min at 4 °C, the supernatant was placed on crushed ice, and the pellet was resuspended in an equal volume of homogenization buffer. After further centrifugation as above, the two supernatants were pooled and centrifuged at $100,000 \times g$ for 2 h at 4 °C. The resulting pellet was resuspended in 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, containing 250 mM sucrose (10 mL buffer/g wet tissue). Finally, 0.5 mL aliquots were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C. No appreciable loss of activity was seen after 2-month storage at -20 °C or after 6 h in a crushed ice bath. When required, the aliquots were thawed, placed on crushed ice and used immediately.

2.4. Measurement of ATPase activity in the gill microsomal fraction

ATPase activity was assayed at 25 °C using the PK/LDH linked system in which the hydrolysis of ATP was coupled to the oxidation of NADH according to Furriel, McNamara, & Leone (2000). The oxidation of NADH was monitored at 340 nm (\$240 nm, pH 7.5 = 6200 mol⁻¹ L cm⁻¹) in a Hitachi U-3000 spectrophotometer equipped with thermostatted cell holders. Standard conditions were: 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.14 mM NADH, 2.0 mM PEP, 82 µg PK (49 U) and 110 µg LDH (94 U) in a final volume of 1.0 mL. Alternatively, ATPase activity was estimated using a GAPDH/PGK linked system coupled to the reduction of NAD+ at 340 nm (Furriel et al., 2000). Standard conditions were: 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM NAD⁺, 0.5 mM sodium phosphate, 1 mM G3P, 150 µg GAPDH (12 U) and 20 µg PGK (9 U) in a final volume of 1 mL. ATPase activity was also assayed at 25 °C after 10 min pre-incubation of the preparation with alamethicin (1 mg/mg protein) to demonstrate the presence of leaky and/or disrupted vesicles (Furriel et al., 2000). Activity was also measured as above in the presence of 2 mM ouabain. The difference in measured activity in the absence or presence of ouabain was considered to represent the (Na+,K+)-ATPase activity.

Controls without added enzyme were included in each experiment to quantify the non-enzymatic hydrolysis of substrate. The initial velocities were constant for at least 15 min provided that less than 5% NADH (or NAD⁺) was oxidized (reduced). In some cases, activity was measured directly by adding 2 mM [γ^{32} P] ATP, and the ³²Pi released was estimated using activated charcoal according to Grubmeyer & Penefsky

2526

D.C. Masui et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (2005) 2521-2535



Fig. 2. Stimulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the microsomal fraction from the gill tissue of C. danae by potassium and sodium ions. The activity was assayed continuously at 25 °C using 7 µg protein in 50 mM triethanolamine buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl2, 1 mM NAD+, 0.5 mM sodium phosphate, 1 mM G3P and the GAPDH/PGK linked system. The experiments were performed using duplicate aliquots from at least three different gill homogenates (N > 3); representative curves obtained from one homogenate are given. Stimulation by potassium ions at a fixed concentration of sodium ions: (●) 3 mM; (○) 5 mM; (■) 7 mM; (□) 10 mM; (\$) 100 mM. (Inset) Dependence of the kinetic parameters $(V, K_{0.5} \text{ and } n_{\rm H})$ calculated for the stimulation of the (Na^+, K^+) -ATPase activity by K+ ions in the presence of fixed concentrations of Na⁺ ions. Each data point represents the corresponding kinetic parameter calculated from a representative saturation curve comprising at least 12 experimental substrate concentrations.

activity of less than 10% was found in the absence of Na⁺ ions regardless of K⁺ ion concentration. Positive cooperative effects were seen for the modulation of ATP hydrolysis by Na⁺ ions independently of K⁺ ion concentration. These data show that, in addition to significantly increasing the maximum velocity of ATP hydrolysis, K⁺ ions apparently compete with Na⁺ ions for their high-affinity sites on the enzyme, revealing interactions between these two cationic sites.

When (Na^+, K^+) -ATPase activity was assayed in the presence of fixed Na⁺ ion concentrations (from 3 to 100 mM), increasing K⁺ ion concentrations resulted in a different profile (Fig. 2). At saturating ATP (2 mM) and Mg²⁺ (3 mM) concentrations, and sub-saturating Na⁺ ion concentration (3 mM), increasing K⁺ ion concentrations increased the velocity of ATP hydrolysis

Table 2 Kinetic parameters for the stimulation by sodium and/or ammonium ions of the (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from the gills of C. danae

-		1		
Na^+ (mM)	[NH4 ⁺]	$V(U mg^{-1})$	$K_{0.5}$ (mM)	$n_{\rm H}$
	(mM)			
0.1 - 100	0	302.1 ± 14.1	5.8 ± 0.3	1.6
0.1 - 100	10	490.6 ± 19.6	9.2 ± 0.4	1.2
0.1 - 100	25	523.3 ± 26.2	10.0 ± 0.5	1.4
0.1 - 100	50	537.7 ± 20.4	9.5 ± 0.4	1.5
0	0.1 - 100	11.5 ± 0.6	_	_
3	0.1 - 100	157.1 ± 8.0	2.6 ± 0.1	1.3
5	0.1 - 100	337.1 ± 13.1	5.2 ± 0.2	1.6
20	0.1 - 100	404.9 ± 17.4	4.0 ± 0.2	1.4
60	0.1 - 100	490.9 ± 20.1	4.7 ± 0.2	1.2
00	0.1 - 100	529.6 ± 23.8	4.7 ± 0.2	1.2

Initial rates were measured using $7 \ \mu g$ protein in 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and the given concentrations of NaCl and NH₄Cl, in a final volume of 1.0 mL. Data are the mean \pm S.D. from at least three different gill preparations.

from almost negligible values up to $69.8 \pm 3.8 \text{ U mg}^{-1}$ with $K_{0.5} = 2.5 \pm 0.1$ mM. Assays performed at fixed concentrations of Na⁺ ions gave maximum velocity estimates of 294.0 ± 11.8 U mg-1 at saturating Na+ (100 mM) and K⁺ (10 mM) ion concentrations (Table 1 and inset to Fig. 2). This value is compatible with that provided in Fig. 1. However, the increase in maximum velocity with increasing Na⁺ ion concentrations was not accompanied by a similar increase in the $K_{0.5}$ estimated for K⁺ ion activation of ATPase activity, which remained almost constant ($K_{0.5} = 2.5 \pm 0.1$ mM, at 3 mM Na⁺ and $K_{0.5} = 1.6 \pm 0.1$ mM at 100 mM Na⁺), as shown in Table 2, and inset to Fig. 2. Note that at low Na⁺ ion concentrations (around 5 mM), activation of the enzyme by K+ ions obeyed Michaelian kinetics, showing no evidence of interactions at the K⁺ sites. However, with increasing Na+ ion concentrations, the curves for activation by K+ ions display cooperative behavior, with an increase in nH up to 2.5 at 100 mM Na⁺, confirming the interaction between the two classes of cationic site.

The relationship between the NH₄⁺ and Na⁺ binding sites was also studied at saturating concentrations of ATP (2 mM), Mg²⁺ (3 mM) and K⁺ (10 mM). In the absence of NH₄⁺ ions, increasing Na⁺ ion concentrations up to 50 mM resulted in a maximum activity of $302.1 \pm 14.1 \text{ U mg}^{-1}$. However, when assayed in the presence of added NH₄⁺ ions, a further increase in max-



Fig. 3. Stimulation of the (Na+,K+)-ATPase activity in the microsomal fraction from the gill tissue of C. danae by sodium and ammonium ions. The activity was assayed continuously at 25°C using 7 µg protein in 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 10 mM KCl, 3 mM MgCl2, 0.14 mM NADH, 2 mM PEP and the PK/LDH linked system. The experiments were performed using duplicate aliquots from at least three different gill homogenates (N > 3); representative curves obtained from one homogenate are given. Stimulation by sodium ions at a fixed concentration of ammonium ions: (()) none; (•) 10 mM; (□) 25 mM; (•) 50 mM. (Inset) Dependence of the kinetic parameters ($V, K_{0.5}$ and $n_{\rm H}$) calculated for the stimulation of the (Na⁺,K⁺)-ATPase activity by Na⁺ ions in the presence of fixed concentrations of NH4+ ions. Each data point represents the corresponding kinetic parameter calculated from a representative saturation curve comprising at least 12 experimental substrate concentrations.

imum activity was noted (Fig. 3). Increasing NH4⁺ ion concentrations up to 50 mM resulted in a maximum velocity of 537.7 ± 20.4 U mg⁻¹, about 78% greater than that estimated in the absence of NH4+ ions. The addition of NH4+ ions displaces the Na+ ions bound to the NH_4^+ sites, as shown by the increase in the $K_{0.5}$ for Na⁺ ions, from 5.80 ± 0.30 to 9.5 ± 0.4 mM in the absence or presence of 50 mM NH4+ ions, respectively. Cooperativity among the Na⁺ binding sites remained almost constant ($n_{\rm H} = 1.6$) regardless of NH₄⁺ ion concentration. These results show that the NH4+ binding site interacts with the Na⁺ binding sites in a manner similar to that concerning the occupancy of the K+ binding sites. Note that in the absence of Na⁺ ions, there was no kinetic evidence for this NH4+ binding site (Fig. 4).

The occupation by Na⁺ ions of their binding sites also modulates the binding of NH4⁺ ions. At saturating



Fig. 4. Stimulation of the (Na+,K+)-ATPase activity in the microsomal fraction from the gill tissue of C. danae by ammonium and sodium ions. The activity was assayed continuously at 25 °C using 7 µg protein in 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 10mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.14mM NADH, 2mM PEP and the PK/LDH linked system. The experiments were performed using duplicate aliquots from at least three different gill homogenates $(N \ge 3)$; representative curves obtained from one homogenate are given. Stimulation by ammonium ions at a fixed concentration of sodium ions: (▲) none; (□) 3 mM; (■) 5 mM; (●) 20 mM; (○) 60 mM; () 100 mM. (Inset) Dependence of the kinetic parameters $(V, K_{0.5} \text{ and } n_{\text{H}})$ calculated for the stimulation of the (Na^+, K^+) -ATPase activity by NH4+ ions in the presence of fixed concentrations of ions Na+. Each data point represents the corresponding kinetic parameter calculated from a representative saturation curve comprising at least 12 experimental substrate concentrations.

concentrations of ATP (2 mM), Mg^{2+} (3 mM) and KCl (10 mM), but in the absence of Na⁺ ions, the enzyme shows no ATP hydrolytic activity even with the addition of up to 50 mM NH4⁺ (Fig. 4). When the NH4⁺ ion concentration was continuously varied up to 50 mM in the presence of fixed concentrations of Na⁺ ions (from 3 to 100 mM), initial velocities of ATP hydrolysis were elicited, and maximum values of 529.6 ± 23.8 U mg⁻¹ were found at 50 mM NH4⁺ and 100 mM Na⁺ ions. The increase in $K_{0.5}$ from 2.6 ± 0.13 mM (at 3 mM Na⁺) to 4.7 ± 0.2 mM (at 100 mM Na⁺), suggests that the NH4⁺ ions compete with Na⁺ ions (Table 2). Note that at low Na⁺ ion concentrations $n_{\rm H}$ for enzyme stimulation by NH4⁺ ions is greater than 1 suggesting the presence of at least two distinct NH4⁺ binding sites.

The interactions between NH₄⁺ and Mg²⁺ ions are shown in Fig. 5. At saturating concentrations of ATP

D.C. Masui et al. / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (2005) 2521-2535



Fig. 5. Stimulation of the (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the microsomal fraction from the gill tissue of *C. danae* by antmonium and magnesium ions. The activity was assayed at 25 °C using 7 μ g protein in 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 10 mM KCl and 100 mM NaCl. The reaction was initiated by addition of 2 mM [γ^{32} P]ATP-Mg²⁺ and ³²Pi released was measured as in Section 2. The experiments were performed using duplicate aliquots from at least three different gill homogenates ($N \ge 3$); representative curves obtained from one homogenate are given. Stimulation by ammonium ions at a fixed concentration of free magnesium ions: (\oplus) 0.5 mM MgCl₂; (\bigcirc) 3 mM MgCl₂; (\blacksquare) 13 mM MgCl₂. (Insets) Dependence of the kinetic parameters ($V, K_{0.5}$ and $n_{\rm H}$) calculated for the stimulation of the (Na⁺, K⁺)-ATPase activity by NH4⁺ ions on the presence of fixed concentrations Na⁺. Each data point represents the corresponding kinetic parameter calculated from a representative saturation curve comprising at least 12 experimental substrate concentrations.

(2 mM), Na⁺ (100 mM) and K⁺ (10 mM), and at a low free Mg^{2+} ion concentration (0.5 mM), total ATP predominates as Mg^{2+} -ATP, and the free Mg^{2+} ion concentration is only sufficient to occupy the activating site. Under these conditions, increasing NH4⁺ ion concentrations stimulated enzyme activity up to $525.7 \pm 15.7 \text{ U} \text{ mg}^{-1}$ with $K_{0.5} = 4.8 \pm 0.1 \text{ mM}$, consistent with the data from Figs. 3 and 4. A further increase in free Mg2+ ion concentration up to 13 mM resulted in a marked decrease in maximum activity to $386.8\pm9.7\,U\,mg^{-1}$ (inset to Fig. 5), suggesting that the (Na+,K+)-ATPase from C. danae gills, like the mammalian enzyme, possesses a site at which Mg2+ ions exert an inhibitory effect. Apparently, occupation of this site by Mg2+ ions strongly regulates NH4+ ion activation, by dislocating NH4+ ions from the activating site. This is suggested by the concomitant increase in $K_{0.5}$ for NH₄⁺ ion stimulation (inset to Fig. 5). The negative cooperativity observed with increasing Mg2+ ion concentrations (Table 3), suggests that Mg2+ ions bind to a second, inhibitory site, and are not displaced by increasing concentrations of NH4+ ions up to 100 mM (inset to Fig. 5).

Table 3

Kinetic parameters for the stimulation by ammonium and magnesium ions of the (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from the gills of C. danae

[NH4 ⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	$V({\rm Umg^{-1}})$	$K_{0.5}$ (mM)	$n_{\rm H}$
0.1-100	0.5	525.7 ± 15.7	4.8 ± 0.1	1.3
0.1–100 0.1–100	3.0 13.0	451.8 ± 18.1 386.8 ± 9.7	7.0 ± 0.3 8.1 ± 0.2	0.8 0.9

Initial rates were measured using 7 µg protein in 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 10 mM KCl and 100 mM NaCl. The reaction was initiated by addition of 2 mM $[\gamma^{32}P]ATP-Mg^{2+}$ and ^{32}Pi released was measured as in Section 2. Data are the mean \pm S.D. from at least three different gill preparations.

4. Discussion

In euryhaline Crustacea exposed to osmotically challenging salinities, the (Na⁺,K⁺)-ATPase responds with ample changes in activity (Castilho, Martins, & Bianchini, 2001; Corotto & Holliday, 1996; Lin, Su, & Su, 2002; Lovett, Verzi, Clifford, & Borst, 2001; Morris, 2001; Péqueux, 1995; Towle et al., 2001). Since both the osmoregulatory and excretory process

in the aquatic Crustacea take place mainly across the gill epithelium (Lin et al., 2002; Lovett et al., 2001; Péqueux, 1995; Weihrauch et al., 1999), a comprehensive kinetic characterization of the (Na+,K+)-ATPase allows a better understanding of the biochemical mechanisms that underlie such processes. Our enzyme preparation from C. danae, a typical brachyuran crab, is especially suitable for such studies since it is insensitive to thapsigargin (a Ca2+-ATPase inhibitor) and ethacrynic acid (a Na⁺-ATPase inhibitor) and, in contrast to other crustacean gill preparations, ouabaininhibitable ATP hydrolysis is the predominant ATPase activity in this microsomal fraction. Further, in this study we avoid using imidazole, histidine, choline, or other cationic buffers known to bind to protein or lipid sites that coexist with transport sites, dislocating enzyme equilibrium towards the E1 conformation, thus masking results (Fedosova & Easmann, 2004).

There is an extensive literature on cation binding sites and their interactions in the mammalian (Na+,K+)-ATPase (for review see Andersen & Vilsen, 1995; Jorgensen & Pedersen, 2001; Jorgensen et al., 1998). The 110 kDa, catalytic, α-subunit contains the phosphory lation site and the binding sites for Na⁺, K⁺, Mg²⁺ ions, and ATP. Binding of Na⁺ and K⁺ ions at their sites, under optimal conditions, varies largely with the particular isoform, tissue or cell examined, and different binding constants have been observed when the same isoform from the same species is assayed in different tissues. The molecular basis for such differences is poorly known, and has been attributed to kinetic differences in the ability of distinct isoforms to displace the equilibrium towards E1 or E2, and/or to the presence of different β-subunits in distinct tissues (Segall, Daly, & Blostein, 2001; Therien, Nestor, Ball, & Blonstein, 1996). The Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ binding sites show interactions that also vary with the enzyme isoform (Robinson & Pratap, 1991; Therien et al., 1996; Vilsen, 1995). In mammals, NH4⁺ ions substitute for K+ ions at their sites, and synergistic activation has not been reported for these two cations.

To date, no data are available concerning the α and β -isoform types encountered in *C. danae* gills. The enzyme is not recognized by specific antibodies raised against mammalian α - and β -subunit isoforms (R.P.M. Furriel, unpublished results). Although the Western blot analysis and ouabain inhibition pattern suggest a single α -subunit isoform in the gill microsomal preparation (Masui, Furriel, McNamara, Mantelatto, & Leone, 2002; Segall et al., 2001), the presence of distinct α -subunit isoforms cannot be excluded. In this study, the $K_{0.5}$ observed for Na⁺ ion stimulation of ATP hydrolysis was 5.8 mM. This value is in the range reported for mammalian enzymes, varying from 4 to 25 mM (Beaugé, Gadsby, & Garrahan, 1997; Robinson & Pratap, 1991; Therien et al., 1996). Cooperative effects were observed for the *C. danae* enzyme; however, the $n_{\rm H}$ values of about 1.6, for Na⁺ interaction (see Fig. 1) are lower than the $n_{\rm H}$ values usually observed (2.5–2.9) for mammalian kidney enzymes (Blanco, Sánchez, & Mercer, 1995; Koster, Blanco, Mills, & Mercer, 1996).

Under optimal conditions, the $K_{0.5}$ values for Na⁺ and K⁺ ions in *C. danae* gill tissue enzyme lie in the range seen for other euryhaline crustaceans, although higher than those for *C. sapidus* (Harris & Bayliss, 1988; Lucu & Towle, 2003; Specht, Rodriguez, Quiñónez, & Velásquez, 1997). Previous studies note that the gill enzymes of decapod crustaceans well established in freshwater show apparent affinities for Na⁺ ions almost 20-fold higher than obtained here (Harris & Bayliss, 1988). This probably derives from the fact that *C. danae* migrates to inshore and shallow waters to reproduce (Mantelatto & Fransozo, 2000; Masui et al., 2002).

To our knowledge, only very few studies have addressed interactions at cationic sites for the crustacean (Na⁺,K⁺)-ATPase. Although a strongly antagonic effect is seen for C. danae (Na+,K+)-ATPase activity, with the binding of K⁺ ions dislocating Na⁺ ions from their sites, the binding of Na⁺ ions at the activating sites does not displace K⁺ ions from their sites. Similar results have been found for Na+ and K+ ion interactions in the axonal membrane enzyme from the crab Cancer pagurus (Gache, Rossi, & Lazdunski, 1976). In addition, the binding sites for Na⁺ ions show heterotropic interactions (n_H around 2), similar to those found here for C. danae. These data suggest that a weaker heterotropic interaction for Na+ ions may be a characteristic of the crustacean (Na⁺,K⁺)-ATPase. The nH for K⁺ ion stimulation in C. danae is regulated by increasing Na⁺ ion concentrations, with an observed shift to cooperative behavior up to n_H around 2.0, very similar to that usually seen for mammalian enzymes.

It is still unclear whether salinity-related increases in (Na⁺,K⁺)-ATPase activities in crustacean gills result

2530

from de novo synthesis of the enzyme or from posttranslational processes such as subunit assembly, membrane trafficking or cell signaling (Lucu & Towle, 2003; Towle et al., 2001). Although enhanced expression of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α-subunit in response to lowsalinity acclimation has been reported for C. maenas (Lucu and Flik, 1999), salinity acclimation has little effect on the proportion of a-subunit protein in posterior gills of C. sapidus (Towle et al., 2001). In C. danae, the increase in (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in response to low-salinity acclimation is accompanied by an increased expression of the enzyme α -subunit (Masui, Furriel, Mantelatto, McNamara, & Leone, 2005). However, variations in Na⁺ and K⁺ ion concentrations may also regulate C. danae (Na⁺,K⁺)-ATPase activity.

Kinetic studies have shown that turnover of the mammalian enzyme is insensitive to changes in extracellular Na+ and K+ ion concentrations, although the enzyme is very sensitive to changes in corresponding intracellular concentrations (Kong & Clarke, 2004). Apparently, the physiological concentrations of such ions at the extracellular sites generally far exceed their respective $K_{0.5}$, and thus, the enzyme binding sites are largely saturated under most conditions. Our present findings demonstrate these effects in C. danae. The enzyme responds with large changes in hydrolysis rate to Na⁺ versus K⁺ ion concentrations. K⁺ ions apparently displace Na⁺ ions from their high affinity sites, but increasing Na⁺ ion concentrations from sub-saturating to saturating levels does not alter the K⁺ ion requirements for activation of ATP hydrolysis (see Fig. 2 and Table 1). Thus, while low K⁺ ion concentrations affect the internal Na⁺ binding sites, Na⁺ ions do not interact with the external K+ sites. Similar effects of K+ ions have been demonstrated for rabbit kidney enzyme, showing that the K⁺ affinity of the E₁ empty-pump state is 38-fold higher than the Na⁺ ion affinity for binding in the E1 form measured using ionsensitive RH-421 dye fluorescence (Schulz & Apell, 1995). In 33‰ salinity, the K+ ion concentration of C. danae hemolymph reaches 10-15 mM (D.C. Masui, unpublished data), a titer very close to saturation at any Na⁺ ion concentration. Direct measurements of change in hemolymph osmolality following the transfer of C. danae to dilute seawater resulted in values of about 914.93 and 623.35 mOs kg-1, respectively (D.C. Masui, unpublished results). However, in other crabs, hemolymph osmolality drops from around 900 mOsm kg-1 in 30% seawater to 550-700 mOsm kg-1 at 2-10‰ salinity (Castilho et al., 2001; Lovett et al., 2001). Under these conditions, the extracellular sites remain close to saturation. Thus, it seems likely that the synergistic activation by NH4+ ions seen in C. danae plays a regulatory role under various environmental conditions. As we have already suggested, benthic crabs may encounter ambient ammonia concentrations that exceed the normally low NH4⁺ concentrations in their hemolymph, leading to influx of NH4⁺ ions (Masui et al., 2002, 2003). Since C. danae is encountered buried in sediments that may contain ammonia concentrations as high as 2-3 mM (Rebelo, Santos, & Monserrat, 1999; Weihrauch et al., 1999), this benthic crab may actively excrete NH4⁺ against the concentration gradient, with saturated extracellular K+ binding sites. NH4+ ions, bound to the additional site, may provide additional (Na⁺,K⁺)-ATPase activity. Another interesting possibility is that the closely related species, C. sapidus, accumulates polyamines in the hemolymph during high salinity acclimation (Lovett & Watts, 1995). NH4+ ions, as the resulting degradation product, may thus further stimulate the (Na⁺,K⁺)-ATPase during acclimation.

The present study reveals that synergistic activation by NH4⁺ ions is strongly influenced by Na⁺ and Mg²⁺ ion concentrations. We have previously suggested that the additional NH4⁺ binding sites are accessible only in the E1 conformation, since the ATPase, but not the pNPPase activity (that involves the E2 conformation exclusively), shows synergistic stimulation by K⁺ and NH4⁺ ions (Masui et al., 2002, 2003). Our current data provide further evidence for this hypothesis. The presence of Na⁺ and Mg²⁺ ions at their activating sites displaces the equilibrium towards the E1 conformation, exposing the additional sites for NH4+ ions, and eliciting synergistic activation by NH4+ ions. Both Na+ and Mg2+ ions displace NH4+ ions from their sites, thus competing with NH4+ for binding in the E1 conformation.

At high concentrations, Mg^{2+} occupies a second, inhibitory site on the enzyme. In mammals, the inhibition by Mg^{2+} ions of (Na^+,K^+) -ATPase activity has been attributed to binding to the E_2K form, decreasing affinity for ATP at the rate limiting step of the reaction cycle (Fontes et al., 1992; Forbush, 1987; Pedemonte & Beaugé, 1983). Free Mg^{2+} ion concentrations above 3 mM apparently shift the equilibrium towards the E2 form (Castro & Farley, 1979; Robinson, 1982; Tribuzy, Fontes, Norby, & Barrabin, 2002). The physiological significance of enzyme inhibition at high Mg2+ ion levels is unclear. Free Mg2+ ion concentrations in the hemolymph of the euryhaline crab Cryptograpsus angulatus are around 12 mM (Mañanes, Meligeni, & Goldemberg, 2002). Assuming similar concentrations in C. danae hemolymph, the pump would be exposed to Mg2+ concentrations far above non-inhibitory levels. The antagonism between Mg2+ and NH4+ ions reported here may serve as a regulatory mechanism of enzyme activity via the extracellular surface of the enzyme. Increasing NH4+ ion concentrations in the hemolymph may minimize inhibition by Mg2+ ions, by both substituting for K+ ions at its sites, or displacing the equilibrium towards the E1 form, and exposing the additional NH4+ binding sites.

Together, our findings show that (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in *C. danae* gills is strongly regulated by cytoplasmic Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ ion concentrations, and by hemolymph NH₄⁺ ion concentrations, which suggests a significant role for cationic interactions in the biochemical adaptation of *C. danae* to saline stress. Studies of cation site–site interactions, such as described here, should allow a better understanding of the mechanisms by which euryhaline crustaceans may have solved the simultaneous challenge of effective hemolymph Na⁺-hyperregulation and concomitant transport and excretion of NH₄⁺ ions.

Fig. 6 attempts to integrate recent findings on the mechanisms by which euryhaline benthic crabs may actively transport and excrete NH_4^+ ions. The main driving force for NH_4^+ ion transport out of the cell is the (Na^+,K^+) -ATPase located in the basolateral membrane. An additional, magnesium-inhibitable, pumping



Fig. 6. Hypothetical model for active ammonia excretion across the gills of the euryhaline crab *C. danae.* (1) The main driving force for NH₄⁺ transport out of the cell is the (Na⁺,K⁺)-ATPase located in the basolateral membrane. An additional, magnesium-inhibitable, pumping force for NH₄⁺ extrusion is represented by a second NH₄⁺-binding site, which appears when the pump is fully saturated by K⁺ ions. (2) Cs⁺-sensitive K⁺ channels, located in the basolateral membrane, do not discriminate between K⁺ and NH₄⁺ ions. (3) Septate junction. (4) Putative Na⁺/NH₄⁺(H⁺) transporter, located in the apical membrane, particularly active during transcellular, NH₄⁺ extrusion. (5) Presumed, amiloride-sensitive, cation-permeable, channel-like structures in the cuticle allow the diffusion of NH₄⁺ ions to the external medium. (6) Cytoplasmic NH₃ diffuses into intracellular vesicles containing a V-ATPase protein pump, which acidifies their interior leading to NH₄⁺ formation. NH₃ is extruded to the subcuticular space via exocytosis. (7) A thesus-like protein, a supposed ammonia transporter of unknown localization may support the vesicular acid-trapping mechanism. Modified after Weihrauch et al. (2004).

force for NH4⁺ extrusion is represented by a second NH4⁺-binding site which appears when the pump is fully saturated by K+ ions (Masui et al., 2002 and present data). In addition to the (Na+,K+)-ATPase, Cs+sensitive K⁺ channels, also located in the basolateral membrane (Riestenpatt, Onken, & Siebers, 1996) that do not discriminate between K+ and NH4+ ions, may translocate NH4+ ions from the hemolymph into the basal cytoplasm (Lucu et al., 1989; Towle & Holleland, 1987; Weihrauch et al., 2002). A recently described, rhesus-like, ammonia transporter of unknown localization may also mediate NH4⁺ ion transfer across cell membranes (Marini, Matassi, Raynal, Andre, Cartron, & Cherif-Zahan, 2000; Weihrauch et al., 2004). A putative, amiloride-sensitive Na⁺/NH4⁺(H⁺) transporter in the apical membrane, and amiloride-sensitive, cationpermeable structures in the cuticle also may be involved in the diffusion of NH4⁺ ions to the external medium. Metabolic NH₃ diffusion from the hemolymph into the epithelial cells also contributes to the cytoplasmic NH3 pool. Cytoplasmic NH3 diffuses into intracellular vesicles either by diffusion or through the, rhesus-like, ammonia transporter; a V-ATPase proton pump acidifies the vesicular interior, leading to NH4+ formation. NH4⁺ is apparently extruded to the subcuticular space via an exocytotic mechanism (Weihrauch et al., 2002, 2004)

To position our biochemical data within a physiological framework is not simple, since we employed gill microsomal preparations, not the intact gill; however, certain considerations are feasible from a physiological perspective. Compared to physiological hemolymph ammonia concentrations of around 100 µM, those that stimulated the gill (Na⁺,K⁺)-ATPase are higher. However, while buried in sediment containing up to 2.8 mM ammonia (Rebelo et al., 1999; Weihrauch et al., 1999), continued excretion by C. danae probably contributes to local increases (Weihrauch et al., 1999). Thus, regardless of the elevated ammonia concentrations employed here, the calculated apparent dissociation constant in vitro ($K_{0.5} = 4.8 \pm 0.1$ mM) is similar to the ammonia concentration found in aquatic biotopes like that of C. danae, which is of physiological significance. Despite some evidence that ammonia excretion and active transport are not directly coupled in crabs (Weihrauch et al., 1999), exposure to elevated ammonia may lead to substitution of potassium by ammonium ions, decreasing intracellular potassium (Towle &

Holleland, 1987). Further, acute exposure to ammonia of *Chasmagnathus granulata*, an estuarine crab, reveals that hemolymph ammonia is less than ambient ammonia (Rebelo et al., 1999). Consequently, and given that the ammonium binding sites on the (Na⁺,K⁺)-ATPase molecule face the hemolymph, when hemolymph ammonia exceeds 100 μ M, the ATPase may be activated, thus maintaining steadystate ammonia titers within physiological limits. The ammonia transported to the cytoplasm would then be trapped in the cytosolic vesicles and excreted to the external medium.

Finally, one approach to establish whether $\rm NH_4^+$ ions are actively transported by the basolateral (Na⁺,K⁺)-ATPase in *C. danae* would be to examine NH4⁺ occlusion by the pump during hydrolysis. NH4⁺ ions should substitute for K⁺ ions at the occlusion sites, which could be estimated using a suitable radioactive ammonia tracer such as methylamine/methylammonium, already employed as a competitive inhibitor of active NH4⁺ flux in turtle bladder (Talor, Lubansky, & Arruda, 1987).

Acknowledgements

FAPESP and CNPq provided financial support. All experiments conducted in this study comply with currently applicable state and federal laws.

References

- Andersen, J. P., & Vilsen, B. (1995). Structure–function relationships of cation translocation by Ca²⁺- and Na⁺, K⁺-ATPases studied by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters*, 359, 101–106.
- Apell, H. J., & Marcus, M. M. (1986). (Na⁺+K⁺)-ATPase in artificial lipid vesicles: Influence of the concentration of mono- and divalent cations on the pumping rate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 862, 254–264.
- Balshaw, D. M., Millette, L. A., Tapperman, K., & Wallick, E. T. (2000). Combined all osteric and competitive interaction between extracellular Na⁺ and K⁺ during ion transport by the α₁, α₂, and α₃ isoforms of the Na, K-ATPase. *Biophysical Journal*, 79, 853–862.
- Beaugé, L. A., Gadsby, D. C., & Garrahan, P. J. (1997). Na/K-ATPase and related transport ATPases. Structure mechanism and regulation. Annals of New York Academy of Sciences, 834, 1–694.
- Blanco, G., Sánchez, G., & Mercer, R. (1995). Comparison of the enzymatic properties of the Na,K-ATPase α3β1 and α3β2 isozymes. *Biochemistry*, 34, 9897–9903.

- Castilho, P. C., Martins, I. A., & Bianchini, A. (2001). Gill Na⁺, K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmag-nathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 256, 215–227.
- Castro, J., & Farley, R. A. (1979). Proteolytic fragmentation of the catalytic subunit of sodium and potassium adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 2221–2228.
- Chacur, M. M., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2001). Spatial and seasonal distributions of *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, 21, 414–425.
- Cooper, A. R., & Morris, S. (1997). Osmotic and ionic regulation by *Leptograpsus variegates* during hyposaline exposure and in response to emersion. *Journal of Experimental Marine Biology* and Ecology, 214, 263–282.
- Copeland, D. E., & Fitzjarrell, A. T. (1968). The salt absorbing cells in gills of blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift fur Zellforschung* und Mikroskopische Anatomie, 92, 1–22.
- Corotto, F. S., & Holliday, C. W. (1996). Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus* nuclus (Dana). Comparative Biochemistry and Physiology, 113A, 361–368.
- Fedosova, N. U., & Easmann, H. (2004). Nucleotide-binding kinetics of Na,K-ATPase: Cation dependence. *Biochemistry*, 43, 4212–4218.
- Fontes, C. F. L., Barrabin, H., Scofano, H. M., & Norby, J. G. (1992). The role of Mg²⁺ and K⁺ in the phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase by ATP in the presence of dimethylsulfoxide but in the absence of Na⁺. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104, 215–225.
- Forbush, B., III. (1987). Rapid release of ⁴²K and ³⁶Rb from an occluded state of the Na,K-pump in the presence of ATP or ADP. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 11104–11115.
- Freire, C. A., & McNamara, J. C. (1992). Involvement of the centralnervous-system in neuroendocrine mediation of osmotic and ionic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfer*sii (Crustacea, Decapoda). *General Comparative Endocrinology*, 88, 316–327.
- Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2000). Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase in gill microsomes from the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 126, 303–315.
- Gache, C., Rossi, B., & Lazdunski, M. (1976). (Na⁺,K⁺)-activated adenosinetriphosphatase of axonal membranes, cooperativity and control. *European Journal of Biochemistry*, 65, 293–306.
- Geering, K. (2000). Topogenic motifs in P-type ATPases. Journal of Membrane Biology, 174, 181–190.
- Grubmeyer, C., & Penefsky, H. S. (1981). The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 3718–3727.
- Guerin, J. L., & Stickle, W. B. (1997). A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: Osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *Journal of Experimental Marine Biology* and Ecology, 218, 165–186.
- Harris, R. R., & Bayliss, D. (1988). Gill (Na⁺/K⁺)-ATPase in decapod crustaceans: Distribution and characteristics in relation to

Na⁺ regulation. Comparative Biochemistry and Physiology A, 90, 303–308.

- Henry, R. P., & Wheatly, M. J. (1992). Interaction of respiration, ion regulation and acid–base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *American Zoologist*, 32, 407–416.
- Hilge, M., Siegal, G., Vuister, G. W., Güntert, P., Gloor, S. M., & Abrahams, J. P. (2003). ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nature Structural Biology*, 10, 468–474.
- Horisberger, J. D. (2004). Recent insights into the structure and mechanisms of the sodium pump. *Physiology*, 19, 377–387.
- Jorgensen, P. L., Nielsen, J. M., Rasmussen, J. H., & Pedersen, P. A. (1998). Structure–function relationships of E₁–E₂ transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 65–70.
- Jorgensen, P. L., & Pedersen, P. A. (2001). Structure–function relationships of Na⁺, K⁺, ATP or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 65–70.
- Kong, B. Y., & Clarke, R. J. (2004). Identification of potential regulatory sites of the Na⁺,K⁺-ATPase by kinetic analysis. *Biochemistry*, 43, 2241–2250.
- Koster, J. C., Blanco, G., Mills, P. B., & Mercer, R. W. (1996). Substitutions of glutamate 781 in the Na,K-ATPase α-subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased affinity for ATP. Journal of Biological Chemistry, 271, 2413–2421.
- Kuntzweiler, T. A., Wallick, E. T., Johnson, C. L., & Lingrel, J. B. (1995). Amino acid replacement of Asp³⁶⁹ in the sheep α1 isoform eliminates ATP and phosphate stimulation of [³H]ouabain binding to the Na⁺, K⁺-ATPase without altering the cation binding properties of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 16206–16212.
- Leone, F. A., Degreve, L., & Baranauskas, J. A. (1992). SIGRAF: A versatile computer program for fitting enzyme kinetic data. *Biochemical Education*, 20, 94–96.
- Lin, H. C., Su, Y. C., & Su, S. H. (2002). A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: Uca). Zoological Science, 19, 643–650.
- Lingrel, J. B., & Kuntzweiler, T. A. (1994). Na⁺, K⁺-ATPase. Journal of Biological Chemistry, 269, 19659–19662.
- Lovett, D. L., Verzi, M. P., Clifford, P. D., & Borst, D. W. (2001). Hemolymph levels of methyl farmesoate increase in response to osmotic stress in the green crab *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 128, 299–306.
- Lovett, D. L., & Watts, S. A. (1995). Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab Callinectes sapidus Rathbun. Comparative Biochemistry and Physiology B, 110, 115–119.
- Lucu, C. (1990). Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. Comparative Biochemistry and Physiology A, 97, 297–306.
- Lucu, C., Devescovi, M., & Siebers, D. (1989). Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused Carcinus gill epithelia? *Journal of Experimental Zoology*, 249, 1–5.
- Lucu, C., & Flik, G. (1999). Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. American Journal of Physiology, 45, R490–R499.

- Lucu, C., & Towle, D. W. (2003). Na⁺ + K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology A, 135, 195–214.
- Mañanes, A. A. L., Meligeni, C. D., & Goldemberg, A. L. (2002). Response to environmental salinity of Na⁺, K⁺-ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab Cyrtograpsus angulatus. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 274, 75–85.
- Mantelatto, F. L. M., & Fransozo, A. (1999). Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 59, 23–31.
- Mantelatto, F. L. M., & Fransozo, A. (2000). Brachyuran community in Ubatuba Bay, Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Journal of Shellfish Research*, 19, 701–709.
- Marini, A. M., Matassi, G., Raynal, V., Andre, B., Cartron, J. P., & Cherif-Zahan, B. (2000). The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Genetics*, 26, 341–344.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2005). K⁺-phosphatase activity of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab, *Callinectes danae*: Lowsalinity acclimation and expression of the α-subunit. *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 294–307.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., Mantelatto, F. L. M., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2003). Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Modulation of K⁺-phosphatase activity by potassium and ammonium ions. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 134, 631–640.
- Masui, D. C., Furriel, R. P. M., McNamara, J. C., Mantelatto, F. L. M., & Leone, F. A. (2002). Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase in the swimming crab Callinectes danae: A possible mechanism for regulation of ammonia excretion. Comparative Biochemistry and Physiology C, 132, 471–482.
- McNamara, J. C., Salomão, L. C., & Ribeiro, E. A. (1990). The effect of eyestalk ablation on hemolymph osmotic and ionic concentrations during acute exposure in the fresh-water shrimp *Macro*brachiam olfersii (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Hydrobi*ologia, 199, 193–199.
- Morris, S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 204, 979–989.
- Onken, H., & Riestenpatt, S. (2002). Ion transport across posterior gills of hyperosmoregulating shore crabs (*Carcinus maenas*): Amiloride blocks the cuticular Na⁺ conductance and induces current-noise. *Journal of Experimental Biology*, 205, 523–531.
- Onken, H., Schobel, A., Kraft, J., & Putzenlechner, M. (2000). Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*: Stimulation by eyestalk extract. *Journal of Experimental Biology*, 203, 1373–1381.
- Onken, H., Tresguerres, M., & Luquet, C. M. (2003). Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chas*magnathus granulatus. Journal of Experimental Biology, 206, 1017–1023.
- Pedemonte, C. H., & Beaugé, L. (1983). Inhibition of (Na⁺,K⁺)-ATPase by magnesium ions and inorganic phosphate and release

of these ligands in the cycles of ATP hydrolysis. Biochimica et Biophysica Acta, 748, 245–253.

- Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15, 1–60.
- Pressley, T. A., Graves, J. S., & Krall, A. R. (1981). Amiloridesensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. *American Journal of Physiology*, 241, R370–R378.
- 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. *Analytical Biochemistry*, 116, 53– 64.
- Rebelo, M. F., Santos, E. A., & Monserrat, J. M. (1999). Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 851. Accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 122, 429–435.
- Riestenpatt, S., Onken, H., & Siebers, D. (1996). Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: Voltage-clamp and ion-flux studies. *Journal* of Experimental Biology, 199, 1545–1554.
- Riestenpatt, S., Zeiske, W., & Onken, H. (1994). Cyclic-AMP stimulation of electrogenic uptake of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology*, 188, 159–174.
- Robinson, J. D. (1970). Interactions between monovalent cations and the (Na⁺ + K⁺)-dependent adenosine triphosphatase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 139, 17–27.
- Robinson, J. D. (1982). Tryptic digestion of the (Na+K)-ATPase is both sensitive to and modifies K⁺ interactions with the enzyme. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 14, 319–333.
- Robinson, J. D., & Pratap, P. R. (1991). Na,K-ATPase: Modes of inhibition by Mg²⁺. Biochimica et Biophysica Acta, 1061, 267–278.
- Sachs, J. R. (1977). Inhibition of the Na-K pump by external sodium. Journal of Physiology (London), 264, 449–470.
- Schulz, S., & Apell, H. J. (1995). Investigation of ion binding to the cytoplasmic binding sites of the Na,K-pump. European Biophysics Journal, 23, 413–442.
- Segall, L., Daly, S. E., & Blostein, R. (2001). Mechanistic basis for kinetic differences between the rat α₁, α₂, and α₃ isoforms of the Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31535–31541.
- Siebers, D., Riestenpatt, S., Weihrauch, D. W., & Lucu, C. (1995). Exkretion von stickstoff über die kiernen der strandkrabbe Carcinus maenas. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 88, 134.
- Specht, S. C., Rodriguez, C., Quiñônez, L., & Velásquez, S. (1997). Effect of high ionic strength and inhibitors of H,K-ATPase on the ouabain sensitive K-sensitive K-p-nitrophenylphosphatase activity of the sea anemone Stichlodactyla heliantus. Comparative Biochemistry and Physiology B, 117, 217–224.
- Talor, Z., Lubansky, H., & Arruda, J. A. (1987). Relationship of K and ammonia transport by the turtle bladder. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 13, 78–94.
- Therien, A. G., Nestor, N. B., Ball, W. J., & Blonstein, R. (1996). Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 7104–7112.

- 153 -

- Towle, D. W., & Holleland, T. (1987). Ammonium ion substitutes for K⁺ in ATP-dependent Na⁺ transport by basolateral membranevesicles. American Journal of Physiology, 252, R479–R489.
- Towle, D. W., & Kays, W. T. (1986). Basolateral localization of Na⁺ + K⁺-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, callinectes sapidus and Carcinus maenas. Journal of Experimental Zoology, 239, 311–318.
- Towle, D. W., Paulsen, R. S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignet, J. H., et al. (2001). Na⁺ + K⁺-ATPase in gills of the crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinityrelated expression of α-subunit mRNA and protein. *Journal of Experimental Biology*, 204, 4005–4012.
- Towle, D. W., Rushton, M. E., Heidysch, D., Magnani, J. J., Rose, M. J., Amstutz, A., et al. (1997). Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: Molecular cloning expression and tissue distribution. *Journal of Experimental Biology*, 200, 1003–1014.
- Towle, D. W., & Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *American Zoologist*, 41, 770–780.
- Tribuzy, A. V. B., Fontes, C. F. L., Norby, J. G., & Barrabin, H. (2002). Dimethylsulfoxide-induced conformational state of Na⁺/K⁺-ATPase studied by proteolytic cleavage. Archives of Biochemistry and Biophysics, 399, 89–95.
- Vilsen, B. (1995). Mutant Glu-781Ala of the rat kidney Na,K-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry*, 34, 1455–1463.

- 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. *Journal of Comparative Physiology*, 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. *Journal of Comparative Physiology B*, 168, 364– 376.
- Weihrauch, D., Morris, S., & Towle, D. W. (2004). Ammonia excretion in aquatic terrestrial crabs. *Journal of Experimental Biology*, 207, 4491–4509.
- Weihrauch, D., & Towle, D. W. (2000). Na⁺/H⁺ exchanger and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter are expressed in the gills of the euryhaline Chinese crab Eriocheir sinensis. Comparative Biochemistry and Physiology B, 126(Suppl.), S158.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., & Towle, D. W. (2001). Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *Journal of Experimental Biology*, 204, 25– 37.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., & Towle, D. W. (2002). Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: Participation of Na⁺/K⁺-ATPase and V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *Journal of Experimen*tal Biology, 205, 2765–2775.
- Williams, A. (1974). The swimming crabs of the genus Callinectes (Decapoda, Portunidae). Fishery Bulletin, 72, 685–798.



Available online at www.sciencedirect.com

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 149 (2008) 622-629



webeviercom/locate/che

Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab Callinectes danae (Brachyura, Portunidae)

E.C.C. Silva a, D.C. Masui b, R.P.M. Furriel b, F.L.M. Mantelatto c, J.C. McNamara c, H. Barrabin^a, F.A. Leone^b, H.M. Scofano^a, C.F.L. Fontes^{a,*}

Instituto de Bioquímica Médica, Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas e ATPases, Programa de Biología Estrutural, CCS, Bloco H, 2 andar, sala 26, 21941-590, RJ, Brazil ^b Departamento de Química, Faculdade de Filosofía, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Avenida Bandeiranna, 3000, Ribeirão Pieto, 14040-001, SP, Brazil ° Departamento de Biologia, Facul dade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Prato, Universidade de São Paulo. Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil

Received 19 October 2007; received in revised form 28 December 2007; accepted 28 December 2007 Available online 16 January 2008

Abstract

Euryhaline crustaceans rarely hyporegulates and employ the driving force of the Na,K-ATPase, located at the basal surface of the gill epithelium, to maintain their hemolymph osmolality within a range compatible with cell function during hyper-regulation. Since polyamine levels increase during the adaptation of crustaceans to hyperosmotic media, we investigate the effect of exogenous polyamines on Na,K-ATPase activity in the posterior gills of Callinectes danae, a euryhaline swimming crab. Polyamine inhibition was dependent on cation concentration, charge and size in the following oxler: spermine> spermidine>putnescine. Spermidine affected K0.3 values for Na+ with minor alterations in K0.5 values for K+ and NH₄, causing a decrease in maximal velocities under saturating Na+, K+ and NH₄ concentrations. Phosphorylation measurements in the presence of 20 µM ATP revealed that the Na,K-ATPase possesses a high affinity site for this substrate. In the presence of 10 mM Na+, both spermidine and spermine inhibited formation of the phosphoenzyme; however, in the presence of 100 mM Na+, the addition of these polyamines allowed accumulation of the phosphoenzyme. The polyamines inhibited pumping activity, both by competing with Na+ at the Na+-binding site, and by inhibiting enzyme dephosphorylation. These findings suggest that polyamine-induced inhibition of Na,K-ATPase activity may be physiologically relevant during migration to fully marine environments. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Na,K-ATPase; Polyamines; Gill microsomes; Callinectes danae; Euryhaline swimming crab

1. Introduction

The Na, K-AT Pase (E.C.3.6.1.37) belongs to the P2c-ATPase family (alkali metal cation pumps and phospholipid translocases), the hallmark of the P-type family members being the

formation of an acyl-phosphate intermediate during the reaction cycle (Axelsen and Palmgren, 1988; Jorgensen and Pedersen, 2001; Kaplan, 2002). The enzyme is responsible for the asymmetrical transport of Na⁺ and K⁺ ions across biological membranes, establishing a membrane resting potential in excitable cells and an ionic gradient driving various cell processes, such as amino acid, glucose and iodine transport and absorption, cell volume regulation and heat production (Glynn, 1993; Kaplan, 2002). During its catalytic cycle, the enzyme undergoes transitions between two main conformational states known as E1 and E2, coupling the energy of hydrolysis of ATP-Mg

^{*} Corresponding author, Ria César Pernetta, 400, Prédio do CCS, Bloco H2-26, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 256526784.

E-mail address: c fontes/abiogned ufit br (C.F.L. Fontes).

^{1096-4959/8 -} see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.cbpb.2007.12.010

molecules with the formation of acid-anhydride bonds between the phosphate group and the Asp_{369} residue of the enzyme, allowing the selective binding, occlusion and release of Na⁺ and K⁺ ions (Shull et al., 1985; Kaplan, 2002). The enzyme also may be phosphorylated on the same Asp_{369} residue through a reversion of a hydrolysis step, a process known as backdoor phosphorylation, inhibited by Na⁺ (Schuurmans-Stekhoven, et al., 1980; Post et al., 1975).

Euryhaline crustaceans maintain their hemolymph ionic concentrations within narrow physiological limits, during the exposure to dilute media. The gill epithelia of such hyperosmoregulating crabs exhibit low permeability to ions and water, which reduces passive salt loss and osmotic water entry (Mantel and Farmer, 1983; Weihrauch et al., 2004). To furnish Na⁺, the posterior gills of certain crabs use the driving force of the Na,K-ATPase located at the basal surface of epithelial cells, allowing active Na⁺ uptake into the hemolymph (Péqueux, 1995; Lucu and Towle, 2003; Freire et al., 2007). Euryhaline species like Carcinus maenas and the blue crab Callinectes sapidus strongly hyperegulate their hemolymph, maintaining a hemolymph-tomedium osmotic gradient of up to 300 mosmol/L, during incursions into estuarine or freshwater environments (Piller et al., 1995; Lucu and Flik, 1999; Lucu and Towle, 2003). Callinectes danae, a hyperosmoregulating, euryhaline swimming crab, can adapt to a wide range of environmental salinities. In such crustaceans, apical transporters (Na⁺/H⁺; Na⁺/NH₄⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers and a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter), potassium channels, a basal chloride channel, and the Na, K-ATPase housed in the basal membranes of the gill epithelial cells function in concert and underpin the excretion of NH4 and regulation of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ (Towle and Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2002; Masui et al., 2005; Freire et al., 2007).

C. danae is a large swimming crab flat inhabits mangroves, estuaries and bays where salinity is often reduced, and some individuals can be encountered on humid silt and sand substrates. The species is an active swimmer, migrating freely among water masses from moderate to high salinities, and is distributed throughout shallow waters of the Atlantic Ocean from Florida, USA to fhe southern coast of Brazil (Guerin and Stickle, 1997; Chacur and Negreiros-Fransozo, 2001). Adults are frequently found in estuarine waters of moderate salinity (28–35‰) that receive freshwater coastal runoff during the southern summer (Mantelatto and Fransozo, 2000).

During acclimation from sea water to dilute media, the specific activity of crustacean gill Na,K-ATPase increases several fold, as seen in *C. maenas, Chasnognathus granulata* (Freire et al., 2007), *C. sapidus* and *Hemigrapsus mulus* (Lucu and Flik, 1999; Castilho et al., 2001; Neufeld et al., 1980; Corotto and Holliday, 1996). Increased Na⁺ transport activity during acelimation can occur by two independent means: positive modulation of preexisting pumps by exogenous and endogenous factors; and/or induction of *de novo* synthesis of additional pump molecules. Western-blotting studies reveal an increase in Na,K-ATPase alpha subunit abundance in gill membranes of *C. maenas* acclimated to low salinity (Lucu and Flik, 1999; Lucu and Towle, 2003), and both the abundance and activity of Na,K-ATPase from the posterior gills increase when *C. sapidus* is transferred from seawater and acclimated to low salinities (Lovett et al., 2006).

Crustacean gill Na,K-ATPases generally exhibit only a single ATP-binding site of low substrate affinity, as seen in *Eriocher* sinensis (K_m =0.25 mM), Uca pugnax (K_m =0.56 mM) and C. granulata (K_m =0.65 mM) (Pequeux etal., 1984; Holliday, 1985 and Castilho et al., 2001). However, like file mammalian enzyme, the C danae gill Na,K-ATPase has both high- and lowaffinity ATP-binding sites (Masui et al., 2003, 2005). Another striking feature of the Na,K-ATPase from C danae gills is that the hydrolysis of ATP but not the hydrolysis of the pseudosubstrate p-nitrophenylphosphate (pNPP) is synergistically stimulated by NH₄⁺ and K⁺ ions (Masui et al., 2003), which suggests that this extra pumping activity at physiological NH₄⁺ concentrations may regulate file active excretion of ammonia across the gill epithelium (Masui et al., 2005).

Elevated levels of mRNA for ornithine decarboxylase and of the enzyme itself, and the consequent production of polyamines, are among the earliest signs that cells have entered their replication cycle (Wu et al., 2007). Highly cationic molecules such as polyamines may bind to nucleic acids with high affinity, suggesting their importance in DNA synthesis and/or regulation. Polyamines inhibit the Na,K-ATPase of various vertebrate tissues supposedly by binding to clusters of acidic residues at the enzyme (Heinrinch-Hirsch et al., 1977; Quarfoth et al., 1978; Robinson et al., 1986; Tashima et al., 1978, Kuntzweiller et al., 1995). While some organisms respond to saline stress by increasing polyamine levels, data for crustaceans are scarce. In Artemia sp. nauplii, putrescine concentration decreases with the increase in salinity of the external medium (Watts et al., 1994). The exposure of C. sapidus to hyperosmotic seawater results in large increases in putrescine and spermine concentrations in the gill cells (Lovett and Watts, 1995). However, the effect of these polyamines on Na,K-ATPase activity is unknown.

The lack of controlled studies encouraged us to examine the effect of exogenously added polyamines on the activity and phosphorylation levels of the Na,K-ATPase from C. danae gills in viro. Putrescine, spermine and spermidine inhibited enzyme activity and interfered in the synergistic stimulation of the ATPase by ammonium and potassium ions. These findings provide useful information on physiological regulation of the Na,K-ATPase when swimming crabs migrate to sea water from freshwater or estuarines.

2. Materials and methods

2.1. Material

All solutions were prepared using Millipore MilliQ ultrapure, apyrogenic water and all reagents were of the highest purity commercially available. Ouabain, ATP sodium salt, Hepes, bistris propane, benzamidine, antipain, leupeptin, pepstatin A, phenyl-methyl-sulphonyl fluoride, imidazole, p-nitrophenylphosphate (pNPP), perchloric acid, putrescine, spermidine, spermine and alamethicin were from Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO. [¹²P] P , was from the Brazilian Institute for Atomic Energy (IPEN). All enzymes employed in [γ⁻³²P]ATP synthesis were from Boehringer Mannheim, Germany. The antibodies against manunalian and avian Na,K-ATPase were from Sigma Co, MO, USA and GeneTex, TX, USA, respectively.

2.2. Gill excision

Adult intermolt specimens of *C. danae* were collected using double rig trawl nets from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. The crabs were transported to the laboratory where they were maintained in tanks containing aerated seawater (33% salinity, 25 °C) and fed on alternate days up to 7 days with shrimp tails. The crabs were weighed (fresh body weight 82.6 ± 17.3 g), carapace width varying from 86 to 93 mm. For each homogenate prepared 5–8 crabs were anesthetized by chilling on crushed ice for 5 min. The carapace was quickly removed and posterior gill pairs 6, 7 and 8 were excised and homogenized in 10 mL of ice cold homogenization buffer, consisting of 20 mM imidazole, pH 6.8 plus 250 mM sucrose, 6 mM EDTA and a proteinase inhibitor cocktail (1 mM benzamidine, 5 μ M antipain, 5 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin A and 5 μ M phenyl– methyl–sulphonyl fluoride).

2.3. Preparation of the gill microsomal fraction

Gills were immediately diced with small scissors and homogenized in the homogenization buffer (20 mL/g wet tissue). After centrifugation of the crude homogenate at 20,000 ×g for 35 min at 4 °C, the supernatant was removed and reserved in an ice bath; the pellet was resuspended in equal volume of homogenization buffer and after further centrifugation as above, the two supernatants were pooled and spinned at 100,000 ×g for 2 h at 4 °C. Finally, the pellet was homogenized in 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, and containing 250 mM sucrose. 0.5-mL aliquots were frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C; no appreciable loss of activity was observed even after 3 months storage. Protein concentration was estimated according to Read and Norflecte (1981). ATPase and p-nitrophenyl phosphatase (pNPPase) activities were measured as described by Furriel et al. (2000).

2.4. Synthesis of [7-32P]ATP

Synfhesis of $[\gamma^{-32}P]$ ATP was performed as described by Walseth and Johnson (1979) with modifications according to Maia et al. (1983).

2.5. Measurement of Na,K-ATPase activity

The Na,K-ATPase activity was assayed by estimating the rate of ³²Pi release from [γ -³²P] ATP hydrolysis by the enzyme as described by Grubmeyer and Penefsky (1981) and Fontes et al. (1999). Briefly, 5-µg aliquots of enzyme homogenate were diluted in a final volume of 0.5 mL of a standard medium consisting of 50 mM bis-tris propane buffer, pH 7.5 and unless otherwise specified in the Figure Legends, 100 mM NaCl, 10 mM KCl and 3 mM MgCl₂. The reaction was performed at 25 °C for 30–40 min and was initiated by the addition of 2 mM ATP/[y-32P] ATP (specific activity 103 cpm/nmol). The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 0.4 M perchloric acid and the tubes were placed in an ice bath. After adding 0.5 mL ice cold water and 400 µL of activated charcoal, the tubes were centrifuged at 700 ×g for 5 min, and 0.8 mL of supernatant was dropped on pieces of Whatman filter papers and dried. The 32Pi on the samples was quantified by liquid scintillation using a Packard Tri-Carb 2100 LSC scintillator. All measurements were performed in the absence and in the presence of 2 mM ouabain, the difference in activity measured representing the Na,K-ATPase activity. The ouabain-inhibitable fraction of ATP hydrolysis represented around 90% of total activity. The effect of exogenous polyamines on Na,K-ATPase activity was examined as above, the enzyme being pre-incubated for 10 min with increasing concentrations of putrescine (from 100 µM up to 10 mM), spermine (from 100 µM up to 2 mM) and spermidine (from 10 µM to 2 mM).

2.6. Phosphorylation measurements and SDS-PAGE evaluation

Enzyme phosphorylation was estimated at 4 °C using 5 µg microsomal protein, in a reaction medium containing 50 mM bistris propane buffer, pH 7.5, 3 mM MgCl2, 20 µM ATP, variable concentrations of Na⁺ and the polyamines as required. The reaction was started by the addition of [\u03c6-32P] ATP (5×105 cpm/ nmol) and stopped after 20 s by the addition of 7% (w/v) perchloric acid. The acid-stable phosphoenzyme formed was centrifuged at 7000 ×g for 5 min, and after discarding the supernatant, the pellet was washed two-fold with MilliQ water, centrifuged under the conditions described above and dissolved in 150 mM Tris-HCl buffer, pH 6.5, containing 5% SDS, 5% dithiothreitol, 10% glycerol and bromophenol blue as the tracking dye. Electrophoresis was performed at pH 6.3, employing a continuous polyacrylamide gradient gel (4-20%) according to Echarte et al. (2001), using a constant current of 60 mA. After staining with Coomassie Blue R, the gel was dried and exposed to KODAK X-OMAT radiography film using a cassette and intensifier screen, for 10 days at -70 °C. Alternatively, the gel was read automatically, using a phospho-imaging device from Molecular Dynamics and STORM software.

2.7. Western blotting

Western blotting was performed according to Fontes et al. (1999), using commercial antibodies against the α l subunit from dog kidney and chicken (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) together with Coomassie blue R-stained molecular makers (βgalactosidase, 110 kDa; bovine albumin, 66 kDa; egg albumin, 45 kDa and bovine eryfhrocyte superoxide dismutase, 16.3 kDa).

2.8. Estimation of kinetic parameters

The kinetic parameters V (maximum velocity), K (apparent dissociation constant or Michaelis–Menten constant) and the $n_{\rm H}$ value (Hill coefficient) estimated for ATP hydrolysis were calculated using SygrafW software (Leone et al., 2005). The curves presented are those which best fit the experimental data. synthesis were from Boehringer Mannheim, Germany. The antibodies against manunalian and avian Na,K-ATPase were from Sigma Co, MO, USA and GeneTex, TX, USA, respectively.

2.2. Gill excision

Adult intermolt specimens of *C. danae* were collected using double rig trawl nets from Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. The crabs were transported to the laboratory where they were maintained in tanks containing aerated seawater (33% salinity, 25 °C) and fed on alternate days up to 7 days with shrimp tails. The crabs were weighed (fresh body weight 82.6 ± 17.3 g), carapace width varying from 86 to 93 mm. For each homogenate prepared 5–8 crabs were anesthetized by chilling on crushed ice for 5 min. The carapace was quickly removed and posterior gill pairs 6, 7 and 8 were excised and homogenized in 10 mL of ice cold homogenization buffer, consisting of 20 mM imidazole, pH 6.8 plus 250 mM sucrose, 6 mM EDTA and a proteinase inhibitor cocktail (1 mM benzamidine, 5 μ M antipain, 5 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin A and 5 μ M phenyl– methyl–sulphonyl fluoride).

2.3. Preparation of the gill microsomal fraction

Gills were immediately diced with small scissors and homogenized in the homogenization buffer (20 mL/g wet tissue). After centrifugation of the crude homogenate at 20,000 ×g for 35 min at 4 °C, the supernatant was removed and reserved in an ice bath; the pellet was resuspended in equal volume of homogenization buffer and after further centrifugation as above, the two supernatants were pooled and spinned at 100,000 ×g for 2 h at 4 °C. Finally, the pellet was homogenized in 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, and containing 250 mM sucrose. 0.5-mL aliquots were frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C; no appreciable loss of activity was observed even after 3 months storage. Protein concentration was estimated according to Read and Norflecte (1981). ATPase and p-nitrophenyl phosphatase (pNPPase) activities were measured as described by Furriel et al. (2000).

2.4. Synthesis of [7-32P]ATP

Synfhesis of $[\gamma^{-32}P]$ ATP was performed as described by Walseth and Johnson (1979) with modifications according to Maia et al. (1983).

2.5. Measurement of Na,K-ATPase activity

The Na,K-ATPase activity was assayed by estimating the rate of ³²Pi release from $[\gamma^{-32}P]$ ATP hydrolysis by the enzyme as described by Grubmeyer and Penefsky (1981) and Fontes et al. (1999). Briefly, 5-µg aliquots of enzyme homogenate were diluted in a final volume of 0.5 mL of a standard medium consisting of 50 mM bis-tris propane buffer, pH 7.5 and unless otherwise specified in the Figure Legends, 100 mM NaCl, 10 mM KCl and 3 mM MgCl₂. The reaction was performed at 25 °C for 30–40 min and was initiated by the addition of 2 mM ATP/[y-32P] ATP (specific activity 103 cpm/nmol). The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 0.4 M perchloric acid and the tubes were placed in an ice bath. After adding 0.5 mL ice cold water and 400 µL of activated charcoal, the tubes were centrifuged at 700 ×g for 5 min, and 0.8 mL of supernatant was dropped on pieces of Whatman filter papers and dried. The 32Pi on the samples was quantified by liquid scintillation using a Packard Tri-Carb 2100 LSC scintillator. All measurements were performed in the absence and in the presence of 2 mM ouabain, the difference in activity measured representing the Na,K-ATPase activity. The ouabain-inhibitable fraction of ATP hydrolysis represented around 90% of total activity. The effect of exogenous polyamines on Na,K-ATPase activity was examined as above, the enzyme being pre-incubated for 10 min with increasing concentrations of putrescine (from 100 µM up to 10 mM), spermine (from 100 µM up to 2 mM) and spermidine (from 10 µM to 2 mM).

2.6. Phosphorylation measurements and SDS-PAGE evaluation

Enzyme phosphorylation was estimated at 4 °C using 5 µg microsomal protein, in a reaction medium containing 50 mM bistris propane buffer, pH 7.5, 3 mM MgCl2, 20 µM ATP, variable concentrations of Na⁺ and the polyamines as required. The reaction was started by the addition of [\u03c6-32P] ATP (5×105 cpm/ nmol) and stopped after 20 s by the addition of 7% (w/v) perchloric acid. The acid-stable phosphoenzyme formed was centrifuged at 7000 ×g for 5 min, and after discarding the supernatant, the pellet was washed two-fold with MilliQ water, centrifuged under the conditions described above and dissolved in 150 mM Tris-HCl buffer, pH 6.5, containing 5% SDS, 5% dithiothreitol, 10% glycerol and bromophenol blue as the tracking dye. Electrophoresis was performed at pH 6.3, employing a continuous polyacrylamide gradient gel (4-20%) according to Echarte et al. (2001), using a constant current of 60 mA. After staining with Coomassie Blue R, the gel was dried and exposed to KODAK X-OMAT radiography film using a cassette and intensifier screen, for 10 days at -70 °C. Alternatively, the gel was read automatically, using a phospho-imaging device from Molecular Dynamics and STORM software.

2.7. Western blotting

Western blotting was performed according to Fontes et al. (1999), using commercial antibodies against the α 1 subunit from dog kidney and chicken (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) together with Coomassie blue R-stained molecular makers (βgalactosidase, 110 kDa; bovine albumin, 66 kDa; egg albumin, 45 kDa and bovine eryfhrocyte superoxide dismutase, 16.3 kDa).

2.8. Estimation of kinetic parameters

The kinetic parameters V (maximum velocity), K (apparent dissociation constant or Michaelis–Menten constant) and the $n_{\rm H}$ value (Hill coefficient) estimated for ATP hydrolysis were calculated using SygrafW software (Leone et al., 2005). The curves presented are those which best fit the experimental data.

Table 1 Kinetic parameters for spermidine-induced inhibition of C. danae gill Na,K-ATP ase activity

Ion	Parameter	Control	2 mM Spermidine
Na ⁺	V (nmol/min/mg)	287.0±5.0	239.0±8.1
	nu	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.38
	$K_{0.5}$ (mM)	3.47 ± 0.31	5.35±0.38
к*	V (nmol/min/mg)	277.0±5.75	235.0±10.21
	n _H	1.0 ± 0.19	1.1 ± 0.1073
	$K_{0.5}$ (mM)	1.65±0.3079	1.92 ± 0.2052
NH_4^+	V (nmol/min/mg)	500.1±9.2	372.1 ± 6.1
	n _H	1.3 ± 0.11	0.97 ± 0.24
	$K_{0.5 mp}$ (mM)	10.85 ± 0.3	11.1 ± 0.12

The kinetic parameters are calculated values and are the mean \pm S.D. of at least four different C. damae gill microsomal preparations (N \geq 4).

thaliana (Bagni et al., 2006) and in Synechocystis sp., a unicellular cyanobacterium, in which artificially induced hyperosmotic stress up-regulates spermidine biosynthesis (Jantaro et al., 2003).

The gill Na,K-ATPase from C. danae was inhibited by putrescine (Fig. 2A), spermidine (Fig. 2B) and spermine (Fig. 2C). Under optimal Na+ (100 mM) and K+ (10 mM) concentrations, increasing polyamine concentrations from 1 to 5 mM, inhibited Na,K-ATPase activity by 20%. In contrast, at 10-fold-lower ion concentrations (10 mM Na⁺ and 1 mM K⁺), spermine and spermidine, but not putrescine, caused 40% inhibition, as also reported by Quarfoth et al. (1978). The difference between optimal and low Na⁺ and K⁺ concentrations was not significant for putrescine inhibition, but was statistically significant for spermine and spermidine inhibition (paired t-Test). However, our findings contrast with those of Tashima et al. (1978), suggesting that spermine may activate the Na,K-ATPase, under specific low ionic and substrate concentrations. The effectiveness of polyamines as inhibitors was putrescine < spermidine < spermine, independently of ionic concentration.

The influence of ionic concentration on inhibition of Na.K-ATPase activity by spermine and spermidine appears to be attributable to both charge density and size. At physiological pH, the amino groups of these molecules are protonated, resulting in a greater charge density for spermine (four positive charges) than putrescine (two positive charges). Thus, the greater the availability of positive charges in the polyamine structure (Fig. 1), the greater the chance of interaction with the cation-binding domain of the Na, K-ATPase, classically described as being rich in acidic amino acid residues in mammals (Kuntzweiller et al., 1995; Koster et al., 1996; Nielsen et al., 1998). Further, considering the direct relationship between the length of the polyamine carbon chain and inhibition, longer chain polyamines may induce more effective steric hindrance on enzyme cation-binding sites. A similar inhibition pattern for erythrocyte Na,K-ATPase has been observed for polyamines secreted by cancer cells (Villano et al., 2001).

Spermine is generally located in the cell nucleus where it interacts primarily with chromatin (Tabor and Tabor, 1984). It seems unlikely that spermine might play a physiological role on plasma membrane Na,K-ATPase in C. danae gills, although "in vitro" it exerts a strong inhibitory effect that may help to

elucidate the catalytic cycle from crustacean Na⁺, K⁺-ATPase. Thus, and taking into account the weak inhibitory effect of putrescine (Fig. 2), we focused on the effect of spermidine on cation activation of C. danae Na,K-ATPase, which was inhibited by spermidine at all stimulating cation (Na⁺, K⁺ and NH4) concentrations, V always being reduced. Spermidineinduced effects on the kinetic parameters of ATP hydrolysis are given in Table 1. The kinetic analysis of the spermidine effect on Na⁺ activation of ATP hydrolysis (Fig. 3) suggests that this polyamine is a mixed inhibitor, reducing V by 30% and reducing Na⁺ affinity from 3.47±0.30 to 5.35 mM±0.38 (Table 1). This shift in Na⁺ affinity is similar to that observed for the canine kidney enzyme (Robinson et al., 1986). There was a slight increase in K_{0.5} for K⁺ (Fig. 4), and the effect on V also suggests mixed-partial inhibition (Fig. 4 and Table 1). Similar effect of polyamines on cation sites has been reported by Villano et al. (2001).

At physiological pH, around 99% of the ammonia in the hemolymph is in the NH⁴₄ form and it can substitute for K⁺ in the basal Na,K-ATPase and for H⁺ in apical exchangers (Morris, 2001; Masui et al., 2002; Weihrauch et al., 1998, 1999). When fully saturated by K⁺, the *C. danae* Na,K-ATPase is further activated by NH⁴₄ in a ouabain-sensitive manner, suggesting the existence of a second, previously unknown, independent, ammonium-binding site (Masui et al., 2005) that affects both Na⁺ and Mg²⁺ binding. There is a clear link between Na⁺ hyperregulation, ammonium excretion and Na,K-ATPase activity in *C. danae* posterior gills (Masui et al., 2005).

The spermidine-induced decrease in V for ATP hydrolysis occurs even when the enzyme is over-stimulated by NH⁴₄. These data were not fitted to the Lineweaver-Burk equation owing to the unusual curve shape, particularly the inhibition seen at NH⁴₄ concentrations higher than 50 mM (data not shown). Calculating the kinetic parameters considering maximal activation at 50 mM NH⁴₄ (Fig. 5) revealed a spermidine-induced reduction in apparent



Fig. 3. Effect of spermidine on Na⁺-stimulated ATP hydrolysis. The microsomal function was preincubated in the absence (\bullet) or in the presence of (\Box) of 2 mM spemidine for 10 min before starting the reaction. ATP hydrolysis was initiated by the addition of 2 mM radioactive ATP tracer, in a standard reaction medium containing 10 mM KCl and increasing Na⁺ concentrations. Data are the mean± S.D. from at least four different experiments using different preparations (N \geq 4). Inset% inhibition by spemidine as a function of Na⁺ concentration.

627

E.C.C. Silva et al. / Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 149 (2008) 622-629



Fig. 4. Effect of spermidine on K⁺-stimulated ATP hydrolysis. The microsonnal fraction was preincubated in the absence (\bullet) or in the presence of (\odot) of 2 mM spemidime for 10 min before starting the reaction. ATP hydrolysis was started by the addition of 2 mM radioactive ATP tracer, in a standard reaction medium containing 100 mM NaCl and increasing K⁺ concentrations. Data are the mean ±S.D. from at least four experiments using different preparations (N ≥ 4).

V with insignificant changes in apparent affinity for NH_4^+ . The V, K_{0.5} and n_H values (Table 1) agree with those described by Masui et al. (2002, 2005) and Lucu and Flik (1999). However, we found n_H values of around 1 for K⁺-stimulation of the ATP hydrolysis rafter than cooperative kinetics.

Our in vitro findings together with Lovett and Watts (1995) in vivo data suggest that the increase in gill polyamine production seen in C. sapidus migrating to seawater from brackish or freshwater induces short-term inhibition of Na,K-ATPase activity, diminishing unnecessary energy expenditure underlying the reduced demand for Na⁺ absorption. Unlike reptiles, birds and mammals, most crustaceans are ammoniotelic, excreting metabolic end products in the form of NH₃⁺ and NH₄⁺,



Fig. 5. Effect of spermidine on NH²₄-stimulated ATP hydrolysis. The microsomal fraction was preincubated in the absence (Φ) or in the presence of (\odot) of 2 mM spemidine for 10 min before starting the eraction. ATP hydrolysis was started by the addition of 2 mM of radioactive tracer, in a standard reaction medium containing 100 mM NaCl, 10 mM KCl and increasing NH²₄ concentrations. Non-linear drawer fitted considering 50 mM NH²₄ to be the point of maximum activation. Data are the mean±S.D. from at least three experiments using different preparations (N \geq 3).



Fig. 6. Effect of Na⁺ on the phosphorylation of *Callimetes damae* gill Na,K-ATPase by ATP. The microsomal fraction was phosphorylated, at 4 °C, by 20 μM ⁵²P-γ-ATP (specific activity of 4×10⁵ cpm.nmol⁻¹) in a standard reaction medium containing increasing Na⁺ concentrations, but no added KCL Lane 1 and 2 were revealed by Westem-blotting using antibodies against the α-1 subunit of the Na,K-ATPase and against avian α-1 subunit of Na,K-ATPase (which recognizes *C.duma* Na,K-ATPase), respectively. Lanes 3 to 9 were revealed by autoradiography, and demonstrate the effect of increasing Na⁺ concentrations in the phosphorylation medium. Lane MW: Coornassie-blue R-stained molecular markets; Lane 1: 30 µg highly purified pig kidney outer meddilla Na,K-ATPase; Iane 2: 30 µg *C. dumae* gill microsonal preparation; Lane 3 Na⁺ absent; Lane 4: 1 mM Na⁺; Lane 5: 3 mM Na⁺; Lane 6: 5 mM Na⁺; Lane 7: 7 mM Na⁺; Lane 8: 10 mM Na⁺; Lane 5: 30 mM Na⁺.

independently of the environmental salinity. Such excretion, however, occurs primarily through the gills, and only 2% of total ammonium is excreted through the urinary tract (Kormanik and Cameron, 1981; Cameron and Batterton, 1978). Ammonia is very toxic and its accumulation in the hemolymph can inhibit the iono-regulatory functions of the gills, inducing changes in membrane permeability and cation fluxes, leading to pathological changes in gill cell ultrastructure, and increasing vulnerability to pathogens (Young-Lai et al., 1991; Harris et al., 2001). Conversely, when C danae penetrates into freshwater, the additional pumping provided by the increase in NH₄²-stimulated Na₄K-ATPase activity may aid in avoiding the accumulation of toxic ammonium resulting from polyamine degradation.

Since at saturating Na⁺ concentrations the polyamines inhibit Na⁺-stimulated ATPase activity, we also examined the effect of spermidine on ATP-driven phosphorylation of *C. danae* Na,K-ATPase. At concentrations as low as 20 µM ATP, increasing Na⁺ concentrations induced enzyme phosphorylation (Fig. 6), which



Fig. 7. Effect of polyamines on Phosphorylation of *C* damae gill Ni, K-ATPase by ATP Samples (10 µg) of previously phosphorylated *C* damae Ni, K-ATPase were applied to a linear 4-20% gradient SDS-PAGE gel. The enzyme was phosphorylatedby 20 μ M ³⁵P- γ -ATP (specific activity of 4×10⁵ cpm.nmof⁻¹) in the presence of pattescine, spennine or spennidine in two different reaction media containing high (100 mM) or low (10 mM) Na⁺ concentrations. Lanes 1, 3, 5 and 7 correspond to the enzyme phosphorylated in the presence of 10 mM Na⁺. Lanes 1, 4, 6 and 8 correspond to phosphorylation in the presence of 100 mM Na⁺. Lanes 1 and 2: controls; Lanes 3 and 4: 10 mM pattescine; Lanes 5 and 6: 2 mM spermine; Lanes 7 and 8: 2 mM spenmidine.

628

corroborates findings of Masui et al. (2002) revealing both catalytic and regulatory ATP sites on C. danae enzyme.

The effect of the polyamines on ATP-driven phosphorylation of the Na,K-ATPase also was analyzed using different Na concentrations (Fig. 7). At 10 mM Na⁺, spermine and spermidine blocked the formation of the phosphorylated intermediate (E-P) form of the Na, K-ATPase, which was not found for putrescine, the weaker inhibitor of the three polyamines used. However, when Na⁺ was increased to 100 mM, there was a marked increase in E-P accumulation independently of the polyamine used. At high Na' concentrations, the crustacean enzyme would be in the E1-form, but during ATP hydrolysis, the presence of 10 mMK⁺ would lead to a reduction in steady-state phosphoenzyme levels. Given that polyamines stabilize the E-P form, our findings suggest that the inhibition of ATP hydrolysis rate by polyamines may result from impairment of the dephosphorylation reaction and subsequent steps in the Na,K-ATPase catalytic cycle. The inhibition of phosphorylation seen at low Na⁺ concentrations agrees with the increase in K05 for Na+ shown in Fig. 3. However, in contrast to the purely competitive inhibition reported for mammalian enzymes (Quarfoth et al., 1978; Robinson et al., 1986), spermidine exhibited a mixed-partial inhibition pattern with regard to Na⁺ and K⁺ (Figs. 3 and 4), and a non-competitive inhibition pattern for NH4⁺ stimulation of the enzyme fully saturated by K⁺ (Fig. 5).

Our findings suggest that polyamines inhibit C. danae gill Na,K-ATPase activity, at least at two steps of it's the catalytic cycle. At low Na⁺ concentrations (10 mM), spermidine reduces the apparent affinity of the enzyme for Na7 ions at the cytoplasmic sites, blocking the formation of the E-P form and inhibiting activity up to 40-45%. When Na⁺ concentration increases to 100 mM, the cation-binding sites become saturated, and spermine, spermidine and putrescine act as weaker inhibitors of ATP hydrolysis an effect attributable to their stabilization of the phosphorylated intermediate steady-state, with a possible reduction in dephosphorylation rates, which may act as a ratelimiting step for the ATPase hydrolysis cycle under these conditions. Thus, at any Na⁺ concentration, the physiological level of spermidine is one of the main controls of Na⁺.K⁺-ATPase activity, in accordance with the ecological observation that polyamines increase upon brackish water-sea water migration to reduce the enzyme activity.

Acknowledgments

We thank Rosangela Ferreira, UFRJ, for excellent technical assistance. This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). CFLF, HB, HMS, FAL and JCM received research scholarships from CNPq. ECCS received a post-graduate scholarship from CNPq, and DCM is a postdoctoral investigator financed by FAPESP.

References

Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J. Mol. Evol. 46, 84–101.

- Bagni, N., Ruiz-Camaco, K., Franceschetti, M., Fomale, S., Fomasieno, R.B., Tassoni, A., 2006. Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in Ambidopsis thaliana under salt stress. Plant Physiol. Biochem. 44, 776–786.
- Cameron, J.N., Batterton, C.V., 1978. Antennul gland function in the freshwater ends, Callineetes sapidus; water electrolyte, acid-base and ammonia excretion. J. Comp. Physici. 123, 143–148.
- Castilho, P.C., Martins, I.A., Bianchini, A., 2001. Gill Na+,K+-ATPase and osmoregulation in the estuarine cntb, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 256, 215–227.
- Chacur, M.M., Negreiros-Finnscoo, M.L., 2001. Spatial and seasonal distributions of *Callinextes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. J. Custac. Biol. 21, 414–425.
- Conoto, F.S., Holliday, C.W., 1996. Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the pupple shore enab, *Homigrapsus mulus* (Dana). Comp. Biochem. Physiol. 113A, 361–368.
- Echarie, M.M., Levi, V., Villamil, A.M., Rossi, R.C., Rossi, J.P., 2001. Quantitation of plasma membrane calcium pump phosphorylated intermediates by electrophoresis. Anal. Biochem. 289, 267–273.
- Fontes, C.L.F., Lopes, E.E.V., Scofano, H.M., Barnbin, H., Norby, J.G., 1999. Stimulation of ounbrain binding to Na⁺, K⁺-ATP are in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATP are preparations. Arch. Biochem. Biophys. 366, 215–223.
- Faeire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2007. A structure-function analysis of ion transport in custacean gills and exercisery organs. Comp. Biochem. Physiol. A. doi:10.1016/j.dpn.2007.05.008. Epub ahead of pint. Furriel, R.P.M., McNaman, J.C., Leone, F.A., 2000. Characterization of (Na⁺,
- Furriel, R.P.M., McNaman, J.C., Leone, F.A., 2000. Characterization of (Na", K")-ATPase in gill microscomes from the freshwater shrimp Macrobachium offersii. Comp. Biochem. Physiol. B 126, 303–315.
- Glynn, I.M., 1999. Annual Review Prize Lecture. "All Hands to the Sodium Pump". J. Physiol. 462, 1–30.
- Grubmeyer, C., Peneßky, H.S., 1981. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 256, 3718–3727.
- Guerin, J.L., Stickle, W.B., 1997. A comparative study of two sympattic species within the genus Callinectes: comoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 218, 165–186.
- Harris, R.R., Coley, S., Collins, S., Macabe, R., 2001. Auronomia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacificcatus lenisculus* (Data). J. Comp. Physiol. B 171, 681–693.
- Heinrinch-Hirsch, B., Ahleers, J., Peter, J.W., 1977. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from chick brain by polyamine. Enzyme 22, 235–241.
- Hollichy, C.D., 1985. Salinity-induced changes in gill Na⁺K⁺ATPase in the mud fiddler erab, Uca pugnax. J. Exp. Zool. 233, 199–208. Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P., Incharoenskadi, A., 2003. Content and
- biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of Sinechocyatis sp. PCC6803. FEMS Microb. Lett. 228, 129–155. Jorgensen, P.L., Pedersen, P.A., 2001. Structure function relationshies of Na⁺,
- Jorgensen, P.L., Pedenen, P.A., 2001. Structure function relationships of Na⁺, K⁺, ATP or Mg⁺₂ binding and energy transduction in Na⁺,K⁺-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 1365, 65–70.
- Kapha, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. Ann. Rev. Biochem. 71, 511–533.
- Khodahandeh, S., Kutnik, M., Aujoulat, F., Charmantier, G., Charmantier, Duares, M., 2005. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Attacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): imunnolocalization of the Na⁺,K⁺-ATPase. Cell Tiss. Res. 319, 167–174.
- Kormanik, G.A., Caneson, J.N., 1981. Annonia excretion in the seawater blue (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not Na⁺/NH⁺₀ exchange. J. Comp. Physiol. 141B, 457–462.
- Koster, J.C., Blanco, G., Mills, P.B., Mercer, R.W., 1996. Substitutions of glutamate 781 in the Na⁺,K⁺-ATPase α-subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased a flinity for ATP.J. Biol. Chem. 271, 2413–2421.
- Kuntzweiller, T.A., Wallick, E.T., Johnson, C.L., Lingrel, J., 1995. Glutamic acid 327 in the sheep o1 isoform of Na+,K+-ATPase stabilizes a K+-induced conformational change. J. Biol. Chem. 270, 2993–3000.
- Lovett, D.L., Watts, S.A., 1995. Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crub *Callinectes sapidus Rathburn*. Comp. Biochem. Physiol. B. 110, 115–119.

corroborates findings of Masui et al. (2002) revealing both catalytic and regulatory ATP sites on C. danae enzyme.

The effect of the polyamines on ATP-driven phosphorylation of the Na,K-ATPase also was analyzed using different Na concentrations (Fig. 7). At 10 mM Na⁺, spermine and spermidine blocked the formation of the phosphorylated intermediate (E-P) form of the Na, K-ATPase, which was not found for putrescine, the weaker inhibitor of the three polyamines used. However, when Na⁺ was increased to 100 mM, there was a marked increase in E-P accumulation independently of the polyamine used. At high Na' concentrations, the crustacean enzyme would be in the E1-form, but during ATP hydrolysis, the presence of 10 mMK⁺ would lead to a reduction in steady-state phosphoenzyme levels. Given that polyamines stabilize the E-P form, our findings suggest that the inhibition of ATP hydrolysis rate by polyamines may result from impairment of the dephosphorylation reaction and subsequent steps in the Na,K-ATPase catalytic cycle. The inhibition of phosphorylation seen at low Na⁺ concentrations agrees with the increase in K05 for Na+ shown in Fig. 3. However, in contrast to the purely competitive inhibition reported for mammalian enzymes (Quarfoth et al., 1978; Robinson et al., 1986), spermidine exhibited a mixed-partial inhibition pattern with regard to Na⁺ and K⁺ (Figs. 3 and 4), and a non-competitive inhibition pattern for NH4⁺ stimulation of the enzyme fully saturated by K⁺ (Fig. 5).

Our findings suggest that polyamines inhibit C. danae gill Na,K-ATPase activity, at least at two steps of it's the catalytic cycle. At low Na⁺ concentrations (10 mM), spermidine reduces the apparent affinity of the enzyme for Na7 ions at the cytoplasmic sites, blocking the formation of the E-P form and inhibiting activity up to 40-45%. When Na⁺ concentration increases to 100 mM, the cation-binding sites become saturated, and spermine, spermidine and putrescine act as weaker inhibitors of ATP hydrolysis an effect attributable to their stabilization of the phosphorylated intermediate steady-state, with a possible reduction in dephosphorylation rates, which may act as a ratelimiting step for the ATPase hydrolysis cycle under these conditions. Thus, at any Na⁺ concentration, the physiological level of spermidine is one of the main controls of Na⁺.K⁺-ATPase activity, in accordance with the ecological observation that polyamines increase upon brackish water-sea water migration to reduce the enzyme activity.

Acknowledgments

We thank Rosangela Ferreira, UFRJ, for excellent technical assistance. This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). CFLF, HB, HMS, FAL and JCM received research scholarships from CNPq. ECCS received a post-graduate scholarship from CNPq, and DCM is a postdoctoral investigator financed by FAPESP.

References

Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J. Mol. Evol. 46, 84–101.

- Bagni, N., Ruiz-Carnaco, K., Franceschetti, M., Fomale, S., Fomasieno, R.B., Tassoni, A., 2006. Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in Ambidopsis thaliana under salt stress. Plant Physiol. Biochem. 44, 776–786.
- Cameron, J.N., Batterton, C.V., 1978. Antennal gland function in the freshwater enals, Callineetes sapidus; water electrolyte, acid-base and ammonia excretion. J. Comp. Physici. 123, 143–148.
- Castilho, P.C., Martins, I.A., Bianchini, A., 2001. Gill Na+,K+-ATPase and osmoregulation in the estuarine cntb, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 256, 215–227.
- Chacur, M.M., Negreiros-Finnscoo, M.L., 2001. Spatial and seasonal distributions of *Callineetes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil, J. Custac, Biol. 21, 414–425.
- Conoto, F.S., Holliday, C.W., 1996. Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the pupple shore enab, *Homigrapsus mulus* (Dana). Comp. Biochem. Physiol. 113A, 361–368.
- Echarie, M.M., Levi, V., Villamil, A.M., Rossi, R.C., Rossi, J.P., 2001. Quantitation of plasma membrane calcium pump phosphorylated intermediates by electrophoresis. Anal. Biochem. 289, 267–273.
- Fontes, C.L.F., Lopes, E.E.V., Scofano, H.M., Barnbin, H., Norby, J.G., 1999. Stimulation of ounloain binding to Na⁺, K⁺-ATP ase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATPase preparations. Arch. Biochem. Biophys. 366, 215–223.
- Faeire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2007. A structure-function analysis of ion transport in custacean gills and exercisery organs. Comp. Biochem. Physiol. A. doi:10.1016/j.dpn.2007.05.008. Epub ahead of pint. Furriel, R.P.M., McNaman, J.C., Leone, F.A., 2000. Characterization of (Na⁺,
- Furnel, R.P.M., McNaman, J.C., Leone, F.A., 2000. Characterization of (Na', K')-ATPase in gill microscomes from the freshwater shrimp Macrobinchium offersii. Comp. Biochem. Physiol. B 126, 303–315.
- Glynn, I.M., 1993. Annual Review Prize Lecture. "All Hands to the Sodium Pump". J. Physiol. 462, 1–30.
- Grubmeyer, C., Peneßky, H.S., 1981. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 256, 3718–3727.
- Guerin, J.L., Stickle, W.B., 1997. A comparative study of two sympattic species within the genus Callinectes: comoregulation, long-term acclination to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 218, 165–186.
- Harris, R.R., Coley, S., Collins, S., Macabe, R., 2001. Auronomia uptake and its effects on ionoregulation in the freshwater crayfish *Pacificcatus lenisculus* (Data). J. Comp. Physiol. B 171, 681–693.
- Heinrinch-Hirsch, B., Ahleers, J., Peter, J.W., 1977. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from chick brain by polyamine. Enzyme 22, 235–241.
- Hollichy, C.D., 1985. Salinity-induced changes in gill Na⁺,K⁺-ATP are in the mud fiddler erab, Uca pugnax. J. Exp. Zool. 233, 199–208. Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P., Incharoenskadi, A., 2003. Content and
- biosynthesis of polyamines in sult and osmotically stressed cells of *Sine-chocyntis sp.* PCC6803. FEMS Microb. Lett. 228, 129–155.
- Jorgensen, P.L., Pedersen, P.A., 2001. Structure function relationships of Na⁺, K⁺, ATP or Mg⁺₂ binding and energy transduction in Na⁺,K⁺-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 1365, 65–70.
- Kapha, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. Ann. Rev. Biochem. 71, 511–533.
- Khodahandeh, S., Kutnik, M., Aujoulat, F., Charmantier, G., Charmantier-Duares, M., 2005. Ontogeny of the antennal glands in the emyfish Astaeus leptodactylus (Crustacea, Decapoda): imunnolocalization of the Na⁺,K⁺-ATPase. Cell Tiss. Res. 319, 167–174.
- Kormanik, G.A., Caneson, J.N., 1981. Annonia excretion in the seawater blue (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not Na⁺/NH⁺₀ exchange. J. Comp. Physiol. 141B, 457–462.
- Koster, J.C., Blanco, G., Mills, P.B., Mercer, R.W., 1996. Substitutions of glutamate 781 in the Na⁺,K⁺-ATPase α-subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased a flinity for ATP.J. Biol. Chem. 271, 2413–2421.
- Kuntzweiller, T.A., Wallick, E.T., Johnson, C.L., Lingrel, J., 1995. Glutamic acid 327 in the sheep o1 isoform of Na+,K+-ATPase stabilizes a K+-induced conformational change. J. Biol. Chem. 270, 2993–3000.
- Lovett, D.L., Watts, S.A., 1995. Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue erab Call invertes sapidus Bathburn. Comp. Biochem. Physiol. B. 110, 115–119.
Curriculum Vitae

Nome: Elias Cristiano Candido da Silva Nascimento: 06 de janeiro de 1976 Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica - Farmácia – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 1996 a julho de 2000.

- Doutorado em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Comunicações em Congressos:

- 08 comunicações em congressos nacionais

- 01 comunicação em congresso internacional

Publicações

Silva, E.C.C, Masui, DC, Furriel RP, Mantelatto FL, McNamara JC, Barrabi H, Leone FA, Scofano HM & Fontes CFL (2008) Regulation by exogenous polyamine spermidine of Na.K-ATPase activity from gills of the euryhaline swimming crab *Callinectess danae* (Brachyuria, Portunidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149 (4):622-629

Masui DC, Furriel RP, Silva ECC, Mantellato FL FL, McNamara JC, Barrabi H, Scofano HM, Fontes CFL, & Leone FA (2005) Gill microsomal Na,K-ATPase from blue crab *Callinectes danae*:Interaction at cationic sites. *Int J Biochem Cell Biol* **37** (12): 2521-35

Alves-Ferreira M, **da Silva ECC**, Ferreira-Pereira A & Scofano HM (2002) Regulatory differences between Ca(2+)ATPase in plasma membrane from chicken (nucleated) and pig (anucleated) erythrocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **131** (4):405-15

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo